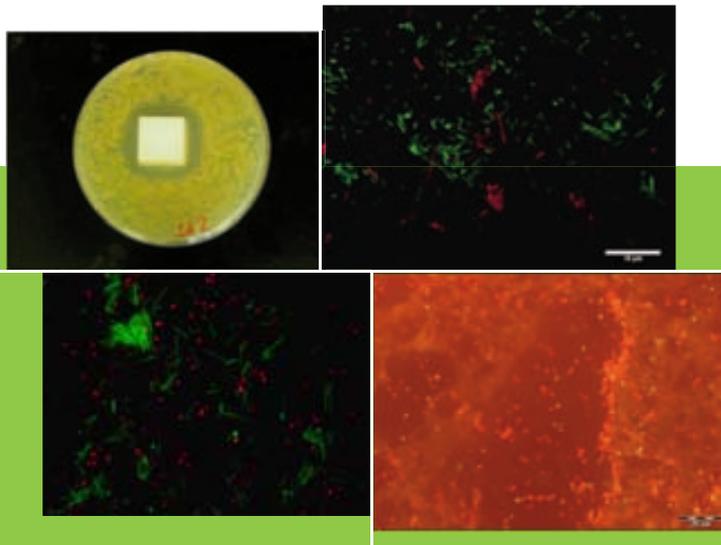


EVALUACIÓN DEL NIVEL DE CONTAMINACIÓN DE SUPERFICIES Y LA EFICACIA DE PRODUCTOS DESINFECTANTES A CORTO Y LARGO PLAZO. NUEVOS MÉTODOS



TESIS DOCTORAL

Abel Guillermo Ríos Castillo

Director: José Juan Rodríguez Jerez

Departament de Ciència Animal i dels Aliments

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

2013



Universitat Autònoma de Barcelona

**Evaluación del nivel de contaminación de superficies
y la eficacia de productos desinfectantes a corto
y largo plazo. Nuevos métodos.**

Abel Guillermo Ríos Castillo

Tesis Doctoral

Memoria presentada al Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la
Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona para optar
al grado de Doctor

Director: José Juan Rodríguez Jerez

Programa de Doctorado en Ciencia de los Alimentos



Facultat de Veterinària
Bellaterra, 2013

JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ JEREZ, profesor titular del área de nutrición y bromatología del Departament de Ciència Animal i dels Aliments de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona

HACEN CONSTAR:

Que la memoria titulada “Evaluación del nivel de contaminación de superficies y la eficacia de productos desinfectantes a corto y largo plazo. Nuevos métodos”, presentada por Abel Guillermo Ríos Castillo para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona, ha sido realizada bajo su dirección y considerándola finalizada, autoriza su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Bellaterra, a día 11 de noviembre del 2013.

José Juan Rodríguez Jerez

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis doctoral no habría sido posible sin la colaboración y el apoyo de muchas personas e instituciones, a las cuales quiero transmitir mis más sinceros agradecimientos:

A José Juan Rodríguez Jerez, director de la tesis, por su permanente apoyo, la constancia y los consejos durante la elaboración de este trabajo y en mi formación.

A la Fundació per als Estudis de Prevenció i Seguretat Integral de la UAB (FEPSI) por la financiación de esta tesis en el programa de becas predoctorales para la formación de investigadores.

A Kim D. Thompson y Alexandra Adams del Institute of Aquaculture, University of Stirling, Scotland, por aceptarme como parte de su equipo y realizar la parte correspondiente de este proyecto en dicha institución.

A Manuela Hernández, por su constante apoyo académico y en el trabajo de laboratorio.

Al equipo del Observatorio de la Seguridad Alimentaria de la UAB (OSA): Fabián González Rivas, Dora Salas Vázquez, Alfred Torres Altarriba, Vanessa Montañez Izquierdo y Fabio Fontecha Umaña por el aporte de sus experiencias y el compañerismo de trabajo.

A los compañeros con quienes he compartido muchas horas en los laboratorios: Dolors, Diana, Nelly, Ángela, Genaro, Natàlia, Fabio, Beatriz, Anyi, Khaty, Jacira, Dora Cecilia, Rita, Idoia, Sonia y Sònia.

A cada uno de los integrantes del Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

A Mariló Caballer Gil y a mi hermano, David Ríos Castillo, por la dedicación en la edición digital de esta tesis.

A mis padres, Isabel Ruth y Medardo Guillermo, y mis hermanos, Ysabel, Ángel, Ana y David, por todo su apoyo en esta trayectoria.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XIII
RESUMEN	XV
ABSTRACT	XVII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	9
3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	11
3.1. Enfermedades de origen bacteriano transmitidas por alimentos .	13
3.2. Superficies y contaminación cruzada	14
3.3. Adherencia bacteriana a superficies	15
3.4. Biofilms	16
3.5. Proceso de formación de los biofilms	16
3.6. Factores que intervienen en la formación de los biofilms	20
3.7. Proceso de higienización	21
3.7.1. Limpieza	21
3.7.2. Desinfección	22
3.8. Etapas de la limpieza y desinfección	22
3.9. Características de un buen desinfectante	24
3.10. Tipos de desinfectantes	24
3.10.1. Alcoholes	25
3.10.2. Hipoclorito de sodio	26

3.10.3. Peróxido de hidrógeno	27
3.10.4. Productos reductores	27
3.10.5. Productos basados en tensoactivos.....	28
3.10.6. Compuestos de amonio cuaternario.....	28
3.10.6.1. Cloruro de benzalconio	30
3.10.7. Productos ácidos y álcalis.....	30
3.10.8. Fenoles.....	31
3.11. Factores que afectan la acción de los desinfectantes	32
3.11.1. Naturaleza de los microorganismos.....	32
3.11.2. Cantidad de microorganismos.....	33
3.11.3. Tiempo de contacto y concentración del producto	34
3.11.4. Materia orgánica y otras sustancias.....	34
3.11.5. Localización y tipo de superficie	34
3.11.6. Temperatura de acción	35
3.11.7. Efecto del pH	35
3.12. Evaluación de la eficacia de productos desinfectantes	35
3.13. Estandarización de la evaluación de la actividad bactericida de desinfectantes.....	36
3.13.1. Ensayos de suspensión	37
3.13.2. Ensayos sobre superficies.....	38
3.14. Resistencia bacteriana	39
3.14.1. Resistencia intrínseca	39
3.14.2. Resistencia adquirida	39
3.14.3. Resistencia cruzada y rotación de desinfectantes	40
3.14.4. Biofilms y resistencia.....	41
3.15. Biofilms en los ambientes de procesamiento de alimentos.....	41
3.16. Higienización en el ámbito doméstico	42
3.17. Control de la adherencia bacteriana a las superficies	43
3.17.1. Tipo de superficies empleadas	44
3.18. Materiales con propiedades antibacterianas	46

3.18.1. Triclosán	47
3.18.2. Aditivos inorgánicos con propiedades antibacterianas ..	49
3.19. Biofilms en sistemas acuáticos.....	50
3.19.1. Formación de biofilms en la acuicultura.....	50
3.19.2. <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	51
3.19.3. Enfermedades causadas por <i>F. psychrophilum</i> y su transmisión.....	51
3.19.4. Aislamiento de <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	52
3.19.5. <i>Flavobacterium psychrophilum</i> y formación de biofilms...53	
3.20. Métodos para el análisis de la contaminación bacteriana en superficies	53
3.20.1. Microscopía de fluorescencia	54
3.20.2. Colorantes fluorescentes	55
4. MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1. Materiales	59
4.1.1. Superficies de ensayo.....	59
4.1.2. Agua dura	59
4.1.3. Sustancia interferente	60
4.1.4. Neutralizante	60
4.1.4.1. Neutralizante para la evaluación de productos desinfectantes a base de peróxido de hidrógeno	61
4.1.5. Productos desinfectantes de ensayo para evaluar la actividad bactericida y el efecto residual en superficies de acero inoxidable.....	61
4.1.6. Organismos de ensayo	64
4.1.6.1. Organismos para la evaluación de productos desinfectantes y el efecto residual.....	64
4.1.6.2. Organismos para la evaluación de superficies con propiedades antibacterianas y halos de inhibición.....	65

4.1.6.3. Organismos para la evaluación de desinfectantes y formación de biofilms en condiciones de acuicultura.....	66
4.1.7. Materiales empleados para la evaluación de superficies plásticas con actividad antibacteriana.....	66
4.1.8. Superficies empleadas para evaluación de la actividad bacteriostática y la formación de halos de inhibición..	66
4.1.9. Productos desinfectantes y formación de biofilms en condiciones de acuicultura	68
4.2. Procedimientos de ensayos para la evaluación de la actividad bactericida de productos desinfectantes y el efecto residual en superficies de acero inoxidable	69
4.2.1. Cultivos de reserva y de trabajo.....	69
4.2.2. Preparación y ajuste de la suspensión bacteriana.....	70
4.2.3. Recuento de la suspensión bacteriana.....	70
4.2.4. Ensayo para la evaluación de la actividad bactericida del peróxido de hidrógeno.....	71
4.2.4.1. Procedimiento de ensayo	71
4.2.4.2. Determinación de la actividad bactericida	72
4.2.4.3. Ensayo de validación de la neutralización.....	72
4.2.4.4. Verificación de la metodología y expresión de los resultados.....	73
4.2.5. Evaluación del efecto residual de desinfectantes sobre superficies.....	74
4.3. Ensayos para la evaluación de la actividad bacteriostática y formación de halos de inhibición de superficies con propiedades antibacterianas	75
4.3.1. Evaluación de superficies plásticas con actividad antibacteriana	75
4.3.2. Determinación de la formación de los halos de inhibición bacterianos en superficies.....	76
4.3.3. Procedimiento para la evaluación de la inhibición bacteriana sobre superficies a diferentes horas.....	77

4.3.4.	Microscopía de epifluorescencia directa (DEM) para la evaluación de superficies.....	77
4.4.	Procedimientos de ensayos para la evaluación de desinfectantes y formación de biofilms en condiciones de acuicultura.....	78
4.4.1.	Recuperación de células ambientales acuáticas de criaderos de peces.....	78
4.4.2.	Actividad bactericida de productos desinfectantes en condiciones de acuicultura	78
4.4.3.	Cultivo de trabajo de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> ...	79
4.4.4.	Formación de biofilms de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> ...	80
4.4.4.1.	Formación de biofilms en condiciones de laboratorio.....	80
4.4.4.2.	Formación de biofilms en condiciones de tanques de crianza de peces.....	80
4.4.5.	Evaluación de la actividad antibacteriana de superficies en condiciones de acuicultura	81
4.4.6.	Procesado de los resultados en la formación de biofilms .	81
4.5.	Análisis estadístico	82
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	83
5.1.	Evaluación de la actividad bactericida y el efecto residual de productos desinfectantes en superficies de acero inoxidable..	85
5.1.1.	Evaluación de la actividad bactericida del peróxido de hidrógeno.....	85
5.1.2.	Actividad bactericida del peróxido de hidrógeno sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	89
5.1.3.	Peróxido de hidrógeno y eliminación de biofilms	92
5.1.4.	Efecto residual de productos desinfectantes sobre superficies de acero inoxidable	93
5.1.5.	Efecto residual del cloruro de benzalconio sobre <i>S. aureus</i> y <i>E. hirae</i>	94
5.1.6.	Efecto residual del hipoclorito de sodio sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	97

5.1.7.	Efecto residual del hipoclorito de sodio sobre <i>Enterococcus hirae</i>	99
5.1.8.	Resistencia de <i>S. aureus</i> y <i>E. hirae</i> al cloruro de benzalconio e hipoclorito de sodio.....	101
5.1.9.	Empleo de desinfectantes con acción residual sobre superficies.....	102
5.2.	Evaluación de la actividad bacteriostática y formación de halos de inhibición de superficies con propiedades antibacterianas	103
5.2.1.	Estudio de la evaluación de superficies plásticas con actividad antibacteriana	103
5.2.2.	Superficies con propiedades bacteriostáticas en condiciones secas y húmedas de ensayo tratadas con triclosán.....	105
5.2.3.	Evaluación de superficies con actividad bacteriostática mediante los halos de inhibición bacterianos.....	106
5.2.4.	Evaluación de los halos de inhibición en diferentes periodos de tiempo.....	110
5.2.5.	Microscopía de epifluorescencia directa.....	112
5.3.	Evaluación de desinfectantes y formación de biofilms en condiciones de acuicultura	115
5.3.1.	Adherencia de bacterias ambientales a los tanques de crianza de peces en condiciones de acuicultura.....	115
5.3.2.	Actividad bactericida de productos desinfectantes en células ambientales.....	116
5.3.3.	Formación de biofilms de <i>F. psychrophilum</i> en condiciones de humedad.....	118
5.3.3.1.	Comparación de distintos materiales en la formación de biofilms de <i>F. psychrophilum</i> en condiciones de humedad.....	121
5.3.4.	Formación de biofilms de <i>F. Psychrophilum</i> en condiciones de tanques de crianza de peces.....	124
5.3.4.1.	Contenido de minerales (ppb) del agua utilizada en los tanques de crianza	124

5.3.4.2. Comparación de los distintos materiales empleados para la formación de biofilms de <i>F. psychrophilum</i>	125
5.3.5. Actividad antibacteriana de superficies empleadas en acuicultura	126
6. CONCLUSIONES	129
7. BIBLIOGRAFÍA	135

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Facilidad de la limpieza según materiales	22
Tabla 2	Características de los desinfectantes de uso común	25
Tabla 3	Resistencia según tipo microorganismo	33
Tabla 4	Fases de la evaluación de desinfectantes. Comité Europeo de Normalización (CEN).....	37
Tabla 5	Biofilms encontrados en la industria de alimentaria	42
Tabla 6	Facilidad para la formación biofilms en diferentes materiales...	45
Tabla 7	Materiales de uso comercial con propiedades antibacterianas...	47
Tabla 8	Productos a base de peróxido de hidrógeno	62
Tabla 9	Composición de los productos basados en peróxido de hidrógeno (%) para su evaluación frente a <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
Tabla 10	Productos desinfectantes a base de cloruro de benzalconio utilizados para evaluar el efecto residual a 24 horas	64
Tabla 11	Productos desinfectantes a base de hipoclorito de sodio utilizados para evaluar el efecto residual a 24 horas	64
Tabla 12	Medios empleados para la evaluación de superficies con actividad bacteriostática.....	67
Tabla 13	Composición de los productos empleados para evaluar la actividad bactericida en <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	68
Tabla 14	Tryptone yeast extract salts agar (TYES).....	69
Tabla 15	Filtros ópticos y rangos de longitud de ondas (nm) empleados en la microscopía de epifluorescencia directa	78
Tabla 16	Efecto bactericida (\log_{10}) de productos a base de peróxido de hidrógeno sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	86

Tabla 17	Efecto bactericida (\log_{10}) de productos a base de peróxido de hidrógeno en <i>Enterococcus hirae</i>	87
Tabla 18	Actividad bactericida de productos basados en peróxido de hidrógeno sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	90
Tabla 19	Efecto bactericida (\log_{10}) a 0 horas y efecto residual a 24 horas de productos a base de cloruro de benzalconio sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	94
Tabla 20	Efecto bactericida (\log_{10}) a 0 horas y efecto residual a 24 horas de productos a base de cloruro de benzalconio sobre <i>Enterococcus hirae</i>	95
Tabla 21	Efecto bactericida (\log_{10}) a 0 horas y efecto residual a 24 horas de productos a base de hipoclorito de sodio en <i>Staphylococcus aureus</i>	98
Tabla 22	Efecto bactericida (\log_{10}) a 0 horas y efecto residual a 24 horas de productos a base de hipoclorito de sodio en <i>Enterococcus hirae</i>	100
Tabla 23	Evaluación de la actividad antibacteriana (\log_{10}) de superficies plásticas con triclosán (ppm) en <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Klebsiella pneumoniae</i>	104
Tabla 24	Actividad bacteriostática (\log_{10}) en <i>S. aureus</i> de superficies con triclosán (ppm) después de permanecer 24 horas en condiciones secas y húmedas de ensayo	106
Tabla 25	Halos de inhibición (cm) de superficies que incorporan triclosán (ppm) tras 24 horas en condiciones secas y húmedas de ensayo	108
Tabla 26	Halos de inhibición (cm) en <i>Staphylococcus aureus</i> para los productos tratados a 24 horas, 48 horas y 72 horas	111
Tabla 27	Recuperación de células ambientales acuáticas adheridas sobre distintos materiales (\log_{10} de células/cm ²)	115
Tabla 28	Eficacia de productos desinfectantes en bacterias ambientales recuperadas de tanques de crianza de peces (\log_{10} de UFC/ml) de diferentes compuestos en las concentraciones del 100%, 50% y 25%	117

Tabla 29	Formación de biofilms (\log_{10} de células/cm ²) de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> en diferentes materiales en condiciones húmedas de ensayo.....	122
Tabla 30	Formación de biofilms para diferentes superficies en agua potable y de lago (\log_{10} de células/cm ²) en tanques de crianza de peces	125
Tabla 31	Actividad antibacteriana de diferentes materiales empleados en la formación de biofilms de <i>F. psychrophilum</i> en comparación del acero inoxidable en condiciones húmedas y en tanques de crianza de peces (\log_{10} de células/cm ²)	127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas de la formación de un biofilm.....	19
Figura 2	Actividad bactericida (\log_{10}) para el producto P5 a base de 0,5% de H_2O_2 en las concentraciones del 100%, 50% y 25% ..	89
Figura 3	Superficie de poliéster sin propiedades antibacteriana sobre una placa de Petri de 90 mm de diámetro, donde se aprecia el crecimiento de colonias de <i>S. aureus</i> después de 24 horas de ser inoculada	107
Figura 4	Halo de inhibición bacteriano difundido en agar TSA durante 24 horas en una superficie de poliéster tratada con triclosán (400 ppm) y conservada en condiciones húmedas con <i>Staphylococcus aureus</i> . La superficie se observa en una placa de Petri de 90 mm de diámetro.....	108
Figura 5	Coficiente de determinación de las concentraciones de triclosán (ppm) y el tamaño de los halos de inhibición (cm) en <i>Staphylococcus aureus</i> en condiciones secas y húmedas de ensayo	110
Figura 6	Coficiente de determinación (R^2) de las concentraciones de triclosán de las muestras (ppm) y el tamaño de los halos de inhibición (cm) en <i>Staphylococcus aureus</i> a las 24 horas, 48 horas y 72 horas de ensayo.....	112
Figura 7	Imagen por microscopía de fluorescencia de superficie de poliéster con triclosán en su composición, sin desarrollo de células bacterianas donde se aprecia residuos orgánicos de la inoculación bacteriana.....	113
Figura 8	Imagen por microscopía de fluorescencia de células viables de <i>S. aureus</i> (en color verde) y de color rojo (lesionadas o muestras) sobre superficies de poliéster sin propiedades antibacterianas en su composición	114

Figura 9	Imagen por microscopía de fluorescencia de células de <i>S. aureus</i> formando biofilms (células viables en color verde. En color rojo, las células lesionadas o muertas) tras 24 horas de su inoculación sobre superficies sin propiedades antibacterianas en su composición	114
Figura 10	Presencia de colonias bacterianas recuperadas a partir de disco de acero inoxidable (2,0 cm de diámetro) e incubadas durante 72 horas en agar TYES	116
Figura 11	Células de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> de 96 horas en caldo de cultivo TYES, observadas por microscopía de fluorescencia (coloración Live/Dead®).....	119
Figura 12	Células de <i>F. psychrophilum</i> formando biofilms tras permanecer 96 horas en una superficie de acero inoxidable observada por microscopía de fluorescencia (coloración Live/Dead®).....	120
Figura 13	Células lesionadas o muertas de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> con forma de anillo tras permanecer 96 horas en una superficie de acero inoxidable, fotografiadas por microscopía de fluorescencia (coloración Live/Dead®).....	121
Figura 14	Imágenes por microscopía de fluorescencia (coloración Live/Dead®) de biofilms de <i>Flavobacterium psychrophilum</i> expuestas durante 96 horas en condiciones de humedad a diferentes superficies de ensayo: a. Acero inoxidable, b. Plástico, c. Vidrio y d. Plástico antibacteriano	123
Figura 15	Composición de minerales (ppb) del agua potable y de lago empleados para la formación de biofilms de <i>F. Psychrophilum</i> en condiciones de tanques de crianza de peces. Análisis realizados en el Water Quality Laboratory, Institute of Aquaculture, University of Stirling	124

RESUMEN

La prevención de la contaminación bacteriana desde las superficies en los ambientes de elaboración de alimentos, industrias de este sector y ambientes domésticos, requiere de productos desinfectantes que sean efectivos frente a distintas especies microbianas, que sean seguros durante su empleo y que tengan acción bactericida residual para proteger a las superficies de la adhesión bacteriana. Asimismo, el empleo de superficies con propiedades antibacterianas que inhiban la formación de biofilms es una medida para evitar la propagación de bacterias patógenas o alterantes de la calidad de los alimentos. Los objetivos del presente trabajo fueron: evaluar la eficacia y el efecto residual de productos desinfectantes, evaluar superficies con propiedades bacteriostáticas y estudiar la formación de biofilms de *Flavobacterium psychrophilum* en el sector de la acuicultura.

De los resultados obtenidos, la acción bactericida del peróxido de hidrógeno frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae* sobre superficies de acero inoxidable se incrementó al emplearlo conjuntamente con cloruro de benzalconio y polímeros catiónicos. *Pseudomonas aeruginosa* es más sensible en comparación de *Staphylococcus aureus* a la actividad bactericida de productos basados en peróxido de hidrógeno. Los productos basados en el cloruro de benzalconio presentaron efecto residual bactericida transcurridas 24 horas en las superficies tratadas. El hipoclorito de sodio presenta efecto residual al combinarse con otros compuestos como el hidróxido de sodio y el alcohol graso etoxilado. *Escherichia coli* es más sensible que *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* a la acción antibacteriana del triclosán en superficies de plástico. Las superficies con propiedades bacteriostáticas presentaron mayor grado de actividad en condiciones secas de ensayo en comparación de las condiciones húmedas, encontrándose una relación entre la concentración del compuesto bacteriostático y la inhibición bacteriana.

En condiciones de acuicultura, se observó una mayor actividad bactericida de los desinfectantes sobre las superficies para el peroximonosulfato de sodio al 1,0%, hipoclorito de sodio al 5,25%, y la combinación de compuestos formados por tensoactivos y ácido láctico. *Flavobacterium psychrophilum* tiene la capacidad para formar biofilms en superficies de acero inoxidable, superficies plásticas, vidrio y madera. En estas condiciones, la adhesión bacteriana puede inhibirse empleando superficies plásticas con propiedades antibacterianas.

ABSTRACT

In prevention of the bacterial contamination from surfaces in the food processing environments, industries in this sector and domestic environments requires disinfectant products that have to be effective against different bacterial species, safe during their use and have bacterial residual action to protect surfaces of the bacterial adhesion. In the same way, the use of surfaces with antibacterial properties which inhibit the biofilm formation is a measure to prevent the spread of pathogenic bacteria and the spoilage of the food quality. The objectives of this study were to evaluate the efficacy and the residual effect of disinfectants products, evaluate the bacteriostatic properties of surfaces and study the biofilm formation produced by *Flavobacterium psychrophilum* in the aquaculture sector.

From the results, the bactericidal action of hydrogen peroxide in *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus hirae* on stainless steel surfaces is increased when it is used together with benzalkonium chloride and cationic polymers. *Pseudomonas aeruginosa* is more sensitive than *Staphylococcus aureus* to the bactericidal activity of products based on hydrogen peroxide. Benzalkonium chloride products showed bactericidal residual effect after 24 hours on the treated surfaces. Sodium hypochlorite has residual effect when it is combined with other compounds such as sodium hydroxide and ethoxylated fatty alcohol. *Escherichia coli* is more sensitive than *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* to the antibacterial action of triclosan on plastic surfaces. Surfaces with bacteriostatic properties showed greater activity in dry conditions compared to wet conditions, which demonstrated a relationship between the bacteriostatic compound concentration on the surfaces employed and the bacterial inhibition.

In the aquaculture conditions, the bactericidal activity on surfaces was higher for potassium peroxydisulfate 1,0%, sodium hypochlorite 5,25%, and the combination of compounds of surfactants and lactic acid. The biofilm formation of *Flavobacterium psychrophilum* appeared on stainless steel surfaces, plastic surfaces, glass and wood. Under these conditions, the bacterial adhesion can be inhibited using plastic surfaces with antibacterial properties.

1. INTRODUCCIÓN



La contaminación bacteriana de los alimentos representa un constante peligro al provocar brotes de enfermedades que afectan a millones de personas cada año, considerándose un problema emergente de salud pública, tanto en países desarrollados, así como en países en vías de desarrollo (Mead *et al.*, 1999; WHO, 2007; EFSA, 2012). Estos brotes se originan por prácticas higiénicas inadecuadas del personal, contaminaciones cruzadas, la contaminación bacteriana desde las superficies de contacto y de equipos, las materias primas, transmisión por vectores y otras causas ambientales. Dentro de este contexto, las superficies representan una de las vías de contaminación bacteriana más frecuentes que se presentan en la industria de los alimentos y en los ambientes domésticos (Kusumaningrum *et al.*, 2003; Garret *et al.*, 2008).

Cuando las condiciones son adecuadas, las bacterias se adhieren a las superficies formando biofilms, que incluso con las prácticas de higiene rutinarias son difíciles de eliminar ya que las bacterias en estas condiciones son más resistentes a cambios ambientales externos. Así, los biofilms, al poder sobrevivir en los entornos de las plantas de alimentos, durante largos periodos de tiempo, se han convertido en un problema en un amplio sector de las industrias de alimentos (Kumar y Anand, 1998; Jessen y Lammert, 2003; Sharma y Anand, 2002).

Siendo uno de los principales objetivos del sector de la elaboración de alimentos el proporcionar productos seguros a los consumidores, se ha elaborado el sistema APPCC (Análisis de peligros y puntos de control críticos) para determinar los riesgos de contaminación en los centros de elaboración de alimentos y garantizar la inocuidad de los productos elaborados. Para implementar un adecuado sistema APPCC, es esencial instaurar planes de higienización por medio de adecuados programas de limpieza y desinfección, con el objetivo de controlar la propagación de los microorganismos en los ambientes alimentarios.

Las directivas europeas en materia de higiene indican que las plantas de procesamiento de alimentos deben presentar un alto nivel de condiciones sanitarias (Arvanitoyannis *et al.*, 2005). Con este objetivo, se emplean desinfectantes que demuestren eficacia antibacteriana cuando son utilizados en las concentraciones adecuadas y en ámbitos de aplicaciones definidos.

Para garantizar la eficacia de los productos desinfectantes frente a la microbiota contaminante y patógena, previamente al uso comercial de estos productos, se requieren procedimientos para evaluar la actividad antibacteriana con distintas cepas bacterianas y condiciones de ensayo: en suspensión, condiciones prácticas de uso sobre superficies, en presencia de materia orgánica y en condiciones reales para su uso (Reybrouck, 1998; Van Klingeren, 2007).

Incluso con los programas de limpieza y desinfección, las bacterias adheridas a las superficies formando biofilms pueden mostrar una alta resistencia a los desinfectantes, no eliminándose en la medida de lo esperado. El desarrollo de nuevos métodos para el control higiénico de las superficies y la prevención de la adherencia bacteriana, son vías de desarrollo para evitar la propagación de bacterias patógenas o alterantes de los alimentos.

Los tipos de superficies juegan un importante papel en la adhesión bacteriana. Generalmente, cualquier superficie es vulnerable al desarrollo de biofilms, estos incluyen plásticos, vidrio, madera y productos alimenticios (Srey *et al.*, 2013). Con el objetivo de evitar la adherencia bacteriana y el posterior desarrollo de biofilms, se han establecido diversas estrategias, desde el empleo de productos desinfectantes con acción bactericida residual sobre las superficies y el desarrollo de materiales que incluyen en su composición compuestos con propiedades antibacterianas como el triclosán, cobre, zinc, plata, etc. que inhiben la adherencia bacteriana y por consiguiente la propagación de los microorganismos (Meyer, 2003; Simões *et al.*, 2010).

Los estudios sobre la adherencia bacteriana a superficies en ambientes acuáticos, establecieron los modelos para conocer el desarrollo de los biofilms desde comienzos del siglo XX. El continuo uso del agua para prácticamente todas las actividades humanas puede ser el origen de la diseminación de diversas enfermedades bacterianas que se propagan desde los biofilms (Huq *et al.*, 2008). De las actividades acuáticas, la acuicultura como sector de producción para la alimentación humana debe hacer frente a retos relacionados con la sanidad y la seguridad de sus productos. A nivel mundial, en el año 2012, la producción proveniente de la acuicultura se equiparaba con la pesca de captura, estimándose que la producción acuícola se incrementará en el futuro para

compensar el aumento de los requerimientos alimentarios de la población humana y el estancamiento de la producción pesquera de captura (FAO, 2012; Naylor *et al.*, 2009).

Uno de los retos originados por el constante aumento de la producción en la acuicultura, es el control y la prevención de la propagación de las enfermedades bacterianas que afectan a los peces de crianza (Qian *et al.*, 2007; King *et al.*, 2008). De las enfermedades de origen bacteriano en la acuicultura, *Flavobacterium psychrophilum* es responsable de cuadros patológicos en especies de peces salmónidos en todo el mundo (Cipriano y Holt, 2005). Dadas las condiciones ambientales en que se desarrollan las flavobacterias, la comprensión del proceso de la formación de biofilms de estos microorganismos como reservorio de enfermedades en peces, puede aportar nuevos conocimientos de los mecanismos involucrados en la prevención y propagación de las enfermedades bacterianas.

2. OBJETIVOS



2.1. OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales planteados en este trabajo fueron:

- Estudiar la eficacia y el efecto residual de diferentes productos desinfectantes sobre superficies de acero inoxidable.
- Evaluar la actividad bacteriostática de superficies elaboradas con compuestos antibacterianos.
- Estudiar la eficacia de productos desinfectantes y la formación de biofilms en condiciones de acuicultura.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la eficacia de productos desinfectantes a base de peróxido de hidrógeno.
- Comparar la eficacia de productos a base de peróxido de hidrógeno sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Evaluar el efecto residual bactericida de productos desinfectantes a base de cloruro de benzalconio y de hipoclorito de sodio.
- Evaluar la eficacia bacteriostática de superficies con propiedades antibacterianas en condiciones secas y húmedas de ensayo.
- Evaluar la inhibición bacteriana de superficies con propiedades antibacterianas, mediante la formación de halos de inhibición bacterianos.
- Evaluar productos con actividad desinfectante en la población bacteriana ambiental obtenida del agua circulante para los tanques de crianza de peces en el sector de la acuicultura.
- Estudiar la formación de biofilms en *Flavobacterium psychrophilum* en distintos materiales utilizados en la crianza acuícola de peces.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. ENFERMEDADES DE ORIGEN BACTERIANO TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Es incuestionable el beneficio de la industrialización en la producción de alimentos al permitir cubrir la constante demanda mundial de estos productos ante el continuo aumento de la población. Con el objetivo de proporcionar alimentos seguros, se han mejorado los procedimientos higiénicos, pero también, actualmente, los riesgos para la salud existentes a lo largo de la historia se han globalizado. Los microorganismos son ubicuos y por la producción intensiva de alimentos, la cantidad de consumidores de alimentos preparados o por el constante incremento de personas que comen en colectividades, ante un brote de enfermedad de origen alimentario, el número de afectados puede incrementarse significativamente si los controles en la elaboración y manipulación de los alimentos no han sido los adecuados (FAO y WHO, 2002).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define a las enfermedades transmitidas por los alimentos como “el conjunto de síntomas originados por la ingestión de agua y/o alimentos que contienen agentes biológicos o no biológicos que afectan la salud del consumidor en forma aguda o crónica y a nivel individual o de grupos de personas”. Las enfermedades de origen alimentario representan un grave peligro para las zonas densamente pobladas; las de origen bacteriano y/o sus toxinas producen brotes en todo el mundo, desde los países menos desarrollados a los más desarrollados. Sin embargo, el número de países con adecuados programas de vigilancia de las enfermedades transmitidas por alimentos es limitado en la actualidad (Rocourt *et al.*, 2003; WHO, 2007).

En el año 2010 se documentó un total de 5262 brotes de enfermedades de origen alimentario en la Unión Europea, causando 43473 casos, 4695 hospitalizaciones y 25 muertes. La mayoría de los brotes registrados fueron causados por *Salmonella*, agentes víricos, *Campylobacter* y toxinas bacterianas. Los alimentos que con mayor frecuencia estuvieron involucrados en estos brotes fueron los huevos, comidas mixtas o de bufés y vegetales y sus subproductos (EFSA, 2012).

Se estima que solo en los Estados Unidos las enfermedades transmitidas por alimentos afectan cada año a 76 millones de personas, causando 325000 hospitalizacio-

nes y 5000 muertes (Mead *et al.*, 1999), además de generar altos costes económicos (Scharff, 2010).

En países en vías de desarrollo, por falta de los medios adecuados, el control de las enfermedades transmitidas por los alimentos no ha recibido suficiente atención dentro del contexto social y económico. Sin embargo, se estima que se producen con una frecuencia similar o mayor que en los países desarrollados. Como la mayoría de los casos que se presentan en estos países no son reportados, la dimensión del problema es desconocida, no llegándose a conocerse el verdadero impacto que tiene sobre la salud pública. En este contexto, en un estudio realizado en Tanzania, se estimó que en el periodo comprendido entre los años 1992 a 1998, las enfermedades transmitidas por el agua y los alimentos representaron una de las cuatro causas más frecuentes de muertes en personas adultas de este país (Setel y Hemed, 2000).

Como otros alimentos, los productos obtenidos de la pesca y la acuicultura para el consumo humano pueden ser la causa de enfermedades bacterianas. En España, durante el periodo de 1994 al 2003, la segunda causa de brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos fue por el consumo de pescados y mariscos con un 9,7% de los brotes notificados (RNVE, 2003).

3.2. SUPERFICIES Y CONTAMINACIÓN CRUZADA

En el área de la alimentación, la contaminación bacteriana puede provenir de los componentes de las materias primas, superficies contaminadas, personas que están en contacto con los alimentos y el ambiente donde se elaboran. Ya desde la antigüedad, se sugirió que muchas de las enfermedades que afectaban a los humanos eran transmitidas por el contacto con superficies contaminadas. Más adelante, fue reconocido que el contacto indirecto con superficies contaminadas es una vía para la transmisión de enfermedades.

La función que una superficie contaminada cumple en la transmisión de diversas enfermedades depende de la presencia de un agente infeccioso, la capacidad del agente infeccioso para sobrevivir en la superficie y la facilidad para ser transferido hacia un huésped susceptible. Teniendo en cuenta estos criterios, las probabilidades de con-

traer infecciones desde superficies contaminadas aumentan considerablemente (Fu *et al.*, 2007). En este contexto, varios estudios han establecido que la contaminación cruzada de bacterias y virus patógenos presentes en los lugares donde se elaboran alimentos podrían ser el principal factor que contribuye, de forma esporádica o en forma de epidemia a la propagación de las enfermedades transmitidas por los alimentos (Chen *et al.*, 2001; Bloomfield, 2003).

Así mismo, diversas especies de bacterias patógenas son capaces de adherirse a las superficies, incluso seguir siendo viables después de la limpieza y desinfección, convirtiéndose a las superficies en una importante fuente de contaminación (Frank y Koffi, 1990; Kusumaningrum *et al.*, 2003; Reij y Den Aantrekker, 2004).

La Organización Mundial de la Salud determinó que en el ámbito europeo el 25% de las toxiinfecciones alimentarias están relacionadas con la contaminación cruzada, siendo las de origen bacteriano desde las superficies, una de las vías más frecuentes, tanto en la industria alimentaria, así como en el ámbito doméstico (WHO, 1995). En Inglaterra y Gales, de los brotes de enfermedades bacterianas relacionados con el consumo de alimentos en el periodo de los años 1999 al 2000, la contaminación cruzada durante la preparación de los alimentos fue el factor que más contribuyó a la propagación de estos brotes (WHO, 2003). Del mismo modo, en EE UU, la contaminación cruzada vía equipos y las escasas prácticas de higiene del personal en la preparación de los alimentos contribuye de forma considerable a la propagación de los microorganismos (Olsen *et al.*, 2000).

3.3. ADHERENCIA BACTERIANA A SUPERFICIES

Las bacterias proliferan de dos formas, como formas unicelulares en una fase acuosa y que son conocidas como células planctónicas o como células adheridas a superficies sólidas formando biofilms (Marshall, 1992; Carpentier y Cerf, 1993). Se estima que en los ambientes naturales, el 99% de todas las células bacterianas que existen se encuentran adheridas o formando biofilms en las superficies y tan solo el 1,0% viven como células planctónicas (Dalton y March, 1998).

3.4. BIOFILMS

Un biofilm puede definirse como un conjunto de microorganismos adheridos a una superficie, encapsulados en una matriz polimérica hidratada que se denomina colectivamente “matriz” o “sustancia polimérica extracelular” (EPS). La matriz es sintetizada por los propios microorganismos y está formada por aproximadamente un 95% de agua, junto a polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, minerales, etc. (Carpentier y Cerf, 1993; Costerton *et al.*, 1995).

Los biofilms bacterianos representan una estrategia de sobrevivencia procariota. La principal función de la matriz de un biofilm es permitir a las bacterias mantenerse unidas y protegidas frente a cambios externos como fluctuaciones de humedad, cambios de temperaturas, acción de productos desinfectantes, presencia de antibióticos, anticuerpos, bacteriófagos, etc.; además de proporcionar a los microorganismos una concentración de nutrientes necesarias y facilitar la eliminación de los residuos bacterianos (Davey y O’toole, 2000; Hall-Stoodley y Stoodley, 2005).

La estructura de un biofilm está condicionada tanto a factores biológicos, físicos y químicos. Esos factores incluyen fuerzas hidrodinámicas, la viscosidad del medio donde se forma y la composición de la matriz. Un biofilm puede contener una o más especies bacterianas, donde la adhesión y restos metabólicos de una especie pueden servir para el desarrollo de otras especies. Estas características permiten que los biofilms puedan desarrollarse sobre superficies hidrófobas, hidrófilas, bióticas o abióticas, que presenten un entorno hidratado; y si no es abundante, que puedan conservar una mínima presencia de nutrientes necesarios para su desarrollo (Marshall, 1992; Sauer *et al.*, 2003). La capacidad para formar biofilms no parece restringirse a algunos grupos específicos de microorganismos y se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de las bacterias pueden existir dentro de los biofilms (Donlan, 2002; Thomas y Nakaishi, 2006).

3.5. PROCESO DE FORMACIÓN DE LOS BIOFILMS

El proceso de formación de los biofilms depende básicamente de la especie bacteriana, su ciclo vital y las interacciones que se produzcan con el medio donde se desarrollan. El

ciclo vital de un biofilm en una superficie abiótica es un proceso dinámico que puede ser dividido en (Kumar y Anand, 1998):

1. Acondicionamiento para su desarrollo,
2. Adhesión celular,
3. Formación de microcolonias,
4. Formación del biofilm,
5. Desprendimiento y dispersión de los biofilms.

1. Acondicionamiento para su desarrollo

La formación de los biofilms puede producirse prácticamente en cualquier superficie donde las bacterias se encuentren presentes. Cuando una superficie presenta las condiciones adecuadas, existe una interacción entre ésta y la fase líquida que provoca el transporte de moléculas orgánicas e inorgánicas y los microorganismos hacia las superficies por difusión o por los flujos turbulentos de líquidos. La acumulación de moléculas orgánicas e inorgánicas en la interfase sólida-líquida de las superficies de contacto con los alimentos conduce a una mayor concentración de nutrientes en comparación de la fase líquida y estos sustratos dan origen a una capa acondicionada para la adherencia bacteriana (Kumar y Anand, 1998; Dunne, 2002; Garrett *et al.*, 2008).

