



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA  
SALUD  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE  
LA SALUD**

**TESIS DOCTORAL**

**ADAPTACIÓN A BIOCIDAS EN  
BACTERIAS PROCEDENTES DE  
ALIMENTOS ECOLÓGICOS: EFECTO EN  
SU SENSIBILIDAD FRENTE A OTROS  
BIOCIDAS Y ANTIBIÓTICOS**

**PRESENTADA POR:  
REBECA GADEA FERNÁNDEZ**

**DIRIGIDA POR:  
DRA. D.<sup>a</sup> ELENA ORTEGA MORENTE  
DR. D. RUBÉN PÉREZ PULIDO  
DR. D. ANTONIO GÁLVEZ DEL POSTIGO**

**JAÉN, 7 DE ABRIL DE 2017**

**ISBN 978-84-9159-129-0**



**ADAPTACIÓN A BIOCIDAS EN BACTERIAS PROCEDENTES  
DE ALIMENTOS ECOLÓGICOS: EFECTO EN SU  
SENSIBILIDAD FRENTE A OTROS BIOCIDAS Y  
ANTIBIÓTICOS**

***BIOCIDE ADAPTATION IN BACTERIA FROM ORGANICALLY  
GROWN FOODS: EFFECT ON SENSITIVITY TO OTHER  
BIOCIDES AND ANTIBIOTICS***

Memoria para optar al grado de Doctor  
Jaén, Abril de 2017

Fdo.: Rebeca Gadea Fernández  
Aspirante al Grado de Doctor

*Los Directores del trabajo:*

*Fdo.: Elena Ortega Morente      Fdo: Rubén Pérez Pulido*

*Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz*

*Área de Microbiología. Dpto. de Ciencias de la Salud.  
Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén.*



Los directores de tesis **D<sup>a</sup>. Elena Ortega Morente, D. Rubén Pérez Pulido y D. Antonio Gálvez del Postigo Ruiz**, pertenecientes al Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén

**HACEN CONSTAR:** Que el trabajo expuesto en la presente Tesis Doctoral: **“Adaptación a biocidas en bacterias procedentes de alimentos ecológicos: efecto en su sensibilidad frente a otros biocidas y antibióticos”** presentado por **D<sup>a</sup>. Rebeca Gadea Fernández** ha sido realizado bajo nuestra dirección y supervisión, cumpliendo todas las exigencias para su presentación y defensa para optar al Grado de Doctor en la modalidad de Mención Internacional. La doctoranda ha realizado una estancia en *Teagask Res. Center* (Cork, Irlanda) desde septiembre a diciembre de 2014.

Jaén, abril de 2017

Fdo.: Elena Ortega Morente

Fdo.: Rubén Pérez Pulido

Fdo.: Antonio Gálvez del Postigo Ruiz

*Este trabajo ha sido subvencionado por el proyecto P08-AGR-4295 (Junta de Andalucía), el Plan de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Jaén (grupo AGR230), y el Campus de Excelencia Internacional Agroalimentario (CeIA3). La doctoranda ha disfrutado igualmente de la ayuda de movilidad: Premios CEIA3 a Trabajos Tutelados de Investigación de Programas de Doctorado y Trabajos Fin de Máster para impulsar Tesis Doctorales con Mención Internacional.*



## **Agradecimientos**

Este es mi agradecimiento a todas aquellas personas que me han ayudado a poder realizar la tesis.

En primer lugar, a mis directores de tesis, al catedrático D. Antonio Gálvez del Postigo que me ha permitido poder realizar la tesis en el laboratorio del cual es responsable, así como a Dña. Elena Ortega Morente y D. Rubén Pérez Pulido que me han ayudado con todas las dudas que me han podido surgir sobre el trabajo a lo largo de la tesis.

En segundo lugar, a todos aquellos compañeros de laboratorio tanto profesores como otros estudiantes de doctorado, que me han ayudado a resolver alguna que otra duda.

En tercer lugar, a todos aquellos técnicos pertenecientes al centro de instrumentación científico-técnico (CICT) que me explicaron y estuvieron conmigo mientras llevaba a cabo la realización de los experimentos mediante el uso de los instrumentos que ellos manejaban.

Y finalmente, a mi familia porque durante estos años ellos han sido mi apoyo emocional y han estado ahí para darme consejos en base a su experiencia personal y laboral.



**INDICE**



RESUMEN.....	1
SUMMARY .....	7
INTRODUCCIÓN .....	13
1. Alimentos Ecológicos .....	15
1.1. Definición e Historia .....	15
1.2. Normativa Reguladora .....	17
1.3. Producción Ecológica y Convencional .....	18
2. Biocidas.....	20
2.1. Definición, Clasificación y Normativa Reguladora.....	20
2.2. Factores Implicados en la Eficacia de los Biocidas .....	23
2.3. Biocidas Ensayados.....	25
2.3.1. Compuestos Derivados de Amonio Cuaternario .....	25
2.3.1.1. Cloruro de Benzalconio .....	26
2.3.1.2. Cloruro de Hexadecilpiridinio .....	27
2.3.1.3. Cetrimida .....	29
2.3.2. Biguanidas.....	30
2.3.2.1. Clorhexidina.....	30
2.3.3. Compuestos Fenólicos .....	32
2.3.3.1. Triclosán .....	32
2.3.3.2. Hexaclorofeno.....	34
3. Mecanismos de Resistencias frente a Agentes Antimicrobianos.....	34
3.1. Bombas de Exporte .....	35
3.2. Modificaciones en la Permeabilidad de la Membrana Celular .....	38
3.3. Modificación de Sitios Diana .....	40
3.4. Degradación y/o Transformación del Compuesto .....	41
4. Tolerancia a Biocidas y Desarrollo de otras Resistencias .....	43
4.1. Resistencias Cruzadas y Cadena Alimentaria .....	48

OBJETIVOS.....	55
TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS .....	59
Artículo 1: Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses.....	61
Artículo 2: Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods .....	65
Artículo 3: Adaptation to biocides cetrimide and chlorhexidine in bacteria from organic foods: association with tolerance to other antimicrobials and physical stresses .....	69
Artículo 4: Effects of exposure to biocides on susceptibility to essential oils and chemical preservatives in bacteria from organic foods.....	73
DISCUSIÓN GENERAL.....	77
CONCLUSIONES .....	97
CONCLUDING REMARKS .....	101
REFERENCIAS .....	105
ANEXO NORMATIVAS ALIMENTOS ECOLÓGICOS Y BIOCIDAS .....	136

**RESUMEN**



Los biocidas se emplean frecuentemente como desinfectantes por su amplio espectro de acción antimicrobiana. Sin embargo, su uso habitual para desinfección en diversos ámbitos puede provocar la aparición de resistencias tanto a biocidas como a antibióticos de importancia clínica en bacterias inicialmente sensibles a estos compuestos. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos provocados por la exposición gradual de bacterias procedentes de alimentos ecológicos a concentraciones subletales de distintos biocidas. El estudio incluye los efectos inducidos sobre la tolerancia al propio biocida, a otros biocidas, así como el desarrollo de resistencias cruzadas con antibióticos de importancia clínica. También se ha analizado la implicación de los mecanismos de exporte y las modificaciones en la fluidez de la membrana citoplasmática como posibles responsables de dichas resistencias, así como la influencia de la tolerancia a los biocidas sobre la capacidad de crecimiento y la resistencia a otros tipos de estrés.

Para llevar a cabo el estudio, partimos de una colección de 76 cepas procedentes de alimentos ecológicos y previamente identificadas y clasificadas como sensibles a biocidas. Las diferentes cepas fueron adaptadas por exposición gradual a concentraciones crecientes de distintos biocidas. La exposición reiterada de estas cepas a los biocidas fenólicos triclosán y hexaclorofeno [2,2'-methylenebis(3,4,6-trichlorophenol)] provocó un incremento en la tolerancia en 41 y 27 de las cepas estudiadas (53.9% y 35.5%), respectivamente. La adaptación a biocidas fenólicos causó igualmente un incremento notable en la tolerancia frente a otros biocidas en la mayoría de cepas estudiadas, así como una mayor resistencia frente a antibióticos. Las cepas adaptadas a triclosán presentaron una mayor resistencia a sulfametoxazol, seguido de ceftazidima y cefotaxima y aquellas sometidas a presión selectiva con hexaclorofeno vieron incrementada su resistencia principalmente frente a ampicilina y a sulfametoxazol, tanto solo como en combinación con trimetoprim.

Los principales genes para bombas de exporte detectados en las cepas adaptadas a triclosán fueron *acrB*, *qacH* y *qacJ*, así como *norA*, *mepA*, *mdeA* y *sepA*, aunque estos últimos en menor proporción. En cuanto a los determinantes de resistencia a antibióticos encontrados fueron *mecA*, *ermC*, *mphA*, *ant(4<sub>-</sub>)-Ia*, *aph(2<sub>-</sub>)-Ic* y *aac(6<sub>-</sub>)-Ie-aph(2<sub>-</sub>)-Ia*.

Entre las cepas adaptadas a hexaclorofeno detectamos los genes para bombas de exporte *sugE*, *455emeA*, *qacEΔ1*, *acrB*, *norB*, *qacH* y *efrA*, así como *ant(4<sub>-</sub>)-Ia*,

*aac(6\_)Ie-aph(2\_)-Ia*, *aph(2\_)-Ic* y *mrsA/B* como representantes de genes específicos de resistencia frente a antibióticos, si bien todos ellos en un número muy limitado de cepas.

Nueve cepas adaptadas a triclosán y seis adaptadas a hexaclorofeno desarrollaron una elevada tolerancia a los biocidas, así como un fenotipo de resistencia estable en ausencia de la presión selectiva del biocida. La mayoría de las cepas adaptadas a triclosán y una de las adaptadas a hexaclorofeno presentaron mayor rigidez en su membrana citoplasmática comparadas con las cepas sensibles, lo que sugiere un papel importante de los cambios en la fluidez de la membrana en el desarrollo de tolerancia a estos compuestos. La exposición a concentraciones crecientes de hexaclorofeno también provocó una menor tolerancia al calor, si bien la adaptación a ambos compuestos fenólicos no presentó efecto alguno en la resistencia frente al ácido gástrico y las sales biliares.

