

CAPÍTULO III.

Mecanismos de tolerancia a biocidas y métodos de evaluación de la tolerancia



● **Yaline Sánchez Neira**

ysanchez@uniboyaca.edu.co.
<https://orcid.org/0000-0002-6848-158X>.

Magíster en Salud Pública.
Universidad de Boyacá.

● **María Inés Torres Caycedo**

mariaitorres@uniboyaca.edu.co.
<https://orcid.org/0000-0003-0690-3182>.

Doctora en Seguridad de los Alimentos.
Universidad de Boyacá.

Introducción

Desde hace varios siglos, en el contexto mundial se han utilizado diferentes agentes y compuestos que ejercen una actividad antimicrobiana, para evitar una transmisión de microorganismos patógenos en diferentes entornos. Sin embargo, la actividad de estos agentes biocidas puede verse modificada por varios factores que disminuyen la acción o control de los microorganismos, bien sea por la concentración utilizada, el tiempo de acción, la temperatura, el pH, entre otros. De cierta forma, en estos casos los biocidas permiten que se presenten tolerancias a agentes químicos o biológicos y esto conlleva a la proliferación y diseminación de infecciones causadas por microorganismos. Ante el aumento de estas resistencias, se busca evidencia que permita conocer la relación entre la tolerancia bacteriana que se presenta actualmente en los diferentes biocidas, la resistencia a los antibióticos y los mecanismos de acción de los biocidas.

Es importante conocer y comprender la causa del incremento de la tolerancia de los biocidas y de la expresión de la resistencia de los diferentes microorganismos a las sustancias con acción biocida. El propósito es mitigar el impacto de la transmisión de microorganismos patógenos que implican determinantes de resistencia, tolerancia y a su vez de virulencia.

Este capítulo aborda, clasifica y presenta los mecanismos de acción de los diferentes agentes químicos, ya sean de origen sintético o natural, y de las bombas de eflujo. Estas últimas se caracterizan por transportar varios agentes

químicos del interior al exterior de la bacteria, mediante sistemas que actúan específicamente en cada una de las familias de bombas de eflujo. Por otro lado, describe los métodos de evaluación de la tolerancia a los biocidas que se utilizan en cosmética, desinfección y disminución de cargas microbianas en diferentes superficies y fómites en ambientes hospitalarios, domésticos e industriales. Finalmente, presenta los resultados de investigación en diferentes microorganismos y biocidas.

Biocidas

Las sustancias con efecto antibiótico y biocida son compuestos utilizados desde siglos atrás para la inhibición o eliminación del desarrollo bacteriano. Estos se diferencian entre ellos por aspectos como los mecanismos de acción, las aplicaciones de cada uno y el espectro. Así, se pueden tratar no solo las enfermedades bacterianas con antibióticos, sino que sirven también como agentes que permiten preservar o promover el crecimiento. Por otro lado, los biocidas se utilizan como antisépticos, conservantes o desinfectantes para impedir el crecimiento y multiplicación de diferentes microorganismos (bacterias, hongos, virus) en el entorno hospitalario, doméstico, veterinario o industrial. Por eso, el riesgo de corresponsencia y resistencia cruzada a ambos agentes es un problema de salud pública (Fuentes *et al.*, 2014; Gilbert & McBain, 2003).

Los biocidas son de origen sintético o biológico. Actualmente existe un gran número de compuestos para el control, destrucción y neutralización de microorganismos, pero no ejercen una actividad específica para determinado grupo bacteriano. Estos compuestos forman parte de los procedimientos y estrategias que se utilizan para disminuir la presentación y propagación de infecciones en el ámbito asistencial, pues se ha evaluado su eficacia en métodos de

desinfección (Russell, 2002). Desde el punto de vista de los mecanismos de acción, los antibióticos han sido conocidos y documentados con evidencia científica, mientras que los biocidas se encuentran en investigación respecto a las diferentes concentraciones, interacciones bioquímicas y sitios de acción (Cabrera *et al.*, 2007; Gilbert & McBain, 2003).

Dentro de los biocidas se encuentran los desinfectantes, los antisépticos, los conservantes, los pesticidas, los herbicidas, los fungicidas y los insecticidas (Ministerio de la Presidencia Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática, 2002), ampliamente utilizados tanto en superficies inanimadas como en la piel, bien sea de manera única o a partir de mezclas. De acuerdo con Hernández-Navarrete *et al.* (2014), la actividad de estos productos químicos depende del tipo de formulación, concentración, pH, periodo de contacto y de la presencia de otros compuestos orgánicos e inorgánicos que influyen en la acción y que permiten agruparlos en 22 categorías químicas con una gran variedad de compuestos (Denyer, 1995; Hernández-Navarrete *et al.*, 2014).

Según Garçao Curiao (2014), existe un grupo de agentes químicos “compuestos de amonio cuaternario (QACs), cloruro de benzalconio (BKC) y cetrimida” que hace parte de esos biocidas de origen catiónico formados a partir de un nitrógeno cuaternario y un conjunto de sustancias hidrófobas. Por otro lado, existen agentes químicos formados por dos grupos catiónicos, los cuales se encuentran aislados por un grupo hidrofóbico y son las bisbiguanidas y la clorhexidina (CHX) o alexidina. Finalmente, la biguanida polihexametileno PHMB presenta más de dos grupos catiónicos.

Cabe destacar que, ante la exposición de biocidas catiónicos como los compuestos de amonio cuaternario, se presenta un desequilibrio en la membrana celular de la bacteria, lo que genera una lisis celular por un movimiento de cationes

divalentes. Así mismo, se produce un daño de la membrana externa con pérdida de contenido citoplasmático en bacterias Gram negativas. Por otro lado, la clorhexidina produce una alteración en la permeabilidad de la membrana, gracias a los grupos etilexil terminales, que hacen que sea uno de los agentes más utilizados en higiene de manos y a nivel oral, pues destruyen las bacterias (Denyer, 1995; González *et al.*, 2014).

De acuerdo con Garçao Curiao (2014), uno de los agentes fungicidas y antibacterianos de amplio espectro más utilizado en higiene oral y de la piel es el triclosán, el cual hace parte del grupo de los bisfenoles, conformado por dos anillos fenólicos. Este tipo de biocida ejerce actividades específicas de inhibición en la proteína que participa en el anabolismo de ácidos grasos y de daños a nivel del citoplasma. Según Russell (2004), este agente permite que exista una desestabilización bacteriana según las diferentes concentraciones con las cuales se utilice, pues su resultado varía desde la inhibición en procesos de absorción de nutrientes requeridos por los diferentes microorganismos hasta la destrucción celular. Es así como su uso se extiende a diferentes mercados tanto a nivel industrial como en servicios del hogar (Garçao Curiao, 2014; Russell, 2004).

En ese mismo contexto se encuentra uno de los agentes derivados del cloro. Si bien existen diferentes formas de presentación, el hipoclorito de sodio sigue siendo el más utilizado para la desinfección de superficies, agua e infecciones. Los hipocloritos presentan una gran variedad de actividad que hace que se consideren fungicidas, esporicidas, bactericidas y virucidas, aunque es poco definida la cloración o mecanismo de acción de estos agentes (Sáenz y Sánchez, 2005).

Los datos presentados en la tabla 5 compilan diferentes biocidas de uso frecuente. Allí se describen los grupos, los compuestos y las funciones.

