

RESISTENCIAS A BIOCIDAS DE CEPAS AISLADAS DE DIFERENTES PESCADOS

JOSÉ LUIS ROMERO GARCÍA, M^a JOSÉ GRANDE BURGOS, RUBÉN PÉREZ PULIDO, ANTONIO GÁLVEZ, ROSARIO LUCAS

RESUMEN

Se ha aislado una colección de cepas de diferentes muestras de pescado fresco y marisco, y se ha determinado la resistencia a diferentes biocidas. En la mayoría de los productos de la pesca estudiados, las unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo están entre 10^3 y 10^7 . En el estudio morfológico predominan los bacilos Gram -, salvo en productos donde la manipulación ha sido más importante que encontramos cocos Gram +. Respecto a los ensayos de resistencia a biocidas, hay mayor número de cepas resistentes para triclosán, oxonia, cloruro de benzalconio y hexadecilpiridinio. En general, la resistencia a biocidas es baja.

Palabras clave: pescado, biocidas, resistencias

ABSTRACT

A collection of bacterial strains isolated from raw seafood has been studied regarding its biocide tolerance. Viable bacterial counts obtained for most samples analyzed ranged from 10^3 to 10^7 colony forming units (CFU) per gram. Most isolates were Gram-negative bacilli, except for raw processed products where Gram-positive bacilli were more abundant. Highest percentages of biocide tolerance were obtained for triclosan, oxonia, benzalkonium chloride and hexadecylpyridinium chloride. In general, biocide tolerance is low.

Keywords: seafood, biocides, antimicrobial resistance

* Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. Campus Las Lagunillas, s/n. 23071-Jaén. E-mail: agalvez@ujaen.es

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El pescado

Los peces y sus productos derivados constituyen una importante fuente de proteína de alto valor biológico, de grasa y vitaminas liposolubles. Debido al incremento de la población mundial y a la mejora de los índices de desarrollo de muchos países, la producción de alimentos proteicos experimenta una demanda creciente. La producción pesquera mundial, supone el tercer alimento proteico de origen animal en cantidad bruta después de la leche y la carne y el segundo en el aporte de proteína neta después de la carne (1). La producción pesquera mundial ha aumentado de forma constante en las últimas cinco décadas y el suministro de peces comestibles se ha incrementado a una tasa media anual del 3,2 %, superando así la tasa de crecimiento de la población mundial del 1,6 % (2).

El consumo *per capita* de pescado en España ronda los 43 Kg anuales, frente a una media europea de 22,1 Kg y media mundial de 18,4 Kg (3). El balance entre importaciones y exportaciones también nos indica que se realiza un comercio importante de pescado, en 2009 las importaciones fueron de 2.061.448 toneladas y las exportaciones de 1.127.908 toneladas.

1.2. Microorganismos del pescado

La piel de los peces contiene abundantes microorganismos capaces de crecer y sobrevivir a bajas temperaturas, incluso inferiores a 10 °C. Las bacterias existentes en el intestino contribuyen junto con las de la piel a la descomposición del pescado (4). La vida útil de los productos de la pesca depende de la rapidez con la que se produzca el deterioro después de la muerte. Son productos muy perecederos debido a los siguientes factores: características físico-químicas de la matriz, alta actividad agua, pH neutro, su composición lipídica, enzimas autolíticas y microorganismos en la superficie corporal (5). Los peces son animales poiquilotérmicos, por tanto, la flora predominante refleja mucho la del medio que circunda al pez vivo (6).

La microbiota de los peces de aguas frías de las regiones árticas y templadas consiste fundamentalmente en psicrófilos aerobios Gram - y psicrotrofos (7). La mayor parte son psicrófilos, capaces de crecer a temperaturas de hasta -5 °C o -6 °C. Por tanto, aunque están inicialmente en cantidades bastante pequeñas, pueden crecer rápido durante su almacenamiento en frío para alcanzar cifras de 10⁵ a 10⁷ UFC/g (de tejido branquial), en 7 días.

Los olores del pescado alterado son el resultado de la utilización bacteriana de moléculas relativamente pequeñas e hidrosolubles del tejido del pescado, especialmente de los constituyentes del nitrógeno no proteico de los tejidos: aminoácidos, péptidos pequeños y óxido de trimetilamina (4). Otros productos del metabolismo bacteriano que contribuyen a la percepción sensorial de la alteración son: ácidos grasos de cadena corta (ácido láctico, ácido butírico), aldehídos y cetonas de los lípidos tisulares, sulfuros volátiles (sulfuro de hidrógeno, sulfuro de dimetilo, mercaptano de metilo), aminas (indol, escatol), aminas biógenas (histamina, putrescina y cada-verina) y amoniaco procedente de los aminoácidos o proteínas degradadas (8). La producción bacteriana de enzimas proteinasas está reprimida al principio pero se acelera en las últimas fases debido al aumento en el *pool* de aminoácidos procedentes de la hidrólisis de proteínas.

La microbiota inicial del pescado depende del ambiente y de su entorno en el momento de la pesca. La microbiota de peces vivos de aguas frías y templadas es muy constante, predominando Gram- como: *Psychrobacter* (*Moraxella*), *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Shewanella* (*Alteromonas*), *Flavobacterium*, *Cytophaga* y *Vibrio*. Normalmente hay pequeño número de Gram+ como *Micrococcus* y *Corynebacterium*. En aguas cálidas, entre el 50 y 60 % de la microflora es Gram+, de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Corynebacterium* (6). En la piel y agallas predominan las bacterias aerobias facultativas, encontrando bacterias del género *Vibrio*, en peces pelágicos (caballa, arenque, sardina, etc.) en concentraciones elevadas. En intestino abundan anaerobias obligadas. En los pescados de agua dulce hay los mismos tipos de bacterias, salvo que *Aeromonas* sustituye a *Vibrio*.