La exposición reiterada de cepas sensibles a concentraciones crecientes de compuestos derivados de amonio cuaternario provocó un incremento en la tolerancia frente a cloruro de benzalconio en el 88.2% de las cepas, en un 30.3% de las cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio y en un 47.4% de las adaptadas a cetrimida, con incrementos en las concentraciones mínimas inhibitorias de entre 2 y 100 veces superiores a las obtenidas en cepas sensibles. La resistencia se mantuvo estable en 7 de las cepas adaptadas a cloruro de benzalconio y 5 de las adaptadas a cetrimida o cloruro de hexadecilpiridinio tras 20 subcultivos en medio libre de biocida. La adaptación a cloruro de benzalconio y cloruro de hexadecilpiridinio provocó una reducción en la susceptibilidad frente a otros biocidas, principalmente hexaclorofeno, bromuro de didecil-dimetilamonio, triclosán y clorhexidina. Un alto porcentaje de las cepas adaptadas a cloruro de benzalconio mostraron también un incremento notable en la resistencia frente a ampicilina, seguida de sulfametoxazol y cefotaxima. Por el contrario algunas cepas mostraron mayor sensibilidad frente a ceftazidina, cefotaxima, ampicilina y sulfametoxazol. Las modificaciones en los perfiles de resistencia a antibióticos en las cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio fueron más heterogéneas. Por su parte, un 83.3% de las cepas adaptadas a cetrimida mostró mayor resistencia frente al menos uno de los antibióticos ensayados, mientras el 69.4% presentó mayor sensibilidad frente a uno o dos antibióticos, principalmente ceftazidima y cefotaxima.

Los principales genes para bombas de exporte detectados en las cepas adaptadas a derivados de amonio cuaternario fueron *acrB*, *sugE*, *norC*, *qacE* y *qacH*, así como los determinantes de resistencia a antibióticos *aac(6\_-Ie-aph(2\_-Ia)*, *aph(2\_-Ic)*, *ant(4\_-Ia)*, *lsa*, *mrsA/B*, *ereA*, *ermB* y *cat*. Las medidas de anisotropía en membrana plasmática mostraron que la adaptación a cloruro de benzalconio y cetrimida induce un incremento notable en la rigidez de la membrana, mientras que las alteraciones en la rigidez de la membrana tras exposición a cloruro de hexadecilpiridinio fueron más heterogéneas y dependientes de la cepa ensayada. La capacidad de crecimiento fue significativamente mayor en algunas cepas adaptadas a derivados de amonio cuaternario y se detectaron también alteraciones en otras propiedades fisiológicas, principalmente una menor tolerancia al calor y al jugo gástrico en cepas adaptadas a cetrimida. Por el contrario, la resistencia a sales biliares no se vio alterada por la exposición gradual a derivados de amonio cuaternario.

La exposición de cepas sensibles a concentraciones subletales de clorhexidina provocó una disminución transitoria en la susceptibilidad a antibióticos y otros biocidas. Las cepas adaptadas al biocida también mostraron alteraciones en las características fisiológicas analizadas, aunque la resistencia frente a sales biliares no se modificó tras la adaptación. En base a los resultados de este estudio, de nuevo los cambios en la fluidez de la membrana parecen ser el principal mecanismo responsable de la adquisición de tolerancia estable frente a este biocida.

En un último estudio, se analizó la sensibilidad frente a conservantes de empleo habitual en la industria alimentaria y frente a aceites esenciales en una colección de 38 cepas con elevada tolerancia a diferentes biocidas tras exposición gradual a los mismos. Las cepas adaptadas a crecimiento en presencia de concentraciones subletales de compuestos derivados de amonio cuaternario (cloruro de benzalconio, cloruro de hexadecilpiridinio y cetrimida), así como de hexaclorofeno y clorhexidina mostraron un incremento generalizado en la sensibilidad frente a los conservantes ensayados. Se encontró una elevada correlación positiva entre la tolerancia a cloruro de hexadecilpiridinio y el incremento en la susceptibilidad frente al ácido 4-hidroxibenzoico, aceite de tomillo y de clavo, nitrito de sódico, sorbato potásico y nitrito potásico. Por el contrario, se detectó un incremento en la tolerancia a todos los conservantes ensayados en las cepas adaptadas a triclosán. Los resultados de este estudio sugieren que la

exposición de bacterias procedentes de alimentos ecológicos a biocidas no siempre está asociada con la co-selección de resistencia a otros agentes antimicrobianos, especialmente frente a aceites esenciales y conservantes químicos empleados en la industria alimentaria, por lo que estos compuestos podrían aplicarse en ambientes alimentarios sin una posterior influencia en la selección de resistencia a antimicrobianos a lo largo de la cadena alimentaria.

## **SUMMARY**



Biocides are widely used as disinfectants because of their broad antimicrobial spectrum. However, their frequent use for disinfection in different settings may promote bacterial drug resistance against both biocides and clinically relevant antibiotics. The aim of the present study was to analyze the effects of step-wise exposure of biocide-sensitive bacteria from organic foods to biocides. The analysis included changes in the tolerance to the biocide itself, the tolerance to other biocides, and cross-resistance to clinically important antibiotics. The involvement of efflux mechanisms was also studied as well as the possible implication of alterations on cytoplasmic membrane fluidity in the resistance mechanisms. The influence of biocide tolerance on growth capacity of the adapted strains and on subsequent resistance to other physical stresses has also been analyzed.

A collection of 76 biocide-sensitive bacterial strains isolated from organically produced food were adapted by repeated exposure to increasing concentrations of biocides. Repeated exposure of bacteria from organic foods to phenolic biocides triclosan (TC) and hexachlorophene [2,2'-methylenebis(3,4,6-trichlorophenol)] (CF) resulted in increased tolerance to the biocide in 41 and 27 strains (53.9% and 35.5%), respectively. Adaptation to phenolic biocides also induced significant increases in the tolerance to other biocides and to antibiotics. TC-adapted strains showed mainly increased resistance to sulfamethoxazol, ceftazidime and cefotaxime, while CF-adapted strains were more resistant to ampicillin, the combination sulfamethoxazol/trimethoprim and sulfamethoxazol.

TC-adapted strains exhibited a limited number of efflux pump genes: *acrB*, *qacH*, *qacJ*, *norA*, *mepA*, *mdeA*, and *sepA*. As to specific antibiotic resistance determinants, we only found *mecA*, *ermC*, *mphA*, *ant(4<sub>-</sub>)-Ia*, *aph(2<sub>-</sub>)-Ic* and *aac(6<sub>-</sub>)-Ie-aph(2<sub>-</sub>)-Ia* among TC-adapted strains. The efflux pump genes *sugE*, *455emeA*, *qacEΔ1*, *acrB*, *norB*, *qacH* and *efrA*, were detected in CF-adapted strains, as well as the specific determinants for antibiotic resistance *ant(4<sub>-</sub>)-Ia*, *aac(6<sub>-</sub>)-Ie-aph(2<sub>-</sub>)-Ia*, *aph(2<sub>-</sub>)-Ic* and *mrsA/B*.

Nine TC-adapted strains and six CF-adapted strains were able to develop high levels of biocide tolerance, and these were stable in the absence of biocide selective pressure. Most strains adapted to TC and one CF-adapted strain showed significantly higher anisotropy values than their corresponding wildtype strains, suggesting that changes in membrane fluidity could be involved in biocide adaptation. Exposure to

gradually increasing concentrations of CF induced a decrease in heat tolerance, while biocide adaptation had no significant effects of gastric acid or bile resistance, suggesting that biocide adaptation should not influence survival of these bacteria in the gastrointestinal tract.

Repeated exposure of wildtype sensitive strains to increasing concentrations of the quaternary ammonium compounds (QACs) benzalkonium chloride (BC), hexadecylpyridinium chloride (HDP) and cetrимide (CE) induced an increase in the tolerance to BC in 88.2% of strains, in 30.3% of strains for HDP and in 47.4% for CE, with increases in minimum inhibitory concentrations between 2 and over 100 fold. Adaptive resistance was stable after 20 subcultures in biocide-free medium for 7 of the BC-adapted strains and for 5 of the CE- and HDP-adapted strains. Adaptation to BC and HDP also reduced the susceptibility to other biocides, mainly hexachlorophene, didecyltrimethylammonium bromide, triclosan and chlorhexidine. BC-adapted strains showed increased antibiotic resistance to ampicillin followed by sulfamethoxazol and cefotaxime, and some showed increased sensitivity to ceftazidime, cefotaxime, ampicillin and sulfamethoxazol. 83.3% of CE-adapted strains showed a higher resistance to at least one of the antibiotics tested and 69.4% had an increased sensitivity to one or two antibiotics, mainly ceftazidime and cefotaxime. Changes in antibiotic resistance in HDP-adapted strains were more heterogeneous and strain dependent.

Main efflux pump genes detected in QAC-adapted strains were *acrB*, *sugE*, *norC*, *qacE* and *qacH*, as well as antibiotic resistance genes *aac(6\_)-Ie-aph(2\_-)Ia*, *aph(2\_-)Ic*, *ant(4\_-)Ia*, *lsa*, *mrsA/B*, *ereA*, *ermB* and *cat*. Membrane anisotropy experiments revealed that QAC adaptation induces an increase in membrane rigidity in the case of BC and CE, while response to HDP was more heterogeneous and strain dependent. Growth capacity was significantly higher in some QAC-adapted strains and strain-dependent changes in heat tolerance were also detected in QAC-adapted strains, mainly decreased heat and gastric acid tolerance in CE-adapted strains. Bile resistances do not seem to be influenced by QAC adaptation.

Gradual exposure of sensitive strains to chlorhexidine (CH) also resulted in mainly transient decreased antimicrobial susceptibility to other antibiotics and to biocides. Biocide-adapted bacteria also exhibit alterations in physiological

characteristics, while bile resistance does not seem to be influenced by biocide adaptation. Results from this study suggest that changes in membrane fluidity may be the main mechanism responsible for the acquisition of stable tolerance to this biocide.

Finally, a collection of 38 biocide-adapted strains with significant increases in their tolerance to biocides after step-wise exposure to these compounds were screened for sensitivity to essential oils and chemical preservatives. Several strains grown in presence of sublethal concentrations of quaternary ammonium compounds QACs (benzalkonium chloride, hexadecylpyridinium chloride or cetrimide) showed a generalized increase in the sensitivity to preservatives. Similar results were found among hexachlorophene- or chlorhexidine- adapted strains. Moreover, tolerance to hexadecylpyridinium chloride showed a very strong positive correlation with 4-hydroxybenzoic acid, thyme oil and sodium nitrite increased susceptibility, as well as a strong correlation with clove oil, potassium sorbate and potassium nitrate increased sensitivities. On the contrary, an increase in the tolerance to preservatives among triclosan-adapted strains was detected. Results from this study suggest that exposure of bacteria from foods to biocides is not always associated with co-selection for other antimicrobial resistances, especially against essential oils or chemical preservatives used in the food industry, so these compounds could be applied in food environments with no subsequent influence on the antimicrobial resistance selection along the food chain.



