

Entregable E2.2. Lista de microorganismos diana elegidos para las etapas siguientes del proyecto.

EXPEDIENTE	IMDECA/2016/4
ACRÓNIMO	ANTIMICROBIAL
PROGRAMA	PROYECTOS DE I + D EN COLABORACIÓN
TÍTULO DEL PROYECTO	ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA EVALUACIÓN DE NUEVOS AGENTES, PRODUCTOS Y MATERIALES CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

ÍNDICE

1.	Descripción del entregable	3
2.	Trabajo realizado	3

1. Descripción del entregable

Este informe incluye una lista de microorganismos diana empleados en diferentes normas de los diferentes sectores productivos contemplados en el plan del proyecto (alimento, cosméticos, calzados, textiles y plásticos) que permitirán la selección de los microorganismos diana que se empleará en las etapas siguientes del proyecto.

2. Trabajo realizado

En este entregable se ha preparado una lista de los compuestos actualmente más utilizados en la industria como antimicrobianos, de acuerdo con su espectro de acción.

IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS, FORMAS DE RESISTENCIA O MODELOS BIOLÓGICOS DIANA DE LOS ANTIMICROBIANOS SELECCIONADOS:

Para efectuar una correcta selección de los microorganismos a ser empleados en el desarrollo de la metodología de ensayo antimicrobiano y que sea posible extrapolar para los materiales de los diferentes sectores que se busca en este proyecto (alimentos, calzados y textiles), se debe llevar en consideración una serie de factores a fin de elegir microorganismos representativos en lo que se refiere a presencia y daño que puedan ocasionar en los materiales de estos diferentes sectores productivos.

Entre estos factores, el tipo de microorganismo a ser utilizado es el primer punto que se debe llevar en consideración. Para la realización de un ensayo es necesario en primer lugar definir qué tipo de microorganismo es más prevaeciente en los materiales a ser testado. En este caso se determinará se en método se utilizará bacterias u hongos como microorganismo test. Un primer factor a ser considerado es el tipo de respiración que presenta los microorganismos diana. La revisión realizada en las diferentes normas ya establecidas hay una clara predominancia a favor de microorganismos aerobios. Además, dentro de cada uno de estos dos tipos de microorganismos es importante seleccionar microorganismos, en caso de que se utilice más de una especie en el ensayo, que tengan características distintivas entre ellos a fin de ampliar la información obtenida en los ensayos. En el caso de las bacterias el padrón empleado con mayor frecuencia es la clasificación artificial basada en la tinción de Gram. La tinción de Gram o coloración de Gram es un tipo de tinción diferencial empleado en bacteriología para la visualización de bacterias, que dependiendo de la composición de la membrana celular se teñirá de violeta o roseo. Debe su nombre al bacteriólogo danés Hans Christian Gram (1853-1938), que desarrolló la técnica en 1884. Para abarcar una mayor representación de bacterias, normalmente se selecciona una bacteria Gram negativa y una bacteria Gram positiva. Si en los materiales a ser testados hay una predominancia de hongos, la metodología a ser desarrollada debe seleccionar entre dos clases de hongos principalmente, los pluricelulares como los mohos u dermatofitos o los unicelulares como las levaduras.

A partir de la definición de cual tipo de microorganismo se desarrollará la metodología se debe llevar en consideración otro factor muy importante: el Hábitat del microorganismo. De una manera genérica se puede definir hábitat como el ambiente que ocupa una población biológica. En la elección de los microorganismos a ser utilizado en un test un punto importante es que dichos microorganismos deben tener como uno de sus hábitats naturales los materiales que van ser testado, es decir, que sean capaces de crecer y reproducirse perpetuando su presencia en dicho material.

Un tercer punto a ser considerado en la elección de los microorganismos test es su potencial patogenicidad para los seres humanos. Aunque parezca contraproducente, para el técnico que va realizar el ensayo, trabajar con microorganismos patógenos, la elección de estos microorganismos para metodologías antimicrobianas de ensayo es la recomendada en prácticamente la totalidad de las normas revisadas. Esta elección está relacionada con la necesidad de certificar que el antimicrobiano que está siendo testado es efectivo contra los microorganismos más peligrosos para la salud humana y no contra microorganismos de la flora microbiana que ayudan y mantienen el buen funcionamiento del hábitat natural donde este microorganismo se localiza en nuestro cuerpo.

En la tabla 1 es posible verificar una amplia revisión de ensayos normalizados donde se especifican cada uno de los microorganismos utilizados en sus respectivas normas.

Tabla 1. Pre-selección de aceites esenciales naturales con potencialidad para utilización en productos funcionalizados (micro- y nano-encapsulación) en materiales del sector calzado y textil.

