



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

ESTUDIO DE RESISTENCIAS A BIOCIDAS Y ANTIBIÓTICOS EN BACTERIAS RESISTENTES AISLADAS DE FRUTAS Y VERDURAS.

Alumno/a: Salazar Peña, Estrella

Tutor/a: Ortega Morente, Elena.
Dpto: Ciencias de la Salud

Julio, 2019



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

**ESTUDIO DE RESISTENCIAS
A BIOCIDAS Y
ANTIBIÓTICOS EN
BACTERIAS RESISTENTES
AISLADAS DE FRUTAS Y
VERDURAS.**

Alumno/a: Salazar Peña, Estrella

Julio, 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. Frutas y hortalizas.....	4
2.1.1. <i>Patógenos asociados a frutas y hortalizas y su impacto en la salud.</i>	<i>4</i>
2.1.2. <i>Alteraciones en frutas y hortalizas.</i>	<i>5</i>
2.2. Calidad y seguridad alimentaria.	6
2.2.1. <i>Inocuidad de los alimentos.</i>	<i>8</i>
2.3. Contaminación en frutas y verduras.	8
2.4. Antibióticos.....	10
2.4.1. <i>Grupos de antibióticos.....</i>	<i>11</i>
2.4.2. <i>Mecanismos de resistencia.....</i>	<i>14</i>
2.4.3. <i>Efectos sobre la salud.</i>	<i>15</i>
2.5. Biocidas.....	16
2.5.1. <i>Clasificación de los biocidas.....</i>	<i>16</i>
2.5.2. <i>Mecanismo de acción de los biocidas:</i>	<i>18</i>
2.5.3. <i>Resistencia a biocidas.....</i>	<i>19</i>
2.5.4. <i>Biocidas en la industria alimentaria.....</i>	<i>21</i>
2.5.5. <i>Efectos de los biocidas sobre la salud.</i>	<i>21</i>
2.5.6. <i>Biocidas de interés.</i>	<i>22</i>
2.6. Resistencias cruzadas.....	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
4.1. Alimentos utilizados.....	25
4.2. Medios utilizados y su preparación	25
4.2.1. <i>Descripción de los medios empleados.</i>	<i>26</i>
4.2.2. <i>Preparación de los medios sólidos y líquidos.</i>	<i>28</i>
4.2.3. <i>Preparación de la solución salina.....</i>	<i>30</i>
4.3. Procesado de los alimentos	31
4.4. Preparación de los antibiogramas.	33
4.4.1. <i>Preparación de las cepas.....</i>	<i>33</i>
4.4.2. <i>Siembra en medio Müller-Hinton con discos de antibióticos.</i>	<i>34</i>
4.5. Preparación de las placas de microtitulación.....	35
4.5.1. <i>Preparación de los biocidas y las disoluciones.....</i>	<i>35</i>
4.5.3. <i>Lectura de los resultados.</i>	<i>37</i>

5. RESULTADOS.	37
5.1. Cepas resistentes aisladas de los alimentos.	37
5.2. Susceptibilidad a los diferentes antibióticos utilizados.	38
5.3. TOLERANCIA FRENTE A BIOCIDAS.	49
6. DISCUSIÓN.	63
7. CONCLUSIONES.	65
8. REFERENCIAS.	66

1. RESUMEN

Los alimentos vegetales son considerados un importante vehículo de transmisión de enfermedades, debido a su contaminación por diversos microorganismos y a su consumo en crudo. Por este motivo es de gran importancia la realización de controles microbiológicos que garanticen la inocuidad del producto. Es común el uso de determinados productos antimicrobianos para lograr dicha inocuidad, pero su uso está muy restringido en la cadena alimentaria, sin olvidar que la resistencia de los microorganismos a los distintos antimicrobianos ha aumentado en los últimos años. En este proyecto se han utilizado alimentos vegetales a partir de los cuales se han aislado diversas cepas resistentes a antimicrobianos. Estas cepas han sido sometidas a pruebas de resistencia a 10 antibióticos y a 7 biocidas. En base a los resultados obtenidos, podemos decir que las cepas aisladas presentan una elevada resistencia a antibióticos, si bien la tolerancia frente a los biocidas no es tan marcada.

Palabras clave: vegetales, control microbiológico, inocuidad, resistencia, antimicrobianos.

ABSTRACT

Vegetables and fruits are an important vehicle in the transmission of food diseases due the diversity of microorganisms that can grow on them and to their consumption as uncooked foods. For this reason it is very important to carry out microbiological controls to render products harmless. Various antimicrobial products such as biocides, are commonly used to achieve such safety level. However, this use is very restricted in the food chain, along with the increase in the resistance of microorganisms to different antimicrobials in last years. In this project, antimicrobial resistant strains have been isolated from vegetables and fruits. These strains have been tested for resistance to 10 antibiotics and 7 different biocides. Based on the results obtained, we can state that the isolated strains are quite resistant to the antibiotics tested, while the tolerance to biocides is not so high.

Keywords: vegetables, microbiological control, harmlessness, resistance, antimicrobial agents.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1. Frutas y hortalizas.

Según el Código Alimentario Español (CAE) el término **fruta** hace referencia al fruto, la inflorescencia, la semilla o las partes carnosas de los órganos florales que presenten un grado de madurez apropiado y que además, sean aptas para el consumo humano. Son alimentos con un contenido alto de hidratos de carbono, generalmente glucosa, sacarosa y fructosa, que les aporta el dulzor. A medida que la fruta va madurando, la concentración de azúcares también aumenta. Respecto al aporte vitamínico, las frutas contienen vitaminas A, C, B1, B2 y ácido fólico y minerales como hierro, calcio, potasio, zinc, sulfatos o magnesio entre otros. Su ingesta aporta celulosa y pectinas principalmente.

Las **hortalizas** engloban cualquier planta herbácea hortícola destinada a la alimentación, tanto en crudo como en cocinado. Este término incluye productos derivados de raíces, hojas, tubérculos, bulbos, flores, frutos y tallos de numerosas plantas (García de Fernando Minguillón *et al.*, 2002). Dentro de sus características nutricionales es destacable su baja densidad calórica, su composición, principalmente hidratos de carbono, polisacáridos y en menor cantidad proteínas y grasas. Son alimentos con un contenido en agua que oscila entre un 75-95%, ricos en fibra soluble e insoluble. Proporcionan gran variedad de vitaminas, como vitaminas del grupo B, Vitamina A, Vitamina C o ácido fólico, además de minerales como el calcio, potasio, magnesio, hierro, yodo, cobre, cinc, etc. Durante el procesado de estos alimentos el contenido de vitaminas varía, perdiéndose las vitaminas hidrosolubles en procesos de cocción.

2.1.1. *Patógenos asociados a frutas y hortalizas y su impacto en la salud.*

La contaminación de las frutas y hortalizas por bacterias patógenas para el ser humano se produce por diversos factores. Debido a que estos productos son ingeridos en crudo, sin un tratamiento previo, se consideran un vehículo bastante común para un gran número de bacterias, hongos y virus, que ocasionan enfermedades transmitidas por los alimentos. La U.S. Food and Drug Administration (FDA) considera que la seguridad de las frutas y verduras son una prioridad y por ello ha puesto en marcha una serie de medidas para cerciorarse de que los consumidores reciben productos seguros. Los patógenos estudiados por la

FDA, en productos importados y nacionales han sido bastante limitados. Se ha detectado la presencia de *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y *Yersinia enterocolitica*. También se han encontrado virus, como el Calicivirus, el virus de la hepatitis A o el norovirus y parásitos, como *Cyclospora cayetanensis*, *Cryptosporidium parvum* y *Giardia lamblia*.

Las enfermedades transmitidas por los alimentos o ETA son el resultado de la ingesta de alimentos o bebidas contaminados por microorganismos patógenos para el ser humano. Estas enfermedades generalmente aparecen con un cuadro clínico que incluye diarreas y vómitos, aunque también puede presentar otros síntomas como cefaleas, fiebre, visión doble, choque séptico, hepatitis, etc. En la actualidad se conocen más de 250 ETA, causadas en su mayoría por bacterias, virus y parásitos. Este tipo de enfermedad supone un problema a nivel mundial, por motivos económicos, sociales y sanitarios. La frecuencia con la que aparecen estas enfermedades sirve como indicador higiénico-sanitario del estado de los alimentos (Rosas y Acosta, 2001).

La bacteria que con mayor frecuencia causa ETA corresponde al género *Salmonella*. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) junto con el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) emitió un comunicado en el que ponían de manifiesto la frecuencia con la que se detectaban brotes relacionados con este género. En Estados Unidos se detectaron 9.4 millones de casos clínicos de ETA relacionados con el género *Salmonella* entre el año 2000 y el 2008. En Cuba entre el 2004 y 2006 se dieron 472 brotes de salmonelosis.

2.1.2. Alteraciones en frutas y hortalizas.

Las alteraciones en estos alimentos pueden darse antes de la cosecha o en su recolección. Algunas de las que aparecen antes de la cosecha son producidas por hongos del género *Botrytis* que afecta a las flores de las fresas y produce podredumbre gris, *Colletotrichum* ataca la epidermis de los plátanos y provoca antracnosis y *Gloeosporium* afecta a las manzanas provocando la podredumbre de las lenticelas.

Sin embargo, la mayoría de las alteraciones aparecen en las etapas post-cosecha. Por lo general los mohos atacan invadiendo al alimento por zonas dañadas, pero hay algunos que tienen lugares específicos de acción. Por ejemplo, *Thielaviopsis*

ataca a las piñas por el pedúnculo produciendo la podredumbre negra o *Colletotrichum* ataca a los plátanos a través de la almohadilla produciendo la podredumbre de la corona del plátano.

Algunas de las alteraciones más relevantes son:

- Podredumbre gris por mohos→ La causante es la bacteria *Botrytis cinerea* y se caracteriza por la aparición de un micelio gris. En este caso el hongo es capaz de invadir la piel de la fruta.
- Podredumbre ácida→ Los agentes causantes de esta alteración son *Geotrichum candidum* y otros microorganismos. En este caso los hongos no son capaces de atravesar la piel intacta del alimento, solo puede aparecer si está dañado.
- Podredumbre blanda por *Rhizopus*→ Causada por *Rhizopus stolonifer* y se manifiesta transformando al vegetal en una masa reblandecida y pulposa.
- Podredumbre por *Phytophthora*→ Este tipo de alteraciones se da a nivel comercial y con causadas por el crecimiento de *Phytophthora* spp. Afectan a diversos alimentos y de diferentes formas.
- Antracnosis→ Aparece como consecuencia de la acción de *Colletotrichum coccodes* y otros microorganismos. Se manifiesta con la aparición de un moteado en las hojas de los frutos.
- Podredumbre azul por mohos→ Es un proceso post-cosecha que afecta mayoritariamente a peras y manzanas. El agente causante de esta podredumbre es *Penicillium expansum*. Para impedir el desarrollo de estos procesos se han utilizado dos agentes de control biológico, *Candida sake* y *Pantoea agglomerans*.

2.2. Calidad y seguridad alimentaria.

Una alimentación saludable está basada en el equilibrio entre la ingesta de alimentos y la proporción de nutrientes que contienen dichos alimentos, pero sin dejar a un lado la seguridad alimentaria (AECOSAN). Existe la Seguridad Alimentaria cuando todas las personas tienen acceso físico y económico a un alimento que sea

seguro y nutritivo que pueda satisfacer las necesidades alimentarias básicas, además de sus preferencias en cuanto a alimentación se refiere, que le permitan llevar una vida sana y activa. Esta es la definición que dio la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) en la Cumbre Mundial de la Alimentación (CMA) de 1996. En esta cumbre lo que se propuso fue la eliminación mundial del hambre y la malnutrición, garantizando la seguridad alimentaria para toda la población (FAO).

Para que exista dicha seguridad alimentaria se deben de cumplir cuatro condiciones, como que haya una oferta y disponibilidad de alimentos adecuada, que haya cierta estabilidad en la oferta sin grandes fluctuaciones ni escasez dependiendo de la estación del año en la que se encuentre, que todo el mundo tenga acceso y capacidad para adquirir los alimentos y por último, que los alimentos sean de calidad e inocuos (AECOSAN).

La realización de análisis microbiológicos tiene múltiples utilidades en la gestión de la seguridad y la calidad de los alimentos. Estas analíticas microbiológicas también son utilizadas por las empresas para diseñar productos y para verificar si los resultados de los protocolos de control de un proceso son los adecuados para lograr la seguridad alimentaria y controlar los posibles errores de los programas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) o en los de Buenas Prácticas Higiénicas (BPH) o Buenas Prácticas de Fabricación (BPF).

Los criterios microbiológicos se pueden y se deben de aplicar en cualquier momento de la cadena alimentaria y es por eso que es importante la implantación de unos límites microbiológicos. También hay otros sistemas para controlar la calidad sanitaria de un producto en sus diferentes etapas de la cadena de producción, como es la aplicación de los programas de prerrequisitos o los programas APPCC (García de Fernando Minguillón *et al.*, 2002).

Antes de realizar un análisis microbiológico es importante garantizar que esa prueba es apropiada y conveniente. Los resultados que se obtienen aportan información que puede servir para conocer la trazabilidad del alimento. Además, las pruebas microbiológicas pueden dar información sobre el grado de contaminación, las posibles alteraciones e incluso si la vida útil del producto es corta (García de Fernando

Minguillón *et al.*, 2002). Estos análisis también pueden indicar si el alimento se ha procesado en las condiciones adecuadas.

Los microorganismos que por lo general no entrañan peligro, pero pueden indicar la presencia de un patógeno, son empleados como indicadores indirectos de un peligro sanitario. Un ejemplo son las enterobacterias y los coliformes que se pueden utilizar como indicadores para detectar la posible presencia de *Salmonella*. (García de Fernando Minguillón *et al.*, 2002).

2.2.1. Inocuidad de los alimentos.

Un alimento inocuo es aquel en el que el riesgo de dañar la salud de los consumidores es nulo o bien muy bajo. Los riesgos pueden ser de naturaleza física, química o microbiológica. La inocuidad es crucial para garantizar alimentos seguros en cada etapa de la cadena alimentaria (FAO).

Actualmente se estima que enferman 600 millones de personas a consecuencia del consumo de alimentos contaminados por bacterias, virus, toxinas o productos químicos y de estas personas enfermas mueren 420. 000. Para evidenciar el impacto de la inocuidad de los alimentos en la salud y la idea de la erradicación del hambre, el 7 de junio de 2019 ha celebrado por primera vez el Día Mundial de la Inocuidad de los Alimentos.

Existen diversas formas de asegurar la inocuidad alimentaria, pero siempre es fundamental el papel de los gobiernos que pueden fomentar la participación de sectores como la sanidad animal, la agricultura o la sanidad pública. Otra forma de mejora sería la producción de alimentos de forma inocua adoptando buenas prácticas, mantener los alimentos inocuos aplicando los sistemas de análisis de peligros y puntos críticos de control (HACCP) o verificar que los alimentos sean inocuos con controles de producto acabado (FAO).

2.3. Contaminación en frutas y verduras.

La microbiota presente en las frutas y verduras tiene diversos orígenes y refleja cómo influye el entorno, las semillas, las enmiendas del suelo y la procedencia del agua de riego. Por este motivo existen numerosos hongos, levaduras, bacterias y virus de interés. Por lo general, las bacterias patógenas no se asocian con la fruta, no obstante se pueden encontrar patógenos y esto se debe a la contaminación en algún punto de la cadena de suministro.

Las fuentes de contaminación van a variar en función de la etapa de producción en la que se encuentre el producto. Cuando se habla de la etapa de antes de la recolección, las dos fuentes de patógenos más importantes son el agua utilizada para la irrigación y para la aplicación de insecticidas y fungicidas y el estiércol usado como fertilizante. La irrigación y la calidad microbiológica del agua de riego utilizada podrían tener gran relevancia sobre la salud del consumidor. Es por esto que la FDA ha emitido un comunicado en el que sugiere que la calidad del agua que va a estar en contacto directo con la parte comestible del alimento debería de ser de mejor calidad microbiológica que la que se usa cuando el contacto con el producto es mínimo. Otras fuentes que también son bastante significativas son las aves migratorias y los animales salvajes (Kruse *et al.*, 2004). La contaminación con virus es ocasionada probablemente por los trabajadores y no por el agua.

Actualmente existe controversia con respecto a si hay o no hay diferencias en la calidad microbiológica de los productos que son cultivados de forma ecológica o convencional. No hay muchas referencias sobre este tema pero se ha sugerido que probablemente las frutas y verduras tengan una carga microbiana más elevada debido al uso de estiércol como fertilizante (Mukherjee *et al.*, 2004).

En la etapa de recolección la contaminación con patógenos suele estar asociada a los equipos de recolección o a los trabajadores.

En la siguiente etapa, el procesado, la mayor parte de las frutas y verduras son lavadas por lo menos una vez y en etapas posteriores varias veces antes de llegar al consumidor. El agua que se emplea es tratada, adicionándole un desinfectante con la intención de controlar la carga microbiana del producto. El hecho de que la carga microbiana sea baja minimiza el deterioro del producto (Matthews *et al.*, 2006).

Además de las fuentes citadas anteriormente, hay otras, como por ejemplo las aguas procedentes de escorrentía, el viento, los equipos y utensilios utilizados en la producción y en la recolección (García de Fernando Minguillón *et al.*, 2002).

Una vez que el patógeno ha sido introducido en el entorno agrícola, puede persistir durante un largo periodo de tiempo. Los patógenos relacionados con la contaminación y con las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) más frecuentes son las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (García de Fernando Minguillón *et al.*, 2002).

Para evitar o reducir la contaminación durante la producción de la materia prima es primordial la aplicación de las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA).

2.4. Antibióticos.

Los antibióticos son medicamentos que se utilizan para el tratamiento de las infecciones de origen bacteriano. El uso de estos medicamentos puede provocar una mutación en las bacterias a las que ataca, o bien desarrollar algún otro mecanismo que provoque el desarrollo de resistencia frente a dicho antibiótico. Cuando la bacteria se ha hecho resistente es mucho más difícil tratar la infección que cuando no se ha producido este proceso (OMS). Actualmente hay muchas enfermedades infecciosas que podían tratarse años atrás, pero debido a las resistencias que se han ido creando, determinadas enfermedades son más difíciles de tratar y esto es un problema serio y que se debe de abordar.

En el año 2014 se publicó el informe *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*, en el que se resaltaba que la resistencia a los antimicrobianos estaba presente en todos los países y que podía afectar a cualquier persona. En el año 2015 la OMS publicó un análisis en el que ponía de manifiesto que a pesar del trabajo que se estaba realizando, era un problema del que aún existían importantes lagunas en las medidas que habría que adoptar.