## **INTRODUCCIÓN**



## 1. ALIMENTOS ECOLÓGICOS

### 1.1. Definición e Historia

La producción ecológica es un fenómeno históricamente muy reciente ya que se inicia en la última parte del siglo XIX e inicios del siglo XX, si bien tanto producción como el consumo de alimentos ecológicos se ha incrementado de forma drástica en los últimos 20 años, debido a la creciente preocupación por parte de los consumidores por el medio ambiente, la biodiversidad animal y la calidad de los alimentos. Los alimentos ecológicos se definen como aquellos provenientes de la producción ecológica, un sistema que combina el uso adecuado de las prácticas ambientales así como el reciclaje de desechos y subproductos de origen animal y vegetal, la biodiversidad genética de los productos, una conservación del ecosistema combatiendo la compactación y erosión, y normas exigentes sobre el bienestar animal. La producción ecológica no permite el empleo de organismos genéticamente modificados (OMG), y no incluye a los productos de caza y pesca de animales salvajes (Reglamento nº 834/2007).

La definición actual de producción ecológica proviene de una serie de conceptos introducidos a lo largo del siglo XX. Uno de los principales conceptos es el de naturalidad de los alimentos, que deriva de diferentes movimientos ecosociales como el “naturalista”, o el “vegetariano” desarrollados a inicios del siglo XX, y particularmente el movimiento alemán *Lebensreform*, de gran importancia entre 1919 y 1933, debido al deterioro de las condiciones de vida durante la transición de la sociedad agraria a la industrializada, que se relacionaron con la “antinaturalidad” asociada a las ciudades. La vuelta a la naturaleza se convirtió en el primer paso de la agricultura ecológica en Europa. A raíz de esto surgen diferentes pioneros de la jardinería y agricultura ecológica, los alemanes Julius Hensel, Ewald Könemann, Heinrich Bauernfeind o la suiza Mina Hofstetter, que empiezan a experimentar con el uso de fertilizantes naturales para mejorar el suelo, o como los escritores británicos Adrian Bell o Rolf Gardiner que promueven una visión de la agricultura basada en los principios ecológicos (Niggli, 2007; Stockdale y Watson, 2008).

Entre 1924 y 1929, Rudolf Steiner introduce por primera vez varios conceptos como el de la vitalidad de los alimentos, que achaca el deterioro de la calidad de la alimentación moderna a no tener en cuenta la influencia de ciertos parámetros como los ciclos lunares o las preparaciones biodinámicas en el cultivo de los productos, o el del

holismo o integridad de la alimentación y agricultura en el cual se trata a una granja como un organismo complejo estructural y funcional y no como un simple negocio con varias líneas de producción.

Poco tiempo después, en 1930, el británico Sir Albert Howard habla sobre el concepto de sistemas autorregulados y saludables basado en la creencia de que un suelo fértil significa cultivos, animales y seres humanos saludables interactuando como uno. Este mismo concepto también fue descrito por la fundadora de la Asociación del Suelo en Gran Bretaña Lady Eve Balfour, la cual desde 1939 hasta 1969 realizaría una investigación sobre las conexiones entre la manera en la que los alimentos eran producidos, la calidad de éstos y la salud humana. Las ideas desarrolladas por Howard y Balfour condujeron al desarrollo de la agricultura ecológica junto con un concepto agroecológico basado en la ciencia.

Aunque la definición moderna de la agricultura ecológica está basada en una serie de conceptos desarrollados a lo largo de los años, éstos tuvieron un inicio común en las investigaciones a principios del siglo XX del austrohúngaro Raoul Heinrich Francé y de su mujer Annie Francé-Harrar. Raoul H. Francé fue el primer ecólogo que describió el suelo como una compleja red de organismos, y junto con el estudio de su mujer Annie sobre el humus de suelos cultivables sembraron la semilla de lo que más tarde se convertiría en el núcleo del concepto de producción de cultivo ecológico (Niggli, 2007).

En España el inicio de la agricultura ecológica o Agricultura Biológica, como inicialmente se la denominó en nuestro país, se remonta a los años 70 en Barcelona gracias a un grupo de nutricionistas. El motivo principal que llevó al inicio del movimiento en España fue el hecho de que algunas enfermedades eran atribuidas a la contaminación ambiental, una alimentación poco sana y, en general, a una forma de vida alejada de la naturaleza (Jiménez Fernández, 2010).

Hoy en día estos conceptos marcan la referencia sobre la producción ecológica. De hecho, en 2005 la Federación Internacional de los Movimientos de Agricultura Ecológica (IFOAM), sintetizó y actualizó estos conceptos históricos en cuatro conceptos: el principio de salud, el principio ecológico, el principio de justicia y el principio del

cuidado, siendo estos últimos dos conceptos éticos añadidos a los históricos (Niggli, 2007).

## **1.2. Normativa Reguladora**

La reglamentación española sobre productos ecológicos se inicia en 1989 con la aprobación del Reglamento de la Denominación Genérica “Agricultura Ecológica”, aplicado hasta la entrada en vigor del Reglamento (CEE) 2092/91 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios. Más adelante, el Real Decreto 1852/1993, basándose en el anterior reglamento, establece una nueva regulación de la agricultura ecológica y en 1999 se aprueba el Reglamento (CE) 1804/99, que completa la norma de 1991 regulando la producción animal. En el año 2000 se crea el logotipo de uso voluntario “Agricultura Ecológica–Sistema de Control CE”. Y finalmente en el año 2007 los ministros de agricultura de la Unión Europea aprueban la normativa vigente actual: el Reglamento (CE) N° 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos de 28 de junio de 2007, que deroga el Reglamento (CEE) 2092/91 y en donde:

- (i) Se establecen los objetivos, principios y normas de producción ecológica de forma más explícita, asegurando su aplicación a todas las fases de la producción de alimentos, piensos y plantas, pero permitiendo la adaptabilidad a las condiciones locales.
- (ii) Se aclaran los problemas ocasionados por los OMG cuando están presentes en los productos en una cierta proporción así como establece su prohibición estricta.
- (iii) Se obliga a incluir el logotipo de la UE en los productos ecológicos autóctonos, así como el lugar de producción, incluso en productos importados que tengan el logo de la Unión Europea.
- (iv) Se permite que los productos no ecológicos indiquen los componentes ecológicos que incluyen, pero sólo en su lista de ingredientes.
- (v) Se establece que sólo aquellos productos que contengan al menos el 95% de los ingredientes ecológicos pueden ostentar la etiqueta ecológica (Jiménez Fernández, 2010).

Más tarde se aprueban otros dos reglamentos que junto con el de 2007 conforman la normativa española actual sobre producción ecológica: el Reglamento R(CE) 889/2008 de la Comisión, por el que se establecen disposiciones de aplicación del R(CE) 834/2007 con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y control, y el R(CE) 1235/2008 de la Comisión por el que se establecen las disposiciones de aplicación del R(CE) 834/2007, en lo referente a las importaciones de productos ecológicos procedentes de terceros países.

### **1.3. Producción Ecológica y Convencional**

Diversos estudios encaminados a demostrar los efectos beneficiosos de la producción ecológica sobre la convencional han puesto de manifiesto diferencias importantes entre ambos. Son de dos tipos:

- 1) Diferencias Técnicas: este grupo hace referencia a los aspectos diferenciales a nivel técnico y de producción entre los sistemas de producción ecológica con respecto a la convencional (Stockdale y Watson, 2008):
  - En el procesado ecológico se prohíben un elevado número de aditivos, tales como colorantes y conservantes, usados normalmente en el procesado convencional.
  - La producción ecológica está relacionada con un tratamiento mínimo de los alimentos. Aunque con la introducción de nuevas tecnologías de procesado o aditivos que cumplen con los estándares ecológicos este punto ha sido objeto de mucha controversia.
  - La regulación 2092/91 obliga a que exista una adecuada separación entre el cosechado, transporte, procesado y empaquetado de los alimentos ecológicos, manteniendo la trazabilidad a lo largo de todas las etapas, imponiendo así una clara separación en tiempo y/o espacio en el procesado de los alimentos ecológicos.
  - Los sistemas de agricultura convencional suelen estar relacionados con tratamientos a corto plazo que suelen provocar problemas, tales como la aplicación de fertilizantes nutritivos solubles o herbicidas que suelen acumularse en los suelos. Por el contrario los sistemas ecológicos tienden al uso de soluciones a largo plazo y evitan el uso de los herbicidas mediante la

rotación de los cultivos, el uso de depredadores naturales o variedades vegetales resistentes.

- Al restringir el uso de pesticidas, en la agricultura ecológica se produce una mejora importante en la conservación del suelo, vida animal y vegetal, al igual que una mejora de la calidad del agua y bajos niveles de residuos de pesticidas en los alimentos.
- La agricultura ecológica ha derivado en una mejor protección del suelo, ya que además de la restricción de los pesticidas se ha llevado a cabo el crecimiento de cultivos para reducir la lixiviación de nitratos, la rotación de cultivos, así como el pastoreo mixto.
- La agricultura ecológica ayuda a proteger la biodiversidad gracias al empleo de una gran variedad de semillas y plantas autóctonas y de la compartimentalización del suelo.
- El bienestar animal también ha sufrido un impacto positivo al incluir varios requisitos de protección en los estándares de producción ecológica que van más allá de las disposiciones legales.

2) Diferencias en la composición nutricional y propiedades organolépticas: las diferencias en composición nutricional entre alimentos ecológicos y convencionales parecen ser escasas en base a los estudios realizados. Se ha determinado el contenido de antioxidantes en tomates de cultivos convencionales y ecológicos, encontrándose una mayor concentración de vitamina C, carotenoides y polifenoles (excepto para el ácido clorogénico) en aquellos cultivados de forma ecológica. Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en la cantidad de licopeno y naringenina (Caris-Veyrat *et al.*, 2004). Igualmente se ha comprobado que el tomate ecológico contiene más ácido salicílico y cadmio pero menos vitamina C, licopeno y cobre que el cultivado de manera tradicional (Rossi *et al.*, 2008). En patatas cultivadas de manera ecológica se observaron una mayor cantidad de vitamina C y ácido clorogénico, así como una menor concentración de nitratos que en las cultivadas de manera tradicional (Hajšlová *et al.*, 2005).

En cuanto a las propiedades organolépticas, apenas se han observado diferencias entre ambos tipos de cultivo. Sólo se ha descrito una menor firmeza y jugosidad en

tomates ecológicos respecto a los cultivados de forma tradicional (Johansson *et al.*, 1999), así como características sensoriales más pobres en zanahorias ecológicas (Haglund *et al.*, 1999).