Tabla 5. Biocidas: grupos, compuesto y función

Grupo	Biocida	Función	Fuente
Amonio cuaternario	Cloruro de benzalconio	Son tensoactivos que facilitan la unión de manera irreversible a fosfolípidos y proteínas de membrana. Adicionalmente, la porción hidrofóbica dentro de la membrana genera alteración de la permeabilidad y una disfunción de la cadena respiratoria.	Wessels & Ingmer (2013)
Biguanidinas	Clorhexidina	Se asocian fuertemente a sitios aniónicos encima de la membrana y pared celular, mientras que generan un movimiento de los cationes divalentes Mg2+ y Ca2+. Esto reduce la fluidez de la membrana y provoca variación osmótica en la célula bacteriana.	Gilbert & Moore (2005)
Fenoles	Triclosán	Produce variaciones en la membrana bacteriana y el compuesto logra ser absorbido por difusión al citoplasma bacteriano. Causa daño principalmente en las vías metabólicas de síntesis de ácidos grasos, que inhibe enzimas como la NADH-reductasa dependiente de ácidos grasos.	Schweizer (2001)
Aldehídos	Glutaraldehído	Daño en las proteínas de la pared y membrana bacteriana, lo que interfiere en los grupos tioles, aminos y sulfhídricos. Por lo tanto, la unión a estos grupos “fijan” estructuras y enzimas con inhibición en la función básica de supervivencia bacteriana.	Gilbert & Moore (2005)
Alcoholes	Alcoholes	Produce alteraciones en la membrana y proteínas bacterianas. Ante el contacto con agua, ocasiona la desnaturalización y daños metabólicos que permiten una rápida lisis bacteriana.	Gilbert & Moore (2005)
Halogenados y Peróxido de hidrógeno	Yodo, cloro y peróxido de hidrógeno	Altamente reactivos que participan como oxidantes y radicales libres capaces de interactuar con componentes celulares como ribosomas y diversas proteínas.	Maillard (2002)

Fuente: elaboración propia con base en datos de López *et al.*, (2010).

Estos antisépticos y desinfectantes anteriormente mencionados generan presión ambiental ante su uso indiscriminado, pues este implicaría la posibilidad de

resistencias bacterianas en diferentes entornos y el desarrollo de resistencias cruzadas con antibióticos (Gnanadhas *et al.*, 2013).

Mecanismos de tolerancia a los antisépticos y desinfectantes

Actualmente existen conocimientos significativos respecto a las reacciones de las bacterias frente a aquellos compuestos que pueden producir su muerte. La tolerancia que presentan pueden ser de dos formas: mediante una propiedad intrínseca demostrada principalmente en microorganismos Gram negativos, como esporas bacterianas y micobacterias, y en microorganismos Gram positivos, como especies del género de *Staphylococcus* (Partridge *et al.*, 2018); y, según Cabrera *et al.* (2007), mediante “mutación o adquisición de plásmidos (autorreplicación, ADN extracromosómico) o transposones (cromosomal o integrado en plásmidos, cassettes de ADN transmisibles)”. Por consiguiente, un gen de resistencia en plásmidos se deriva de una mutación puntual en un gen blanco en las bacterias que van a estar susceptibles, así como aquellos genes que van a proveer protección contra otras bacterias.

En efecto, tanto antisépticos como desinfectantes son utilizados frecuentemente en cantidades considerables en centros de salud, laboratorios y sobre todo en la parte asistencial de hospitales, para la prevención de infecciones adquiridas durante la estancia del paciente. En la tabla 6 y en la figura 12 se resumen e ilustran los mecanismos de acción y lugares blanco de los principales agentes químicos utilizados en desinfección (Cabrera *et al.*, 2007; Hernández-Navarrete *et al.*, 2014).

Tabla 6. Mecanismos y lugar de acción de los principales agentes químicos utilizados como antisépticos y desinfectantes

Desinfectante/ Antiséptico	Mecanismo de acción	Lugar de acción
Compuestos de Amonio Cuaternario	Afectación general en la membrana y disminución de la síntesis de fosfolípidos.	Membrana interna citoplasmática
Clorhexidina	Concentraciones disminuidas dañan la integridad de la membrana. Concentraciones elevadas generan congelación del citoplasma.	
Diaminas	Induce la supresión de aminoácidos.	
Fenoles	Pérdida y desajuste.	
Glutaraldehído	Unión cruzada a proteínas	Envoltura celular (pared celular, membrana externa)
EDTA, otros permeabilizantes	Bacteria Gram negativa: eliminación de Mg^{++} , liberación de algunos lipopolisacáridos	
Halógenos	Inhiben la síntesis del ADN	Alteración del ADN
Peróxido de hidrógeno, iones de Plata	Rompimiento de la hebra de ADN	
Acridinas	La acridina se coloca entre dos pares de bases del ADN, lo que ocasiona su separación	Intercalación con el ADN
Formaldehído	Uniones y combinaciones entre las proteínas, ARN y ADN.	Unión cruzada a acromoléculas
Glutaraldehído	Forma puentes de unión de proteínas de la envoltura celular y otros sitios celulares	
Compuestos con plata	Acción de grupos tiol con enzimas que se ensamblan a membrana	Interacción con grupos tiol (un átomo de azufre y un átomo de hidrógeno (-SH))
Halógenos	Oxidación de los grupos tioles a disulfitos, sulfóxidos o disulfóxidos	Agentes oxidantes
Peroxígenos	En el peróxido de hidrógeno se forman radicales libres $OH\cdot$ que oxidan a los grupos tioles en enzimas y proteínas. Ácido paracético: inhibe los grupos tioles en proteínas y enzimas	

Fuente: elaboración propia con base en datos de Cabrera *et al.*, (2007)

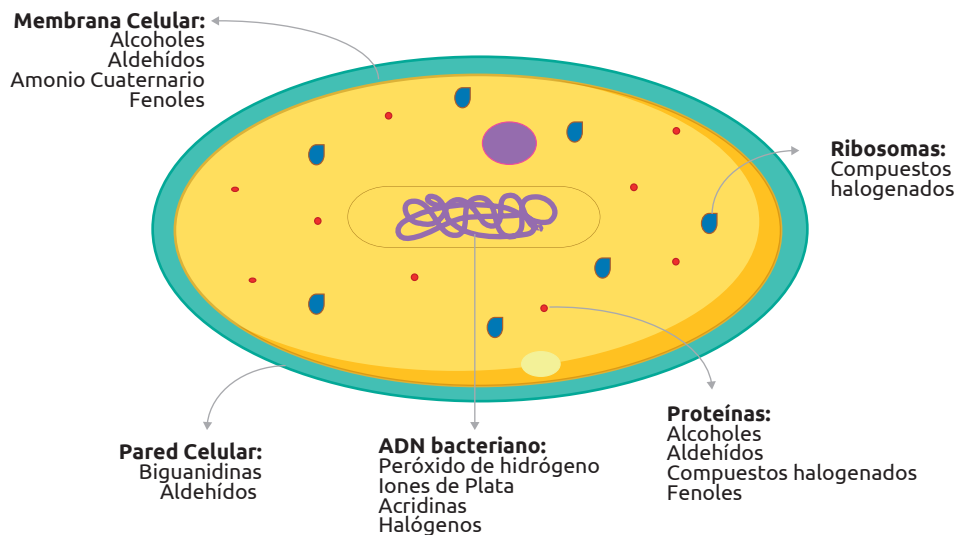


Figura 12. Acción de los biocidas en las células bacterianas
Fuente: elaboración propia

Tolerancia / Resistencia a biocidas

Teniendo en cuenta lo presentado por Russell (1997), la expulsión de los agentes químicos, principalmente a partir de las bombas de eflujo y bloqueo en la entrada de dichos agentes a la membrana celular, se presenta por las formas intrínsecas como extrínsecas, lo que conlleva incrementos en la tolerancia bacteriana a los diferentes biocidas.

Sin embargo, la falta de membrana externa permite en algunos microorganismos que los biocidas actúen directamente en la estructura bacteriana y, como menciona Garçao Curiao (2014), causen daño a las proteínas, composición de ácidos grasos o fosfolípidos, que permiten que se presenten procesos de respuesta y expulsión ante un estrés, cambios en las características hereditarias, así como en la actividad metabólica, que facilitan la resistencia a los biocidas.

Bombas de eflujo

Las bombas de expulsión/eflujo, son un mecanismo de resistencia mixto, puede ser adquirido cuando está presente un elemento genético móvil o cuando una mutación ocasiona su sobreexpresión o es intrínseco si están codificadas por el propio ADN del microorganismo. Estas exportan un amplio rango de compuestos como biocidas, colorantes o antibióticos mediante gradientes de iones transmembrana (protones o sodio) o por la hidrólisis del ATP. La expresión de las bombas de exporte suele estar sometida a regulación transcripcional a través de productos de genes activadores o represores que se unen al ADN.

En la figura 13 se muestra un esquema de bomba de eflujo y su posición en la membrana y el periplasma bacteriano (Tauch *et al.*, 2003).