La resistencia a los antimicrobianos se da cuando los microorganismos son alterados de tal forma que los medicamentos que se utilizaban para curar las infecciones que producían dejan de ser eficaces. El término ultrarresistente se aplica a aquellos microorganismos resistentes a la mayoría de los antimicrobianos y se describió hace ya casi una década en bacterias como *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella* spp., y *Salmonella typhi* (Hellinger, 2000). El uso que se ha dado a los antibióticos durante las últimas décadas es muy amplio, se han utilizado para terapia, profilaxis, crecimiento animal y para algunas actividades agrícolas. El uso inadecuado de estos fármacos provoca que los microorganismos se vuelvan resistentes y que se puedan propagar a través del agua o la cadena alimentaria (Wegener, 2003). Hoy en día la transmisión y la prevalencia de bacterias resistentes a los antibióticos (BRA) se han convertido en un peligro para la seguridad alimentaria (Lavilla *et al.*, 2014).

Las bacterias transmitidas por los alimentos despiertan gran interés y son consideradas reservas potenciales de genes de resistencia, debido a la complejidad de su transmisión. Son los estudios moleculares los que están evidenciando la transferencia de genes de resistencia entre las bacterias de origen animal y humano (Marshall y Levy, 2011). Smith DeWaal y Vaughn Grooters ya destacaron el aumento en el consumo de determinados antibióticos, como los β -lactámicos, tetraciclinas o sulfonamidas en los últimos años. Los β -lactámicos son una preocupación importante, ya que éstos se usan para el tratamiento de infecciones enterocócicas. Se usan con fines terapéuticos, cuando ya se ha producido la infección pero también como profilácticos en animales productores de alimentos (Smith y Vaughn, 2013).

Se trata de un problema muy preocupante ya que el hecho de no poder tratar una infección puede desembocar en la muerte del paciente o la transmisión de la enfermedad a más personas. Hay países que han optado por promover medidas para un uso adecuado de los antibióticos, por ejemplo en Cuba desde el año 1998, mediante el Programa Nacional de Medicamentos, se ha controlado de forma minuciosa la prescripción y el uso de estos fármacos. Otras medidas adoptadas han sido la restricción de la prescripción a los especialistas y limitar los fármacos que se pueden recetar (Freijoso *et al.*, 1997). A nivel europeo, La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) junto con el Centro Europeo de Prevención y Control de Enfermedades (ECDC) vienen publicando desde el año 2011 informes acerca de la resistencia a antimicrobianos en bacterias zoonóticas que afectan a animales y humanos, a través de la cadena alimentaria. Estos informes anuales suponen una importante contribución al trabajo desarrollado en Europa y apoya a la Comisión europea en el desarrollo de proposiciones para combatir la resistencia a antimicrobianos.

2.4.1. Grupos de antibióticos.

Los principales grupos de antibióticos son los siguientes (Azanza *et al.*, 2000; Honorato *et al.*, 2000):

Aminoglucósidos→ Tienen actividad bactericida frente a bacilos Gram-negativos aerobios, como *Enterobacteriaceae* y bacilos no fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter* spp. Dentro de este grupo se incluyen

la estreptomicina, neomicina, amikacina, kanamicina, tobramicina, gentamicina y espectinomicina.

Betalactámicos→Por lo general su espectro de acción recae sobre bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, además de en espiroquetas pero no son activos frente a micoplasmas ni sobre bacterias intracelulares de tipo clamidias o rickettsias. El mecanismo de resistencia más importante es la producción de betalactamasa. Esta capacidad la tienen *S. aureus*, enterobacterias como *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Shigella* y *Bacteroides* spp., Dentro de este grupo encontramos:

- **Penicilinas:** actúan sobre todo frente a cocos Gram-negativos y bacilos Gram-positivos, tanto facultativos como anaerobios. Las penicilinas pueden ser bencilpenicilinas, carboxipenicilinas, isoxazolilpenicilinas, aminopenicilinas o ureidopenicilinas.
- **Cefalosporinas:** Son bactericidas frente a la mayoría de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, pero tienen ciertas limitaciones, como la inactividad frente a enterococos, contra estafilococos resistentes a la meticilina o contra bacilos anaerobios Gram-negativos. Las cefalosporinas se clasifican en generaciones.
 - Cefalosporinas de 1ª generación: tienen muy buena acción bactericida frente a cocos Gram positivos. Son por ejemplo cefadroxilo, cefalexina, cefradina, etc.
 - Cefalosporinas de 2ª generación: son activas frente a cocos Gram-positivos, aunque menos que las de 1ª generación y bacilos Gram-negativos. Pertenecen a este grupo cefaclor, cefuroxima, cefonicida, cefoxitina, etc.
 - Cefalosporinas de 3ª generación: Activa frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y algunas enterobacterias no productoras de betalactamasa de espectro extendido, como *E. coli*, *K. pneumoniae*, etc.
 - Cefalosporinas de 4ª generación: activas frente a cocos Gram-positivos y bacilos Gram-negativos, como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli* o del género *Enterobacter*. A su vez pueden ser:
 - Monobactamas: aztreonam.
 - Carbapenemes: imipenem, meropenem, etc.

- Inhibidores de las beta-lactamasas: amoxicilina y ácido clavulánico, ampicilina y sulbactam, piperacilina y tazobactam.

Anfenicoles→ En este grupo destaca el cloranfenicol. Son activos frente a muchas bacterias Gram-positivas, como *Streptococos* y *Staphilococos* y también frente a Gram-negativas, como *Pasteurella*, *Echerichia*, *Neisseria*, *Brucella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Haemophilus*. Otras bacterias que son sensibles al cloranfenicol son las anaerobias como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*.

Glicopéptidos→ Destacan la vancomicina y la teicoplanina. Fundamentalmente son activos frente a bacterias Gram-positivas.

Lincosamidas→ Pertenecen a este grupo la clindamicina y lincomicina. Activos frente a bacterias Gram-positivas, especialmente *S.pneumoniae* y *S. aureus*.

Macrólidos→ Se encuentran en este grupo la eritromicina, espiramicina, azitromicina, telitromicina, etc. Actúan frente a cocos Gram-positivos, cocos Gram-negativos, bacilos Gram-positivos y bacilos Gram-negativos.

Quinolonas→ Son el ciprofloxacino, ofloxacino, norfloxacino, levofloxacino, etc. También se agrupan en generaciones:

- Quinolonas de 1ª generación: Activas frente a bacterias Gram-negativas (*E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Shigella*) menos *pseudomonas*.
- Quinolonas de 2ª generación: Similares a la anterior y además actúa frente a bacterias multirresistentes a cefalosporinas, penicilinas y aminoglucósidos.
- Quinolonas de 3ª generación: Similar a las anteriores pero también tienen actividad contra bacterias Gram-negativas.
- Quinolonas de 4ª generación: igual que la anterior pero también incluye las bacterias anaerobias.

Sulfamidas→ Se encuentra la trimetoprima y el cotrimoxazol. Tiene un espectro de acción muy limitado debido a las resistencias que se han ido originando, no obstante son activas frente a un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, pero inactiva frente a *Enterococcus*.

Tetraciclinas→ Se incluyen la tigeciclina, tetraciclina, minociclina, etc. Las tetraciclinas tienen actividad frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas fundamentalmente.

Misceláneos→ Aparecen en este grupo la polimixina, bacitracina, tirotricina, mupirocina, etc, Principalmente tienen actividad bactericida contra la mayoría de estafilococos y estreptococos.

2.4.2. Mecanismos de resistencia.

La resistencia a los antibióticos se adquiere por varios mecanismos que las bacterias han ido desarrollando (Imagen 1), especialmente por el contacto prolongado con estos fármacos y, en ocasiones, en concentraciones subletales (Elliot, 1999):

- **Modificación enzimática del antibiótico**→ las bacterias producen enzimas con la capacidad de cambiar la estructura del antibiótico provocando la pérdida de su funcionalidad. Las β -lactamasas las más relevantes, pueden hidrolizar el anillo β -lactámico (Harwell y Brown, 2000). Las enzimas que modifican los aminoglucósidos también alteran estos antibióticos con reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación (Livermore, 1991).
- **Bombas de expulsión activa**→ Mecanismo muy empleado por las bacterias Gram negativas (Vila *et al.*, 2007). Se encuentran localizadas en la membrana externa de la célula. Con este mecanismo se expulsan diversas moléculas, como metabolitos, detergentes, antibióticos, etc. El objetivo es controlar las concentraciones de sustancias tóxicas en el interior celular manteniéndolas al mínimo. Estas bombas pueden ser específicas o inespecíficas para un fármaco. El aumento en la expresión de una bomba inespecífica puede producir resistencia cruzada entre distintos fármacos (Depardieu *et al.*, 2007). En resumen, estas bombas recogen el antibiótico del espacio periplásmico y lo expulsan evitando que llegue a su lugar de acción.
- **Cambios en la permeabilidad de la membrana externa**→ las bacterias son capaces de alterar la estructura de la bicapa lipídica de la membrana, aunque son las porinas las que fundamentalmente alteran la permeabilidad. Las porinas son canales que se forman en la membrana externa de las

bacterias Gram negativa y entre sus funciones está la de ralentizar el paso de los antibióticos al interior celular.

- **Alteraciones del sitio de acción**→ las bacterias tienen la capacidad de modificar el lugar en el que el antibiótico se une a su sitio diana, lo que evita el antimicrobiano realice su función. Es un mecanismo muy utilizado por las bacterias Gram-positivas, que originan cambios estructurales en los sitios de acción de los antibióticos β -lactámicos a nivel de las proteínas unidoras de penicilinas (Cavaco *et al.*, 2008).

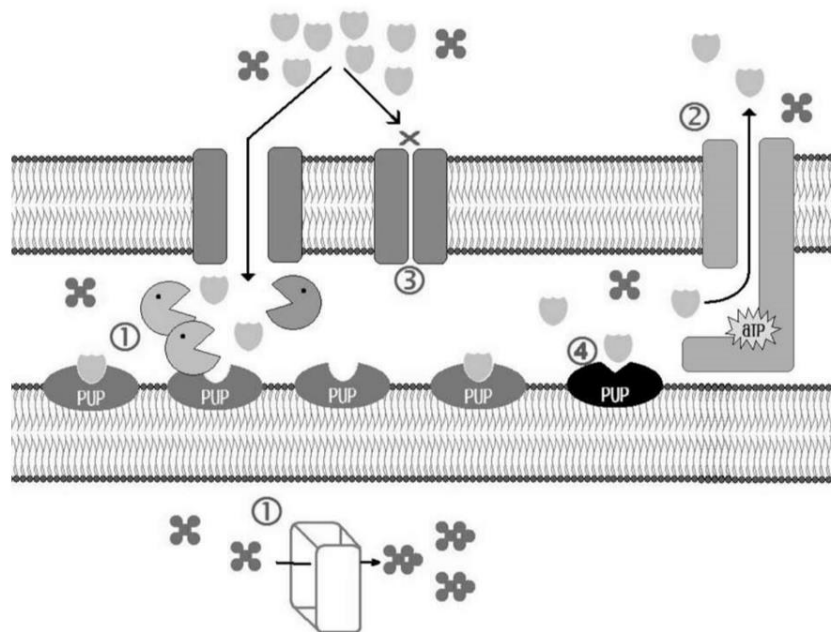


Imagen 1: Principales mecanismos de resistencia a los antibióticos. 1. Enzimas modificadoras. 2. Bombas de expulsión. 3. Cierre de porinas. 4. Proteínas de Unión a Penicilina (PUP).

2.4.3. Efectos sobre la salud.

Las enterobacterias son las principales bacterias que provocan infecciones nosocomiales, siendo las especies *E. coli* y *K. pneumoniae* las más relevantes. (Gu *et al.*, 2016 ; Yao *et al.*, 2016). *Escherichia coli* es la causante de infecciones como bacteriemia, infecciones urinarias, sepsis, gastroenteritis o meningitis neonatal entre otras, mientras que *K. pneumoniae* causa neumonías, infecciones urinarias e incluso infecciones de heridas en tejidos blandos (Al-Agha, 2017). La multirresistencia adquirida es algo novedoso que genera un problema global para la salud. Este tipo de resistencia se ha definido como la no susceptibilidad adquirida

a por lo menos un agente en tres o más antimicrobianos (Magiorakos *et al.*, 2012 ; Cannatelli *et al.*, 2016 ; Moosavian y Emam, 2019).

Hasta ahora, los carbapenémicos, un tipo de antibiótico perteneciente al grupo de los β -lactámicos, han sido empleados para el tratamiento de enfermedades infecciosas, pero el problema de las resistencias ha hecho que sean menos efectivos y que se tenga que recurrir a otros fármacos. El fármaco que ha sustituido éstos en caso de resistencia a las enterobacterias es la colistina, a la cual están empezando a aparecer casos de resistencias de hasta un 15% (Di Pilato *et al.*, 2016 ; Moosavian y Emam, 2019). Por tanto, la colistina, es el último recurso contra patógenos resistentes a múltiples fármacos, ya empieza a perder eficacia también. La preocupación que hay se debe a la aparición de un mecanismo que está mediado por unos plásmidos denominados *mcr* que se ha descrito en enterobacterias de origen clínico y alimentario (Poirel *et al.*, 2017). Es vital comprender los mecanismos que participan en este proceso para frenar la diseminación de estos plásmidos de resistencia a antibióticos a otras bacterias (Dominguez *et al.*, 2019).

2.5. Biocidas.

Los biocidas son sustancias o preparados que por lo general están constituidos por sustancias activas. El objetivo de estas sustancias es destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo que sea nocivo, mediante acciones biológicas o químicas.

2.5.1. Clasificación de los biocidas

En un principio los biocidas se encontraban divididos en 23 tipos en función del uso que tuviesen y a su vez estaban clasificados en 4 grandes grupos (GRUPO 1: Desinfectantes. GRUPO 2: Conservantes. GRUPO 3: Plaguicidas. GRUPO 4: Otros biocidas.). Esta clasificación sufrió algunas modificaciones cuando se revisó el Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al uso y comercialización de los biocidas, pasando a ser 22 tipos de biocidas en lugar de 23.

La regulación de los biocidas se realiza a nivel Europeo por el Reglamento (UE) nº 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y el uso de los biocidas, mediante el cual se regula el proceso

de evaluación para el registro, la autorización y la comercialización de dichos productos (Ministerio para la Transición Ecológica).

El uso de los biocidas en el sector alimentario se encuentra muy restringido debido a la necesidad de proteger la salud de los consumidores

En la tabla 1, que aparece a continuación, están recogidos los 22 biocidas clasificados en sus respectivos grupos.

Grupo 1: Desinfectantes	
Estos tipos de biocidas excluyen los biocidas de limpieza que no persiguen un efecto biocida, incluidos los detergentes líquidos y en polvo y productos similares.	
Número	Tipo de producto
TP 1	Higiene humana
TP 2	Desinfectantes y plaguicidas no destinados a la aplicación directa a personas o animales
TP 3	Higiene veterinaria
TP 4	Alimentos y piensos
TP 5	Agua potable
Grupo 2: Conservantes	
Salvo que se indique lo contrario, este tipo de productos solo abarca los destinados a prevenir el crecimiento de microbios y algas.	
Número	Tipo de producto
TP 6	Conservantes para los productos durante su almacenamiento
TP 7	Conservantes para películas
TP 8	Protectores para maderas.
TP 9	Protectores de fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados.
TP 10	Protectores para líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales
TP 11	Productos antimoho
TP 12	Protectores de líquidos empleados para trabajar o cortar materiales.
TP 13	Protectores de líquidos empleados para trabajar o cortar maderas
Grupo 3: Plaguicidas	
Número	Tipo de producto
TP 14	Rodenticidas
TP 15	Avicidas
TP 16	Molusquicidas, vermícidias y productos para controlar otros invertebrados
TP 17	Piscicidas
TP 18	Insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos

TP 19	Repelentes y atrayentes
TP 20	Control de otros animales vertebrados
Grupo 4: Otros biocidas.	
Número	Tipo de producto
TP 21	Productos antiincrustantes
TP 22	Líquidos para embalsamamiento y taxidermia

Tabla 1: Clasificación de los biocidas.

2.5.2. Mecanismo de acción de los biocidas:

La acción fundamental de los **biocidas oxidantes** es la oxidación de cualquier tipo de materia orgánica. Este mecanismo se basa en la acción del biocida sobre la membrana de los microorganismos, ya que, oxida las proteínas alterando de esta forma la permeabilidad de la membrana y originando entrecruzamientos que disminuyen la elasticidad de dicha membrana, haciéndola rígida y alterando así la presión intracelular, provocando la muerte del microorganismo..Además son sustancias que se consumen de forma rápida en aquellos sistemas que están muy contaminados. Por otra parte, los biocidas **no oxidantes** tienen efectos más dañinos, pudiendo penetrar en la célula y produciendo alteraciones en el ADN, ARN o incluso en los sistemas de defensa celulares (Tabla 2). Estos biocidas son los más recomendados en la industria alimentaria. Para tener un intervalo de inhibición más amplio lo que se hace es utilizar biocidas como mezclas de dos o tres compuestos activos que sean compatibles (Russell, 2003).

Sitio blanco	Antiséptico o desinfectante	Mecanismo de acción
Envoltura celular (pared celular, membrana externa)	Glutaraldehído EDTA, otros permeabilizantes	Unión cruzada a proteínas Bacteria gramnegativa: remoción de Mg ⁺⁺ , liberación de algunos LPS
Membrana interna citoplasmática	CAC	Daño generalizado de la membrana que comprometen fosfolípidos de las dos membranas.
	Clorhexidina	Las bajas concentraciones afectan la integridad de la membrana, las altas concentraciones causan congelamiento del citoplasma.
	Diaminas	Inducción a la pérdida de aminoácidos.
	PHMB (mezcla heterodispersa de bioguanidas de polihexametileno), alexidina	Fase de separación y formación de dominios de lípidos de membrana.
	Fenoles	Pérdida, desacople.
Unión cruzada a macromoléculas	Formaldehído Glutaraldehído	Unión cruzada de proteínas, ARN y ADN. Unión cruzada de proteínas de la envoltura celular y en otros sitios celulares.
Intercalación con el ADN	Acridinas	Intercalación de una molécula de acridina entre dos capas de pares de bases en el ADN.
Interacción con grupos tiol	Compuestos con plata	Enzimas que se unen a membrana interacción con grupos tiol
Efectos en el ADN	Halógenos Peróxido de hidrógeno, iones de plata	Inhibición de la síntesis del ADN Ruptura de la hebra de ADN
	Halógenos	Oxidación de los grupos tioles a disulfitos, sulfóxidos o disulfóxidos
	Peroxisenos	Peróxido de hidrógeno: Actividad debida a la formación de radicales libres OH [•] , que oxida a los grupos tioles en enzimas y proteínas; ácido paracético: Inhibición de los grupos tioles en proteínas y enzimas.

Tabla 2: Resumen de mecanismos de acción antibacteriana de antisépticos y desinfectantes.

2.5.3. Resistencia a biocidas.

Los biocidas se han empleado durante muchos años por lo que actualmente se dispone de una amplia gama de compuestos que muestran diferentes niveles de actividad antimicrobiana. Uno de los problemas que más preocupa hoy día es comprender los mecanismos de acción de estos productos ya que podría estar relacionada con la tolerancia y la resistencia bacteriana. Si la tolerancia a los biocidas se hace más frecuente y por otra parte está vinculada con la resistencia a los antibióticos, entonces no solo las bacterias resistentes se podrían transmitir a lo largo de la cadena alimentaria, sino que también habría reservorios de determinantes de resistencias que provocarían la aparición de nuevos microorganismos resistentes (Ortega *et al.*, 2013).