2. Adhesión celular

El segundo paso en la formación de los biofilms es la unión de los microorganismos a las superficies previamente acondicionadas. Este proceso puede ser activo o pasivo y depende de la motilidad bacteriana o el transporte de las células planctónicas (Kumar y Anand, 1998). La alta energía libre y las superficies húmedas promueven la adhesión bacteriana, formando microcolonias de unión reversible. Estas uniones son de tipo electrostáticas, hidrófobas u originadas por fuerzas de Van der Waals, sin una unión

química. A diferencia de la etapa de acondicionamiento, el tiempo para que se produzca la adhesión celular depende de las especies bacterianas y los sustratos presentes en las superficies (Marshall, 1992; An y Friedman, 1998).

VanHaecke *et al.* (1990) encontraron que *Pseudomonas aeruginosa* requiere 30 segundos de contacto para adherirse a superficies de acero inoxidable. Mittelman (1998) menciona que la leche y sus derivados pueden adsorberse a las superficies en un tiempo de 5 a 10 segundos, formando un film que facilita la adhesión bacteriana. En esta etapa, las bacterias presentes sobre las superficies siguen mostrando movimientos brownianos y pueden ser fácilmente eliminadas aplicando pequeñas fuerzas, pero si esta unión se mantiene el tiempo necesario para seguir desarrollándose, aparecen nuevas estructuras químicas y físicas que la convierten en una unión permanente (Chmielewski y Frank, 2003).

3. Formación de microcolonias

La adhesión irreversible con la formación de microcolonias depende del tiempo, la temperatura, disponibilidad de nutrientes, etc. (Holah, 1995b). En esta fase, las células adheridas ya no presentan movimiento browniano, involucrando una adhesión física de las células a las superficies por la formación de la “sustancia polimérica extracelular” (EPS). La fase de unión irreversible de las células a las superficies puede producirse desde los 20 minutos a las 4 horas, en una temperatura comprendida entre 4 °C y 20 °C (Gilbert *et al.*, 1991).

4. Formación del biofilm

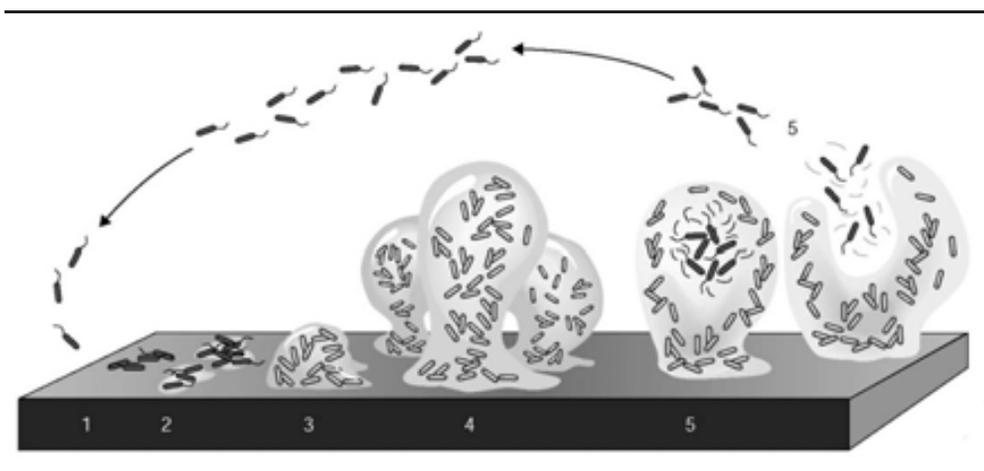
Dependiendo de las condiciones bacterianas y ambientales, las microcolonias siguen produciendo sustancia polimérica extracelular. La composición de un biofilm puede ser heterogénea, debido a la colonización de diferentes microorganismos que requieren diferentes necesidades nutricionales. El aumento adicional en el tamaño del biofilm se produce por el depósito o fijación de otros solutos orgánicos e inorgánicos y de partículas que se encuentran en la fase líquida circundante. En esta fase, las bacterias alteran su metabolismo y se producen cambios en su morfología. Este tipo de

adhesión protege a las células del acceso a biocidas, metales y toxinas, haciendo difícil su remoción. Para remover las microcolonias se requiere de la aplicación de lavados, raspados sobre las superficies o la ruptura química de las fuerzas de fijación a través de la aplicación de enzimas, detergentes, surfactantes, desinfectantes y la aplicación de calor (Costerton *et al.*, 1981; Sutherland, 1982; Sauer *et al.*, 2003).

5. Desprendimiento y dispersión de los biofilms

Cuando los biofilms han alcanzado una estructura altamente organizada, condiciones ambientales como la presencia de sustancias químicas en el medio fluido y alteraciones en los ecosistemas de los propios biofilms, causan que diversas bacterias se desprendan de la matriz y entren en el flujo de la corriente líquida. Junto a estas células, diversos nutrientes y otros residuos son liberados y transportados a otras superficies. Estas nuevas células aprovechan los posibles residuos nutritivos de las superficies para formar una capa orgánica y desarrollar nuevos biofilms (Kumar y Anand, 1998; Watnick y Kolter, 2000; Dunne, 2002).

Figura 1. Etapas de la formación de un biofilm: 1. Acondicionamiento para su desarrollo, 2. Adhesión celular, 3. Formación de microcolonias, 4. Formación del biofilm, y 5. Desprendimiento y dispersión de los biofilms.



Fuente: Kumar y Anand, 1998; Sauer, 2003.

3.6. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA FORMACIÓN DE LOS BIOFILMS

Factores ambientales como el pH circundante, temperatura del medio, presencia de nutrientes y las características de la población bacteriana, desempeñan un papel importante en los cambios fenotípicos de las células en estado planctónico hacia las formas sésiles presentes en los biofilms.

Una temperatura óptima, junto a una constante fuente de nutrientes para los microorganismos adheridos a una superficie, resultará en una rápida formación de biofilms (Stepanovic *et al.*, 2003). La temperatura del medio se correlaciona con la velocidad de reacción de las enzimas en el metabolismo bacteriano, y por tanto, afectará el desarrollo de muchos procesos fisiológicos y bioquímicos de las células cuando forman un biofilm. En este sentido, se ha encontrado que la adherencia óptima de *Yersinia enterocolitica* a superficies de acero inoxidable es de 21 °C en comparación de temperaturas de 35 °C o 10 °C (Herald y Zottola, 1988a). En el caso de la bacteria marina *Deleya mariana*, la máxima adhesión a un sustrato hidrófilo se observó a 25 °C, mientras que la adhesión fue menor a 19 °C y mucho más débil a una temperatura de 37 °C (Shea *et al.*, 1991).

Mafu *et al.* (2011) indican que las superficies hidrofílicas e hidrofóbicas no tienen efecto en la capacidad de adherencia de *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*; mientras que un pH comprendido entre 6 a 8 influye en la capacidad de adherencia bacteriana en ambos tipos de superficies. En otro estudio, se ha observado que *Yersinia enterocolitica* presenta la máxima adherencia cuando se desarrolla a una temperatura de 30 °C y un pH del medio de 8 a 9 (Herald y Zottola, 1988a).

En el caso de *Listeria monocytogenes* presenta una óptima adherencia en un pH de 7 (Herald y Zottola, 1988b) y *Pseudomonas aeruginosa* presenta la máxima adhesión a superficies de acero inoxidable en el rango de un pH de 7 a 8, óptimo para su metabolismo celular (Stanley, 1983).

El tipo de superficie también influye en la formación de los biofilms. Los que se desarrollan en superficies mucosas son fisiológicamente diferentes de aquellos formados en superficies inertes, y en general, puede decirse que las bacterias tienden a desarrollarse en superficies ásperas e hidrofóbicas (Pringle y Fletcher, 1983; Characklis *et al.*, 1990; Jones *et al.*, 1999).

3.7. PROCESO DE HIGIENIZACIÓN

El proceso de higienización tiene como objetivo eliminar o reducir al mínimo los microorganismos patógenos o alterantes de los alimentos que pueden producir una contaminación bacteriana en las industrias de este sector y en los ambientes domésticos (Holah, 1995a). Actualmente, el proceso de higienización se considera el método más eficaz para el control de los microorganismos. La higienización implica la correcta aplicación de los programas de limpieza y desinfección, que se consideran cada uno como parte imprescindible del sistema APPCC que garantiza la calidad y seguridad de los productos elaborados en las industrias de alimentos (Salvat y Colin, 1995). En los ambientes domésticos, sin un adecuado programa de higienización, incluso los agentes desinfectantes altamente eficaces en superficies, no reducen los niveles de contaminación bacteriana (Rusin *et al.*, 1998). El proceso de la limpieza y desinfección debe reevaluar regularmente la lógica que rige sus programas, además de tener objetivos claros para cada operación en los diferentes contextos particulares donde se aplique (Kahrs, 1995).

3.7.1. Limpieza

Dentro del proceso de higienización, la limpieza minimiza la presencia de agentes microbianos y restos físicos o químicos que afectan la calidad o seguridad de los productos alimentarios. Esta operación incluye la eliminación de la suciedad orgánica e inorgánica, cuerpos extraños, restos de alimentos y otros residuos mediante la acción mecánica y la aplicación de detergentes. Los programas de limpieza se determinan en función del tipo de suciedad presente, así como las características de los alimentos que son elaborados. Ya que la mayor parte de los microorganismos se encuentran unidos a la materia orgánica, de la que se nutren, durante un programa de limpieza es de suma importancia eliminar la mayor cantidad de microorganismos junto con la suciedad antes de la aplicación de un desinfectante. La facilidad para la operación de limpieza es variable según el tipo de materiales donde se apliquen los productos químicos (tabla 1).

Tabla 1. Facilidad de la limpieza según materiales (*).

Vidrio	100
Acero inoxidable	80
Aluminio	70
Goma	30
Plástico	20

(*) Escala del 0 al 100 (Hyginov, 2001)

3.7.2. Desinfección

La desinfección es el programa que tiene por objetivo reducir las cantidades de microorganismos contaminantes a niveles que no representen un peligro para la salud pública o la calidad de los productos alimentarios. De esta forma, se previene mediante el uso de desinfectantes, el desarrollo bacteriano antes de la reanudación de una producción en las plantas de alimentos (Holah, 1995a; Bousser, 2002).

La desinfección condiciona directamente la calidad de los productos, pero los procedimientos que la preceden de prelavado y lavado durante la limpieza son igualmente esenciales, ya que desinfectar una superficie cuya limpieza no ha sido la adecuada carece de sentido (Leveau y Bouix, 2002). Además, una incorrecta desinfección permite el crecimiento de biofilms en los entornos de las plantas de procesamiento de alimentos, incrementando el riesgo de reducir la vida comercial de sus productos y la transmisión de enfermedades (Frank y Koffi, 1990).

3.8. ETAPAS DE LA LIMPIEZA Y DESINFECCIÓN

Cuando se ha evaluado un protocolo que garantiza la capacidad de los productos detergentes y desinfectantes, se debe implementar un procedimiento de limpieza y desinfección (Maris, 1998). Este programa, de forma general, debe contemplar las siguientes fases (Salvat y Colin, 1995; Hyginov, 2001):

1. Acondicionamiento del lugar a higienizar:

En esta fase se procede a retirar los residuos de basura, protegiendo sistemas eléctricos y desmontando todos aquellos elementos de los equipos de producción que necesiten un procedimiento específico de limpieza o que entorpezcan el normal desarrollo de la misma.

2. Prelavado:

Es la limpieza inicial y contempla la utilización de agua para eliminar la suciedad visible. La temperatura del agua dependerá del tipo de suciedad, siendo recomendable el uso del agua a una mayor temperatura si existe suciedad grasa y parte de la carga bacteriana se encuentra adherida a las superficies.

3. Limpieza (lavado):

Se realiza mediante la aplicación de un agente limpiador o detergente que ha sido elegido para disolver y solubilizar la suciedad en la superficie sobre la que debe actuar.

4. Aclarado:

Tras la limpieza se procede a eliminar la suciedad que se ha disuelto y se halla en suspensión, así como los restos de los detergentes utilizados mediante la aplicación de agua potable a media-baja presión, normalmente fría o templada.

5. Aplicación del desinfectante:

En esta etapa se procede a aplicar los productos desinfectantes de forma manual o mecánica, dejándolos actuar un mínimo de tiempo y que puede variar de acuerdo con los tipos de desinfectante empleados.

6. Aclarado final:

El aclarado final tiene por objeto eliminar los residuos de los desinfectantes utilizados. Si la limpieza y la desinfección se han realizado conjuntamente, el enjuague final servirá para arrastrar la suciedad disuelta y los residuos desinfectantes.

7. Secado:

Se procede al secado de todas aquellas superficies que entran en contacto directo con los alimentos para protegerlas del agua residual ya que serviría de vehículo diseminador de los microorganismos presentes.

3.9. CARACTERÍSTICAS DE UN BUEN DESINFECTANTE

Dada la diversidad de superficies donde los desinfectantes deben actuar y los distintos microorganismos a eliminar, estos deben reunir ciertas condiciones para que su empleo sea eficaz y seguro (Wildbrett, 2000). Entre las características de un buen desinfectante se pueden mencionar:

- Que sean eficaces para el mayor espectro de microorganismos.
- No provoquen fenómenos de resistencia.
- Se mantengan estables en presencia de residuos orgánicos y de aguas duras.
- Que sean solubles en el agua y se eliminen fácilmente con el enjuagado.
- No transmitan olores ni sabores a los alimentos.
- No sean tóxicos por inhalación o sean irritantes para la piel o las mucosidades en condiciones normales de empleo.
- No deterioren las superficies con las que entran en contacto.
- Acción bactericida de efecto prolongado sobre las superficies.
- No resulten contaminantes para el medio ambiente.

3.10. TIPOS DE DESINFECTANTES

Existe una variedad de desinfectantes empleados en la industria de alimentos, los más comunes son los amonios cuaternarios, los productos clorados, los compuestos yodóforos y los ácidos (Lentsch, 1979) (tabla 2). En base a sus propiedades, los desinfectantes pueden agruparse en alcoholes, productos oxidantes, reductores, fenoles, productos basados en tensoactivos, los productos ácidos y los álcalis (McDonnell y Russell, 1999).

Tabla 2. Características de los desinfectantes de uso común.

Característica	Yodóforos	Clorados	Ácidos	Amonios cuaternarios
Acción contra Gram positivas	Buena	Buena	Buena	Buena
Acción contra Gram negativas	Buena	Buena	Buena	Regular
Esporas	Buena	Buena	Buena	Ninguna
Destrucción de levaduras	Buena	Buena	Buena	Buena
Destrucción de mohos	Buena	Buena	Buena	Buena
Estabilidad al almacenamiento	Depende de la temperatura	Poca	Excelente	Excelente
Penetración	Buena	Poca	Buena	Excelente
Formación de capa protectora	Ninguna a poca	Ninguna	Ninguna	Si
Afectado por materia orgánica	Moderado	Alto	Bajo	Bajo
Afectado por otros constituyentes del agua	pH alto	pH bajo	pH alto	Si
Corrosivo en superficies	No al acero inoxidable	Amplio en acero	Bajo en acero inoxidable	No
Coste	Moderado	Bajo	Moderado	Moderado

Fuente: Adaptación de Lentsch, S. (1979).

3.10.1. Alcoholes

El alcohol etílico, alcohol isopropílico y el alcohol n-propílico tienen buenas propiedades desinfectantes en el rango del 60-90% de las soluciones. El alcohol isopropílico tiene mayor uso en ambientes domésticos, comúnmente en una solución al 70% (Leveau y Bouix, 2002; McDonnell y Russell, 1999).

Los alcoholes son desinfectantes de nivel intermedio que muestran amplio espectro de acción frente a células vegetativas, hongos, virus con envolturas y algunos tipos de mi-

cobacterias, incluyendo *Mycobacterium tuberculosis*. Los alcoholes actúan provocando daños en la membrana celular y como consecuencia de esto, conducen a una rápida desnaturalización de las proteínas y la lisis de las células bacterianas. Los alcoholes tienen propiedades disolventes y se mezclan bien con otros productos, pero su acción se ve inactivada por la presencia de materia orgánica. Las formulaciones comerciales con altos niveles de alcohol se encuentran típicamente en forma de aerosoles, así también en combinación con otros desinfectantes como los fenoles y los compuestos de amonios cuaternarios añadidos en concentraciones por debajo del 1,0% para lograr una mayor eficacia. Durante su uso, la toxicidad de los alcoholes es baja y no representan riesgos importantes del deterioro de las superficies donde se aplican (Wirtanen y Salo, 2003; Fu *et al.*, 2007).

3.10.2. Hipoclorito de sodio

El hipoclorito de sodio y los productos clorados constituyen el grupo más común de agentes desinfectantes debido a su bajo coste, facilidad de aplicación y la capacidad para inactivar una gran variedad de microorganismos; sin embargo, la actividad fungicida y esporicida del hipoclorito de sodio es más lenta y depende de la concentración y del pH (Leveau y Bouix, 2002).

Los compuestos de cloro más utilizados incluyen: cloro líquido, cloro gaseoso (Cl_2), hipoclorito de sodio y cloraminas orgánicas e inorgánicas. El efecto desinfectante se debe a la liberación de Cl_2 , que al reaccionar con el agua a un pH ácido o neutro, produce ácido hipocloroso que se comporta como un fuerte oxidante. El mecanismo fundamental de la acción antimicrobiana del hipoclorito de sodio se produce cuando ingresa por los poros de la pared y membrana celular, oxidando y desnaturalizando las proteínas intracelulares y el ADN. La oxidación es uno de los mecanismos más importantes de toxicidad celular y de ahí que los compuestos con alta capacidad oxidante muestren propiedades antimicrobianas. Así también, puede ocurrir una interacción con los ácidos nucleicos y una disrupción de la fosforilación oxidativa celular (Russell y Russell, 1995).

El hipoclorito de sodio es relativamente inestable cuando se encuentra en presencia de materia orgánica, temperaturas extremas y a la exposición de la luz. Por su alto poder

oxidante, tiene propiedades corrosivas frente a diferentes metales como el acero inoxidable. En presencia de materia orgánica, algunos compuestos clorados y el hipoclorito de sodio son formulados con otros compuestos como los tensoactivos para aumentar la velocidad de destrucción de los microorganismos (Wildbrett, 2000; Leveau y Bouix, 2002).

3.10.3. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), conocido también como agua oxigenada, tiene alto efecto oxidante al liberar OH y radicales libres en el agua que desnaturalizan componentes celulares que contienen lípidos, proteínas y ADN. Este compuesto puede ser considerado como el antiséptico y desinfectante más natural, ya que sus metabolitos no son tóxicos para el medio ambiente, al descomponerse en oxígeno y agua y no dejar residuos. Estas características permiten que sean empleados en operaciones de desinfección próximas a lugares y equipos donde se elaboran alimentos (McDonnell y Russell, 1999; Wildbrett, 2000).

Los compuestos peróxidos tienen un espectro antimicrobiano sumamente amplio: bacterias (incluyendo esporas), agentes víricos y hongos, según la concentración y condiciones de utilización. Las concentraciones de uso pueden variar desde el 3% para las desinfecciones de rutina y hasta el 25%, cuando se requieren altos niveles de desinfección, mostrando una mayor actividad frente a bacterias Gram positivas; pero la presencia de catalasa en este tipo de bacterias inactiva el peróxido de hidrógeno, haciéndolo menos eficaz al degradarse rápidamente en oxígeno y agua (McDonnell y Russell, 1999; Drosou *et al.*, 2003; Fraise, 1999).

3.10.4. Productos reductores

El glutaraldehído es un agente reductor empleado como referencia en la desinfección del instrumental médico, aunque con las micobacterias es necesario un mayor tiempo de exposición. Tiene efecto tóxico e irritante, por lo que no es aconsejable aplicarlo en altas concentraciones. Este desinfectante ejerce su acción a nivel de la membrana externa, pared celular, e incluso dentro de los componentes citoplasmáticos bacterianos (Leveau y Bouix, 2002).

3.10.5. Productos basados en tensoactivos

Los productos basados en tensoactivos son sustancias cuyas moléculas están constituidas por dos partes bien diferenciadas, una de ellas es de carácter hidrófilo, es decir soluble en el agua o en sustancias polares, y la otra de carácter lipófilo, soluble en sustancias apolares. Los tensoactivos se caracterizan fundamentalmente por disminuir la tensión superficial de los líquidos, facilitando el esparcimiento en los lugares donde se aplica. Los productos tensoactivos se clasifican de acuerdo a su carga iónica en: **compuestos catiónicos**, siendo los más utilizados por su eficacia los amonios cuaternarios; **compuestos aniónicos**, los cuales presentan propiedades de detergencia como los jabones; **compuestos anfóteros**, con propiedades intermedias entre las anteriores; y los **compuestos tensoactivos no iónicos**, que no poseen carga eléctrica neta (Wildbrett, 2000; Leveau y Bouix, 2002).

3.10.6. Compuestos de amonio cuaternario

Los amonios cuaternarios son un grupo de compuestos tensoactivos catiónicos con propiedades antimicrobianas que tienen como estructura básica al ión amonio (NH_4^+), donde uno o más átomos de hidrógeno son reemplazados por grupos alquilo. Pueden actuar como productos limpiadores y desinfectantes. Al ser solubles en el agua y el etanol, reducen la tensión superficial de los líquidos con los que entran en contacto (McDonnell y Russell, 1999; Leveau y Bouix, 2002).

Los amonios cuaternarios presentan una mayor eficacia en un medio ligeramente alcalino y cuando son empleados en las concentraciones adecuadas no presentan propiedades odoríferas o tóxicas, pero durante su uso, el contacto continuo con la piel puede causar dermatitis por una reacción de hipersensibilidad (Kahrs, 1995). Los amonios cuaternarios se comportan como bactericidas en altas concentraciones y como bacteriostáticos a bajas concentraciones. Estos compuestos son activos para eliminar bacterias Gram positivas, mientras que las bacterias Gram negativas pueden presentar resistencia, causada por una exposición previa en concentraciones subletales. Estos compuestos tienen acción sobre microorganismos fúngicos y en virus tipo lipofílicos pero no sobre virus tipo hidrófilos, micobacterias o esporas. Los amonios cuaternarios son utilizados en altas concentraciones para inhibir especies bacterianas como *Pseu-*

domonas sp. y *Serratia* sp. (Wildbrett, 2000; Leveau y Bouix, 2002; Sidhu, *et al.*, 2002).

El carácter catiónico de estos compuestos provoca un cambio en la tensión superficial de las células bacterianas. La desorganización membranar da lugar a una modificación de la permeabilidad y a una desnaturalización de las proteínas y enzimas celulares y finalmente la destrucción celular (Gilbert y Moore, 2005; Leveau y Bouix, 2002).

Los amonios cuaternarios son ampliamente utilizados como desinfectantes de superficies tanto en ambientes médicos y en la producción de alimentos. El carácter catiónico les impide, salvo excepciones, formularse en mezclas con tensoactivos aniónicos y jabones. Las superficies de acero inoxidable, otros tipos de metales y los materiales plásticos aceptan sin alteraciones las preparaciones a base de amonios cuaternarios, pero las soluciones alcalinas de estos compuestos degradan metales como el aluminio y sus aleaciones. Una ventaja de estos compuestos es que dejan una capa antimicrobiana residual sobre las superficies que evita la proliferación bacteriana, sin embargo, puede ser una situación de desventaja su uso en operaciones con productos lácteos cultivados, quesos, cervezas, etc., donde se emplean cultivos bacterianos para la elaboración de estos alimentos (Schmidt, 1997).

No obstante, su uso masivo puede suponer un riesgo para los consumidores. Al utilizarse como desinfectante, por las características positivas que hemos comentado, puede ser que el criterio de la desinfección prevalezca sobre otros, por lo que puede haber una elevada cantidad de superficies con residuo químico, incluso a concentraciones superiores a las recomendables. En estos casos, el uso extensivo como desinfectante y detergente puede representar un riesgo de contaminación alimentaria causado por (AESAN, 2012):

- Su uso indebido como producto fitosanitario.
- Su presencia como coadyuvante (conservante) de productos fitosanitarios, fertilizantes y otros medios de defensa vegetal (también conocidos como fitofortificantes).
- La contaminación durante el cultivo a través del agua de riego tratada, del suelo

o cajas en la recolección.

- La contaminación cruzada por la desinfección del agua de lavado.
- La contaminación cruzada a partir del equipo, superficies e incluso las manos de los empleados desinfectadas con esta clase de productos químicos.

Todo ello está llevando a las autoridades a considerar su inclusión en normativas referidas a límites de sustancias químicas en los alimentos.

3.10.6.1. Cloruro de benzalconio

El cloruro de benzalconio es una sal de amonio cuaternario cuya fórmula condensada es cloruro de alquil dimetil bencil amonio. Este compuesto es estable en presencia de la luz, cambios de temperaturas y puede almacenarse por largos periodos de tiempo. El cloruro de benzalconio forma espuma que permite que se distribuya uniformemente sobre las superficies tratadas, aumentando su actividad si se utiliza en un ambiente alcalino. Es compatible con detergentes catiónicos y no iónicos, y es incompatible con sustancias aniónicas, algunos tipos de jabones, alcoholes y sulfonatos. Al igual que la mayoría de amonios cuaternarios, el cloruro de benzalconio es soluble en agua dura (Leveau y Bouix, 2002).

3.10.7. Productos ácidos y álcalis

Los ácidos y álcalis actúan alterando la permeabilidad celular y coagulando las proteínas celulares. Dentro de estos compuestos, se encuentran el ácido sulfúrico (H_2SO_4), el ácido nítrico (HNO_3), el hidróxido de sodio (NaOH), el hidróxido de potasio (KOH) y los ácidos grasos. Los ácidos y los álcalis tienen una aplicación limitada debido a su naturaleza cáustica y corrosiva.

En general, los ácidos son más eficaces que los álcalis. El hidróxido de sodio en la concentración del 2% es efectivo contra virus y bacterias patógenas pero ha sido reemplazado en gran parte por productos menos corrosivos e irritantes, sin embargo, en situaciones específicas puede ser una opción de uso por su fácil disponibilidad (Wildbrett, 2000; Leveau y Bouix, 2002).

Los ácidos grasos y los desinfectantes de ácido carboxílico se desarrollaron en la década de 1980. Las formulaciones típicas incluyen ácidos grasos en combinación con otros tipos de ácidos, como los ácidos fosfóricos o ácidos orgánicos. La doble función de ácido puede ser utilizado para el enjuague y la desinfección en un solo paso. La principal ventaja sobre los ácidos aniónicos es la menor formación de espuma potencial. Son muy estables en las formas diluidas, soportan la presencia de materia orgánica y conservan sus propiedades cuando son aplicados a altas temperaturas. Estos desinfectantes deben ser empleados en un pH medio bajo, ya que tienen una baja actividad por encima de un pH de 3,5 a 4,0.

Los ácidos grasos tienen un amplio espectro de actividad, aunque no son muy eficaces contra levaduras y mohos. Algunas formulaciones pueden perder su actividad a temperaturas inferiores a 10 °C, ser corrosivas para algunos metales y degradar ciertos plásticos y materiales de caucho (Schmidt, 1997).

3.10.8. Fenoles

Los compuestos fenólicos son eficaces contra bacterias Gram negativas y Gram positivas, levaduras, hongos y algunos tipos de virus. Los fenoles sintéticos normalmente no son efectivos contra esporas bacterianas (Kahrs, 1995).

El cresol y el timol son alquilos derivados del fenol, y el hexaclorofeno y el triclosán son fenoles clorinados. Se cree que los compuestos fenólicos actúan frente a las bacterias mediante la interacción con las enzimas en la membrana citoplasmática, alterando la permeabilidad de la pared celular. Las concentraciones de usos finales pueden variar de 0,05% a más de 1%, dependiendo del ingrediente activo y el nivel desinfectante que se quiera aplicar. Los derivados fenólicos tienden a mantener su actividad en presencia de materia orgánica y agua dura, siendo la actividad más elevada cuando el pH del medio está comprendido entre unos valores de 4 y 9.

Al igual que los compuestos fenólicos, sus derivados tienen una solubilidad relativamente baja y tienden a dejar un residuo sobre las superficies. Los agentes fenólicos son generalmente incompatibles con los derivados catiónicos y presentan antagonismo con algunos compuestos no iónicos (Leveau y Bouix, 2002).

Agentes tensoactivos aniónicos, incluyendo los jabones naturales, son generalmente utilizados para solubilizar los compuestos fenólicos en las formulaciones acuosas (McDonnell y Russell, 1999; Fu *et al.*, 2007).

3.11. FACTORES QUE AFECTAN LA ACCIÓN DE LOS DESINFECTANTES

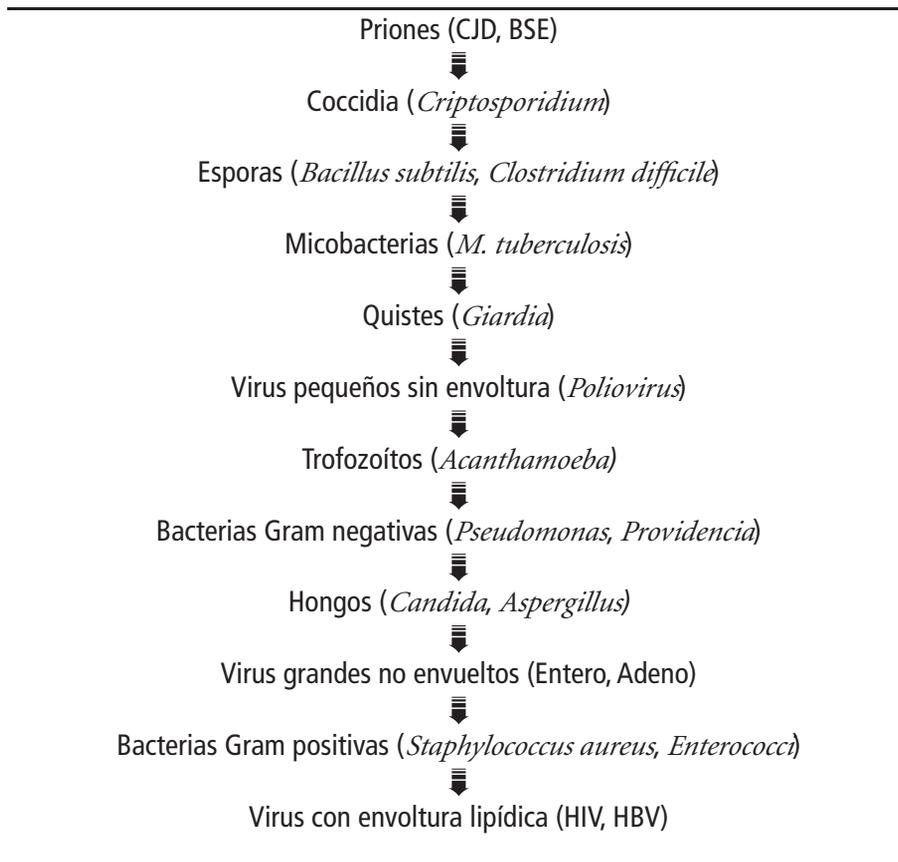
La actividad de los desinfectantes depende de una serie de factores, algunos inherentes a los propios desinfectantes, microorganismos de ensayo o el método elegido para su evaluación. La comprensión de los factores que afectan la actividad antimicrobiana es esencial para garantizar que la formulación de un desinfectante se utilice correctamente.

3.11.1. Naturaleza de los microorganismos

La actividad de los desinfectantes depende en gran medida de la resistencia de las especies bacterianas en las que actúan. Con este objetivo, las cepas utilizadas en los ensayos de eficacia de los desinfectantes deben ser representativas de la flora bacteriana en general, empleando cepas de colección acreditadas y conservadas adecuadamente para garantizar su estabilidad genética.

Las cepas bacterianas patógenas, si bien no se emplean en los ensayos, comúnmente son más sensibles a la acción de los desinfectantes. Entre los microorganismos más resistentes a la exposición de los desinfectantes están las esporas bacterianas, las micobacterias, bacilos Gram negativos, bacterias Gram positivas y microorganismos fúngicos.

Aunque hay excepciones en la clasificación bacteriana, de acuerdo a la resistencia (por ejemplo, algunas micobacterias son relativamente sensibles a la desinfección), la susceptibilidad a los desinfectantes nos ofrece información útil al momento de elegir los desinfectantes adecuados (tabla 3). La sensibilidad de los virus depende de su estructura. Aquellos que poseen envoltura, son más sensibles a la desinfección en comparación con los virus sin envoltura (Maillard, 2001).

Tabla 3. Resistencia según tipo microorganismo.

Fuente: McDonnell y Russell, 1999.

3.11.2. Cantidad de microorganismos

El número de microorganismos influye en la eficacia biocida, lo que implica que la cantidad de desinfectante o el tiempo de contacto sean directamente proporcionales a la cantidad de microorganismos para conseguir un nivel determinado de actividad desinfectante. Así mismo, cuando las bacterias se hallan formando biofilms son menos susceptibles a los desinfectantes que las células bacterianas usadas en los ensayos de suspensión para evaluar la actividad bactericida de productos desinfectantes (Luppens *et al.*, 2002b). Independientemente de la cantidad de microorganismos, la eliminación o reducción de los mismos, debería realizarse hasta una cantidad que no suponga un riesgo para la salud del consumidor o la calidad del producto.

3.11.3. Tiempo de contacto y concentración del producto

La concentración de un biocida es probablemente el factor más importante que afecta la actividad antimicrobiana. Cuanto mayor es la concentración de un desinfectante, generalmente mayor es su eficacia, y por tanto, el tiempo de exposición será menor. Un tiempo de contacto suficiente del desinfectante con los microorganismos es un punto crítico para asegurar la desinfección y alcanzar una reducción de la población bacteriana en los ensayos de suspensión (Holah, 1995b).

Normalmente el tiempo de contacto en los ensayos de evaluación de desinfectantes es de 5 minutos. Tiempos superiores pueden ser requeridos para una correcta desinfección de utensilios o determinadas piezas de algunos equipos que sean de difícil acceso para los desinfectantes.

3.11.4. Materia orgánica y otras sustancias

Diversas sustancias pueden neutralizar la acción de los desinfectantes, por este motivo, previamente a la desinfección, hay que limpiar las superficies de restos orgánicos, jabones y detergentes; debido a que forman cubiertas que impiden el adecuado contacto del desinfectante con las superficies o se combinan con estos formando compuestos inertes o menos activos al provocar una disminución de las propiedades antimicrobianas de los desinfectantes. Es por tanto esencial eliminar toda la suciedad durante la fase de limpieza a través del enjuague previo a la desinfección (Holah, 1995a).

3.11.5. Localización y tipo de superficie

Los microorganismos pueden encontrarse en zonas de difícil acceso que dificulten la penetración del desinfectante. El diseño de las infraestructuras y equipos, la selección de los materiales y el tratamiento que se realice sobre ellos para limitar la adherencia de los microorganismos, después de la limpieza y desinfección, son factores determinantes en la higiene de las superficies (Maukonen *et al.*, 2003).

Materiales extremadamente porosos ofrecen superficies más apropiadas para la adherencia, al favorecer la presencia de residuos orgánicos y microorganismos. De igual

manera, grietas, ranuras y espacios corroídos dificultan los procesos de limpieza y desinfección (Troller, 1993).

El material más práctico y por consiguiente el más utilizado en los equipos es el acero inoxidable, ya que puede tratarse previamente de diversas maneras con el fin de obtener una superficie fácil de limpiar, además de ser estable e inerte al entrar en contacto con los alimentos (Flint *et al.*, 2000).

3.11.6. Temperatura de acción

La potenciación de la actividad por el incremento de la temperatura llega a un punto máximo, considerado como la temperatura óptima de aplicación, punto a partir del cual, un incremento de la temperatura produce una pérdida del potencial biocida, como ocurre con el peróxido de hidrógeno al hacerse inestable a temperaturas superiores de 45 °C (Gerald y Gilbert, 1998).

3.11.7. Efecto del pH

Los desinfectantes tienen un pH óptimo de acción y cuando se producen variaciones, afectan principalmente a la formulación del producto. Un cambio de pH puede alterar la ionización del desinfectante y por tanto su actividad. Así también la dureza del agua y la calidad y tensión superficial de la solución desinfectante pueden afectar las propiedades de los productos (Holah, 1995a).

3.12. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE PRODUCTOS DESINFECTANTES

El uso comercial de los desinfectantes está regulado por normas de evaluación estandarizadas, realizadas mediante ensayos de laboratorio. El objetivo principal de un ensayo de la eficacia de un producto con propiedades bactericidas es determinar la capacidad de eliminación de un número de células en relación con el tiempo de exposición.

Cuantificar las propiedades bactericidas de los desinfectantes se inició tan pronto como

se descubrió el papel de las bacterias en la propagación de las enfermedades y el deterioro de los alimentos. Robert Koch estudió el efecto bactericida de los desinfectantes, describiéndolo en un artículo titulado “*Über Desinfektion*”, “Sobre la desinfección”, en el cual hizo mediciones del poder inhibitorio del cloruro de mercurio en esporas de *Clostridium anthracis*, donde no se consideró la inactivación de los residuos del producto desinfectante al final de la exposición con el microorganismo en estudio. Más adelante, la inactivación de un producto desinfectante al final de la exposición con un microorganismo fue considerado por Julius Geppert, quien utilizó el sulfato amónico como neutralizante del cloruro de mercurio (Reybrouck, 1998).

Durante las últimas décadas del siglo XX, los estudios de las propiedades de la desinfección, demostraron que el límite de no sobrevivencia de los microorganismos era determinado por el tamaño del inóculo, es decir, el número de organismos presentes en la suspensión bacteriana que entra en contacto con el desinfectante. De esta forma, si el inóculo consiste de solamente pocas bacterias, el límite de no sobrevivencia será alcanzado después de un corto periodo de exposición. Para superar esta dificultad, se consideró una reducción cuantitativa del número de células bacterianas para los ensayos y predecir el valor desinfectante de determinados productos. Considerando el amplio campo de aplicación de los desinfectantes, se han desarrollado pruebas más específicas, dependiendo de los diferentes campos de uso (Cremieux y Fleurette, 1991).

3.13. ESTANDARIZACIÓN DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE DESINFECTANTES

Con el objetivo de comparar la población microbiana inicial sometida a la acción de productos con acción antibacteriana y el número de microorganismos sobrevivientes, se crearon grupos de trabajo en distintos países europeos que establecieron diversos ensayos cuantitativos.

En 1989, la formación del Comité Técnico de Antisépticos y Desinfectantes Químicos (CEN/TC 216) estableció los objetivos para la estandarización de la terminología, requerimientos y metodología, incluyendo la eficacia potencial, las recomendaciones de

uso y las condiciones de etiquetado de los antisépticos y desinfectantes químicos para su aplicación en diferentes actividades (agricultura, medicina, alimentación, industria y veterinaria). En 1999 el comité técnico europeo CEN/TC 216 estableció los procedimientos de evaluación de los desinfectantes en tres fases (tabla 4).

Tabla 4. Fases de la evaluación de desinfectantes. Comité Europeo de Normalización (CEN).

Fase	Tipo de test	Propósito
Fase 1	Normativa básica para la evaluación de ensayos de suspensión.	Establecer si un producto presenta actividad bactericida, fungicida o esporicida, sin tener en cuenta condiciones específicas de uso.
Fase 2, Etapa 1	Ensayo cuantitativo en suspensión bajo condiciones representativas de uso.	Los ensayos reproducen condiciones similares a los esperados en los campos agroalimentario, médico, veterinario e industrial.
Fase 2, Etapa 2	Ensayo cuantitativo en superficies bajo condiciones representativas de uso.	Establecer si un producto tiene actividad bactericida en superficies.
Fase 3	Ensayo en condiciones reales de uso	Evaluación en condiciones prácticas de uso del producto a emplearse.