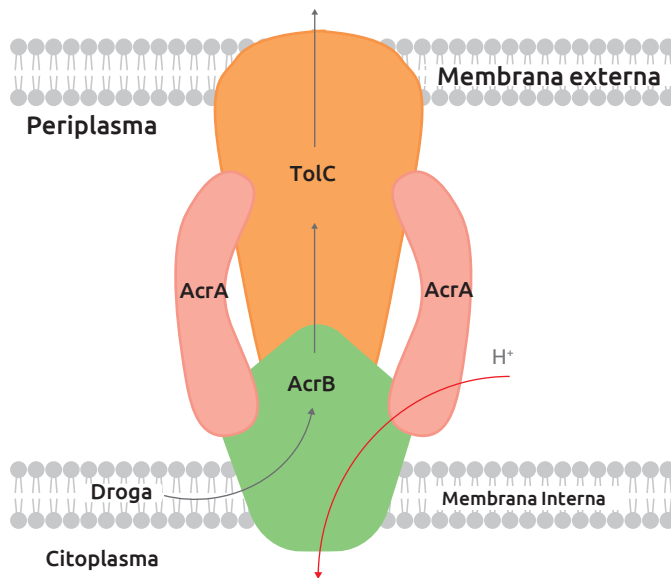
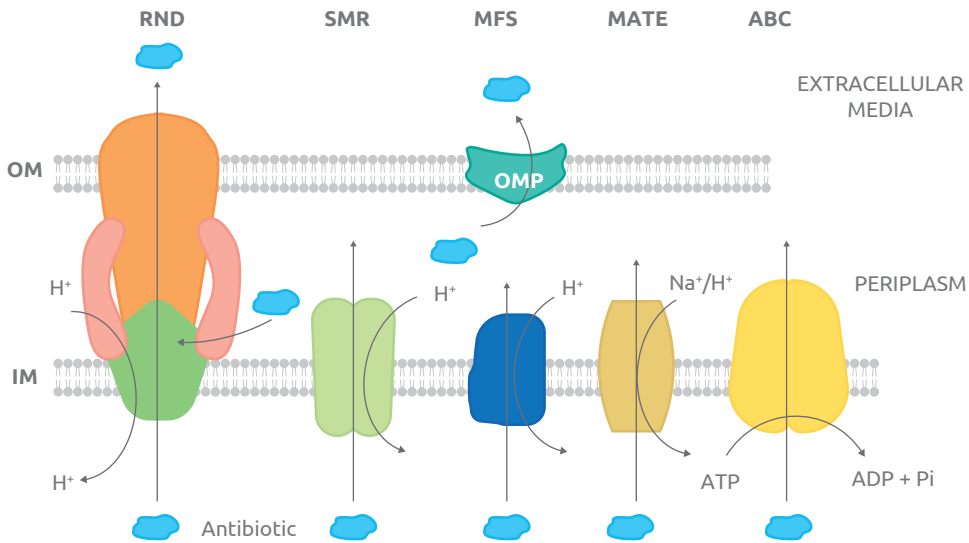


Figura 13. Bomba de eflujo que representa la salida del complejo tripartito ensamblado (AcrAB-TolC). Fuente: Modificado de Blair & Piddock (2009).

Los genes de bombas de expulsión/eflujo, localizados en plásmidos o en el cromosoma bacteriano, se dividen en cinco grandes familias de acuerdo con su composición, el número de regiones transmembrana, las fuentes de energía y los sustratos (figura14).



● **Figura 14.** Cinco grandes familias que componen los genes de bombas de eflujo
Fuente: Tomado de Wales & Davies (2015).

Familia de resistencia, división, nodulación (RND, resistance nodulation division)

Esta familia se ha descrito en bacterias Gram negativas y sus 16 miembros suelen estar formados por un sistema de tres componentes AcrAB/TolC (como se observa en la figura 15) con un gran dominio periplasmático (en torno a 1000 aminoácidos divididos en 12 hélices). AcrB se une a una proteína periplásmica de fusión AcrA (en torno a 400 aminoácidos) y a un poro de la membrana externa, TolC (sobre 500 aminoácidos), para formar un canal tripartito que va desde el citoplasma hasta el exterior, pasando

por la membrana externa. Se divide en tres subfamilias encargadas del antiporte de fármacos, metales, biocidas o lipooligosacáridos (Rosenberg *et al.*, 2003).

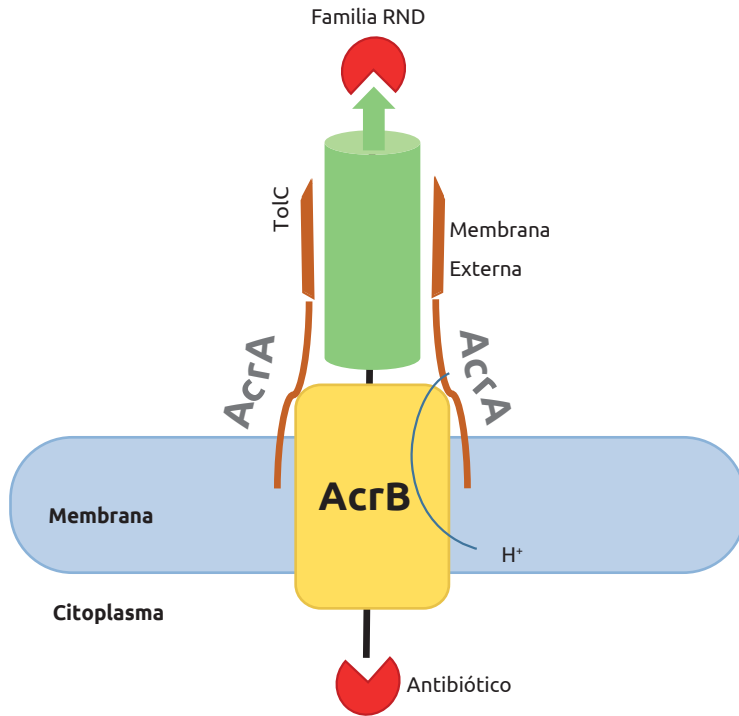


Figura 15. Bomba de eflujo de la familia de resistencia, división, nodulación (RND)

Fuente: elaboración propia con base en datos de Garçao Curiao (2014)

Familia de resistencia a múltiples fármacos de pequeño tamaño (SMR, small multidrug resistance)

Existen bombas de resistencia a múltiples fármacos que se caracterizan por tener proteínas de tamaño reducido con cuatro fracciones. Estas facilitan la expulsión de agentes antibacterianos, principalmente aquellos de origen catiónico como los compuestos de amonio cuaternario (figura 16), y son reguladas por plásmidos que contribuyen a que

se ejerza una defensa contra estos compuestos (Lavilla *et al*, 2014). En este mismo contexto, se resalta lo presentado por Garçao Curiao (2014), para los sustratos como “azúcares, péptidos, carbohidratos, antimicrobianos de alto peso molecular y metales” que son de difícil transporte por ser de gran tamaño.

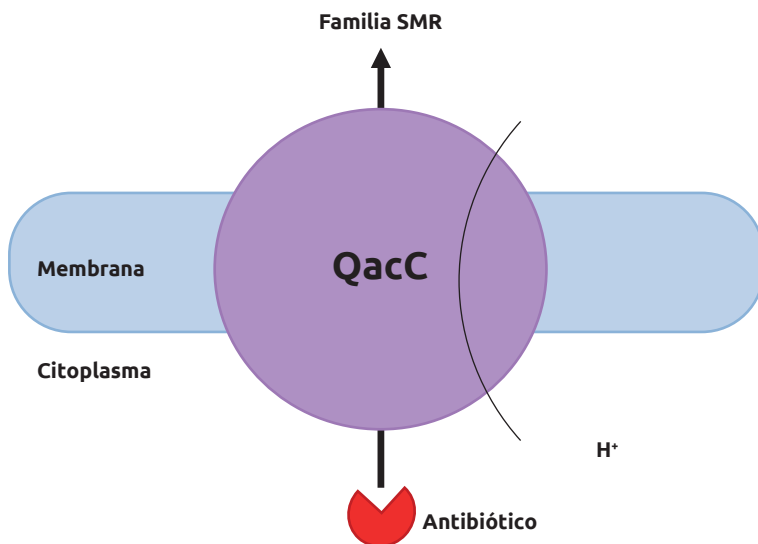


Figura 16. Bomba de eflujo de la familia de resistencia a múltiples fármacos de pequeño tamaño (SMR)
Fuente: elaboración propia con base en datos de Garçao Curiao (2014)

Superfamilia del facilitador mayor (MFS, major facilitator superfamily)

Los miembros de la familia MFS son proteínas transportadoras de membrana con un tamaño cercano a 400 aminoácidos estructurados en 12 hélices transmembrana, como TetB, o en 14 hélices, como QacA (figura17), encargadas del simporte, antiporte o uniporte de varios sustratos como fármacos o biocidas. Se dividen en 17 subfamilias que pueden encontrarse en procariotas y eucariotas y se han descrito aproximadamente 500 miembros. En bacterias Gram negativas, estos sistemas pueden funcionar

como componentes de sistemas tripartitos junto a los canales adicionales MFPs (membrane fusion proteins) y OM (outer membrane), como los sistemas EmrAB-TolC o EmrKY-TolC descritos en *E. coli* (Floyd *et al.*, 2010; Fluman & Bibi, 2009).