## **2. BIOCIDAS**

### **2.1. Definición, Clasificación y Normativa Reguladora**

De acuerdo con la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de febrero de 1998 relativa a la comercialización de biocidas y por analogía el 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, estos agentes se definen como “sustancias activas y preparados que contienen una o más sustancias activas, presentados en la forma en la que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos”.

Quedan excluidos del ámbito de aplicación de esta norma los relacionados a continuación:

- a. Los medicamentos de uso humano.
- b. Los medicamentos de uso veterinario.
- c. Los productos sanitarios y los productos sanitarios implantables activos. Así como los productos sanitarios para tratamiento *in vitro*.
- d. Los aromas para productos alimenticios y materiales de base para su producción.
- e. Los aditivos alimentarios autorizados en los productos alimenticios destinados al consumo humano.
- f. Los materiales y objetos destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios.
- g. La leche cruda, la leche tratada térmicamente y los productos lácteos.
- h. Las normas higiénico-sanitarias relativas a la producción y puesta en el mercado de los ovoproductos.
- i. Las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de productos pesqueros.
- j. Los productos utilizados en alimentación animal, los piensos y los piensos medicamentosos.
- k. Los productos cosméticos.
- l. Los productos fitosanitarios.

- m. Las condiciones de concesión de excepciones temporales y limitadas respecto a las normas comunitarias sanitarias específicas aplicables a la producción y comercialización de determinados productos de origen animal.

Atendiendo al anexo V de la Directiva 98/8/CE y al Real Decreto 1054/2002, los biocidas se clasifican de la siguiente forma:

- ✓ Grupo 1: Desinfectantes y Biocidas Generales, que incluye cinco tipos: Tipo 1 (Biocidas para la higiene humana), Tipo 2 (Desinfectantes utilizados en la vida privada y en la salud pública que no estén en contacto con alimentos o piensos), Tipo 3 (Biocidas empleados para la higiene veterinaria), Tipo 4 (Desinfectantes para las superficies que estén en contacto con los alimentos y piensos) y Tipo 5 (Desinfectantes para agua potable).
- ✓ Grupo 2: Conservantes, con ocho tipos: Tipo 6 (Conservantes para productos envasados), Tipo 7 (Conservantes para películas o recubrimientos), Tipo 8 (Protectores para maderas), Tipo 9 (Protectores de fibras, cuero, caucho y materiales polimerizados), Tipo 10 (Protectores de mampostería), Tipo 11 (Protectores para líquidos utilizados en sistemas de refrigeración y en procesos industriales, pero sin incluir aquellos productos empleados en la conservación del agua potable), Tipo 12 (Productos anti-moho) y Tipo 13 (Protectores de líquidos de metalistería).
- ✓ Grupo 3: Plaguicidas, formado por seis tipos: Tipo 14 (Rodenticidas), Tipo 15 (Avicidas), Tipo 16 (Molusquicidas), Tipo 17 (Piscicidas, donde se excluyen de estos productos los empleados para tratar las enfermedades de los peces), Tipo 18 (Insecticidas, acaricidas y productos para controlar otros artrópodos, como arácnidos, insectos, crustáceos, etc.) y Tipo 19 (Repelentes y atrayentes).
- ✓ Grupo 4: Otros Biocidas, donde se incluyen cuatro tipos: Tipo 20 (Conservantes para alimentos o piensos), Tipo 21 (Productos anti-incrustantes para proteger barcos, equipos de acuicultura u otras estructuras acuáticas), Tipo 22 (Líquidos para embalsamiento y taxidermia) y Tipo 23 (Control de otros vertebrados (parásitos)).

Los desinfectantes, a su vez, se pueden clasificar según el nivel de inactivación que producen: bajo, intermedio y alto. Los desinfectantes de bajo nivel inactivan a la mayoría de las células vegetativas, algunos hongos y virus envueltos. Los de nivel

intermedio inactivan las células vegetativas, micobacterias, la mayoría de los virus y hongos, pero no destruyen necesariamente las esporas. Los de nivel alto, o también denominados esterilizantes químicos, pueden inactivar las esporas si son expuestos durante tiempos prolongados, además de inactivar a células vegetativas, micobacterias, hongos y virus envueltos y no envueltos. Un ejemplo de desinfectantes de nivel bajo son los compuestos derivados del amonio cuaternario, y de nivel intermedio o bajo, los derivados fenólicos, en función del tipo de compuesto (SCENIHR, 2009).

La autorización de los biocidas está regulada por la Directiva 98/8/CE, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de febrero, relativa a la comercialización de biocidas, la cual armoniza en el ámbito europeo la legislación sobre estos productos. Esta directiva establece los principios comunes de evaluación y autorización de biocidas, evitando barreras económicas y administrativas. Ha sido transpuesta a nuestro ordenamiento jurídico mediante el 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. Con este Real Decreto, se controlan los 23 tipos de productos antes descritos.

Hasta ahora, en base a la legislación existente en España en esta materia (Real Decreto 3349/1983 y posteriores modificaciones, Real Decreto 162/1991 y Real Decreto 443/1994), solo se registraban algunos tipos de productos biocidas. No obstante, esta legislación sólo fue de aplicación durante el periodo transitorio de 10 años que establece la ya comentada Directiva 98/8/CE (Real Decreto 1054/2002), en la que se establece un procedimiento de revisión de las sustancias activas biocidas comercializadas con anterioridad a mayo de 2000. Esta revisión se ha llevado a cabo de acuerdo con los Reglamentos de la Comisión Europea (Reglamento (CE) N° 1896/2000, Reglamento (CE) N 2032/2003, Reglamento 1048/2005 y Reglamento (CE) 1849/2006).

A partir de septiembre de 2013 entró en vigor el nuevo 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, quedando derogada en ese momento la Directiva 98/8/CE. Con este nuevo Reglamento la Unión Europea armoniza todas las normas sobre el uso y la comercialización de los biocidas que existen en cada Estado miembro, mejorando así la libre circulación de los mismos dentro de la Unión, ya que, al tratarse de un Reglamento, es de aplicación directa en todos los Estados miembros.

## 2.2. Factores Implicados en la Eficacia de los Biocidas

La eficacia de un biocida presente en el medio depende de una serie de factores que se pueden agrupar en intrínsecos y extrínsecos:

- Factores intrínsecos: son los propios del microorganismo, ya sean inherentes a éste o adquiridos por mutaciones o a través de elementos genéticos móviles. Entre ellos destacan los siguientes:
  - *Permeabilidad de la membrana*: éste ha sido un mecanismo bastante estudiado, y afecta tanto a esporas como a células vegetativas, ya que la membrana limita la cantidad de biocida que puede penetrar en la célula (SCENIHR, 2009). En bacterias, los estudios llevados a cabo en este tema se centran en la variación en los lipopolisacáridos, ácidos grasos, fosfolípidos, proteínas de membrana y fluidez de ésta (Gandhi *et al.*, 1993; Tattawasart *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000; Schweizer, 2001; Loughlin *et al.*, 2002; Alonso-Hernando *et al.*, 2010).
  - *Expresión de Bombas de Exporte*: es un mecanismo de defensa ampliamente empleado en la resistencia de antibióticos tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, pero también ha demostrado ser eficaz reduciendo el efecto de los biocidas, como múltiples estudios han señalado, (Leelaporn *et al.*, 1994; McDonnell y Russell, 1999; Fang *et al.*, 2002; Gaze *et al.*, 2005; Maseda *et al.*, 2009; Russell, 2003; He *et al.*, 2011; Moen *et al.*, 2012; McNeil *et al.*, 2014; Schlett *et al.*, 2014). Generalmente los genes que codifican para las bombas de exporte suelen ser cromosómicos pero también pueden localizarse en plásmidos, como es el caso de los genes *qac* (Poole, 2002).
  - *Transformación o Degradación Enzimática*: este mecanismo se ha descrito como un mecanismo de detoxificación tras exposición a biocidas. En bacterias, el triclosán es empleado como una fuente de energía y carbono (Hay *et al.*, 2001) y la degradación de compuestos difeniléter como este bisfenol implica la dihidroxilación y/o la dioxigenación de uno de sus anillos fenólicos (Takase *et al.*, 1986; Schmidt *et al.*, 1992; Schmidt *et al.*, 1993).
  - *Alteración de los sitios diana*: aunque este mecanismo de resistencia no es muy común (SCENIHR, 2009), se ha descrito en *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y especies del género *Mycobacterium* bajo la presión

selectiva del compuesto bisfenólico triclosán (Schweizer, 2001; Rensch *et al.*, 2013).

- *Cambios Fenotípicos*: en bacterias expuestas a cloruro de benzalconio se han descrito cambios en el tamaño y/o grosor de las células, y en los filamentos celulares (To *et al.*, 2002; Moen *et al.*, 2012).
- *Formación de Biopelículas*: algunas bacterias, como *Staphylococcus aureus*, son capaces de crear biopelículas, matrices extracelulares poliméricas que les ayudan a protegerse de cualquier agente externo, y varios estudios han puesto de manifiesto alteraciones en la formación de éstas cuando la bacteria es expuesta a biocidas catiónicos y fenólicos (Ganeshnarayan *et al.*, 2009; Latimer *et al.*, 2012).
- *Cambios Metabólicos*: algunas bacterias expuestas a concentraciones subletales de biocidas son capaces de inducir diversos cambios metabólicos tales como un aumento en la biosíntesis de ácidos grasos por modificación de ciertas rutas metabólicas (Webber *et al.*, 2008).

➤ Factores extrínsecos:

- *Concentración del Biocida*: si se aplica en concentraciones no óptimas, su eficacia es reducida y puede facilitar el desarrollo de microorganismos resistentes, no sólo al compuesto sino a otros también, como se ha descrito en numerosos estudios (To *et al.*, 2002; Braoudaki y Hilton, 2004a, 2004b; Maseda *et al.*, 2009; Fuangthong *et al.*, 2011; Kazemi *et al.*, 2012; Santos Costa *et al.*, 2015).

Distintos parámetros físicos y químicos afectan igualmente a la eficacia antimicrobiana de los biocidas (Maillard, 2013):

- *Temperatura*: este parámetro afecta tanto a la acción de los antimicrobianos, ya que el incremento de la temperatura tiende a provocar una desnaturalización y/o una evaporación de éstos, como al crecimiento y desarrollo de los microorganismos. Se ha demostrado que una disminución de la temperatura ambiental (desde 30° C hasta 10°C) provoca que *E. coli* se vuelva más susceptible a cloruro de benzalconio.
- *pH*: el pH afecta a la actividad del biocida por modificación del mismo biocida o bien por una alteración en la interacción del mismo con el microorganismo. Cuando se incrementa el pH, la actividad de los fenoles

disminuye, al aumentar el grado de disociación de la molécula. En los compuestos derivados de amonio cuaternario y las biguanidas el aumento del pH incrementa el grado de ionización de los componentes de la superficie bacteriana y con ello se favorece la unión de estos compuestos.