La primera fase establece si un producto presenta actividad bactericida en ensayos de suspensión; en la segunda fase, los ensayos de inmersión y en superficies simulan las condiciones reales de uso; y una tercera fase, se realiza en condiciones reales de uso, examinando si después de un tiempo determinado, la carga bacteriana ha sido eliminada por la solución desinfectante (Van Klingerén *et al.*, 1998; Holah, 2003).

3.13.1. Ensayos de suspensión

Los ensayos de suspensión consisten en mezclar un inóculo bacteriano con el desinfectante a ser evaluado. Después de un tiempo de contacto determinado, se realiza una neutralización para inactivar el producto desinfectante en estudio. Después de la recuperación de los microorganismos en un medio de cultivo, se determina la reducción del inóculo inicial bacteriano producido por el desinfectante en distintos tiempos de contacto, diluciones del desinfectante, diferentes durezas del agua y ausencia o presencia de materia orgánica. El ensayo básico de la actividad bactericida en suspensión UNE-EN 1040 requiere de

una reducción de $5 \log_{10}$ en un tiempo que puede variar entre 1 a 60 minutos (Anónimo, 1997a). La prueba fungicida UNE-EN 1275, requiere de una reducción de $4 \log_{10}$ durante 15 minutos de contacto (Anónimo, 1997b). Y la prueba esporicida UNE-EN 14347, una reducción de $4 \log_{10}$ durante 30, 60 o 120 minutos de tiempos de contacto (Anónimo, 2005).

Los ensayos de la fase 1/etapa 1 (UNE-EN 1040 y UNE-EN 1275) se realizan en ausencia de sustancia interferente; mientras que los correspondientes a la fase 2/etapa 1, se realizan en condiciones limpias (mínima presencia de materia orgánica) o en condiciones sucias de ensayo (superficies con un nivel considerable de materia orgánica) (Anónimo, 1998a; Anónimo, 1998b). En los ensayos de suspensión, las pruebas se han demostrado suficientemente reproducibles cuando se realizan replicados adecuados. Sin embargo, la repetitividad y reproducibilidad pueden alterarse cuando se evalúan en presencia de materia orgánica (Bloomfield *et al.*, 1993; Wirtanen y Salo, 2003).

3.13.2. Ensayos sobre superficies

Estos ensayos evalúan la aplicación mecánica de los desinfectantes sobre las superficies. Debido a la más lenta difusión en las superficies, los desinfectantes son de concentraciones más elevadas que los utilizados en los ensayos de suspensión, ya que la eficacia de un desinfectante depende en parte de la capacidad de penetrar sobre toda la cubierta superficial y de la cantidad de materia orgánica presente (Holah *et al.*, 1998; Peters y Spicher, 1998).

Estos factores fueron considerados por el Comité Europeo de Normalización que desarrolló la norma UNE-EN 13697 “Ensayo cuantitativo de superficies no porosas para la evaluación de la actividad bactericida y/o fungicida de desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios en la industria, en el hogar y en colectividades correspondiente a la fase 2/etapa 2”. En este ensayo un producto desinfectante es eficaz si comprueba un factor de reducción de la viabilidad bacteriana igual o superior de $4 \log_{10}$, con un tiempo de contacto de 5 minutos del desinfectante y un inóculo bacteriano adherido a una superficie de acero inoxidable, realizados a una temperatura ambiente de 18 °C a 25 °C. Ya que el tiempo de desecación del inóculo sobre la superficie

puede alterar la adherencia de las bacterias y repercutir directamente en los resultados, el secado del inóculo no debe exceder de 1 hora a una temperatura de 37 °C.

3.14. RESISTENCIA BACTERIANA

Si bien el concepto de resistencia bacteriana es un término relativo, esta característica se presenta cuando una cepa o especie bacteriana crece en una concentración desinfectante más alta que el necesario para reducir otro microorganismo y se dice que tiene mayor resistencia. A diferencia de los antibióticos, la resistencia bacteriana a determinados desinfectantes tiene su origen en el amplio espectro de actividad en distintos lugares de las células (Chapman, 2003; Russell, 2003). La resistencia puede ser tanto intrínseca (una propiedad natural del organismo), adquirida por mutación, o por la adquisición de plásmidos (McDonnell y Russell, 1999).

3.14.1. Resistencia intrínseca

El mecanismo de resistencia intrínseca es un fenómeno determinado genéticamente y se presenta cuando un desinfectante no alcanza su mayor diana de acción a concentraciones suficientemente elevadas para eliminar ciertos microorganismos. Las esporas bacterianas, las micobacterias y las bacterias Gram negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, son intrínsecamente resistentes a muchos desinfectantes.

Las bacterias que forman biofilms presentan una resistencia intrínseca debido a los mecanismos resultantes de la adaptación fenotípica de las células. La pared celular Gram positiva de los estafilococos, compuesta esencialmente por peptidoglicanos, no impide la penetración de los desinfectantes de elevado peso molecular como los amonios cuaternarios y la clorhexidina, que junto a los bacilos son más sensibles a estos compuestos (Russell, A. y Russell, N. 1995).

3.14.2. Resistencia adquirida

La resistencia bacteriana adquirida puede aparecer como mecanismo de defensa contra agentes antimicrobianos por mutación o adquisición de elementos genéticos externos

como los plásmidos. Estos mecanismos de defensa celular activan regiones del genoma que se encuentran en el citoplasma induciendo la síntesis de enzimas que actúan contra diversas sustancias letales como los compuestos desinfectantes (Russell, 1999).

3.14.3. Resistencia cruzada y rotación de desinfectantes

La aparición de los fenómenos de adaptación cruzada a diferentes desinfectantes, incrementa la sobrevivencia de los microorganismos. La adaptación cruzada no se presenta como respuesta a una resistencia intrínseca, sino cuando las formulaciones de los productos desinfectantes no son usados adecuadamente durante su aplicación (Bloomfield, 2002; Chapman, 2003).

Según Langsrud *et al.* (2003a), la resistencia cruzada puede producirse:

1. Si dos agentes antibacterianos utilizan en las células bacterianas la misma vía (por ejemplo, las porinas) para alcanzar su objetivo de acción.
2. Cuando los mecanismos de acción de los desinfectantes son similares (por ejemplo, la inhibición de la síntesis de proteínas).
3. Si los desinfectantes tienen similares mecanismos de resistencia (por ejemplo, reducción de la permeabilidad).

La alternancia entre dos o más desinfectantes se utiliza para evitar el desarrollo de poblaciones bacterianas resistentes en los entornos de producción de alimentos. Sin embargo, en la práctica se puede dar el caso que se apliquen desinfectantes de acción similar y los microorganismos resistentes a un desinfectante pueden volverse resistentes a los otros. El desarrollo de esta flora bacteriana puede evitarse mediante el adecuado uso de las concentraciones desinfectantes o mediante la combinación de diferentes ingredientes activos (Heinzel, 1998; Meyer, 2000).

Los riesgos en la producción y procesado de alimentos causados por la resistencia bacteriana a los desinfectantes se considera baja cuando estos productos se utilizan en las condiciones adecuadas (Meyer, 2006). Ejemplos de resistencia cruzada entre los desinfectantes ha sido descrito en *Pseudomonas aeruginosa*, por el uso de amonios cuater-

narios junto a compuestos anfóteros y el uso simultáneo del triclosán con antibióticos (Jones *et al.*, 1989; Chuanchuen *et al.*, 2001).

3.14.4. Biofilms y resistencia

Durante las dos últimas décadas se ha determinado por diversos estudios que las bacterias adheridas a las superficies son más resistentes al efecto de los desinfectantes que las bacterias en estado planctónico conservadas en suspensión (Bower *et al.*, 1996; Russell, 2004). Así, las bacterias presentes en un biofilm pueden ser de 500 a 1500 veces más resistentes a los productos esterilizantes en comparación del mismo número de bacterias planctónicas cultivadas en suspensión líquida (Hyde *et al.*, 1998).

Estos cambios se deben a patrones de expresión genética de las bacterias presentes en el biofilm que no se observan en las células planctónicas, con el consiguiente aumento de la resistencia frente a diversas clases de antimicrobianos. Por ejemplo, biofilms formados por *Salmonella entérica* serovar enteritidis sobrevivieron a un tratamiento letal de cloruro de benzalconio en comparación de células planctónicas cuando fueron expuestas previamente a concentraciones subletales del desinfectante (Mangalappalli-Illathu *et al.*, 2008).

3.15. BIOFILMS EN LOS AMBIENTES DE PROCESADO DE ALIMENTOS

Está bien documentado que la presencia de biofilms se ha convertido en un problema en una amplia gama de industrias dedicadas al sector de la alimentación (tabla 5). Este problema se incrementa cuando las operaciones de limpieza y desinfección son inadecuadas, haciendo a los microorganismos más resistentes para ser eliminados (Shi y Zhu, 2009; Srey *et al.*, 2013). Una serie de informes muestran la persistencia de agentes patógenos en las superficies en contacto con los alimentos como los descritos en *Listeria monocytogenes* (Frank y Kofi, 1990), *Yersinia enterocolitica* (Kumar y Singh, 1994), *Campylobacter jejuni* (Stern y Kazmi, 1989) y *Escherichia coli* O157:H7 (Doyle y Padhye, 1988).

Tabla 5. Biofilms encontrados en la industria de alimentaria.

Lugar	Biofilms aislados (%)
Planta de procesado de lácteos, líneas de pasteurización	<i>Bacillus cereus</i> (12)
	<i>Escherichia coli</i> (11)
	<i>Shigella</i> sp. (11)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (8)
Planta de elaboración de helados, cinta transportadora o unidad de producción	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Shigella</i>
Industria de pescado, unidad de producción de caviar	<i>Neisseriaceae</i> (25)
	<i>Pseudomonas</i> (6)
	<i>Vibrio</i> (10)
	<i>Listeria</i> (3)
Industria del camarón	<i>Pseudomonas</i> (66)
	<i>P. fluorescens</i>
	<i>P. putida</i>
Industria del pescado	<i>Enterobacteriaceae</i> (27)
	<i>Serratia liquefaciens</i>

De: Shi y Zhu, 2009

Los programas de higienización que presenten limitaciones en sus procedimientos, generan una acumulación de microorganismos sobre las superficies de los equipos que resulta en la formación de biofilms, provocando una contaminación post-procesado y reduciendo la vida útil de los alimentos elaborados (Mattila *et al.*, 1990). Se ha observado que las principales fuentes que participan en la acumulación de biofilms son los suelos, las tuberías de aguas residuales, cintas transportadoras, superficies de acero inoxidable, materiales de caucho y sellos de teflón (Fletcher, 1985; Mafu *et al.*, 1990; Blackman y Frank, 1996).

3.16. HIGIENIZACIÓN EN EL ÁMBITO DOMÉSTICO

Al igual de lo que ocurre en los establecimientos de transformación de alimentos, los agentes patógenos pueden existir en los hogares durante largos periodos de tiempo. Sin

embargo, se presta poca atención a la higiene en el ámbito doméstico ya que se ha supuesto que en los hogares modernos se respetan las prácticas tradicionales de higiene. No obstante, una elevada proporción de enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos tienen su origen en estos ambientes (Scott *et al.*, 1982; Scott, 1996). Los hogares, y en particular las cocinas, ofrecen una variedad de posibilidades para la recontaminación bacteriana (Bloomfield, 2003; Redmond y Griffith, 2003; Garrett *et al.*, 2008).

En el Reino Unido, se estima que se presentan 9 millones de casos de enfermedades digestivas cada año, muchas de las cuales se originan en los hogares. Así mismo, aproximadamente el 16% de los brotes de intoxicación alimentaria en Inglaterra y Gales pueden estar asociados con el consumo de comidas preparadas en casas particulares. Los datos globales sobre la incidencia de las enfermedades infecciosas ha llevado a tomar iniciativas para mejorar la higiene en los hogares, estableciendo programas para la eliminación bacteriana de las superficies domésticas (Garrett *et al.*, 2008).

Se ha considerado que la contaminación cruzada con patógenos bacterianos, en los ambientes domésticos y en establecimientos de servicios de preparación de comidas es el factor más importante para la propagación en forma esporádica o epidémica de las enfermedades transmitidas por alimentos (Chen *et al.*, 2001). Experimentos de contaminación cruzada mostraron que las tablas de madera, sobre todo las gastadas por el uso, presentan un mayor potencial de riesgo para causar una contaminación cruzada (Gough y Dodd, 1998). Especies bacterianas como *Campylobacter jejuni* y *Salmonella* spp. pueden transferirse fácilmente desde productos como el pollo crudo hacia las tablas de picar, platos y las manos (de Boer y Hahné, 1990).

3.17. CONTROL DE LA ADHERENCIA BACTERIANA A LAS SUPERFICIES

Un adecuado control de la adherencia bacteriana puede ser bastante difícil para diversos tipos de microorganismos. Conociendo las posibles limitaciones, se han desarrollado nuevas tecnologías para evitar la formación de biofilms. El estudio de las propiedades de los compuestos empleados en la limpieza y desinfección ha servido para determinar la elección de productos desinfectantes con propiedades que inhiban el posterior crecimiento bacteriano sobre las superficies (Poulsen, 1999). Para la

higienización de superficies, lo ideal sería el empleo alternativo de dos o más métodos de limpieza, ya que los microorganismos pueden adaptarse y sobrevivir a diferentes productos desinfectantes cuando son utilizados de forma individual (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992).

Incrementar el tiempo de la exposición de los detergentes sobre las superficies ha demostrado que reduce los recuentos de bacterias viables ya que tienen menos probabilidades de sobrevivir si los procedimientos de saneamiento han sido realizados correctamente. Una limpieza frecuente en intervalos cortos de tiempo es otro método eficaz para prevenir o limitar la esporulación o la formación de biofilms de *Bacillus subtilis* (Lindsay *et al.*, 2005).

3.17.1. Tipo de superficies empleadas

En la práctica, el uso exclusivo de detergentes y desinfectantes no siempre son suficientes para eliminar los biofilms. Humm (1992) concluyó que el tratamiento con desinfectantes solo reduce en un 50% el número de células de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* adheridas a superficies de acero inoxidable.

La elección de los materiales es, por tanto, de gran importancia en el diseño de los equipos en contacto con los alimentos y las superficies de procesado. Propiedades tales como la rugosidad, humectabilidad (determinado por la hidrofobicidad), vulnerabilidad al desgaste, facilidad para la limpieza y desinfección, influyen en la capacidad de las células a adherirse a una superficie determinada. Está demostrado que alimentos y microorganismos se acumulan como biofilms en superficies de acero inoxidable, aluminio, vidrio, caucho, teflón y materiales de nylon que forman parte de las infraestructuras de las plantas de procesado de alimentos (Mafu *et al.*, 1990; Notermans *et al.*, 1991; Blackman y Frank, 1996).

Numerosas superficies de contacto, como el acero inoxidable y el teflón, pueden mostrar atracción por moléculas orgánicas como la leche y llegar a ser un sustrato acondicionante para la formación de biofilms (McGuire y Swartzel, 1989). Así mismo, muchas bacterias tienen una mayor afinidad por las superficies hidrófilas (superficies de metal,

vidrio, etc.) en comparación de las superficies hidrófobas (caucho, plásticos, etc.) (Bendering *et al.*, 1993). Si bien el grado de formación de biofilms puede variar según los microorganismos presentes, Rogers *et al.* (1994) estudiaron la formación de biofilms de *Legionella pneumophila* en diferentes materiales, encontrando que el vidrio era el material con la mínima facilidad para la formación de biofilms, mientras que el látex presentaba la mayor facilidad (tabla 6).

Tabla 6. Facilidad para la formación biofilms en diferentes materiales.

Facilidad	Material
Mínima	Vidrio
	Acero Inoxidable
	Polipropileno
	PVC clorado
	PVC no plastificado
	Polietileno
	Etileno-propileno
Máxima	Látex

Fuente: Rogers *et al.*, 1994; Meyer, 2003.

Las superficies fabricadas a partir de materiales que no son porosos, facilitan la limpieza en comparación de otros materiales. Las superficies de acero inoxidable son las más utilizadas en el procesado de alimentos, debido a su composición química, facilidad de limpieza y alta resistencia al calor (Zottola y Sasahara, 1994). Estas superficies son comúnmente tratadas con desinfectantes y productos de limpieza que contienen peróxidos, cloraminas o hipocloritos. En particular los hipocloritos pueden ser agresivos incluso para las superficies de acero inoxidable si presentan alteraciones. Por tanto, la duración del contacto con los desinfectantes, así como la temperatura de aplicación y un enjuague a fondo con agua, deben ser controlados cuidadosamente para conservar las propiedades protectoras las superficies (BSSA, 2001).

3.18. MATERIALES CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

Con el fin de eliminar o reducir sustancialmente la adhesión bacteriana y prevenir la formación de biofilms, se han realizado esfuerzos para fabricar superficies con propiedades antibacterianas, la aplicación de revestimientos para las superficies o la modificación y/o alteración de su arquitectura. Ejemplo de estos esfuerzos, es el uso de compuestos a base de polímeros para ser utilizados como revestimientos de superficies y pinturas (Thouvenin *et al.*, 2003; Tsibouklis *et al.*, 2000).

También materiales de embalaje de alimentos que contienen compuestos antimicrobianos han adquirido importancia práctica en los últimos años para el control biológico de los microorganismos patógenos y alterantes de los alimentos. Estos compuestos antibacterianos tienen la propiedad de migrar a las superficies, inhibiendo la adherencia bacteriana (Halek y Garg, 1989; Weng y Hotchkiss, 1992).

Gottenbos *et al.* (2001) observaron una reducción en la tasa de adhesión bacteriana por el uso de caucho de silicona como biomaterial revestido con un compuesto de amonio cuaternario. Park *et al.* (2004) emplearon la lisozima para mejorar las propiedades antimicrobianas del quitosán cuando se usa en forma de películas sobre las superficies de contacto con alimentos, observando una reducción del crecimiento de *Streptococcus faecalis* y *Escherichia coli*.

Péptidos como las bacteriocinas presentan propiedades antibacterianas durante su uso (Tagg *et al.*, 1976). La nisina es una bacteriocina producida por ciertas cepas de *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* que muestra actividad frente a bacterias Gram positivas, particularmente sobre aquellas que forman esporas como *Bacillus* y *Clostridium* (Hurst, 1981; Ray, 1992; Hyde *et al.*, 2006).

En 1988, en los EEUU, la nisina fue aprobado por la U.S. Food and Drug Administration (FDA) como aditivo alimentario para el control de las esporas de *Clostridium botulinum* en quesos fundidos para untar. La nisina cuando es incorporada al acero inoxidable, materiales de caucho y superficies de tereftalato de polietileno (PET) presentan actividad antibacteriana, inhibiendo el crecimiento de *Enterococcus hirae* (Guerra *et al.*, 2005). Así mismo, las superficies de silicona, sílice y materiales para el embalaje de alimentos adsorbidas con nisina reducen la incidencia de la contaminación causada por *Listeria mono-*

cytogenes (Daeschel *et al.*, 1992; Bower *et al.*, 1995; Ming *et al.*, 1997).

Tabla 7. Materiales de uso comercial con propiedades antibacterianas.

Compañía	Aplicación	Componente activo	Aplicaciones
Sanitized AG, Suiza /Clariant	Sanitized® Actigard® Saniprot®	Triclosán y otros	Textiles, plásticos, cueros, papel, textiles del hogar, poliuretano
DuPont, USA	MicroFree™	Ag, óxido de cobre y silicato de zinc	Textiles, pinturas, láminas de empaque
Miliken Co., USA	Novaron®	Ag, fosfato de zirconio sustituido	Varias
Microban products, UK	Microban®	Triclosán	Varias
Thomson Research Asso- ciates, Canadá	Ultra-Fresh	Triclosán y otros	Polímeros, adhesivos, plásticos, etc.
Surfacine Development Company, USA	Surfacine®	Ag-Haluros/ complejo polímeros	Varias
Ishizuka Glass Co., Japón	Ionpure	Ag/cristal	Varias

Fuente: Vermeiren *et al.*, 2002.

3.18.1. Triclosán

El triclosán (2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenilo éter) es un derivado fenólico sintético no iónico utilizado como agente antimicrobiano de amplio espectro e incorporado a diferentes materiales (Møretro y Langsrud, 2011). El triclosán fue desarrollado en la década del 60 y es utilizado en productos de consumo como pastas de dientes, enjuagues bucales, desodorantes, jabones, productos textiles, juguetes, compuestos lavavajillas, plásticos, utensilios de cocina etc. (Jones *et al.*, 2000; Dann y Hontela, 2011).

En Europa y los Estados Unidos se producen cerca de 350 y 450 toneladas de triclo-

sán, respectivamente, para diferentes aplicaciones comerciales (Singer *et al.*, 2002; von der Ohe *et al.*, 2011). En un estudio en los EEUU, un 76% de 395 jabones comerciales examinados contenían triclosán como componente antibacteriano (Perencevich *et al.*, 2001).

El modo de acción del triclosán se basa en el bloqueo de la enzima enoil-acil proteína reductasa transportadora (ENR), una enzima que interviene en la generación de los ácidos grasos necesarios para la formación de la pared celular (Singh *et al.*, 2011). El triclosán también interfiere en la síntesis del ARN y los ácidos nucleicos bacterianos (Regös y Hitz, 1974; Bhargava y Leonard, 1996).

Las concentraciones de uso común del triclosán varían entre el 0,3% al 2,0% y en la mayoría de los productos que lo contienen se usa en una concentración del 1,0%. Concentraciones inferiores tienen una eficacia cuestionada y deben estar formuladas con detergentes aniónicos y un pH ácido a neutro para aumentar su efectividad (Jones *et al.*, 2000).

El triclosán tiene una amplia actividad frente a diversos tipos de microorganismos como bacterias Gram positivas, Gram negativas, bacterias multirresistentes, algunos tipos de hongos, una elevada actividad frente a *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente, *Plasmodium falciparum* y *Toxoplasma gondii* (Bhargava y Leonard, 1996; Jones *et al.*, 2000; McLeod *et al.*, 2001).

El triclosán es uno de los productos más estudiados en relación con la resistencia bacteriana ya que existe la preocupación de que su uso generalizado pueda conducir a la aparición o la proliferación de bacterias resistentes tanto a productos biocidas como a los antibióticos (Kampf y Kramer, 2004; Yazdankhah *et al.*, 2006).

Si bien en la Unión Europea está restringido el uso del triclosán como aditivo en la fabricación de materiales y objetos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (OJEU, 2010; SCCS, 2010); en los Estados Unidos, la FDA (Food and Drug Administration) no tiene la suficiente evidencia para recomendar a los consumidores un cambio en el uso de los productos que contienen triclosán (FDA, 2010).

3.18.2. Aditivos inorgánicos con propiedades antibacterianas

Aditivos inorgánicos con propiedades antibacterianas como la plata, cobre y zinc se presentan en diferentes formas como es el caso de sales metálicas y nanopartículas coloidales. En comparación con los antimicrobianos orgánicos, las ventajas de los aditivos antibacterianos inorgánicos son la seguridad y la estabilidad de estos compuestos durante su uso (Domek *et al.*, 1984; Södeberg, 1990; Petica *et al.*, 2008; Kandelbauer y Widsten, 2009).

El zinc es un ión metálico necesario para el metabolismo celular, pero un exceso de este metal ejerce efectos tóxicos al actuar como un potente inhibidor del transporte de electrones en el sistema respiratorio bacteriano (Choudhury y Srivastava, 2001). El óxido de zinc (ZnO) se ha estudiado al presentar propiedades para inhibir el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Hallmans y Elmros, 1980; Atmaca *et al.*, 1998).

La actividad antibacteriana del óxido de zinc es mayor en bacterias Gram positivas en comparación de las Gram negativas (Södeberg *et al.*, 1990; Sawai *et al.*, 1995). Este metal en forma de piritionato de zinc [zinc bis (2-pyridylthio)-n-óxido] se incorpora en productos de aseo, plásticos y pinturas, con el objetivo de evitar la degradación producida por la adherencia de bacterias, hongos, mohos y algas; además de aprovechar sus propiedades antimicrobianas (Sun *et al.*, 2006).

Las sales de plata han sido utilizadas durante mucho tiempo para inhibir la proliferación de microorganismos a nivel clínico y ambiental. Estas sales en forma de cationes (Ag^+), en su forma no iónica (plata elemental) o en forma de nanopartículas, intensifican las propiedades antimicrobianas de este elemento, siendo eficaces para la eliminación de hongos, bacterias y virus (Klueh *et al.*, 2000; Hashimoto, 2001; Lok *et al.*, 2006; Kandile *et al.*, 2010). De todos los iones metálicos, la plata presenta la más alta toxicidad para los microorganismos y es el menos tóxico para las células animales (Golubovich y Rabotnova, 1974). Materiales médicos son a menudo provistos de un revestimiento de plata que actúa como un inhibidor del crecimiento bacteriano (Schierholz *et al.*, 1998).

El cobre en forma de ion Cu^{2+} ha demostrado *in vitro* una amplia actividad bactericida al penetrar en la membrana celular bacteriana y dañar la cadena respiratoria de las células (Domek *et al.*, 1984; Tong *et al.*, 2005). El cobre también produce una interacción con los procesos enzimáticos y la oxidación de los componentes de la membrana celular (Cervantes y Gutiérrez-Corona, 1994; Pearce y Sherman, 1999). En el año 2008, la Agencia de Protección Medio Ambiental (EPA) de los Estados Unidos reconoció al cobre como el primer metal con propiedades bactericidas, al observarse que superficies fabricadas con aleaciones de cobre inactivan diferentes tipos de especies bacterianas (Wilks, *et al.*, 2005; Yoon *et al.*, 2007; Borkow y Gabbay, 2009).

3.19. BIOFILMS EN SISTEMAS ACUÁTICOS

3.19.1. Formación de biofilms en la acuicultura

Desde principios del siglo XX, los estudios sobre la adherencia bacteriana a superficies en medios acuáticos, establecieron los modelos para conocer el desarrollo de los biofilms (Lloyd, 1930; ZoBell, 1943). Los ambientes acuáticos representan más del 70% de la superficie de la tierra, incluyendo los océanos, estuarios, ríos, lagos, humedales, arroyos, manantiales y aguas subterráneas. Ya que los biofilms son ubicuos en las superficies de ambientes acuáticos, al desprenderse las células bacterianas a las fuentes de agua pueden propagar diversos microorganismos (Harvell *et al.*, 1999; Huq *et al.*, 2008). *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae* y las micobacterias no tuberculosas son ejemplos de bacterias patógenas que forman biofilms en ambientes acuáticos naturales (Kierek y Watnick, 2003; Hall-Stoodley y Stoodley, 2005; Fong *et al.*, 2006).

Los recursos acuáticos, además de ser esenciales para la vida, proveen de los medios necesarios para actividades como la acuicultura. En el transcurso de aproximadamente medio siglo, la acuicultura ha pasado de ser una actividad secundaria en la producción de alimentos a equipararse a la producción de pesca de captura, suministrando productos pesqueros necesarios para cubrir las necesidades alimentarias de la población mundial (Sandrin *et al.*, 2009; FAO, 2012).

En la acuicultura, el género *Flavobacterium* es un grupo de especies que persiste en forma

latente, causando brotes de enfermedades dentro de las granjas de crianza de salmones y truchas. *Flavobacterium* sp. (flavobacterias) se presentan como bacterias aisladas de aguas dulces, aguas marinas, aguas residuales o formando biofilms. El género *Flavobacterium* se ha detectado en alimentos como pescados, crustáceos, moluscos, carnes, leche y subproductos, y huevos; siendo aceptado como un contaminante de alimentos proteicos y del agua. Dentro de este género, *Flavobacterium columnare* y *Flavobacterium psychrophilum* son especies patógenas que merman la producción de la acuicultura de peces salmónidos (García-López *et al.*, 2004; Bernardet y Bowman, 2006; Duchaud, 2007).

3.19.2. *Flavobacterium psychrophilum*

Flavobacterium psychrophilum (antes *Flexibacter psychrophilus* o *Cytophaga psychrophila*), es una bacteria Gram negativa, aerobia estricta, tipo bacilo delgado con extremos redondeados. Las células de *F. psychrophilum* tienen un tamaño aproximado de 0,4 µm a 0,5 µm de diámetro y de 1,5-7,5 µm de largo. El principal hábitat del género *Flavobacterium* es el suelo y agua donde existe materia orgánica en descomposición. Cuando esta especie bacteriana habita en ríos y lagos, su desarrollo se produce en un rango de temperatura de 4 °C a 23 °C (Holt, 1988; Dalsgaard, 1993).

3.19.3. Enfermedades causadas por *F. psychrophilum* y su transmisión

Flavobacterium psychrophilum es el agente causal de la “enfermedad bacteriana del agua fría” (CWD) (Borg, 1960), el “Síndrome de la trucha de arco Iris” (RTFS) (Holt *et al.*, 1993) y el “Síndrome del alevín de trucha” (RTFS) (Lorenzen, 1994 y Rangdale *et al.*, 1995) en peces salmónidos y ocasionalmente en otras especies de peces. Originalmente se consideró que la distribución geográfica de *F. psychrophilum* estaba limitado a América del Norte (Anderson y Conroy, 1969). Actualmente, por la rápida expansión de la acuicultura, *F. psychrophilum* está reconocido como un patógeno en la acuicultura de agua dulce, causando cuantiosas pérdidas económicas en granjas de peces salmónidos alrededor del mundo (Madetoja *et al.*, 2002).

Las condiciones de la enfermedad han sido descritas en toda Europa, tanto en peces salmónidos, así como en otras especies (Cipriano y Holt, 2005). El agente también ha

sido aislado de peces enfermos en distintos países como Japón (Wakabayashi *et al.*, 1991), Australia (Tasmania) (Schmidtke y Carson, 1995), Corea, Chile y Perú (Barnes y Brown, 2011).

Las manifestaciones de la “Enfermedad del agua fría” (CWD), así como el curso de la epizootia están estrechamente relacionados con la temperatura del agua ya que se produce entre los 4 °C y 10 °C (Cipriano y Holt, 2005). Aunque se han descrito epizootias a temperaturas de 16 °C, cuando las temperaturas son superiores a 15 °C, la mortalidad de los peces declina progresivamente y conduce a la desaparición de la enfermedad (Holt *et al.*, 1989).

F. psychrophilum se ha encontrado en el mucus de la piel, tejido conectivo de las aletas, branquias, riñones, bazo, fluido ovárico y seminal, y sobre las superficies de huevos de los peces huéspedes (Holt *et al.*, 1993; Madetoja *et al.*, 2002). Puede transmitirse verticalmente, con la consiguiente diseminación en distintas áreas geográficas por el transporte comercial de peces adultos, alevines o huevos. El medio ambiente también puede representar un reservorio para este microorganismo ya que *F. psychrophilum* es capaz de sobrevivir en el agua durante muchos meses, adaptando su morfología para hacer frente a diversas condiciones adversas (Rangdale, 1995; Brown *et al.*, 1997; Vatsos *et al.*, 2001).

3.19.4. Aislamiento de *Flavobacterium psychrophilum*

El aislamiento de *F. psychrophilum* se ve limitado por el lento crecimiento de las células bacterianas, debiendo ser cultivado en medios específicos con una limitada cantidad de nutrientes, tiempos de incubación de 3 a 6 días y una temperatura de 15 °C a 20 °C (Wiklund *et al.*, 2000; Cipriano y Holt, 2005). En algunos casos se ha señalado que *F. psychrophilum* crece débilmente en agar de soja triptona (TSA) (Wiklund *et al.*, 1994; Madetoja *et al.*, 2001).

Otros autores, sin embargo, no han conseguido el crecimiento de *F. psychrophilum* en este medio (Ostland *et al.*, 1997; Ekman *et al.*, 1999). Los medios específicos de cultivos utilizados comúnmente en su aislamiento son agar Cytophaga (Anacker & Ordal's agar) (Anacker y Ordal 1959; Daskalov *et al.*, 1999) y triptone yeast extract salts agar

(TYES) (Holt *et al.*, 1993), con una temperatura de incubación óptima entre los 15 °C y 18 °C. Asimismo, el aislamiento de *F. psychrophilum* a partir de muestras proveniente de aguas ambientales puede ser difícil ya que la presencia de bacterias ambientales de crecimiento rápido inhiben su desarrollo (Nematollahi *et al.*, 2003; García-López *et al.*, 2004).

3.19.5. *Flavobacterium psychrophilum* y formación de biofilms

La capacidad de adhesión y formación de biofilms de *Flavobacterium psychrophilum* contribuye a su difusión en granjas de peces salmónidos alrededor del mundo (Álvarez *et al.*, 2006; Duchaud *et al.*, 2007). En diferentes estudios, *F. psychrophilum* ha sido detectado y aislado de aguas dulces y salobres asociadas con la crianza de peces (Bruun *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2000; Madetoja *et al.*, 2002).

La capacidad de adhesión de este microorganismo afecta principalmente a la piel, a las aletas y huevos de los peces, y la transmisión por el agua indica que las reservas de esta especie bacteriana pueden encontrarse en el agua utilizada en la crianza de peces (Madetoja *et al.*, 2003).

El uso de agentes antimicrobianos en la acuicultura ha dado lugar a la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos, provocando un aumento de la resistencia bacteriana y alteraciones de la flora bacteriana (Bruun *et al.*, 2000; WHO, 2006). Las bacterias patógenas que se encuentran en los biofilms causan una exposición recurrente de los peces a las infecciones, convirtiéndolos en portadores asintomáticos. En una alta densidad, las bacterias de *F. psychrophilum*, que forman biofilms, son menos susceptibles a los antimicrobianos, la oxitetraciclina y la flumequina, al desarrollar resistencia a estos compuestos cuando son expuestos a concentraciones subinhibitorias de crecimiento (Sundell y Wiklund, 2007).

3.20. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA EN SUPERFICIES

Existen diversos procedimientos para el estudio de los biofilms, estos incluyen la acción mecánica, procedimientos químicos y la microscopía. Las fuerzas mecánicas por medio

de la agitación, sonicación y el raspado de superficies presentan el inconveniente de no contabilizar totalmente las bacterias cuando se encuentran fuertemente adheridas a las superficies al tratar de removerlas (Donlan y Costerton, 2002).

Los métodos químicos evalúan los biofilms por la producción de compuestos como el oxígeno, proteínas, enzimas y el adenosín trifosfato (ATP). El método ATP por bioluminiscencia detecta la energía celular, representando el número de células con actividad metabólica de una muestra. Esta técnica proporciona en tiempo real una valoración de la carga microbiana y de los restos celulares en los alimentos, siendo apropiada para evaluar los procedimientos de la limpieza y desinfección (Characklis *et al.*, 1982; Baker, 1992; Chen, 2003).

Tradicionalmente, la microscopía ha sido empleada para la observación de la contaminación bacteriana sobre las superficies. Con la microscopía electrónica de barrido se realizaron las primeras investigaciones para la observación de biofilms, utilizando disolventes (alcohol, acetona y xileno) para deshidratar las muestras gradualmente antes del examen, ya que el agua de hidratación no es compatible con el vacío utilizado por el haz de electrones y produciría la consiguiente distorsión de la imagen de la muestra.

El desarrollo del microscopio confocal de barrido por láser (CLSM) en la década de 1980, permitió examinar biofilms *in situ*, aunque a menor aumento, pero sin las limitaciones de uso del microscopio electrónico de barrido. De este modo, la limitación de la resolución fue compensada por la capacidad de obtener imágenes inalteradas de la matriz de los biofilms (Ladd y Costerton, 1990; Donlan y Costerton, 2002).

3.20.1. Microscopía de fluorescencia

La microscopía de fluorescencia es uno de los métodos directos más utilizados para la observación de biofilms. Este tipo de microscopía emplea un colorante fluorescente (fluorocromo) que permite detectar moléculas que fluorescen (componente fluorescente) al absorber luz de onda corta y reemitir una luz de longitud de onda mayor.

La principal ventaja de la microscopía de fluorescencia es la distribución espacial de las células en la muestra y la posibilidad de observar su viabilidad. Sin embargo, la imagen

es bidimensional y observar los biofilms de forma tridimensional se consigue con el uso de la microscopía confocal (Caldwell *et al.*, 1993; Maukonen *et al.*, 2003).

Existen dos tipos de microscopios de fluorescencia:

1. **Microscopios de fluorescencia de luz transmitida.** Estos microscopios presentan un haz de luz que atraviesa un lente condensador y lo concentra sobre la muestra para obtener una iluminación óptima de la misma.
2. **Microscopios de epifluorescencia.** Estos microscopios presentan más ventajas que los microscopios de luz transmitida, al presentar una luz de alta intensidad y dos sistemas de filtros. Uno de los sistemas de filtros concentra la luz, dejando pasar solo la longitud de onda que excita a las moléculas fluorescentes que se quiere visualizar. La muestra se observa a través de un segundo sistema de filtros que conducen solo la longitud de onda correspondiente a la luz que reemiten los componentes fluorescentes. De esta forma, las estructuras fluorescentes de las células aparecen luminosas sobre un fondo oscuro cuando son observadas por los oculares del microscopio. Así mismo, un sistema de análisis digital de imágenes en un sistema acoplado al microscopio de epifluorescencia es una herramienta eficiente que puede ser utilizado para evaluar de forma cualitativa y cuantitativamente la biomasa, dimensiones y parámetros morfológicos básicos de las bacterias y los biofilms (Takeuchi y Frank, 2001).

3.20.2. Colorantes fluorescentes

Los colorantes fluorescentes al incidir sobre ciertas moléculas emiten luz con una longitud de onda determinada. El color y la intensidad de la luz es una propiedad característica de las moléculas fluorescentes de distintas muestras analizadas (Suzuki *et al.*, 1997). Existen varios colorantes específicos para la detección de determinados componentes celulares. Para detectar la integridad de la membrana bacteriana y por tanto la viabilidad de las células, se emplean colorantes como el FITC (fluoresceína-5-isotiocianato), utilizado para el marcado de biomoléculas como las proteínas, péptidos, ácidos nucleicos y polisacáridos.

El colorante DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol) es específico para el ADN (Porter y Feig, 1980) y el SYTO[®]9, se une al ADN y ARN tanto de células viables como no viables. Para determinar las células no viables, se emplea el yoduro de propidio que penetra solamente en las células que tienen dañada la membrana celular. De este modo, en microscopía, el yoduro de propidio puede ser utilizado junto al SYTO[®]9 para determinar las células viables y no viables de una muestra bacteriana (Boulos *et al.*, 1999).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Superficies de ensayo

Las superficies de ensayo fueron discos de acero inoxidable tipo 1.4301 (Anónimo, 2002; Anónimo, 2006) de 2,0 cm de diámetro y un espesor de 1,2 mm. Previamente a los ensayos, los discos fueron limpiados y desinfectados. La limpieza se realizó sumergiendo los discos en una solución acuosa detergente de Dino-dis-dipol® al 5,0% durante 1 hora. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada las veces necesarias hasta que se presentaron visiblemente limpios. A continuación, los discos se introdujeron en una solución con alcohol isopropílico (2-propanol) al 70% durante 15 minutos, favoreciendo con esto una desinfección parcial y secándolos en una cabina de flujo laminar de aire.

Finalmente, para eliminar los microorganismos que pudieron permanecer viables, los discos fueron esterilizados en autoclave a vapor por presión a 121 °C durante 15 minutos. Los discos fueron utilizados una vez en los diferentes ensayos y se desecharon.

4.1.2. Agua dura

El agua dura se utilizó para preparar las concentraciones de los productos desinfectantes y para el control de agua en los diferentes ensayos. La formulación del agua dura fue (Anónimo, 2002):

1. Solución "A": se preparó disolviendo 19,84 g de $MgCl_2$ anhidro y 46,24 g de $CaCl_2$ en 1000 ml de agua destilada.
2. Solución "B": se disolvió 35,02 g de $NaHCO_3$ en 1000 ml de agua destilada.

Se añadió 600 ml de agua destilada a 6,0 ml de la solución "A". Posteriormente se agregaron 8,0 ml de la solución "B" y se diluyeron con agua destilada hasta alcanzar 1000 ml. El pH de la solución se ajustó a $7,0 \pm 0,2$ y la solución de agua dura se esterilizó a través de un filtro de membrana con un diámetro máximo de poro de 0,45 μm (Millipore®).