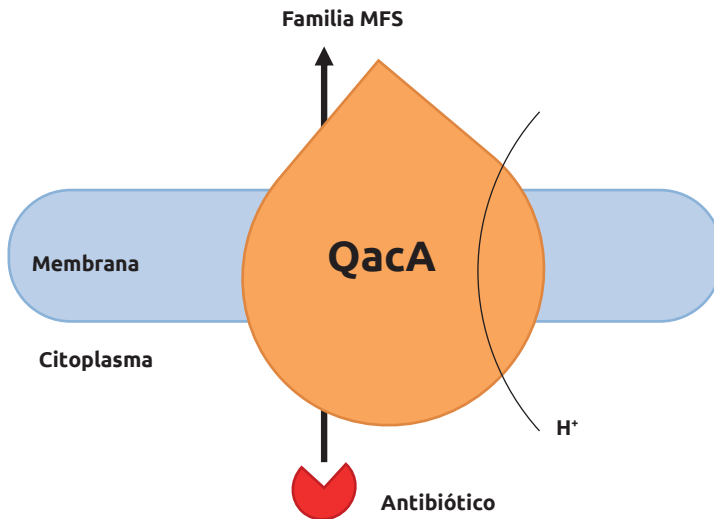


Figura 17. Bomba de eflujo de la Superfamilia del facilitador mayor (MFS)

Fuente: elaboración propia con base en datos de Garção Curiao (2014)

Familia de múltiples fármacos y tóxicos (MATE, multidrug and toxic-compound extrusion)

En esta familia se encuentran proteínas conformadas por 12 fragmentos transmembrana. Según Lavilla (2014), estas usan energía a partir de “iones de Na⁺, con bombas como la NorM de *Vibrio parahaemolyticus* (como se observa en la figura 18), y están presentes en bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas”.

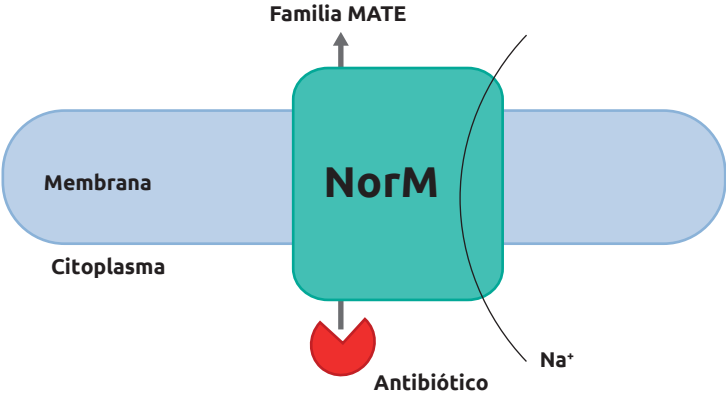


Figura 18. Bomba de eflujo de múltiples fármacos y tóxicos (MATE)
Fuente: elaboración propia con base en datos de Garçao Curiao (2014)

**Familia de casete de unión al ATP
(ABC, ATP binding cassette)**

Esta familia presenta factores que dependen de la hidrólisis del ATP (como se muestra en la figura 19) y utiliza la energía en los procesos de los mecanismos de resistencia bacteriana. En ella se destacan tres condiciones a nivel funcional: “los exportadores (clase I), los no involucrados en transporte (clase II) y los importadores (clase III)” (Céspedes, 2009, p.18).

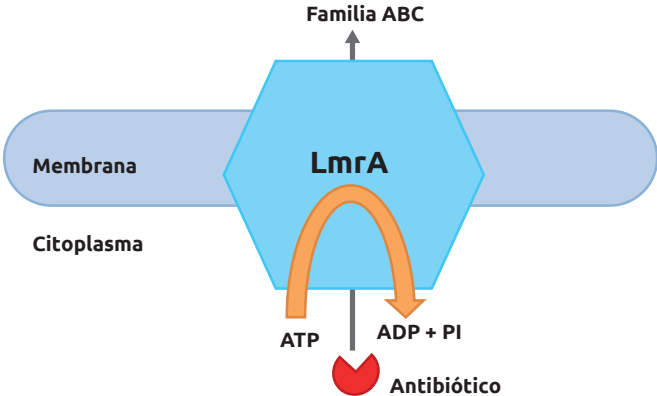


Figura 19. Bomba de casete de unión al ATP (ABC)
Fuente: elaboración propia con base en datos de Garçao Curiao (2014)

Materiales y métodos

Para los ensayos de microtitulación de biocidas fueron probados compuestos como cloruro benzalconio, cetrimide, clorhexidina y triclosán, y se utilizaron diferentes concentraciones de la sustancia del biocida. Las diluciones de cada biocida se prepararon en un medio nutritivo líquido estéril como tripticasa, soya o caldo infusión cerebro corazón. A excepción del triclosán que requiere dilución inicial en alcohol etílico de 96°, los demás biocidas se prepararon en el medio. Las cepas de prueba fueron cultivadas mediante incubación en agitación y alcanzaron en 18 horas el crecimiento exponencial suficiente para obtener un recuento celular estándar equivalente al patrón McFarland N° 0,5 (Cottell, *et al.*, 2009).

El montaje en las placas de microtitulación tuvo un volumen final de 200 μ l por pozo. El inóculo bacteriano correspondió a un volumen de 20 μ l de la dilución del cultivo bacteriano en SS al 0,85 % en 180 μ l de biocida (estandarizando el recuento de células). Las diluciones de biocidas que se propusieron para estos ensayos correspondieron a C1: 1 %, C2: 0,25 %, C3: 0.0025 %, C4: 0.00025 % y C5: 0,00025 %. Las cepas bacterianas se aplicaron a las 5 concentraciones de biocidas, teniendo en el templado de la placa controles para biocidas, medio BHI (control de esterilidad) y control de crecimiento de cepas (control de vitalidad) (figura 20).

# CEPA	# 1	# 2	# 3	# 4	# 5	# 7	# 8	# 9	# 10	# 11	# 12	# 13
CONCENTRACIÓN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A (A(c1)c1)	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa	180 µl C1 + 20 µl Cepa
B (c2)	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa	180 µl C2 + 20 µl Cepa
C (c3)	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa	180 µl C3 + 20 µl Cepa
D (c4)	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa	180 µl C4 + 20 µl Cepa
E (c5)	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa	180 µl C5 + 20 µl Cepa
F (control cepa)	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa	180 µl caldo BHI + 20 µl Cepa
G (control Biocida)	Ci 200 µl	Ci 200 µl	C1 200 µl	C1 200 µl	C2 200 µl	C2 200 µl	C3 200 µl	C3 200 µl	C4 200 µl	C4 200 µl	C5 200 µl	C5 200 µl
H (control caldo)	180 µl caldo BHI	180 µl caldo BHI										

Figura 20. Montaje microdilución para determinación de tolerancia a biocidas
Fuente: Elaboración propia

Este procedimiento fue realizado en condiciones óptimas de esterilidad e incubado a 37°C por 24 horas. La lectura de la tolerancia se basó en la determinación de la absorbancia de cada pozo de prueba, teniendo en cuenta la lectura inicial de los controles: el control del medio debe ser negativo, la lectura de la absorbancia debe ser <0,050, que es considerado el blanco, y la del medio de cultivo y crecimiento 0. De otra parte, se verificó el control de viabilidad para cada cepa que debe reportar crecimiento. La lectura se realizó a 595 nm. Para los estudios del grupo se trabajó con el equipo Imark – Biorad®. La lectura de tolerancia se realizó calculando el resultado de la lectura de la turbidez de cada pozo de prueba menos el control de biocidas en cada dilución. Se estableció un punto de cohorte con absorbancias > a 0,500. Lecturas inferiores muestran una actividad biocida.