La tolerancia de las bacterias a los medicamentos se incrementa más rápido que el ritmo en el que se generan nuevos antimicrobianos, lo cual es preocupante en

el ámbito de la clínica humana. Algunos ejemplos de resistencias nuevas son *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM), *Enterococcus* resistentes a la vancomicina (VRE), *Mycobacterium tuberculosis* (MDRTB) y bacterias Gram negativas resistentes a múltiples fármacos. La tolerancia de un microorganismo frente a un biocida se puede definir como la supervivencia de una cepa bacteriana a una concentración de biocida que inhibe al resto de la población bacteriana (Maillard, 2007; Chapman, 2003). La tolerancia por lo tanto se podría definir como la supervivencia bacteriana frente a un biocida usando las concentraciones recomendadas por el fabricante. El término no susceptible es empleado para definir la resistencia a un biocida de un microorganismo (Maillard, 2007).

El exceso de producción de las bombas de flujo de salida es uno de los mecanismos de tolerancia a los biocidas más común y está relacionado con resistencia cruzadas a biocidas y antibióticos, como β -lactámicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas, tetraciclinas y macrólidos (Bialek-Davenet *et al.*, 2011; Álvarez-Ortega *et al.*, 2013; Piddock, 2006)

Las cepas con una resistencia baja a los compuestos de amonio cuaternario (QACs) tienen una frecuencia relativamente alta entre las especies *Listeria monocytogenes* (10%), *Staphylococcus* spp., (13%) y *Pseudomonas*.spp., (30%) e inferior para bacterias de ácido láctico (1,5%) y coliformes (1%). Estos valores son para las cepas aisladas en la industria alimentaria. Por regla general, las bacterias que se aíslan después de la desinfección son más resistentes y representan un problema para la seguridad alimentaria (Langsruda *et al.*, 2003). Es frecuente que los antibióticos y los biocidas se usen simultáneamente, lo que puede aumentar el riesgo de las resistencias cruzadas. Las *enterobacterias* multirresistentes (MDR), principalmente *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*, se consideran una grave amenaza para la salud pública y el uso de biocidas, como la clorhexidina (CHX), está recomendado en áreas de alto riesgo de MDR de la familia *Enterobacteriaceae* (Naparstek *et al.*, 2012 ; Curiao *et al.*, 2015).

La mayoría de los biocidas no tienen una diana celular específica distinta sobre la que actuar, a diferencia de los compuestos antimicrobianos que son selectivamente tóxicos. La resistencia a los compuestos antimicrobianos puede surgir una vez que se hayan producido una o más mutaciones sobre el gen diana. Sin embargo, la

tolerancia a los biocidas se produce a través de mecanismos menos caracterizados, mediante modificaciones en la célula bacteriana que incluyan la regulación positiva de la actividad de la bomba de flujo de salida o las alteraciones estructurales de la membrana que afectan a la permeabilidad (Poole, 2002). La tolerancia a los biocidas en la industria alimentaria se puede prevenir con buenos sistemas de limpieza y desinfección empleo de dosis adecuada y rotación de los productos empleados (Langsruda et al., 2003).

2.5.4. Biocidas en la industria alimentaria.

Los biocidas juegan un papel muy importante y efectivo en la limitación de la propagación de las infecciones y enfermedades (McBain et al., 2002). Sin embargo un uso excesivo de estos agentes químicos junto con la presión selectiva que se produce hace que la tolerancia a estos biocidas aumente y con ello aparezcan nuevas resistencias cruzadas a compuestos antimicrobianos (Fraise, 2002 ; Condell *et al.*, 2012).

Los biocidas son utilizados en los hospitales, granjas, en la agricultura y en una amplia variedad de industrias. Igualmente son utilizados en los hogares para inhibir o matar bacterias patógenas (McDonnell y Russell, 1999).

En la industria alimentaria, el hecho de que haya aumentado la demanda por parte del consumidor de alimentos saludables, nutritivos y poco procesados ha influido en la cantidad de biocidas utilizados. Para mejorar la higiene y garantizar la inocuidad de los alimentos, la industria alimentaria ha aumentado el uso de biocidas y desinfectantes químicos para controlar la carga microbiana en las etapas de producción (Condell *et al.*, 2012 ; Langsrud *et al.*, 2003). De esta forma aumenta la tolerancia a los biocidas y esto hace que repercuta en la salud pública. Es por esto por lo que se pone en duda la eficacia de los desinfectantes para controlar la inocuidad, puesto que cualquier tolerancia alterada a estos biocidas podría facilitar la supervivencia de organismos patógenos y contribuir a la aparición de cepas resistentes.

2.5.5. Efectos de los biocidas sobre la salud.

La aplicación de biocidas en los cultivos vegetales es un remedio común para intentar frenar enfermedades y plagas, a pesar de su toxicidad conocida. Pueden causar alteraciones en el ADN, lo cual puede expresarse en forma de anomalía

cromosómica (Palani y Panneerselvam, 2007). Los biocidas también producen efectos a largo plazo en la población e incluso puede manifestarse en generaciones próximas. Esto es a consecuencia de la exposición continua a estas sustancias, que originan gran variedad de alteraciones morfológicas, bioquímicas y fisiológicas. Los agentes tóxicos pueden revelar enfermedades en individuos con predisposición hereditaria o con hipersensibilidad alérgica desencadenando enfermedades como Alzheimer, Parkinson, enfermedades reumáticas, diabetes, inmunodeficiencias, enfermedades cardiorrespiratorias o arterioesclerosis (Olufunsho *et al.*, 2010). Además se puede dar el caso en el que se inhiba la expresión de determinados genes. Hay mutaciones que no se manifiestan instantáneamente, pero se van acumulando y desestabilizando el genoma, por lo que no se puede establecer la relación dosis-efecto y por consiguiente, tampoco se puede fijar una dosis mínima.

No se debe de olvidar que un agente químico con la capacidad de generar mutaciones o toxicidad en plantas, también podrán causarlos en los seres humanos (Grant, 1994). Para determinar dicha toxicidad de los biocidas en los cultivos, se utiliza el test de *Allium cepa* que detecta las alteraciones. Es un test muy sensible que detecta la toxicidad frente a compuestos como azufre, magnesio, boro, cromo, pesticidas, herbicidas, etc (Mustafa *et al.*, 2008).

2.5.6. Biocidas de interés.

Los biocidas se clasifican en base a su composición química y mecanismo de acción sobre los microorganismos. Algunos agentes **no oxidantes** son el sulfato de cobre, fenoles clorados, óxido de tributil estaño, compuestos de amonio cuaternarios, dibromo nitrilo, etc. Las **sales cuaternarias de amonio** son las más eficaces frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, aunque para estas últimas lo son en menor medida

- **Cloruro de benzalconio:** activo frente a bacterias, virus y hongos. Se utiliza como antiséptico y desinfectante de la piel, en la industria alimentaria y en algunos productos cosméticos.
- **Cetrimida:** Antiséptico de amplio espectro. Actúa frente a bacterias Gram positivas. Se utiliza para tratar quemaduras, heridas de la piel y para la limpieza y desinfección de utensilios.

- **Hexadecilpiridinio** (HDPC): Antibacteriano con función conservante y desinfectante. Muy efectivo frente a *Bacillus cereus* y *Bacillus weihenstephanensis* en verduras crudas (Cobo *et al.*, 2008).
- **Clorhexidina**: Amplio espectro de acción. Uso como desinfectante en productos farmacéuticos y cosméticos (Hugo y Russell, 1982). Activa frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Altera la permeabilidad de la membrana, favoreciendo la precipitación proteica.
- **Bis-fenoles**: Desinfectantes de amplio espectro que alteran la permeabilidad de la membrana por la desnaturalización proteica y la inactivación de enzimas de membrana. Se utiliza en su forma jabonosa para aumentar el poder de penetración. Dispone de actividad bactericida, tuberculocida, fungicida y viricida frente a virus envueltos.
- **Hexachlorofeno**: inhibidor de enzimas de la membrana a concentraciones bajas y destrucción celular en concentraciones elevadas. Activo frente a bacterias Gram-positivas y esporas.
- **Triclosan**: Uso en el sector sanitario y comercial. Bloquea la síntesis de lípidos de la membrana plasmática.

Dentro de los **agentes oxidantes** se encuentran el cloro, yodo, bromo, peróxido de hidrogeno, ozono, dióxido de cloro junto con las sales halógenas. Se utilizan en sistemas limpios, solo actúan en superficie.

2.6. Resistencias cruzadas.

Hay casos en los que las bacterias se vuelven tolerantes a los biocidas y resistentes a los antibióticos mediante mecanismos que no tienen nada que ver o por una resistencia cruzada. Este tipo de resistencia aparece cuando diferentes agentes antimicrobianos actúan sobre un mismo objetivo.

Los antibióticos tienen objetivos de acción determinados en las bacterias principalmente la síntesis de la pared celular, síntesis de proteínas, síntesis de ácidos nucleicos y función de la membrana celular (**Braoudaki y Hilton, 2004**). Por el contrario, los biocidas a diferencia de los antibióticos actúan en varios puntos en el interior de la célula (Maillard, 2002). Se ha observado que las bacterias presentan una baja resistencia frente a algunos compuestos de amonio cuaternario, la clorhexidina y el triclosán (Russell, 2002). El uso descontrolado de compuestos antimicrobianos está favoreciendo el incremento de la resistencia

bacteriana y se sabe que hay muchas similitudes entre los mecanismos que proporcionan tolerancia a los biocidas y resistencia a los antibióticos. Las similitudes mencionadas incluyen una disminución en la permeabilidad de la membrana, disminución en la acumulación de fármacos, modificación del objetivo contra el que actúa e incluso la modificación del propio antibiótico (Moreillon, 2000; Levy, 2002). Cada vez es más obvia la implicación de los sistemas de exporte activos en los mecanismos de resistencia bacteriana. Este hecho hace pensar que es muy posible que exista una resistencia a un antimicrobiano concreto que provoque la aparición de un mecanismo de resistencia cruzada contra otro antimicrobiano.

Determinados organismos, como ya se ha mencionado, pueden desarrollar mecanismos para protegerse y esto se debe a que la exposición a un fármaco puede desencadenar una resistencia cruzada a muchos otros fármacos, sin relación estructural o funcional.

La adaptación a los desinfectantes puede ir por tanto acompañada de la resistencia cruzada a los antibióticos. Se ha descrito por ejemplo un vínculo genético entre la tolerancia a QACs y la resistencia a diversos antibióticos en los estafilococos asociados a los alimentos (Langsruda et al., 2003).

La resistencia cruzada a los compuestos antimicrobianos tras la exposición y adaptación a un biocida puede aparecer en situaciones muy limitadas (Condell *et al.*, 2012):

- Cuando el biocida y un compuesto antimicrobiano actúan sobre la misma diana celular.
- Cuando el biocida y el compuesto antimicrobiano tienen el mismo mecanismo de transporte.
- Cuando puede haber un biocida y un antibiótico que tengan el mismo mecanismo de resistencia (Gilbert *et al.*, 2003)
- En situaciones en las que los genes que contribuyen a la tolerancia a los biocidas y la resistencia a los antibióticos se transmitan en mismo elemento genético (Poole, 2004).

Actualmente, aunque numerosos estudios describen la resistencia cruzada entre los antibióticos y los biocidas, aún es algo que preocupa a la comunidad

científica porque hay mecanismos desconocidos y en muchos casos dependen del tipo de antimicrobiano estudiado (Braoudaki y Hilton, 2004).

3. OBJETIVOS.

Los objetivos que se plantean para este proyecto son los siguientes:

1. Aislar cepas resistentes a antimicrobianos presentes en los alimentos vegetales.
2. Determinar la susceptibilidad de las cepas aisladas en los alimentos vegetales a diferentes antibióticos.
3. Determinar la tolerancia de las cepas aisladas en los alimentos vegetales a distintos biocidas empleados en la industria alimentaria.
4. Evaluar la presencia en alimentos vegetales de cepas bacterianas multirresistentes

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Alimentos utilizados.

Para la realización de este trabajo se han utilizado 8 alimentos, de los cuales 6 han sido frutas y 2 han sido verduras, obtenidos de diferentes establecimientos de la provincia de Jaén. Los alimentos escogidos para la realización de este estudio han sido espinaca, zanahoria, aguacate, uva, pera, ciruela, fresa, kiwi y plátano.

4.2. Medios utilizados y su preparación

Para la realización de este trabajo se han utilizado medios sólidos y líquidos. Dentro de los medios sólidos que se han empleado están el Müller-Hinton y el TSA mientras que el TSB es un medio líquido utilizado para cultivar cepas (Imagen 1).

El medio Müller-Hinton se emplea para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. También se ha utilizado este medio suplementado con un antibiótico (sulfato de estreptomicina) y con un biocida (cloruro de benzalconio) para el aislamiento de microorganismos resistentes.

El TSA y el TSB son medios generales que se utilizan para el crecimiento de cualquier tipo de microorganismo.

4.2.1. Descripción de los medios empleados.

Mueller-Hinton Agar (PanReac Applichem, Barcelona)→ Medio de cultivo no selectivo, rico en nutrientes, de color beige y homogéneo. Es utilizado para estudiar la susceptibilidad antimicrobiana de organismos aeróbicos. Contiene infusión de carne de res y peptona ácida de caseína, que proporcionan aminoácidos esenciales, vitaminas, nitrógeno y minerales necesarios para el crecimiento bacteriano. También contiene almidón, cuya función es absorber cualquier metabolito tóxico que se produzca. El agar actúa como agente solidificante. Este medio también se utiliza para el crecimiento de bacterias anaeróbicas y aeróbicas facultativas (Tabla 3).

Fórmula en g/l

Peptone	17,5
Beef infusion solids	2
Starch	1,5
Agar	17
pH	7.3 ± 0,2
Temperatura	25°C

Tabla 3: Composición del medio de cultivo Mueller-Hinton Agar.

Tryptic Soy Broth (TSB) (Scharlau, Barcelona)→ Medio líquido, muy nutritivo de uso general y color amarillo. Tiene como fuentes de nitrógeno la peptona de soja y la peptona de caseína, lo cual favorece el crecimiento de microorganismos aerobios y anaerobios. En su composición se encuentra la glucosa, la cual es una fuente de carbohidratos y de carbono. Es un medio utilizado para el análisis de productos alimenticios. Sin embargo, no se recomienda su uso como medio de mantenimiento ya que en la fermentación de los azúcares se liberan ácidos que disminuye la viabilidad de los microorganismos (Tabla 4).

Fórmula en g/l

Peptone from casein	17
Soya peptone	3
D(+) Glucose	2,5
Sodium chloride	5
Dipotassium phosphate	2,5
pH	7,3 ± 0,2

Temperatura	25°C
-------------	------

Tabla 4: Composición del medio de cultivo Typtic Soy Broth.

Tryptone Soy Agar (TSA) (PanReac AppliChem)→ Medio de cultivo color ámbar que favorece el crecimiento de un gran número de microorganismos. La tripteína y la peptona de soja son la fuente principal de vitaminas, minerales, bases púricas y pirimídicas y aminoácidos libres. La peptona de soja también aporta hidratos de carbono que favorecen el crecimiento de microorganismos. La función del cloruro de sodio es el mantenimiento osmótico mientras que el agar actúa como agente solidificante (Tabla 5).

Fórmula en g/l

Pancreatic Digest of Soya	5
Digest Pancreatic of Casein	15
Sodium Chloride	5
Agar	15
pH	7.3±0.2
Temperatura	25 °C

Tabla 5: Composición del medio de cultivo Tryptone Soy Agar.

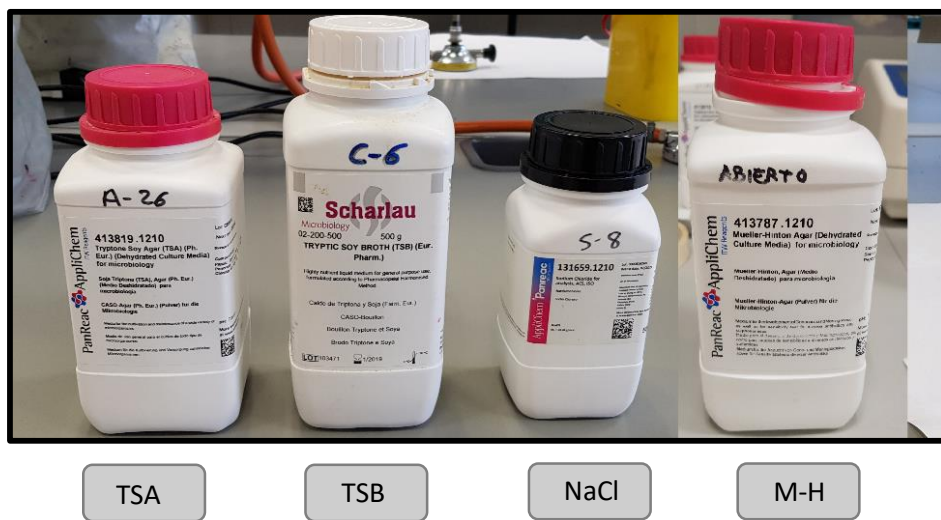


Imagen 2: Medios comerciales deshidratados y sales empleadas.

4.2.2. Preparación de los medios sólidos y líquidos.

Medios sólidos.

- **Müller-Hinton.**

De este medio se han preparado 4 matraces de 250 ml y 1 solo matraz de 800 ml. De los 4 matraces de 250 ml, a dos de ellos se les ha adicionado el antibiótico sulfato de estreptomicina para alcanzar una concentración final en el medio de 4µg/ml y a los 2 sobrantes, el biocida cloruro de benzalconio para alcanzar una concentración final en el medio de 0.025%. Con estos matraces se preparan placas para el aislamiento de microorganismos, aproximadamente 100 placas. Con el matraz de 800 ml se van a preparar placas para realizar antibiogramas a las cepas aisladas anteriormente.

Para la preparación de estos matraces se va a partir del medio comercial deshidratado, en el cual vienen los gr/l que se necesitan del producto. A partir de este dato, sabiendo que los gramos que vienen en la etiqueta son para 1 l, se ha ajustado la cantidad para los distintos volúmenes que se necesitan (Imagen 3).

- **TSA.**

El TSA es un medio general del cual se ha preparado tan solo un matraz de 350 ml. Una vez que se ha preparado este medio, se mete en el microondas aproximadamente 2 minutos, para fundir el agar y homogeneizar el medio. A continuación se prepara una gradilla con 50 tubos a los cuales se les adicionan 7 ml de TSA, para obtener tubos en semilla para la siembra de microorganismos (Imagen 4).



Imagen 3: Medio de cultivo Müller-Hinton.

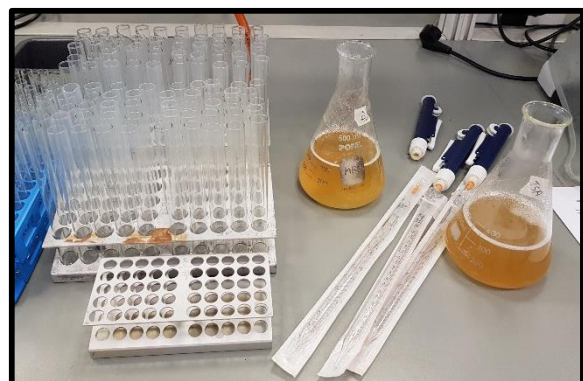


Imagen 4: Medio de cultivo TSA preparado para repartir en tubos y autoclavar.