4.1.3. Sustancia interferente

La sustancia interferente se emplea sobre las superficies para las condiciones sucias o limpias de los ensayos de desinfectantes. La acción interferente debe ser considerada en los diferentes ensayos de evaluación de productos desinfectantes ya que representa la suciedad sobre estas superficies en condiciones prácticas de uso.

Reactivos como la albúmina bovina interfieren en la acción de los desinfectantes al reaccionar con estos de forma química o inespecífica. Cuanto mayor es la concentración de una sustancia con propiedades interferentes, el efecto protector sobre las superficies aumenta y por tanto mayor es la sobrevivencia de los microorganismos en los ensayos de los productos desinfectantes (Bloomfield *et al.*, 1993; Hunsinger *et al.*, 2005).

Para representar las condiciones sucias de ensayo, se empleó solución de albúmina bovina (polvo liofilizado, grado estándar 96,0%, Sigma®) en una concentración final de 3,0 g/l, disuelta en agua destilada y filtrada con membrana de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore®).

4.1.4. Neutralizante

En el proceso de evaluación de los diferentes productos desinfectantes es importante que estos sean neutralizados, a fin de evitar la continuación de la actividad bactericida una vez finalizado el tiempo de acción sobre las cepas bacterianas en estudio. Como agentes neutralizantes pueden ser utilizados una gran variedad de compuestos en los diferentes ensayos, dependiendo del desinfectante que se quiera inactivar. Los agentes neutralizantes más comunes incluyen compuestos como la lecitina, polisorbato 80 (Tween 80®), tiosulfato de sodio, etc.; siendo necesario que sean validados previamente a los ensayos, a fin de demostrar que la neutralización es eficaz e inocua para los microorganismos presentes (Van de Weyer *et al.*, 1993; Taylor *et al.*, 1999; Fraise, 2008). En el presente estudio, la solución neutralizante fue formulada con: lecitina, 3,0 g/l; polisorbato 80 (Tween 80®), 30,0 g/l (Panreac Química S.A.); tiosulfato de sodio, 5,0 g/l (Panreac Química S.A.); l-histidina, 1,0 g/l (Sigma-Aldrich®); y saponina, 30,0 g/l (Sigma®); en disolución tampón fosfato (0,25 mol/l) al 1,0 % (v/v) y un pH de $7 \pm 0,02$ (Anónimo, 2002).

4.1.4.1. Neutralizante para la evaluación de productos desinfectantes a base de peróxido de hidrógeno

Se estandarizó una solución neutralizante para la evaluación de los desinfectantes a base de peróxido de hidrógeno como único principio activo o en combinación con otros componentes (tablas 8 y 9). Previamente a los ensayos, se evaluó la catalasa como neutralizante en comparación al propuesto en el apartado 4.1.4 en doble concentración. Con los productos ensayados se observó que el objetivo de la neutralización del peróxido de hidrógeno era similar empleando catalasa (Sigma-Aldrich®) en comparación de la mezcla: lecitina, 6,0 g/l; polisorbato 80 (Tween 80®), 60,0 g/l; tiosulfato de sodio, 5,0 g/l; l-histidina, 1,0 g/l; y saponina, 30,0 g/l; en disolución tampón fosfato 0,25 mol/l al 1,0% (v/v) y un pH de $7 \pm 0,02$. Dado que la actividad de la catalasa puede verse influenciada por los otros componentes que acompañan al peróxido de hidrógeno, el ensayo de validación de la neutralización para estos productos se efectuó con la mezcla anteriormente descrita (apartado 4.2.4.3).

4.1.5. Productos desinfectantes de ensayo para evaluar la actividad bactericida y el efecto residual en superficies de acero inoxidable

Los productos desinfectantes para los ensayos fueron suministrados por una industria química dedicada a la elaboración de productos para la limpieza y desinfección. Estos productos fueron recibidos en frascos herméticamente cerrados y para su evaluación fueron conservados a temperatura ambiente entre los 18 °C y 25 °C.

Los productos desinfectantes utilizados para evaluar la actividad bactericida fueron formulados a base de peróxido de hidrógeno. Se evaluaron en las concentraciones del 25%, 50% y 100%. Estas concentraciones para los ensayos fueron diluidas con agua dura estéril (apartado 4.1.2). Para evaluar el efecto residual bactericida sobre superficies de acero inoxidable, se emplearon productos basados en cloruro de benzalconio e hipoclorito de sodio. Las composiciones de los diferentes compuestos utilizados en los ensayos se muestran en las tablas 8, 9, 10 y 11.

Tabla 8. Productos a base de peróxido de hidrógeno.

Producto	Composición	Microorganismos de ensayo
P1	1,0% de peróxido de hidrógeno	<i>S. aureus, E. Hirae</i>
P2	2,0% de peróxido de hidrógeno	<i>S. aureus, E. Hirae</i>
P3	0,25% de peróxido de hidrógeno 0,25% de cloruro de benzalconio	<i>S. aureus, E. hirae</i>
P4	0,25% de peróxido de hidrógeno 0,20% de propionato de N,N-didecil-N-metil-polioxietil amonio (*) 1,0% de tensoactivos no iónicos 5,0% de alcohol etílico	<i>S. aureus, E. hirae</i>
P5	0,50% de peróxido de hidrógeno 0,20% propionato de N,N-didecil-N-metil-polioxietil amonio (*) 1,0% de tensoactivos no iónicos 5,0% de alcohol etílico	<i>S. aureus, E. hirae, E. coli y P. aeruginosa</i>
P6	1,0% de peróxido de hidrógeno 0,20% de propionato de N,N-didecil-N-metil-polioxietil amonio (*) 1,0% de tensoactivos no iónicos 5,0% de alcohol etílico	<i>S. aureus, E. hirae</i>
P7	3,0% de peróxido de hidrógeno 1,80% de cloruro de benzalconio 3,0% de tensoactivos no iónicos	<i>S. aureus, E. hirae</i>

(*) Polímero catiónico

Tabla 9. Composición de los productos basados en peróxido de hidrógeno (%) para su evaluación frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

	Peróxido de hidrógeno	Monofenil-glicol	Ácido acetofos-fónico	Ácido láctico	Polímero catiónico(*)	Benzoato de sodio	Ácido salicílico	Espesante
H1	3,0	1,0	0,30	3,50	0	0	0	0
H2	0,5	1,0	0,30	4,10	0	0	0	0
H3	0,5	1,0	0,85	3,50	0	0	0	0
H4	3,0	1,0	0,30	3,50	0	0	0	0
H5	3,0	1,0	0,30	3,50	0,20	0	0	0,10
H6	3,0	1,0	0,30	3,50	0,20	0	0	0
H7	3,0	0	0	0	0	0,25	0	0,15
H8	3,0	0	0	0	0	0,50	0	0,15
H9	3,0	0	0	0	0	1,0	0	0,15
H10	3,0	0	0	0	0	0	0,25	0,15
H11	3,0	0	0	0	0	0	0,50	0,15
H12	3,0	0	0	0	0	0	1,0	0,15
H13	3,0	0	0	0,25	0	0	0	0,15
H14	3,0	0	0	0,50	0	0	0	0,15
H15	3,0	0	0	1,0	0	0	0	0,15
H16	3,0	0,25	0	0	0	0	0	0,15
H17	3,0	0,50	0	0	0	0	0	0,15
H18	3,0	1,0	0	0	0	0	0	0,15

(*) Propionato de N,N-didecil-N-metil polioxietil amonio.

Tabla 10. Productos desinfectantes a base de cloruro de benzalconio utilizados para evaluar el efecto residual a 24 horas.

Producto	Composición
C1	1,0% cloruro de benzalconio
C2	1,0% cloruro de benzalconio + 0,20% NaOH + 1,0% NaClO
C3	1,0% cloruro de benzalconio + 0,20% NaOH + 3,0% NaClO
C4	1,0% cloruro de benzalconio + 0,20% NaOH + 0,3% NaClO + 1,0% óxido de amina

Tabla 11. Productos desinfectantes a base de hipoclorito de sodio utilizados para evaluar el efecto residual a 24 horas.

Producto	Composición
N1	3,5% NaClO + 0,5% cloruro de benzalconio + 2,4% óxido de amina mirístico + 1,0% NaOH
N2	3,5% NaClO + 0,8% cloruro de benzalconio + 2,4% óxido de amina mirístico + 1,0% NaOH
N3	3,7% NaClO + 1,15% alcohol graso etoxilado + 1,05% NaOH + 0,22% silicato de sodio
N4	4,0% NaClO
N5	4,0% NaClO + 1,0% NaOH
N6	4,0% NaClO + 1,0% NaOH + 1,0% cloruro de benzalconio + 0,5% óxido de alquildimetilamina
N7	4,5% NaClO + 0,9% NaOH + 1,2% jabón + 2,0 óxido de amina

4.1.6. Organismos de ensayo

4.1.6.1. Organismos para la evaluación de productos desinfectantes y el efecto residual

La elección de las cepas bacterianas para los ensayos de los productos a base de peróxido de hidrógeno fueron tipo Gram positivas y Gram negativas, de acuerdo con la norma UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002) y adquiridas directamente a la “American Type

Culture Collection” (ATCC):

- *Enterococcus hirae* ATCC 10541
- *Escherichia coli* ATCC 10536
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

Para la evaluación de efecto residual bactericida de los productos a base de cloruro de benzalconio e hipoclorito de sodio, las cepas empleadas fueron:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Enterococcus hirae* ATCC 10541

4.1.6.2. Organismos para la evaluación de superficies con propiedades antibacterianas y halos de inhibición

Las cepas bacterianas empleadas para la evaluación de superficies de plástico con actividad antibacteriana, fueron:

- *Escherichia coli* ATCC 8739
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Klebsiella pneumoniae* OSA 0804

Para evaluar la actividad bacteriostática y la formación de halos de inhibición bacterianos de las superficies de poliéster con triclosán en su composición, se utilizó *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Esta cepa bacteriana Gram positiva es utilizada para la evaluación de desinfectantes en los Estados Unidos y Europa (Anónimo, 1997a; AOAC, 2010). *Staphylococcus aureus* tiende a ser muy resistente, crece en un amplio margen de temperaturas, de pH, concentraciones de cloruro de sodio y, aunque no forma esporas, es capaz de formar biofilms. Además, *S. aureus* puede transmitirse de individuos asintomáticos a superficies, con la consiguiente implicación que representa en las toxiin-

fecciones alimentarias (Troller, 1993; Oie *et al.*, 1996; Akiyama, 1998; Luppens *et al.*, 2002b).

4.1.6.3. Organismos para la evaluación de desinfectantes y formación de biofilms en condiciones de acuicultura

Con el objetivo de evaluar la formación de biofilms en diferentes materiales utilizados en la acuicultura se empleó la cepa bacteriana *Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947 (National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria, Reino Unido). La evaluación de los productos desinfectantes se realizó con células ambientales aisladas del agua circulante utilizada en la crianza de los peces en las instalaciones del Institute of Aquaculture, University of Stirling, Escocia, reino Unido.

4.1.7. Materiales empleados para la evaluación de superficies plásticas con actividad antibacteriana

Para la evaluar las superficies plásticas con actividad antibacteriana, se ensayaron de acuerdo con la norma JIS Z 2801: 2000. Estas superficies previamente a los ensayos, fueron esterilizadas en autoclave a 121 °C durante 15 minutos (Anónimo, 2000). Las soluciones y medios de cultivo para estos ensayos se muestran en la tabla 12.

4.1.8. Superficies empleadas para evaluación de la actividad bacteriostática y la formación de halos de inhibición

Las muestras de superficies empleadas para la evaluación cualitativa de la inhibición bacteriana fueron de poliéster, a las cuales se les agregó triclosán en diferentes concentraciones en el proceso de elaboración. El tamaño de las superficies de estudio fue de 2,5 x 2,5 centímetros.

Tabla 12. Medios empleados para la evaluación de superficies con actividad bacteriostática.

Medio	Componente
Caldo nutritivo	
Extracto de carne	3,0 g
Peptona	10,0 g
NaCl (cloruro de sodio)	5,0 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7,0 ± 0,2
Agar nutritivo	
TSA (agar de soja triptona)	40,0 g
Agua destilada	1000 ml
Caldo SCDLP	
TSB (tryptone soy broth)	30,0 g
Tween 80	1,0 ml
Agua destilada	1000 ml
Solución buffer fosfato	
Fosfato de potasio dihidrógeno	34,0 g
Agua	1000 ml
pH	7,0 ± 0,2
Solución salina buffer fosfato	
Solución buffer fosfato	1,0 ml
Solución salina (0,85% NaCl)	800 ml

4.1.9. Productos desinfectantes y formación de biofilms en condiciones de acuicultura

Los ensayos para la evaluación de productos desinfectantes y formación de biofilms en condiciones de acuicultura, se realizaron en el Institute of Aquaculture, University of Stirling, Reino Unido. Con este objetivo, se recuperaron células ambientales del agua potable de los tanques para la crianza de peces en superficies de acero inoxidable (apartado 4.1.1). Los productos desinfectantes empleados en estos ensayos se muestran en la tabla 13.

La evaluación de la formación de biofilms se realizó con *Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947 (apartado 4.1.6.3). El medio para el aislamiento y cultivo de trabajo de *F. psychrophilum* NCIMB 1947 fue “Tryptone yeast extract salts” (TYES) en forma de agar o caldo (tabla 14), y agar de soja triptona (TSA) para la recuperación de las células ambientales. Se utilizó solución salina al 0,9% como diluyente de las suspensiones bacterianas de los diferentes ensayos.

Tabla 13. Composición de los productos empleados para evaluar la actividad bactericida en *Flavobacterium psychrophilum*.

Compuesto	Tensoactivos	Ácido salicílico	Ácido láctico	Etanol	Cumensulfonato
"101"	14,3% aniónicos / 5,7% anfóteros	0,50	-	-	1,0
"201"	14,3% aniónicos / 5,7% anfóteros	0,50	-	5,8	-
"300"	14,3% aniónicos / 5,7% anfóteros	-	-	-	1,0
"400"	14,3% aniónicos / 5,7% anfóteros	-	2,0	-	1,6
Peroximonosulfato de sodio (1,0%)					
Hipoclorito de sodio (5,25%)					

Tabla 14. Triptone yeast extract salts agar (TYES).

Componente	Cantidad
Triptona	4,0 g
Extracto de levadura	0,4 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,2 g
Agua destilada	1000 ml
Agar bacteriológico	15,0 g
Ajustar a pH a 7,2	
Autoclave a 15 - 20 minutos a 121 °C	

Adaptación: Holt, R.A. (1988).

4.2. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE PRODUCTOS DESINFECTANTES Y EL EFECTO RESIDUAL EN SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE

4.2.1. Cultivos de reserva y de trabajo

Los cultivos de reserva de *Enterococcus hirae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (apartado 4.1.6.1) fueron obtenidos de cepas bacterianas liofilizadas en viales y conservadas en refrigeración a 4 °C. Las cepas se reactivaron añadiendo a los viales 1,0 ml de agua de peptona tamponada (Biomérieux®) y dejando que se estabilizasen a una temperatura de 18 °C a 25 °C durante 1 hora. Posteriormente, se transfirió el contenido de cada vial a un tubo con 9,0 ml de agua peptonada tamponada para obtener una suspensión bacteriana. La suspensión bacteriana se incubó a 37 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a realizar un subcultivo en agar TSA durante 24 horas a 37 °C. Del subcultivo se hicieron siembras por estrías en tubos inclinados para obtener los cultivos de reserva, que fueron conservados en refrigeración a 4 °C.

Posteriormente, de los cultivos de reserva refrigerados, se realizaron dos subcultivos consecutivos en agar TSA, para obtener cada uno de los cultivos bacterianos de trabajo.

4.2.2. Preparación y ajuste de la suspensión bacteriana

Por cada ensayo, se preparó una suspensión bacteriana. Con este objetivo, se transfirieron con asas de siembra, células del cultivo bacteriano de trabajo a un matraz conteniendo 10 ml de diluyente (1,0 g de triptona y 8,5 g de NaCl en 1000 ml de agua destilada estéril) y 3,5 g de perlas de vidrio de 2,0 mm de diámetro (Afora, España). El matraz se agitó durante 3 minutos, transfiriendo la suspensión a un tubo de ensayo y se realizaron las diluciones hasta ajustar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) a un valor comprendido entre 1,5 - 5,0 x 10⁸ UFC/ml. El ajuste de la suspensión bacteriana se hizo por espectrofotometría con una lectura de absorbancia a una longitud de onda de 405 nm. Las curvas de calibración empleadas tienen las siguientes fórmulas:

- *Staphylococcus aureus* $y = 0,4443\text{Ln}(x) + 9,01$ $R^2 = 0,95$
- *Enterococcus hirae* $y = 0,8417\text{Ln}(x) + 8,88$ $R^2 = 0,97$
- *Escherichia coli* $y = 0,7172\text{Ln}(x) + 8,69$ $R^2 = 0,89$
- *Pseudomonas aeruginosa* $y = 0,4004\text{Ln}(x) + 8,50$ $R^2 = 0,95$

Donde “y” es el logaritmo decimal del recuento (log UFC/ml) y “x” el valor de la absorbancia leída. Inmediatamente después de cada suspensión bacteriana ajustada se realizaron los ensayos y recuentos correspondientes.

4.2.3. Recuento de la suspensión bacteriana

Para determinar el número de UFC/ml de una suspensión bacteriana, se prepararon diluciones decimales de 10⁻⁶ y 10⁻⁷. Se tomó 1,0 ml de cada una de las diluciones por duplicado y se inocularon en placas de Petri. Posteriormente se hizo una siembra en masa, añadiendo de 15-20 ml de agar TSA fundido a 45 °C y se incubaron las placas a 37 °C durante 24 horas. Se desecharon las placas que por cualquier razón no permitieron su recuento y se volvieron a incubar durante otras 24 horas. Finalmente se hizo el recuento de las placas que mostraron un número comprendido entre 50 y 300 de UFC.

4.2.4. Ensayo para la evaluación de la actividad bactericida del peróxido de hidrógeno

Se empleó la norma UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002) “Ensayo cuantitativo de superficie no porosa 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 colectividades. Método de ensayo sin acción mecánica y requisitos (fase 2, etapa 2)” para determinar la actividad bactericida de los diferentes productos a base de peróxido de hidrógeno.

Las condiciones escogidas (tiempo de contacto, temperatura, organismos de ensayo, etc.) reflejan los parámetros encontrados en condiciones prácticas, incluyendo las condiciones que puedan influir en la acción de los desinfectantes.

4.2.4.1. Procedimiento de ensayo

2 minutos antes de iniciar el ensayo, se agregó 1,0 ml de la suspensión bacteriana de trabajo a 1,0 ml de la solución de albúmina bovina para obtener la suspensión bacteriana de ensayo.

Los ensayos se realizaron a una temperatura entre 18 °C y 25 °C. Se colocaron 4 superficies de ensayo en posición horizontal, inoculando 50 µl de la suspensión bacteriana de ensayo a cada una de las superficies de los discos y permitiendo que el inóculo se distribuyera lo más homogéneamente posible. Las superficies inoculadas se secaron en una estufa a 37 °C, retirándolas cuando estuvieron visiblemente secas (45 ± 5 minutos) y dejando que se equilibraran a temperatura ambiente. Se agregaron 100 µl de los productos desinfectantes de ensayo a 3 superficies con el inóculo bacteriano seco, asegurando que quedaran totalmente cubiertos. Para el control de agua, se agregaron 100 µl de agua dura sobre otra superficie. Después de 5 minutos de acción de los productos desinfectantes y el agua dura en las diferentes superficies, éstas se transfirieron de forma invertidas a las caras inoculadas a placas de Petri de 50 mm de diámetro y 23 mm de altura (Esterilin®) que contenían 10 ml de neutralizante (apartado 4.1.4.1) y 3,5 g de perlas de vidrio de 2,0 mm de diámetro. Se agitaron manualmente en una superficie plana durante un minuto, asegurando que las perlas estaban en contacto con

las superficies y eran capaces de moverse libremente para separar las células bacterianas adheridas a las superficies.

Para el ensayo del desinfectante y el control de agua, después de un tiempo de neutralización de 5 minutos \pm 10 segundos, se prepararon diluciones decimales de 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} para cada uno de los ensayos del desinfectante y de 10^{-3} a 10^{-6} para el control de agua. Se tomaron 1,0 ml de cada concentración por duplicado y se procedió a sembrar en placas Petri, en medio agar TSA, incubándolas por un tiempo de entre 24 y 48 horas a 37 °C.

Para el control de recuperación de los microorganismos, se recuperaron las superficies después de la neutralización y se lavaron con 10 ml de agua destilada estéril. Las superficies se transfirieron a placas de Petri conteniendo aproximadamente 10 ml de agar TSA solidificado y se colocaron con la parte de la superficie inoculada hacia arriba. Se añadieron 100 μ l de agua destilada estéril sobre cada uno de los discos recuperados y con una punta de pipeta estéril se efectuó un raspado sobre la superficie inoculada durante 1 minuto para remover la posible presencia de células bacterianas no recuperadas durante los ensayos de los desinfectantes. Después del raspado de las superficies, se vertieron aproximadamente 10 ml agar TSA fundido a 45 °C en placas Petri y se incubaron a 37 °C durante 24 - 48 horas.

4.2.4.2. Determinación de la actividad bactericida

La actividad bactericida se demostró por un factor de reducción logarítmica de la viabilidad bacteriana igual o superior a $4 \log_{10}$, en las condiciones de ensayo requeridas: 5 minutos \pm 10 segundos de acción del desinfectante, una temperatura entre los 18 °C y 25 °C y en condiciones sucias de ensayo.

4.2.4.3. Ensayo de validación de la neutralización

Para cada uno de los productos desinfectantes de ensayo, se evaluó el correspondiente neutralizante empleado. Con este objetivo, se equilibraron los reactivos a 20 °C y se inocularon 50 μ l de la suspensión bacteriana en dos superficies de ensayo. Las superficies inoculadas se secaron en estufa a 37 °C en un tiempo aproximado de 45 minutos.

Se añadieron 100 µl de agua destilada y 100 µl de la solución desinfectante de ensayo de la concentración al 100% a dos frascos con 10 ml de neutralizante y 3,5 g de perlas de vidrio de 2 mm de diámetro. Se mezclaron y se dejaron en contacto durante 5 minutos \pm 10 segundos. Las superficies con los inóculos secos se transfirieron a las placas de Petri con los lados inoculados hacia el interior y se agitaron con un agitador mecánico durante 1 minuto. Se prepararon una serie de diluciones de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , tanto para el control y para el ensayo de neutralización. Posteriormente, se tomaron 1,0 ml de cada concentración de estudio por duplicado y se sembraron en medio agar TSA, incubándolos a 37 °C durante 24 horas.

4.2.4.4. Verificación de la metodología y expresión de los resultados

La comprobación de la metodología de los ensayos de los productos desinfectantes y de neutralización fue:

- La media de los recuentos obtenidos en placas por duplicado estaba comprendida entre 50 y 300.
- N - Nc no es superior a $2 \log_{10}$.
- N - NC no es superior a $2 \log_{10}$.
- NC - NT no es superior a $\pm 0,3 \log_{10}$.
- Nts es inferior a 100 UFC/ml para las concentraciones activas.

Donde: (N): Suspensión bacteriana, (Nc): Control de agua, (NC): Control de neutralización, (NT): Ensayo de neutralización, (Nts): Recuperación de microorganismos.

El efecto bactericida (ME) se determina cuantitativamente por el número de UFC sobrevivientes que puedan recuperarse de las superficies de los ensayos de los desinfectantes (Nd): $ME = Nc - Nd$. Calculándose los valores ME para cada organismo y concentración de estudio de los productos de los ensayos.

4.2.5. Evaluación del efecto residual de desinfectantes sobre superficies

Con el objetivo de evaluar el efecto residual bactericida sobre superficies no porosas de productos desinfectantes, se adaptó la norma UNE-EN 13697. Los desinfectantes empleados fueron cuatro formulaciones a base de cloruro de benzalconio y siete a base de hipoclorito de sodio (tablas 10 y 11).

El procedimiento de ensayo se realizó inoculando en el centro de las superficies 100 µl de las soluciones desinfectantes en las concentraciones del 25%, 50% y 100%. Las superficies con las diferentes soluciones desinfectantes se sometieron a un secado a 20 °C en una cabina de flujo laminar de aire. Inmediatamente tras su secado (0 horas) y transcurridas 24 horas, se inocularon las diferentes superficies con 50 µl de una suspensión bacteriana de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 o *Enterococcus hirae* ATCC 10541, ambas en una concentración de $1,5 - 5,0 \times 10^8$ UFC/ml. Las soluciones desinfectantes secas sobre las superficies tanto a 0 horas como a 24 horas, permanecieron en contacto con el inóculo bacteriano durante 30 minutos a una temperatura comprendida entre los 18 °C y 25 °C. Posteriormente, se inactivó el efecto del desinfectante colocando las superficies en el medio neutralizante (apartado 4.1.4) con 3,5 g de perlas de vidrio de 2,0 mm de diámetro contenida en una placa de Petri de 50 mm de diámetro y 23 mm de altura (Esterilin®). Inmediatamente, se agitaron sobre una superficie plana durante 1 minuto y se hicieron las diluciones correspondientes para ser sembradas en agar TSA por inmersión en placa durante 24-48 horas. Finalmente, para realizar el control de recuperación de microorganismos, se procedió de acuerdo al procedimiento para la evaluación de productos desinfectantes (apartado 4.2.4.1).

La validación de la neutralización, metodología y expresión de los resultados se realizaron de acuerdo a los apartados 4.2.4.3 y 4.2.4.4.

Para determinar el efecto residual bactericida, se consideró las observaciones realizadas por Mosteller y Bishop (1993), quienes determinaron la eficacia desinfectante para el control del biofilms por una reducción de $3 \log_{10}$; además de las pruebas de suspensión de la actividad bactericida básica, norma UNE-EN 1040 (Anónimo, 1997a) y la actividad sobre superficies, norma UNE-EN 13697 (Anónimo, 2002) que determinan

una reducción de $5 \log_{10}$ y $4 \log_{10}$, respectivamente.

En base a estas pruebas como antecedentes y contemplando la posible actividad bactericida residual de las soluciones desinfectantes secas, se estableció el efecto residual bactericida cuando el desinfectante mostró una actividad bactericida mayor o igual a $3 \log_{10}$, después de 24 horas de exponerse el producto desinfectante seco con la suspensión bacteriana durante 30 minutos a temperatura ambiente ($18 \text{ }^\circ\text{C}$ - $25 \text{ }^\circ\text{C}$).

4.3. ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y FORMACIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN DE SUPERFICIES CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

4.3.1. Evaluación de superficies plásticas con actividad antibacteriana

La norma JIS Z 2801: 2000 determina la actividad de superficies con propiedades antimicrobianas mediante la cuantificación de las células bacterianas en contacto con estas superficies y las recuperadas después de 24 horas a 35°C . El efecto antibacteriano se determina comparando la sobrevivencia de las bacterias de un material tratado con estas propiedades con otro no tratado. Por cada procedimiento, se emplearon 3 superficies con propiedades antibacterianas y 6 superficies de acero inoxidable, de las cuales, 3 fueron destinadas al control de 0 horas y las otras 3 para el control de 24 horas.

El procedimiento de ensayo se realizó preparando la suspensión bacteriana con el caldo nutritivo y ajustándolo a un valor de $2,5 - 10 \times 10^5$ células/ml por microscopía de epifluorescencia (apartado 4.3.4). Posteriormente, se inocularon $50 \mu\text{l}$ de la suspensión bacteriana a las superficies. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada muestra. Las superficies inoculadas se conservaron en una cámara en condiciones de humedad a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las superficies plásticas se recuperaron en 10 ml de caldo SCDLP. De igual manera se procedió con las otras 3 superficies de control a 0 horas. Las superficies plásticas y discos contenidos en envases con caldo SCDLP y perlas de vidrio de 2,0 mm de diámetro se agitaron con un agitador mecánico durante 1 minuto. Posteriormente se hicieron las diluciones correspondien-

tes en solución salina de buffer fosfato, siembra en placa con agar TSA y se incubaron a 35 °C durante 24 a 48 horas. Tras la incubación, se realizaron los recuentos de las colonias sembradas en las placas de Petri que contenían entre 50 y 300 colonias.

4.3.2. Determinación de la formación de los halos de inhibición bacterianos en superficies

Este procedimiento tiene como objetivo determinar la inhibición bacteriana (halos de inhibición) de una superficie con propiedades antibacterianas. Para evaluar la formación de los halos de inhibición, se traspasaron colonias de cultivo de trabajo de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a un tubo con diluyente (8,5 g de NaCl y 1,0 g de triptona pancreática en 1000 ml de agua destilada estéril), ajustando el número de células a un rango comprendido entre $1,5 - 5,0 \times 10^8$ UFC/ml y obteniendo la suspensión bacteriana de ensayo. Se añadió 1,0 ml de la sustancia interferente (0,6 g/100 ml de albúmina bovina) a la suspensión bacteriana para reproducir las condiciones sucias en el ensayo. Inmediatamente, se inocularon 50 µl de esta suspensión a las diferentes superficies con propiedades antibacterianas y se procedió a su conservación en condiciones húmedas o secas. Para las condiciones húmedas, se agregaron 1000 ml de agua destilada estéril en un recipiente de 4,5 litros de capacidad, con las diferentes superficies de ensayo en placas de Petri y controlando que las placas conteniendo las superficies no quedasen sumergidas en el agua. Posteriormente se cerró el recipiente con papel aluminio y se conservó a una temperatura de 20 °C durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, las superficies se traspasaron a recipientes con 10 ml de neutralizante y 3,5 g de perlas de vidrio (apartado 4.1.4) y se agitaron con un agitador mecánico. Finalmente, se realizaron las diluciones correspondientes y se cultivaron en placa con agar TSA para determinar la actividad bacteriostática.

Las superficies de los ensayos se recuperaron de los recipientes y se traspasaron a placas de Petri conteniendo 10 ml de medio TSA sólido. Se agregaron 100 µl de agua destilada estéril en cada una de las superficies para facilitar la recuperación de las células viables. Se realizó un raspado con una punta de pipeta sobre las superficies inoculadas durante 1 minuto y se procedió a poner en contacto las caras de las superficies raspadas con el agar TSA sólido contenidas en las placas de Petri. Se vertieron aproximadamente otros 10 ml de TSA, de tal manera que cubrieron la mayor parte de la superficie de ensayo. Las

placas de Petri con el agar y las superficies se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Transcurrido el tiempo de incubación, usando una regla métrica, se midieron en centímetros (cm) el tamaño medio alcanzado por los halos de inhibición bacterianos de las superficies en las placas de Petri.

4.3.3. Procedimiento para la evaluación de la inhibición bacteriana sobre superficies a diferentes horas

Para la evaluación de los halos de inhibición a diferentes horas, se procedió de igual forma que en el apartado 4.3.2. Después que las superficies fueron recuperadas, estas se enjuagaron con 200 ml de agua destilada estéril y se secaron en una estufa con flujo de aire a 45 °C durante 24 horas para eliminar las posibles células bacterianas viables. Estas superficies se inocularon y en condiciones secas de ensayo se realizaron las evaluaciones de la formación de halos de inhibición correspondientes a las 24 horas, 48 horas y 72 horas.

4.3.4. Microscopía de epifluorescencia directa (DEM) para la evaluación de superficies

Con el objetivo de observar las superficies por microscopía, se utilizó el kit de tinción de viabilidad Live/Dead® (Backlight™) compuesta por dos colorantes: SYTO®9 de coloración verde y el yoduro de propidio de color rojo para determinar las células vivas y las muertas o lesionadas, respectivamente, de las superficies de poliéster tratadas con triclosán. Las células con la membrana plasmática intacta son permeables al SYTO®9 pero no al yoduro de propidio, por tanto se teñirán de color verde. En las células con la membrana plasmática dañada penetran los dos colorantes pero el yoduro de propidio reduce al colorante SYTO®9, produciendo una tinción de color rojo. Las superficies se tiñeron con 30 µl de Live/Dead® y transcurridos 5 minutos, se observaron con un microscopio de epifluorescencia directa Olympus® BX51-52, acoplado a una lámpara de mercurio Olympus® U-RFL-T y 3 filtros ópticos (tabla 15). Las imágenes fueron capturadas por microfotografía con una cámara digital acoplada Olympus DP-50 y analizadas con el programa Soft Imaging System® (AnalySIS® GMBH. Alemania).

Tabla 15. Filtros ópticos y rangos de longitud de ondas (nm) empleados en la microscopía de epifluorescencia directa.

Tipo filtro percibido	Rango de Excitación	Rango de Emisión	Color
B	460-490	515-550	Verde
G	510-550	>590	Rojo
IB	480-495/515-535	550-570/590-620	Verde-Rojo

4.4. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYOS PARA LA EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES Y FORMACIÓN DE BIOFILMS EN CONDICIONES DE ACUICULTURA

Los ensayos de la evaluación de productos desinfectantes y formación de biofilms en condiciones de acuicultura se realizaron en el Institute of Aquaculture, University of Stirling, Escocia, Reino Unido, así como en la granja de peces Buckieburn de esta misma institución.

4.4.1. Recuperación de células ambientales acuáticas de criaderos de peces

La recuperación de células ambientales acuáticas se realizó de los tanques de crianza de peces en las instalaciones de la granja de peces de Buckieburn del Institute of Aquaculture. Las superficies empleadas en el estudio fueron: acero inoxidable, plástico, vidrio, madera y plástico antibacteriano a base de piritionato de zinc. Estas superficies fueron sumergidas en el fondo de los tanques de crianza de peces, las cuales se mantuvieron con agua en circulación durante siete días a una temperatura de entre 10 °C a 14 °C. Posteriormente se evaluó la adherencia bacteriana en las diferentes superficies por microscopía de fluorescencia.

4.4.2. Actividad bactericida de productos desinfectantes en condiciones de acuicultura

Para evaluar la actividad de productos con propiedades desinfectantes en condicio-

nes de acuicultura, se recuperaron células ambientales en discos de acero inoxidable del agua potable de los tanques de crianza de peces en las instalaciones del Institute of Aquaculture. Estos discos permanecieron 3 días en agua potable en circulación y se traspasaron a placas de Petri con aproximadamente 10 ml de agar TYES sólido (apartado 4.1.9). Se hicieron ligeros raspados de las superficies de los discos con una punta de pipeta para liberar las células adheridas hacia el medio agar sólido. Posteriormente se agregaron otros 10 ml de agar TYES licuado y se incubaron durante 72 horas a 22 °C. Las células ambientales fueron tipo bacilos, Gram negativos y oxidasa negativos. De las colonias recuperadas, se hicieron subcultivos en medio agar TYES para obtener los cultivos de trabajo.

A partir de cada cultivo de trabajo, se realizó un subcultivo para obtener el cultivo de trabajo de ensayo. Se traspasaron asadas de colonias bacterianas a solución salina (0,90%) para obtener una suspensión bacteriana de las células ambientales y se inocularon 50 µl de la suspensión sobre cada una de las caras de los discos de ensayo. Estos discos inoculados se secaron en estufa de 22 °C durante 1 hora ± 10 minutos. Cuando se observaron visiblemente secos, se procedió a agregar a las superficies 100 µl de los productos desinfectantes de ensayo en las concentraciones del 100%, 50%, y 25%. Transcurridos 5 minutos de acción de los productos desinfectantes sobre los discos inoculados secos, se procedió a su neutralización en frascos con 10 ml de solución neutralizante (solución Tween 80, 30,0 g/l; saponina, 30,0 g/l; y tiosulfato de sodio, 5,0 g/l) y 3,5 g de perlas de vidrio de 2,0 mm de diámetro. Posteriormente se prepararon las diluciones correspondientes y siembras por inmersión en agar TYES durante 72 horas a 22 °C para determinar la suspensión bacteriana (UFC/ml) inoculada sobre las superficies y la actividad antibacteriana de cada uno de los productos.

4.4.3. Cultivo de trabajo de *Flavobacterium psychrophilum*

El cultivo de trabajo de *Flavobacterium psychrophilum* NCIMB 1947 se obtuvo de criobolas conservadas a -70 °C. Las criobolas se recuperaron en caldo TYES y se incubaron a 15 °C durante 5 días. Con los cultivos en suspensión, se realizaron cultivos de reserva en agar TYES incubados durante 5 días a 15 °C. Los cultivos de trabajo en agar TYES se obtuvieron a partir de cultivos de reserva en iguales condiciones de preparación.

4.4.4. Formación de biofilms de *Flavobacterium psychrophilum*

4.4.4.1. Formación de biofilms en condiciones de laboratorio

A partir del cultivo de trabajo de *Flavobacterium psychrophilum* en agar TYES, se procedió a hacer una suspensión bacteriana en caldo TYES e incubarlo durante 5 días. Transcurrido el periodo de incubación, se inocularon 50 µl de la suspensión bacteriana en los discos de acero inoxidable, por triplicado, con una concentración de $6,30 \log_{10}$ de células viables/cm², cuantificadas por microscopía de fluorescencia en las superficies de acero inoxidable usando la tinción Live/Dead®. Las otras superficies inoculadas fueron: vidrio, plástico y plástico experimental antibacteriano a base de piritionato de zinc. Los cuatro tipos de superficies se conservaron en un ambiente cerrado y en condiciones de humedad a 15 °C con agua destilada estéril durante 96 horas. Posteriormente se analizaron por microscopía de fluorescencia para evaluar la formación de biofilms de las células de *F. psychrophilum*.

4.4.4.2. Formación de biofilms en condiciones de tanques de crianza de peces

Para evaluar la adherencia y formación de biofilms de *F. psychrophilum* en condiciones prácticas se emplearon dos tipos diferentes de agua:

1. Tanques con agua potable de uso común para la crianza de peces.
2. Tanques con agua lacustre, la cual fue filtrada por membrana de 0,45 µm previamente a los ensayos.

El agua obtenida y filtrada del lago Airthrey (Stirling, Escocia), y el agua potable para los estudios, fueron sometidos a un análisis de minerales para evaluar su posible influencia en el desarrollo de *F. psychrophilum*. Estos análisis se realizaron en el Water Quality Laboratory, Institute of Aquaculture, University of Stirling.

La evaluación se realizó a partir de una suspensión bacteriana de trabajo de *F. psychrophilum* en TYES, transfiriendo 1,0 ml de la suspensión a frascos con 500 ml de TYES e incubándolos durante 48 horas en un agitador (Kühner Shaker®) con una

agitación constante de 140 rpm a una temperatura de 15 °C. Así mismo, se inocularon las diferentes superficies para el ensayo: acero inoxidable, vidrio, plástico, madera y plástico experimental antibacteriano. El número inicial de células viables/cm² de *F. psychrophilum* en los discos de acero inoxidable fue de 6,33 log₁₀ y se mantuvieron en condiciones húmedas durante 72 horas. Transcurridos las 72 horas de contacto del inóculo con las superficies, se trasladaron a los tanques y se añadió conjuntamente la suspensión bacteriana de *F. psychrophilum* contenida en los frascos a los tanques de crianza de peces con una capacidad de 10 litros de agua corriente del lago o de agua potable. Las superficies se conservaron en los tanques durante 96 horas a una temperatura ambiente de 15 °C. Después del tiempo de conservación en los tanques, se procedió a la evaluación de la adherencia bacteriana sobre las superficies por microscopía de fluorescencia.

4.4.5. Evaluación de la actividad antibacteriana de superficies en condiciones de acuicultura

Con el objetivo de evaluar la actividad antibacteriana de las superficies usadas en acuicultura, se consideró la adherencia de las células viables de *Flavobacterium psychrophilum* formando biofilms, comparando los resultados obtenidos en los discos de acero inoxidable con las otras superficies (plástico, madera, vidrio y plástico antibacteriano) en tres condiciones de ensayo:

1. Condiciones de humedad.
2. Condiciones de crianza de peces en tanques con agua potable.
3. Condiciones de crianza de peces en tanques con agua corriente de lago.