Resultados

Ensayo con bacterias saprófitas (Matriz cárnicos)

La tolerancia reportada por las cepas de Gram negativos a los cuatro biocidas ensayados mostró el 1,2 % de cepas con intolerancia; es decir, no hubo crecimiento de las cepas en la menor concentración ($<C5:0.00025$ %). Sin embargo, el triclosán (TC) fue el biocida en el que se mostró mayor número de cepas intolerantes, seguido de cloruro de benzalconio (BC), clorhexidina (CHX) y, por último, cetrimide (CT). El 98,8 % mostraron tolerancia principalmente en las concentraciones C5 (0,00025 %) y C4 (0,0025 %). La concentración con mayor tolerancia de las cepas en estudio fue en la C4: la clorhexidina es el biocida que muestra mayor número de cepas tolerantes. De otro modo, la tolerancia en las concentraciones C1 y C2 fue poco frecuente.

La resistencia se determinó principalmente en el triclosán y el cloruro de benzalconio, que son biocidas que se han referido como los de mayor espectro de uso y se han utilizado por mayor tiempo. Las cepas en estudio provienen de un ambiente no expuesto a presión antibiótica o antimicrobiana, sin embargo, se debe considerar que estos géneros corresponden a microbiota proveniente posiblemente de la manipulación (sacrificio, preparación en canal, transporte, comercialización) (figura 21).

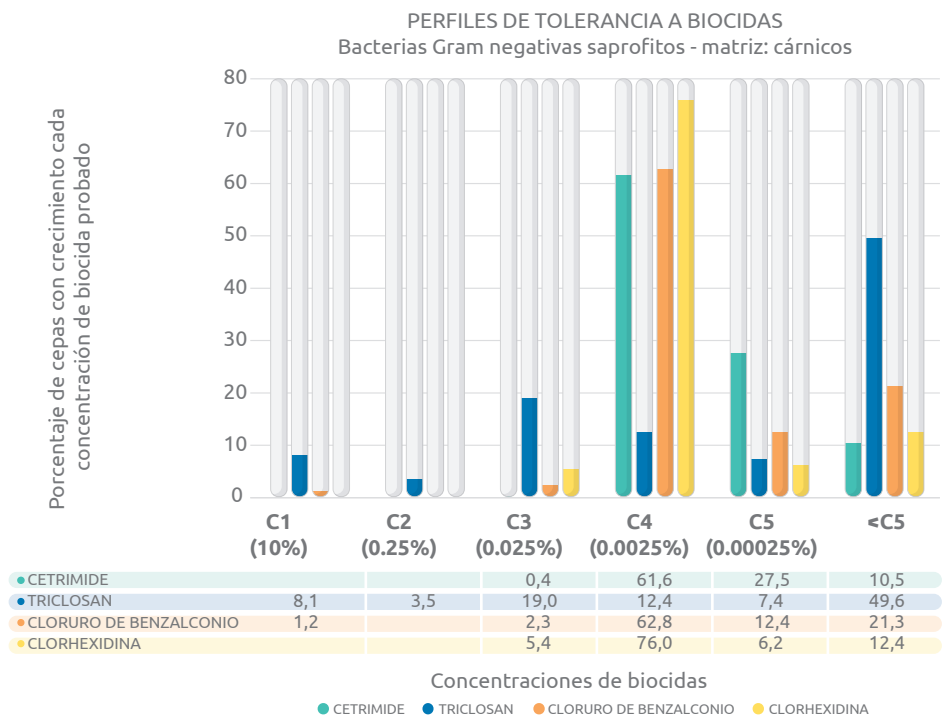


Figura 21. Tolerancia de biocidas a bacterias saprófitas Gram negativas aislados de matriz de cárnicos
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

Los resultados muestran los perfiles de tolerancia frente a los biocidas, probados en diferentes concentraciones. Los géneros bacterianos crecieron principalmente en la concentración C4, donde se colocaron los saprófitos probados para los géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Serratia*, que muestran tolerancia a los biocidas CHX, BC, CT y en menor porcentaje TC en los otros géneros *Salmonella*, *Shiguelia*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Hafnia*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*. De otra parte, de *Plesiomonas*, *Tatumella*, *Providencia* y *Rahnella* se presentó tolerancia en esta concentración para los biocidas CT, CHX y BC, excepto al triclosán (figura 22 a la 26). La tolerancia a CT se presentó principalmente en las concentraciones C5 y C4.

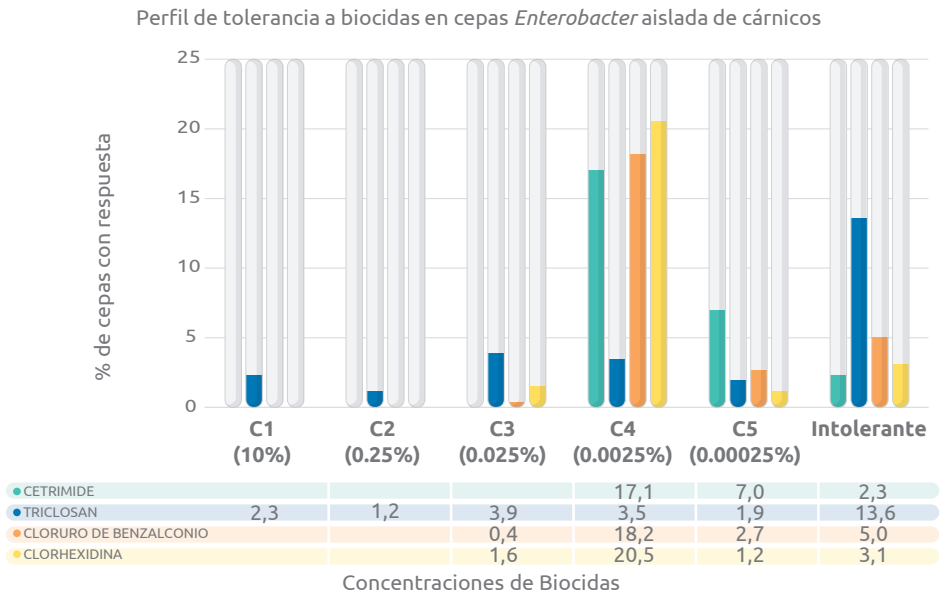


Figura 22. Perfil de tolerancia a biocidas género *Enterobacter* aislado de cárnicos.
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

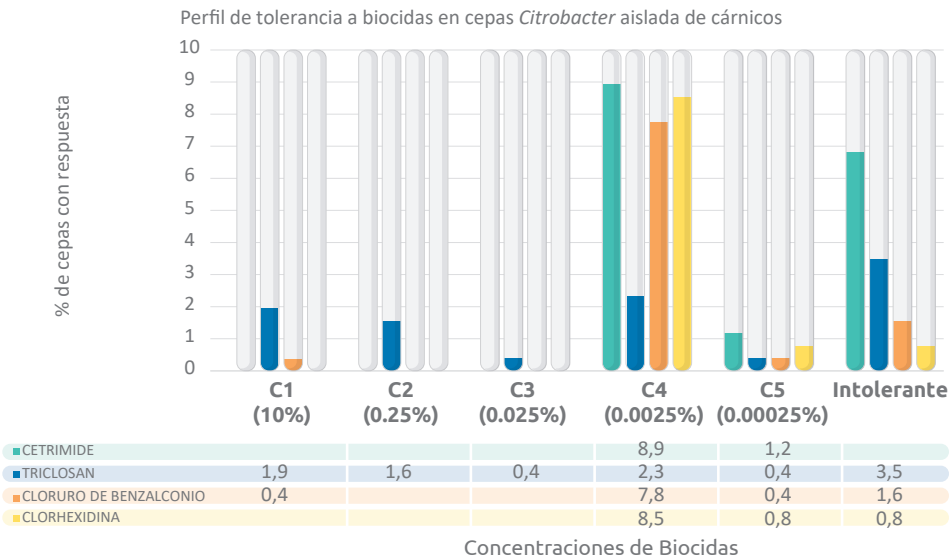


Figura 23. Perfil de tolerancia a biocidas género *Citrobacter* aislado de cárnicos.
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