Medios líquidos.

- **TSB.**

Del medio TSB se han preparado 2 matraces de 400 ml y otro matraz de 150 ml. Al igual que en los medios anteriores, se han calculado los gramos de medio que se necesita. Con este medio se han preparado aproximadamente 200 tubos con 2 ml, los cuales se han utilizado para el crecimiento bacteriano. Por otra parte, se han preparado unos 100 eppendorf con 900 μ l del mismo TSB, los cuales se han utilizado para las diluciones de los cultivos que se distribuyen en las placas de microtitulación. El TSB sobrante ha sido utilizado para la preparación de las distintas concentraciones de los biocidas (Imagen 5).

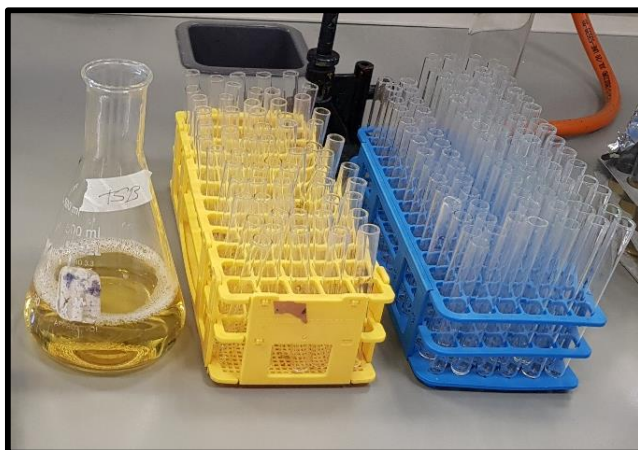
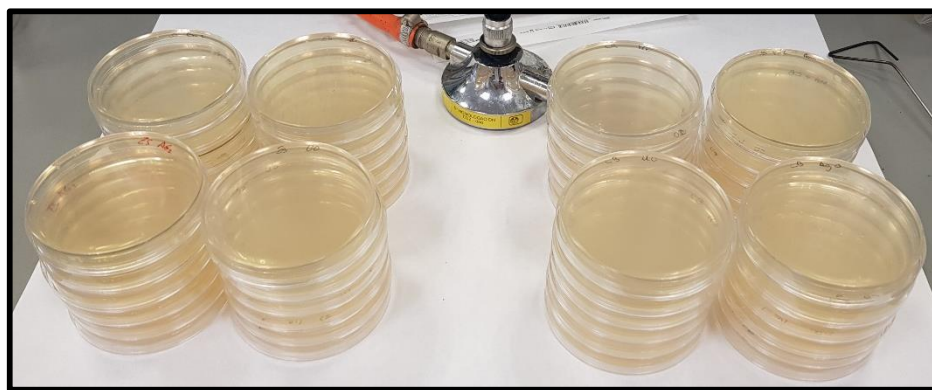


Imagen 5: Medio TSB

- **Sulfato de estreptomina y cloruro de benzalconio.**

El antibiótico sulfato de estreptomina tiene que estar a una concentración de 4 μ g/ml. Para lograr esta concentración en un matraz de 250 ml, se han necesitado 1000 μ g de antibiótico. Esta cantidad se adiciona a cada uno de los 2 matraces preparados una vez esterilizados y atemperados a 50°C.

Por otra parte, a los dos matraces de Müller- Hinton de 250 ml restantes se les ha añadido cloruro de benzalconio al 0.025% una vez que han salido del autoclave y se han atemperado a 50° C (Imagen 6).



M-H + SE

M-H + CB

Imagen 6: Medio Müller-Hinton adicionado con los antimicrobianos. M-h: Müller-Hinton, SE: sulfato de estreptomicina, CB: Cloruro de benzalconio.

4.2.3. Preparación de la solución salina.

Se han preparado 3 matraces de 200 ml de solución salina al 0.9%. Para prepararlos se ha utilizado agua destilada y cloruro de sodio (Imagen 7). De estos matraces, 45 ml están destinados para homogeneizar la muestra del alimento, la cual será la dilución inicial empleada en los recuentos. También se ha preparado eppendorf de 1.5 ml con 0.9 ml de dicha solución salina, los cuales van a ser utilizados para las diluciones seriadas (Imagen 8).

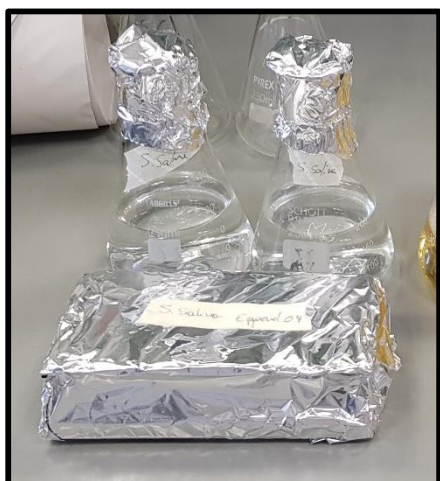


Imagen 7: Matraces y eppendorf con solución salina preparados para autoclavar.



Imagen 8: Eppendorf con solución salina.

Para la esterilización del material, se introducen en el autoclave los matraces con los medios, la solución salina tapados con un tapón de algodón hidrófobo y papel de

aluminio, los tubos tanto de TSB como de TSA, las gradillas con los eppendorf de TSB y de solución salina y cajas de puntas, todo ello sellado con cinta de autoclavado. El autoclavado dura aproximadamente 30 minutos y se alcanza una temperatura de 121°C y 1 atmósfera de presión.

4.3. Procesado de los alimentos

Se han utilizado 8 alimentos, de los cuales 6 han sido frutas y 2 han sido verduras.

Estos alimentos se han procesado de dos formas distintas. En uno de los procesos que se han seguido, se han pesado 5 gramos del alimento, se ha depositado en una bolsa hermética con 45 ml de solución salina y se han procesado en un homogeneizador Stomacher (Imagen 9) mientras que con el otro proceso, se ha depositado la pieza de fruta entera en la bolsa hermética con la solución salina y se ha hecho un lavado en superficie (Imagen 10). En ambos casos se masajea el alimento en contacto con la solución salina para resuspender cualquier microorganismo presente.

Para preparar las diluciones seriadas, se considera la solución inicial la dilución 0 y a partir de ahí se hacen las diluciones -1 y -2. Para obtener estas diluciones, tomamos 100 µl de la dilución 0 y se añaden a un eppendorf de solución salina de 0.9 µl, obteniendo la dilución -1 y un volumen final de 1 ml. Se repite este proceso para obtener la dilución -2 (Imagen 11).

A continuación se realiza la siembra en placa, tanto en el medio Müller-Hinton con sulfato de estreptomicina como en el medio Müller-Hinton con cloruro de benzalconio. La siembra en placa se realiza de la dilución -2 a la dilución 0, adicionando 100 µl de la dilución correspondiente y siempre bajo condiciones de esterilidad. Esta siembra se realiza por duplicado por lo que tendremos un total de 6 placas de Müller-Hinton con sulfato de estreptomicina y otras 6 placas de Müller-Hinton con cloruro de benzalconio por cada alimento analizado (Imagen 12).

Al realizar la siembra por duplicado, un lote se incuba en la estufa a 37°C y otro a 30°C entre 48 y 72 horas.



Imagen 9: Alimentos homogeneizados con Stomacher.



Imagen 10: Alimento lavado en superficie

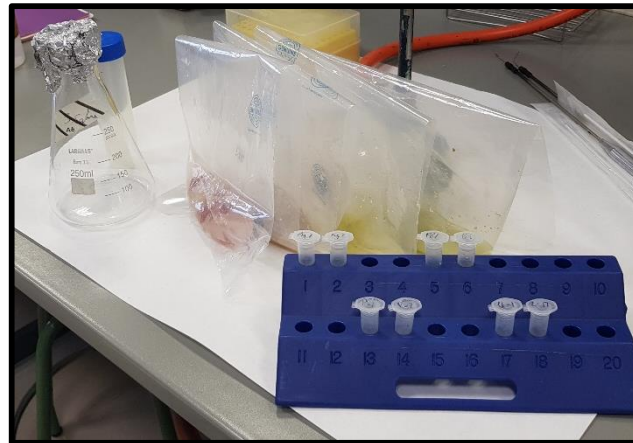


Imagen 11: Preparación de las diluciones seriadas.

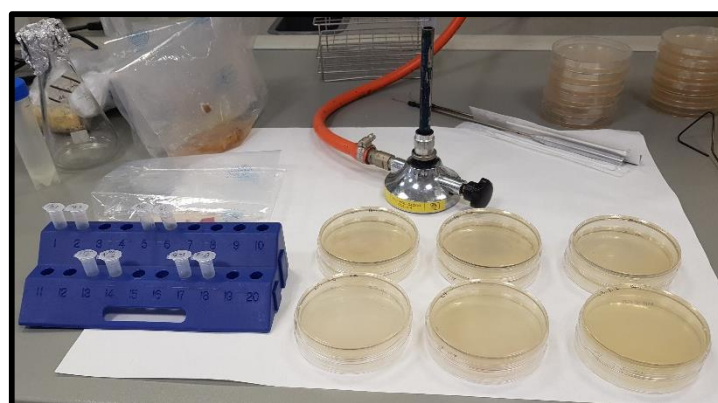


Imagen 12: Siembra en placa por duplicado partiendo de las diluciones seriadas.

4.4. Preparación de los antibiogramas.

4.4.1. Preparación de las cepas.

Una vez se han aislado las cepas en los medios Müller-Hinton adicionados con los distintos antimicrobianos, procedemos a realizar la prueba de sensibilidad antimicrobiana. Para la realización de esta prueba, las colonias aisladas deben de haber crecido en TSB (medio líquido). Para ello, las colonias aisladas en las placas mencionadas anteriormente, son picadas con una pipeta y depositadas en los tubos de TSB de 2ml (Imagen 13). A estos tubos se les asigna un número que indica el alimento, la dilución y el medio en el que ha crecido y se dejan en la estufa durante 24 horas y al igual que las placas, se hace por duplicado para incubarlas a 37°C y a 30°C (Imagen 14).

Pasado el tiempo de incubación se comprueba el crecimiento, si hay turbidez es porque la bacteria ha crecido mientras que si no la hay, no ha crecido. Aquellas cepas que si han crecido se siembran con un escobillón en un tubo TSA en semilla, que estará 24 horas en la estufa a la temperatura que le corresponda y posteriormente se almacenará en la cámara fría (Imagen 15).



Imagen 13: Colonias aisladas en Müller-Hinton y picadas con una pipeta para ser depositadas en TSB.

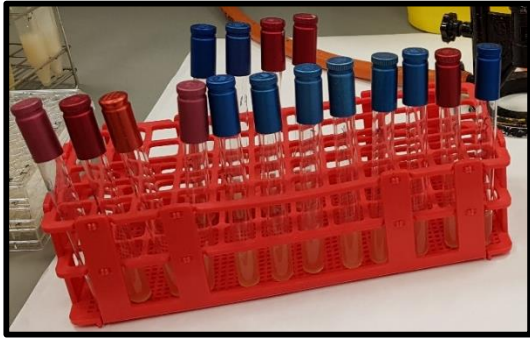


Imagen 14: TSB inoculado con cepas del medio Müller-Hinton.

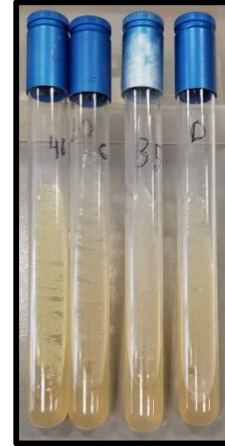


Imagen 15: TSA inoculado con las cepas aisladas en TSB tras pasar 24 horas en la estufa.

4.4.2. Siembra en medio Müller-Hinton con discos de antibióticos.

Para este proyecto se van a utilizar 10 antibióticos distintos (Imagen 16). Se preparan lotes de 10 placas de Müller-Hinton, en las cuales se va a colocar el disco de antibiótico en el centro (Imagen 17). En cada placa se van a sembrar aproximadamente 6 cepas diferentes en forma de estrella alrededor del disco de antibiótico. Se introduce un escobillón en un tubo de TSB previamente rotulado y se siembra en todas las placas en la posición correspondiente. Todo este proceso se realiza bajo condiciones de esterilidad (Imagen 18).

Estas placas se incuban en la estufa a la temperatura correspondiente y pasadas 24 horas se miden los halos de crecimiento.



Imagen 16: Antibióticos utilizados

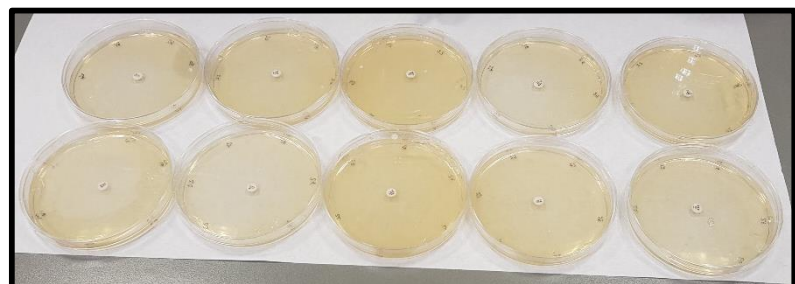


Imagen 17: Preparación de las placas de Müller-Hinton con los antibióticos.

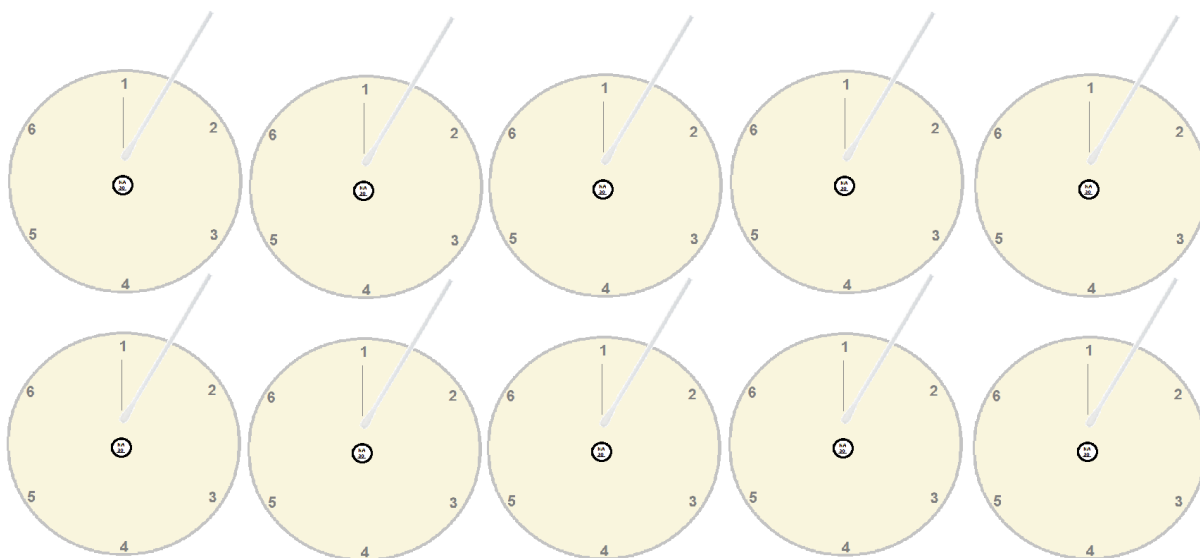


Imagen 18: Siembra de las cepas aisladas para la realización del antibiograma

4.5. Preparación de las placas de microtitulación.

4.5.1. Preparación de los biocidas y las disoluciones.

Para la realización de esta parte del proyecto, se han utilizado 7 biocidas. En primer lugar se han preparado las concentraciones de dichos biocidas para ensayar en placas de microtitulación (Imagen 19). Para poder llevarlo a cabo, es necesario haber preparado un cultivo estacionario con los tubos inoculados con nuestras cepas que teníamos rotulados. A partir de estos tubos se preparan las diluciones en los eppendorf de 900 μ l de TSB, adicionando 100 μ l suspensión bacteriana (Imagen 20).

Una vez que se han preparado las concentraciones de los biocidas y los eppendorf con las distintas cepas, se preparan las placas de microtitulación.

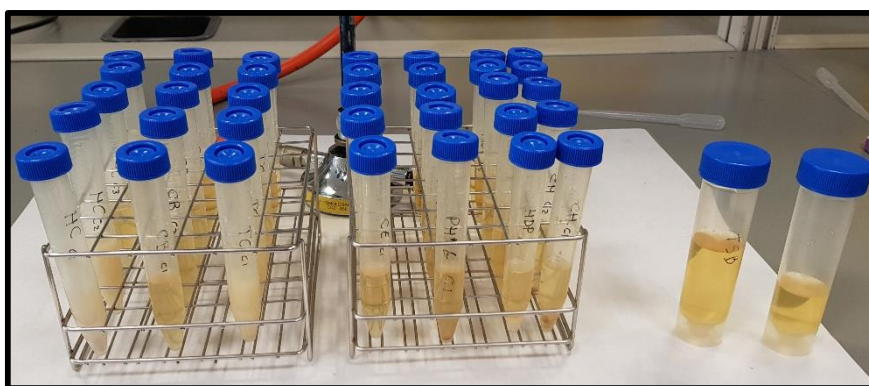


Imagen 19: Preparación de los biocidas que se han utilizado.

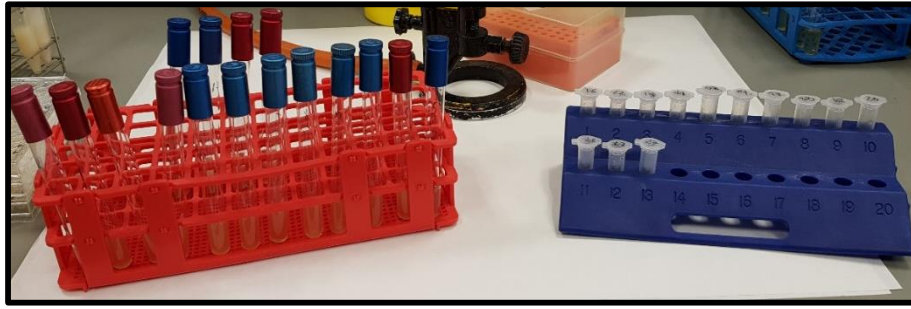


Imagen 20: Preparación de los eppendorf para el ensayo en las placas de microtitulación

4.5.2. Ensayo en las placas de microtitulación.

Se han necesitado 3 placas por cada biocida, puesto que unas se han incubado a 37° y otras a 30°C, sumando así un total de 21 placas.