Los microorganismos patógenos del pescado crudo refrigerado son los mismos que la microbiota original y los adquiridos en las primeras fases de la pesca. En pescado entero hay *Clostridium botulinum*, tipos E y B y F no proteolíticos. Pueden crecer a temperaturas bajas, a partir de 3,3 °C, por tanto hay que tener cuidado con pescado envasado al vacío y en atmósferas modificadas mantenido a una temperatura mayor de 3 °C. En los pescados que no se cuida la cadena de frío y se mantengan a una temperatura mayor de 10 °C crecen bien microorganismos patógenos como: *Vibrio* spp., *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Shigella* spp. En aguas cálidas puede haber altos recuentos de *Vibrio* spp. Este género incluye algunas especies que pueden provocar septicemias graves.

En las truchas criadas en estanques se pueden encontrar altas concentraciones de *Clostridium botulinum*. Pueden aparecer patógenos entéricos (*Salmonella* spp., *Shigella*

spp.) en balsas enriquecidas con estiércol y también debido a los piensos, anfibios y aves. En ahumados puede encontrarse *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *C. botulinum*. Si la temperatura no ha sido suficientemente alta y hay una mala conservación a temperatura alta puede dar problemas *C. botulinum* tipo E, en el ahumado en caliente se inactivan esporas de *C. botulinum* no proteolítico pero no las proteolíticas (7).__

Las infecciones por consumo de alimentos contaminados continúan siendo una constante relevante en el ámbito sanitario de la Unión Europea. En 2011 se detectaron un 16.1% de infecciones por consumo de diferentes pescados el ámbito de la Unión Europea (9). En el sector pesquero hay también preocupación creciente por el incremento de cepas resistentes o multirresistentes a los agentes antimicrobianos en la cadena alimentaria (9, 10, 11).

1.3. Biocidas (desinfectantes)

Según el Reglamento (UE) 528/2012 (12) se definen los biocidas como “toda sustancia o mezcla, en la forma en la que se suministra al usuario, que esté compuesta por, o genere una o más sustancias activas, con la finalidad de destruir, contrarrestar o neutralizar cualquier organismo nocivo, o de impedir su acción o de ejercer sobre él un efecto de control de otro tipo, por cualquier medio que no sea una mera acción física o mecánica”.

La acción de los biocidas dependerá del tipo de microorganismos sobre el que queramos actuar, debido a sus diferentes características fisiológicas, metabólicas. El mecanismo de acción de los biocidas se fundamenta en que actúan sobre las moléculas de la membrana de la célula viva, especialmente sobre las proteínas, carbohidratos, lípidos (fosfolípidos), ácidos nucleicos y sobre otras pequeñas moléculas, como algunas vitaminas, hormonas y ciertos elementos minerales esenciales presentes en las células (13, 14). Al actuar sobre diferentes dianas, es muy difícil determinar cuáles son los efectos concretos que provocan o contribuyen a la muerte del microorganismo. Principalmente interaccionan con la superficie celular, pero una vez dentro del microorganismo, puede dañar uno o más componentes celulares, mediante tres mecanismos de acción: Envenenamiento de los sistemas enzimáticos, Alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular o Coagulación y precipitación de proteínas celulares.

El uso de biocidas en la piscicultura, en virtud de los requisitos previos de la Directiva 98/8/ CE, permite una gama de desinfectantes para la descontaminación

en la cría de peces, o para estanques y equipos como son yodóforos, sales metálicas, compuestos halo orgánicos, aldehídos, peróxido de hidrógeno, compuestos de amonio cuaternario, y colorantes antimicrobianos.

Una preocupación creciente es el uso de biocidas, ya que puede provocar co-selección de cepas resistentes a antibióticos de uso clínico, como se ha comprobado en el caso del triclosan y otros (15, 16, 17, 18). Los biocidas son ampliamente utilizados en la desinfección de equipos e instalaciones. En bacterias Gram-negativas se han descrito numerosos genes de resistencia a biocidas derivados del amonio cuaternario (QAC), que también están ampliamente diseminados en las bacterias Gram-negativas (19, 20, 21).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Aislamiento de cepas procedentes de pescado

Se ha aislado una colección de cepas a partir de 14 especies de pescado y productos del mar, boquerón (*Engraulis encrasicolus*), sardina (*Sardina pilchardus*), jurel (*Trachurus trachurus*), caballa (*Scomber scombrus*), lenguado (*Solea* spp.), dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*), salmón (*Salmo salar*), merluza (*Merluccius capensis*), tintorera (*Prionace glauca*), calamar (*Loligo* spp.), mejillón (*Mytilus edulis*), langostino (*Penaeus* spp.) y cigala (*Nephrops norvegicus*).

Se pesaron 25 gramos de cada una de las muestras de pescado. Dependiendo del tipo de pescado se seleccionaron distintas zonas de la toma de muestra. Teniendo en cuenta zonas con piel, sin piel, cola, cabeza, estómago, etc. En una bolsa estéril se mezclaron con 225 ml de peptona salina, con el fin de homogeneizar la muestra. Se masajeó el contenido durante 2 minutos para desprender los microorganismos, y se dejó reposar para que se depositaran los restos de pescado. Con el sobrenadante obtenido se prepararon diluciones para el recuento de microorganismos, manteniéndolas en frío hasta su uso.