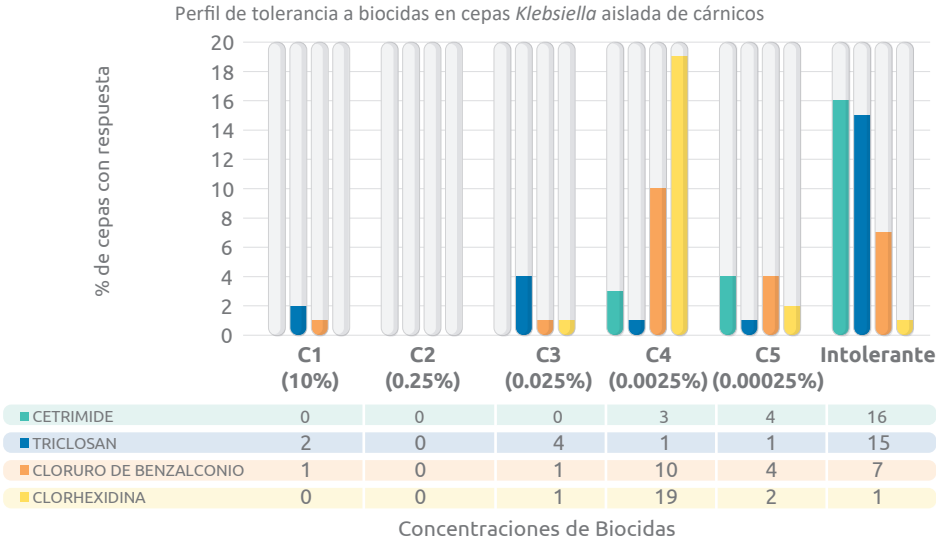


Figura 24. Perfil de tolerancia a biocidas del género *Klebsiella* aislado de cárnicos
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

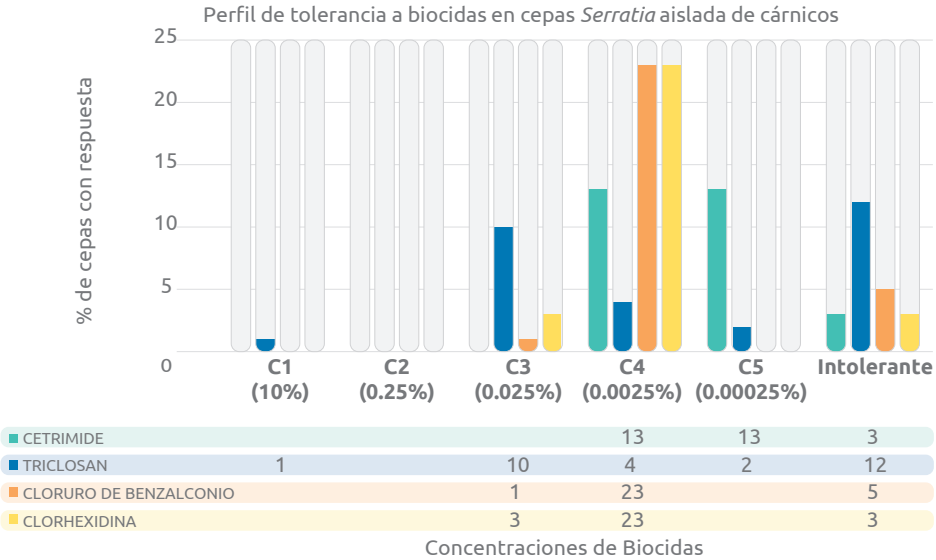


Figura 25. Perfil de tolerancia a biocidas del género *Serratia* aislada de cárnicos.
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

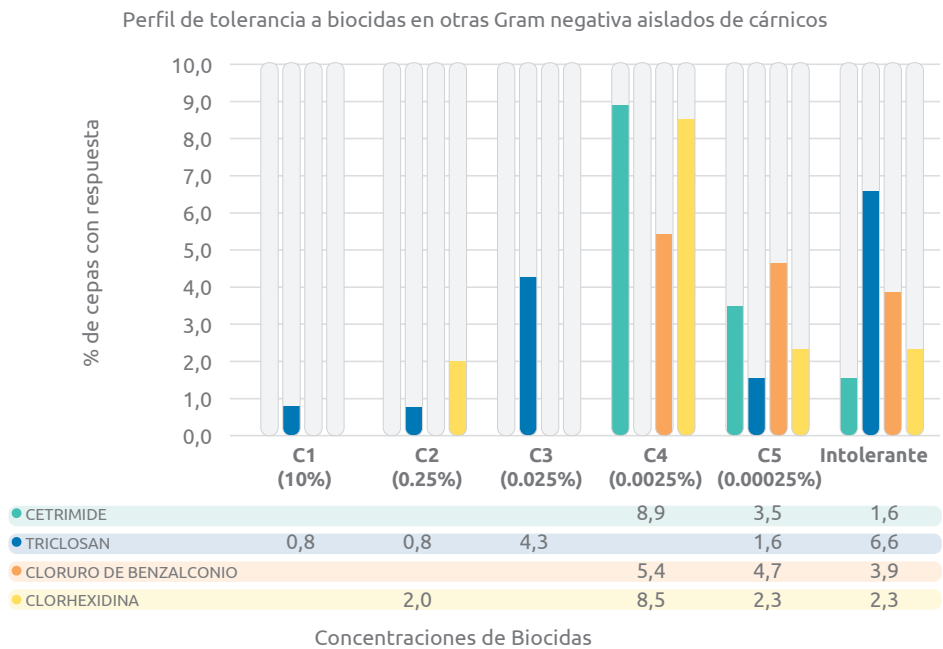


Figura 26. Perfil de tolerancia de otros géneros de Gram negativos aislados de cárnicos
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

Ensayo con bacterias de aislados clínicos

Se expusieron 71 aislados clínicos que presentaron diferentes perfiles de resistencia a sustancias antibióticas. Los fenotipos relacionados fueron AmpC y BLEE. Los ensayos se realizaron con la metodología anteriormente expuesta.

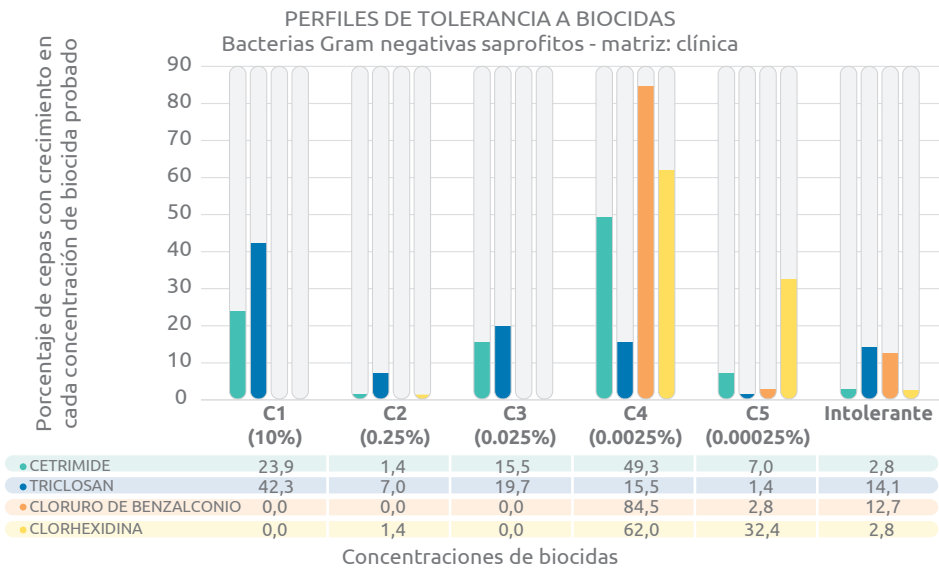


Figura 27. Perfil de tolerancia a biocidas en Gram negativos aislados del ambiente clínico
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