Cada una de las filas de cada placa corresponde a una concentración y cada columna corresponde a una cepa distinta. Para completar cada placa se han depositado 180 µl de TSB y 20 µl de la dilución 1:10 de cada cepa en la primera fila, a continuación, en la segunda fila que corresponde con la concentración 5 del biocida y también se han adicionado 180 µl de biocida más 20 µl de cada cepa. Este proceso se repite hasta la concentración 1. En la última fila se han colocado controles negativos para poder detectar si hay contaminación en algunos de los medios empleados. Los 3 primeros pocillos contienen 200 µl de TSB y a continuación, en cada pocillo se han adicionado 200 µl de cada una de las concentraciones (C5, C4, C3, C2, C1). Todo este proceso se ha realizado bajo condiciones de esterilidad (Imagen 21).

Una vez completadas las placas se han incubado a la temperatura óptima de crecimiento bacteriano durante 24 horas (imagen 22).

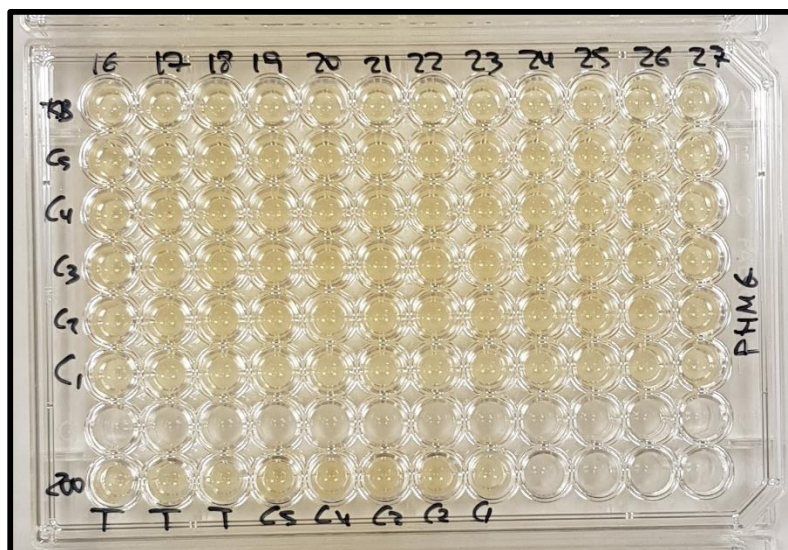


Imagen 21: Placa de microtitulación



Imagen 22: Estufas a diferentes temperaturas para la incubación de las placas de microtitulación.

4.5.3. Lectura de los resultados.

Pasado el tiempo de incubación y con ayuda de un lector de microplacas para absorbancia Sunrise™ (Tecan Trading AG, Switzerland) y con el programa informático Excel XFluor se ha podido determinar la menor concentración de cada uno de los biocidas estudiados que inhibe el crecimiento de cada una de las cepas (concentración mínima inhibitoria o MIC) en cada una de las placas (Imagen 23).



Imagen 23: Lectura de resultados de las placas de microtitulación.

5. RESULTADOS.

5.1. Cepas resistentes aisladas de los alimentos.

En este estudio se ha utilizado el medio Müller-Hinton adicionado con cloruro de benzalconio o bien de estreptomycin. Se aislaron un total de 15 cepas resistentes a cloruro de benzalconio, que corresponden a las cepas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 26, las cuales aparecen identificadas en la tabla 6. Por otra parte, en

el medio que se había adicionado de estreptomicina se aislaron 9 cepas resistentes, que son las cepas 8, 9, 10, 11, 13, 16, 17, 23 y 27.

CEPA	ALIMENTO	MULLER HILTON CON ANTIBIOTICO/ BIOCIDA	DILUCIÓN	TEMPERATURA DE CRECIMIENTO
1	Zanahoria	Cloruro de benzalconio	2	37°C
2	Zanahoria	Cloruro de benzalconio	2	37°C
3	Zanahoria	Cloruro de benzalconio	2	37°C
4	Zanahoria	Cloruro de benzalconio	2	37°C
5	Aguacate	Cloruro de benzalconio	0	37°C
6	Aguacate	Cloruro de benzalconio	0	37°C
7	Aguacate	Cloruro de benzalconio	0	37°C
8	Ciruela	Estreptomicina	1	37°C
9	Fresa	Estreptomicina	0	37°C
10	Fresa	Estreptomicina	0	37°C
11	Fresa	Estreptomicina	0	37°C
13	Kiwi	Estreptomicina	2	37°C
16	Kiwi	Estreptomicina	0	30°C
17	Pera	Estreptomicina	0	30°C
18	Zanahoria	Cloruro de benzalconio	2	30°C
19	Zanahoria	Cloruro de benzalconio	2	30°C
20	Zanahoria	Cloruro de benzalconio	2	30°C
21	Pera	Cloruro de benzalconio	0	30°C
22	Pera	Cloruro de benzalconio	0	30°C
23	Pera	Estreptomicina	2	30°C
24	Espinaca	Cloruro de benzalconio	2	30°C
25	Espinaca	Cloruro de benzalconio	2	30°C
26	Espinaca	Cloruro de benzalconio	2	30°C
27	Fresa	Estreptomicina	1	30°C

Tabla 6: Cepas aisladas de los distintos alimentos en el medio Müller-Hinton adicionado con antimicrobianos.

5.2. Susceptibilidad a los diferentes antibióticos utilizados.

Una vez que se han incubado las placas para realizar la prueba del antibiograma durante 24 horas en la estufa, unas a 30°C y otras a 37°C, según la temperatura óptima para el crecimiento bacteriano, se procede a la lectura de dichas placas. Para realizar la lectura se mide la distancia que hay entre el disco de antibiótico y el crecimiento bacteriano. Con estas medidas, las cuales vienen en milímetros (mm), establecemos unos intervalos para hacer una clasificación en función de su resistencia. Aquellas cepas que estén dentro del intervalo de cepas resistentes, aparecer marcadas con una R, las cepas que hayan mostrado sensibilidad a cualquier antibiótico, aparecerán marcadas con una S y aquellas cuya resistencia es intermedia

se representan con una M. Al no estar identificadas las cepas estudiadas a nivel de género o especie, no se pueden emplear los intervalos estandarizados a nivel internacional por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Los intervalos se han establecido de forma arbitraria y con el único objetivo de poder clasificar las cepas estudiadas en base a los resultados obtenidos para cada uno de los antibióticos analizados, sin que esta clasificación permita establecer de forma taxativa la resistencia o sensibilidad de las cepas frente a los antibióticos o su significación clínica. Los antibióticos que se han utilizado aparecen en la tabla 7.

ABREVIATURA	ANTIBIÓTICO
IPM	Imipemem
FEP	Cefepima
VA	Vancomicina
PRI	Piperacilina
MEM	Meroponem
NA	Ácido nalidíxico
C	Cloranfenicol
SXT	Trimetoprim sulfametoxazol
FOX	Cefoxitina
NET	Netilmicina

Tabla 7: Antibióticos utilizados y sus abreviaturas

Las siguientes imágenes muestran la diferencia que hay entre una placa en la que las cepas son resistentes y por lo tanto no se aprecia un halo significativo y otras en las que las cepas tienen resistencia intermedia o incluso llegan a ser sensibles a ese antibiótico y los halos son mucho mayores.

En la placa identificada como R aparecen las cepas resistentes y en la placa identificada como S se muestran aquellas cepas cuyo halo es mayor y nos hace sospechar que son sensibles o con una resistencia intermedia a ese antibiótico (Imagen 24).

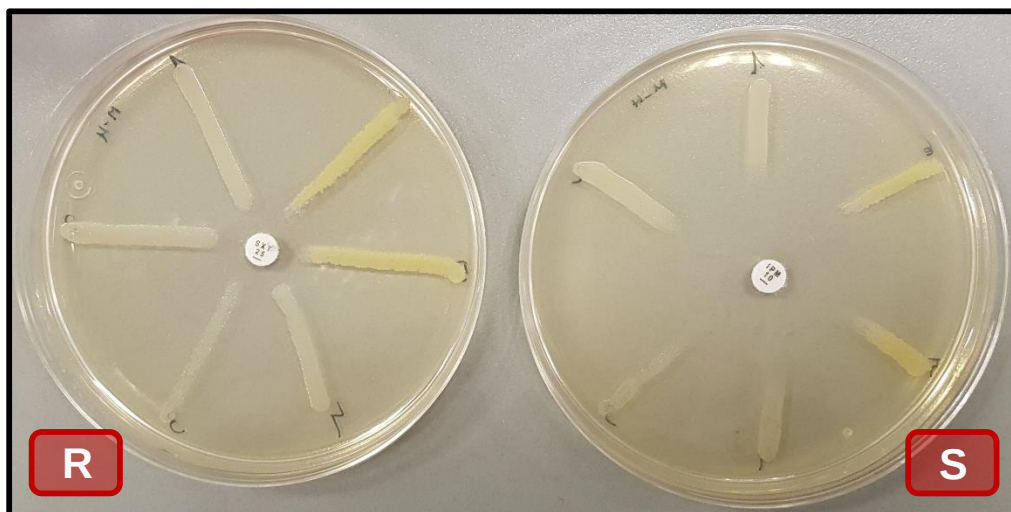


Imagen 24: Antibiograma pasadas las 24 horas de incubación

- **Imipemem.**

En el caso de este antibiótico los intervalos que se han obtenido son los siguientes:

- Resistente → R (4-13)mm
- Resistencia intermedia → M (14-22)mm
- Sensible → S (23-31)mm

En la siguiente tabla podemos ver como 14 de las 24 cepas han mostrado resistencia a este antibiótico mientras que tan solo una de ellas es sensible a la acción del imipemem. El resto de las cepas tendrían una resistencia intermedia.

IMIPEMEM (IPM)												
Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	18	15	17	15	16	17	15	18	11	20	11	31
Resistencia	R	M	M	M	M	M	M	M	R	M	R	S

Cepa	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	16	7	10	9	8	6	7	6	7	4	6	4
Resistencia	M	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 8: Actividad del imipemem frente a las cepas aisladas.

- **Cefepima.**

Los intervalos para la clasificación de las cepas en función de su resistencia que se han obtenido para cefepima son los siguientes:

- Resistente→ R (0-8)mm
- Resistencia intermedia→ M (9-16)mm
- Sensible→ S (17-24)mm

La tabla 9 nos muestra el grado de resistencia que han mostrado las cepas utilizadas en este proyecto. En este caso, 13 de las cepas que son resistentes a este antibiótico mientras que tan solo 1 mostraría sensibilidad. Las 10 cepas restantes han mostrado una resistencia intermedia según los datos que hemos recopilado.

CEFEPIMA (FEP)												
Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	14	15	10	8	13	15	13	11	0	0	12	24
Resistencia	M	M	M	R	M	M	M	M	R	M	M	S
Cepa	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	7	6	7	3	9	6	7	6	7	4	6	4
Resistencia	R	R	R	R	M	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 9: Actividad de la cefepima frente a las cepas aisladas.

• Vancomicina

Para este antibiótico se han establecido los siguientes intervalos:

- Resistente→ R (2-6)mm
- Resistencia intermedia→ M (7-11)mm
- Sensible→ S (12-15)mm

Al observar los datos que aparecen en la tabla 10, podemos apreciar que la mayoría de las cepas han sido resistentes a este antibiótico puesto que 19 de las 24 cepas se encuentran dentro del intervalo de bacterias resistentes a la vancomicina. Tan solo 2 de las cepas que se han utilizado parecen mostrar sensibilidad frente a la acción de este antibiótico y las 2 restantes tendrían una resistencia intermedia.

VANCOMICINA (VA)												
Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	3	6	2	4	3	3	5	12	11	15	12	11
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	S	M	S	S	M

CEPA	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	3	5	3	4	4	4	3	2	2	4	4	6
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 10: Actividad de la vancomicina frente a las cepas aisladas.

- **Piperacilina.**

Para este antibiótico se han establecido otros 3 intervalos:

- Resistente → R (3-12)mm
- Resistencia intermedia → M (13-22)mm
- Sensible → S (23-31)mm

A continuación, se aprecia como 14 de las 24 cepas son resistentes frente a la acción de la piperacilina, 8 de las cepas tendrían una resistencia intermedia y tan solo 2 de las cepas serían sensibles a su acción (Tabla 11).

PIPERACILINA (PRI)												
CEPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	16	18	13	15	11	13	11	17	23	31	20	19
Resistencia	M	M	M	M	R	M	R	M	S	S	M	M

CEPA	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	8	9	9	7	11	9	8	10	11	6	8	3
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 11: Actividad de la piperacilina frente a las cepas aisladas

- **Meropenem.**

Para determinar la susceptibilidad de las cepas que se han utilizado ante este antibiótico se han creado 3 intervalos:

- Resistente→ R (5-13)mm
- Resistencia intermedia→ M (14-20)mm
- Sensible→ S (21-28)mm

Al analizar los datos que aparecen en la tabla 12 vemos como en este caso hay 3 cepas sensibles, con halos de 22, 25 y 28 milímetros. Por otro lado tenemos 12 cepas que presentan una resistencia intermedia, con halos comprendidos entre 14 y 20 milímetros y por último, aparecen 9 cepas que son resistentes a la acción de este antibiótico.

MEROPENEM (MEM)												
CEPA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	20	19	28	25	17	17	15	16	15	17	15	22
Resistencia	M	M	S	S	M	M	M	M	M	M	M	S
Cepa	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	16	9	16	14	12	11	7	9	8	9	7	5
Resistencia	M	R	M	M	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 12: Actividad del meropenem frente a las cepas aisladas.

- **Ácido nalidíxico.**

Los intervalos que se han establecido para este antibiótico son los siguientes:

- Resistente→ R (2-7)mm
- Resistencia intermedia→ M (8-12)mm
- Sensible→ S (13-17)mm

Con este antibiótico, 18 de las cepas utilizadas presentarían resistencia frente a su acción, mientras que 3 de las cepas restantes serían sensibles y las otras 3 tendrían una resistencia intermedia (Tabla 13).

ÁCIDO NALIDÍXICO (NA)												
Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	10	10	5	5	7	8	6	5	15	17	14	4
Resistencia	M	M	R	R	R	M	R	R	S	S	S	R

Cepa	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	2	5	4	4	5	4	3	4	4	4	4	5
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 13: Actividad de las cepas frente al ácido nalidítico.

- **Cloranfenicol.**

Los intervalos establecidos para este antibiótico aparecen a continuación:

- Resistente → R (3-12)mm
- Resistencia intermedia → M (13-21)mm
- Sensible → S (22-30)mm

Con estos datos vemos que solo una de las cepas ha mostrado resistencia intermedia, siendo el resto sensible o resistente a su acción. De todas las cepas, 20 de ellas serían resistentes y tan solo 3 sensibles (Tabla 14).

CLORANFENICOL (C)												
Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	10	30	30	30	10	11	5	12	5	20	4	3
Resistencia	R	S	S	S	R	R	R	R	R	M	R	R
Cepa	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	4	3	4	3	3	3	3	5	3	5	4	3
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 14: Actividad de las cepas frente al cloranfenicol.

- **Trimetoprim sulfametoxazol**

Para la determinación de la susceptibilidad a este antibiótico se han establecido los siguientes intervalos:

- Resistente → R (2-8)mm
- Resistencia intermedia → M (9-15)mm
- Sensible → S (16-21)mm

Los resultados que obtendríamos serían que la mayoría de las cepas son resistentes a la acción del trimetoprim sulfametoxazol ya que 19 cepas estarían dentro

del intervalo de resistencia, mientras que una de ellas sería sensible y el resto tendría una resistencia intermedia (Tabla 15).

TRIMETOPRIM SULFAMETOXAZOL (SXT)												
Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	6	5	4	5	4	6	4	18	15	21	15	14
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	S	M	S	M	M
Cepa	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	7	3	2	3	2	4	3	4	2	2	3	3
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 15: Actividad de las cepas frente al trimetoprim sulfametoxazol.

- **Cefoxitina.**

Los intervalos establecidos son:

- Resistente → R (1-9)mm
- Resistencia intermedia → M (10-18)mm
- Sensible → S (19-26)mm

Tan solo una de las cepas aisladas presentaría sensibilidad a la cefoxitina mientras que las 23 restantes serían resistentes según los datos que se han obtenido (Tabla 16).

CEFOXITINA (FOX)												
Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	8	9	5	4	5	5	4	8	4	3	4	26
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
Cepa	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	5	2	2	2	2	4	4	3	3	4	1	5
Resistencia	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 16: Actividad de las cepas frente a la cefoxitina.

- **Netilmicina**

Para la netilmicina se han establecido 3 intervalos para determinar qué acción tienen los antibióticos sobre las cepas:

- Resistente → R (4-9)mm
- Resistencia intermedia → M (10-14)mm
- Sensible → S (15-19)mm

Con la netilmicina se puede observar que 11 cepas serían resistentes a su acción, mientras que tan solo 4 serían sensibles. El resto de las cepas estaría en el intervalo de resistencia intermedia.

NETILMICINA (NET)												
Cepa	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13
D (mm)	15	19	17	16	10	13	12	11	13	13	10	9
Resistencia	S	S	S	S	M	M	M	M	M	M	M	R
Cepa	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
D (mm)	4	9	10	6	9	9	9	10	8	9	9	5
Resistencia	R	R	M	R	R	R	R	M	R	R	R	R

Tabla 17: Actividad de las cepas frente a la netilmicina.

En base a los resultados que se han obtenido, si comparamos la resistencia de cada una de las cepas con todos los antibióticos utilizados, podríamos decir que las cepas que muestra mayor resistencia son las cepas 17, 21, 22, 24, 25, 26 y 27 ya que se muestran resistentes a todos los antibióticos. Por el contrario, la cepa 10 sería la más sensible, si bien sólo muestra sensibilidad a la vancomicina, piperacilina, ácido nalidíxico y cloranfenicol.

5.1.2. Resumen de la susceptibilidad de las cepas a los antibióticos.

Al hacer un recuento del número de cepas que son resistentes, sensibles o que han mostrado una resistencia intermedia, en el caso del **imipemem** obtenemos 14 cepas resistentes, 9 cepas con resistencia intermedia y tan solo una ha mostrado sensibilidad a su acción.

En el caso del **cefepima**, en el recuento encontramos que 13 de las 24 cepas son resistentes, 10 cepas tienen una resistencia intermedia y una cepa sería resistente a este antibiótico.

Con la **vancomicina** el número de cepas resistentes aumenta hasta 19. Tan solo tendríamos 2 cepas con resistencia intermedia y 3 cepas sensibles a este antibiótico.

En la **piperacilina**, según los datos que nos proporciona la tabla X, en el recuento tendríamos 14 cepas resistentes, 8 con resistencia intermedia y 2 cepas sensibles.

A continuación observamos que en el caso del **meropenem** no aparece ninguna cepa sensible a su acción. La mitad de las cepas son resistentes a este antibiótico y la otra mitad muestran resistencia intermedia.

El **ácido nalidíxico** es un antibiótico en el que el número de cepas resistentes es mayor que el número de cepas sensibles, siendo 18 las cepas resistentes y tan solo 3 las sensibles. Las 3 cepas restantes tienen una resistencia intermedia.

En el **cloranfenicol** encontramos 20 cepas resistentes y las 4 cepas restantes se consideran sensibles a su acción.