Cada dilución se sembró en su placa correspondiente de medio TSA salino, siempre por triplicado con la espátula de Drigalski estéril. Se incubaron a 30 y 37°C, durante 24 horas. Pasadas las 24h se observaron las colonias y se hizo el recuento de células viables por la técnica del número de unidades formadoras de colonias UFC/ml o g. de muestra de pescado ensayada. Se seleccionaron las colonias perfectamente aisladas, y se realizó la tinción de Gram para poder clasificar las cepas según su morfología. Se congelaron a -80° para los posteriores ensayos.

2.1. ENSAYO DE RESISTENCIA A biocidas, MICROTITULACIÓN.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) se define como la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de la incubación durante la noche. Para el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias de los biocidas sometidos a estudio se han distribuido en placas de microtitulación los biocidas a ensayar junto con diluciones de cultivos estacionarios de las diferentes cepas.

- Biocidas utilizados:

- **Cloruro de benzalconio:** 50% en agua (Fluka. Sigma-Aldrich Chemic GmH).
- **PHMG** (polyhexamethylene guanidine hydrochloride; Oy Soft).
- **Oxonia** (Ácido P3-oxonia).
- **Hexaclorofeno**, 99%. (Aldrich Chemical Co. Ltd.).
- **Hexadecilpiridinio:** 99,0-102,0% (Sigma Aldrich, Co.).
- **Triclosan** (Irgasan): $\geq 97,0\%$ HPLC. 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol (Sigma Aldrich, Co.).
- **Cetrimida**, Alkytrimethyl-ammonium bromide. Soluble en agua al 10%. (Sigma Aldrich, Co.).
- **Clorhexidina digluconato** 20% en agua. (Sigma Aldrich, Co.)

Técnica de microtitulación

Se preparan distintas diluciones de los biocidas en medio nutritivo líquido estéril, TSB. En la dilución al 10% del hexaclorofeno y del triclosan se utiliza alcohol etílico de 96° para facilitar la disolución del compuesto. En cada pocillo de la placa de microtitulación se añaden 200 μ l de la dilución del biocida, desde C1 a C5 y se inoculan con 20 μ l de la dilución 1/10 del cultivo overnight de cada cepa. En todos los ensayos se pone un control positivo, y controles negativos del medio TSB y de los diferentes biocidas, Se incuban a 37 °C o 30 °C, según crecimiento de cada cepa, durante 18-24 horas. A las 24 h se procede a la lectura de la microplaca con el lector "Microplate Reader" (BIO-RAD) a 595 nm.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de colonias: obtención de cultivos puros.

Se han aislado 73 cepas del conjunto de las especies de pescado muestreadas. Para el posterior estudio dichas cepas se han agrupado dependiendo del tipo de pescado del que proceden (Tabla 1).

Una vez realizada la toma de muestra como se refleja en el apartado de material y métodos se procedió al recuento de UFC/g y a la identificación de las muestras y clasificación mediante la tinción de Gram. En la tabla 2 se pueden observar los distintos pescados ensayados, las zonas de muestra y los resultados obtenidos.

La concentración de microorganismos viables encontrada es muy variable dependiendo de cada producto, oscilando desde $1,5 \times 10^3$ UFC/g en mejillón fresco hasta $7,2 \times 10^7$ UFC/g en salmón, presentado en una rodaja envasada en bandeja de poliestireno cubierta por film en vitrina refrigerada. En general, los productos de pesca extractiva y moluscos tienen menor carga bacteriana, oscilando entre 10^3 a 10^4 UFC/g, la excepción es el jurel con $1,8 \times 10^6$ UFC/g, en estos niveles se sitúa también la tintorera; los productos de la acuicultura y el marisco cocido están próximos a 10^5 UFC/g, similar a la rodaja de merluza; y la carga microbiana mayor se ha encontrado en la dorada, la muestra de la parte de la ventresca con piel con 10^6 UFC/g y el salmón, como hemos comentado ya, con 10^7 UFC/g (Tabla 2).

En el trabajo de aislamiento y recuperación de cepas en medio líquido realizado a lo largo de los días, se observó que muchas cepas dejaban de crecer a 37°C , creciendo a 30°C . Las cepas con un crecimiento óptimo mesófilo (37°C) se han aislado de los productos presentados en rodajas y trozos, además de algunas en marisco cocido y en algunos productos de pesca extractiva y acuicultura como caballa, dorada y lubina. Del total de cepas el 52% han crecido a 30°C y el 48% a 37°C (Tabla 2).

La morfología de las colonias observada en medio sólido sobre placa de TSA, es bastante homogénea, todas las colonias han sido circulares y de elevación entre convexa (la mayoría) y plana. Se han encontrado tres tipos claramente diferenciados respecto al color: colonias blancas mucosas, colonias con tonalidad amarillenta, y colonias transparentes o translúcidas.

Por último, el estudio mediante la tinción de Gram nos muestra el predominio de los bacilos Gram -. Los bacilos Gram - son los predominantes en los productos procedentes de la pesca extractiva, de la acuicultura y los moluscos. El otro grupo predominante son los cocos Gram +, encontrados en el grupo de las rodajas y trozos

de pescado y en el marisco cocido. En menor cantidad aparecen algunos bacilos Gram + (Tabla 2).

3.2. Ensayos de resistencias a biocidas

En el cómputo global, las cepas de pescado evaluadas no son resistentes a las concentraciones de 1% y 0,25% de los desinfectantes ensayados, tan solo un 8,22% son resistentes a la concentración de 0,25% de triclosán (TRI). A la concentración de 0,025% se encuentran cepas resistentes a varios de los biocidas ensayados salvo a la cetrimida (CETRI), polihexametilen guanida (PHMG) y hexaclorofeno (HCF). Las cepas son más resistentes según el siguiente orden: triclosán (TRI) con un 10,95%, oxonia (OX) con un 4,1%, cloruro de benzalconio (CLB) con un 2,74% y hexadecilpiridinio (HDP) con un 1,37%. Para el resto de biocidas solo se detectaron cepas resistentes a concentraciones mucho más bajas (Figura 1).