- *Tiempo de Contacto*: la actividad antimicrobiana del compuesto normalmente aumenta cuando se incrementa el tiempo de contacto de éste con el microorganismo, aunque no siempre hay una relación directa entre ambos parámetros.
- *Humedad Relativa*: este factor es especialmente importante en biocidas gaseosos tipo óxido de etileno, formaldehído, dióxido de cloro, peróxido vaporizado de hidrógeno o  $\beta$ -propiolactona.
- *Composición de los Medios de Cultivo*: Se sabe que los medios que contienen glicerol alteran la susceptibilidad a los fenoles y parabenos, los que contienen L-alanina en vez de L-cisteína provocan que *E. coli* se vuelva más permeable y por ende más susceptible a los biocidas, y los que contienen aminoácidos pueden alterar, según los aminoácidos añadidos, la estructura celular y/o la susceptibilidad a los biocidas (Maillard, 2013).

## **2.3. Biocidas Ensayados**

### **2.3.1. Compuestos Derivados de Amonio Cuaternario**

Los compuestos derivados de amonio cuaternario (QACs) son surfactantes catiónicos descritos por primera vez en 1916, aunque no fue hasta la década de 1930 cuando empezaron a utilizarse (Russell, 2002). Se emplean principalmente como desinfectantes y antisépticos en instalaciones de cuidado animal y ámbito sanitario, agricultura e industria. Además, hoy en día son la principal clase de surfactantes catiónicos usados como ingredientes en numerosos productos de cuidado personal y limpieza de superficies. Sin embargo, una aplicación excesiva puede desencadenar su liberación en el medio ambiente donde se acumulan en un gradiente de concentraciones favorecido por el hecho de que son compuestos biodegradables bajo condiciones aerobias, con lo que sus concentraciones fluctúan continuamente. La exposición de los microorganismos a un amplio y cambiante rango de concentraciones puede favorecer el desarrollo de resistencias (Tezel y Pavlostathis, 2015).

La estructura química general de los estos compuestos, generalmente monocatiónicos, se muestra en la figura 1, donde R puede ser un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo sencillo ( $-\text{CH}_3$ ), un grupo alquilo sustituido con otros grupos funcionales o una cadena de alquilo, que pueden variar entre 4 y 18 grupos, lo que le confiere su actividad antimicrobiana asociada al carácter lipofílico de la molécula. La mayor actividad de los QACs contra bacterias Gram positivas y levaduras se produce cuando la longitud de la cadena de alquilo se encuentra entre 12 y 14 grupos, mientras que para Gram negativas la longitud óptima es de 14 a 16 grupos. En relación a su actividad antimicrobiana, una vez que el agente catiónico ha sido absorbido y ha penetrado en la pared celular, se produce una interacción entre el nitrógeno cargado positivamente y los grupos fosfolípidos cargados negativamente de la membrana tanto de bacterias como de levaduras (Gilbert y Moore, 2005; Buffet-Bataillon *et al.*, 2012a; Gerba, 2015). A continuación se produce una desorganización de la membrana, seguida de una pérdida de material intracelular de bajo peso molecular, la degradación de proteínas y ácidos nucleicos y una lisis final causada por enzimas autolíticas (Salton, 1968).

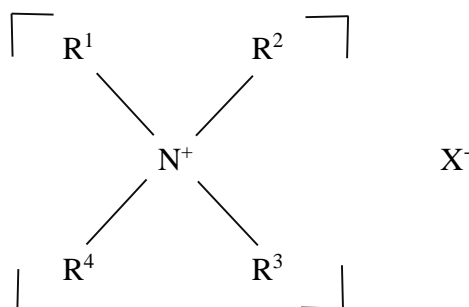


Figura 1. Estructura química general de los compuestos derivados de amonio cuaternario

Dentro de este grupo hemos empleado tres biocidas en este estudio: cloruro de benzalconio, cloruro de hexadecilpiridinio y cetrimida.

### **2.3.1.1. Cloruro de Benzalconio**

El cloruro de benzalconio (BC) o cloruro de alquilbenzildimetil amonio (Figura 2) presenta una cadena de alquilo variable que van desde 8 a 18 grupos, aunque suelen predominar las cadenas entre 12 a 14 grupos (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012a). Se trata de un biocida perteneciente al grupo 1 (Desinfectantes y Biocidas Generales) encuadrado dentro del cuarto tipo (Desinfectantes para las superficies que estén en contacto con los

alimentos y piensos) y es un compuesto derivado de amonio cuaternario ampliamente utilizado en productos farmacéuticos y en la práctica clínica para desinfectar material termolábil (Adair *et al.*, 1969).

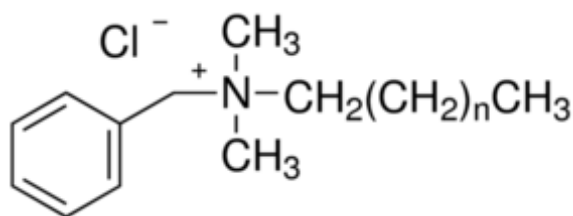


Figura 2. Estructura del Cloruro de Benzalconio

Su mecanismo de acción es similar al del resto de compuestos derivados de amonio cuaternario y depende de la dosis empleada, ya que a bajas concentraciones causa la pérdida de material citoplasmático mientras que a altas concentraciones provoca la coagulación del citoplasma bacteriano (To *et al.*, 2002).

En cuanto a la resistencia frente a cloruro de benzalconio, es frecuente su desarrollo por exposición a concentraciones subinhibitorias del compuesto (Adair *et al.*, 1969; To *et al.*, 2002). Dicha adaptación parece transmitirse a las sucesivas generaciones (Braoudaki y Hilton, 2004a; Moen *et al.*, 2012), e implica una serie de cambios como son (i) cambios en la composición de ácidos grasos (Loughlin *et al.*, 2002), (ii) expresión de genes de resistencia como son el gen *acrB* del sistema de exporte AcrAB/TolC o el gen *sugE* y genes relacionados con el estrés osmótico y oxidativo como *hdeA*, *ompF* o *ompW* (He *et al.*, 2011; Moen *et al.*, 2012), o (iii) cambios morfológicos como modificaciones en la fluidez de la membrana, en la longitud de las células o cambios en los filamentos celulares (To *et al.*, 2002; Alonso-Hernando *et al.*, 2010; Moen *et al.*, 2012).

### 2.3.1.2. Cloruro de Hexadecilpiridinio

El cloruro de hexadecilpiridinio (HDP), cloruro de 1-hexadecilpiridinio o cloruro de cetilpiridinio (Figura 3) es una sal de amonio cuaternario perteneciente al tipo 1 (Biocidas para la higiene humana) del grupo 1 (Desinfectantes y Biocidas Generales). Suele utilizarse como antimicrobiano y desinfectante en enjuagues bucales, pastillas, pastas de dientes y sprays nasales, respiratorios y de garganta (Hwang *et al.*, 2012). Al

igual que el resto de los QACs su actividad antimicrobiana depende de la longitud de la cadena de alquilos (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012a).

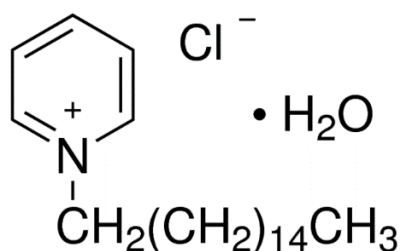


Figura 3. Estructura química del cloruro de hexadecilpiridinio

El cloruro de hexadecilpiridinio es un detergente catiónico soluble en agua, cloroformo, alcohol y acetona cuyo mecanismo de acción es igual al descrito para todos los compuestos de amonio cuaternario, siendo germicida tanto bajo condiciones ácidas como condiciones alcalinas, y con un amplio espectro de acción, aunque especialmente activo frente a bacterias Gram positivas (Quisno y Foter, 1946; Sreenivasan *et al.*, 2012; Okada *et al.*, 2016).

La eficacia clínica en enjuagues bucales del cloruro de hexadecilpiridinio está ampliamente documentada (Sreenivasan *et al.*, 2012) pero, por el contrario, hay pocos estudios acerca de la actividad antimicrobiana sobre especies bacterianas individuales, así como los posibles mecanismos de resistencia frente a este biocida. Sí se ha demostrado que la exposición reiterada al cloruro de hexadecilpiridinio origina cepas resistentes, no sólo al propio compuesto sino también a otros biocidas y antibióticos (Maseda *et al.*, 2009). Además, dicha resistencia, aunque inestable, puede ser transferible entre cepas y reduce también susceptibilidad a lisis por SDS (Tattawasart *et al.*, 1999). Para poder desarrollar dicha resistencia, las bacterias utilizan diferentes mecanismos de supervivencia como son la expresión de genes de bombas de exporte como *sugE*, *sdeAB* o *acrAB* (Maseda *et al.*, 2009; He *et al.*, 2011), y la formación de biopelículas que interactúan con el biocida e impide que penetre en las células (Ganeshnarayan *et al.*, 2009).

### 2.3.1.3. Cetrimida

La cetrimida (CE) o bromuro de alquiltrimetilamonio (Figura 4) presenta una cadena de alquilos entre 8 y 18 grupos (Gilbert y Moore, 2005). Es un compuesto derivado de amonio cuaternario perteneciente al tipo 1 (Biocidas para la higiene humana) dentro del grupo 1 (Desinfectantes y Biocidas Generales). Suele emplearse principalmente en productos de endodoncia (Güldas *et al.*, 2016).

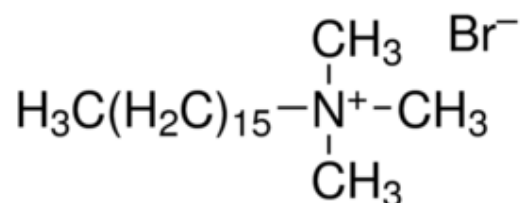


Figura 4. Estructura química de la cetrimida

La cetrimida es un surfactante catiónico que se caracteriza por ser eficaz contra bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, y hongos. Su mecanismo de acción es igual al descrito para todos los compuestos de amonio cuaternario (Ruíz-Linares *et al.*, 2014). Diversos estudios confirman la eficacia de la cetrimida en la destrucción de las biopelículas de *Enterococcus faecalis* al interactuar con la matriz extracelular, así como la destrucción de cultivos formadores de éstas si se encuentra en combinación con EDTA, ácido cítrico o clorhexidina, además de favorecer el efecto antibacteriano de algunos antibióticos (Martos *et al.*, 2013; Güldas *et al.*, 2016).