En el recuento que se ha realizado en el **trimetoprim sulfatoxazol** hayamos 19 cepas resistentes, 3 cepas con resistencia intermedia y tan solo una cepa sensible al antibiótico.

En el caso de la **cefotoxina**, el número de cepas resistentes aumenta considerablemente, apareciendo resistencia en 23 de las 24 cepas. Este es el antibiótico frente al que las cepas aisladas muestran mayor resistencia. La cepa restante muestra sensibilidad a este antibiótico.

Por último, al cuantificar las cepas resistentes a la **netilmicina** encontramos 11 cepas con resistencia a su acción, 4 cepas sensibles y 9 cepas con resistencia intermedia.

De forma global hemos aislado cepas resistentes a todos los antibióticos aunque frente a la cefepima, el meropenem y la netilmicina se encuentran menos cepas resistentes respecto al resto de antibióticos.

Del medio Müller-Hinton adicionado con cloruro de benzalconio se han aislado 15 cepas, de las cuáles, de forma general, 13 cepas presentan un perfil de resistencia elevado y 2 cepas tienen resistencia intermedia. Las **cepas 1, 2, 3 y 4** provienen del aislamiento en zanahoria. De forma general, las cepas 1, 3 y 4 son resistentes a la mayoría de los antibióticos analizados, mientras que la cepa 2 tendría una resistencia intermedia. Por otra parte encontramos que las **cepas 5, 6 y 7** han sido aisladas en aguacate y de éstas, la 5 y la 7 son más resistentes a la acción de los antibióticos mientras que la cepa 6 tiene una resistencia intermedia. A continuación encontramos que las **cepas 18 y 19** son resistentes a 8 de los 10 antibióticos y presentan resistencia intermedia en los dos antibióticos restantes, y **la cepa 20** es resistente a todos los antibióticos a excepción de la cefepima, estas tres últimas también se han aislado en zanahoria. Las **cepas 21, 22, 24, 25 y 26** han sido resistentes a todos los antibióticos que se han utilizado, siendo las cepas **21 y 22** aisladas en pera y el resto en espinaca (Tabla 17).

En el medio Müller-Hinton adicionado con estreptomicina se han aislado 9 cepas, de las cuales, de forma general, 4 presentan un perfil de alta resistencia a antibióticos, otras 4 tienen resistencia intermedia y tan solo una sería sensible. La **cepa 8** se ha aislado en ciruela y de forma general presenta resistencia intermedia. Las **cepas 9, 10 y 11** se han aislado en una fresa. La 9 y la 11, de forma general, presentan una resistencia intermedia mientras que la cepa 10 es más sensible a otros antibióticos. **Las cepas 13 y 16** se han aislado en kiwi. La cepa 13 es resistente y la cepa 16 es resistente a todos los antibióticos excepto al imipenem y al meropenem. La **cepa 17** es resistente a todos los antibióticos y se ha aislado en pera. La **cepa 23** también se ha aislado en pera, presenta resistencia intermedia a la netilmicina, al resto de los antibióticos es resistente. Por último, la **cepa 27**, aislada en fresa, es resistente a todos los antibióticos (Tabla 17).

ANTIBIÓTICOS										
CEPA	IPM	FEP	VA	PRI	MEM	NA	C	SXT	FOX	NET
1	R	M	R	M	M	M	R	R	R	S
2	M	M	R	M	M	M	S	R	R	S
3	M	M	R	M	R	R	S	R	R	S
4	M	R	R	M	R	R	S	R	R	S
5	M	M	R	R	M	R	R	R	R	M
6	M	M	R	M	M	M	R	R	R	M
7	M	M	R	R	M	R	R	R	R	M
8	M	M	S	M	M	R	R	S	R	M
9	R	R	M	S	M	S	R	M	R	M
10	M	M	S	S	M	S	S	S	R	M
11	R	M	S	M	M	S	R	M	R	M
13	S	S	M	M	R	R	R	M	S	R
16	M	R	R	R	M	R	R	R	R	R
17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
18	R	R	R	R	M	R	R	R	R	M
19	R	R	R	R	M	R	R	R	R	R
20	R	M	R	R	R	R	R	R	R	R
21	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
22	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
23	R	R	R	R	R	R	R	R	R	M
24	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
25	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
26	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
27	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 17: Resumen de la resistencia de las cepas a los antibióticos. R= Resistente; M= Resistencia intermedia; S= Sensible.

5.3. TOLERANCIA FRENTE A BIOCIDAS.

Una vez que se han incubado las placas durante 24 horas, unas en la estufa a 37°C y otras a 30°C, según cuál fuese su temperatura óptima de crecimiento, se procede a la lectura de las placas de microtitulación para evaluar la posible tolerancia

a los biocidas empleados. Esta lectura se hace tanto de forma visual como empleando un lector de placas. Para la obtención de los resultados, se introduce cada una de las placas de microtitulación en un lector de microplacas para absorbancia Sunrise™ y tras una breve agitación obtenemos unos valores que corresponden con la densidad óptica, medida a 620nm, de en cada uno de los pocillos y esta densidad óptica sería directamente proporcional a la concentración bacteriana presente.

Del ensayo con los diferentes alimentos, se aislaron 24 cepas, las cuales se han utilizado para ver el efecto que tienen los distintos biocidas sobre su crecimiento. Para determinar cuál es la MIC de las cepas, se prepararon distintas diluciones que fueron C1, concentrada al 1%, C2 al 0.25%, C3 al 0.025%, C4 con una concentración del 0.0025% y por último C5 que le corresponde una concentración del 0.00025%.

Como ya se ha citado en el apartado “materiales y métodos “, en la última fila se disponen blancos con el medio de cultivo TSB exclusivamente y las distintas concentraciones de los biocidas. Estos valores nos van a servir para determinar la concentración bacteriana en los casos en los que la densidad óptica del biocida sea muy elevada. Por lo tanto, aquellos blancos que tengan un valor ligeramente elevado, se le restarán al valor de cada lectura con la cepa correspondiente.

A partir de estos datos se va a determinar cuál es la menor concentración del biocida que inhibe el crecimiento de la cepa (MIC) y para ello nos fijaremos en qué concentración se produce un descenso brusco de la densidad óptica, y por tanto de la concentración bacteriana.

En este proyecto se han utilizado 7 biocidas a diferentes concentraciones. Estos biocidas son los siguientes (Tabla 18):

ABREVIATURA	BIOCIDA
CB	Cloruro de benzalconio
CE	Cetrimida
CH	Clorhexidina
HC	Hexaclorofeno
HDP	Hexadecil piridinio

PHMG	Polihexametil biguanidio
TC	Triclosan.

Tabla 18: Biocidas empleados y sus abreviaturas.

5.2.1. Cálculo de la MIC cuando la turbidez del biocida interfiere en la medida de absorbancia.

Hay casos en los que los valores de los blancos van a ser más elevados que los valores que se obtienen en la primera fila, en la cual se añadían 180 µl de TSB y 20 µl por cepa. Esto se debe a que la densidad óptica del biocida interfiere en la medida por lo que hay que tenerlo en cuenta a la hora de determinar cuál es la concentración mínima inhibitoria (MIC). Lo que vamos a hacer es restar dichos valores a las densidades ópticas que correspondan.

Esto ocurre en dos casos, con el Hexaclorofeno y con el triclosán.

- **Hexaclorofeno.**

Al realizar la determinación visual se puede percibir como los blancos correspondientes a las concentraciones C2 y C1 aparecen turbias, la misma turbidez que se ve reflejada en esas mismas concentraciones en todas las cepas. Una vez se ha visto esta diferencia, al observar los valores obtenidos tras la lectura se podría confirmar que el biocida interfiere en la lectura de los resultados por lo que los valores que se obtienen en las concentraciones C2 y C1 se restarán a los valores de los pocillos con dichas concentraciones más cada una de las cepas, para así tener un valor aproximado del crecimiento bacteriano real (Imagen 25).

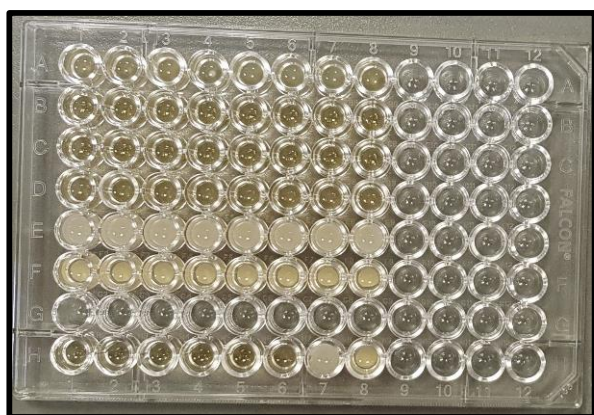


Imagen 25 a: Placa de microtitulación con hexaclorofeno vista desde arriba



Imagen 25 b: Placa de microtitulación con hexaclorofeno vista desde abajo

En la siguiente tabla se pueden ver los resultados que obtenemos una vez que hemos hecho las operaciones que corresponden. En este caso los valores de las concentraciones C2 y C1 no modifican los resultados de las MIC puesto que todas las concentraciones mínimas inhibitorias se encuentran en concentraciones más pequeñas.

Cálculo de la concentración bacteriana aproximada																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
C2	2,95	2,93	2,44	2,49	2,5	2,49	2,96	2,94	2,85	2,88	2,95	2,97	1,86	1,85	1,73	1,68	1,83	1,77	1,88	1,88	1,92	1,92	1,92	1,85		
C1	2,01	2,01	1,96	2,03	2,06	2,02	2,03	1,99	2,06	2	2,01	2,04	2,27	2,22	2,26	2,26	2,22	2,21	2,21	2,23	2,28	2,22	2,24	2,14		
Blanco	0,06	0,06	0,05	0,06	0,07	0,49	2,81	2,05																		
C2-Blanco	0,14	0,12	-0,4	-0,3	-0,3	-0,3	0,15	0,13	0,04	0,07	0,14	0,16	-1	-1	-1,1	-1,1	-1	-1	-0,9	-0,9	-0,9	-0,9	-0,9	-1		
C1-Blanco	-0	-0	-0,1	-0	0,01	-0	-0	-0,1	0,01	-0	-0	-0	0,22	0,17	0,21	0,21	0,17	0,16	0,16	0,18	0,23	0,17	0,19	0,09		
							C2	C1																		

Tabla 18: Densidades ópticas medidas en el hexaclorofeno.

- **Triclosán.**

En el caso del triclosán pasa algo parecido a lo anterior, solo que interfiere en las concentraciones C3, C2 y C1. En las imágenes que se muestran a continuación se puede ver que en las concentraciones mencionadas anteriormente aparecen unos precipitados en el fondo. Tanto en los blancos como en los pocillos con el biocida y la cepa tienen la misma apariencia, lo que nos hace pensar que podría ser el biocida el responsable de la turbidez y no el crecimiento bacteriano (Imagen 26).

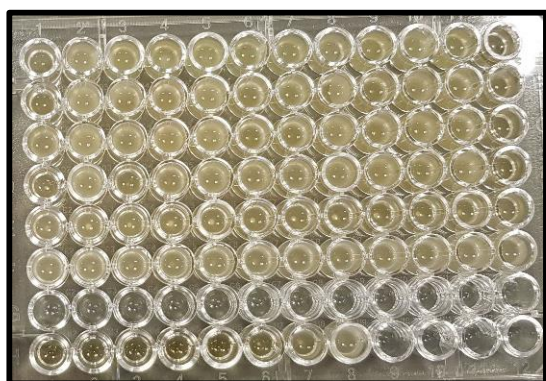


Imagen 26 a: Placa de microtitulación con triclosán vista desde arriba



Imagen 26 b: Placa de microtitulación con triclosán vista desde abajo

En la tabla 19, que aparece a continuación, se muestran los resultados tras haber realizado las operaciones pertinentes. En este caso sí que se modifican los MIC ya que para este biocida las cepas podrían ser más tolerantes por lo que podrían crecer a concentraciones más elevadas.

Cálculo de la concentración bacteriana aproximada																										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27		
C3	0,46	0,43	0,65	0,71	0,71	0,77	0,53	0,68	0,56	0,48	0,53	0,38	0,54	1,52	0,76	1,63	1,63	1,43	1,23	1,48	1,94	1,67	1,93	0,54		
C2	1,15	1,14	1,74	1,64	1,68	1,78	1,28	1,29	1,2	1,24	1,35	1,17	1,72	1,8	1,66	1,81	1,8	1,64	1,71	1,8	1,88	1,66	1,81	1,64		
C1	1,22	1,18	1,4	1,19	1,1	1,23	1,42	1,43	1,43	1,35	1,49	1,5	1,83	1,95	1,71	1,85	1,83	1,85	1,83	1,89	1,94	1,89	1,92	1,84		
Blanco	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,55	1,68	1,88																		
C3-Blanco	-0,1	-0,1	0,1	0,16	0,16	0,22	-0	0,13	0,01	-0,1	-0	-0,2	-0	0,97	0,21	1,08	1,08	0,88	0,68	0,93	1,39	1,12	1,38	-0		
C2-Blanco	-0,5	-0,5	0,06	-0	0	0,1	-0,4	-0,4	-0,5	-0,4	-0,3	-0,5	0,04	0,12	-0	0,13	0,12	-0	0,03	0,12	0,2	-0	0,13	-0		
C1-Blanco	-0,7	-0,7	-0,5	-0,7	-0,8	-0,7	-0,5	-0,5	-0,5	-0,5	-0,4	-0,4	-0	0,07	-0,2	-0	-0	-0	-0	0,01	0,06	0,01	0,04	-0		
						C3	C2	C1																		

Tabla 19: Concentraciones medidas en el triclosán.

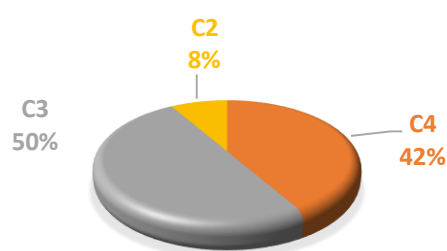
5.2.2. Determinación de la MIC.

Con los datos recopilados en la lectura de cada una de las placas de microtitulación podemos hacer una aproximación de cuál sería la MIC de cada uno de los biocidas frente a las cepas aisladas.

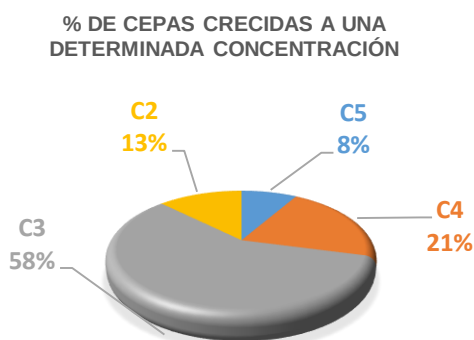
- **Cloruro de benzalconio.**

Al analizar la sensibilidad a este biocida de cada una de las cepas, como se puede observar en la tabla 20, el 42% de las cepas presentan un MIC de 0,0025, un 50% requieren una concentración del 0.025% para ser inhibidas y el 8% restante tienen la MIC del 0.25%. En la concentración 0.00025% todas las cepas han sido capaces de crecer por lo que son cepas tolerantes a esa concentración.

% DE CEPAS CRECIDAS A UNA DETERMINADA CONCENTRACIÓN



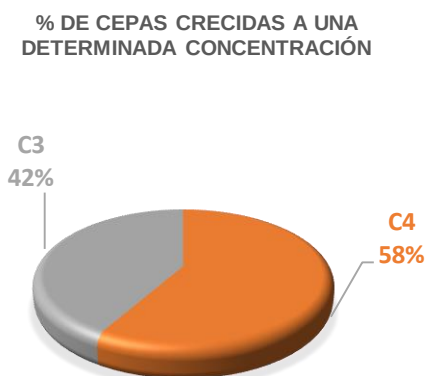
- **Cetrimida.**



En base a los resultados obtenidos en la tabla 21, al realizar la lectura de la placa e interpretar esos resultados podemos ver como el 8% de las cepas presentan una MIC del 0.00025%, el 21% en la concentración 0.0025%, el 58% en la concentración al 0.025% y el 13% restante de las cepas tienen la concentración mínima inhibitoria en la concentración del 0.25%.

- **Clorhexidina.**

Al observar los valores obtenidos al leer las placas en las que se han enfrentado las 24 cepas a este biocida (Tabla 22), se podría concluir diciendo que el 58% de las cepas presentan una MIC del 0.0025% y un 42% de las cepas tendrían su MIC en la concentración al 0.025%. De esta forma se podría decir que todas las cepas son tolerantes a la concentración 0.00025%, puesto que se ha hallado crecimiento en ellas.



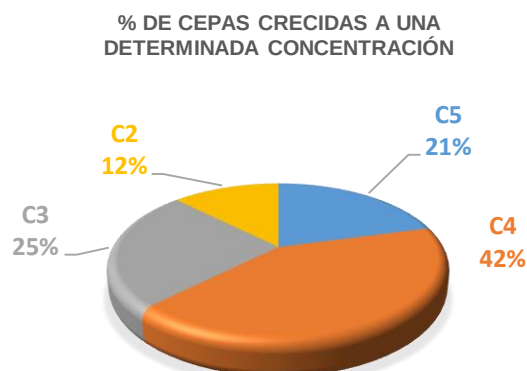
- **Hexaclorofeno.**



En el caso de este biocida al analizar los valores que se han obtenido en la tabla 23, se aprecia que un 52% de las cepas presentan una MIC del 0.00025%, y el 48% restante tendría la MIC en la concentración al 0.0025%. En base a estos resultados podríamos pensar que estas cepas son más sensibles a este biocida en concentraciones más bajas.

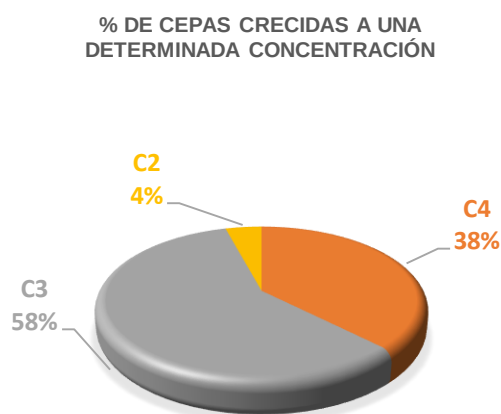
- **Hexadecil piridinio (HDP).**

Para este biocida (Tabla 24), se observa que las cepas son más tolerantes, ya que encontramos que hay un 21% de cepas que presentan una MIC del 0.00025%, un 42% estaría tendrían su MIC en la concentración al 0.0025%, un 25% correspondería a la concentración al 0.025% y por último, el 12% de las cepas restantes requieren una concentración del 0.25% para ver inhibido su crecimiento.