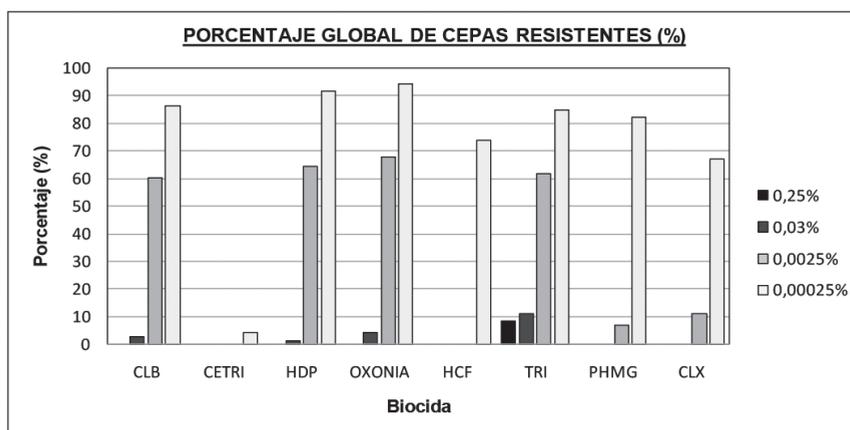


Figura 1: Porcentaje global de cepas tolerantes a las diferentes concentraciones de cloruro de benzalconio (CLB), Cetrimida (CETRI), hexadecilpiridinio (HDP), oxonia, hexaclorofeno (HCF), triclosán (TRI), polihexametilen guanidina (PHMG), o clorhexidina digluconato (CLX).

Al observar los resultados, según las categorías en las que se han agrupado los productos de la pesca utilizados en el estudio, tenemos:

Cepas procedentes de la pesca extractiva: sardina, boquerón, caballa y jurel. En general son cepas poco resistentes, encontrando sin embargo en este grupo las más resistentes a la concentración de 0,25% al triclosán. A la concentración de 0,025% hay

cepas resistentes al cloruro de benzalconio, oxonia y triclosán. A la concentración de 0,0025% aproximadamente la mitad de las cepas de esta categoría son resistentes, aunque variando según biocida, mayor al cloruro de benzalconio, triclosán, oxonia, hexadecilpiridinio y polihexametilen guanidina.

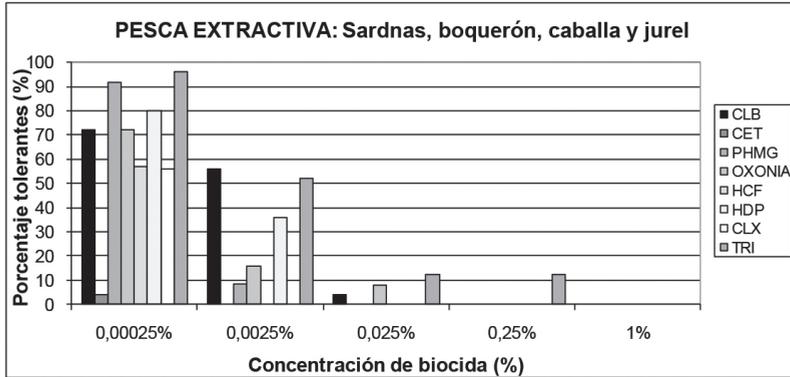


Figura 2. Porcentaje de cepas procedentes de pesca extractiva tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

A la menor concentración ensayada, 0,00025%, la resistencia es mayor, exceptuando la cetrimida (Figura 2).

Cepas procedentes de la acuicultura: lenguado, dorada, lubina. La distribución de resistencia a los biocidas, entre las cepas aisladas de esta categoría, es muy similar a la de la pesca extractiva. No hay resistencia a la concentración del 1%, a la concentración de 0,25% hay un 19% de las cepas de esta categoría resistentes al triclosán. A la concentración de 0,025% no hay crecimiento bacteriano en los derivados del amonio cuaternario, poliguanidas y hexaclorofeno. A la concentración de 0,0025% el porcentaje de crecimiento bacteriano oscila entre el 50% para cloruro de benzalconio y triclosan y el 13% para polihexametilen guanida. Finalmente, a la concentración de 0,00025% los porcentajes de crecimiento son muy altos salvo para cetrimida (Figura 3).

Cepas procedentes de productos presentados en rodajas y en trozos: salmón, merluza y tintorera. Las 16 cepas de este grupo tienen un comportamiento muy homogéneo. No hay crecimiento a las concentraciones de 1% y 0,25%. Al 0,025% se detectan porcentajes muy bajos de cepas resistentes a cloruro de benzalconio y triclosan. Estos biocidas, junto con el hexadecilpiridinio, mantienen porcentajes de resistencia muy altos al 0,0025%. Todos los biocidas (excepto cetrimida) muestran porcentajes muy altos de resistencia al 0,00025% (Figura 4).