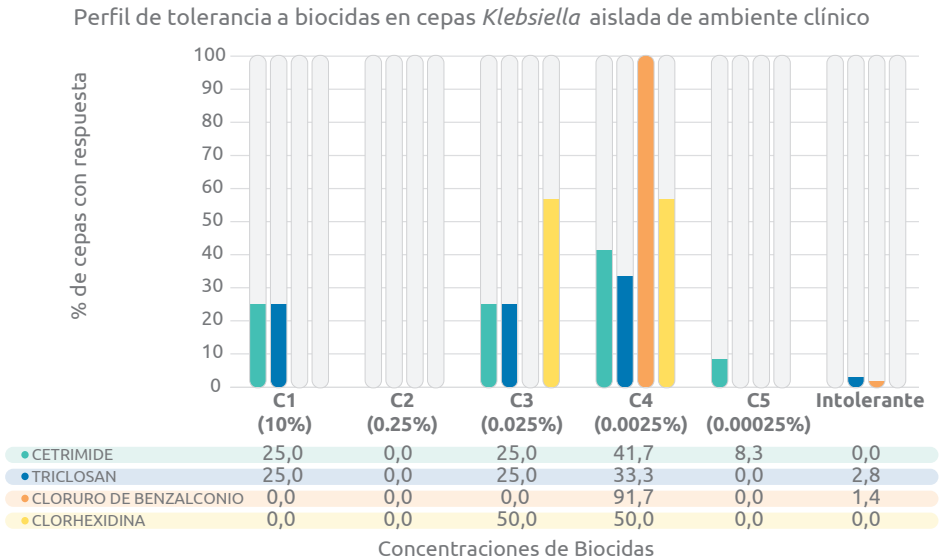


Figura 28. Perfil de tolerancia a biocidas del género *Klebsiella* aislado del ambiente clínico
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

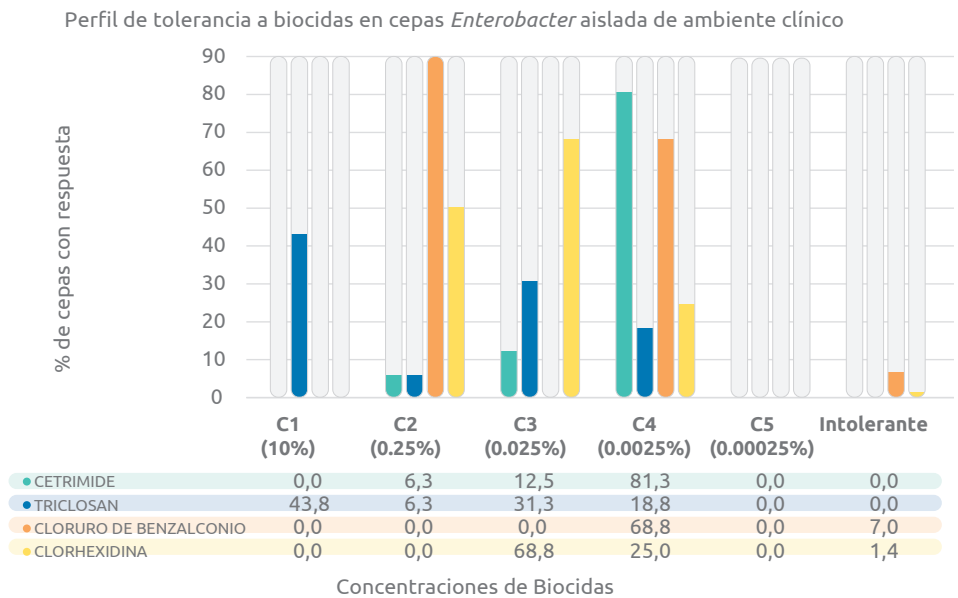


Figura 29. Perfil de tolerancia a biocidas del género *Enterobacter* aislada del ambiente clínico
Fuente: Tomado de Rosas-Leal, López-Velandia, Torres-Caycedo y Merchán (2019).

Discusión

Los géneros aislados de cárnicos muestran bajos perfiles de tolerancia a los cuatro biocidas probados CT, BC, CHX, y TC. Es decir, se presenta crecimiento bacteriano en todos los géneros de Gram negativos. Esta respuesta puede estar mediada por mecanismos de susceptibilidad intrínsecos, como la producción de enzimas, expresión de bombas de eflujo, cambios en la permeabilidad celular o capacidad de producción de biopelículas y quorum sensing. En el presente estudio se aislaron grupos en los que se han reportado estas tolerancias aumentadas anteriormente, y géneros bacterianos relacionados con formación de biofilms. Posiblemente, estos géneros han sido expuestos a la presión microbici­da proveniente de los ambientes que se

generan en una cadena de producción (Mah & O'Toole, 2001; Webber, 2003; Amaral *et al.*, 2014).

En todos los biocidas y géneros bacterianos, tanto en cárnicos como en clínica, la concentración que presentó mayor tolerancia fue la 4 (0,0025 %), con resultados similares a otros estudios (Lerma *et al.*, 2015 y Garrido *et al.*, 2015) en los que se estudiaron psicrófilos y bacterias del género *Salmonella* presentes en producción de cárnicos. Para los aislados clínicos se puede observar similitud en la respuesta de tolerancia en los biocidas cetrimida, cloruro de benzalconio y clorhexidina con otros estudios que exploraron cepas de *Enterobacter* multirresistentes (Boutarfi *et al.* 2019).

El hallazgo de bacterias que presentan tolerancia a los biocidas implica un riesgo potencial en las cadenas de producción y entornos de procesamiento de carnes. Este incremento en la tolerancia se puede adquirir mediante la exposición a concentraciones de biocidas que no son letales para la célula bacteriana o por la exposición cruzada con antibióticos. En combinación con las prácticas de desinfección, el uso de antibióticos como promotores o agentes terapéuticos podría generar la coselección de bacterias patógenas (Spellberg & Gilbert, 2014).

Los resultados de tolerancia en estas cepas que provienen del ambiente de manipulación son importantes porque el mecanismo por el cual se genera el aumento de la tolerancia a las concentraciones de biocidas que se consideran seguras pueden estar asociados a la presencia de elementos genéticos. Además, al estar estas bacterias en un ambiente de relación zoonótica, podrían transmitirse algunos géneros directamente a través de la cadena alimentaria. Dichos géneros son patógenos transmitidos por alimentos, como *Salmonella* y *Shigella*, que para este estudio fueron aislados en bajo porcentaje y presentaron tolerancia hasta C4, excepto con el triclosán con el cual se inhibió

su crecimiento. Sin embargo, el potencial riesgo puede ser para otros géneros, como se presenta en otros estudios (Garrido et, al. 2015, Holah *et al.*, 2002,).

Las cepas multirresistentes del ambiente clínico mostraron una tolerancia mayor que las cepas saprófitas en las concentraciones C1, C2 y C3, principalmente para ceftriaxona y triclosán. Estas son respuestas similares a otros géneros de bacterias de importancia clínica o involucradas como etiologías infecciosas multirresistentes y en infecciones recurrentes por colonización, dada la inhibición del efecto residual de estos compuestos. Así como se muestra en estas cepas multirresistentes, la tolerancia al triclosán podría interpretarse como el mecanismo cruzado entre la resistencia antibiótica y la tolerancia a sustancias biocidas. Este mismo comportamiento se observó en los géneros de *Klebsiella* y *Enterobacter*, ambos como géneros con mayor porcentaje de aislamiento en los dos ambientes (Hughes & Ferguson, 2017; D'Arezzo *et al.*, 2012; Cottell *et al.*, 2009).

Conclusiones

Los ensayos realizados proporcionan información sobre la respuesta de tolerancia a sustancias biocidas utilizadas con frecuencia. El crecimiento en concentraciones del 1 %, especialmente con el triclosán, tanto en los aislados clínicos multirresistentes como con las bacterias saprófitas, evidencia que el aumento de la tolerancia a sustancias microbicidas circula en ambientes diferentes.

En las muestras estudiadas se hallaron géneros comunes como *Klebsiella* y *Enterobacter*, con respuesta similar a las biocidas entre los ambientes “alimentario” y “clínico”, dado que muestran porcentajes de tolerancia en la concentración C1, principalmente con el triclosán. Esto puede deberse a que esta sustancia biocida ha sido una de las primeras en

usarse para el control del crecimiento bacteriano y en la industria cosmética, lo que ha originado mayor exposición de la microbiota humana y ambiental.