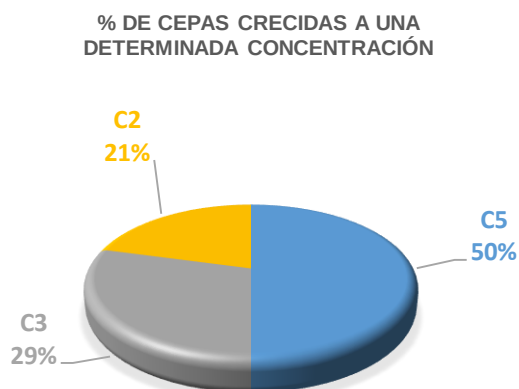
- **Polihexametil biguanidio (PHMG).**

En cuanto a este biocida se observa que todas las cepas han sido tolerantes con una MIC del 0.00025% puesto que hay crecimiento. A continuación, en la siguiente concentración, que sería del 0.0025%, encontramos un 38% de las cepas aisladas. Un 58% de las cepas que se han enfrentado a este biocida encuentran su concentración mínima inhibitoria en la concentración al 0.025% y el 4% restante de todas las cepas lo tendrían en la concentración al 0.25 (Tabla 25).



- **Triclosán (TC):**

En el caso del triclosan, al analizar los valores de la tabla 26, se puede ver que habría cepas más tolerantes a dicho biocida y otras muy sensibles. El 50% de las cepas tienen una concentración mínima inhibitoria que se encuentra en la concentración del 0.00025%, por lo que se podría decir que se trata de cepas muy sensibles a este biocida. A continuación, el 29% de las cepas encuentran su MIC en la concentración del 0.025%, seguido de esto, el 21% presenta



una MIC del 1%. En este último caso podríamos decir que estamos ante cepas más tolerantes a las concentraciones que se han empleado en este biocida.

Al observar todos estos resultados podríamos decir que las cepas que presentan una mayor sensibilidad a los 7 biocidas empleados serían las cepas 10, 11 y 13 cuyas MIC se encuentran entre las concentraciones 0.00025%, 0.0025% y 0.025.

Por el contrario, las cepas que mayor tolerancia han mostrado son las cepas 21, 22, 23 y 24, cuyos MIC se encuentran en las concentraciones 0.0025%, 0.025% y 0.25%, siendo las cepas 21 y 22 las que mayor tolerancia han mostrado ya que en 3 de los 7 biocidas han tenido su MIC en 0.25, en 2 de los biocidas restantes lo han presentado para un 0.025% y en los otros 2 biocidas para un 0.0025%.

CB																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
TSB	1,34	1,11	1,78	1,50	1,28	1,16	1,45	1,38	0,71	0,79	0,78	1,44	0,67	1,89	1,83	1,86	1,90	1,73	1,77	1,88	1,95	1,95	1,98	0,88
C5	1,24	0,86	1,78	1,54	1,32	1,30	1,57	1,50	0,33	0,31	0,40	1,15	1,65	1,92	1,77	1,97	1,91	1,76	1,81	1,93	1,93	1,93	2,00	1,01
C4	0,44	0,29	1,33	1,20	0,41	0,30	0,07	0,11	0,07	0,08	0,07	0,11	0,40	1,79	1,09	1,47	1,50	1,52	1,61	1,76	1,58	1,62	1,63	0,16
C3	0,15	0,12	0,17	0,18	0,15	0,13	0,14	0,16	0,14	0,14	0,13	0,19	0,15	0,31	0,26	0,28	0,34	1,63	1,64	0,26	0,55	0,24	0,46	0,15
C2	0,07	0,07	0,06	0,06	0,08	0,09	0,07	0,07	0,11	0,11	0,11	0,19	0,09	0,08	0,16	0,08	0,14	0,08	0,08	0,09	0,10	0,09	0,10	0,08
C1	0,07	0,09	0,07	0,07	0,07	0,09	0,08	0,07	0,09	0,10	0,10	0,16	0,13	0,09	0,17	0,09	0,17	0,08	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,07
200	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05																
	TSB	TSB	TSB	C5	C4	C3	C2	C1																

Tabla 20: Densidades ópticas obtenidas en la lectura de las placas en las que se ha utilizado el cloruro de benzalconio (CB). Los pocillos en los que se ha detectado crecimiento están representados en amarillo, mientras que las concentraciones mínimas inhibitorias aparecen en rojo.

CE																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
TSB	1,41	1,58	1,79	1,57	1,26	1,18	1,49	1,33	1,04	0,99	0,88	1,41	1,69	1,91	1,83	1,88	1,91	1,72	1,75	1,91	1,97	1,91	1,97	0,60
C5	1,46	1,38	1,72	1,57	1,03	1,21	1,53	1,45	0,34	0,08	0,09	1,04	0,72	1,92	1,71	1,95	1,82	1,62	1,67	1,91	1,87	1,74	1,91	0,83
C4	0,63	0,61	1,47	1,47	1,13	1,34	0,62	0,09	0,07	0,07	0,07	0,13	0,24	1,72	1,30	1,30	1,54	1,30	1,43	1,80	1,62	1,45	1,69	0,10
C3	0,09	0,10	0,11	0,12	0,11	0,12	0,11	0,11	0,10	0,10	0,09	0,14	0,10	0,25	0,22	0,15	0,22	1,73	1,80	1,99	0,16	0,12	0,37	0,09
C2	0,08	0,09	0,11	0,11	0,10	0,13	0,10	0,11	0,09	0,09	0,09	0,16	0,09	0,13	0,13	0,14	0,11	0,10	0,10	0,12	0,14	0,11	0,13	0,09
C1	0,07	0,08	0,07	0,07	0,09	0,09	0,08	0,09	0,07	0,08	0,08	0,15	0,08	0,13	0,11	0,12	0,10	0,09	0,10	0,10	0,11	0,09	0,10	0,08
200	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	TSB	TSB	TSB	C5	C4	C3	C2	C1																

Tabla 21: Densidades ópticas obtenidas en la lectura de las placas en las que se ha utilizado la cetrimida (CE). Los pocillos en los que se ha detectado crecimiento están representados en amarillo, mientras que las concentraciones mínimas inhibitorias aparecen en rojo.

CH																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
TSB	1,45	1,62	1,77	1,53	1,30	1,14	1,13	1,31	1,18	0,90	0,92	1,35	0,80	1,92	1,83	1,85	1,87	1,67	1,72	1,93	1,99	1,87	1,99	0,72
C5	1,53	1,47	1,70	1,54	1,03	1,11	1,52	1,53	1,47	1,37	1,00	1,20	1,27	1,91	1,71	1,97	1,88	1,61	1,66	1,90	1,96	1,76	1,96	0,58
C4	0,07	0,07	0,47	0,71	0,12	0,10	0,07	0,20	0,08	0,08	0,08	0,13	0,08	0,95	0,14	1,40	1,68	1,56	1,64	0,35	1,90	1,71	1,87	0,08
C3	0,09	0,09	0,12	0,10	0,13	0,13	0,08	0,21	0,08	0,08	0,08	0,19	0,09	0,17	0,10	0,11	0,10	0,11	0,10	0,13	0,14	0,10	0,12	0,09
C2	0,14	0,13	0,31	0,25	0,30	0,23	0,14	0,28	0,11	0,11	0,11	0,25	0,16	0,34	0,32	0,24	0,18	0,26	0,30	0,35	0,39	0,18	0,36	0,11
C1	0,16	0,27	0,39	0,32	0,31	0,29	0,20	0,43	0,17	0,17	0,17	0,34	0,20	0,36	0,41	0,25	0,26	0,35	0,35	0,36	0,43	0,23	0,37	0,16
200	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
	TSB	TSB	TSB	C5	C4	C3	C2	C1																

Tabla 22: Densidades ópticas obtenidas en la lectura de las placas en las que se ha utilizado la clorhexidina (CH). Los pocillos en los que se ha detectado crecimiento están representados en amarillo, mientras que las concentraciones mínimas inhibitorias aparecen en rojo.

HC																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
TSB	1,00	0,89	1,77	1,52	1,24	1,33	1,31	1,24	0,77	0,89	0,96	1,37	0,85	1,82	1,67	1,77	1,96	1,70	1,75	1,79	1,96	1,93	1,85	0,32
C5	0,07	0,14	1,58	1,47	1,11	0,90	0,14	0,09	0,06	0,07	0,07	0,08	0,34	1,80	1,34	1,57	1,94	1,44	1,50	1,52	1,82	1,67	1,93	0,29
C4	0,07	0,09	0,11	0,11	0,11	0,10	0,09	0,13	0,10	0,10	0,10	0,09	0,10	0,12	0,09	0,11	0,10	0,08	0,09	0,12	0,13	0,08	0,11	0,18
C3	0,36	0,39	0,41	0,45	0,49	0,43	0,41	0,45	0,40	0,42	0,40	0,38	0,45	0,60	0,43	0,50	0,46	0,41	0,42	0,50	0,60	0,43	0,39	0,36
C2	2,95	2,93	2,44	2,49	2,50	2,49	2,96	2,94	2,85	2,88	2,95	2,97	1,86	1,85	1,73	1,68	1,83	1,77	1,88	1,88	1,92	1,92	1,92	1,85
C1	2,01	2,01	1,96	2,03	2,06	2,02	2,03	1,99	2,06	2,00	2,01	2,04	2,27	2,22	2,26	2,26	2,22	2,21	2,21	2,23	2,28	2,22	2,24	2,14
200	0,06	0,06	0,05	0,06	0,07	0,49	2,81	2,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,54	0,74	0,53	0,60	0,60	0,41	0,42	0,51	0,44	0,39	0,38	0,41
	TSB	TSB	TSB	C5	C4	C3	C2	C1																

Tabla 23: Densidades ópticas obtenidas en la lectura de las placas en las que se ha utilizado hexaclorofeno (HC). Los pocillos en los que se ha detectado crecimiento están representados en amarillo, mientras que las concentraciones mínimas inhibitorias aparecen en rojo.

HDP																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
TSB	1,50	1,33	1,76	1,46	1,41	1,20	1,22	1,29	1,31	1,26	0,64	1,32	0,64	1,89	1,83	1,90	1,88	1,66	1,70	1,86	1,97	1,91	1,89	1,08
C5	1,02	0,84	1,69	1,48	1,10	1,28	0,82	0,06	0,06	0,06	0,06	0,07	0,45	1,90	1,67	1,81	1,77	1,62	1,68	1,86	1,79	1,76	1,87	0,66
C4	0,13	0,07	0,88	1,23	0,16	0,20	0,08	0,10	0,08	0,07	0,08	0,10	0,08	0,12	1,30	0,11	1,19	1,36	1,53	0,12	0,55	1,04	0,94	0,10
C3	0,11	0,10	0,13	0,15	0,14	0,13	0,10	0,11	0,10	0,10	0,10	0,12	0,12	0,16	0,15	0,15	0,18	1,89	1,90	0,21	0,20	0,20	0,82	0,12
C2	0,09	0,07	0,08	0,08	0,08	0,09	0,07	0,07	0,07	0,07	0,09	0,12	0,10	0,09	0,08	0,08	0,09	0,59	0,65	0,07	0,07	0,08	0,33	0,08
C1	0,07	0,08	0,09	0,09	0,09	0,09	0,08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,10	0,09	0,10	0,10	0,09	0,09	0,09	0,09	0,09	0,10	0,10	0,09	0,08
200	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,05	0,04	0,04	0,04	0,05	0,04	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05
	TSB	TSB	TSB	C5	C4	C3	C2	C1					0,05	0,05	0,05	0,06	0,07	0,10	0,07	0,07	0,06	0,05	0,06	0,05

Tabla 24: Densidades ópticas obtenidas en la lectura de las placas en las que se ha utilizado hexadecil piridino (HDP). Los pocillos en los que se ha detectado crecimiento están representados en amarillo, mientras que las concentraciones mínimas inhibitorias aparecen en rojo.

PHMG																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
TSB	1,55	1,62	1,75	1,51	1,35	1,24	1,35	1,33	1,34	1,31	1,26	0,95	1,16	1,90	1,85	1,89	1,89	1,67	1,72	1,90	1,99	1,84	1,97	1,16
C5	1,65	1,44	1,70	1,51	1,16	1,19	1,70	1,48	1,45	1,37	1,21	1,10	0,71	1,91	1,72	1,94	1,85	1,59	1,63	1,88	1,84	1,72	1,89	1,15
C4	1,46	1,30	1,67	1,51	1,27	1,33	1,54	1,48	1,42	1,37	0,71	0,31	1,14	1,86	1,66	1,71	1,83	1,57	1,59	1,76	1,83	1,68	1,93	1,04
C3	0,13	0,16	0,31	0,81	0,27	0,25	0,18	0,24	0,15	0,15	0,15	0,26	0,16	0,42	0,43	0,23	0,85	0,24	0,36	0,38	1,18	0,59	1,09	0,13
C2	0,10	0,11	0,28	0,15	0,22	0,19	0,11	0,19	0,11	0,11	0,12	0,24	0,15	0,29	0,35	0,24	0,22	0,19	0,18	0,27	0,55	0,15	0,36	0,10
C1	0,09	0,11	0,31	0,16	0,18	0,19	0,11	0,21	0,11	0,13	0,11	0,29	0,12	0,27	0,34	0,23	0,21	0,20	0,19	0,23	0,41	0,13	0,35	0,10
200	0,05	0,05	0,06	0,05	0,05	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,06	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,22	0,04	0,05	0,05	0,05	0,05
	TSB	TSB	TSB	C5	C4	C3	C2	C1																

Tabla 25: Densidades ópticas obtenidas en la lectura de las placas en las que se ha utilizado polihexametil biguadinio (PHMG). Los pocillos en los que se ha detectado crecimiento están representados en amarillo, mientras que las concentraciones mínimas inhibitorias aparecen en rojo.

TC																								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
TSB	1,4	1,06	1,77	1,48	1,26	1,21	1,33	1,3	1,28	0,76	0,7	1,37	0,65	1,91	1,81	1,9	1,95	1,72	1,75	1,87	1,98	1,94	1,94	0,52
C5	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,15	0,07	0,07	0,07	0,08	0,71	1,92	1,76	1,94	1,91	1,68	1,69	1,84	1,75	1,79	1,89	0,93
C4	0,06	0,07	0,07	0,07	0,06	0,07	0,07	0,09	0,07	0,06	0,07	0,08	0,93	1,92	1,39	1,91	1,9	1,65	1,68	1,81	1,86	1,79	1,96	0,43
C3	-0,09	-0,12	0,1	0,16	0,16	0,22	0,02	0,13	0,01	0,07	0,02	0,17	0,01	0,97	0,21	1,08	1,08	0,88	0,68	0,93	1,39	1,12	1,38	0,01
C2	-0,53	-0,54	0,06	0,04	0	0,1	-0,4	0,39	0,48	0,44	0,33	0,51	0,04	0,12	0,02	0,13	0,12	0,04	0,03	0,12	0,2	0,02	0,13	0,04
C1	-0,66	-0,7	-0,48	0,69	0,78	0,65	0,46	0,45	0,45	0,53	0,39	0,38	0,05	0,07	0,17	0,03	0,05	0,03	0,05	0,01	0,06	0,01	0,04	0,04
200	0,06	0,05	0,05	0,06	0,06	0,55	1,68	1,88																
	TSB	TSB	TSB	C5	C4	C3	C2	C1																

Tabla 26: Densidades ópticas obtenidas en la lectura de las placas en las que se ha utilizado el cloruro triclosan (TC). Los pocillos en los que se ha detectado crecimiento están representados en amarillo, mientras que las concentraciones mínimas inhibitorias aparecen en rojo.

5.2.3. Resumen de la susceptibilidad de las cepas a los biocidas.

Según los datos reflejados en la tabla siguiente, en el **cloruro de benzalconio** 16 de las 24 cepas que se han aislado son tolerantes a dicho biocida, mientras que las 8 restantes presentan mayor sensibilidad a su acción.

En el caso de la **cetrimida**, hay 17 cepas tolerantes a la acción de este biocida y 7 cepas serían sensibles al mismo.

Con la **clorhexidina** el número de cepas tolerantes disminuye, apareciendo 10 cepas tolerantes a su acción. El número de cepas que son sensibles a la clorhexidina aumenta hasta 14.

El **hexaclorofeno** es el único biocida en el que no se encuentra ninguna cepa tolerante puesto que todas han mostrado sensibilidad a la acción de este biocida.

En el **hexadecil piridinio** sigue siendo más elevado el número de cepas sensibles que las cepas tolerantes. Encontramos 15 cepas sensibles frente a 9 que son tolerantes a este biocida.

Con el **polihexametil biguanidio** ocurre a la inversa que en el biocida anterior. En este caso 15 cepas del total han sido tolerantes mientras que las 9 restantes han mostrado sensibilidad a la acción de dicho biocida.

Por último, en el caso del **triclosán** hay 12 cepas tolerantes y otras 12 cepas sensibles.

De forma general, podríamos decir que los biocidas a los que las cepas han presentado mayor tolerancia han sido el cloruro de benzalconio, la cetrimida y el polihexametil biguanidio. Por el contrario, los biocidas frente a los que las cepas habrían presentado menos tolerancia, siendo las cepas más sensibles a su acción han sido la clorhexidina, el hexadecil piridinio y habría 28 que destacar el hexaclorofeno ya que todas las cepas se han mostrado sensibles a su acción. También cabe destacar el caso del triclosán, en que la mitad de las cepas han sido tolerantes y la otra mitad sensibles.

Del medio Müller-Hinton adicionado con cloruro de benzalconio se han aislado 15 cepas, de las cuales 8 son en general más tolerantes al efecto de los biocidas ensayados y 5 son más sensibles. Las **cepas 1, 2, 3 y 4**, han sido aisladas en

zanahoria. De forma general, las cepas 1 y 2, son más sensibles a biocidas mientras que las cepas 3 y 4 son más tolerantes. Las **cepas 5, 6 y 7** (aisladas en aguacate) en general son sensibles, al contrario que las **cepas 18, 19 y 20** (aisladas en zanahoria) que son tolerantes. Las **cepas 21 y 22** (aisladas en pera) junto a las **cepas 24, 25 y 26** (aisladas en espinaca) presentan también tolerancia a la mayoría de los biocidas.

Del medio Müller-Hinton adicionado con estreptomicina, en general, las **cepas 8** (aislada en ciruela), **9, 10, 11** (aisladas en fresa), **13, 16** (aisladas en kiwi), **23** (aislada en pera) y **27** (aislada en fresa) son más sensibles a la acción de los biocidas, mientras que la **cepa 17** (aislada en pera) es más tolerante a la acción de los biocidas ensayados.

BIOCIDAS							
CEPA	CB	CE	CH	HC	HDP	PHMG	TC
1	T	T	S	S	S	T	S
2	T	T	S	S	S	T	S
3	T	T	T	S	T	T	S
4	T	T	T	S	T	T	S
5	S	T	S	S	S	T	S
6	S	T	S	S	S	T	S
7	S	T	S	S	S	T	S
8	S	S	S	S	S	T	S
9	S	S	S	S	S	T	S
10	S	S	S	S	S	T	S
11	S	S	S	S	S	T	S
13	T	S	S	S	S	S	S
16	T	S	S	S	S	S	T
17	T	T	T	S	S	T	T
18	T	T	S	S	T	T	T
19	T	T	T	S	S	T	T
20	T	T	T	S	T	S	T
21	T	T	T	S	T	S	T
22	T	T	T	S	T	S	T
23	T	T	S	S	T	S	T

24	T	T	T	S	T	S	T
25	T	T	T	S	T	S	T
26	T	T	T	S	S	T	T
27	S	S	S	S	S	S	T

Tabla 27: Resumen de la tolerancia de las cepas a los biocidas. T= Tolerante;
S= Sensible.