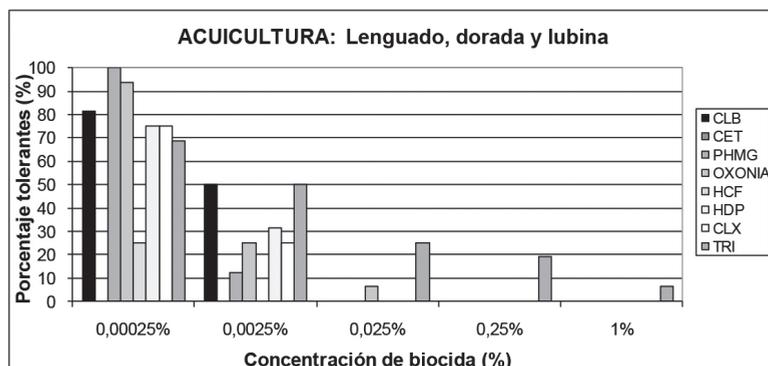


Figura 3. Porcentaje de cepas de acuicultura tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

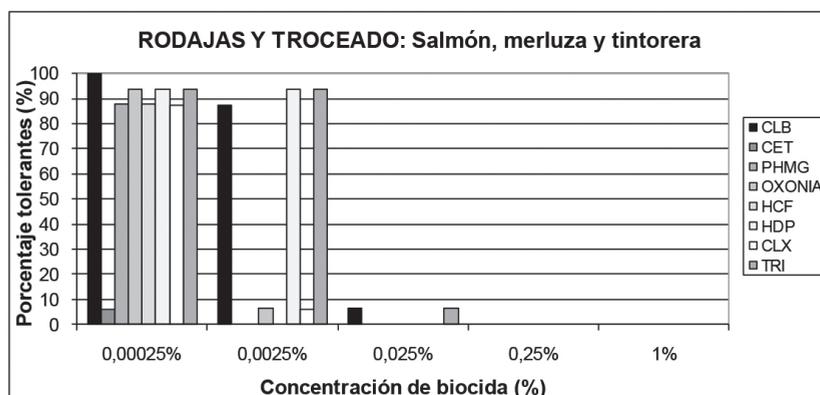


Figura 4. Porcentaje de cepas aisladas de la presentación en rodajas y troceado tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

Cepas procedentes de moluscos: calamar y mejillón. En esta categoría solo se incluyen 6 cepas aisladas. El comportamiento ante los biocidas ha sido muy similar al grupo anterior. No hay crecimiento a las concentraciones de biocida del 1% y 0,25%. Sin embargo el 17% de las cepas han crecido a la concentración de 0,025% frente al triclosán. Al 0,0025% se observa alta resistencia para cloruro de benzalconio, hexadecilpiridinio y triclosán. Al 0,00025% se observa alta resistencia para los biocidas cloruro de benzalconio, oxonia, hexadecilpiridinio, clorhexidina y triclosán. También se encuentran niveles muy altos de resistencia para polihexametileno guanida y hexaclorofeno, y ligeramente altos para cetrimidina (Figura 5).

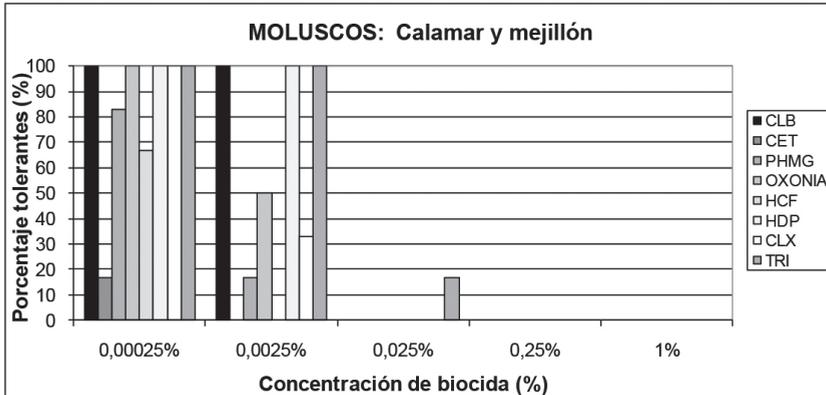


Figura 5. Porcentaje de cepas de moluscos tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

Cepas procedentes de marisco cocido: langostino y cigala. Se han ensayado 10 cepas. No hay crecimiento a las concentraciones del 1% y 0,25%. Al 0,025% se han encontrado resistencias para clorhexidina y triclosan. A la concentración de 0,0025%, las resistencias van del 50% para polihexametilen guanida al 10% para oxonia. Al 0,00025% se encuentran resistentes para todas las cepas (Figura 6).

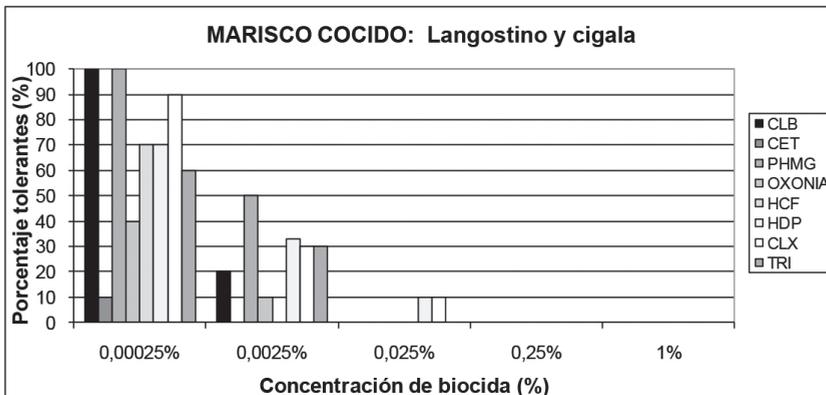


Figura 6. Porcentaje de cepas de marisco cocido tolerantes a cada una de las concentraciones de biocida ensayadas.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio muestran la presencia de bacterias resistentes a biocidas en las diferentes muestras de pescado ensayadas. El 64% de las cepas aisladas son bacterias Gram negativas, según estudios anteriores, las bacterias Gram negativas son generalmente más tolerantes que las bacterias Gram-positivas a los agentes antibacterianos (22, 23), datos que concuerdan con nuestros resultados donde la mayor resistencia a biocidas se produjo en las bacterias Gram-negativas. La membrana externa de las bacterias Gram-negativas actúa como una barrera responsable de la resistencia intrínseca de estos microorganismos para muchos compuestos antimicrobianos (24, 25). Tal resistencia a la permeabilidad mediada depende en una medida considerable, no sólo del agente en cuestión, sino también del tipo de microorganismo. La membrana externa de los miembros de la familia Enterobacteriaceae (y otras bacterias Gram-negativas, en particular *Pseudomonas aeruginosa*) actúa como una barrera que limita o impide la entrada de muchos agentes antibacterianos (24, 25).