4.4.6. Procesado de los resultados en la formación de biofilms

Para la evaluación de los resultados, se empleó un microscopio de fluorescencia Olympus® IX70, analizando 10 imágenes por muestra. Los parámetros de configuración, calibración de entrada y la adquisición de imágenes se ajustaron a valores estándares para conseguir imágenes homogéneas. Para contrastar las células vivas o muertas se empleó

el colorante Live/Dead® (apartado 4.3.4). La obtención de las microfotografías se hizo con el programa de imagen Cytovision® versión 2.51 y el análisis de imagen con el programa Soft Imaging System® (AnalySIS® GMBH. Alemania).

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los ensayos de la actividad bactericida y el efecto residual de los distintos desinfectantes se realizaron por duplicado en tres experimentos distintos (n=6). Los ensayos correspondientes a la evaluación de superficies y microscopía se realizaron por triplicado en tres experimentos distintos (n=9). Para el análisis estadístico se utilizó el programa SAS® v9.1.3.4 (SAS Institute, Inc; North Carolina, USA), evaluando los resultados por el análisis de la varianza (ANOVA). Para la comparación de las medias se utilizaron los test de Duncan y Student Newman Keuls (SNK) con un nivel de significación = 0,05.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA Y EL EFECTO RESIDUAL DE PRODUCTOS DESINFECTANTES EN SUPERFICIES DE ACERO INOXIDABLE

5.1.1. Evaluación de la actividad bactericida del peróxido de hidrógeno

Los resultados de la evaluación de la actividad bactericida contra *Staphylococcus aureus* se muestran en la tabla 16. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para los productos desinfectantes de ensayo en las tres concentraciones de estudio: 100%, 50% y 25%.

Los productos desinfectantes que mostraron actividad bactericida igual o superior a 4 \log_{10} al 100% de concentración de estudio fueron el P3, el P5 y el P6. El producto P3 con una actividad bactericida de 5,77 \log_{10} , está compuesto de 0,25% de peróxido de hidrógeno y 0,25% de cloruro de benzalconio. El P5 y el P6 están compuestos a base de 0,50% y 1,0% de peróxido de hidrógeno, respectivamente, tensoactivos no iónicos (1,0%), propionato de N,N-didecil-N-metil-polioxietil amonio al 0,20% (polímero catiónico) y alcohol etílico al 5,0% (tabla 8). La actividad bactericida más elevada fue para el producto P5 con un valor de 6,72 \log_{10} . Los productos que no presentaron actividad bactericida en esta concentración de estudio para *S. aureus* fueron el P1, P2, P4 y P7.

Los resultados de la actividad bactericida al 50% de concentración de estudio, mostraron que los productos P3 y P6 presentaron unos valores de 4,77 \log_{10} y 4,99 \log_{10} , respectivamente; mientras que en esta misma concentración, el producto P5 no conservó la actividad bactericida superior a 4 \log_{10} , que sí se observó en este producto al 100% de concentración.

En la concentración del 25% para *S. aureus*, los productos a base de peróxido de hidrógeno no mostraron actividad bactericida. Los ensayos empleando peróxido de hidrógeno como único componente en los productos P1 (1,0% de H_2O_2) y P2 (2,0% de H_2O_2), no presentaron actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus* en ninguna de sus concentraciones de ensayo. Así también, los productos P4 y P7, al igual que en las concentraciones del 100% y 50%, tampoco presentaron actividad bactericida al 25% de concentración.

Los resultados de los productos P3, P4, P5 y P7 mostraron una reducción considerable de la actividad bactericida en las concentraciones de ensayo (100%, 50% y 25%) contra *S. aureus* ($P < 0,05$). El producto P1, que no mostró ninguna actividad bactericida en los diferentes productos, tampoco mostró diferencias estadísticas ($P > 0,05$) cuando fue evaluado en las tres concentraciones de ensayo.

Tabla 16. Efecto bactericida (\log_{10}) de productos a base de peróxido de hidrógeno sobre *Staphylococcus aureus*.

Productos	Concentraciones de estudio		
	100%	50%	25%
P1	1,50 ^{fA} ± 0,14	1,48 ^{eA} ± 0,27	1,41 ^{dA} ± 0,31
P2	2,69 ^{dA} ± 0,03	1,40 ^{eB} ± 0,10	1,37 ^{dB} ± 0,17
P3	5,77 ^{bA} ± 0,21	4,77 ^{aB} ± 0,06	2,01 ^{cC} ± 0,14
P4	3,79 ^{cA} ± 0,11	3,35 ^{cB} ± 0,19	2,84 ^{abC} ± 0,16
P5	6,72 ^{aA} ± 0,26	3,74 ^{bB} ± 0,11	2,64 ^{bC} ± 0,25
P6	5,78 ^{bA} ± 0,18	4,99 ^{aA} ± 0,16	2,92 ^{aB} ± 0,17
P7	2,30 ^{eA} ± 0,12	1,73 ^{dB} ± 0,07	1,03 ^{eC} ± 0,22

^{a-f} Valores medios en una misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^{A-C} Valores medios en una misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Los resultados obtenidos para *Enterococcus hirae* (tabla 17), mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los diferentes productos. Al 100% de concentración de estudio, los productos presentaron actividad bactericida con la excepción de los productos P1 y P7 (2,53 \log_{10} y 2,67 \log_{10} , respectivamente). Estos mismos productos, tampoco fueron efectivos cuando fueron evaluados contra *S. aureus*. Así, en el producto P1, el peróxido de hidrógeno cuando actúa al 1,0%, sin la combinación de otros componentes, no tiene actividad bactericida frente a *S. aureus* o *E. hirae*; y el producto P7 que a diferencia de los productos P4, P5 y P6, no incluía alcohol etílico o un polímero catiónico en su composición.

Al 50% de concentración, los productos P3 y P6 presentaron actividad bactericida su-

perior a $4 \log_{10}$. Mientras que al 25% de concentración de estudio, ningún producto de ensayo conservó dicha actividad.

La actividad bactericida de los productos a base de peróxido de hidrógeno en *Enterococcus hirae*, se redujo significativamente ($P < 0,05$) según las concentraciones del estudio (100%, 50% y 25%) en los productos P2, P3, P4 y P6; mientras que no se observó esta reducción ($P > 0,05$) en el producto P7, que no presentó actividad bactericida en ninguna de las concentraciones de ensayo.

Tabla 17. Efecto bactericida (\log_{10}) de productos a base de peróxido de hidrógeno en *Enterococcus hirae*.

Productos	Concentraciones de estudio		
	100%	50%	25%
P1	2,53 ^{eA} ± 0,26	1,44 ^{gB} ± 0,18	1,42 ^{eB} ± 0,19
P2	6,12 ^{cA} ± 0,34	2,68 ^{dB} ± 0,11	1,34 ^{eC} ± 0,14
P3	5,38 ^{dA} ± 0,16	4,55 ^{aB} ± 0,14	2,86 ^{aC} ± 0,14
P4	6,65 ^{abA} ± 0,12	3,03 ^{cB} ± 0,23	2,33 ^{bC} ± 0,08
P5	6,78 ^{aA} ± 0,11	2,41 ^{eB} ± 0,17	2,08 ^{cB} ± 0,32
P6	6,57 ^{bA} ± 0,22	4,05 ^{bB} ± 0,16	2,39 ^{bC} ± 0,15
P7	2,67 ^{eA} ± 0,24	1,71 ^{fA} ± 0,24	1,62 ^{dA} ± 0,11

^{a-g} Valores medios en una misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^{A-C} Valores medios en una misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

De acuerdo con los resultados de las cepas bacterianas estudiadas, se observó una mayor resistencia de *Staphylococcus aureus*, ya que únicamente los productos P3, P5 y P6 al 100% de concentración de estudio fueron efectivos en esta especie bacteriana, mientras que los resultados en *Enterococcus hirae*, mostraron que además de estos productos, también fueron efectivos los productos P2 y P4 en la eliminación de este microorganismo.

Se ha descrito que la alta resistencia del género *Staphylococcus* se produce al ser capaz de sintetizar grandes cantidades de catalasa y peroxidasa que descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno antes de ingresar y dañar la célula bacteriana (Man-

dell, 1975; Watson *et al.*, 1998; Clements y Foster 1999). Así mismo, otros estudios han señalado que *S. aureus*, como bacteria Gram positiva, tiende a ser más resistente para muchos tipos de desinfectantes en comparación de las bacterias Gram negativas (Troller, 1993; Luppens *et al.*, 2002a,b). Respecto a la mayor sensibilidad de *E. hirae* en comparación de *S. aureus* a los productos basados en peróxido de hidrógeno evaluados en nuestro estudio, no se corresponde con el número creciente de infecciones nosocomiales causadas por este organismo, lo que demuestra una creciente resistencia a una amplia gama de antibióticos en ambientes hospitalarios. Incluso el género *Enterococcus* ha mostrado resistencia a desinfectantes de uso común como agentes clorados, alcoholes y el glutaraldehído, así como una alta resistencia a condiciones ambientales adversas para su desarrollo (Bradley y Fraise, 1996; Leclercq, 1997; Morrison, 2002; Giraffa, 2004). Nuestros resultados, por tanto, no son coincidentes con estos autores y nos indican que la cepa de referencia, empleada por nosotros, no es especialmente resistente a los desinfectantes evaluados.

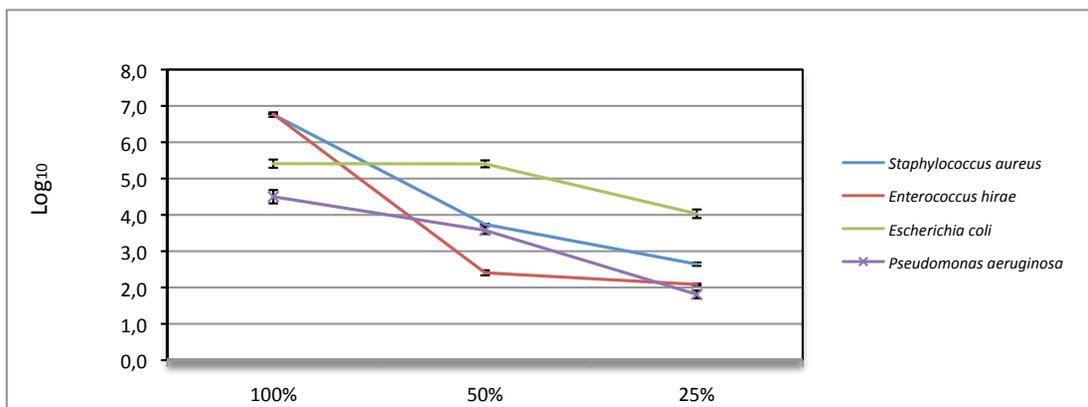
El peróxido de hidrógeno al 0,25% cuando fue usado conjuntamente con el cloruro de benzalconio (producto P3); y en combinación con el alcohol etílico y el propionato de N,N-didecil-N-metil-polioxiethyl amonio (P4, P5 y P6), potenciaron su actividad bactericida sin incrementar necesariamente las concentraciones de uso. Así el producto P6, en combinación de estos productos y 1,0% de peróxido de hidrógeno, mostró alta eficacia bactericida en ambas cepas bacterianas al 100% y 50% de concentración. Este incremento de la actividad del peróxido de hidrógeno se debe a la acción combinada entre oxidación e incremento de la permeabilidad de la membrana bacteriana, al combinarse con el cloruro de benzalconio y el alcohol etílico, que reducen más la tensión superficial de la célula bacteriana, facilitando el proceso de su desnaturalización y eliminación.

El producto P5, compuesto por 0,50% de peróxido de hidrógeno, se empleó para evaluar todas las cepas de referencia de la norma UNE-EN 13697, por contener la concentración de estudio intermedia entre el P4 (0,25% de H₂O₂) y el P6 (1,0% de H₂O₂), efectivo el primero frente a *E. hirae* al 100% y el P6, efectivo tanto para *E. hirae* y *S. aureus* en la misma concentración de estudio.

Los resultados del producto P5 al 100% de concentración, mostraron que tiene actividad bactericida superior a 4 log₁₀ para las 4 cepas bacterianas (figura 2). En las con-

centraciones del 50% y 25%, el producto P5 es solo efectivo contra *Escherichia coli*, con una reducción de 5,41 \log_{10} y 4,03 \log_{10} , respectivamente. Estos resultados muestran que este producto tiene actividad bactericida en las diferentes concentraciones de estudio y en condiciones sucias de ensayo para *Escherichia coli*, que puede explicarse por ser una especie Gram negativa de mayor susceptibilidad a los desinfectantes de uso común, en comparación de otras especies bacterias como *S. aureus* o *P. aeruginosa* (D'Aquino y Núñez, 1997). Así, de acuerdo a los resultados mostrados en la figura 2, los productos desinfectantes con peróxido de hidrógeno, a baja concentración, son especialmente eficaces contra microorganismos de origen fecal, como *Escherichia coli*. La eficacia contra microorganismos de la piel, el ambiente o el agua será limitada si existe dilución o pérdida del biocida por evaporación, envejecimiento del producto, etc.

Figura 2. Actividad bactericida (\log_{10}) para el producto P5 a base de 0,5% de H_2O_2 en las concentraciones del 100%, 50% y 25%.



5.1.2. Actividad bactericida del peróxido de hidrógeno sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Los ensayos sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 se realizaron en 18 productos con el peróxido de hidrógeno como componente común y en combinación de otros compuestos bacteriostáticos, estabilizantes o detergentes como el monofenilglicol, ácido acetofosfónico, ácido láctico, propionato de N,N-didecil-N-metil polioxietyl amonio (polímero catiónico, con propiedades de solubilidad en el

agua), benzoato de sodio y ácido salicílico (tabla 9). En la tabla 18 se observa la actividad bactericida superior a $4 \log_{10}$ para *Pseudomonas aeruginosa* en los 18 productos de ensayo, siendo la máxima actividad bactericida para el producto H6 y la mínima para el H2 ($7,01 \log_{10}$ y $4,54 \log_{10}$, respectivamente).

Tabla 18. Actividad bactericida de productos basados en peróxido de hidrógeno sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Producto	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
H1	5,02 ^{abA} ± 0,11	5,04 ^{bA} ± 0,08
H2	4,54 ^{bA} ± 0,02	3,20 ^{eB} ± 0,09
H3	5,15 ^{abA} ± 0,08	3,55 ^{eB} ± 0,03
H4	5,66 ^{abA} ± 0,12	6,58 ^{aA} ± 0,74
H5	5,21 ^{abA} ± 0,09	6,10 ^{aA} ± 0,93
H6	7,01 ^{aA} ± 0,93	6,98 ^{aA} ± 0,16
H7	5,40 ^{abA} ± 0,21	4,80 ^{cbA} ± 0,32
H8	4,96 ^{abA} ± 0,71	4,33 ^{cdB} ± 0,06
H9	6,36 ^{aA} ± 0,74	4,62 ^{cbB} ± 0,05
H10	5,13 ^{abA} ± 0,04	4,50 ^{cbA} ± 0,13
H11	5,58 ^{abA} ± 1,26	4,57 ^{cbB} ± 0,02
H12	5,76 ^{abA} ± 0,32	3,41 ^{eB} ± 0,05
H13	5,40 ^{abA} ± 0,37	3,47 ^{eB} ± 0,07
H14	5,08 ^{abA} ± 0,31	3,30 ^{eB} ± 0,05
H15	5,76 ^{abA} ± 0,32	3,62 ^{eB} ± 0,09
H16	5,24 ^{abA} ± 0,05	3,75 ^{edB} ± 0,03
H17	5,36 ^{abA} ± 0,65	3,70 ^{edB} ± 0,22
H18	5,66 ^{abA} ± 0,40	4,69 ^{cbB} ± 0,15

^{a-e} Valores medios en una misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes (P<0,05).

^{A-B} Valores medios en una misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes (P<0,05).

En los ensayos con *Staphylococcus aureus*, los productos con mayor actividad bactericida fueron el H4, H5 y H6, con valores de $6,58 \log_{10}$, $6,10 \log_{10}$ y $6,98 \log_{10}$, respectivamente, y la menor actividad fue para el producto H2 con $3,20 \log_{10}$.

Al comparar las dos cepas bacterianas en el presente estudio, se observó mayor sensibilidad de *P. aeruginosa* a los compuestos de peróxido de hidrógeno en las diluciones que van desde el 0,50% al 3,0% en 12 productos ($P < 0,05$). Así también, a diferencia de los resultados obtenidos en *Pseudomonas aeruginosa*, en donde todos los productos fueron efectivos, los ensayos en *Staphylococcus aureus* no detectaron actividad bactericida igual o mayor a $4 \log_{10}$ en 8 productos evaluados (tabla 18).

Estos resultados pueden ser atribuidos a que la actividad del peróxido de hidrógeno se incrementó, especialmente en *P. aeruginosa*, al combinarse este producto con compuestos con propiedades antimicrobianas como el ácido láctico (concentraciones del 0,25% al 4,10%), el benzoato de sodio (0,25% al 1,0%) y el ácido salicílico (0,25% al 1,0%) (tabla 9).

En otros estudios, el ácido láctico (0,5% al 2,0%) ha demostrado un gran potencial para inhibir el crecimiento bacteriano (Oh y Marshall, 1995) y el benzoato de sodio ha mostrado propiedades inhibitorias para la formación de biofilms (Al-Ahmad *et al.*, 2008). El ácido salicílico tiene propiedades antibacterianas, siendo más efectivo contra hongos y levaduras (Lück y Jager, 1997). La presencia de *Pseudomonas* sp. como género predominante en las plantas de industrias de alimentos es importante por su capacidad para sobrevivir a las rutinas de limpieza y desinfección y formar biofilms, con el riesgo que implica su desprendimiento durante la producción y la posibilidad de contaminar los alimentos. Esto es atribuido a su alta resistencia a los desinfectantes, bajos requerimientos nutritivos y la facilidad para adherirse a las superficies (Bagge-Ravn *et al.*, 2003). Al mismo tiempo, el género *Pseudomonas* posee una elevada actividad catalasa, por lo que el empleo de peróxido de hidrógeno no se presupone muy eficaz. Nuestros resultados demuestran que al mezclar el peróxido de hidrógeno con otras sustancias que facilitan su penetrabilidad o que potencian su acción oxidante, se consigue un efecto biocida aceptable, por lo que puede abrirse una vía de su uso en situaciones en las que se produce una elevada contaminación microbiana en áreas con elevada humedad.

Como producto desinfectante, el peróxido de hidrógeno no es tóxico, es inofensivo para el medio ambiente a mediano y largo plazo porque se descompone en agua y oxígeno, no produciendo subproductos nocivos. La actividad del peróxido de hidrógeno se produce al liberar OH⁻ y radicales libres que interactúan con los componentes de las membranas celulares lipofílicas y el ADN. Esta acción del H₂O₂ es inmediata, por lo que se degrada rápidamente, precisando de compuestos estabilizadores para conservar su acción. El peróxido de hidrógeno se utiliza cada vez más como desinfectante en el tratamiento del agua potable, aguas residuales y en la mezcla con alimentos en concentraciones a partir del 3,0% (Fraise, 1999). Si además, se puede conseguir una cierta acción persistente o acción residual, el efecto de pequeñas concentraciones podría mejorar los niveles de higiene y de seguridad alimentaria. En este sentido, el peróxido de hidrógeno, al liberar oxígeno en el agua, es un principio activo que puede utilizarse en operaciones próximas a los alimentos, valorando el posible riesgo de inducir a la oxidación de los componentes alimenticios (Gerald y Gilbert, 1998; Wildbrett, 2000; Tofant *et al.*, 2006).

5.1.3. Peróxido de hidrógeno y eliminación de biofilms

Los productos a base de peróxido de hidrógeno tienen la capacidad de eliminar biofilms, ya que su efecto se basa en la producción de radicales libres que afectan a los polisacáridos y glicoproteínas presentes en los biofilms (Christensen, 1989; Blanchard *et al.*, 1998 y Wirtanen *et al.*, 2001).

La acción del peróxido de hidrógeno contra *S. aureus* se ve rápidamente limitada cuando las concentraciones utilizadas están en el límite de la eficacia *in vitro*, al ser descompuesto por las catalasas celulares. Se han realizado estudios sobre el papel de la catalasa y productos a base de peróxido de hidrógeno en *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* para conocer las respuestas al estrés provocado por el H₂O₂ en la prevención de la formación de biofilms, pero su eficacia no está totalmente aclarada (Demple, 1991; Elkins *et al.*, 1999). En otro estudio, se ha observado que el peróxido de hidrógeno muestra un buen efecto bacteriostático contra células adheridas a superficies, sin embargo, la actividad bactericida es baja en estas condiciones (Baldry, 1983). Esto puede deberse a que el peróxido de hidrógeno cuando es utilizado como único componente, es más débil que en combinación de compuestos como los iones de plata, que utilizados de

forma sinérgica, potencian la acción de ambos productos químicos, consiguiendo una baja toxicidad y presentando efecto residual duradero sobre las superficies (Pedahzur, 1995).

En los ensayos del presente estudio se proponen alternativas en la formulación de desinfectantes para prolongar la acción del H_2O_2 e inhibir la formación de biofilms, al usarlo conjuntamente con productos de acción sinérgica o estabilizantes como el cloruro de benzalconio, polímeros catiónicos y tensoactivos no iónicos. Se han encontrado resultados similares al formularse el peróxido de hidrógeno de forma única o con otros productos. Así, Felix (1991), encontró que el peróxido de hidrógeno en concentraciones del 3,0% al 6,0%, en solución acuosa y aplicado a una temperatura de 82 °C, es suficientemente efectivo para eliminar biofilms, con una mayor eficacia frente a productos clorados o yodados, por lo que propone la aplicación de este biocida, solo, y a elevada temperatura. En otro estudio, se demostró que la combinación de peróxido de hidrógeno y amonios cuaternarios son útiles para proteger superficies de la formación de biofilms en ambientes industriales y de salud (Makdesi, 2010).

5.1.4. Efecto residual de productos desinfectantes sobre superficies de acero inoxidable

Para determinar la actividad bactericida inicial de los productos desinfectantes (0 horas), se consideró una reducción del inóculo inicial igual o superior a $4 \log_{10}$ (UFC/ml), después de permanecer 5 minutos en contacto sobre las superficies de los discos de ensayo (Anónimo, 2002). Para la actividad bactericida residual, en base a los estudios de la protección de superficies frente a la adhesión bacteriana y formación de biofilms (Mosteller y Bishop, 1993), se estableció que el efecto residual se produce por una reducción igual o superior de $3 \log_{10}$ al permanecer un determinado inóculo bacteriano sobre las superficies con el residuo seco de un desinfectante durante 30 minutos (apartado 4.2.5).

La composición de los desinfectantes empleados fue a base de cloruro de benzalconio e hipoclorito de sodio (tablas 10 y 11), tanto para las 0 horas como transcurridas 24 horas, después de actuar el producto desinfectante seco sobre las superficies en las con-

centraciones de 100%, 50% y 25%.

5.1.5. Efecto residual del cloruro de benzalconio sobre *S. aureus* y *E. hirae*

Los productos a base de cloruro de benzalconio en las diferentes concentraciones de estudio mostraron actividad bactericida y efecto residual a 24 horas tanto para *S. aureus* como para *E. hirae*. Las reducciones observadas para las 0 y 24 horas fueron superiores a $4 \log_{10}$ y $3 \log_{10}$, respectivamente (tablas 19 y 20).

Tabla 19. Efecto bactericida (\log_{10}) a 0 horas y efecto residual a 24 horas de productos a base de cloruro de benzalconio sobre *Staphylococcus aureus*.

Concentraciones de estudio	Producto	Horas	
		0 horas	24 horas
100%	C1	6,42 ^{bA} ± 0,05	5,95 ^{cB} ± 0,06
	C2	6,74 ^{abA} ± 0,19	6,89 ^{aA} ± 0,13
	C3	6,93 ^{aA} ± 0,13	6,72 ^{aA} ± 0,21
	C4	6,81 ^{abA} ± 0,17	6,21 ^{bA} ± 0,11
50%	C1	5,94 ^{bA} ± 0,12	5,97 ^{bA} ± 0,06
	C2	6,83 ^{aA} ± 0,16	6,92 ^{aA} ± 0,09
	C3	6,96 ^{aA} ± 0,14	5,42 ^{cB} ± 0,07
	C4	6,21 ^{bA} ± 0,03	3,95 ^{dB} ± 0,28
25%	C1	6,12 ^{bA} ± 0,05	5,98 ^{bA} ± 0,08
	C2	6,81 ^{aA} ± 0,22	6,94 ^{aA} ± 0,27
	C3	5,18 ^{dA} ± 0,15	5,08 ^{cA} ± 0,10
	C4	5,73 ^{cA} ± 0,13	3,58 ^{dB} ± 0,16

^{a-d} Valores medios en una misma columna con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes (P<0,05).

^{A-B} Valores medios en una misma fila con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes (P<0,05).

Tabla 20. Efecto bactericida (\log_{10}) a 0 horas y efecto residual a 24 horas de productos a base de cloruro de benzalconio sobre *Enterococcus hirae*.

Concentraciones de estudio	Producto	Horas	
		0 horas	24 horas
100%	C1	6,30 ^{bA} ± 0,11	6,26 ^{bA} ± 0,06
	C2	6,75 ^{abA} ± 0,24	6,19 ^{bA} ± 0,17
	C3	6,94 ^{aA} ± 0,15	6,73 ^{aA} ± 0,20
	C4	6,91 ^{aA} ± 0,20	6,70 ^{aA} ± 0,04
50%	C1	6,31 ^{cA} ± 0,08	5,96 ^{bB} ± 0,08
	C2	6,71 ^{bA} ± 0,13	6,16 ^{aA} ± 0,12
	C3	6,04 ^{dA} ± 0,02	6,13 ^{aA} ± 0,08
	C4	6,91 ^{aA} ± 0,03	5,80 ^{cB} ± 0,01
25%	C1	5,82 ^{cB} ± 0,10	5,99 ^{aA} ± 0,10
	C2	6,72 ^{bA} ± 0,21	4,84 ^{cB} ± 0,04
	C3	4,88 ^{dB} ± 0,09	5,65 ^{bA} ± 0,11
	C4	6,96 ^{aA} ± 0,13	4,65 ^{cB} ± 0,20

^{a-d} Valores medios en un mismo grupo de columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^{A-B} Valores medios en un mismo grupo de filas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Las máximas actividades a 0 horas sobre *S. aureus*, se presentaron en los productos C3 (6,93 \log_{10} al 100% y 6,96 \log_{10} al 50%) y en el producto C2 (6,81 \log_{10} al 25%).

En *Enterococcus hirae*, la máxima actividad al 100% de concentración de estudio también se presentó en el producto C3 (6,94 \log_{10}); mientras que al 50% y 25%, los valores máximos de actividad bactericida se presentaron en el producto C4 (6,91 \log_{10} y 6,96 \log_{10} , respectivamente).

El efecto residual a 24 horas fue elevado en aquellos productos que presentaron una formulación a base de cloruro de benzalconio con hidróxido de sodio en la concentración

de 100%. Así, el producto C2 con una reducción de 6,89 \log_{10} y el producto C3, con una reducción de 6,73 \log_{10} fueron los más eficaces frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae*, respectivamente. Si bien todos los productos basados en cloruro de benzalconio presentaron efecto residual a las 24 horas, se observaron reducciones considerables ($P < 0,05$) de la actividad para *Staphylococcus aureus* en los productos C1 al 100%, C3 y C4 al 50%, y C4 al 25% transcurridas 24 horas. Respecto a *Enterococcus hirae*, se observó una reducción considerable ($P < 0,05$) para los productos C1 y C4 al 50%, y en los productos C2 y C4 al 25% de concentración.

Estos resultados muestran una elevada estabilidad del cloruro de benzalconio como desinfectante y alta eficacia contra *E. hirae* y *S. aureus*, conservando sus propiedades bactericidas sobre las superficies de acero inoxidable transcurridos 24 horas de su aplicación. Los compuestos de amonio cuaternario son considerados desinfectantes eficientes, ya que se ha observado que tienen la propiedad de adherirse químicamente a las superficies, proporcionando efectividad antibacteriana duradera tras la desinfección (Speier y Malek, 1982; Kemper y White, 1991). En este sentido, el acondicionamiento de superficies con sales de amonio cuaternario es una excelente medida para inhibir la adhesión bacteriana (Whitekettle, 1991). Los amonios cuaternarios actúan en un mayor nivel frente a bacterias Gram positivas en comparación de las bacterias Gram negativas, que tienden a presentar mayor resistencia (especialmente *Pseudomonas* sp.); asimismo, también son efectivos para la eliminación de mohos y levaduras (Carsberg, 1996; Langsrud *et al.*, 2003b). Los productos formulados con amonios cuaternarios, como el cloruro de benzalconio están indicados por su elevado poder bactericida. Este producto no se ve afectado por la carga orgánica, pudiendo ser un sustituto de la lejía, con la ventaja que en su manipulación no presenta agresividad a la piel, presenta baja toxicidad y puede clasificarse como un compuesto biodegradable (Kümmerer *et al.*, 2002).

En el presente estudio, si bien el cloruro de benzalconio, solo, al 1,0% (producto C1), presentó alta actividad del efecto residual a las 24 horas, tanto para *Staphylococcus aureus* como para *Enterococcus hirae* en las tres concentraciones de ensayo, la actividad sinérgica con el hidróxido de sodio y el óxido de amina potenciaron la actividad bactericida residual de este compuesto. El aumento de la eficacia del efecto residual se observó en la combinación de estos componentes en el producto C2 ensayado contra *Staphylococcus aureus*. Incluso, la actividad residual de este producto a las 24 horas fue superior a la

actividad bactericida ensayada a 0 horas sobre *S. aureus* en las tres concentraciones de estudio. En este sentido, se ha indicado que la relación entre la destrucción bacteriana y la concentración de los desinfectantes no siempre es lineal. Normalmente las poblaciones bacterianas son difíciles de eliminar en bajas concentraciones, pero si la concentración aumenta, se llega a un punto donde se elimina la mayor parte de la población bacteriana, y a mayores concentraciones, los microorganismos pueden volverse difíciles de destruir por fenómenos de resistencia. Es importante por tanto, utilizar los desinfectantes en el rango de las concentraciones óptimas, y en caso de omitir las indicaciones de su uso, pueden aumentar los efectos o disminuir su actividad (Holah, 1995b). De donde puede concluirse que, son necesarias pruebas que simulen las condiciones prácticas de uso de los desinfectantes para determinar las concentraciones adecuadas.

5.1.6. Efecto residual del hipoclorito de sodio sobre *Staphylococcus aureus*

A las 0 horas, los ensayos de los productos desinfectantes basados en hipoclorito de sodio sobre *S. aureus* (tabla 12), mostraron actividad bactericida superior a $4 \log_{10}$ para las concentraciones del 100% y 50% (tabla 21). Los valores más elevados fueron obtenidos en los productos N5 ($6,99 \log_{10}$) al 100% de concentración y en el producto N3 ($6,55 \log_{10}$) al 50% de concentración.

El efecto residual de los productos a base de hipoclorito de sodio sobre *S. aureus* al 100% de concentración de estudio, con la excepción de los productos N4 y N6, se conservaron en los otros 5 productos (N1, N2, N3, N5 y N7). El producto N4, solo incluía hipoclorito de sodio al 4,0%. El producto N6, incluía 4,0% de NaClO, 1,0% de cloruro de benzalconio, 1,0% de NaOH y 0,5% de óxido de alquildimetilamina. El óxido de alquildimetilamina, al ser un surfactante, podría interferir en la estabilidad de los otros componentes como el cloruro de benzalconio, ya que este producto no conservó el efecto residual en ninguna de las concentraciones de estudio. Sin embargo, el cloruro de benzalconio sí produjo una acción potenciada con el hipoclorito de sodio en los productos N1 y N2 (concentraciones de 0,5% y 0,8%, respectivamente, de cloruro de benzalconio). Al 50% de concentración, el efecto residual solo se conservó en los productos N5 y N7. Al 25% de concentración, el hipoclorito de sodio no presentó

actividad bactericida residual en ninguno de los productos ensayados (tabla 21).

Tabla 21. Efecto bactericida (\log_{10}) a 0 horas y efecto residual a 24 horas de productos a base de hipoclorito de sodio en *Staphylococcus aureus*.

Concentraciones de estudio	Producto	Horas	
		0 horas	24 horas
100%	N1	6,14 ^{cA} ± 0,07	3,57 ^{bB} ± 0,12
	N2	5,43 ^{dA} ± 0,22	4,76 ^{aA} ± 0,09
	N3	6,55 ^{bA} ± 0,17	4,79 ^{aB} ± 0,10
	N4	6,50 ^{bA} ± 0,12	0,94 ^{dB} ± 0,14
	N5	6,99 ^{aA} ± 0,11	3,41 ^{bB} ± 0,12
	N6	6,78 ^{abA} ± 0,05	1,26 ^{cB} ± 0,20
	N7	5,15 ^{eA} ± 0,15	3,43 ^{bB} ± 0,11
50%	N1	6,09 ^{abA} ± 0,20	1,79 ^{cB} ± 0,07
	N2	5,02 ^{bcA} ± 0,13	1,92 ^{cB} ± 0,06
	N3	6,55 ^{aA} ± 0,09	2,97 ^{bB} ± 0,18
	N4	5,60 ^{abcA} ± 0,08	0,85 ^{eB} ± 0,13
	N5	5,39 ^{abcA} ± 0,19	3,31 ^{aB} ± 0,12
	N6	4,78 ^{bcA} ± 0,21	1,23 ^{dB} ± 0,02
	N7	4,54 ^{cA} ± 0,16	3,24 ^{aA} ± 0,05
25%	N1	4,54 ^{cA} ± 0,13	1,68 ^{bB} ± 0,07
	N2	2,50 ^{fA} ± 0,02	1,81 ^{bA} ± 0,14
	N3	6,67 ^{aA} ± 0,15	1,64 ^{bB} ± 0,17
	N4	5,83 ^{bA} ± 0,06	0,65 ^{aB} ± 0,10
	N5	2,89 ^{eA} ± 0,03	2,94 ^{aA} ± 0,23
	N6	1,40 ^{gA} ± 0,04	1,26 ^{cA} ± 0,17
	N7	3,23 ^{dA} ± 0,14	1,68 ^{bA} ± 0,11

^{a-g} Valores medios en un mismo grupo de columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^{A-B} Valores medios en un mismo grupo de filas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

El hipoclorito de sodio como único componente (producto N4), no presentó efecto residual bactericida en ninguna de sus concentraciones de ensayo. Sin embargo, el efecto residual sí se presentó cuando este compuesto fue formulado con otros productos como el cloruro de benzalconio, hidróxido de sodio, cloruro de benzalconio, óxido de amina mirístico y el alcohol graso etoxilado (tensoactivo no iónico).

5.1.7. Efecto residual del hipoclorito de sodio sobre *Enterococcus hirae*

Los valores obtenidos para *Enterococcus hirae* (tabla 22) muestran que todos los productos basados en el hipoclorito de sodio al 100% de concentración, presentaron actividad bactericida a las 0 horas. El efecto residual a las 24 horas no se presentó en los productos N4, N6 y N7. Los productos de ensayo que conservaron efecto residual bactericida en las tres concentraciones de estudio fueron las muestras N2, N3 y N5, efecto producido por la potenciación del hipoclorito de sodio al combinarse con el óxido de amina mirístico, el alcohol graso etoxilado y el hidróxido de sodio (tabla 11). El producto N4 (NaClO al 4,0%) no conservó efecto bactericida en ninguna de sus concentraciones para *E. hirae*. Estos resultados también fueron observados en los resultados del efecto residual del hipoclorito de sodio en *Staphylococcus aureus*.

La existencia de resistencias, a bajas concentraciones, respecto al hipoclorito de sodio ha sido descrita en el género *Enterococcus*. Por ello, se recomienda un tiempo de acción mínimo de 30 minutos cuando se emplea en una concentración igual o menor del 0,5%, mientras que una concentración del 5,25% puede ser adecuada para eliminar *Enterococcus faecalis* en 30 segundos (Gomes, 2001). Esta acción inmediata del NaClO se estima que puede inactivarse entre los 90 minutos y 3 horas de contacto del producto con las superficies, restableciéndose posteriormente la contaminación bacteriana a los niveles previos por recontaminación microbiana (Scott *et al.*, 1984).

La combinación del hipoclorito de sodio con el cloruro de benzalconio, hidróxido de sodio, óxido de amina mirístico y el alcohol graso etoxilado permitió poner de manifiesto una acción bactericida residual frente a *E. hirae* o *S. aureus* en alguna de sus concentraciones de ensayo con excepción del producto N6. El producto N6 está compuesto de NaClO (4,0%), hidróxido de sodio (1,0%), cloruro de benzalconio

(1,0%) y 0,5% de óxido de alquildimetilamina. El óxido de alquildimetilamina, en el producto N6, al igual que en *S. aureus*, cuando fue ensayado en *E. hirae*, no mostró actividad bactericida residual a las 24 horas.

Tabla 22. Efecto bactericida (\log_{10}) a 0 horas y efecto residual a 24 horas de productos a base de hipoclorito de sodio en *Enterococcus hirae*.

Concentraciones de estudio	Producto	Horas	
		0 horas	24 horas
100%	N1	5,89 ^{bA} ± 0,20	6,90 ^{aA} ± 0,04
	N2	6,60 ^{aA} ± 0,11	6,17 ^{bA} ± 0,16
	N3	6,62 ^{aA} ± 0,02	6,21 ^{bB} ± 0,06
	N4	6,69 ^{aA} ± 0,09	1,47 ^{dB} ± 0,02
	N5	5,88 ^{bA} ± 0,11	5,61 ^{cA} ± 0,26
	N6	5,45 ^{bA} ± 0,28	1,39 ^{dB} ± 0,05
	N7	4,50 ^{cA} ± 0,31	1,74 ^{dB} ± 0,04
50%	N1	5,17 ^{cA} ± 0,07	3,41 ^{dB} ± 0,04
	N2	5,90 ^{bA} ± 0,28	4,87 ^{cA} ± 0,10
	N3	6,71 ^{aA} ± 0,17	6,27 ^{aA} ± 0,04
	N4	6,83 ^{aA} ± 0,09	1,42 ^{eB} ± 0,06
	N5	5,90 ^{bA} ± 0,04	5,61 ^{bA} ± 0,16
	N6	1,37 ^{eA} ± 0,06	1,36 ^{fA} ± 0,11
	N7	3,19 ^{dA} ± 0,03	1,55 ^{eB} ± 0,09
25%	N1	3,06 ^{eA} ± 0,04	2,09 ^{cB} ± 0,07
	N2	4,91 ^{dA} ± 0,15	3,90 ^{bA} ± 0,02
	N3	6,68 ^{aA} ± 0,05	5,61 ^{aA} ± 0,13
	N4	6,09 ^{bA} ± 0,05	1,47 ^{dB} ± 0,08
	N5	5,60 ^{cA} ± 0,20	5,51 ^{aA} ± 0,14
	N6	1,31 ^{gA} ± 0,06	1,35 ^{dA} ± 0,06
	N7	1,65 ^{fA} ± 0,03	1,50 ^{dA} ± 0,04

^{a-g} Valores medios en un mismo grupo de columnas con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes (P<0,05).

^{A-B} Valores medios en un mismo grupo de filas con diferentes letras mayúsculas son significativamente diferentes (P<0,05).

Los efectos sinérgicos de los compuestos con propiedades bactericidas han sido descritos por Aarnisalo *et al.* (2000), donde la acción del hipoclorito de sodio al 13,5%, conjuntamente con el hidróxido de sodio y el óxido de amina, se consideró mucho más eficiente que actuando este producto de forma única en superficies de acero inoxidable en condiciones sucias de ensayo. Así mismo, se ha observado una influencia significativa sobre la actividad bactericida de los desinfectantes que contienen hipoclorito de sodio, cuando actúan de forma conjunta con el hidróxido de sodio y tensoactivos no iónicos (Bodík *et al.*, 2008).