Estudios sobre resistencias a cetrimida demuestran que la exposición prolongada a cetrimida a concentraciones subinhibitorias origina la adquisición de resistencias no sólo a este biocida sino a otros compuestos como fluoroquinolonas. Entre los mecanismos responsables de esta resistencia, las bombas de exporte juegan un papel primordial, siendo los genes *nor* o el gen *mdeA* los que se han descrito con mayor frecuencia. Además se ha observado altas resistencias en los géneros *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, y en *E. coli*, donde la resistencia a cetrimida se encuentra codificada en plásmidos y está asociada a cambios en la membrana celular del microorganismo (Kazemi *et al.*, 2012; Santos Costa *et al.*, 2015).

### 2.3.2. Biguanidas

Las biguanidas se sintetizaron por primera vez a principios del siglo XX y desde entonces se ha desarrollado una gran variedad de compuestos con un amplio espectro farmacológico (Gilbert y Moore, 2005). Entre estos compuestos están las bisbiguanidas, caracterizadas por tener dos grupos biguanidas catiónicos separados por un puente hidrofóbico de 6 carbonos (Figura 5). Como compuestos catiónicos, las bisbiguanidas tienen un mecanismo de acción similar a los compuestos derivados de amonio cuaternario, ya que estos biocidas están formados por una molécula que presenta una parte cargada positivamente responsable de la unión a la estructura cargada negativamente presente en la pared y membrana celular bacteriana, desencadenando la secuencia de eventos descrita previamente para los QACs. Las biguanidas, además, pueden unirse a dos estructuras adyacentes en vez de a una, aumentando así su actividad antimicrobiana, de modo que a bajas concentraciones las bombas de exporte son incapaces de ejercer efecto sobre ellas. Además, se caracterizan por tener un amplio espectro de acción excepto en algunas bacterias Gram negativas, sobre todo en especies del género *Providentia* y de la familia *Pseudomonadaceae*, en que resulta ineficaz. (Gilbert y Moore, 2005).

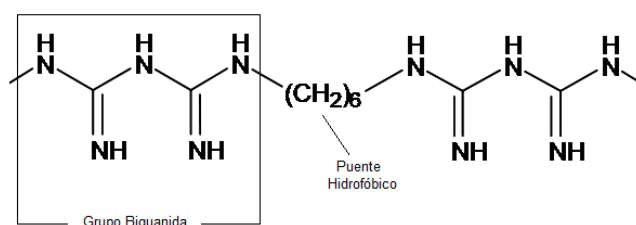


Figura 5. Estructura química general de las bisbiguanidas

#### 2.3.2.1. Clorhexidina

La clorhexidina (CH) o 1,1'-hexametilenebis[5-(4-clorofenil) biguanida] (Figura 6) se encuadra dentro del grupo 1 (Desinfectantes y Biocidas Generales) y dentro de éste en el tipo 1 (Biocidas para la higiene humana). Es uno de los biocidas más comunes en formulaciones antisépticas como productos de higiene de manos e higiene oral (McDonnell y Russell, 1999). Fue descrita por primera vez en 1946, aunque hasta 1954 no se inició su introducción y aplicación como desinfectante (Russell, 2002).

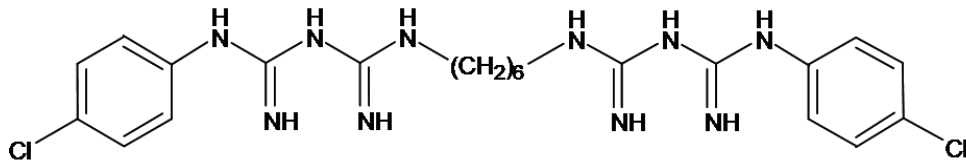


Figura 6. Estructura química de la clorhexidina

La clorhexidina, bisbiguanida catiónica con dos grupos 4-clorofenol finales, hidrofóbica, pH dependiente, lipolítica y cuyo mecanismo de acción fue descrito por primera vez en 1958, posee un amplio espectro de acción ya que actúa (i) sobre los protozoos mostrando actividad a nivel de membrana, (ii) sobre levaduras presenta un efecto bifásico, similar a bacterias, ya que produce una lisis de los protoplastos y daño intracelular mientras que a altas concentraciones provoca una coagulación intracelular, y (iii) sobre los virus, siendo especialmente activa contra virus con envoltura lipídica (McDonnell y Russell, 1999). En lo referente a las bacterias, la clorhexidina actúa de forma variable, sobre las esporas bacterianas la clorhexidina previene el desarrollo de éstas e inhibe la esporulación pero no la germinación. Sobre las bacterias, reacciona con los grupos fosfato cargados negativamente de la pared celular provocando daño celular y posterior pérdida de las enzimas periplásmicas y de los componentes citoplasmáticos. Además, a altas concentraciones, se produce la coagulación del citoplasma bacteriano y la precipitación de las proteínas y ácidos nucleicos al interactuar con las moléculas citoplasmáticas fosforiladas (Al-Adham *et al.*, 2013; McDonnell y Russell, 1999; Coenye *et al.*, 2011; Rema *et al.*, 2014).

Las exposiciones continuadas a clorhexidina originan microorganismos resistentes que se caracterizan por ser más hidrofóbicas y menos sensibles a lisis por SDS que las cepas no expuestas al biocida (Tattawasart *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000). Además, dicha resistencia es estable si la exposición se ha iniciado a bajas concentraciones (Thomas *et al.*, 2000) y provoca la aparición de resistencias cruzadas o corresistencias con otros tipos de estrés, como el oxidativo (Fuangthong *et al.*, 2011). Para incrementar su tolerancia a la clorhexidina las bacterias desarrollan una serie de mecanismos como (i) modificación de la envoltura celular, (ii) cambios en los procesos bioquímicos intracelulares (Tattawasart *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000), o (iii) expresión de genes de bombas de exporte, como los genes *qacA/B*, *smr* o *cepA* que se asocian de forma específica con la resistencia frente a clorhexidina (Fang *et al.*, 2002; McNeil *et al.*, 2014; Schlett *et al.*, 2014).

### 2.3.3. Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos han sido utilizados desde hace años por sus propiedades antisépticas, desinfectantes y conservantes (McDonnell y Russell, 1999) y la primera aplicación de éstos como compuestos antimicrobianos fue en 1815, aunque hoy en día numerosos derivados se emplean como antimicrobianos (Goddard y McCue, 2001).

La estructura de los compuestos fenólicos se muestra en la Figura 7. Se caracterizan por ser efectivos contra células vegetativas tanto Gram positivas como Gram negativas aunque no contra esporas, y presentan una actividad bifásica ya que a bajas concentraciones interactúan con las enzimas bacterianas implicadas en la síntesis de membrana, mientras que a altas concentraciones causan la coagulación general del citoplasma. Además afectan a la membrana citoplasmática al provocar la liberación de iones potasio (Al-Adham *et al.*, 2013).

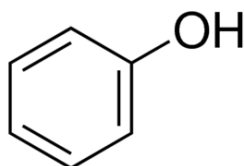


Figura 7. Estructura química del fenol

Los bisfenoles son derivados de compuestos fenólicos descritos por primera vez en 1906, aunque no fue hasta 1927 cuando se inició su aplicación (Russell, 2002). Se caracterizan por ser derivados hidroxihalogenados de dos grupos fenólicos conectados por varios puentes, presentan un amplio rango de acción contra bacterias, hongos y algas, se inactivan por surfactantes no iónicos y su solubilidad es reducida en soluciones acuosas (Al-Adham *et al.*, 2013; McDonnell y Russell, 1999).

El triclosán y el hexaclorofeno son sus representantes más conocidos, y son los biocidas que se han utilizado en este estudio.

#### 2.3.3.1. Triclosán

El triclosán (TC) irgasán o 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter (Figura 8) descubierto inicialmente en 1906 pero no aplicado hasta 1970 (Russell, 2002), pertenece al tipo 1 (Biocidas para la higiene humana) del grupo 1 (Desinfectantes y Biocidas

Generales). Suele utilizarse en productos de higiene y cuidado personal, como jabones de manos, geles, desodorantes o pastas dentífricas (Schweizer, 2001).

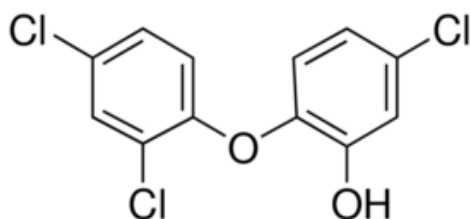


Figura 8. Estructura química del triclosán

El triclosán se caracteriza por ser un producto sintético, de amplio espectro, no iónico, termoestable hasta 200°C y soluble en disolventes orgánicos como el etanol, aunque a pH alcalino puede disolverse en soluciones acuosas. Su mecanismo de acción depende de la concentración, ya que a bajas concentraciones inhibe la enzima enoil-acil reductasa NADH-dependiente (FabI) responsable de la formación de ácidos grasos, pero a altas concentraciones causa daños en la membrana celular interfiriendo en la síntesis de compuestos lipídicos y proteicos (Schweizer, 2001; Cottell *et al.*, 2009). La actividad antimicrobiana del triclosán se caracteriza por ser principalmente bacteriostática aunque también se ha descrito actividad fungistática. Es igual de eficaz contra bacterias Gram positivas y Gram negativas, si bien presenta menor actividad contra *Serratia marcescens*, *Alcaligenes* sp. y *P. aeruginosa* (Goddard y McCue, 2001).

Las cepas que han adquirido resistencia a triclosán se caracterizan porque forman colonias más pequeñas, reducen la actividad DNasa y desarrollan una tolerancia estable en sucesivas generaciones (Braoudaki y Hilton, 2004a; Latimer *et al.*, 2012). Los principales mecanismos de resistencia son (i) impermeabilidad de la membrana externa, (ii) pared celular con alto contenido lipídico, (iii) degradación enzimática del triclosán (Hay *et al.*, 2001; Schweizer, 2001), (iv) incremento y/o mutación de sitios diana (Rensch *et al.*, 2013), (v) aumento de la biosíntesis de ácidos grasos al incrementar la producción de piruvato o alterar las vías metabólicas para producir ácidos grasos (Webber *et al.*, 2008), y (vi) expresión de genes de bombas de exporte, como AcrAB/TolC o MexAB/OprM (Schweizer, 2001).

### 2.3.3.2. Hexaclorofeno

El hexaclorofeno (CF) o 2,2'-dihidroxi-3,3',5,5',6,6'-hexaclorodifenilmetano (Figura 9), pertenece al tipo 1 (Biocidas para la higiene humana) que se encuadra en el grupo 1 (Desinfectantes y Biocidas Generales). Suele emplearse en productos como desodorantes, cremas, champús o cosméticos (Levin y Freese, 1977).