De acuerdo con los resultados obtenidos en las tablas 17 y 27, se puede observar como las cepas 3, 4, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 26 tienen un comportamiento muy similar en presencia de biocidas y de antibióticos.

6. DISCUSIÓN.

La creciente resistencia adquirida a los antibióticos y a los biocidas a través de la cadena alimentaria es objeto de preocupación por el impacto que puede tener sobre la salud de la población. Los biocidas son utilizados en la industria alimentaria para la desinfección de los alimentos y la preocupación por la utilización de estos productos es un tema que ha surgido recientemente (Ortega Motente *et al*, 2013). Por otra parte, el uso de los antibióticos en la industria alimentaria está muy restringido, sin embargo, son muy empleados en el sector agrícola (Landers *et al.*, 2012).

Existe cierta inquietud debido a que se cree que la exposición a estos agentes, tanto biocidas como antibióticos, puede estar relacionada con la selección de bacterias resistentes a estos últimos.

Hay estudios en los que, tras el aislamiento de cepas bacterianas a partir de alimentos, se ha hecho una identificación previa, para después determinar el grado de susceptibilidad a determinados antibióticos y biocidas. Los resultados que obtuvieron indicaron que las bacterias Gram-positivas, como *Bacillus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus* mostraban resistencia elevada a los biocidas. La presencia de estos géneros, en concreto en la industria alimentaria, se utiliza como indicador de contaminación, por lo que estos resultados pueden ser muy significativos. En nuestro estudio no hemos realizado una identificación preliminar de las bacterias por lo que

no podemos afirmar taxativamente si las cepas aisladas son resistentes o sensibles a un antibiótico o bien tolerantes a determinados biocidas. Sin embargo, sí hemos observado patrones generales de comportamiento más o menos resistente, tolerante o bien de mayor sensibilidad, en las cepas resistentes aisladas de vegetales.

Previamente ya se habían aislado cepas multirresistentes aisladas a partir de alimentos y se habían identificado principalmente como pertenecientes al género *Pantoea* y al género *Enterobacter* spp., esta multirresistencia se da en al menos 6 biocidas y 6 antibióticos. Los resultados que se obtuvieron en este estudio indicaban que la resistencia a los diferentes antimicrobianos, en bacterias Gram-negativas, se podría atribuir principalmente a la presencia de bombas de flujo de salida o bombas de exporte (Fernández Fuentes *et al.*, 2013). Si de alguna forma la resistencia a los biocidas está vinculada con la resistencia a antibióticos en determinantes genéticos comunes, además de transmitirse estos microorganismos a lo largo de la cadena alimentaria, también se pueden propagar estas resistencias a otros microorganismos, ampliando el número y la variedad de bacterias resistentes en el ambiente (Ortega Morente *et al.*, 2013). Ya se han descrito relaciones directas entre la tolerancia al triclosán y la resistencia a cloranfenicol y a nitrofurantoína. Esta relación apunta a que la resistencia frente a estos compuestos puede compartir un mecanismo común (Romanova *et al.*, 2006). En nuestro estudio, independientemente del tipo de bacteria que hayamos aislado, hemos encontrado cepas que presentan resistencia tanto a la acción de los antibióticos como a la de los biocidas. Es más, algunas de estas cepas se ha observado que son tolerantes a la mayoría de los biocidas y resistentes a casi todos los antibióticos empleados por lo que podríamos estar ante cepas multirresistentes.

Por otro lado, un estudio ya ha descrito que la exposición de *Listeria monocytogenes* a concentraciones elevadas de cloruro de benzalconio provocó determinadas mutaciones responsables de que la susceptibilidad de estas cepas bacterianas a la gentamicina y a la kanamicina disminuyese (Romanova *et al.*, 2006).

En estudios previos se ha confirmado la capacidad de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas para adaptarse a los biocidas. Los biocidas a los que las bacterias muestran mayor tolerancia son la clorhexidina y el cloruro de benzalconio, con un 88.2% de adaptación, pero también se han registrado valores algo más bajos

de resistencias, como es el caso del triclosan (53.9%), cetrimida (47.4%), hexaclorofeno (35.5%) o el cloruro de hexaclorofeno (30.3%) (Gaeda *et al.*, 2016 ; Gadea *et al.*, 2017). En nuestro caso, los resultados obtenidos han sido similares, siendo los biocidas a los que más tolerancia se ha detectado han sido el cloruro de benzalconio, la cetrimida y el polihexametil biguanidio, mientras que el hexaclorofeno ha sido el biocida frente al cual las cepas se han mostrado más sensibles.

Por el contrario, estudios previos muestran que los antibióticos frente a los que las cepas presentan una resistencia más elevada son ampicilina, sulfametoxazol y tetraciclina (Gadea *et al.*, 2017), mientras que nuestros resultados indican que el antibiótico frente al que las cepas han mostrado una resistencia más elevada es la cefotoxina.

7. CONCLUSIONES.

1. Se han aislado un total de 24 cepas resistentes a diferentes antimicrobianos en alimentos vegetales. De estas 24 cepas, 15 se han aislado en el medio Müller-Hinton adicionado con cloruro de benzalconio y las 9 cepas restantes se han aislado en el medio Müller-Hinton suplementado con estreptomicina.
2. En general, frente a todos los antibióticos se han obtenido resistencias de las distintas cepas aisladas, pero el antibiótico al que mayor resistencia han mostrado las cepas ha sido la cefoxitina seguida del cloranfenicol. Por otro lado encontramos que las cepas se han mostrado menos resistentes a la acción del meropenem.
3. El biocida al que mayor tolerancia han mostrado las cepas resistentes previamente aisladas ha sido la cetrimida, seguido del cloruro de benzalconio y del polihexametil biguanidio. Por el contrario, el biocida frente al cual todas las cepas se han mostrado más sensibles, es el hexaclorofeno. Dichas cepas también se han mostrado sensibles a la acción de la clorhexidina y hexadecil piridinio, aunque en menor grado.
4. Las cepas aisladas como tolerantes a cloruro de benzalconio que más resistencia han presentado a los antibióticos, han sido las cepas 21 y 22 aisladas en pera y 24, 25 y 26 aisladas en espinaca. Por otra parte, las cepas aisladas como resistentes a estreptomicina que han presentado mayor

resistencia a la acción de otros antibióticos son las cepas 17, aislada en pera y 27, aislada en fresa. La cepa que ha mostrado menor resistencia a los antibióticos es la cepa 10, que ha sido aislada en fresa.

5. En el caso de los biocidas, las cepas que han mostrado una tolerancia más elevada de entre las aisladas en medio suplementado con cloruro de benzalconio son las cepas 3, 4, 18,19 y 20, aisladas en zanahoria, 21 y 22, aisladas en pera y 24, 25 y 26 aisladas en espinaca. Por otra parte, la cepa aislada en el medio Müller-Hinton, adicionado con estreptomina que ha mostrado una tolerancia más elevada es la cepa 17, obtenida de pera. Las cepas que se han mostrado más sensibles frente a la acción de estos biocidas se han aislado en el medio adicionado con estreptomina. Estas cepas son la 8, 9, 10 y 11, aisladas en pera, la cepa 13, aislada en kiwi y por último la cepa 27, aislada en fresa.
6. Por último, cabe destacar algunas cepas especialmente resistentes y tolerantes a los antimicrobianos ensayados. Son las cepas 3, 4, 17,18, 19, 20, 21, 22, 24, 25 y 26, que han mostrado un comportamiento muy similar al ser enfrentadas tanto a los biocidas como a los antibióticos.

8. REFERENCIAS.

- AECOSAN (2003). La seguridad alimentaria. Recuperado de <http://www.aecosan.msssi.gob.es>
- Al-Agha, A.G. (2017). Extraction and purification of lipopolysaccharide of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(8), 90–100.
- Álvarez-Ortega, C., Olivares, J. y Martínez, J. L. (2013). RND multidrug efflux pumps: what are they good for?. *Frontiers in Microbiology*, 4, 7.
- Azanza Perea, J. R., Sádaba Díaz de Rada, B. y García Quetglás, E. (2000). Bases del tratamiento antimicrobiano en situaciones especiales. En J. Picazo y M. Gómis (Eds.), *Bases para el tratamiento antimicrobiano* (pp. 190-196). Barcelona: Doyma.
- Bialek-Davenet, S., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Lavigne, J-P., Bert, F., Moreau, R. y Nicolas-Chanoine, M-H. (2011). *In vitro* selection of *ramR* and *soxR* mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones

as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), 2795–2802.

- Braoudaki, M. y Hilton, A. C. (2004). Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of clinical microbiology*, 42(1), 73–78.
- Cannatelli, A., Giani, T., Antonelli, A., Principe, L., Luzzaro, F. y Rossolini, G. M. (2016). First detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in *Escherichia coli* in Italy. *ACS Infectious diseases*, 60(5), 3257–3258.
- Cavaco, L.M., Frimodt-Moller, N., Hasman, H., Guardabassi, L., Nielsen, L. y Aarestrup, F. M. (2008). Prevalence of quinolone resistance mechanisms and associations to minimum inhibitory concentrations in quinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and swine in Denmark. *Microbial Drug Resistance*, 14, 163-169.
- Chapman, J. S. (2003). Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(1), 133-138.
- Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Lucas López, R., Ben Omar, N., Valdivia, E. y Galvez, A. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* and *Bacillus weihenstephanensis* in raw vegetables by application of washing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. *International Journal of Food Microbiology*, 25(6), 762-770.
- Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K. A., Walsh, C., Burgess, C., & Fanning, S. (2012). Efficacy of biocides used in the modern food industry to control salmonella entérica, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and environmental microbiology*, 78(9), 3087–3097.
- Curiao, T., Marchi, E., Viti, C., Oggioni, M. R., Baquero, F., Martinez, J. L., & Coque, T. M. (2015). Polymorphic variation in susceptibility and metabolism of triclosan-resistant mutants of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical strains obtained after exposure to biocides and antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(6), 3413–3423.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E. y Courvalin, P. (2007). Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical Microbiology*, 20, 79-114.

- Dery, K.J., Soballe, B., Witherspoon, M.S., Bui, D., Koch, R. y Sherratt, D.J. (2003). The aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib encoded by Tn1331 is evenly distributed within the cell's cytoplasm. *Antimicrob Agents Chemother*, 47, 2897-2902.
- Di Pilato, V., Arena, F., Tascini, C., Cannatelli, A., Henrici De Angelis, L., Fortunato, S. y Rossolini, G. M. (2016). *mcr-1.2*, a New *mcr* Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(9), 5612–5615.
- Dominguez, J. E., Faccone, D., Tijet, N., Gomez, S., Corso, A., Fernández-Miyakawa, M. E., y Melano, R. G. (2019). Characterization of *Escherichia coli* carrying *mcr-1*-plasmids recovered from food animals from Argentina. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 41.
- Elliot, T. S. (1999). Antibacterial resistance in the intensive care unit. Mechanisms and management. *British Medical Bulletin*, 55(1), 259-276.
- FAO (2019). Seguridad alimentaria. Recuperado de <http://www.fao.org>
- Fernández Fuentes, M.A., Ortega Morente, E., Abriouel, H., Pérez Pulido, R. y Galvez, A. (2013). Antimicrobial resistance determinants in antibiotics and biocide- resistant gram-negative bacteria from organic foods. *Food Control*, 37, 9-14.
- Fraise, A. P. (2002). Biocide abuse and antimicrobial resistance a cause for concern?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), 11–12.
- Freijoso Santiesteban, E., Cires Pujol, M., Furones Mourelle, J.A., Hernández Cueto, M., Pérez Peña, J. y Rodríguez Ruíz, A. (1997). Manejo de las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA). *Bol Informac Terapéut APS*, 18(2), 165-168.
- Gadea, R., Fernández Fuentes M.A., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. y Ortega Morente, E. (2016). Adaptative tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Research International*, 85, 131-143.
- Gadea, R., Glibota, N., Pérez Pulido, R., Gálvez, y Ortega, E. (2017). Effects of exposure to biocides on susceptibility to essential oils and chemical preservatives in bacteria from organic foods. *Food Control*, 80, 176-182.

- García de Fernando Minguillón, G., Ordóñez Pereda, J. A., Asensio Pérez, M. A., Fernández-Salguero Carretero, J., Cabezas Redondo, L., Gómez Díaz, R. y Vioque Amor, M. (2002). Frutas y derivados. En R. Gómez Díaz (Eds.), *Microorganismos de los alimentos: Uso de datos para evaluar el control del proceso y la aceptación del producto* (pp. 217-240). Zaragoza: Acribia, S.A.
- García de Fernando Minguillón, G., Ordóñez Pereda, J. A., Asensio Pérez, M. A., Fernández-Salguero Carretero, J., Cabezas Redondo, L., Gómez Díaz, R. y Vioque Amor, M. (2002). Hortalizas y derivados. En R. Gómez Díaz (Eds.), *Microorganismos de los alimentos: Uso de datos para evaluar el control del proceso y la aceptación del producto* (pp. 179-215). España: Acribia, S.A.
- García de Fernando Minguillón, G., Ordóñez Pereda, J. A., Asensio Pérez, M. A., Fernández-Salguero Carretero, J., Cabezas Redondo, L., Gómez Díaz, R. y Vioque Amor, M. (2002). Utilidad de las pruebas microbianas para la seguridad y calidad. En G. García de Fernando Minguillón (Eds.), *Microorganismos de los alimentos: Uso de datos para evaluar el control del proceso y la aceptación del producto* (pp. 3-15). España: Acribia, S.A.
- Gilbert, P. y McBain, A. J. (2003). Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(2), 189–208.
- Grant, W. (1994). The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research*, 310(2), 175–185.
- Gu, D.X., Huang, Y.L. y Ma, J. H. (2016). Detection of colistin resistance gene *mcr-1* in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from an infant with diarrhea in China. *ACS Infectious Diseases*, 60(8), 5099–5100.
- Hellinger, W. C. (2000). Confronting the problem of increasing antibiotic resistance. *Southern Medical Journal*, 93(9), 842-848.
- Honorato Pérez, J., Campanero Martínez, M.A. y Sádaba Diaz de Rada, B. (2000). Bases del tratamiento antimicrobiano. Bases farmacológicas. En J. Picazo y M. Gómis (Eds.), *Bases para el tratamiento antimicrobiano* (pp. 28-45). Barcelona: Doyma.

- Hugo, W.B. y Russell, A. D. (1982). Types of antimicrobial agents. En A. D. Russell, W. B. Hugo y G. A. J. Ayliffe (Eds.), *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation* (pp.8-16). Oxford: Blackwell.
- Kruse, H., A.-M. Kirkemo, y K. Handeland. (2004). Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases*, 10(12), 2067-2072.
- Landers, T.F., Cohen, B., Wittum, T.E., y Larson, E.L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy and potential. *Public Health Reports*, 127, 4-22.
- Langsrud, S., Sidhu, M., Heir, E. y Holck, A. (2003). Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(4), 283–290.
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Knapp, C. W., Correa Galeote, D., Gálvez, A., y Abriouel, H. (2014). Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PloS one*, 9(12), 1-17.
- Levy, S. B. (2002). Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 92, 65-71.
- Livermore, D. M. (1991). Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 78, 7-16.
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A. y Carey, R. B. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(3), 268–281.
- Matthews, K., Bihm, E. Gravani, R., Solomon, E., Brandl, M., Mandrel, R., Fonseca, J. y Bruhn, C. (2006). Los microorganismos asociados a las frutas y a las verduras. En K. Matthews (Eds.), *Microbiología de las frutas y las verduras* (pp. 1-17). Zaragoza: Acribia, S.A.
- Maillard, J. Y. (2007). Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *Journal of Hospital Infection*, 65(2), 60–72.
- Maillard, J. Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 92(1), 16-27.

- Marshall, B. M. y Levy, S. B. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24, 718–733.
- McBain, A. J., Rickard, A. H. y Gilbert, P. (2002). Possible implications of biocide accumulation in the environment on the prevalence of bacterial antibiotic resistance. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(6), 326–330.
- McDonnell, G. y Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179.
- Ministerio para la Transición Ecológica (2019). Biocidas. Recuperado de <https://www.miteco.gob.es>
- Moosavian, M., & Emam, N. (2019). The first report of emerging mobilized colistin-resistance (*mcr*) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran. *Infection and drug resistance*, 12, 1001–1010.
- Moreillon, P. (2000). Means of bacterial resistance. *Revue Médicale Suisse*, 120, 641-650.
- Mustafa, Y. y Suna, E. (2008). Destroy Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. *Caryologia*, 61(1), 45-52.
- Mukherjee, A., Speh, D., Dyck, E. and Diez-Gonzalez, F. (2004). Preharvest evaluation of coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in organic and conventional produce grown by Minnesota farmers. *Journal of Food Protection*, 67(5), 894-900.
- Naparstek, L., Carmeli, Y., Chmelnitsky, I., Banin, E. y Navon-Venezia, S. (2012). Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Hospital Infection*, 81(1), 15–19.
- Olufunsho, A., Akintonwa, A. y Sunday, O. (2010). Mutagenic Screening of Crude Oil Fractions Using Modified Ames Test and *Allium cepa* (Linn) Assay. *American Journal of Pharmacology and Toxicology*, 5(1), 1-8.
- Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, M.A., Grande Burgos, M.J., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. (2013). Biocide tolerance in bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 162(1), 13-25.

- Palani, L. y Panneerselvam, N. (2007). Cytogenetic studies of food preservative in *Allium cepa* root meristem cells. *Medicine and Biology*, 14(2), 60-63.
- Piddock, L. J. V. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 382–402.
- Poirel, L., Jayol, A. y Nordmann, P. (2017). Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(2), 557–596.
- Poole, K. (2004). Acquired resistance. En A. Fraiese, P.A. Lambert y J-Y. Maillard (Eds.), *Ayliffe's principles and practice of disinfection, preservation and sterilization* (pp. 154-169). Malden: Blackwell Publishing Ltd.
- Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Symposium series Society for Applied Microbiology*, 92, 55S–64S.
- Romanova, N.A., Wolfs, P.F., Brovko, L.Y. y Griffiths, M. (2006). Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3498-3503.
- Rosas, G.A. y Acosta, V.M. (2001). Manual de manejo higiénico de los alimentos. Recuperado octubre de 2005, de <http://bvssan.incap.int>.
- Russell, A. D. (2004). Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of Hospital Infection*, 57(2), 97-104.
- Russell, A. D. (2003). Biocide usage and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infection Diseases*, 3(1), 794- 803.
- Russell, A. D. (2002). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 92, 121-135.
- Smith De Waal, C. y Vaughn Grooters, S. (2013). Antibiotic resistance in foodborne pathogens. En C. Smith De Waal y S. Vaughn Grooters (Eds.), *Center for Science in the Public Interest* (pp. 1-22). Washington.

- Vila, J., Marti, S. y Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1210-1215.
- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 439–445.
- Yao, X., Doi, Y., Zeng, L., Lv, L. y Liu, J. H. (2016). Carbapenem-resistant and colistin-resistant *Escherichia coli* co-producing NDM-9 and *MCR-1*. *Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 288–289.