5.1.8. Resistencia de *S. aureus* y *E. hirae* al cloruro de benzalconio e hipoclorito de sodio

Al comparar la resistencia entre *S. aureus* y *E. hirae*, se observó, que en los ensayos con el cloruro de benzalconio, ambas cepas fueron sensibles tanto a 0 horas, como al efecto residual a 24 horas (tablas 19 y 20).

Si bien se ha descrito una alta resistencia del género *Enterococcus* contra diferentes antimicrobianos, desinfectantes y el calor (Tsai *et al.*, 1998; Eaton y Gasson, 2001), *Staphylococcus aureus* presentó una mayor resistencia a los productos basados en hipoclorito de sodio en comparación de *Enterococcus hirae*. Así, en la tabla 21 se observa que en los resultados para *S. aureus*, de los productos a base de NaClO a 24 horas en la concentración de estudio al 25%, estos no mostraron efecto residual superior a 3 log₁₀.

De acuerdo con nuestros resultados, el hipoclorito de sodio ha sido efectivo en sus diferentes concentraciones de estudio para ser utilizado como un producto de acción inmediata en superficies. Sin embargo, puede inactivarse rápidamente en presencia de biofilms por la protección de la matriz de exopolisacáridos y otros mecanismos que se comportan como obstáculos para la destrucción bacteriana (Stewart *et al.*, 2001). En otro estudio, se ha indicado que la limitada penetración de cloro en la matriz del biofilm es probable que sea un factor importante que influya en la reducción de la eficacia de los productos clorados contra los biofilms, en comparación de su buena actividad en células en estado planctónico (De Beer, 1994).

El incremento de las concentraciones de los productos clorados pueden potenciar

la acción bactericida pero existen límites de las concentraciones de cloro usados en los ambientes de procesado de alimentos, ya que altas concentraciones pueden representar un peligro en la manipulación y ser excesivamente corrosivo para el acero inoxidable y otros metales (Eifert y Sanglay, 2002). Sin embargo, la acción de los productos clorados, como el hipoclorito de sodio, pueden incrementarse al emplearlo conjuntamente con compuestos como el peróxido de hidrógeno en la eliminación de biofilms de *P. aeruginosa* en superficies de las plantas de procesado de alimentos (DeQueiroz y Day, 2007).

5.1.9. Empleo de desinfectantes con acción residual sobre superficies

Mosteller y Bishop (1993) y Sharma y Anand (2002), indicaron que un producto desinfectante presenta actividad bactericida frente a las células adheridas formando biofilms cuando presenta actividad antibacteriana igual o mayor de $3 \log_{10}$. Esta protección de las superficies frente a la adherencia bacteriana no siempre se puede conseguir con el uso tradicional de desinfectantes. Así, Chen y Stewart (1996) señalan que los compuestos de cloro activo reaccionan con la materia orgánica en las capas superficiales de los biofilms más rápido de lo que pueden difundirse hacia el interior. Norwood y Gilmour, (2000) observaron que eran necesarias concentraciones superiores a 1000 ppm para la reducción del número de células presentes en un biofilm, comparados con 10 ppm, suficientes para la eliminación de células de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fragi* y *Staphylococcus xylosus* en estado planctónico.

En el presente trabajo, al combinarse el hipoclorito con compuestos como el cloruro de benzalconio, que presenta propiedades tensoactivas, se observó actividad bactericida. Si bien, en las superficies húmedas, la recontaminación a partir de la flora residual puede ser muy rápida, se han realizado estudios que muestran que el empleo de productos tensoactivos, presentan acción residual sobre las superficies y evitan la rápida propagación de biofilms. En el caso del cloruro de benzalconio, este producto tiene una alta capacidad para penetrar y adherirse a superficies difíciles de limpiar (McDonnell y Russell, 1999).

De acuerdo con otros estudios, las superficies preacondicionadas con tensoactivos no iónicos y aniónicos fueron eficaces en la inhibición de la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* en más de un 90%, tanto si eran superficies de acero inoxidable, como de vidrio (Cloete y Jacobs, 2001). Meylheuc *et al.*, (2006) mostraron que el acondicionamiento previo de superficies de acero inoxidable con tensoactivos aniónicos reducen los niveles de contaminación de *Listeria monocytogenes*, que favorece la actividad bactericida de desinfectantes y el control de la formación de biofilms. Al mismo tiempo, Splendiani *et al.*, (2006) describieron que los tensoactivos pueden incrementar la carga de la pared celular, reduciendo la capacidad para formar biofilms. Así, en condiciones prácticas de uso, la rotación de desinfectantes o la elaboración de compuestos con diferentes clases de desinfectantes, debe ser considerado, con el objetivo de proporcionar una protección añadida, gracias a la acción residual de compuestos como los amonios cuaternarios, teniendo en cuenta su correcto uso y en las concentraciones indicadas para evitar una posible contaminación desde los equipos y superficies a los alimentos.

5.2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y FORMACIÓN DE HALOS DE INHIBICIÓN DE SUPERFICIES CON PROPIEDADES ANTIBACTERIANAS

5.2.1. Estudio de la evaluación de superficies plásticas con actividad antibacteriana

Los resultados de la evaluación de superficies plásticas mediante la norma JIS Z 2801: 2000 (Anónimo, 2000) muestran la actividad antibacteriana de las tres superficies que incluyen triclosán en su composición (J1: 1400 ppm, J2: 1200 ppm y J3: 1000 ppm), donde la efectividad antibacteriana se demuestra por una reducción igual o superior a $2 \log_{10}$, al comparar el inóculo bacteriano sobre una superficie que no contenga aditivos antimicrobianos (control) y el recuento bacteriano en las superficies tratadas transcurridas 24 horas.

Los resultados de la tabla 23 muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre las cepas bacterianas empleadas, siendo *Escherichia coli* ATCC 8739 más sensible que *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Klebsiella pneumoniae*, no encontrán-

dose diferencias significativas entre estas dos últimas cepas bacterianas ($P > 0,05$).

Los resultados para *Escherichia coli* ATCC 8739, muestran actividad antibacteriana para la muestra J1, de $5,57 \log_{10}$; para la J2, $5,54 \log_{10}$; y para la J3, $4,40 \log_{10}$. En el caso de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*, si bien se presentó una reducción máxima de $1,22 \log_{10}$, y $1,02 \log_{10}$, respectivamente, en la muestra J1, las tres muestras de plástico no presentaron actividad antibacteriana igual o superior a $2 \log_{10}$.

Tabla 23. Evaluación de la actividad antibacteriana (\log_{10}) de superficies plásticas con triclosán (ppm) en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.

Microorganismo	J1 (1400 ppm)	J2 (1200 ppm)	J3 (1000 ppm)
<i>Escherichia coli</i>	$5,57^a \pm 0,14$	$5,54^a \pm 0,23$	$4,40^a \pm 0,58$
<i>Staphylococcus aureus</i>	$1,22^b \pm 0,59$	$0,79^b \pm 0,45$	$0,90^b \pm 0,87$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	$1,02^b \pm 3,46$	$0,45^b \pm 0,05$	$0,55^b \pm 0,88$

^{a-b} Valores medios en una misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Nuestros resultados evidencian una mayor sensibilidad de *Escherichia coli* en comparación con *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* a superficies plásticas con actividad antibacteriana. En este sentido, Ghazani *et al.* (2008) describieron la capacidad de sobrevivencia y formación de biofilms de *E. coli* en superficies plásticas. Del mismo modo, DeVere y Purchase (2007) describieron una mayor sensibilidad de *Escherichia coli* en superficies plásticas al tiempo de secado en comparación de *S. aureus*, indicando que el orden de sobrevivencia bacteriana era mayor en superficies de vidrio, plástico, plástico antibacteriano y finalmente las superficies de madera. Así también, se ha descrito que *Escherichia coli* presenta una mayor susceptibilidad a los desinfectantes de uso común en comparación de otras especies bacterianas como *S. aureus* y *P. aeruginosa* (D'Aquino y Núñez, 1997).

La importancia del género *Klebsiella* radica en que es ubicuo en el entorno humano y está

ampliamente distribuida en la naturaleza. *Klebsiella pneumoniae* actúa como patógeno oportunista frecuentemente implicados en infecciones graves, en individuos debilitados o comúnmente asociado con infecciones nosocomiales y pacientes con enfermedades respiratorias crónicas (Vanhooren *et al.*, 1999; Clegg y Schurtz Sebghati, 2002). También se ha descrito la alta capacidad de formar biofilms de *K. pneumoniae* en comparación de *Salmonella enteritidis* o *Escherichia coli*, proporcionando evidencias adicionales de la sobrevivencia y persistencia de este microorganismo (Jones y Bradshaw, 1996).

5.2.2. Superficies con propiedades bacteriostáticas en condiciones secas y húmedas de ensayo tratadas con triclosán

Los resultados de las 5 superficies de ensayo con concentraciones de 0 ppm a 850 ppm de triclosán se muestran en la tabla 24. Se evaluó la actividad bacteriostática y la formación de halos de inhibición en 24 horas de contacto de las superficies con el inóculo bacteriano de *Staphylococcus aureus* en condiciones secas y húmedas de ensayo.

En los resultados se observa diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para las condiciones secas en comparación de las condiciones húmedas en las cinco muestras de ensayo estudiadas, encontrándose una disminución apreciable de la actividad bacteriostática cuando las muestras fueron ensayadas en condiciones húmedas. Sin embargo, la actividad del triclosán no fue muy elevada. De hecho, en ninguna de las muestras se consigue una reducción de carga igual o superior a 2 logaritmos del recuento inicial, ni en las muestras conservadas en sequedad, ni en las muestras en condiciones húmedas. Esto nos indica que la capacidad antibacteriana del triclosán en estas concentraciones de estudio es baja, por lo que si se utiliza este biocida, la capacidad para controlar el crecimiento bacteriano en superficies es de carácter bacteriostático.

En condiciones húmedas, la elevada humedad fue un factor negativo para la inhibición del desarrollo de *S. aureus*. Estos resultados concuerdan con los observados por Møretro *et al.* (2003), quienes evaluaron la capacidad de *S. aureus*, *E. cloacae* y *P. aeruginosa* para desarrollarse y multiplicarse en superficies húmedas. En los tres casos, de acuerdo con estos autores, existía un potencial peligro por la contaminación cruzada desde las superficies hacia los alimentos en superficies húmedas.

Tabla 24. Actividad bacteriostática (\log_{10}) en *S. aureus* de superficies con triclosán (ppm) después de permanecer 24 horas en condiciones secas y húmedas de ensayo.

Muestra	Triclosán (ppm)	Condiciones secas	Condiciones húmedas
Id1	0	0,74 ^{aA} ± 0,13	0,34 ^{aB} ± 0,06
Id2	400	0,99 ^{aA} ± 0,42	0,19 ^{aB} ± 0,02
Id3	500	0,68 ^{aA} ± 0,16	0,25 ^{aB} ± 0,03
Id4	650	1,02 ^{aA} ± 0,16	0,16 ^{aB} ± 0,01
Id5	850	1,17 ^{aA} ± 0,39	0,20 ^{aB} ± 0,02

^{a-b} Valores medios en una misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

^{A-B} Valores medios (mayúsculas) en una misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Si bien el riesgo de contaminación se reduce cuando las superficies se encuentran secas, porque el crecimiento bacteriano y la sobrevivencia se ven reducidas, estudios en condiciones de sequedad muestran que la viabilidad de *S. aureus* puede representar un riesgo durante largos periodos de tiempo, al menos de 72 a 96 horas (Kusumaningrum *et al.*, 2003; Fuster-Valls, 2008). Así mismo, las condiciones húmedas son un factor determinante en la sobrevivencia de las bacterias que puede contrarrestarse con el uso de materiales con propiedades bacteriostáticas de diversos tipos (McEldowney y Fletcher, 1988; Robine *et al.*, 2002). Por tanto, la prevención del riesgo de proliferación bacteriana en superficies húmedas de distintos ambientes de elaboración de alimentos, ha de contemplarse mediante el uso de materiales con propiedades antimicrobianas.

5.2.3. Evaluación de superficies con actividad bacteriostática mediante los halos de inhibición bacterianos

El objetivo de los biocidas con propiedades bacteriostáticas es impedir la proliferación de los microorganismos, y por tanto, controlar la formación de biofilms. Para evaluar las concentraciones de triclosán en las superficies que incorporan este compuesto, se estudió la inhibición bacteriana mediante la observación de la formación de halos de

inhibición. Estos halos pueden presentarse sobre estas superficies cuando están inmersos en agar en periodos de tiempo definidos, demostrando la presencia de un compuesto biocida, su eficacia y su concentración (tabla 25).

En la figura 3 se muestra una superficie previamente sometida a condiciones secas de ensayo, sin tratamiento con triclosán (0 ppm), donde se observa el crecimiento de colonias bacterianas de *Staphylococcus aureus* alrededor de toda la superficie de poliéster inmersa en agar TSA contenida en una placa Petri de 90 mm de diámetro, sin la formación de halo de inhibición bacteriano. En contraposición, en la figura 4, se observa una superficie de poliéster de un tamaño de 2,5 cm x 2,5 cm que contenía 400 ppm de triclosán, y donde se forma un halo de inhibición sobre el agar TSA transcurridas 24 horas de incubación, utilizando *Staphylococcus aureus*. En condiciones húmedas de ensayo, el tamaño del halo de inhibición en esta concentración de ensayo fue de 0,48 cm.

Figura 3. Superficie de poliéster sin propiedades antibacteriana sobre una placa de Petri de 90 mm de diámetro, donde se aprecia el crecimiento de colonias de *S. aureus* después de 24 horas de ser inoculada.

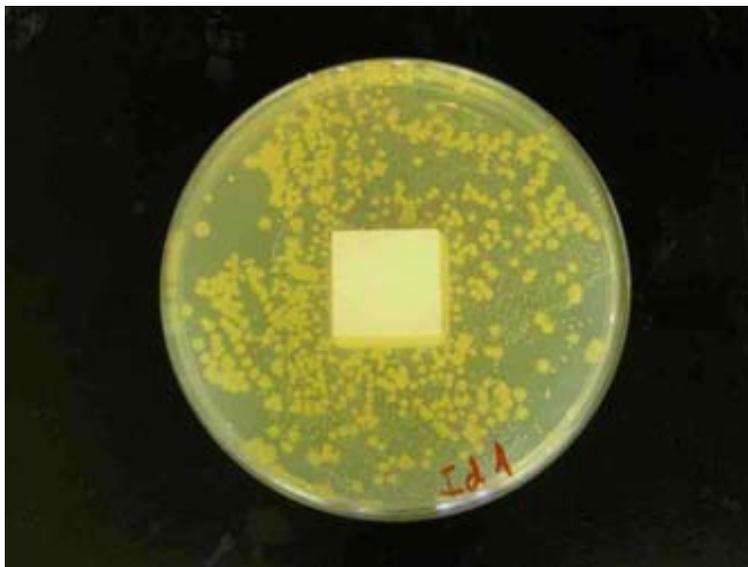


Figura 4. Halo de inhibición bacteriano difundido en agar TSA durante 24 horas en una superficie de poliéster tratada con triclosán (400 ppm) y conservada en condiciones húmedas con *Staphylococcus aureus*. La superficie se observa en una placa de Petri de 90 mm de diámetro.

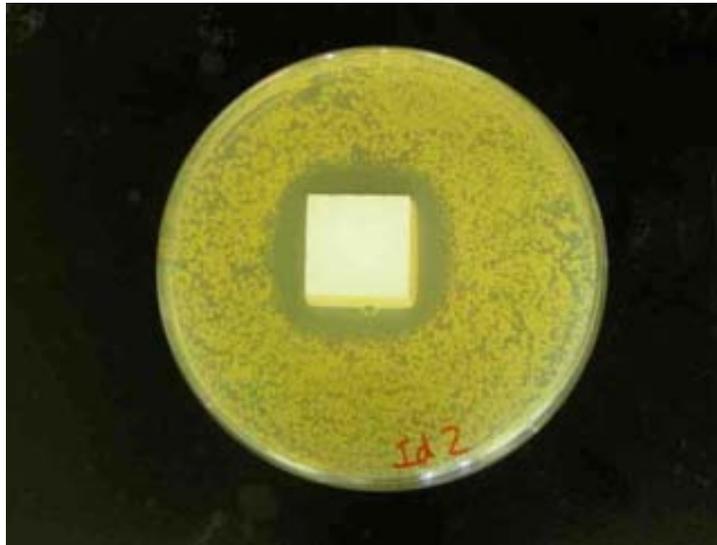


Tabla 25. Halos de inhibición (cm) de superficies que incorporan triclosán (ppm) tras 24 horas en condiciones secas y húmedas de ensayo.

Muestra	Triclosán (ppm)	Condiciones secas	Condiciones húmedas
Id1	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Id2	400	0,36 ^{cB} ± 0,05	0,48 ^{cA} ± 0,07
Id3	500	0,61 ^{bA} ± 0,08	0,56 ^{bA} ± 0,05
Id4	650	0,63 ^{bA} ± 0,07	0,64 ^{bA} ± 0,07
Id5	850	0,88 ^{aA} ± 0,05	0,94 ^{aA} ± 0,07

^{a-c} Valores medios en letras minúsculas en una misma columna con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0,05).

^{A-B} Valores medios en una misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes (P<0,05).

De acuerdo a las 5 muestras de estudio, aunque no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$) entre las concentraciones de 500 ppm (Id3) y los 650 ppm (Id4) en ambas condiciones de ensayo, se observa un incremento del tamaño de los halos de inhibición de acuerdo a la concentración del triclosán (de 400 ppm a 850 ppm) tanto en condiciones secas como húmedas. Los mayores tamaños también se encontraron para la concentración más alta de estudio (850 ppm), siendo estos valores de 0,88 cm para las condiciones secas y 0,94 cm para las condiciones húmedas.

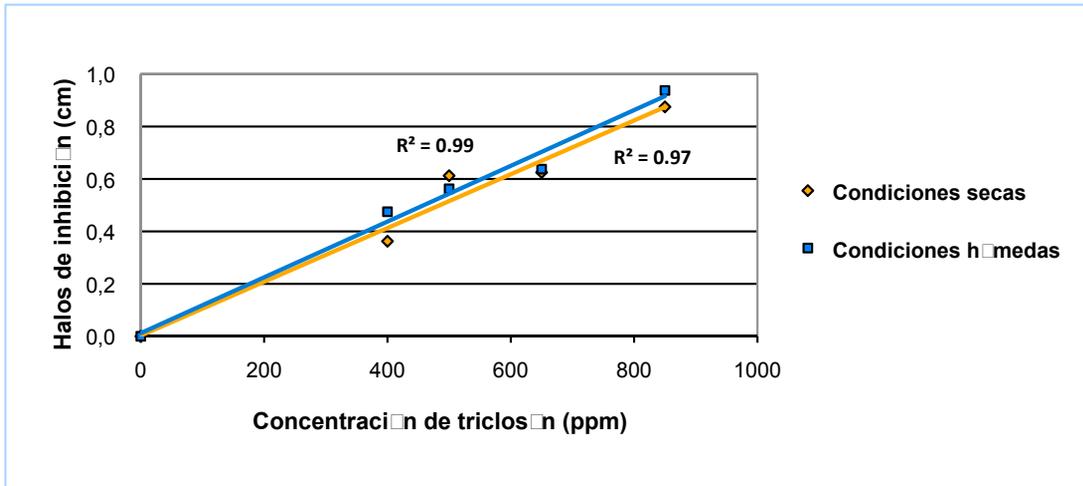
Probablemente si las concentraciones del triclosán fueran más elevadas, la eficacia biocida también puede ser manifiestamente superior. Sin embargo, la concentración es equivalente a durabilidad. Un mayor halo significa una mayor reserva de biocida, por lo que equivaldrá a un mantenimiento de la actividad biológica durante más tiempo. En consecuencia, la elección de la concentración dependerá de la durabilidad del efecto deseado.

Si bien se ha indicado que las condiciones húmedas son favorables para la colonización y posterior adherencia de bacterias a las superficies, al añadir un biocida, con propiedades bacteriostáticas las condiciones favorables para la formación de biofilms se ven reducidas (Chmielewski y Frank, 2003). En el caso del presente estudio, con concentraciones de triclosán desde los 400 ppm (Id2) hasta los 850 ppm (Id5), no presentaron las condiciones adecuadas para la formación de biofilms (tabla 25). Este hecho es importante, si tenemos en cuenta que la presencia de los microorganismos patógenos en superficies, tanto de uso doméstico como en las industrias de alimentos, constituye un peligro para la recontaminación de las superficies durante largos periodos de tiempo. Así mismo, el secado de las superficies no debe descartarse en condiciones prácticas de uso después del proceso de higienización, debido a que la propagación bacteriana en un medio líquido es un elemento esencial para la adherencia y posible formación de biofilms (Humphrey *et al.*, 1994).

En la figura 5 se aprecia la relación de las concentraciones del triclosán en las superficies de ensayo y el tamaño de los halos de inhibición. Los coeficientes de determinación (R^2) fueron de 0,97 para las condiciones secas de ensayo y 0,99 para las condiciones húmedas. Estos resultados muestran una alta relación entre las superficies tratadas con triclosán y el tamaño de los halos de inhibición. El hecho que los halos de inhibición se

conserven tanto en condiciones húmedas o secas, permite evaluar la inhibición bacteriana de las superficies tratadas con antibacterianos en diferentes periodos de tiempo y estimar la vida útil de este tipo de superficies.

Figura 5. Coeficiente de determinación de las concentraciones de triclosán (ppm) y el tamaño de los halos de inhibición (cm) en *Staphylococcus aureus* en condiciones secas y húmedas de ensayo.



5.2.4. Evaluación de los halos de inhibición en diferentes periodos de tiempo de tiempo

En la tabla 26 se observa la evaluación de los halos de inhibición en *Staphylococcus aureus* después de los tratamientos de lavado y secado a las 24 horas, 48 horas y 72 horas para cada una de las 7 muestras de estudio.

Los resultados obtenidos indican que las muestras con contenido de triclosán entre los 400 ppm y 600 ppm (muestras A, B, C y D), pierden una considerable actividad ($P < 0,05$) transcurridas las 24 horas, 48 horas y 72 horas, no llegando a ser suficientemente estables; mientras que a partir de los 700 ppm (muestras E, F y G) no se observan pérdidas significativas ($P > 0,05$) en la actividad del triclosán entre las 48 horas y 72 horas. Así, las concentraciones más elevadas, presentaron las actividades bactericidas más altas: 1,82 cm y 1,18 cm a las 24 y 48 horas, respectivamente, en el producto G (850 ppm) y 1,03 cm a las 72 horas en el producto F (800 ppm de triclosán).

Tabla 26. Halos de inhibición (cm) en *Staphylococcus aureus* para los productos tratados a 24 horas, 48 horas y 72 horas.

Muestra	Concentración (ppm)	24 horas	48 horas	72 horas
A	400	0,69 ^A ± 0,13	0,55 ^B ± 0,06	0,35 ^C ± 0,10
B	450	0,90 ^A ± 0,17	0,62 ^B ± 0,12	0,38 ^C ± 0,09
C	500	1,33 ^A ± 0,20	0,70 ^B ± 0,24	0,33 ^C ± 0,10
D	600	1,54 ^A ± 0,16	0,68 ^B ± 0,18	0,43 ^C ± 0,13
E	700	1,32 ^A ± 0,27	0,80 ^B ± 0,31	0,80 ^B ± 0,08
F	800	1,51 ^A ± 0,29	1,17 ^B ± 0,05	1,03 ^B ± 0,17
G	850	1,82 ^A ± 0,18	1,18 ^B ± 0,12	0,97 ^B ± 0,12

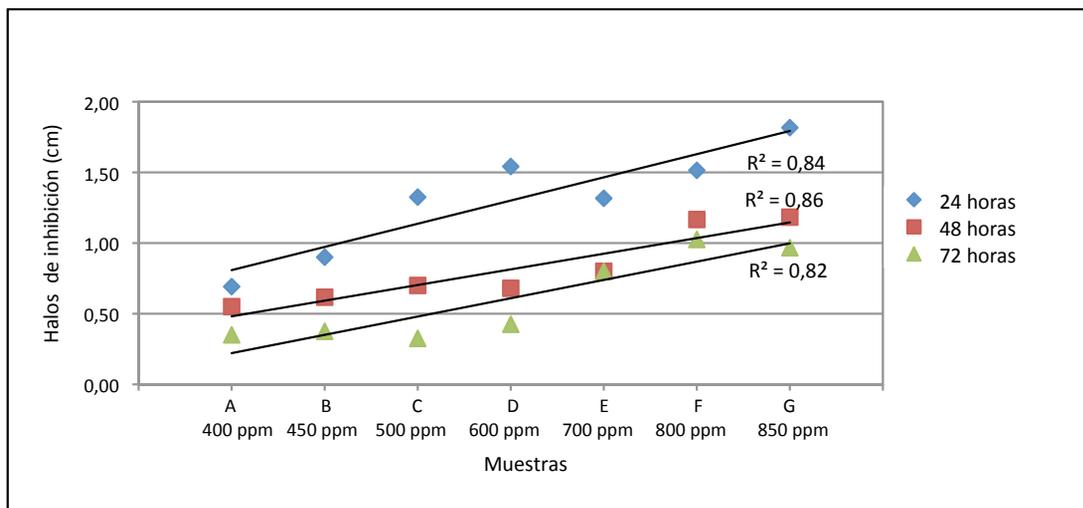
^{A-C} Valores medios en una misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Las líneas de tendencia mostraron altos coeficientes de determinación (R^2) de las concentraciones del triclosán (ppm) en las muestras ensayadas, 0,84 para las 24 horas, 0,86 para las 48 horas y 0,82 para las 72 horas de estudio (figura 6). A partir de los resultados, considerando un descenso de las propiedades bacteriostáticas de las superficies, es de esperar que también pierdan actividad en mayores intervalos de tiempo. En el presente estudio, después de los 3 tratamientos de lavado y secado, a partir de las 72 horas pueden hacerse subsiguientes pruebas rápidas de tratamientos de lavado y secado en diferentes periodos de tiempo y considerar una proyección de la protección real por tipo de superficies, tipo de compuesto bacteriostático incluido en su elaboración y resistencia por cepa bacteriana.

La incorporación de agentes bacteriostáticos tiene como objetivo garantizar una adecuada higienización de las superficies inhibiendo el crecimiento de las bacterias y manteniendo sus propiedades bacteriostáticas durante largos periodos de tiempo. El tratamiento de superficies que no entren en contacto directo con los alimentos, en el proceso de su fabricación, pueden incorporar componentes antibacterianos en las concentraciones adecuadas y lo más homogéneamente posible, de tal forma que no alteren las propiedades físicas del material empleado. En el caso de compuestos como el triclosán, estas

propiedades bacteriostáticas dependen si se emplea a bajas concentraciones, como es en el caso del presente estudio, o si emplea en concentraciones más elevadas, este compuesto presentará propiedades bactericidas (Bhargava y Leonard, 1996; Suller y Russell, 2000).

Figura 6. Coeficiente de determinación (R^2) de las concentraciones de triclosán de las muestras (ppm) y el tamaño de los halos de inhibición (cm) en *Staphylococcus aureus* a las 24 horas, 48 horas y 72 horas de ensayo.



5.2.5. Microscopía de epifluorescencia directa

Para evaluar por microscopía las superficies de poliéster de 2,5 cm x 2,5 cm sin tratamientos con triclosán, se inocularon $2,96 \times 10^8$ células/ml de *Staphylococcus aureus* y se conservaron durante 24 horas a 37 °C en condiciones húmedas de ensayo. En las figuras 8 y 9 se observan microscópicamente las superficies de ensayo no tratadas con triclosán. En las imágenes se aprecian células teñidas de verde correspondientes a las bacterias viables que darán origen a las colonias bacterianas tras la incubación con agar TSA a 37 °C en los ensayos de halos de inhibición. Mientras que en superficies con un contenido de triclosán de 400 ppm, se observó residuos orgánicos sin desarrollo apreciable de células bacterianas viables (figura 7). Esto se evidenció por la formación de halos de inhibición bacterianos.

El empleo en este estudio de la tinción vital Live/Dead® mostró microscópicamente las células viables (color verde) después de 24 horas en condiciones húmedas, que se encontraron en un mínimo porcentaje en comparación de las células que se tiñeron de color rojo (células muertas o lesionadas).

La mayor proporción de células con las membranas citoplasmáticas dañadas (muertas o lesionadas) puede deberse al estrés producido, el tiempo, sequedad y las propiedades físicas de las superficies; sin embargo, no necesariamente estas células son inviables, ya que pueden mantenerse en estado de latencia, reactivándose si se presentan condiciones más favorables para su desarrollo (Berney *et al*, 2006; Fuster-Valls, 2006). De acuerdo con los resultados obtenidos, la inclusión de un biocida en un material, impide la formación de biofilms, por lo que la detección de un halo, según nuestro procedimiento analítico, implica que las bacterias no se adhieren, con el consiguiente factor de seguridad para los manipuladores y para el producto elaborado.

Figura 7. Imagen por microscopía de fluorescencia de superficie de poliéster con triclosán en su composición, sin desarrollo de células bacterianas donde se aprecia residuos orgánicos de la inoculación bacteriana.

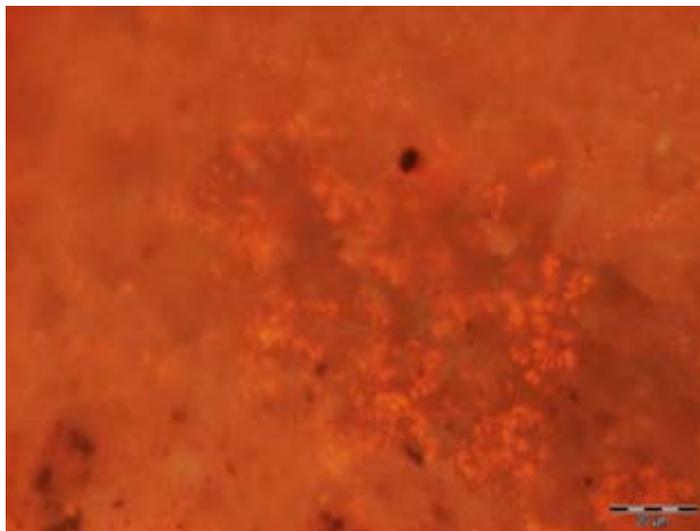


Figura 8. Imagen por microscopía de fluorescencia de células viables de *S. aureus* (en color verde) y de color rojo (lesionadas o muertas) sobre superficies de poliéster sin propiedades antibacterianas en su composición.

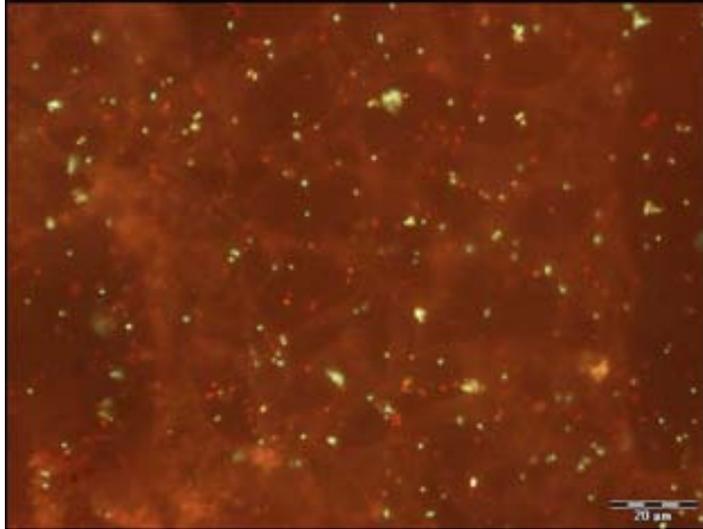
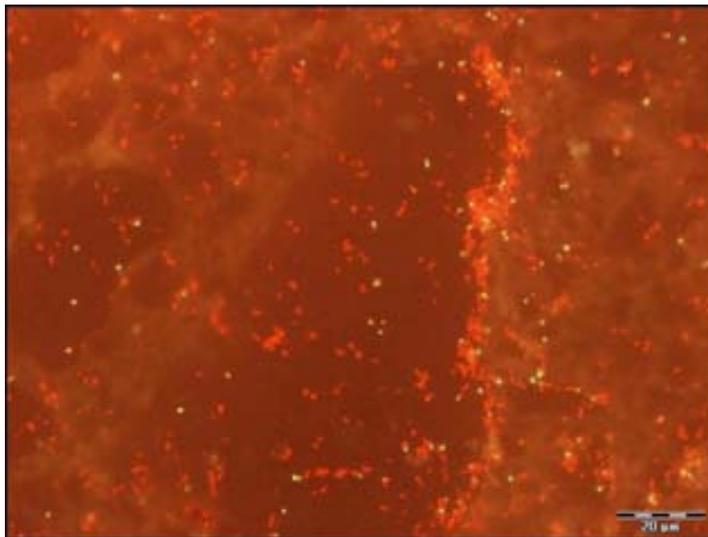


Figura 9. Imagen por microscopía de fluorescencia de células de *S. aureus* formando biofilms (células viables en color verde. En color rojo, las células lesionadas o muertas) tras 24 horas de su inoculación sobre superficies sin propiedades antibacterianas en su composición.



5.3. EVALUACIÓN DE DESINFECTANTES Y FORMACIÓN DE BIOFILMS EN CONDICIONES DE ACUICULTURA

5.3.1. Adherencia de bacterias ambientales a los tanques de crianza de peces en condiciones de acuicultura

Para evaluar la adherencia de bacterias ambientales en la crianza de peces salmónidos, se utilizaron superficies de acero inoxidable, plástico, vidrio y plástico antibacteriano a base de piritionato de zinc. Las diferentes superficies de ensayo permanecieron en el interior de los tanques de crianza de peces en agua corriente circulante durante siete días, para ser posteriormente recuperadas para su estudio microbiológico. Microscópicamente las células adheridas fueron tipo bacilos Gram negativos. En la tabla 27 se muestran los resultados de la adherencia de las células ambientales \log_{10} (células/cm²) sobre los distintos tipos de superficies mediante microscopía de fluorescencia empleando la tinción vital Live/Dead®.

Tabla 27. Recuperación de células ambientales acuáticas adheridas sobre distintos materiales (\log_{10} células/cm²).

Material	Vivas	Muertas
Acero inoxidable	4,51 ^{a A} ± 0,17	4,75 ^{a A} ± 0,12
Plástico	4,65 ^{a A} ± 0,07	4,86 ^{a A} ± 0,02
Vidrio	4,90 ^{a A} ± 0,27	4,41 ^{a A} ± 0,26
Madera	4,54 ^{a A} ± 0,02	4,77 ^{a A} ± 0,63
Plástico antibacteriano	3,83 ^{b B} ± 0,55	4,37 ^{a A} ± 0,16

^{a-b} Valores estadísticamente significativos ($P < 0,05$) leídos en columna.

^{A-B} Valores medios en una misma fila con diferentes letras son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Las superficies de acero inoxidable, plástico, vidrio y madera mostraron una adherencia de células vivas significativamente mayor ($P < 0,05$) que los obtenidos para el plástico antibacteriano (3,83 \log_{10}). En estos resultados, los recuentos por microscopía de fluorescencia de las células vivas y lesionadas o muertas, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$). Con la excepción del plástico antibacteriano,

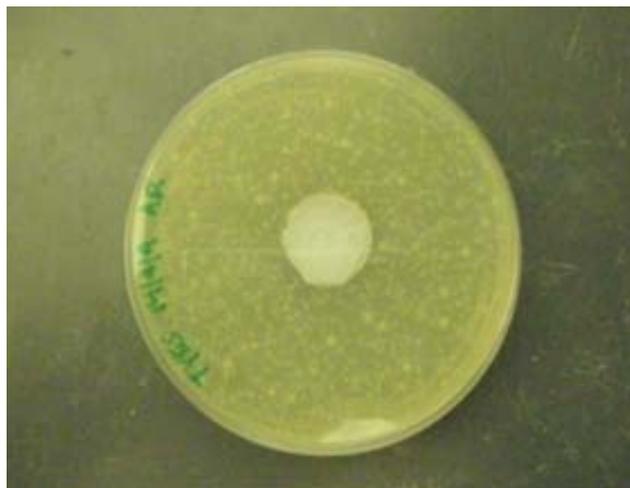
los valores obtenidos de células bacterianas viables en plástico, vidrio y madera fueron superiores a los observados en el acero inoxidable ($4,51 \log_{10}$).

La capacidad de las células planctónicas para adherirse a las superficies es la primera etapa de la formación de biofilms, cuando las condiciones del medio ambiente son adecuadas (Palmer *et al.*, 2007; Garrett *et al.*, 2008). Esta característica nos muestra que las superficies utilizadas en las instalaciones acuícolas para la crianza de peces es una fuente para la propagación bacteriana, con el riesgo de transmisión hacia los peces durante los ciclos de producción.

5.3.2. Actividad bactericida de productos desinfectantes en células ambientales

Para la evaluación de la actividad bactericida en las células ambientales recuperadas, se usaron compuestos a base de tensoactivos, peroximonosulfato de sodio al 1,0%, y el hipoclorito de sodio (tabla 13). Tras la recuperación de las células en las superficies de acero inoxidable adheridas a los tanques de crianza con agua circulante, estos se incubaron en agar TYES (figura 10) con las características microscópicas de ser células tipo bacilo Gram negativas.

Figura 10. Presencia de colonias bacterianas recuperadas a partir de disco de acero inoxidable (2,0 cm de diámetro) e incubadas durante 72 horas en agar TYES.



Los ensayos de los productos desinfectantes de las células recuperadas se realizaron a partir de una suspensión bacteriana inicial de $6,33 \log_{10}$ (UFC/ml). Los resultados obtenidos de la evaluación de los productos desinfectantes se observan en la tabla 28. Estos resultados muestran diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para los diferentes productos de ensayo en sus diferentes concentraciones.

Al 100% de concentración de estudio, se presentó alta significación estadística ($P < 0,05$) para el peroximonosulfato de sodio al 1,0%, hipoclorito de sodio al 5,25% y el producto “400”; los cuales mostraron eficacia bactericida superior a $4 \log_{10}$. El producto “400” presentó una composición tensoactiva (14,3%, aniónico y 5,7%, anfóteros), además de ácido láctico y ácido orgánico, compuestos con propiedades antimicrobianas que incrementan la actividad bactericida de la composición tensoactiva al inhibir el desarrollo bacteriano en las superficies (Helander *et al.*, 1997 y Han, 2005).

Al 50% de concentración de estudio de los productos ensayados, solo el hipoclorito de sodio presentó actividad bactericida superior a $4 \log_{10}$ ($6,32 \log_{10}$), mientras que al 25% de concentración de estudio, este compuesto no presentó actividad bactericida ($3,60 \log_{10}$).

Tabla 28. Eficacia de productos desinfectantes en bacterias ambientales recuperadas de tanques de crianza de peces (\log_{10} de UFC/ml) de diferentes compuestos en las concentraciones del 100%, 50% y 25%.

Producto	100%	50%	25%
Peroximonosulfato de sodio (1,0%)	6,30 ^a ± 0,17	2,94 ^b ± 0,12	2,67 ^b ± 0,13
Hipoclorito de sodio	6,32 ^a ± 0,12	6,32 ^a ± 0,27	3,60 ^a ± 0,60
“101”	3,40 ^b ± 0,32	3,13 ^c ± 0,23	2,39 ^b ± 0,07
“201”	4,11 ^b ± 1,23	3,34 ^c ± 0,62	3,10 ^b ± 0,62
“300”	2,79 ^c ± 0,11	2,56 ^c ± 0,14	2,65 ^b ± 0,15
“400”	6,31 ^a ± 0,24	3,68 ^b ± 0,07	2,68 ^b ± 0,17

^{a-c} Valores estadísticamente significativos ($P < 0,05$) leídos en columna.