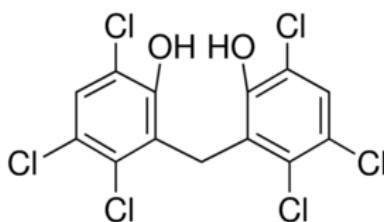


Figura 9. Estructura química del hexaclorofeno

El hexaclorofeno es un biocida bisfenólico cuyo modo de acción depende de la concentración de modo que a bajas concentraciones inhibe los sistemas de transporte de electrones y enzimas de membrana, mientras que a altas concentraciones produce la precipitación de las proteínas de la pared celular. También se caracteriza por ser más activo contra bacterias Gram positivas, especialmente el género *Staphylococcus*, que contra bacterias Gram negativas, hongos, virus y esporas (Heath *et al.*, 2000; Shmon, 2003).

Aunque el hexaclorofeno es ampliamente utilizado, no hay muchos estudios que identifiquen los mecanismos que utilizan los microorganismos para sobrevivir en presencia de este biocida. Aun así, hay algunos estudios que ponen de manifiesto la importancia de los genes plasmídicos en la tolerancia a este biocida (Sutton y Jacoby, 1978; Heath *et al.*, 2000).

## 3. MECANISMOS DE RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS

La resistencia microbiana se define como la capacidad temporal y/o permanente de un organismo y su progenie para permanecer viable y multiplicarse bajo condiciones que eliminarían o inhibirían a otros miembros de la especie (Gilbert y McBain, 2003), y ésta puede dividirse en dos tipos: intrínseca y adquirida o adaptativa. La intrínseca o innata es aquella inherente al microorganismo y puede ser específica del microorganismo

o de la población microbiana, como la formación de esporas, o bien desarrollada a través de adaptaciones fenotípicas al ambiente, como las biopelículas. La adaptativa es la ocasionada por elementos externos que han sido adquiridos por el microorganismo como los plásmidos, o por mutaciones y/o alteraciones en la expresión de genes endógenos. Entre los mecanismos de resistencia destacan las bombas de exporte, la degradación o transformación enzimática del compuesto, la modificación de los sitios diana, cambios en la permeabilidad de la membrana, formación de biopelículas y esporas (SCENIHR, 2009; Wales y Davies, 2015).

Los plásmidos, como elementos genéticos móviles fácilmente transmisibles, juegan un papel fundamental en la tolerancia a diversos compuestos. En cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se ha descrito que la resistencia a hexaclorofeno esta mediada por plásmidos como pMG1 y pMG2 (Sutton y Jacoby, 1978). En cepas de *Paenibacillus larvae* la resistencia a tetraciclina se asocia con la presencia de los plásmidos pPL373, pPL374 o pPL395 (Alippi *et al.*, 2014). Diversos genes de resistencia frente a compuestos derivados de amonio cuaternario, biguanidas, bromuro de etidio, diamidinas, parabenos, antibióticos o fenoles codificados por plásmidos se han descrito en el género *Staphylococcus* (Russell, 1997), y entre ellos están la mayoría de los genes *qac* relacionados con la expulsión de más de 30 compuestos catiónicos lipofílicos pertenecientes a diferentes clases químicas (Jaglic y Cervinkova, 2012).

### **3.1. Bombas de Exporte**

La expresión de bombas de exporte se considera un mecanismo de resistencia mixto porque puede ser adquirido, cuando están presentes en un elemento genético móvil o una mutación ocasiona su sobreexpresión, o intrínseco, si están codificadas por el propio ADN del microorganismo. Éstas 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 (Wales y Davies, 2015).

Los genes de bombas de exporte, localizados en plásmidos o en el cromosoma bacteriano, se dividen en cinco grandes familias de acuerdo con su composición, número de regiones transmembrana, fuentes de energía y sustratos: (i) familia de extrusión de

múltiples fármacos y tóxicos (MATE, *multidrug and toxic-compound extrusion*), (ii) familia de casete de unión al ATP (ABC, *ATP binding cassette*), (iii) superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*), (iv) familia de resistencia a múltiples fármacos de pequeño tamaño (SMR, *small multidrug resistance*), y (v) familia de resistencia, división, nodulación (RND, *resistance nodulation division*) (Poole, 2002; Sun *et al.*, 2014).

- 1) Familia de extrusión de múltiples fármacos y tóxicos (MATE): Se han caracterizado unos 20 transportadores pertenecientes a esta familia y que están presentes en todos los Reinos. Son proteínas transportadoras simples encargadas del antiporte de agentes catiónicos mediante protones o sodio (Li y Nikaido, 2009).  
Algunas de las bombas de exporte descritas en esta familia son NorM (descrita en *Vibrio parahaemolyticus*) o MepA (*S. aureus*), que pueden exportar compuestos derivados de amonio cuaternario y PmpM (*P. aeruginosa*), que puede exportar fluoroquinolonas, cloruro de benzalconio, bromuro de etidio o acriflavina (Piddock, 2006; Tezel y Pavlostathis, 2015)
- 2) Familia de casete de unión al ATP (ABC): Los aproximadamente 500 miembros de esta familia que han sido descritos y secuenciados se dividen en 28 subfamilias localizadas en eucariotas y procariotas y se relacionan con diferentes funciones de transporte como la expulsión de toxinas, metabolitos y fármacos mediante la hidrólisis del ATP. En bacterias están formados por dos dominios citoplasmáticos unidos al ATP y dos dominios transmembrana hidrofóbicos, sumando en total más de 1000 aminoácidos distribuidos, normalmente, en 12 hélices, 6 citoplasmáticas y 6 transmembrana (Saier, 1998; Marquez, 2005; Li y Nikaido, 2009).  
Entre las bombas de exporte pertenecientes a esta familia se encuentran LmrA descrita en *Lactococcus lactis* y que exporta  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, ciprofloxacino y ofloxacino, MrsA descrita en *Staphylococcus* spp. y que exporta macrólidos, al igual que MrsC descrita en *Enterococcus faecium*, Lsa descrita en *Enterococcus faecalis* que exporta lincosamidas, o EfrAB descrita en *E. faecalis* y que exporta norfloxacino o ciprofloxacino (Poole, 2005).
- 3) Superfamilia del facilitador mayor (MFS): Los miembros de la familia MFS son proteínas transportadoras de membrana con un tamaño en torno a 400 aminoácidos

estructurados en 12 hélices transmembrana, como TetB, o en 14 hélices, como QacA, encargadas del simporte, antiporte o uniporte de varios sustratos como fármacos o biocidas. Se divide en 17 subfamilias que pueden encontrarse en procariotas y eucariotas y se han descrito aproximadamente unos 500 miembros. En bacterias Gram negativas estos sistemas pueden funcionar como componentes de sistemas tripartitos junto con los canales adicionales MFPs (membrane fusion proteins) y OM (outer membrane) como los sistemas EmrAB-TolC o EmrKY-TolC descritos en *E. coli* (Saier *et al.*, 1998; Li y Nikaido, 2009).

Entre sus miembros destacan LfrA descrita en *Mycobacterium smegmatis* y con sustratos como el cloruro de benzalconio o a las fluoroquinolonas, QacA, QacB y QacC aisladas en *Staphylococcus aureus* y que transportan cloruro de benzalconio o clorhexidina entre otros, EmrB descrita en *E. coli* y que presenta como sustratos al ácido nalidíxico o la tiolactomicina, TetK descrita en *S. aureus*, que expulsa tetraciclina, NorA y NorB descritas en *S. aureus* y que presentan al ciprofloxacino o a compuestos derivados de amonio cuaternario, como cloruro de cetilpiridinio o cetrimida como algunos de sus sustratos, al igual que BIT descrita en *Bacillus subtilis* (Paulsen *et al.*, 1996; Poole, 2005; Tezel y Pavlostathis, 2015).

- 4) Familia de resistencia a múltiples fármacos de pequeño tamaño (SMR): Se conocen más de 250 miembros divididos en tres subfamilias. Se localizan sólo en procariotas y son proteínas de pequeño tamaño (en torno a 100 aminoácidos divididos en 4 hélices) encargadas del antiporte de diversos fármacos. Se caracterizan por ser solubles en disolventes orgánicos, y pueden ser codificados por plásmidos o por el cromosoma bacteriano (Saier *et al.*, 1998; Li y Nikaido, 2009). Entre sus miembros destaca SugE descrita en *Enterobacter cloacae* y que confiere resistencia contra biocidas como cloruro de cetilpiridinio, cloruro de benzalconio o dodecil sulfato de sodio (He *et al.*, 2011) EmrE descrita en *E. coli* y que presenta sustratos como tetraciclina o bromuro de cetilpiridinio, QacC/D, conocido también como Smr aislado en *S. aureus* y que exporta bromuro de etidio, bromuro de cetilpiridinio y otros compuestos de amonio y QacE, descrita en *Klebsiella pneumoniae* y que presenta sustratos similares a las proteínas Smr al igual que QacEΔ1 (localizado en bacterias Gram negativas) (Paulsen *et al.*, 1996).

5) Familia de resistencia, división, nodulación (RND): Esta familia se ha descrito en bacterias Gram negativas, y sus 16 miembros suelen estar formados por un sistema de tres componentes como AcrAB/TolC en donde hay un gran dominio periplasmático (en torno a 1000 aminoácidos divididos en 12 hélices), AcrB, que 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 (Saier *et al.*, 1998; Piddock, 2006; Kumar *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2014). Como ejemplos de esta familia destacan los sistemas de bombas de exporte MexCD-OprJ descrito en *P. aeruginosa* y que se induce por contacto con los biocidas cloruro de benzalconio, gluconato de clorhexidina (Morita *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2014) o triclosán (Chuanchuen *et al.*, 2001), aunque también presenta antibióticos como sustratos (tetraciclina, quinolonas o cloranfenicol), MtrCDE descrito en *Neisseria gonorrhoeae* y que incluye detergentes, antibióticos hidrofóbicos o colorantes como posibles sustratos, AcrAB-TolC descrito en *E. coli* y presenta sustratos como el bromuro de etidio, cristal violeta o antibióticos como eritromicina y acriflavina (Paulsen *et al.*, 1996), SmeDEF descrito en *Stenotrophomonas maltophilia* y que expulsa triclosán (Sun *et al.*, 2014), clorhexidina o cloruro de benzalconio, YhiUV-TolC descrito en *E. coli* y que presenta como sustrato al cloruro de benzalconio (Poole, 2005) o CmeABC y CmeDEF ambos descritos en *Campylobacter jejuni* y que proporcionan resistencia a diversos antibióticos y compuestos tóxicos (Akiba *et al.*, 2006).