En la producción de los alimentos, específicamente de los cárnicos, confluyen muchos factores humanos, animales y medioambientales que provocan la exposición a las sustancias biocidas, así como tratamientos físicos que conllevan la adaptación de los microorganismos a las condiciones ambientales fluctuantes de temperatura, concentraciones de carga orgánica, humedad y procesos de desinfección. Por eso, los saprófitos llegan a presentar resistencia al efecto biocida y por lo tanto pueden potenciar otros determinantes.

Consideraciones éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que en este artículo no se realizaron experimentos con animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que los datos tuvieron un manejo ético y confidencial de la información según las normas constitucionales y legales sobre protección de datos personales (Ley habeas data).

Todos los datos analizados de los diferentes proyectos fueron revisados y avalados por el Comité de Bioética Institucional de la Universidad de Boyacá.

- Amaral, L., Martins, A., Spengler, G., & Molnar, J. (2014). Efflux pumps of Gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. *Frontiers in pharmacology* 4, 168. <https://doi.org/10.3389/fphar.2013.00168>
- Blair, J. M., & Piddock, L. J. (2009). Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.07.003>
- Boutarfi, Z., Rebiahi, S. A., Morghad, T., Pulido, R. P., Burgos, M. J. G., Mahdi, F., Lucas, R., & Galvez, A. (2019). Biocide tolerance and antibiotic resistance of Enterobacter spp. isolated from an Algerian hospital environment. *Journal of global antimicrobial resistance*, 18, 291-297. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.005>
- Cabrera, E.C., Gómez, F.R., & Zúñiga, E.A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Colomb Med*, 38. <https://www.redalyc.org/pdf/283/28338208.pdf>
- Céspedes, D.P. (2009). *Detección de genes de resistencia a biocidas en bacterias nosocomiales mediante la reacción en cadena de la polimerasa* [tesis de pregrado, Universidad de Chile]. Repositorio Institucional UCHILE. <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/131438/Detecci%C3%B3n-de-genes-de-resistencia-a-biocidas-en-bacterias-nosocomiales-mediante-la-reacci%C3%B3n-en-cadena-de-la-polimerasa.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Cottell, A., Denyer, S. P., Hanlon, G. W., Ochs, D., & Maillard, J. Y. (2009). Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *Journal of Hospital Infection*, 72(1), 71-76. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2009.01.014>
- D'Arezzo, S., Lanini, S., Puro, V., Ippolito, G., & Visca, P. (2012). High-level tolerance to triclosan may play a role in Pseudomonas aeruginosa antibiotic resistance in immunocompromised hosts: evidence from outbreak investigation. *BMC research notes*, 5(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-43>
- Denyer, S. P. (1995). Mechanisms of action of antibacterial biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 36(3-4), 227–245. [https://doi.org/10.1016/0964-8305\(96\)00015-7](https://doi.org/10.1016/0964-8305(96)00015-7)
- Floyd, J. L., Smith, K. P., Kumar, S. H., Floyd, J. T., & Varela, M. F. (2010). LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator

superfamily from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(12), 5406–5412. <https://doi.org/10.1128/AAC.00580-10>

Fluman, N., & Bibi, E. (2009). Bacterial multidrug transport through the lens of the major facilitator superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1794(5), 738–747. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.020>

Fuentes A.M, F., Morente, E. O., Abriouel, H., Pulido, R. P., & Gálvez, A. (2014). Antimicrobial resistance determinants in antibiotic and biocide-resistant gram-negative bacteria from organic foods. *Food Control*, 37, 9–14. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.08.041>

Garçao Curiao, T.I (2014). *Análisis fenotípico, genómico y bioinformático de los elementos genéticos asociados a resistencia a antibióticos y biocidas en enterobacterias* [tesis de doctorado, Universidad Complutense de Madrid]. <https://eprints.ucm.es/id/eprint/24967/1/T35262.pdf>

Garrido, A. M., Burgos, M., Márquez, M., Aguayo, M., Pulido, R. P., Árbol, J. T. D., Gálvez, A., & López, R. L. (2015). Biocide tolerance in *Salmonella* from meats in Southern Spain. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1177–1181. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-838246420140396>

Gilbert, P., & 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. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.189-208.2003>

Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: Diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>

Gnanadhas, D. P., Marathe, S. A., & Chakravorty, D. (2013). Biocides—resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. *Expert opinion on investigational drugs*, 22(2), 191–206. <https://doi.org/10.1517/13543784.2013.748035>

González, L. L., Isabel Gutiérrez Pérez, M., Eulalia Lucio-Villegas Menéndez, M., Lluch, N. A., Luisa Morató Agustí, M., & Cachafeiro, S. P. (2014). Introducción a los antisépticos. *Atencion Primaria*, 46(SUPPL. 2), 1–9. [https://doi.org/10.1016/S0212-6567\(14\)70055-1](https://doi.org/10.1016/S0212-6567(14)70055-1)

- Hernández-Navarrete, M. J., Celorrio-Pascual, J. M., Moros, C. L., & Bernad, V. M. S. (2014). Principles of antiseptics, disinfection and sterilization. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(10), 681–688. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.04.003>
- Holah, J. T., Taylor, J. H., Dawson, D. J., & Hall, K. E. (2002). Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. *Journal of applied microbiology*, 92, 111S-120S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.18.x>
- Hughes, C., & Ferguson, J. (2017). Phenotypic chlorhexidine and triclosan susceptibility in clinical *Staphylococcus aureus* isolates in Australia. *Pathology*, 49(6), 633-637. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2017.05.008>
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Knapp, C. W., Correa Galeote, D., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PloS one*, 9(12), e114252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114252>
- Lerma, L. L., Benomar, N., Muñoz, M. D. C. C., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2015). Correlation between antibiotic and biocide resistance in mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from slaughterhouse surfaces throughout meat chain production. *Food microbiology*, 51, 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.04.010>
- López Aguayo, M. C., Lucas López, R., Grande Burgos, M. J., & Gálvez-del-Postigo-Ruiz, A. (2010). Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. <https://core.ac.uk/download/pdf/60878292.pdf>
- Mah, T. F & O'Toole, G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* 9(1), 34-39. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(00)01913-2)
- Maillard, J. Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92(1), 16S-27S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>
- Ministerio de la Presidencia Relaciones con las Cortes y Memoria Democrática. (2002). Real Decreto 1054/2002, de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2002-19923>

- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>
- Rosas-Leal, D. A., López-Velandia, D. P., Torres-Caycedo, M. I., & Merchán, M. A. (2019). Perfiles de susceptibilidad de grupos bacterianos aislados de productos cárnicos en Tunja, Boyacá. *Revista Investigación en Salud Universidad de Boyacá*, 6(2), 19-39. <https://doi.org/10.24267/23897325.439>
- Rosenberg, E. Y., Bertenthal, D., Nilles, M. L., Bertrand, K. P., & Nikaido, H. (2003). Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1609–1619. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03531.x>
- Russell, A. D. (1997). Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of applied Microbiology*, 83(2), 155-165.
- Russell, A. D. (2002). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92(1), 121S-135S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.12.x>
- Russell, A. D. (2004). Whither triclosan? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(5), 693–695. <https://doi.org/10.1093/jac/dkh171>
- Sáenz-Anduaga, E., & Sánchez-Saldaña, L. (2005). Antibióticos tópicos. *Dermatología Peruana*, 15(1), 7. https://www.dermatologiaperuana.pe/assets/uploads/revista_a1XZ_a02.pdf
- Schweizer, H. P. (2001). Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 202(1), 1–7. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10772.x>
- Spellberg, B., & Gilbert, D. N. (2014). The Future of Antibiotics and Resistance: A Tribute to a Career of Leadership by John Bartlett. *Clinical Infectious Diseases*, 59(suppl 2), S71–S75. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu392>
- Tauch, A., Schlüter, A., Bischoff, N., Goesmann, A., Meyer, F., & Pühler, A. (2003). The 79,370-bp conjugative plasmid pB4 consists of an IncP-1 β backbone loaded with a chromate resistance transposon, the strA-strB streptomycin resistance gene pair, the

- oxacillinase gene blaNPS-1, and a tripartite antibiotic efflux system of the resistance-nodulation-division family. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(5), 570–584. <https://doi.org/10.1007/s00438-002-0785-z>
- Wales, A. D., & Davies, R. H. (2015). Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics* 4(4), 567–604. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4040567>
- Webber, M. A. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 9–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg050>
- Wessels, S., & Ingmer, H. (2013). Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 67(3), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2013.09.006>