De acuerdo a estos resultados, el peroximonosulfato de potasio al 1,0%, y el hipoclorito de sodio al 5,25% presentaron una actividad bactericida frente a las células ambientales recuperadas. El peroximonosulfato de potasio se utiliza como un agente oxidante de los componentes celulares bacterianos, al desnaturalizar los ácidos nucleicos y provocar una disrupción de la pared celular bacteriana. Este compuesto tiene propiedades bactericidas, viricidas y fungicidas, y es utilizado en diferentes sectores como los hospitales, laboratorios, plantas de alimentos, etc. (Dunowska *et al.*, 2005; Anipsitakis *et al.*, 2008).

En general, el hipoclorito de sodio es ampliamente utilizado para la desinfección de superficies, como se ha observado en estos resultados; debiendo tener en cuenta que este producto es inactivado por la presencia de restos de materia orgánica propia de los peces o de los sistemas de alimentación en los tanques de crianza, lo que justifica una adecuada limpieza con detergentes no iónicos de las superficies de plástico previamente a la desinfección (McDonnell y Russell, 1999; Chmielewski y Frank, 2003).

Además, la rotación de desinfectantes es importante en el manejo de la producción de peces, ya que las células bacterianas acuáticas pueden generar la formación de biofilms en superficies cuando las condiciones son apropiadas, con la consiguiente propagación de bacterias patógenas de importancia en la acuicultura. Los productos tensoactivos aniónicos con anfóteros, como es el caso del producto “400”, presentan ventajas referentes a: detergencia, humectancia y poder espumante. Esta capacidad bactericida es incrementada por el ácido láctico. Por ello pueden ser utilizadas en concentraciones mayores en las formulaciones de productos con acción detergente y desinfectante (Oh y Marshall, 1995).

5.3.3. Formación de biofilms de *F. psychrophilum* en condiciones de humedad

Después de 5 días de incubación de *F. psychrophilum* en caldo TYES a 15 °C, se inocularon 50 µl en los discos de acero inoxidable de 2,0 cm de diámetro con un valor de 7,98 log₁₀ de células/cm², de los cuales 6,30 log₁₀ correspondieron a células vivas (coloración verde) y 1,68 log₁₀ a células lesionadas o muertas (coloración roja). La relación entre volumen inoculado y el área del disco de acero inoxidable fue conser-

vada para los otros materiales empleados: plástico, vidrio y plástico antibacteriano. Los inóculos permanecieron 96 horas en las diferentes superficies y posteriormente se realizaron los exámenes de microscopía de fluorescencia con la coloración Live/Dead®.

Las características morfológicas mostraron a las células vivas de *F. psychrophilum* (coloración verde) de apariencia delgadas y de una longitud aproximada de 3 μm a 8 μm ; incluso algunas bacterias con un tamaño de 10 μm . Por el contrario, las células lesionadas o muertas teñidas de rojo, presentaron tamaños más reducidos, con una longitud entre 1,0 μm y 6,0 μm (figura 11).

Transcurridas 96 horas en las diferentes superficies en condiciones húmedas, las células de *F. psychrophilum* contenidas en los biofilms, presentaron tamaños individuales más reducidos respecto al inóculo inicial (figura 12). Estos cambios morfológicos fueron más notables en las células vivas que en las células lesionadas o muertas.

Figura 11. Células de *Flavobacterium psychrophilum* de 96 horas en caldo de cultivo TYES, observadas por microscopía de fluorescencia (coloración Live/Dead®).

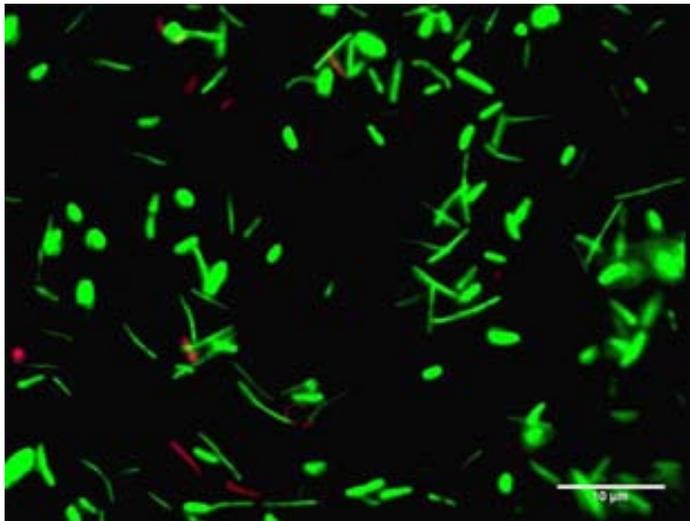
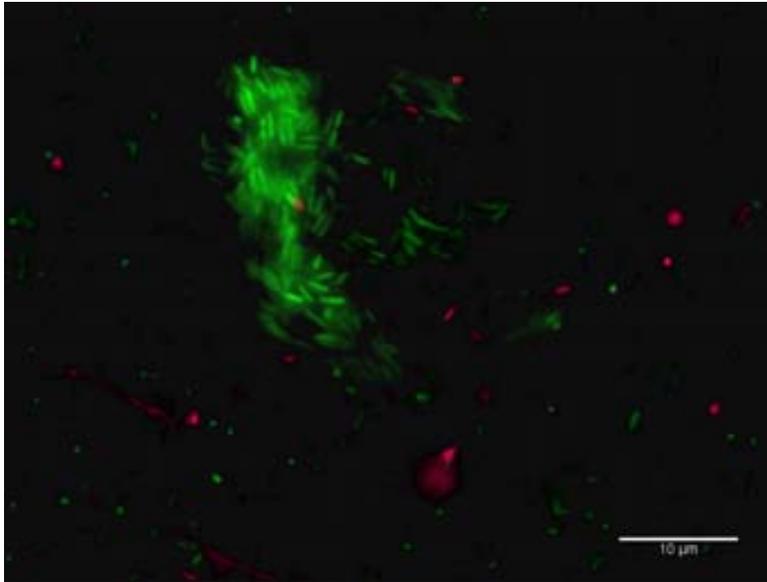


Figura 12. Células de *F. psychrophilum* formando biofilms tras permanecer 96 horas en una superficie de acero inoxidable observada por microscopía de fluorescencia (Coloración Live/Dead®).

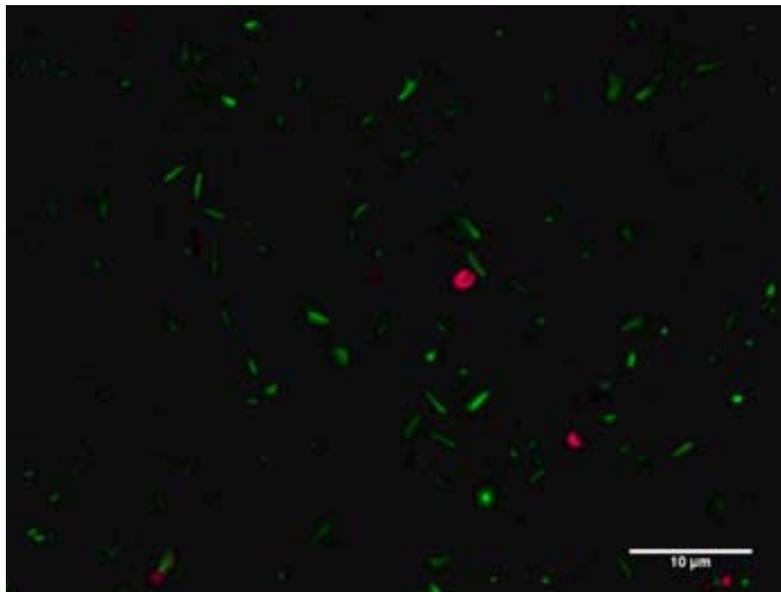


Los cambios morfológicos se presentan cuando las bacterias en condiciones húmedas tienden a agruparse formando microcolonias, secretando sustancias poliméricas extracelulares y reduciendo su tamaño para formar biofilms, los cuales en la etapa madura de su desarrollo están formados por más células dañadas (muertas o no viables) que células vivas (Allison y Sutherland, 1987; Chmielewski y Frank, 2003).

Algunas células lesionadas o muertas presentaron formas anilladas, aproximadamente de un tamaño de 1,0 μm a 3,0 μm de diámetro (figura 13). La característica de formas anilladas en células de *F. psychrophilum* NCIMB 1947, en el presente estudio, también ha sido observada en células de *F. psychrophilum* aisladas de peces salmónidos con la enfermedad conocida como “Síndrome de la trucha de arco iris” en el Reino Unido. En dicho estudio, las formas anilladas fueron observadas por microscopía electrónica, tras permanecer las bacterias en suspensión líquida durante 4 semanas (Vatsos *et al.*, 2003). Estos cambios morfológicos pueden haberse acelerado bajo condiciones de crecimiento directamente sobre las superficies de ensayo, produciéndose una alteración de la membrana plasmática, fenómeno observado por Boulos *et al.* (1999). Asimismo,

el desarrollo de células bacterianas sobre superficies en condiciones adversas, como la falta de nutrientes, disminuye el tamaño celular, característica que ha sido observada en *Staphylococcus aureus* (Fuster-Valls, 2006).

Figura 13. Células lesionadas o muertas de *Flavobacterium psychrophilum* con forma de anillo tras permanecer 96 horas en una superficie de acero inoxidable, fotografiadas por microscopía de fluorescencia (coloración Live/Dead®).



5.3.3.1. Comparación de distintos materiales en la formación de biofilms de *F. psychrophilum* en condiciones de humedad

Los resultados de la tabla 29 muestra la formación de biofilms de *Flavobacterium psychrophilum* después de haber sido conservadas las superficies inoculadas en condiciones húmedas a 15 °C y examinarse por microscopía de fluorescencia.

La formación de biofilms de *F. psychrophilum* en las diferentes superficies de ensayo mostraron los siguientes valores: 6,15 log₁₀ para el acero inoxidable, 5,96 log₁₀ para el plástico, 5,92 log₁₀ para el vidrio y 3,81 log₁₀ para el plástico experimental antibacte-

riano (figura 14). Se apreció una mayor adhesión bacteriana a las superficies de acero inoxidable, plástico y vidrio. Este grupo fue estadísticamente más significativo ($P < 0,05$) que el plástico antibacteriano, tanto para las células vivas y lesionadas o muertas.

Tabla 29. Formación de biofilms (\log_{10} de células/cm²) de *Flavobacterium psychrophilum* en diferentes materiales en condiciones húmedas de ensayo.

Material	Células	
	Vivas	Lesionadas o muertas
Acero inoxidable	6,15 ^a ± 0,37	5,54 ^a ± 0,45
Plástico	5,96 ^a ± 0,06	5,97 ^a ± 0,48
Vidrio	5,92 ^a ± 0,02	5,75 ^a ± 0,05
Plástico antibacteriano	3,81 ^b ± 0,17	4,04 ^b ± 0,28

^{a-b} Valores estadísticamente significativos ($P < 0,05$) leídos en columna.

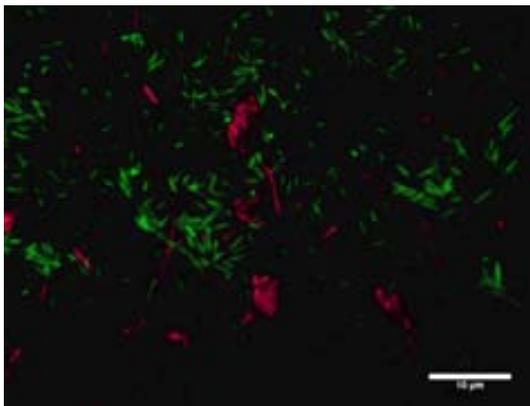
Los niveles de adhesión de las bacterias a distintos materiales no solo están influenciados por sus irregularidades o la porosidad, sino también dependen de la cepa bacteriana y su capacidad de adhesión, temperatura, condiciones de humedad o desecación y de la naturaleza del fluido desde donde se adhieren las bacterias (Flint *et al.*, 2000; Jullien *et al.*, 2002). Sin embargo, la capacidad de *F. psychrophilum* para sobrevivir a la desecación no ha sido descrito todavía, fenómeno que sí se ha observado en las células Gram negativas sobre superficies de acero inoxidable (Fuster-Valls *et al.*, 2008).

En el presente estudio, los resultados mostraron que en condiciones húmedas, se produjo una reducción a partir del inóculo inicial de 6,30 \log_{10} a 6,15 \log_{10} de bacterias vivas y un aumento de 1,68 \log_{10} a 5,54 \log_{10} de las células lesionadas o muertas tras permanecer *F. psychrophilum* 96 horas sobre las superficies de acero inoxidable.

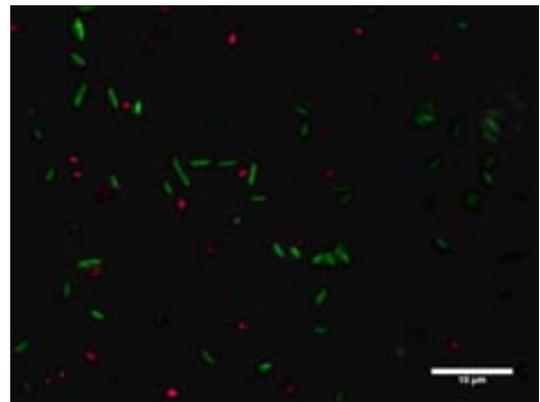
En este sentido, en condiciones de desecación, se espera que la presencia de células lesionadas o muertas sea sensiblemente mayor. Incluso, en condiciones adecuadas de humedad, la falta de nutrientes pueden favorecer la formación de biofilms (Chmielewski y Frank, 2003). Así, el aumento de las células lesionadas o muertas en comparación de las presentes en el inóculo inicial pueden indicar los cambios celulares hacia la for-

mación de biofilms maduros, los cuales están formados mayoritariamente por células lesionadas o muertas.

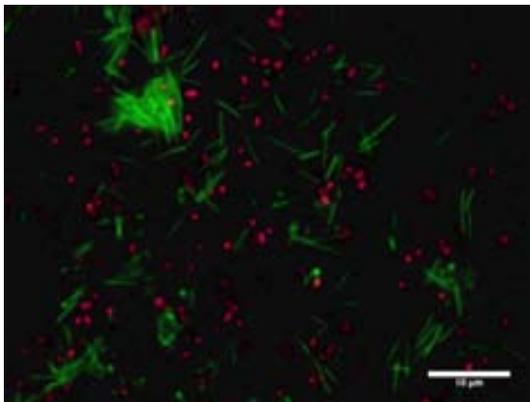
Figura 14. Imágenes por microscopía de fluorescencia (coloración Live/Dead®) de biofilms de *Flavobacterium psychrophilum* expuestas durante 96 horas en condiciones de humedad a diferentes superficies de ensayo: a. Acero inoxidable, b. Plástico, c. Vidrio y d. Plástico antibacteriano.



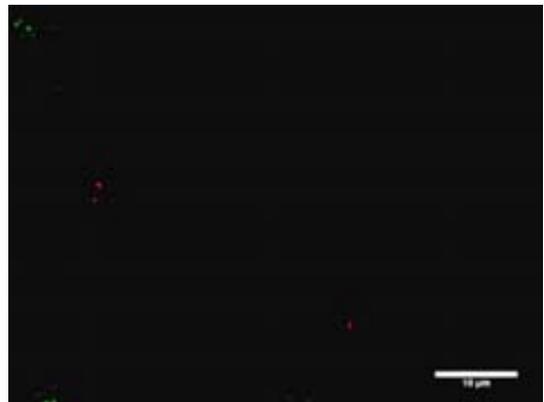
a. Acero inoxidable



b. Plástico



c. Vidrio



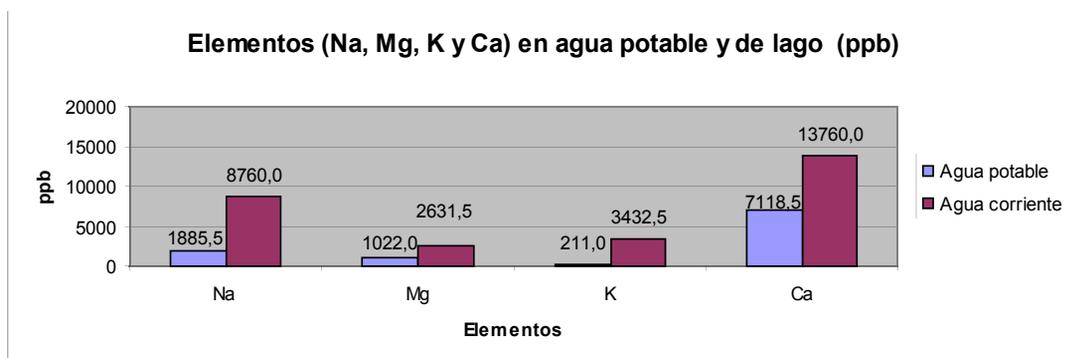
d. Plástico antibacteriano

5.3.4. Formación de biofilms de *F. Psychrophilum* en condiciones de tanques de crianza de peces

5.3.4.1. Contenido de minerales (ppb) del agua utilizada en los tanques de crianza

En la figura 15 se muestran las concentraciones de los minerales contenidos en el agua corriente obtenida del lago Airthrey tras su filtración por membrana de 0,45 μm (Millipore®). La composición mineral del agua corriente muestra una concentración más alta en sodio, magnesio, potasio y calcio (ppb) en comparación de lo encontrado en el agua potable. Si bien en condiciones normales, en el agua corriente no potable hay una mayor concentración de elementos minerales y una mayor cantidad de residuos que favorecen la presencia de bacterias ambientales, se ha observado que la capacidad de adhesión de los microorganismos en los sistemas de tuberías de distribución de agua potable no se ve necesariamente disminuida, ya que la presencia de nutrientes es suficiente para el desarrollo de células planctónicas, y a pesar de que la posible presencia de estas células no son elevadas, tienen una alta capacidad de formar biofilms (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992; Percival y Walker, 1999).

Figura 15. Composición de minerales (ppb) del agua potable y de lago empleados para la formación de biofilms de *F. Psychrophilum* en condiciones de tanques de crianza de peces. Análisis realizados en el Water Quality Laboratory, Institute of Aquaculture, University of Stirling.



5.3.4.2. Comparación de los distintos materiales empleados para la formación de biofilms de *F. psychrophilum*

Los ensayos de la formación de biofilms de *F. psychrophilum* en tanques de crianza de peces se realizaron con una concentración inicial $6,33 \log_{10}$ de células viables/cm². Los resultados muestran las células adheridas formando biofilms, $4,94 \log_{10}$ para las superficies de acero inoxidable, $5,04 \log_{10}$ para el plástico, $4,93 \log_{10}$ para el vidrio y $5,05 \log_{10}$ para la madera. Estas superficies presentaron un grupo que fue estadísticamente más significativo ($P < 0,05$) a la del plástico experimental antibacteriano, que presentó una adherencia bacteriana de $2,46 \log_{10}$ para las células vivas al examen de microscopía de fluorescencia (tabla 30).

Tabla 30. Formación de biofilms para diferentes superficies en agua potable y de lago (\log_{10} de células/cm²) en tanques de crianza de peces.

Material empleado	Agua potable		Agua corriente	
	Células vivas	Células lesionadas o muertas	Células vivas	Células lesionadas o muertas
Acero inoxidable	$4,94^a \pm 0,12$	$5,17^{ab} \pm 0,12$	$5,36^a \pm 0,13$	$5,19^a \pm 0,40$
Plástico	$5,04^a \pm 0,08$	$4,77^{ab} \pm 0,11$	$5,47^a \pm 0,08$	$5,49^a \pm 0,50$
Vidrio	$4,93^a \pm 0,11$	$5,10^{ab} \pm 0,12$	$5,38^a \pm 0,09$	$5,37^a \pm 0,28$
Madera	$5,05^a \pm 0,10$	$5,45^a \pm 0,39$	$5,14^b \pm 0,07$	$5,19^a \pm 0,40$
Plástico antibacteriano	$2,46^b \pm 2,13$	$4,07^c \pm 0,34$	$3,78^c \pm 0,17$	$4,32^b \pm 0,19$

^{a-c} Valores estadísticamente significativos ($P < 0,05$) leídos en columna.

Para las condiciones de estudio en los tanques con agua corriente obtenidas del lago Airthrey, se observó mayor significancia estadística ($P < 0,05$) para las células vivas adheridas al acero inoxidable ($5,36 \log_{10}$), plástico ($5,47 \log_{10}$) y vidrio ($5,38 \log_{10}$). Las células adheridas a la madera presentaron una adherencia de $5,14 \log_{10}$ y una menor significancia estadística para el plástico antibacteriano ($3,78 \log_{10}$).

De acuerdo a los resultados de la adhesión de las células, se observaron valores superiores para las células en las superficies que permanecieron en los tanques de agua corriente. Dado que la concentración de la composición mineral del agua corriente de lago fue superior al encontrado en el agua potable en este estudio, estos resultados concuerdan con otros estudios, donde se ha observado que sedimentos orgánicos e inorgánicos influyen en la formación de biofilms de *Flavobacterium* sp. Así, Mattila-Sandholm y Wirtanen (1992) informan que en los suministros de aguas naturales e industriales, la formación de biofilms se produce a pesar de que el contenido de nutrientes es bajo, además que el número de células planctónicas es de 500 a 50,000 veces inferior al de las células formando biofilms sobre las superficies en este tipo instalaciones. *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Achromobacter* son los géneros que normalmente se encuentran en el agua potable. Staroscik y Hunnicutt, (2007) observaron por microscopía confocal que la adición de iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} al medio de cultivo de Anacker-Ordal (Anacker y Ordal, 1959) causó la formación de biofilms con formas irregulares y la adición de mucosidades de la piel de salmón y glucosa inducía la formación de biofilms relativamente uniformes en *F. columnare*. Así mismo, se ha observado que *F. psychrophilum* aumenta su sobrevivencia por la presencia de sedimentos que contienen nutrientes en el agua por largos periodos de tiempo y llegar a ser fácilmente propagable en las explotaciones de peces donde existen sistemas de recirculación del agua (Madetoja *et al.*, 2003).

5.3.5. Actividad antibacteriana de superficies empleadas en acuicultura

La tabla 31 muestra la cantidad de células viables adheridas en las superficies de acero inoxidable como control en condiciones húmedas y condiciones de agua potable ($6,15 \log_{10}$ y $4,94 \log_{10}$, respectivamente). Al comparar los valores, el plástico antibacteriano a base de piritionato de zinc presentó una reducción del número de células viables de $2,34 \log_{10}$ en condiciones húmedas de ensayo, y $2,48 \log_{10}$ en los taques de crianza de peces en condiciones de agua potable. En los ensayos usando agua corriente de lago, presentó una reducción antibacteriana de $1,58 \log_{10}$. Mientras que se

observaron reducciones mínimas o se presentó un aumento del número de células en el plástico, vidrio y la madera de uso en las instalaciones de crianza de peces. La reducción de las propiedades antibacterianas del plástico a base de piritionato de zinc en los ensayos con el agua corriente de lago difieren de los encontrados para este material en los experimentos en condiciones húmedas ($2,34 \log_{10}$) o en el agua potable ($2,48 \log_{10}$), donde fueron más eficaces. Esto puede deberse a la presencia de restos de minerales que interfieren con las propiedades bacteriostáticas propias de la superficie del plástico experimental antibacteriano; así como la alta densidad de elementos minerales en comparación del agua potable, que favorece la formación de biofilms del género *Flavobacterium* (Madetoja *et al.*, 2003; Staroscik y Hunnicutt, 2007). Actualmente, el piritionato de zinc tiene muchos usos prácticos. Además de usarse por sus propiedades antibacterianas, también se emplea en la prevención de la degradación microbiana de superficies, evitando el deterioro en la fabricación de materiales como plásticos, polímeros y látex, etc. (Maraldo y Dahllöf, 2004; Sun *et al.*, 2006).

Tabla 31. Actividad antibacteriana de diferentes materiales empleados en la formación de biofilms de *F. psychrophilum* en comparación del acero inoxidable en condiciones húmedas y en tanques de crianza de peces (\log_{10} de células/cm²).

Materiales	Condiciones de humedad	Condiciones en tanques de crianza de peces	
		Agua potable	Agua corriente de lago
Acero inoxidable	6,15	4,94	5,36
Diferencias de los materiales respecto al acero inoxidable			
Plástico	0,19	-0,10	-0,11
Vidrio	0,23	0,01	-0,02
Madera	-	-0,11	0,22
Plástico antibacteriano	2,34	2,48	1,58

(-) Signo negativo representa un aumento de la cantidad de células (\log_{10}) respecto a las superficies de acero inoxidable como control.

El conocimiento de la formación de biofilms y los inhibidores de crecimiento bacte-

riano sobre las superficies empleadas en los criaderos de peces como *F. psychrophilum* puede proporcionar información útil en cuanto a la naturaleza de la adhesión de esta bacteria a diferentes superficies.

Coincidiendo con el estudio del genoma de *F. psychrophilum*, se ha observado que esta especie bacteriana contiene muchos factores determinantes para la biosíntesis, difusión, modificación, la polimerización de exopolisacáridos y la capacidad de almacenar cianoficina que son necesarios para la formación de biofilms. Estas características podrían explicar la larga sobrevivencia de *F. psychrophilum* fuera de los peces huéspedes (Duchaud *et al.*, 2007), la posterior transmisión a las mucosidades de los peces y producir diversos cuadros patológicos (Madetoja *et al.*, 2000; Nematollahi *et al.*, 2003; Morgan *et al.*, 2007). Sundell y Wiklund, (2007) mostraron que en altas densidades de células de *F. psychrophilum* formando biofilms son menos susceptibles a antibióticos como la oxitetraciclina y la flumequina, de uso común en la acuicultura, e incluso pueden desarrollar una rápida resistencia si son expuestas a concentraciones subinhibitorias. Estas características, junto con las fuertes propiedades adherentes, probablemente contribuyan a su difusión en la acuicultura, por lo que el uso de materiales que inhiban el desarrollo bacteriano puede abrir vías de desarrollo en la prevención de la propagación de *Flavobacterium psychrophilum*, así como de otras especies bacterianas implicadas en brotes de enfermedades.

6. CONCLUSIONES

1. La evaluación de las propiedades bactericidas de las formulaciones con: 0,25% de peróxido de hidrógeno y 0,25% de cloruro de benzalconio; y 1,0% de peróxido de hidrógeno, 5,0% de alcohol etílico y 0,2% de polímeros catiónicos, presentaron alta eficacia bactericida frente a *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus hirae*; mientras que el empleo de peróxido de hidrógeno como único compuesto al 1,0%, no presentó actividad bactericida en ambas cepas bacterianas.
2. La resistencia de *Staphylococcus aureus* es mayor, en comparación con *Pseudomonas aeruginosa*, a los compuestos de peróxido de hidrógeno en las concentraciones del 0,5% al 3,0%. La actividad bactericida del peróxido de hidrógeno frente a *Staphylococcus aureus* se incrementó cuando actuó en combinación de compuestos como el ácido láctico, benzoato de sodio y el ácido salicílico.
3. El método para evaluar el efecto residual bactericida de desinfectantes sobre superficies basado en la norma UNE EN 13697 es funcional para determinar esta actividad en productos desinfectantes a base de cloruro de benzalconio e hipoclorito de sodio.
4. El cloruro de benzalconio a una concentración del 1,0% como único compuesto o en combinación de hidróxido de sodio al 0,20% y el óxido de amina al 1,0%, presentó actividad bactericida residual después de 24 horas sobre superficies de acero inoxidable. El hipoclorito de sodio al 4,0% como único compuesto bactericida no presenta efecto residual en 24 horas. La actividad residual bactericida del hipoclorito de sodio se incrementó al combinarse con otros compuestos, como el cloruro de benzalconio, hidróxido de sodio, óxido de amina mirístico y el alcohol graso etoxilado.

CONCLUSIONES

5. La evaluación de superficies plásticas que contienen triclosán como compuesto antibacteriano, demostró que *Escherichia coli* es más sensible a la actividad antibacteriana de estas superficies en comparación de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae*.
6. La actividad bacteriostática de superficies que incluyen triclosán en su composición, no se ve inhibida por las condiciones secas de ensayo. En estas condiciones, *Staphylococcus aureus* presentó mayor susceptibilidad a la acción del triclosán en comparación de las condiciones húmedas.
7. El estudio de la formación de los halos de inhibición bacterianos como un método para evaluar la actividad antibacteriana de superficies, evidencia la propagación de los compuestos con propiedades antimicrobianas cuando se hallan presentes en las superficies, encontrándose una relación entre la concentración de triclosán presente en las superficies y el tamaño de los halos de inhibición formados.
8. La capacidad de formación de los halos de inhibición de superficies con propiedades antibacterianas se presenta en diferentes periodos de tiempo. Este método puede emplearse para determinar el tiempo de vida útil de dichas propiedades en distintos materiales.
9. Los compuestos de peroximonosulfato de sodio al 1,0%, hipoclorito de sodio al 5,25%, y la combinación de compuestos tensoactivos aniónicos, anfóteros, ácido láctico y cumensulfonato, mostraron efecto bactericida al evaluarlos en células ambientales recuperadas del agua circulante utilizada en criaderos de peces.

10. *Flavobacterium psychrophilum* es un microorganismo que tiene la capacidad de formar biofilms, con cambios en su morfología celular, como reducción del tamaño celular y un incremento de las células lesionadas o muertas después de permanecer 96 horas en superficies de acero inoxidable. La capacidad de adherirse y desarrollar biofilms, también se observó en las superficies plásticas de crianza de peces, vidrio y madera.

11. El plástico antibacteriano a base de piritionato de zinc tiene la capacidad de inhibir la formación de biofilms en condiciones de crianza de peces. La actividad antibacteriana se ve interferida cuando el agua circulante con estas superficies presenta altas concentraciones de sodio, magnesio, potasio y calcio.

7. BIBLIOGRAFÍA

Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M., Wirtanen, G., Autio, T., Lundén, J., Korkeala, H. y Sjöberg, A. 2000. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety*, 20: 237–250.

AESAN (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). 2012. Informe sobre la presencia de compuestos de amonio cuaternario en alimentos y piensos. Actuaciones de control oficial derivadas.

http://www.aesan.msc.es/AESAN/web/cadena_alimentaria/subdetalle/amonio_cuaternario.shtml

Akiyama, H., Yamasaki, O., Kanzaki, H., Tada, J. y Arata, J. 1998. Effects of sucrose and silver on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 629–634.

Al-Ahmad, A., Wiedmann-Al-Ahmad, M., Auschill, T.M., Follo, M., Braun, G., Hellwig, E. y Arweiler, N.B. 2008. Effects of commonly used food preservatives on biofilm formation of *Streptococcus mutans* *in vitro*. *Archives of Oral Biology*, 53(8): 765–772.

Allison, D. y Sutherland, I. 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *Journal of General Microbiology*, 133: 1319–1327.

Álvarez, B., Secades, P., Prieto, M., McBride, M.J. y Guijarro, J.A. 2006. A mutation in *Flavobacterium psychrophilum* tlpB inhibits gliding motility and induces biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 4044–4053.

An, Y. y Friedman, R. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43: 338–348.

Anacker, R.L. y Ordal, E.J. 1959. Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*: I. Serological typing. *Journal of Bacteriology*, 78: 25–32.

Anderson, J. y Conroy, D. 1969. The pathogenic myxobacteria with special reference to fish disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 32: 30–39.

Anipsitakis, G., Tufano, T.P. y Dionysiou, D. 2008. Chemical and microbial

decontamination of pool water using activated potassium peroxymonosulfate. *Water Research*, 42(12): 2899–2910.

Anónimo, 1997a. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad bactericida básica. Método de ensayo y requisitos (Fase 1). AENOR, UNE–EN 1040.

Anónimo, 1997b. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad fungicida básica. Método de ensayo y requisitos (Fase 1). AENOR, UNE–EN 1275, 1–30 pg.

Anónimo, 1998a. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria en el hogar y en la colectividad. Métodos de ensayo y requisitos (fase 2, etapa 1). AENOR, UNE–EN 1276, 1–35 pg.

Anónimo, 1998b. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad fungicida de los antisépticos y desinfectantes químicos utilizados en productos alimenticios, en la industria en el hogar y en la colectividad. Métodos de ensayo y requisitos (Fase 2, etapa 1). AENOR, UNE–EN 1650, 1–35 pg.

Anónimo, 2000. Antimicrobial products–Test for antimicrobial activity and efficacy. Japanese Industrial Standard. JIS Z 2801: 2000.

Anónimo, 2002. 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 – Fase 2/etapa 1. AENOR, UNE–EN 13697, 1–34 pg.

Anónimo, 2005. Antisépticos y desinfectantes químicos. Actividad esporicida básica. Método de ensayo y requisitos, (Fase 1/etapa 1). UNE–EN 14347.

Anónimo, 2006. Aceros inoxidable. Parte 1: Relación de aceros inoxidable. AENOR, UNE EN 10088–1: 2006.

AOAC International. 2010. Official Methods of Analysis of AOAC International 18th

- Edition, 2005. Current through Revision 3, 2010. Edit: W. Horwitz., Arlington, Va. USA.
- Arvanitoyannis, I., Choreftaki, S. y Tserkezou, P. 2005. An update of EU legislation (Directives and Regulation) on food-related issues (Safety, Hygiene, Packaging, Technology, GMOs, Additives, Radiation, Labeling); presentation and comments. *International Journal of Food Science and Technology*, 40: 1021–1112.
- Atmaca, S., Gül, K. y Çiçek, R. 1998. The Effect of Zinc on Microbial Growth. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 28(6): 595–598.
- Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, Ch. y Gram, L. 2003. The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3): 239–250.
- Baker, J., Griffiths, M. y Collins-Thompson, D. 1992. Bacterial bioluminescence: applications in food microbiology. *Journal of Food Protection*, 55(1): 62–70.
- Baldry, M. 1983. The bactericidal, fungicidal and sporicidal properties of hydrogen peroxide and peracetic acid. *Journal of Applied Bacteriology*, 54: 417–23.
- Barnes, M.E. y Brown, M.L. 2011. A Review of *Flavobacterium Psychrophilum* Biology, Clinical Signs, and Bacterial Cold Water Disease Prevention and Treatment. *The Open Fish Science Journal*, 4: 40–48.
- Bendinger, B., Rijnaarts, H.H.M., Altendorf, K. y Zehnder, A.J.B. 1993. Physicochemical cell surface and adhesive properties of coryneform bacteria related to the presence and chain length of mycolic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3973–3977.
- Bernardet, J.F. y Bowman, J.P. 2006. The genus *Flavobacterium*. *Prokaryotes*, 7: 481–531.
- Berney, M., Weilenmann, H. y Egli, T. 2006. Flow-cytometric study of vital cellular functions in *Escherichia coli* during solar disinfection (SODIS). *Microbiology*, 152: 1719-1729.

- Bhargava, H.N. y Leonard, P. 1996. Triclosan: applications and safety. *American Journal of Infection Control*, 24(3): 209–218.
- Blackman, I. y Frank, J. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food–processing surfaces. *Journal of food protection*, 59: 827–831.
- Blanchard, A., Bird, M. y Wrigh, J. 1998. Peroxygen disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on stainless steel discs. *Biofouling*, 13(3): 233–253.
- Bloomfield, S., Arthur, M., Begun, K. y Patel, H. 1993. Comparative testing of disinfectants using proposed European surface test methods. *Letters in Applied Microbiology*, 17: 119–125.
- Bloomfield, S. 2002. Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 144–57.
- Bloomfield, S. 2003. Home hygiene: a risk approach. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 206(1): 1–8.
- Bodík, I., Gasparikova, E., Dancova, L., Kalina, A., Hutnan, M. y Drtil, M. 2008. Influence of disinfectants on domestic wastewater treatment plant performance. *Bioresource Technology*, 99(3): 532–539.
- Borg, A.F. 1960. Studies on myxobacteria associated with diseases in salmonid fishes. *Journal of Wildlife Disease*, 8: 1–85.
- Borkow, G. y Gabbay, J. 2009. Copper, An Ancient Remedy Returning to Fight Microbial, Fungal and Viral Infections. *Current Chemical Biology*, 3: 272–278.
- Boulos, L., Prevost, M., Barbeau, B., Coallier, J. y Desjardins, R. 1999. LIVE/DEAD. BacLight™: application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *Journal of Microbiological Methods*, 37: 77–86.
- Bousser, C. 2002. Combinación de la limpieza y la desinfección. En: Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. AMV Ediciones y Mundi–Prensa, Madrid, pg. 303–320.

- Bower, C., McGuire, J. y Daeschel, M. 1995. Suppression of *Listeria monocytogenes* colonization following adsorption of nisin onto silica surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 992–997.
- Bower, C., McGuire, J. y Daeschel, M. 1996. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food–contact surfaces. *Trends in Food Science & Technology*, 7(5): 152–157.
- Bradley, C.R. y Fraise, A.P. 1996. Heat and chemical resistance of enterococci. *Journal of Hospital Infection*, 34: 191–196.
- Brown, L., Cox, W.T. y Levine, R. 1997. Evidence that the causal agent of bacterial cold–water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29: 213–218.
- Bruun, M.S., Schmidt, A.S., Madsen, L. y Dalsgaard, I. 2000. Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of *Flavobacterium psychrophilum*. *Aquaculture*, 187: 201–212.
- BSSA (British Stainless Steel Association). 2001. Stainless Steels for the Food Processing Industries. *SSAS Information*, 3.21(2): 1–5.
- Caldwell, D., Korber, D. y Lawrence, J. 1993. Analysis of biofilm formation using 2D vs 3D digital imaging. *Journal of Applied Microbiology*, 74: 52S–66S.
- Carpentier, B. y Cerf, O. 1993. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75: 499–511.
- Carsberg, H. 1996. Selecting your sanitizers. *Food Quality*, 2(3): 35–36.
- Cervantes, C. y Gutierrez–Corona, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*, 14(2): 121–137.
- Chapman, J. 2003. Disinfectant resistance mechanisms, cross–resistance, and co–resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4): 271–276.
- Characklis, W., Trulear, M., Bryers, J. y Zilver, N. 1982. Dynamics of biofilm processes:

Methods. *Water Research*, 16: 1207–1216.

Characklis, W., McFeters, G. y Marshall, K.C. 1990. Physiological ecology in biofilm systems. En: Characklis, W.G. & Marshall, K.C. (Eds.), *Biofilms*, pg. 341–394.

Chen, X. y Stewart, P. 1996. Chlorine penetration into artificial biofilm is limited by a reaction–diffusion interaction. *Environmental Science and Technology*, 30(6): 2078–2083.

Chen, Y., Jackson, K., Chea, F. y Schaffner, D. 2001. Quantification and variability analysis of bacterial cross–contamination rates in common food service tasks. *Journal of Food Protection*, 64: 72–80.

Chen, J. 2003. Contemporary Monitoring Methods. *Food Safety Handbook*. Edit. Schmidt y Rodrick. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, pg. 197–210.

Chmielewski, R. y Frank, J. 2003. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 22–32.

Choudhury, R. y Srivastava, S. 2001. Zinc resistance mechanisms in bacteria. *Current science*, 81(7): 768–775.

Christensen, B.E. 1989. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *Journal of Biotechnology*, 10(3–4): 181–202.

Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff–Schweizer, R.R. y Schweizer, H.P. 2001. Cross–resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants over expressing MexCD–OprJ. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 428–32.

Cipriano, R.C. y Holt, R.A. 2005. *Flavobacterium psychrophilum*, cause of Bacterial Cold–Water Disease and Rainbow Trout Fry Syndrome. Fish Disease Leaflet No. 86. United States Dept. of the Interior. U.S. Geological Service, National Fish Health Research Laboratory, Kearneysville, WV, USA.

Clegg, S. y Schurtz Sebghati, T.A. 2002. *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular Medical*

Microbiology, 3: 1655–1680.