Norma	Título	Tinción Gram/Hongos	Microorganismos	Colección Tipo
ISO 16187:2013	CALZADO Y COMPONENTES DE CALZADO. MÉTODO DE ENSAYO PARA EVALUAR LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
		Bacteria Gram negativa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
ISO 20645	TEJIDOS TEXTILES. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI NA. ENSAYO DE DIFUSIÓN SOBRE PLACA DE AGAR	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
		Bacteria Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 11229
		Bacteria Gram negativa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
ASTM E 2149:2013	MÉTODO DE PRUEBA ESTÁNDAR PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS AGENTES ANTIMICROBIANOS INMOVILIZADOS EN CONDICIONES DE CONTACTO DINÁMICO	Bacteria Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
AATCC100:2004	EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA EN LOS MATERIALES TEXTILES ACABADOS	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
		Bacteria Gram negativa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
ISO 22196	MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTI NA EN LAS SUPERFICIES PLÁSTICAS	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
		Bacteria Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
SN195924	TEXTILES; DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI NA: MÉTODO DE CONTEO DE GÉRMESES.	Bacteria Gram positiva	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
		Bacteria Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
UNE-EN 1276:2010	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES QUÍMICOS UTILIZADOS EN PRODUCTOS ALIMENTICIOS, EN LA INDUSTRIA, EN EL HOGAR Y EN	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
		Bacteria Gram positiva	<i>Enterococcus hirae</i>	ATCC 10541

	COLECTIVIDAD.	Bacteria Gram negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442
		Bacteria Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536
JIS Z 2801	PRODUCTOS ANTIBACTERIANOS – TEST PARA ACTIVIDAD Y EFICACIA ANTIBACTERIAL	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
		Bacteria Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
JIS L 1902	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI NA DE LOS PRODUCTOS ANTI NOS ACABADOS (TEXTILES)	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538P
		Bacteria Gram negativa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
		Bacteria Gram negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
		Bacteria Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	
ISO 20743:2007	TEJIDOS TEXTILES. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE PRODUCTOS ACABADOS ANTIBACTERIANOS	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
		Bacteria Gram negativa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
AATCC147:2004	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI NA DE MATERIA TEXTIL: MÉTODO DE RAYAS PARALELAS	Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
		Bacteria Gram negativa	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352
AATCC30:2004	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA EN MATERIAL TEXTIL: RESISTENCIA DEL MATERIAL TEXTIL AL MOHO Y LA PODREDUMBRE	Hongos (mohos)	<i>Aspergillus niger</i>	
ISO 846:1997	PLÁSTICOS. EVALUACIÓN DE LA ACCIÓN DE MICROORGANISMOS	Hongo (moho)	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 6275
		Hongo (moho)	<i>Penicillium funiculosum</i>	CMI 114933
		Hongo (moho)	<i>Paecilomyces variotii</i>	ATCC 18502

		Hongo (moho)	<i>Gliocladium virens</i>	ATCC 9645
		Hongo (queratinoso)	<i>Chaetomium globosum</i>	ATCC 6205
ASTM D4300	MÉTODOS DE PRUEBA ESTÁNDAR PARA LA CAPACIDAD DE LAS PELÍCULAS ADHESIVAS PARA SOPORTAR O RESISTIR EL CRECIMIENTO DE HONGOS	Hongo (moho)	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 9642
		Hongo (moho)	<i>Aspergillus flavus</i>	ATCC 9643
		Hongo (moho)	<i>Penicillium pinophilum</i>	ATCC 9644
		Hongo (moho)	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	ATCC 24725
		Hongo (moho)	<i>Aurebasidium pullulans</i>	ATCC 15233
ASTM D 4576:08	MÉTODOS DE PRUEBA PARA RESISTENCIA A HONGOS EN WET-BLUE	Hongo (moho)	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 6275
ASTM D7584:10	MÉTODOS DE PRUEBA ESTÁNDAR PARA EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA DE LA SUPERFICIE DE AZUL HÚMEDO PARA EL CRECIMIENTO DE HONGOS EN UNA CÁMARA AMBIENTAL	Hongo (moho)	<i>presentes en la muestra</i>	
ASTM G21:2015	MÉTODO DE PRUEBA PARA DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA DE MATERIALES SINTÉTICOS POLIMÉRICOS CONTRA HONGOS	Hongo (moho)	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 9642
		Hongo (moho)	<i>Penicillium pinophilum</i>	ATCC 11797
		Hongo (moho)	<i>Chaetomium globosum</i>	ATCC 6205
		Hongo (moho)	<i>Gliocladium virens</i>	ATCC 9645
		Hongo (moho)	<i>Aureobasidium pullulans</i>	ATCC 15233
ISO 11930:2012	COSMETICS- MICROBIOLOGY-EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL PROTECTION OF A COSMETIC PRODUCT	Bacteria Gram negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
		Bacteria Gram negativa	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739
		Levadura	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

		Hongo (moho)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>	ATCC 16404
		Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
EUROPEAN PHARMAOPOEIA 5.0. 2005	5.1.3. EFFICACY OF ANTIMICROBIAL PRESERVATION	Bacteria Gram negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
		Bacteria Gram positiva	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
		Levadura	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
		Hongos (mohos)	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
UNE-EN 1275: 2007	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA O LEVURICIDA BÁSICA DE LOS ANTISÉPTICOS Y DESINFECTANTES QUÍMICOS. MÉTODO DE ENSAYO Y REQUISITOS	Levadura	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231
		Hongo (moho)	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404
UNE EN 1104:2005	PAPEL Y CARTÓN PARA CONTACTO ALIMENTARIO. DETERMINACIÓN DE LA TRANSFERENCIA DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS	Hongo (moho)	<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 6275
		Bacteria gram positiva	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633
ISO 20976-1	MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN – GUIDELINES FOR CONDUCTING CHALLENGE TESTS – PART 1: CHALLENGE TESTS TO STUDY THE GROWTH POTENTIAL, LAG TIME AND THE MAXIMUM GROWTH RATE A MICROBIOLOGY OF THE FOOD CHAIN – GUIDELINES FOR CONDUCTING CHALLENGE TESTS OF FOOD AND FEED PRODUCTS	Bacterias Gram positivas. Bacterias Gram negativas	Microorganismos diana alimentos (*)	
NACMCF (National advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods) 2009	PARAMETERS FOR DETERMINING INOCULATED PACK CHALLENGE STUDY PROTOCOLS	Bacterias Gram positivas. Bacterias Gram negativas	Microorganismos diana alimentos (*)	
ASTM E2562:2012	STANDARD TEST METHOD FOR QUANTIFICATION OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA BIOFILM GROWN WITH HIGH SHEAR AND CONTINUOUS FLOW USING CDC BIOFILM REACTOR.	Bacteria Gram negativa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442

Elección de los microorganismos a ser utilizados en la metodología desarrollada del proyecto.

Para realizar la selección de los microorganismos a ser empleados en la(s) metodología(s) a ser desarrollada en el proyecto se ha determinado que el microorganismo elegido sería las bacterias. Esta elección se debe a una serie de características prácticas que se buscan dar solución con la metodología que se plantea desarrollar.

En primer lugar, algunas de las bacterias que se utilizan para la realización de los ensayos son capaces de formar biofilms, que representa un problema de contaminación relevante, en especial en la industria alimentaria. Otro factor que se ha llevado en consideración es el tiempo de respuesta que se puede dar con un ensayo que utiliza bacterias al envés que hongos. Generalmente el crecimiento bacteriano es muy rápido lo que permite establecer plazos de ensayos inferiores a una semana. En contrapartida, por el metabolismo que presentan los hongos, con excepción de las levaduras, es mucho más lento y en todas las normas revisadas, el tiempo medio de un ensayo con estos microorganismos tiene una duración de, no mínimo, 30 días, lo que podría regenerar problemas considerando los plazos totales que están establecidos para la ejecución completa del proyecto.

El siguiente paso fue definir cuales microorganismos deberían ser elegidos como microorganismo diana para el proyecto. Para esto se ha llevado en consideración los microorganismos que más veces coincidía en las diferentes normas de los distintos sectores industriales que abarcan esta propuesta. Finalmente se ha llevado en consideración también el tipo de pared celular que cada bacteria presenta que está relacionada con la coloración de Gram.

En la tabla 2 se presenta los microorganismos seleccionados para bacterias y hongos.

Microorganismos	Colección Tipo	Tinción Gram
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	Gram Positiva
<i>Escherichia coli</i>	ATCC/DSMZ/CECT	Gram Negativa
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352	Gram Positiva
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 9642	Hongo (moho)
<i>Penicillium pinophilum</i>	ATCC 11797	Hongo (moho)
<i>Chaetomium globosum</i>	ATCC 6205	Hongo (moho)
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	Levadura
<i>Aureobasidium pullulans</i>	ATCC 6205	Hongo (moho)

Estos microorganismos o al menos uno de los dos están representados en todas las normas internacionales de los sectores productivos que son objetivos de este proyecto (ISO 16187:2013; ISO 20645; ASTM E 2149:2013; AATCC100:2004; ISO 22196; SN195924; UNE-EN 1276; JIS Z 2801; JIS L 1902; ISO 20743:2007; AATCC147:2004) y están presentes tanto en materiales del calzado y textiles, pero también como contaminantes de alimentos.