En los resultados obtenidos un 8,20%, de las cepas aisladas son resistentes a la concentración de 0,25% de triclosán (TRI), El triclosan (5-cloro-2- (2,4-dicloro-fenoxi) fenol) es una biocida ampliamente utilizado en jabones de tocador, pasta de dientes, jabones líquidos, plásticos de uso doméstico, desodorantes, telas, champús, una gran variedad de productos de cuidado personal y productos comerciales para limpieza de superficies, así como incorporado en materiales como tablas de cortar, o embalajes. Tiene un amplio espectro frente a muchos microorganismos, incluyendo bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas, algunos hongos, y micobacterias (26). Las bacterias resistentes a triclosan son abundantes en naturaleza, y existen muchos mecanismos de resistencia conocidos, (27, 28, 29, 30). Recientemente se han descrito genes de resistencia presentes en *Escherichia coli* (31), *Pseudomonas aeruginosa* (32), *Salmonella enterica* serovar typhimurium (33), *Staphylococcus aureus* (34), *Mycobacterium smegmatis* (28), o *Acinetobacter baumannii* (35).

Aparte del Triclosan, se ha detectado también un bajo porcentaje de cepas con altos niveles de resistencia a oxonia, cloruro de benzalconio y hexadecilpiridinio, Atendiendo a la literatura científica, dentro de las bacterias Gram-negativas que son particularmente resistentes a varios biocidas destacan *Pseudomonas aeruginosa*, *P. cepacia*, *Proteus* spp. y *Providencia stuartii* (22). *P. aeruginosa* tolera altos niveles de derivados del amonio cuaternario y es también menos susceptible que otros muchos tipos de bacterias Gram-negativas a diacetato de clorhexidina (CHA). Aparte de en los alimentos, otros estudios han detectado la presencia de cepas de *Listeria monocytogenes* y *E. coli* resistentes al uso prolongado de derivados de amonio cuaternario en

una planta de procesamiento de pescado noruego (36). En los mataderos de cabra y cordero, se han detectado también especies de *Pseudomonas* resistentes a antibióticos y biocidas, aisladas de todas las superficies de producción de la cadena de la carne así como en los productos cárnicos (37).

En la industria alimentaria moderna, la escala de la producción de alimentos aliada a las demandas de los consumidores de alimentos sanos, nutritivos, y mínimamente procesados carente de aditivos, tales como conservantes químicos y otros agentes antimicrobianos, ha tenido un impacto importante en el número de biocidas utilizados en este entorno. En un intento de mejorar las medidas de higiene y garantizar la seguridad alimentaria, la industria alimentaria ha aumentado la utilización de biocidas y desinfectantes basados en productos químicos para el control de la ecología microbiana del entorno de producción (38), incrementándose la tolerancia bacteriana a la mayoría de los agentes. Una exposición mayor a los biocidas puede dar lugar a bacterias resistentes que pueden ser transmitidas por los alimentos, lo que puede tener implicaciones importantes para la salud pública. Esta característica, sin duda, pone en peligro el papel de los desinfectantes como un medio eficaz para controlar microorganismos. La tolerancia adquirida a estos agentes podría facilitar la supervivencia de microorganismos patógenos y contribuir a la aparición de cepas resistentes.

Los datos obtenidos en este estudio indican la presencia de cepas resistentes a algunos de los biocidas utilizados en la industria alimentaria, siendo mayor en los pescados en rodajas y en trozos como salmón, merluza y tintorera, donde el contacto con superficies y el manejo es mayor. Debido a que no existen muchos datos sobre la resistencia de antimicrobianos en cepas procedentes de pescado, sería conveniente profundizar en este tipo de estudios, con el fin de poder conocer mejor los riesgos de selección de cepas resistentes y adoptar medidas de higiene que permitan producir alimentos de mayor calidad y seguridad alimentaria, así como aumentar la vida útil de productos altamente perecederos como el pescado.

BIBLIOGRAFÍA

- FAO 2013. El estado mundial de la agricultura y la alimentación
- FAO 2014. GLOBEFISH Highlights, 1/2014: 64.
- FAO 2010. Anuario de estadísticas de pesca 2009. Tabla resumen. Producción de acuicultura 2010. Capturas 2010. Hojas de balance de alimentos.
- Ruiter, A. 1999. El pescado y los productos derivados de la pesca composición, propiedades nutritivas y estabilidad. Ed. Acribia S.A.
- Forsythe, F., Hayes, PR. 1999. Higiene de los alimentos, microbiología y HACCP 2007. 2ª edición. S.J.. Ed. Acribia, S.A.
- Abaroa, MC., Pérez-Villarreal, B., Bald, C., Riesco, S., Picaza, N. 2008. Frescura del pescado-guía visual para su evaluación sensorial. AztiTecnalia.

- Gram, L., Huss, H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products Int J Food Microbiol. 33: 121-137
- Ibrahim, SM., Nassar, AG., El-Badry, N. 2008. Effect of modified atmosphere packaging and vacuum packaging methods on some quality aspects of smoked mullet (*Mugil cephalus*). Global Vet. 2 (6):296-300.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013a. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic agents and Food-borne Outbreaks in 2011. EFSA Journal 11:3129, 250 pp.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2013. Epidemiological update: multistate outbreak of *Salmonella* Stanley infection, 30 January 2013. Published 7 Feb 2013.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) 2012. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC; 2012.
- Reglamento (UE) N° 528/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2012, relativo a la comercialización y uso de los biocidas. DOUE L167 de 27-06-2012.
- Gilbert, P., McBain, A.J. 2003. Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev. 16: 189-208.
- Cerf, O., Carpentier, B., Sanders, P. 2010. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "resistance" has different meanings. Int J Food Microbiol. 136: 247-254.
- Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, TT. 2001. Cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. Antimicrob Agents Chemother. 45: 428-432.
- Braoudaki, M., Hilton, AC. 2004. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. J Clin Microbiol. 42:73-78.
- Ortega Morente, E., Fernández-Fuentes, MA., Grande Burgos, MJ., Abriouel, H., Pérez Pulido, R., Gálvez, A. 2012. Biocide tolerance in bacteria. Int J Food Microbiol. 162: 13-25.
- López Aguayo, M.C., Grande Burgos, M.J., Lucas López, R., Gálvez, A. 2010. Resistencia a biocidas de diferentes cepas de *Escherichia coli*. Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental, 23: 121-136.
- Poole, K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. J Antimicrob Chemother. 56: 20-51.
- Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Annals Med 39: 162-176.
- Hansen, L.S., Jensen, LB., Sorensen, HI. 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. J Antimicrob Chemother. 60:145-147.
- Russell, A.D., Gould, G.W. 1988. Resistance of Enterobacteriaceae to preservatives and disinfectants. J Appl Microbiol. Symposium Supplement 65, 167S-195S.
- Russell, A.D., Chopra, I. 1990. Understanding Antibacterial Action and Resistance, second ed. Ellis Horwood, Chichester, UK.
- Nikaido, H., Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol Rev. 49; 1-32.
- Gilbert, P., Pemberton, D., Wilkinson, D.E. 1990. Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. J Appl Bacteriol. 69: 585-592.
- Saleh, S., Haddadin, R.N., Baillie, S., Collier, P.J. 2010. Triclosan –an update. Lett. Appl. Microbiol. 52: 87-95.
- Yazdankhah, S.P., Scheie, A.A., Hoiby, E.A., Lunestad, B.T., Heir, E., Fotland, T.O. 2006. Triclosan and antimicrobial resistance in bacteria: an overview. Microb. Drug Resist. 12: 83-90.

- McMurry, L.M., McDermott, P.F., Levy, S.B. 1999. Genetic evidence that InhA of *Mycobacterium smegmatis* is a target for triclosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 711-713.
- Russell, A.D. 2004. Whither triclosan? *J. Antimicrob. Chemother.* 53: 693-695.
- McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B. 1998. Overexpression of marA, soxS, or acrAB produces resistance to triclosan in laboratory and clinical strains of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 166: 305-309.
- Yu, B.J., Kim, J.A., Pan, J.G. 2010. Signature gene expression profile of triclosan-resistant *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65: 1171-1177.
- ChuanChuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff- Schweizer, R.R., Schweizer, H.P. 2001. Cross resistance between triclosan and antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 428-432.
- Bailey, A.M., Paulsen, I.T., Piddock, L.J. 2008. RamA confers multidrug resistance in *Salmonella enterica* via increased expression of acrB, which is inhibited by chlorpromazine. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 3604-3611.
- Sorum, H., Abee-Lund TM, Solberg A, Wold A. 2003. Integron-containing IncU R plasmids pRAS1 and pAr-32 from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 1285-1290.
- Chen Y, Pi B, Zhou H, Yu Y, Li L. 2009. Triclosan resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J. Med. Microbiol.* 58: 1086-1091.
- Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*. J.T Holah, JH Taylor, DJ, Dawson, KE Hall *Journal of applied microbiology* Volume 92, Issue s1 May 2002 Pages 111S-120S
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Gálvez, A., Abriouel, H., 2013. Prevalence of bacteria resistant to antibiotics and/or biocides on meat processing plant surfaces throughout meat chain production. *Int. J. Food Microbiol.* 161: 97-106.
- Langsrud, S., Sidhu, M., Heir, E., Holck, A. 2003. Bacterial disinfectant resistance a challenge for the food industry. *Int. Biodeter. Biodegr.* 51:283-290.

Tabla 1: Distribución del número de cepas aisladas de pescado en el presente estudio.

				Nº DE CEPAS	TOTAL		
FORMA DE VENTA	Pescado fresco	Entero	Pesca extractiva	SARDINA BOQUERÓN CABALLA JUREL	4 9 7 5	25	
			Acuicultura	Lenguado Dorada Lubina	5 5 6	16	
				Rodajas y troceado	Salmón Merluza Tintorera	12 2 2	16
					Moluscos	Mejillón Calamar	2 4
		Marisco cocido	Langostino Cigala			4 6	10

Tabla 2. Resultados del aislamiento de colonias.

CATEGORÍAS	ALIMENTO	MUESTRA	UFC	Nº DE CEPA	Tª INCUB.	GRAM	MORF COLONIA
Pesca extractiva ENTERO	BOQUERÓN (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	Boquerón entero	1,9 X 10 ⁴	1	30	bacilos -	Grandes amarillas
				2	37	bacilos -	Medianas
				3	30	bacilos -	Pequeña amarilla
				4	37	bacilos +	Pequeña blanca
		Boquerón sin cabeza ni cola	6,3 X 10 ³	5	30	bacilos -	Grande amarilla
				6	30	bacilos -	Grande blanca
				7	30	bacilos -	Mediana blanca
				8	30	bacilos -	Mediana blanca
				9	30	bacilos -	Pequeñas transparentes
	SARDINA (<i>Sardina pilchardus</i>)	Mitad con cabeza	4,3 X 10 ⁴	10	30	bacilos +	Grande amarilla
				11	30	bacilos -	Pequeña transparente
				12	30	bacilos -	Pequeña transparente
				13	30	bacilos -	Grande transparente
JUREL (<i>Trachurus trachurus</i>)	Con cabeza	1,8 X 10 ⁶	14	37	bacilos -	Mediana blanca	
			15	30	bacilos -	Mediana amarilla	
			16	37	cocos +	Pequeña amarilla	
			17	30	bacilos -	Pequeña amarilla	
			18	30	bacilos -	Pequeña blanca	
			19	37	bacilos -	Grande blanca	
			20	37	bacilos -	Grande blanca	
			21	37	bacilos -	Grande transparente	
CABALLA (<i>Scomber scombrus</i>) Atlántico Noreste	Ventresca con piel	8,6 X 10 ⁴	22	30	bacilos -	Mediana blanca	
			23	30	bacilos -	Pequeña transparente	
			24	37	bacilos -	Pequeña blanca	
			25	30	bacilos -	Mediana blanca	

RESISTENCIAS A BIOCIDAS DE CEPAS AISLADAS DE DIFERENTES PESCADOS

				26	30	bacilos -	Pequeñas, transparentes
				27	30	bacilos -	Pequeñas, transparentes
	LENGUADO	Lomo con espina, sangre	9,8 X 10 ⁴	28	30	bacilos -	Pequeñas, transparentes
	(<i>Solea spp.</i>)			29	30	bacilos -	Pequeñas, mucosas
				30	30	bacilos -	Pequeñas, mucosas
Acuicultura ENTERO		Lomo con piel	4,5 X 10 ⁵	31	37	bacilos -	Grande blanca
				32	30	bacilos -	Mediana transparente
	DORADA						
	(<i>Sparus aurata</i>)			33	37	bacilos -	Grande blanca
	Santa Pola acuicultura	Ventresca con piel	2,8 X 10 ⁶	34	37	bacilos -	Mediana transparente
				35	30	bacilos +	Pequeña transparente
				36	30	bacilos -	Pequeña transparente
		Lomo con piel	7,6 X 10 ⁵	37	30	bacilos -	Pequeña transparente
	LUBINA			38	37	bacilos -	Pequeña blanca
	(<i>Dicentrarchus labrax</i>)			39	30	bacilos -	Pequeña blanca
Santa Pola acuicultura	Ventresca con piel	5,1 X 10 ⁵	40	37	bacilos -	Grande blanca	
			41	30	bacilos -	Pequeña blanca	
				42	37	cocos +	Pequeña amarilla
				43	37	cocos +	Pequeña amarilla
				44	37	cocos +	Pequeña amarilla
		Externa con piel	7,2 X 10 ⁷	45	37	cocos +	Pequeña amarilla
				46	37	cocos +	Pequeña amarilla
	SALMÓN (<i>Salmo salar</i>)			47	37	cocos +	Pequeña amarilla
Rodajas y troceado	Noruega acuicultura						
	Rodaja envasada poliexpan +film			48	37	cocos +	Pequeña amarilla
				49	37	cocos +	Pequeña amarilla
			3,0 X 10 ⁷	50	37	cocos +	Pequeña amarilla
				51	37	cocos +	Pequeña amarilla
				52	37	cocos +	Pequeña amarilla
				53	37	cocos +	Pequeña amarilla
	MERLUZA			54	37	bacilos +	Transparentes
	(<i>Merluccius capensis</i>)		7,0 X 10 ⁵	55	37	cocos +	Transparentes
	Atlántico sudeste (El Cabo, Namibia)						
	TINTORERA		4,2 X 10 ⁵	56	30	cocos +	Transparentes
	(<i>Prionace glauca</i>)			57	37	bacilos-	Transparentes
	Sin etiqueta						

RESISTENCIAS A BIOCIDAS DE CEPAS AISLADAS DE DIFERENTES PESCADOS

			58	30	bacilos -	Transparentes
	CALAMAR		59	30	bacilos -	Transparentes
	(<i>Loligo spp.</i>)	2,8 X 10 ⁴	60	30	bacilos -	Transparentes
	Atlántico Suroeste		61	30	bacilos -	Transparentes
Moluscos	Congelado-descongelado					
			62	30	bacilos -	Grande amarilla
	MEJILLÓN	1,5 X 10 ³	63	37	bacilos -	Grande amarilla
	(<i>Mytilus edulis</i>)					
	Fresco					
			64	30	cocos +	Transparentes
	LANGOSTINO	4,2 X 10 ⁴	65	30	cocos +	Transparentes
	(<i>Penaeus spp.</i>)		66	37	bacilos -	Transparentes
	Venezuela acuicultura		67	37	cocos +	Transparentes
	Cocido, descongelado					
Marisco cocido			68	37	bacilos -	Grande blanca
			69	37	bacilos +	Grande blanca
	CIGALA	5,1 X 10 ⁵	70	30	bacilos -	Transparentes
	(<i>Nephrops norvegicus</i>)		71	30	bacilos -	Transparentes
	Cocido descongelado					
		3,0 X 10 ⁴	72	37	bacilos +	Grande amarilla
			73	37	bacilos -	Mediana blanca