Clements, M.O. y Foster, S.J. 1999. Stress resistance in *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 7(11): 458–462.

Cloete, T. y Jacobs, L. 2001. Surfactants and the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to 3CR12 stainless steel and glass. *Water SA*, 27(1): 21–26.

Costerton, J.W, Irvin, R. y Cheng, K.1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual Review of Microbiology*, 83: 299–324.

Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., y Lappin–Scott, H.M. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 45: 711–745.

Cremieux, A. y Fleurette, J. 1991. Methods of testing disinfectants. *Disinfection, Sterilization and Preservation*. Block. SS., Ed., Lippincott Williams & Wilkins, New York, 1318 pg.

D’Aquino, M., Nuñez, L. 1997. Influencia de la materia orgánica sobre la acción de desinfectantes. *Revista Argentina de Infectología*, 10(1): 3–9.

Daeschel, M.A., McGuire, J. y Al–Makhlafi, H. 1992. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic silicon surfaces. *Journal of food protection*, 55(9): 731–735.

Dalsgaard, I. 1993. Virulence mechanisms in *Cytophaga psychrophila* and other Cytophaga–like bacteria pathogenic for fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3: 127–144.

Dalton, H. y March, P. 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. *Current Opinion in Biotechnology*, 9(3): 252–255.

Dann, A.B. y Hontela, A. 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. You have full text access to this content. *Journal of Applied Toxicology*, 31: 285–311.

Daskalov, H., Austin, D.A. y Austin, B. 1999. An improved growth medium for *Flavobacterium psychrophilum*. *Letters in Applied Microbiology*, 28: 279–299.

- Davey, M. y O'toole, G. 2000. Microbial biofilm: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews*, 64(4): 847–867.
- De Beer, D., Srinivasan, R. y Stewart, P.S. 1994. Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12): 4339–4344.
- de Boer, E. y Hahné, M. 1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. *Journal of Food Protection*, 53(12): 1067–1068.
- Demple, B. 1991. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annual Review of Genetics*, 25: 315–337.
- DeQueiroz, G.A. y Day, D.F. 2007. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4): 794–802.
- DeVere, E. y Purchase, D. 2007. Effectiveness of domestic antibacterial products in decontaminating food contact surfaces. *Food Microbiology*, 24(4): 425–430.
- Domek, M., LeChavallier, M., Cameron, S. y McFeters, G. 1984. Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*, 48: 289–293.
- Donlan, R. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 881–890.
- Donlan, R. y Costerton, J. 2002. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167–193.
- Doyle, M.P. y Padhye, V.V. 1988. *Escherichia coli*. In: Doyle, M.P. Ed., *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, pg. 235–282.
- Drosou, A., Falabella, A. y Kirsner, R. 2003. Antiseptics on wounds: An Area of controversy. *Wounds*, 15(5): 149–166.

- Duchaud, E., Boussaha, M., Loux, V., Bernardet, J., Michel, C., Kerouault, B., Mondot, S., Nicolas, P., Bossy, R., Caron, C., Bessieres, P., Gibrat, J., Claverol, S., Dumetz, F., Henaff, M. y Benmansour, A. 2007. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature Biotechnology*, 25: 763–769.
- Dunne, W. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 155–166.
- Dunowska, M., Morley, P.S. y Hyatt, D.R. 2005. The effect of Virkon®S fogging on survival of *Salmonella enterica* and *Staphylococcus aureus* on surfaces in a veterinary teaching hospital. *Veterinary Microbiology*, 105(3–4): 281–289.
- Eaton, T. y Gasson, M. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(4): 1628–1635.
- EFSA. European Food Safety Authority. 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3): 2597 [442 pp.].
- Eifert, J.D. y Sanglay, G.C. 2002. Chemistry of chlorine sanitizers in food processing. Dairy, Food and Environmental Sanitation. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*, 22(7): 534–538
- Ekman, E., Brojeson, H. y Johansson, N. 1999. *Flavobacterium psychrophilum* in Baltic salmon *Salmo salar* brood fish and their offspring. *Diseases of Aquatic Organisms*, 37: 159–163.
- Elkins, J., Hassett, D., Stewart, P., Schweizer H. y McDermott, T. 1999. Protective role of catalase in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm resistance to hydrogen peroxide. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 4594–4600.
- FAO y WHO. 2002. Global forum of food safety regulators. Marrakech, Morocco: World Health Organization.
- FAO. 2012. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2012. Departamento de Pesca

y Acuicultura de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

FDA (Food and Drug Administration). 2010. Triclosan: What Consumers Should Know. FDA, Consumer Health Information, Washington DC, U.S.
<http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM206222.pdf>

Felix, C.W. 1991. Sanitizers fail to kill bacteria in biofilms. *Food Prot Rep*, 7(5): 6.

Fletcher, M. 1985. Effect of solid surfaces on the activity of attached bacteria. En: Savage, D.C.& Fletcher, M. (Eds.), *Bacterial adhesion*. Plenum Press, pg. 339–61.

Flint, S.H., Brooks, J.D. y Bremer, P.J. 2000. Properties of the stainless steel substrate, influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *Journal of Food Engineering*, 43(4): 235–242.

Fong, J., Karplus, K., Schoolnik, G. y Yildiz, F. 2006. Identification and characterization of Rbma, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 188(3): 1049–1059.

Fraiese, A.P. 1999. Choosing disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 43: 255–264.

Fraiese, A.P. 2008. European norms for disinfection testing. *Journal of Hospital Infection*, 70(1): 8–10.

Frank, J. y Koffi, R. 1990. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* in associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53(7): 550–554.

Fu, E., McCue K., y Boesenberg, D. 2007. Chemical Disinfection of Hard Surfaces–Household, Industrial and Institutional Settings. En: Johansson, I. y Somasundaran P. (Eds.), *Handbook for cleaning/decontamination of surfaces*, pg. 573–592.

Fuster-Valls, N. 2006. Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. PhD Thesis. Universitat Autònoma de Barcelona, 182 pg.

- Fuster-Valls, N., Hernández, M., Marín de Mateo, M. y Rodríguez, J. 2008. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*, 9(3): 308–314.
- García-López, M; Santos, J. y Otero, A. 2004. *Flavobacterium*. Encyclopedia of Food Microbiology, pg. 820–826.
- Garrett, T., Bhakoo, M. y Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9, 10): 1049–1056.
- Gerald, M.S. y Gilbert, F.S. 1998. Hydrogen peroxide disinfection of minimally processed fruit and vegetables. *Food Technology*, 52(2): 48–52.
- Ghazani, M., Dolgharisharaf, J., Khajeh, M. y Najafian, K. 2008: Biofilm formation of *Escherichia coli* O₁₁₁ on plastic surfaces. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10: 1282–1284.
- Gilbert, P., Evans, D., Evans, E., Duguid, I. y Brown, M. 1991. Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Applied Bacteriology*, 71(1): 72–77.
- Gilbert, P. y Moore, L. 2005. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4): 703–715.
- Giraffa, G. 2004. *Enterococcus*. Encyclopedia of Food Microbiology. Volume III, 617–624.
- Golubovich, V. y Rabortnova I. 1974. Kinetics of growth inhibition by silver ions. *Microbiology*, 43: 948–950.
- Gomes, B., Ferraz, C., Vianna, M., Berber, V., Teixeira, F. y Souza-Filho, F. 2001. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*, 34(6): 424–428.
- Gottenbos, B., van der Mei, H.C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P. y Busscher, H.J. 2001. In vitro and in vivo antimicrobial activity of covalently coupled quaternary

ammoniumsilane coatings on silicone rubber. *Biomaterials*, 23: 1417–1423.

Gough, N.L. y Dodd, C. 1998. The survival and disinfection of *Salmonella typhimurium* on chopping board surfaces of wood and plastic. *Food Control*, 9: 363–368.

Guerra, N., Araujo, A., Barrera, A., Agrasar, A., Macías, C., Carballo, J. y Pastrana, L. 2005. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to surfaces commonly used in the food industry. *Journal of Food Protection*, 68(5): 1012–1019.

Halek, G.W. y Garg, A. 1989. Fungal inhibition by a fungicide coupled to an ionomeric film. *Journal of Food Safety*, 9: 215–222.

Hall–Stoodley, L. y Stoodley, P. 2005. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends in Microbiology*, 13(1): 7–10.

Hallmans, G. y Elmros, T. 1980. Zinc tape treatment of burns infected by *Pseudomonas aeruginosa*. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 14: 221–227.

Han, J. 2005. Antimicrobial packaging systems. *Innovations in Food Packaging*, pg. 80–107.

Harvell, C., Kim, K., Burkholder, J., Colwell, R., Epstein, P., Grimes, D., Hofmann, E., Lipp, E., Osterhaus, A., Overstreet, R., Porter, J., Smith, G. y Vasta, G. 1999. Review: Marine ecology –Emerging marine diseases– Climate links and anthropogenic factors. *Science*, 285: 1505–1510.

Hashimoto, H. 2001. Evaluation of the anti–biofilm effect of a new antibacterial silver citrate/lecithin coating in an in–vitro experimental system using a modified Robbins device. *Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, 75: 678–685.

Heinzel, M. 1998. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 225–234.

Helander, I., von Wright, A. y Mattila–Sandholm, T. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram–negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5): 146–150.

- Herald, P. y Zottola, E. 1988a. Scanning electron microscopic examination of *Yersinia enterocolitica* attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. *Journal of Food Protection*, 51: 445–448.
- Herald, P. y Zottola, E. 1988b. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Protection*, 53: 1549–1562.
- Holah, J. 1995a. Progress report on CEN/TC 216/Working Group 3: Disinfectant test methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 36: 355–365.
- Holah, J. 1995b. Special needs for disinfectants in food–handling establishments. *Revue scientifique et technique*, 14(1): 95–104.
- Holah, J., Lavaud, A., Peters, W. y Dye, K.A. 1998. Future techniques for disinfectant efficacy testing. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41: 273–279.
- Holah, J. 2003. CEN/TC 216: its role in producing current and future European disinfectant testing standards. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4): 239–243.
- Holt, R.A. 1988. *Cytophaga psychrophila*, the causative agent of bacterial cold–water disease in salmonid fish. PhD Thesis, Oregon State University, Corvallis. USA.
- Holt, R.A., Amandi, A., Rohovec, J.S. y Fryer, J.L. 1989. Relation of water temperature to bacterial cold–water disease in Coho salmon, Chinook salmon and Rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health*, 1: 94–101.
- Holt, R.A., Rohovec, J.S. y Fryer, J.L. 1993. Bacterial cold–water disease. In: *Bacterial Diseases of Fish* (Ed. by V. Inglis, R.J. Roberts & N.R. Bromage), pg. 3–23.
- Humm, B.J. 1992. A research update on the effects of cleaners and sanitizers on food processing biofilms. *Journal of Food Protection Report*, 8: 5–6.
- Humphrey, T., Martin, K.W. y Whitehead, A. 1994. Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes.

Epidemiology and Infection, 113: 403–409.

Hunsinger, B., Abele, A. y Böhm, R. 2005. Effects of the drying conditions on different Gram negative bacteria on stainless steel discs used in the “quantitative surface test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants” (EN 14349). ISAH 2005 – Warsaw, Poland, Vol. 2: 217–220.

Huq, A., Whitehouse, C., Grim, C., Alam, M. y Colwell, R. 2008. Biofilms in water, its role and impact in human disease transmission. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(3): 244–247.

Hurst, A. 1981. Nisin. *Advances in Applied Microbiology*, 27: 85–123.

Hyde, J., Darouiche, R. y Costerton, J. 1998. Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. *The Journal of Heart Valve Disease*, 7: 316–326.

Hyde, A., Parisot, J., McNichol, A. y Bonev, B. 2006. Nisin-induced changes in *Bacillus* morphology suggest a paradigm of antibiotic action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS), 103(52): 19896–19901.

Hyginov, C. 2001. Guía para la elaboración de un plan de limpieza y desinfección. De aplicación en empresas del sector alimentario. Edit. Acibia, S. A. España. 54 pg.

Jessen, B. y Lammert, L. 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4): 265–269.

Jones, M., Herd, T. y Christie, H. 1989. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbios*, 58(234): 49–61.

Jones, K. y Bradshaw, S.B. 1996. Biofilm formation by the enterobacteriaceae: a comparison between *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 458–464.

Jones, C., Adams, M., Zhdan, P. y Chamberlain, A. 1999. The role of surface physicochemical properties in determining the distribution of the autochthonous microflora in mineral water bottles. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6): 917–927.

- Jones, R., Jampani, H., Newman, J. y Lee, A. 2000. Triclosan: a review of effectiveness and safety in health care settings. *American Journal of Infection Control*, 28(2): 184–196.
- Jullien, C., Benezech, T., Carpentier, B., Lebret, V. y Faille, C. 2002. Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56(1): 77–87.
- Kahrs, R.F. 1995. General disinfection guidelines. *International Office of Epizootics*, 14: 105–122.
- Kampf, G. y Kramer, A. 2004. Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs. *Clinical Microbiology Reviews*, 17: 863–893.
- Kandelbauer, A. y Widsten, P. 2009. Antibacterial melamine resin surfaces for wood-based furniture and flooring. *Progress in Organic Coatings*, 65(3): 305–313.
- Kandile, N., Zaky, H., Mohamed, M. y Mohamed, H. 2010. Silver Nanoparticles Effect on Antimicrobial and Antifungal Activity of New Heterocycles. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31(12): 3530–3538.
- Kemper, R.A. y White, W. 1991. Sustained Reduction of Aerobiological Densities in Buildings by Modification of Interior Surfaces with Silane Modified Quaternary Amines. En: “Indoor Air Pollution, Radon, Bioaerosols and VOCs”. Lewis Publishers, Ghelsea.
- Kierek, K. y Watnick, P. 2003. Environmental Determinants of *Vibrio cholerae* Biofilm Development. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9): 5079–5088.
- King, R., Flick, G., Smith, S., Pierson, M., Boardman, G. y Coale, Ch. 2008. Response of Bacterial Biofilms in Recirculating Aquaculture Systems to Various Sanitizers. *Journal of Applied Aquaculture*, 20(2): 79–92.
- Klueh, U., Wagner, V., Kelly, S., Johnson, A. y Bryers, J.D. 2000. Efficacy of silvercoated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53: 621–631.

- Kumar, C.G. y Singh, R. 1994. *Yersinia enterocolitica*, as an emerging foodborne pathogen – a review. *Indian Journal of Dairy Science*, 47: 537–544.
- Kumar, C.G. y Anand, S. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2): 9–27.
- Kusumaningrum, H., Riboldi, G., Hazeleger, W. y Beumer, R. 2003. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*, 85: 227–236.
- Kümmerer, K., Al-Ahmad, A. y Henninger, A. 2002. Use of Chemotaxonomy To Study the Influence of Benzalkonium Chloride on Bacterial Populations in Biodegradation Testing. *Acta hydrochimica et hydrobiologica*, 30(4): 171–178.
- Ladd, T.L. y Costerton, J. 1990. 9 Methods for studying biofilm bacteria. *Methods in Microbiology*, 22: 285–307.
- Langsrud, S., Sidhu, M., Heir, E. y Holck, A. 2003a. Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4): 283–290.
- Langsrud, S., Sundheim, G. y Borgmann–Strahsen, R. 2003b. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *Journal of Applied Microbiology*, 95: 874–882.
- Leclercq, R. 1997. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clinical Infectious Disease*, Suppl. 1: S80–S84.
- Lentsch, S. 1979. Sanitizers for an effective cleaning program. In Sanitation notebook for the seafood industry, ed. G.J. Flick, *et al.*, 77. Blacksburg: Department of Food Science and Technology, Virginia Polytechnic Institute & State University.
- Leveau, J. y Bouix, M. 2002. Manual técnico de higiene, limpieza y desinfección. Edit. Mundi–Prensa Libros S. A. 623 pg.
- Lindsay, D., Brozel, V.S. y von Holy, A. 2005. Spore formation in *Bacillus subtilis* biofilms. *Journal of Food Protection*, 68(4): 860–865.

- Lloyd, B. 1930. Bacteria of the Clyde Sea area: a quantitative investigation. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 16: 879–907.
- Lok, C.N., Ho, C.M., Chen, R., He, Q.Y., Yu, W.Y., Sun, H.Z., Tam, P.K., Chiu, J.F. y Che, C.M. 2006. Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4): 916–924.
- Lorenzen, E. 1994. Studies on *Flexibacter psychrophilus* in relation to rainbow trout fry syndrome (RTFS). PhD Thesis, Royal Veterinary and Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Luppens, S., Rombouts, F. y Abee, T. 2002a. The Effect of the Growth Phase of *Staphylococcus aureus* on resistance to disinfectants in a suspension test. *Journal of Food Protection*, 65(1): 124–129.
- Luppens, S., Reij, M., Van der Heijden, R., Rombouts, F. y Abee, T. 2002b. Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9): 4194–4200.
- Lück, E. y Jager, M. 1997. Antimicrobial Food Additives: Characteristics, Uses, Effects. 260 pg.
- Madetoja, J., Nyman, P. y Wiklund, T. 2000. *Flavobacterium psychrophilum*, invasion into and shedding by rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 43: 27–38.
- Madetoja J., Hanninen M.L., Hirvela–Koski V., Dalsgaard I. y Wiklund, T. 2001. Phenotypic and genotypic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* from Finnish fish farms. *Journal of Fish Diseases*, 24: 469–479.
- Madetoja, J., Dalsgaard, I. y Wiklund, T. 2002. Occurrence of *Flavobacterium psychrophilum* in fish–farming environment. *Diseases of Aquatic Organisms*, 52: 109–118.
- Madetoja, J., Nystedt, S. y Wiklund, T. 2003. Survival and virulence of *Flavobacterium psychrophilum* in water microcosms. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(2): 217–223.

Mafu, A.A, Roy, D., Goulet, J. y Hagny, P. 1990. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53: 742–746.

Mafu, A.A., Plumety, C., Deschênes, L. y Goulet, J. 2011. Adhesion of Pathogenic Bacteria to Food Contact Surfaces: Influence of pH of Culture. *International Journal of Microbiology*, ID 972494, 10 pg.

Maillard, J.Y. 2001. Virus susceptibility to biocides: an understanding. *Reviews in Medical Microbiology*, 12(2): 63–74.

Makdesi, A. 2010. Drain Sanitation Delivers Peace of Mind, Using alternative cleaning methods can eliminate biofilms. *Food Quality*, 17(3): 39–42.

Mandell, G.L. 1975. Catalase, Superoxide Dismutase, and Virulence of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Clinical Investigation*, 55: 561–566.

Mangalappalli-Illathu, A., Vidovic, S. y Korber, D. 2008. Differential adaptive response and survival of *Salmonella enterica* serovar enteritidis planktonic and biofilm cells exposed to benzalkonium chloride. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10): 3669–3680.

Maraldo, K. y Dahllöf, I. 2004. Indirect estimation of degradation time for zinc pyrithione and copper pyrithione in seawater. *Marine Pollution Bulletin*, 48(9–10): 894–901.

Maris, P. 1998. Regulatory procedures for disinfectants in Europe. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41: 297–301.

Marshall, K. 1992. Biofilms: An overview of bacterial adhesion, activity, and control at surfaces. *American Society for Microbiology News*, 8: 202–207.

Mattila, T., Manninen, A. y Kylasiurola, A.L. 1990. Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. *Journal of Dairy Research*, 57: 33–39.

Mattila-Sandholm, T. y Wirtanen, G. 1992. Biofilm formation in industry: a review.

Food Reviews International, 8(4): 573–603.

Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila–Sandholm T. y Saarela, M. 2003. Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30: 327–356.

McDonnell, G. y Russell, A. 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 147–179.

McEldowney, S. y Fletcher, M. 1988. The effect of temperature and relative humidity on the survival of bacteria attached to dry solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, 7: 83–86.

McGuire J. y Swartzel, K.R. 1989. The influence of solid surface energetics on macromolecular adsorption from milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13(2): 145–160.

McLeod, R., Muench, S., Rafferty, J., Kyle, D., Mui, E., Kirisits, M., Mack, D., Roberts, C., Samuel, B., Lyons, R., Dorris, M., Milhous, W. y Rice, D. 2001. Triclosan inhibits the growth of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* by inhibition of Apicomplexan Fab I. *International Journal for Parasitology*, 31(2): 109–113.

Mead, P., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L., Bresee, J., Shapiro, C., Griffin, P. y Tauxe, R. 1999. Food–related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases*, 5: 607–625.

Meyer, B. 2000. Effective disinfectant procedures to prevent the selection of resistant microbes. *Pharmaceutical Technology Europe*, 12(11): 44–50.

Meyer, B. 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4): 249–253.

Meyer, B. 2006. Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *International Journal of Food Microbiology*, 112: 275–279.

Meylheuc, T., Renault, M. y Bellon–Fontaine, M.N. 2006. Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 109: 71–78.

Ming, X.T., Weber, G.H., Ayres, J.W. y Sandine, W.E. 1997. Bacteriocins applied to food packaging materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats. *Journal of Food Science*, 62: 413–415.

Mittelman, M. 1998. Symposium: Biofilms: Development and control structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81(10): 2760–2764.

Morgan, A., Thompson, K., Auchinachie, N. y Adams, A. 2007. Mucus and its importance to *Flavobacterium psychrophilum* infection. EAFP Conference, Grado, Italy.

Morrison, D. 2002. The *Enterococci*. *Molecular Medical Microbiology*, 921–936 pg.

Mosteller, T., y Bishop, J. 1993. Sanitizer efficacy against attached bacteria in a milk biofilm. *Journal of food protection*, 56: 34–41.

Møretrø, T., Hermansen, L., Holck, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K. y Langsrud, S. 2003. Biofilm Formation and the Presence of the Intercellular Adhesion Locus *ica* among Staphylococci from Food and Food Processing Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 5648–5655.

Møretrø, T. & Langsrud, S. 2011. Effects of Materials Containing Antimicrobial Compounds on Food Hygiene. *Journal of Food Protection*, 74(7): 1200–1211.

Naylor, R.L., Hardy, R.W, Bureau, D.P, Chiu, A., Elliott, M., Farrell, A.P., Forster, I., Gatlin, D.M., Goldberg, R.J., Hua, K. y Nichols, P.D. 2009. Feeding aquaculture in an era of finite resources. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(36): 15103–15110.

Nematollahi, A., Decostere, A., Pasmans, F. y Haesebrouck, F. 2003. *Flavobacterium psychrophilum* infections in salmonid fish. *Journal of Fish Diseases*, 26(10): 563–574.

Norwood, D. y Gilmour, A. 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady–state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3): 512–520.

Notermans, S., Dormans, J. y Mead, G. 1991. Contribution of surface attachment to

the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. *Biofouling*, 5: 21–36.

Oh, D. y Marshall, D. 1995. Influence of packaging method, lactic acid and monolaurin on *Listeria monocytogenes* in crawfish tail meat homogenate. *Food Microbiology*, 12: 159–163.

Oie, S., Huang, Y., Kamiya, A., Konishi, H. y Nakazawa, T. 1996. Efficacy of disinfectants against biofilm cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, 85: 223–230.

OJEU (Official Journal of the European Union). 2010. DECISIÓN DE LA COMISIÓN de 19 de marzo de 2010 relativa a la no inclusión del 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifenil éter en la lista de la Unión de los aditivos que pueden utilizarse en la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios con arreglo a la Directiva 2002/72/CE. 1613. 23.3.10, L75/25.

Olsen, J., MacKinon, L., Goulding, J., Bean, N. y Slutsker, L. 2000. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks – United States, 1993–1997. *Centers for Disease Control and Prevention*, 49: 51–55.

Ostland, V.E., McGrogan, D.C. y Ferguson, H.W. 1997. Cephalic osteochondritis and necrotic scleritis in intensively reared salmonids associated with *Flexibacter psychrophilus*. *Journal of Fish Diseases*, 20: 443–450.

Palmer, J., Flint, S. y Brooks, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*, 34: 577–588.

Park, A., Daeschel, M.A. y Zhao, Y. 2004. Functional properties of antimicrobial lysozyme–chitosan composite films. *Journal of Food Safety*, 69: 215–221.

Pearce, D. y Sherman, F. 1999. Toxicity of copper, cobalt, and nickel salts is dependent on histidine metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 181(16): 4774–4779.

Pedahzur, R., Lev, O., Fattal, B. y Shuval, H. I. 1995. The interaction of silver ions

and hydrogen peroxide in the inactivation of *E. coli*: A preliminary evaluation of a new long acting residual drinking water disinfectant. *Water Science and Technology*, 31(5–6): 123–129.

Percival, S. y Walker, J. 1999. Potable Water and Biofilms: a Review of the Public Health Implications. *Biofouling*, 14(2): 99–115.

Perencevich, E., Wong, M. y Harris, A. 2001. National and regional assessment of the antibacterial soap market: A step toward determining the impact of prevalent antibacterial soaps. *American Journal of Infection Control*, 29(5): 281–283.

Peters, J. y Spicher, G. 1998. Model tests for efficacy of disinfectants on surface. IV communication: dependence of test results on the amount of contamination and the kind of active substance. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 201: 311–323.

Petica, A., Gavrilu, S., Lungu, M., Buruntea, N. y Panzaru, C. 2008. Colloidal silver solutions with antimicrobial properties. *Materials Science and Engineering: B*, 152(1–3): 22–27.

Porter, K. y Feig, Y. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography*, 25(5): 943–948.

Poulsen, L. 1999. Microbial Biofilm in Food Processing. *Lebensmittel–Wissenschaft und–Technologie*, 32(6): 321–326.

Pringle, J.H. y Fletcher, M. 1983. Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 45: 811–7.

Qian, P.Y., Lau, S.C., Dahms, H.U., Dobretsov, S. y Harder, T. 2007. Marine biofilms as mediators of colonization by marine macroorganisms: implications for antifouling and aquaculture. *Marine Biotechnology*, 9(4): 399–410.

Rangdale, R.E. 1995. Studies on Rainbow Trout Fry Syndrome (RTFS). PhD Thesis, University of Stirling, Scotland, UK.

Ray, B. 1992. Nisin of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as a food biopreservative. En: Ray, B., Daeschel, M. (Eds.), *Food Biopreservatives of Microbial Origin*. CRC Press. USA, pg.

207–264.

Redmond, E.C. y Griffith, C.J. 2003. Consumer food handling in the home: a review of food safety studies. *Journal of Food Protection*, 66: 130–161.

Regös, J. y Hitz, H. 1974. Investigations on the mode of action of triclosan, a broad spectrum antimicrobial agent. *Zentralbl Bakteriol (Orig A)*, 226: 390–401.

Reij, M. y Den Aantrekker, E. 2004. Recontamination as a Source of Pathogens in Processed Foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1): 1–11.

Reybrouck, G. 1998. The testing of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3–4): 269–272.

RNVE (Red Nacional de vigilancia epidemiológica), 2003. Brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos, 1994–2003. Centro nacional de Epidemiología, España. <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-brotes/Informedebrotesalimentarios.pdf>

Robine, E., Boulangé–Petermann, L. y Derangère, D. 2002. Assessing bactericidal properties of materials: the case of metallic surfaces in contact with air. *Journal of Microbiological Methods*, 49: 225–234.

Rocourt, J., Moy, G., Vierk, K. y Schlundt, J. 2003. The present state of foodborne disease in OECD countries. Geneva: World Health Organization (WHO).

Rogers, J., Dowsett, A., Dennis, P., Lee, J. y Keevil, C. 1994. Influence of Plumbing Materials on Biofilm Formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(6): 1842–1851.

Rusin, P., Orosz–Coughlin, P. y Gerba, C. 1998. Reduction of faecal coliform, coliform and heterotrophic plate count bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaners. *Journal of Applied Microbiology*, 85(5): 819–28.

Russell, A. y Russell, N. 1995. Biocides: activity, action and resistance. 53rd Symposium of the Society for General Microbiology, 53: 327–365.

- Russell, A. 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*, 43: S57–S68.
- Russell, A. 2003. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5): 750–763.
- Russell, A. 2004. Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of Hospital Infection*, 57(2): 97–104.
- Salvat, G. y Colin, P. 1995. Cleaning and disinfection in the meat industries of Europe. *Revue Scientifique et Technique*, 14(2): 313–341.
- Sandrin, T., Dowd, S., Herman, D.C. y Maier, R. 2009. Chapter 6 – Aquatic Environments. *Environmental Microbiology*, Edit. Mitchell, R. y Gu, J. pg., 103–122.
- Sauer, K. 2003. The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome Biology*, 4: 219. 5 pg.
- Sawai, J., Igarashi, H., Hashimoto, A., Kokugan, T. y Shimizu, M. 1995. Evaluation of Growth Inhibitory Effect of Ceramics Powder Slurry on Bacteria by Conductance Method. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 28(3): 288–293.
- SCCS (Scientific Committee on Consumer Safety). 2010. Opinion on triclosan Antimicrobial Resistance. SCCS, Directorate General for Health & Consumers, European Commission. 1251/09, 22 Junio de 2010.
- Scharff, R. 2010. Health-related costs from foodborne illness in the United States. Produce Safety Project at Georgetown University. Washington, D. C. 1–28 pg.
- Schierholz, J.M., Lucas, L.J. Rump, A. y Pulverer, G. 1998. Efficacy of silver-coated medical devices. *Journal of Hospital Infection*, 40(4): 257–262.
- Schmidt, R.H. 1997. Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations. University of Florida, Institute of Food and Agriculture Sciences. Fact Sheet FS 14.
- Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Pedersen, K. y Larsen, J.L. 2000. Occurrence

- of antimicrobial resistance in fish–pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 4908–4915.
- Schmidtke, L.M. y Carson, J. 1995. Characteristics of *Flexibacter psychrophilus* isolated from Atlantic salmon in Australia. *Diseases of Aquatic Organisms*, 21: 157–161.
- Scott, E., Bloomfield, S.F. y Barlow, C.G. 1982. An investigation of microbial contamination in the home. *Journal of Hygiene*, 89(2): 279–293.
- Scott, E., Bloomfield, S. y Barlow, C.G. 1984. Evaluation of disinfectants in the domestic environment under “in use” conditions. *Journal of Hygiene*, 92: 193–203.
- Scott, E. 1996. Foodborne disease and other hygiene issues in the home. *Journal of Applied Bacteriology*, 80: 5–9.
- Setel, P. y Hemed, Y. 2000. Cause–Specific Adult Mortality: Evidence from Community–Based Surveillance–Selected Sites, Tanzania, 1992–1998. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49(19): 416–419.
- Sharma, M. y Anand, S. 2002. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control*, 13(6–7): 469–477.
- Shea, C., Nunley, J., Williamson, J. y Smith–Sommerville, H. 1991. Comparison of the adhesion properties of *Deleya marina* and the exopolysaccharide–defective mutant strain DMR. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3107–3113.
- Shi, X. y Zhu, X. 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9): 407–413.
- Sidhu, M., Sørum, H. y Holck, A. 2002. Resistance to Quaternary Ammonium Compounds in Food–Related Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 8(4): 393–399.
- Simões, M., Simões, L. y Vieira, M. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food Science and Technology*, 43(4): 573–583.
- Singer, H., Müller, S. y Tixier, C. y Pillonel, L. 2002. Triclosan: Occurrence and Fate of

a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environmental Science and Technology*, 36(23): 4998–5004.

Singh, N.J., Shin, D., Lee, H.M., Kim, H.T., Chang, H.J., Cho, J.M., Kim, K.S. y Ro, S. 2011. Structural basis of triclosan resistance. *Journal of Structural Biology*, 174(1): 173–179.

Södeberg, T., Sunze, B., Holm, S., Elmro, T., Hallmans, G. y Sjöberg, S. 1990. Antibacterial effect of zinc oxide in vitro. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, 24(3): 193–197.

Speier, J.L. Malek, J.R. 1982. Destruction of microorganisms by contact with solid surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 89(1): 68–76.

Splendiani, A., Livingston, A.G. y Nicoletta, C. 2006. Control membrane–attached biofilms using surfactants. *Biotechnology and Bioengineering*, 94: 15–23.

Srey, S., Jahid, I.K. y Ha, Sang–Do. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2): 572–585.

Stanley, P.M. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Canadian Journal of Microbiology*, 29: 1493–1499.

Staroscik, A. y Hunnicutt, D. 2007. The influence of culture conditions on biofilm formation in *Flavobacterium columnare*. *Flavobacterium 2007*, Workshop. National Conservation Training Center. West Virgin. USA.

Stepanovic, S., Cirkovic, I. Mijac, V. y Svabic–Vlahovic, M. 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20: 339–343.

Stern, N.J. y Kazmi, S.U. 1989. *Campylobacter jejuni*. In: Doyle M.P. Ed. Foodborne Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, New York. USA. pg., 71–110.

Stewart, P.S., Rayner, J., Roe, F. y Rees, W.M. 2001. Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J. Appl. Microbiol.*

91(3): 525–32.

Suller, M. y Russell, A.D. 2000. Triclosan and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 11–18.

Sun, J., Qiu, X., Meng, W. y Qing, F. 2006. Design and synthesis of novel perfluoroalkyl-containing zinc pyrithione biocide. *Tetrahedron*, 2(37): 8702–8706.

Sundell, K. y Wiklund, T. 2007. Effect of biofilm formation on antimicrobial resistance of *Flavobacterium psychrophilum*. *Flavobacterium 2007 Workshop*, National Conservation Training Center. West Virgin. USA.

Sutherland, I. 1982. Microbial Exopolysaccharides – their Role in Microbial Adhesion in Aqueous Systems. *Critical Reviews in Microbiology*, 10(2): 173–201.

Suzuki, T., Fujikura, K., Higashiyama, T. y Takata, K. 1997. DNA Staining for Fluorescence and Laser Confocal Microscopy. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(1): 49–53.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. y Wannaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40: 722–756.

Takeuchi, K. y Frank, J.F. 2001. Confocal microscopy and microbial viability detection for food research. *Journal of Food Protection*, 64(12): 2088–2102.

Taylor, J.H., Rogers, S. y Holah, J.T. 1999. A comparison of the bactericidal efficacy of 18 disinfectants used in the food industry against *Escherichia coli* O157:H7 and *Pseudomonas aeruginosa* at 10 and 20°C. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 718–25.

Thomas, J. y Nakaishi, L. 2006. Managing the complexity of a dynamic biofilm. *Journal of the American Dental Association*, 137: 10S–15S.

Thouvenin, M., Langlois, V., Briandet, R., Langlois, J.Y. Guerin, P.H., Peron, J.J., Haras, D. y Vallee-Rehel, K. 2003. Study of erodable paint properties involved in antifouling activity. *Biofouling*, 19: 177–186.

Tofant, A., Vu emilo, M., Pavi i , Ž. y Mili , D. 2006. The hydrogen peroxide, as a

potentially useful slurry disinfectant. *Livestock Science*, 102(3): 243–247.

Tong, G., Yulong, M., Peng, G. y Zirong, X. 2005. Antibacterial effects of the Cu(II)–exchanged montmorillonite on *Escherichia coli* K88 and *Salmonella choleraesuis*. *Veterinary Microbiology*, 105(2): 113–122.

Troller, J. 1993. Sanitation in food processing. Edit. Academic Press Inc. San Diego. 478 pg.

Tsai, S., Zervos, M., Clewell, D., Donabedian, S., Sahm, D. y Chow J. 1998. New–level gentamicin resistance gene, aph(2⁺)–Id, in *Enterococcus* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 1229–1232.

Tsibouklis, J., Stone, M., Thorpe, A.A., Graham, P., Nevell, T.G. y Ewen, R.J. 2000. Inhibiting bacterial adhesion onto surfaces: the non–stick coating approach. *International Journal of Adhesion*, 20: 91–96.

Van de Weyer, A., Devleeschouwer, M. y Dony, J. 1993. Bactericidal activity of disinfectants on listeria. *Journal of Applied Microbiology*, 74(4): 480–483.

Van Klingerén, B., Koller, W., Bloomfield, S., Bohm, R., Cremieux, A., Holah, J., Reybrouck, G. y Rodger, H. 1998. Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 41(3–4): 289–296.

Van Klingerén, B. 2007. A brief history of European harmonization of disinfectant testing – a Dutch view. *GMS Krankenhhyg Interdiszip*, 2(1): 1–6.

Vanhaecke, E., Remon, J., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D. y Van Peteghem, A. 1990. Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316–L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3): 788–795.

Vanhooren, P., De Baets, S., Bruggeman, G. y Vandamme, E. 1999. *Klebsiella*. *Encyclopedia of Food Microbiology*, pg. 1107–1115.

Vatsos, I., Thompson, K. y Adams, A. 2001. Adhesion of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* to unfertilized eggs of rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss) and n-hexadecane. *Letters in Applied Microbiology*, 33: 178–182.

Vatsos, I., Thompson, K. y Adams, A. 2003. Starvation of *Flavobacterium psychrophilum* in broth, stream water and distilled water. *Diseases of Aquatic Organisms*, 56: 115–126.

Vermeiren, L., Devlieghere, F. y Debevere, G. 2002. Effectiveness of some recent antimicrobial packaging concepts. *Food Additives and Contaminants*, 19: 163–171.

von der Ohe, P.C., Schmitt-Jansen, M., Slobodnik, J. y Brack, W. 2011. Triclosan—the forgotten priority substance? *Environmental Science and Pollution Research*, 19: 585–91.

Wakabayashi, H., Horiuchi, M., Bunya, Y. y Hoshiai, G. 1991. Outbreaks in coldwater disease in coho salmon in Japan. *Fish Pathology*, 26: 211–212.

Watnick, P. y Kolter, R. 2000. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*, 182(10): 2675–2679.

Watson, S.P., Clements, M.O. y Foster, S.J. 1998. Characterization of the Starvation–Survival Response of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 180(7): 1750–1758.

Weng, Y.M. y Hotchkiss, J.H. 1992. Inhibition of surface molds on cheese by polyethylene film containing the antimycotic im– azalil. *Journal of Food Protection*, 55: 367–369.

Whitekettle, W.K. 1991. Effects of surface–active chemicals on microbial adhesion. *Journal of Industrial Microbiology*, 7(2): 105–116.

WHO, (World Health Organization). 1995. Sixth report of WHO surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe. FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses, Berlin.

WHO, (World Health Organization). 2003. Eighth report 1999–2000 of WHO Surveillance Programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe.

http://www.bfr.bund.de/internet/8threport/CRs/uk_ew.pdf

WHO, 2006. Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Informe conjunto FAO/OIE/WHO. Republica de Corea, 13–16 Junio del 2006, pg. 107.
ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture_rep_13_16june2006.pdf

WHO, 2007. General information related to foodborne disease.
http://www.who.int/foodsafety/foodborne_disease/general/en/index.html

Wiklund T., Kaas K., Lönnström L. y Dalsgaard, I. 1994. Isolation of *Cytophaga psychrophila* (*Flexibacter psychrophilus*) from wild and farm rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Finland. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 14: 44–46.

Wiklund T., Madsen L., Bruun M.S. y Dalsgaard, I. 2000. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 299–307.

Wildbrett, G. 2000. Limpieza y desinfección en la industria alimentaria. Edit. Acribia. S.A. Zaragoza, España. 349 pg.

Wilks, S., Michels, H. y Keevil, C. 2005. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 105(3): 445–454.

Wirtanen, G., Salo, S., Helander, I.M. y Mattila–Sandholm, T. 2001. Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20: 37–50.

Wirtanen, G. y Salo, S. 2003. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2: 293–306.

Yazdankhah, S., Scheie, A. Høiby, E., Lunestad, B–T. Heir, E., Fotland, T., Naterstad, K. y Kruse, H. 2006. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. *Microbial Drug Resistance*, 12: 83–90.

Yoon, K., Byeon, J., Park, J. y Hwang, J. 2007. Susceptibility constants of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* to silver and copper nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 373: 572–575.

ZoBell, C. 1943. The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *The Journal of Bacteriology*, 46(1): 39–56.

Zottola, E.A. y Sasahara, K.C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry – should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, 23(2): 125–148.

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona