



# Evaluación de la actividad bactericida de un antimicrobiano de origen natural

<b>Apellidos, nombre</b>	Rivas Soler, Alejandro (alriso@tal.upv.es) Pérez Esteve, Édgar (edpees@upv.es)
<b>Departamento</b>	Departamento de Tecnología de los Alimentos
<b>Centro</b>	Universitat Politècnica de València



## 1 Resumen de las ideas clave

Entre los diferentes enfoques para controlar la carga microbiana en los sistemas alimentarios se encuentra la adición de compuestos antimicrobianos naturales como aceites esenciales, extractos de plantas o bacteriocinas. Generalmente está considerado que un determinado compuesto es biocida cuando a una cierta concentración es capaz de reducir en al menos 3 unidades logarítmicas la carga inicial de microorganismo. Nos debemos preguntar por tanto, ¿cómo podría saber si una molécula es biocida? Si te encuentras en esa situación, lo que necesitas determinar es la concentración mínima bactericida de ese compuesto. Para ayudarte a enfrentarte a este problema, en el presente artículo docente podrás revisar el concepto de concentración mínima bactericida (CMB) y las diferentes opciones que tienes para determinarla.

## 2 Objetivos

Una vez leído con detenimiento este documento, serás capaz de:

- Diferenciar entre efecto bactericida y efecto bacteriostático.
- Definir el término de “Concentración Mínima Bactericida”.
- Describir diferentes métodos para estudiar la actividad bactericida de los microorganismos frente un antimicrobiano.
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida de un antimicrobiano frente a un determinado microorganismo.
- Diseñar el experimento para la obtención de una curva de letalidad e interpretar los resultados.

## 3 Introducción

En el ámbito de la seguridad alimentaria, cuando se incorpora un nuevo compuesto antimicrobiano a un alimento, es imprescindible cuantificar el efecto bactericida del mismo. Por ejemplo, las regulaciones de la FDA exigen un requisito mínimo de 5 reducciones logarítmicas del microorganismo patógeno de referencia para que un alimento tratado con una tecnología (altas presiones o antimicrobianos) o combinación de tecnologías (altas Presiones + antimicrobiano) pueda ser comercializado en los EEUU. Por tanto, si se incorpora un antimicrobiano de origen natural, por ejemplo, sustituto de un antimicrobiano químico, es fundamental conocer con exactitud el efecto bactericida del mismo. La información que nos proporciona la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), entendida como la concentración mínima de antimicrobiano que impide el crecimiento de un microorganismo, es claramente insuficiente para estos fines. No obstante, el conocimiento de la CMI es un buen punto de partida para evaluar el efecto bactericida de un compuesto.



Para valorar la capacidad bactericida de los antimicrobianos se pueden emplear dos métodos: el cálculo de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y el cálculo de la Curva de Letalidad (CL). Mientras el primer método nos proporciona el valor de la concentración de antimicrobiano necesario para reducir tres ciclos logarítmicos la población inicial de microorganismo en las condiciones de ensayo, el segundo nos permite estudiar la variación de la inactivación del microorganismo en función del tiempo. En este artículo docente te explicamos cómo determinar el efecto bactericida de un antimicrobiano mediante ambos métodos.

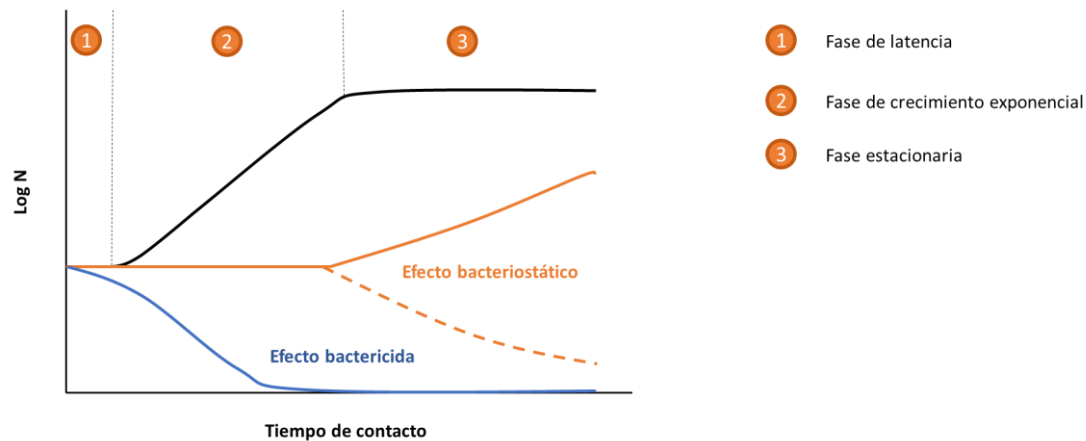
## 4 Desarrollo

### 4.1 Efecto bacteriostático y bactericida de un antimicrobiano

Cuando se evalúa la actividad antimicrobiana de un nuevo compuesto nos podemos encontrar básicamente con dos escenarios: que el microorganismo se vea afectado por el antimicrobiano, o que no le afecte. En el caso de verse afectado, el microorganismo puede ver ralentizado su crecimiento (hasta el punto de detenerlo) o incluso puede morir. Al primer efecto, se le denomina *efecto bacteriostático* y al segundo, *efecto bactericida*.

En un principio, las definiciones de "bacteriostático" y "bactericida" parecen ser sencillas. Bacteriostático significa que el compuesto previene el crecimiento de microorganismos (es decir, los mantiene en la fase de latencia) (**figura 1**) y "bactericida" significa que mata los microorganismos.

Sin embargo, en realidad, no existen 2 categorías estrictas de agentes antimicrobianos (una que mata exclusivamente bacterias y otra que solo inhibe el crecimiento). Convencionalmente, se considera que un compuesto es bactericida, si reduce la población del microorganismo al menos un 99,9 % respecto a la población inicial en 18-24 h. Por tanto, si en 18-24 horas, la inactivación alcanzada es inferior al 99,9 %, se puede considerar que el compuesto tiene efecto bacteriostático frente al microorganismo diana. Esta diferenciación entre los diferentes efectos se estableció en un ámbito de microbiología clínica, donde los tiempos de actuación de los antibióticos son más cortos. Sin embargo, en un ámbito agroalimentario, donde los tiempos de actuación generalmente son más largos (incorporación del antimicrobiano en la formulación de un alimento o de un envase), un antimicrobiano puede tener un efecto bacteriostático para tiempos cortos (18-24h) y bactericida para tiempos más largos (> 24h). Por tanto, más que decir si un compuesto es bactericida o bacteriostático, habría que considerar si un compuesto tiene actividad bactericida o bacteriostática en las condiciones ensayadas.



**Figura 1.** Curva de desarrollo microbiano en función del tiempo

Una vez entendido este concepto entenderás que la actividad bacteriostática o bactericida de un compuesto se aplica solo al microorganismo en particular (o incluso a la cepa) contra el cual se ha probado en las condiciones de ensayo. Por ejemplo, un aceite esencial puede tener actividad bacteriostática frente a *E. coli* (gram -) pero puede tener actividad bactericida frente a *L. monocytogenes* (gram +), en las mismas condiciones de ensayo.

Además, La determinación microbiológica in vitro de la actividad bactericida o bacteriostática de un compuesto puede verse influenciada por las condiciones de crecimiento del microorganismo (fase exponencial o fase estacionaria), la densidad bacteriana y la duración del ensayo. Todo ello hace que sea difícil la comparación de los resultados.

## 4.2 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida

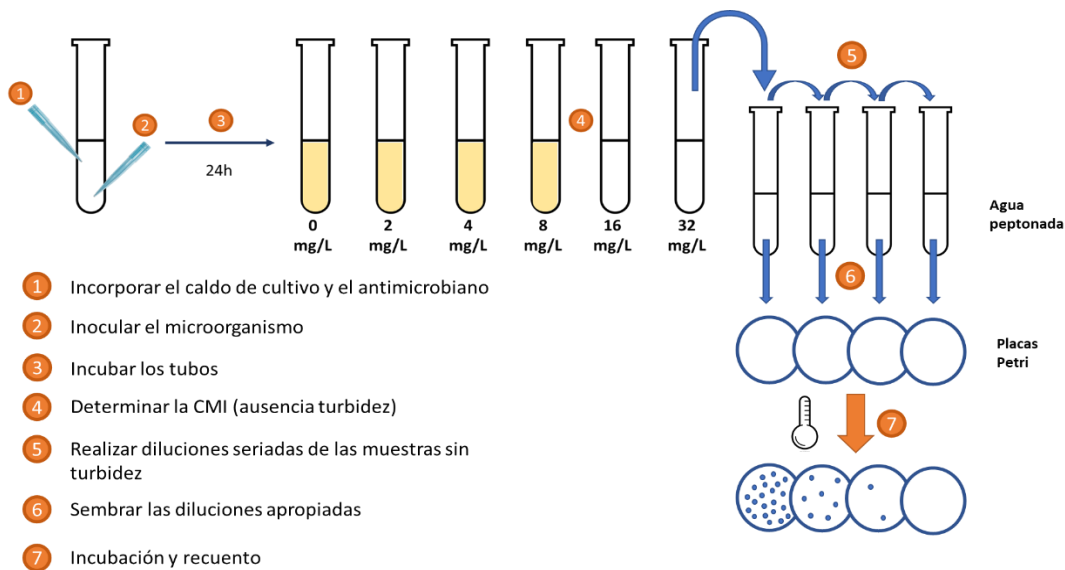
### Fundamento

La *Concentración Mínima Bactericida* (CMB) se define como la menor concentración de antimicrobiano que ha matado el 99,9% del inóculo original, equivalente a una disminución de 3 logaritmos decimales. El recuento se realiza habitualmente mediante técnicas de cultivo.

Para calcular la CMB se emplean métodos en los que bacteria y antimicrobiano se enfrentan en un caldo, concretamente de los métodos de macro o microdilución que se utilizan para la determinación de la *Concentración Mínima Inhibitoria* (CMI).

### Procedimiento

Para su determinación se parte de los tubos o placas sin crecimiento de la bacteria empleada para determinar la CMI (**figura 2**). Para ello se comprueba visualmente si los tubos (método de macrodilución) o pocillos (método de microdilución) presentan turbidez tras un periodo de incubación (1-4). Una vez que hemos determinado la CMI, se toman aquellos tubos que no presentan turbidez, o sea, los tubos donde sospechamos que las concentraciones de antimicrobiano han inactivado al microorganismo, o al menos, han inhibido su crecimiento.



**Figura 2.** Esquema del proceso de determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Los tubos elegidos se agitan en un vortex y de cada tubo se toma 1 mL y se realizan diluciones seriadas en agua peptonada estéril u otro diluyente adecuado (5).

A continuación, se enumeran los organismos viables de las diluciones apropiadas usando siembra en superficie o en profundidad, filtración microbiana, u otros métodos válidos (6). El medio de siembra se escogerá en función del microorganismo. Por último, se incuban las placas sembradas a la temperatura y tiempo especificado en función del microorganismo (7).

Para determinar los microorganismos supervivientes, se recuentan las colonias y se registran los datos como ufc/placa, se calcula el recuento promedio de las placas (2 placas de cada dilución) y se multiplica por el factor de dilución, obteniéndose de este modo el valor promedio de ufc/mL. Este recuento debe transformarse logarítmicamente (obtener el logaritmo decimal del valor).

Una vez que se haya determinado la población superviviente, se procederá a calcular la reducción logarítmica para cada concentración de antimicrobiano por medio de la siguiente ecuación:

$$RL = N_0 - N_t$$

Donde:

RL: reducción logarítmica, expresado en  $\text{Log}_{10}$ .

$N_0$ : promedio de la población inicial, expresado en  $\text{Log}_{10}$ .

$N_t$ : promedio de la población superviviente tras un tiempo de contacto  $t$ , expresado como  $\text{Log}_{10}$ .

La CMB será aquella concentración que haya producido una reducción de **3 ciclos logarítmicos (RL = 3)** en la población inicial del microorganismo.

### Caso práctico

Se desea incorporar un aceite esencial a un alimento y para ello se han determinado las CMB de cinco aceites esenciales para diferentes tiempos de contacto en un medio de referencia (**Tabla 1**). En vista a los resultados, y sabiendo que el patógeno de referencia para ese alimento es el *E. coli* ¿qué antimicrobiano es el más efectivo?

Bacteria	Tiempo	Canela rama	Orégano	Tomillo	Canela hoja	Té
<i>E. coli</i>	5 min	1,12	0,81	0,81	1,75	1,75
	15 min	1,12	0,81	0,81	1,75	1,75
	30 min	0,81	0,81	0,81	1,75	1,75
	60 min	0,81	0,81	0,81	1,75	1,75
	24 h	0,58	0,81	0,81	1,75	1,75
<i>S. aureus</i>	5 min	>10	1,12	>10	1,75	>10
	15 min	3	1,12	3	1,75	>10
	30 min	1,75	1,12	1,12	1,75	>10
	60 min	1,12	1,12	1,12	1,75	10
	24 h	0,66	1,12	1,12	1,75	3
<i>P. aeruginosa</i>	5 min	1,12	1,75	>10	ND	>10
	15 min	1,12	1,75	>10	ND	>10
	30 min	1,12	1,75	>10	5	>10
	60 min	1,12	1,75	>10	5	>10
	24 h	0,81	ND	>10	ND	ND

**Tabla 1.** Concentración Mínima Bactericida (CMB) (% v/v) de diferentes aceites esenciales a 5, 15, 30 min, 1 h y 24 h.

Como puedes observar en la **Tabla 1**, el aceite esencial proveniente de la canela en rama es el más efectivo, porque, aunque a tiempos cortos se requiere una mayor concentración (CMB más elevado) para alcanzar la inactivación especificada (3 reducciones logarítmicas) que el aceite de orégano, a tiempos largos su CMB es bastante más pequeña. Además, es también más efectivo frente a los otros microorganismos patógenos estudiados (CMB más bajas).

## 4.3 Determinación de la curva de letalidad o muerte

### Fundamento

La *curva de letalidad* o muerte es un método cinético de determinación del poder bactericida de un compuesto antimicrobiano. A través del mismo se valora la capacidad bactericida del antimicrobiano en relación con el tiempo y la concentración del mismo. Para ello, el antimicrobiano se pone en contacto con una población conocida de un microorganismo durante un período de tiempo y a una temperatura específica.

Este tipo de metodología nos permite estudiar el efecto bactericida de un antimicrobiano en condiciones diferentes a las “estándar” (caldo Mueller-Hinton, 37°C, pH 7,2, etc). Por ejemplo, se puede estudiar el efecto de la temperatura, pH, acidez, ... sobre la capacidad antimicrobiana de un compuesto. Es más, en un ámbito alimentario, se puede incorporar el antimicrobiano a un alimento y evaluar el efecto del alimento sobre la actividad del mismo.

Previamente a la realización de los estudios cinéticos de letalidad, se debe tener conocimiento de una serie de parámetros:

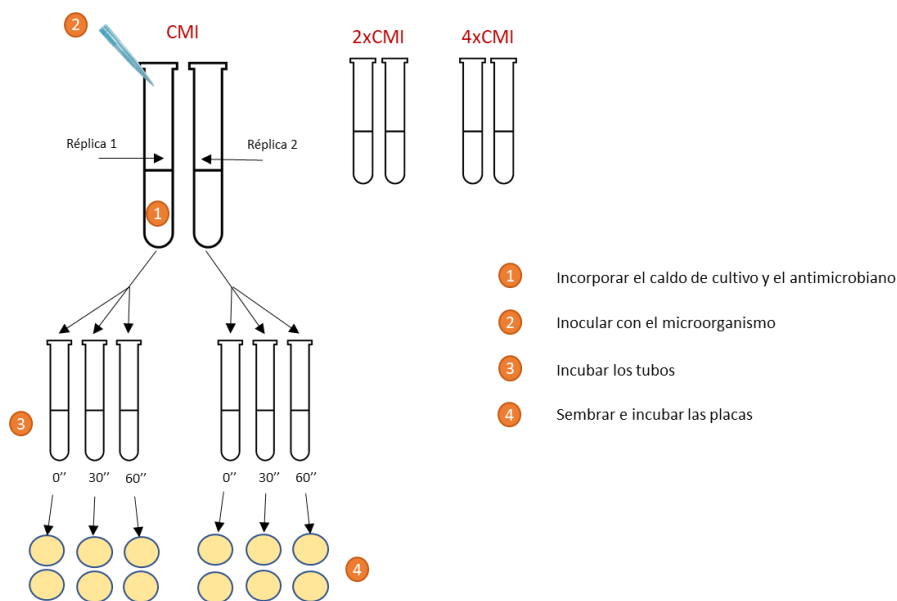
- i) la CMI del microorganismo en el medio donde vamos a determinar la curva de letalidad.
- ii) las concentraciones que vamos a ensayar, normalmente suelen estudiarse las concentraciones comprendidas entre 1 y 4xCMI.
- iii) a ser posible, también es conveniente conocer la dinámica de crecimiento del microorganismo, que nos permite establecer los tiempos para la toma de muestras.
- iv) el efecto del antimicrobiano arrastrado durante la incubación de las placas Petri sembradas, ya que puede sobreestimar la inactivación.
- v) La concentración del inóculo del cual debemos partir.

### Procedimiento

En primer lugar, hay que preparar el **inóculo**. Para ello se transfiere el cultivo dos veces (de 18 a 24 h) a un medio de crecimiento apropiado para mantener el organismo en la fase de crecimiento exponencial. Esta cuestión es muy importante, ya que la susceptibilidad de los microorganismos frente a los antimicrobianos depende de la fase de crecimiento del mismo en la que se encuentre.

La suspensión de inóculo debe prepararse para lograr una concentración poblacional mínima de  $10^6$  ufc / mL. La suspensión de inóculo final debe estar bien mezclada antes de transferirla a la solución con el antimicrobiano.

Una vez que se ha seleccionado las concentraciones a estudiar (ente 1 y 4 veces la CMI), se prepara la **solución del antimicrobiano (1)**, usando para ello, agua destilada u otros diluyentes (p.e. solución salina o un tampón), asegurándose que el antimicrobiano esté completamente disperso. Cada concentración se preparará por duplicado (**Figura 3**). Para el cálculo de la concentración hay que tener en cuenta la dilución de la muestra cuando se incorpora el inóculo.



**Figura 3.** Esquema del procedimiento para la obtención de las curvas de letalidad.

El siguiente paso es la elección de los **tiempos de contacto**. Se debe seleccionar un intervalo de tiempo mínimo, que permita trabajar de manera reproducible. Por ejemplo, si se emplea 2 minutos para sembrar una muestra, no se podrá elegir un intervalo de muestreo inferior a 2 minutos.

La siguiente etapa es la **puesta en contacto** del microorganismo con el antimicrobiano (2). En primer lugar, se agita muy bien la solución de antimicrobiano, seguidamente se adiciona el inóculo (concentración final aproximada de  $10^5$  ufc / mL) y se vuelve a agitar la mezcla. Paralelamente se inoculará la muestra control sin antimicrobiano.

A intervalos de tiempo predeterminados (3), se retira una alícuota (1 mL) y se hacen las diluciones adecuadas en el diluyente apropiado (por ejemplo, agua peptonada estéril) y a continuación se **siembran** por duplicado las diluciones, usando, para ello, cualquier método de siembra que permita cuantificar (superficie, profundidad, filtración...) (4). Las placas sembradas se incubarán a la temperatura y tiempo específico en función del microorganismo.

Tras la incubación, se determina la población de microorganismo superviviente. Para ello, se cuentan las colonias que han crecido en las placas y se registran los datos como ufc / placa. Se calcula el promedio de las placas (2 placas x dilución x réplica) y se multiplica por el factor de dilución, obteniéndose el valor promedio en ufc / mL. Este recuento debe transformarse logarítmicamente.

Por último, se procede a calcular la reducción logarítmica en la población del microorganismo obtenida tras un tiempo de exposición con el antimicrobiano usando la siguiente fórmula:

$$RL = N_0 - N_t$$

Donde:

RL: reducción logarítmica, expresado en  $\text{Log}_{10}$ .

$N_0$ : promedio de la población inicial, expresado en  $\text{Log}_{10}$ .

$N_t$ : promedio de la población superviviente tras un tiempo de contacto  $t$ , expresado como  $\text{Log}_{10}$ .

Una ventaja de realizar las curvas de letalidad es la posibilidad de aplicar herramientas de microbiología predictiva, que nos permita, además de evaluar en mayor profundidad el efecto bactericida del antimicrobiano, predecir comportamientos del microorganismo cuando variamos las condiciones del ensayo (pH, temperatura, composición, ...).

### Caso práctico

Se desea evaluar el efecto antimicrobiano de un nuevo aceite esencial que se desea incorporar a un alimento ácido (pH 4) tipo batido de fruta (tipo *smoothie*) para ser comercializado en EEUU. Sabemos que el producto no se comercializa antes de 24 horas tras su formulación. ¿Cómo plantearías un estudio para la obtención de curvas de letalidad? ¿Qué parámetros se tendrían que estudiar?

En este caso, en primer lugar, se elegiría el microorganismo patógeno diana del estudio. A priori, aquellos que no sobreviven a esa acidez, por ejemplo, los pertenecientes al género *Clostridium*, se podrían descartar. Esto nos deja por ejemplo *L. monocytogenes* o *E. coli*.

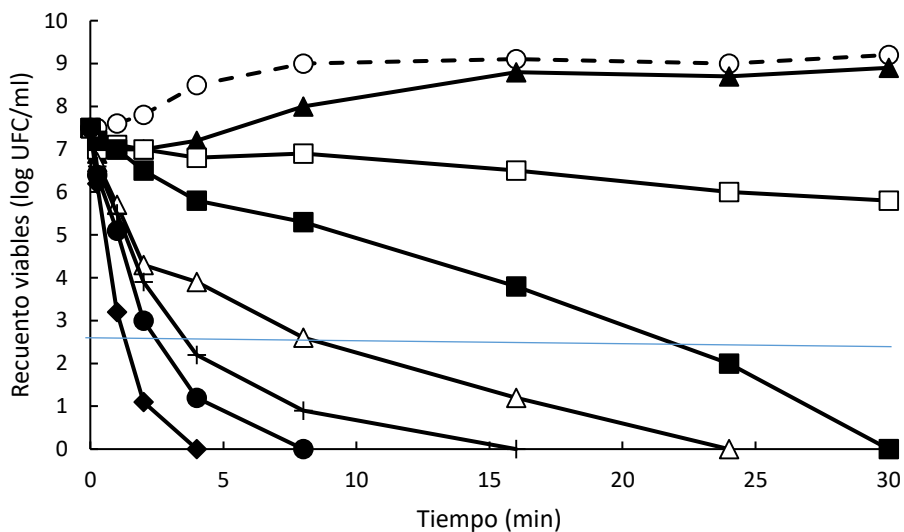


Como se va a evaluar un nuevo antimicrobiano, el estudio se realizaría directamente en el batido. Para ello, a diferentes tubos que contuviesen el batido se les adicionarían concentraciones crecientes del antimicrobiano, se inocularían con el microorganismo diana (p.e. *E. coli*) y se incubarían (4°C por ser la temperatura de uso del producto). A determinados tiempos (mínimo 24h), se tomarían muestras y se sembrarían en un medio adecuado.

Operando así, obtendríamos las curvas de letalidad para cada concentración de antimicrobiano en las condiciones reales de uso. Para ilustrar cómo son estas curvas, la **Figura 4** muestra un ejemplo de curva de letalidad típica.

A partir de aquí, podríamos calcular la concentración a la cual tras un tiempo de 24h (establecido en este caso por el tiempo mínimo de comercialización) la carga inicial de *E. coli* se ha reducido al menos 3 ciclos logarítmicos. Esta sería la CMB para este antimicrobiano en las condiciones de ensayo. Para este ejemplo, esta sería 0.16 %.

Sin embargo, puesto que se desea comercializar en EEUU, la reducción deberá de ser de al menos 5 ciclos logarítmicos. En este caso, de nuevo, la concentración elegida deberá de ser al menos 0.16 %, ya que es la más baja a la que tras 24 h de contacto se alcanza una inactivación superior a la requerida.



**Figura 4.** Curvas de letalidad para un antimicrobiano variando la concentración del mismo: (○) control; (▲) 0.04 %; (□) 0.08 %; (■) 0.16 %; (△) 0.31 %; (+) 0.62 %; (●) 1.25 %; (◆) 2.5 %.

## 5 Cierre

A lo largo de este objeto de aprendizaje hemos revisado la diferenciación entre efecto bactericida y efecto bacteriostático y el concepto de concentración mínima bactericida y de curva de letalidad. Además, a través de casos prácticos hemos conocido el procedimiento de cálculo de la CMB y de obtención de las curvas de letalidad. Todo ello nos permitirá diseñar los ensayos necesarios para evaluar el efecto de incorporar un antimicrobiano a un alimento frente a un microorganismo.



## 6 Bibliografía

ASTM International. E2315-16 Standard Guide for Assessment of Antimicrobial Activity Using a Time-Kill Procedure. West Conshohocken, PA; ASTM International, 2016.

Collins, C.H, Lyne, P.M., Grange, J.M., Falkinham, J.O. Microbiological Methods. Arnold Ed. London. 2004.

Foerster, S., Unemo, M., Hathaway, L.J. et al. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. BMC Microbiol 16, 216. 2016.

Mayaud L, Carricajo A, Zhiri A, Aubert G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. Lett Appl Microbiol. 47(3):167-73. 2008.

G. A. Pankey, L. D. Sabath, Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections, Clinical Infectious Diseases, Volume 38, Issue 6, 15 March 2004, Pages 864–870.

Ramirez, L.S, Castaño, D.M. Methodologies for evaluating the *In vitro* antibacterial activity of natural compounds of plant origin. Scientia et Technica Año XV, No 42, 2009.

SEIMC. Métodos especiales para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Editor: Picazo, J.J. 2000

SEIMC. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Editor: Picazo, J.J. 2000