### **3.2. Modificaciones en la Permeabilidad de la Membrana Celular**

Las modificaciones en la membrana celular son uno de los mecanismos de resistencia descritos con mayor frecuencia, junto con las bombas de exporte (SCENIHR, 2009). La membrana celular interviene en una gran variedad de funciones como transporte de solutos y electrones, síntesis del ATP, señalización intracelular o protección celular. A causa de esta multifunción, los cambios en la fluidez de la membrana pueden derivar en la aparición de tolerancias a diversos tipos de estrés como el ocasionado tras la exposición a alcoholes en diversas cepas bacterianas, arqueas y levaduras (Huffer *et al.*, 2011), el provocado por exposición a un gradiente de temperaturas en *L.*

*monocytogenes* (Badaoui Najjar *et al.*, 2007) y en *Acidithiobacillus ferrooxidans* (Mykytczuk *et al.*, 2010a) o el producido por adaptación al ácido cítrico y peroxiácidos en cepas de *L. monocytogenes* y *S. enterica* (Alonso-Hernando *et al.*, 2010).

Además de los cambios en la fluidez de la membrana, también se han descrito cambios en la composición de los lipopolisacáridos, ácidos grasos, fosfolípidos y proteínas, así como cambios en otras propiedades de la membrana como responsables del desarrollo de resistencias (Loughlin *et al.*, 2002; SCENIHR, 2009). En relación a diferencias en los ácidos grasos, *P. aeruginosa* adaptada a dos compuestos de amonio cuaternario (bromuro de didecildimetilamonio y cloruro de benzildimetiltetradecilamonio) presenta una alteración en la composición de ácidos grasos, en concreto en los ácidos láurico, palmítico,  $\beta$ -hidroxicáprico y  $\alpha$ - y  $\beta$ -hidroxiláurico, componentes del lípido A situado en la membrana externa de las bacterias Gram negativas, que evita la entrada de estos compuestos en la célula (Guerin-Mechin *et al.*, 1999; Guerin-Mechin *et al.*, 2000). Se han descrito cepas de *A. ferrooxidans* crecidas a bajas temperaturas y ambientes ácidos capaces de alterar la proporción de ácidos grasos saturados e insaturados, provocando un aumento de los segundos a medida que disminuye la temperatura de crecimiento (Mykytczuk *et al.*, 2010a), así como un aumento de los ácidos grasos saturados al disminuir el pH (Mykytczuk *et al.*, 2010b).

La modificación en la composición de los fosfolípidos de membrana ha sido descrita en *Pseudomonas putida* A tras adaptación al compuesto de amonio cuaternario tetradecil-trimetilamonio (Boeris *et al.*, 2007). En cepas de *P. stutzeri* adaptadas a cloruro de cetilpiridinio y a clorhexidina se han observado también cambios en los fosfolípidos de membrana (Tattawasart, *et al.*, 2000)

Se han descrito también cambios en la concentración de proteínas de membrana celular en cepas de *S. marcescens* adaptadas a gluconato de clorhexidina (Gandhi *et al.*, 1993), y en cepas de *Salmonella* se ha observado la expresión de proteínas específicas de membrana inducidas por la exposición a ácido (Leyer y Johnson, 1993). Varias cepas del género *Pseudomonas* mostraron también cambios en su perfil proteico tras la adaptación a clorhexidina y a cloruro de cetilpiridinio (Tattawasart, *et al.*, 2000) al igual que *E. faecalis* adaptada a clorhexidina, que expresó una proteína de 19-kDa tras su adaptación (Kitagawa *et al.*, 2016).

Los cambios en las propiedades de la membrana hacen referencia al nivel de hidrofobicidad que presentan las células. En este sentido se han descrito varias cepas del género *Salmonella* adaptadas a los biocidas cloruro de benzalconio y triclosán, al antibiótico eritromicina y a ácidos que incrementan su hidrofobicidad tras la adaptación, aunque no se produjo ningún cambio en la composición de la membrana (Leyer y Johnson, 1993; Braoudaki y Hilton, 2005). Esta adaptación supuso un aumento en la resistencia a otros tipos de estrés como calor, sales o a antibióticos como polimixina B (Leyer y Johnson, 1993). Resultados similares se han descrito en cepas de *E. faecalis* adaptadas a clorhexidina y cloruro de cetilpiridinio (Kitagawa *et al.*, 2016), y en diversas cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* adaptadas a los mismos biocidas (Tattawasart *et al.*, 1999) y a cloruro de benzildimetildodecilamonio (Ferreira *et al.*, 2011).

### **3.3. Modificación de Sitios Diana**

La modificación de los sitios diana es un mecanismo de resistencia escasamente descrito como mecanismo para incrementar la tolerancia a biocidas (SCENIHR, 2009). Aun así, se han observado mutaciones en el gen encargado de codificar la proteína enoil-acil reductasa de resistencia a triclosán y/o sobreexpresiones de dicho gen que ha derivado en una modificación del sitio diana en varias cepas de los géneros *Mycobacterium* (Schweizer, 2001), *Salmonella* (Rensch *et al.*, 2013), *E. coli* (Heath *et al.*, 1999) o *P. aeruginosa* (Hoang y Schweizer, 1999).

Las bacterias también reemplazan o modifican determinadas moléculas diana para evadir el efecto de antibióticos. El mecanismo más frecuente es la producción de enzimas homólogas a las proteínas de unión al péptidoglicano (PBPs), objeto de acción de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, con baja afinidad por los mismos, pero completamente activas, y que se ha descrito en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA). Esta proteína PBP2a está codificada por el locus *mec*, un fragmento genómico que probablemente ha evolucionado y se ha extendido a *S. aureus* a partir de otras especies de este género (Wu *et al.*, 1996).

La metilación de los ARN ribosómicos, que protege a las moléculas dianas del efecto inhibitorio de antibióticos macrólidos, es otro ejemplo de modificación de sitio diana, así como la resistencia a quinolonas mediada por plásmidos y basada en la protección de la molécula diana, la ADN girasa (Strahilevitz et al., 2009).

### 3.4. Degradación y/o Transformación del Compuesto

Este otro mecanismo de resistencia se ha descrito tanto para biocidas como para antibióticos (SCENIHR, 2009). En diversas bacterias, el triclosán es empleado como fuente de carbono y energía (Hay et al., 2001) de modo que este compuesto se degrada por la dihidroxilación o la dioxigenación de uno de sus anillos fenólicos (Takase et al., 1986; Schmidt et al., 1992; Schmidt et al., 1993).

Algunas cepas de los géneros *Pseudomonas* y *Flavobacterium* degradan la clorhexidina al emplearla como fuente de nitrógeno (Kido et al., 1988; Uyeda et al., 1997; Tanaka et al., 2005). Varias especies bacterianas pertenecientes a géneros como *Sphingomonas* o *Azospirillum* igualmente degradan el biocida catiónico polihexametileno (PHMB) al emplearlo como fuente de nitrógeno (O'Malley et al., 2007).

La transformación de los compuestos derivados de amonio cuaternario bajo condiciones aerobias también se ha observado en diferentes especies destacando los géneros *Xanthomonas*, *Aeromonas* y *Pseudomonas* y se han descrito tres vías por las cuales estos compuestos son degradados (Tezel y Pavlostathis, 2015). Varias cepas de *Burkholderia cepacia* son capaces emplear el cloruro de benzalconio como fuente de carbono y degradarlo hasta acetil-coenzima A y succinil-coenzima A (Ahn et al., 2016). También se han descrito casos de degradación de conservantes como los parabenos o ésteres del ácido 4-hidroxibenzoico a través de la actividad esterasa de *Enterobacter cloacae* (Valkova et al., 2001).

Un mecanismo de resistencia frente a antibióticos ampliamente distribuido entre las bacterias consiste en la inactivación enzimática de estos mediante enzimas como las  $\beta$ -lactamasas o las enzimas modificadoras de aminoglucósidos (AMEs) (Cag et al., 2016). La resistencia a aminoglucósidos se ha desarrollado en diferentes especies bacterianas tanto Gram negativas como Gram positivas, gracias a la diseminación de enzimas

modificadoras de aminoglucósidos a través de elementos genéticos móviles (Bush y Miller, 1998). Estas enzimas mimetizan el lugar de unión de los aminoglucósidos al ARNr, impidiendo la unión del antibiótico a su sitio diana (Romanowska *et al.*, 2013).

La resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos mediada por las enzimas  $\beta$ -lactamasas es responsable de gran parte de los problemas de resistencias en clínica humana. Este grupo de antibióticos ataca a las proteínas de unión a la penicilina (PBPs), e interfiere con la síntesis de la pared celular. La configuración tridimensional de las  $\beta$ -lactamasas imita a estas proteínas, lo que les permite unirse e inactivar a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, bloqueando su actividad antimicrobiana (Davies *et al.*, 2001).

Los antibióticos  $\beta$ -lactámicos son productos naturales de algunos microorganismos, por lo que en la naturaleza, incluso antes de la introducción de los antibióticos en la práctica clínica, los microorganismos producían estas enzimas para sobrevivir frente a los productores de antibióticos (Bhullar *et al.*, 2012). La enorme presión selectiva causada por el amplio uso de los antibióticos permitió la evolución y diseminación de las  $\beta$ -lactamasas, especialmente entre las bacterias Gram negativas. Este escenario se ha venido repitiendo tras la introducción de cada nuevo antibiótico  $\beta$ -lactámico en el arsenal terapéutico, independientemente de su espectro de acción. Hoy en día, las bacterias Gram negativas producen varias  $\beta$ -lactamasas de forma simultánea, lo que les confiere resistencia frente a diversas clases de antibióticos  $\beta$ -lactámicos.

Estas enzimas se clasifican en cuatro clases moleculares (A, B, C y D) (Ambler, 1980). Las enzimas de la clase A se caracterizan por ser susceptibles a los inhibidores ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam (Biondi *et al.*, 2011). La mayoría de ellas muestran además un amplio espectro de acción frente a cefalosporinas de tercera generación, por lo que se conocen como  $\beta$ -lactamasas de amplio espectro (ESBLs) y han evolucionado a partir de  $\beta$ -lactamasas de espectro reducido del tipo TEM, SHV o CTX-M mediante sustitución de uno o más aminoácidos. Las enzimas de clase A del tipo TEM y CTX-M se distribuyen principalmente entre la familia *Enterobacteriaceae* a través de elementos genéticos móviles, mientras las de tipo VEB y PER suelen propagarse entre los géneros *Acinetobacter* y *Pseudomonas* (Vahaboglu *et al.*, 1997; Poirel *et al.*, 2003).

Las enzimas de tipo KPC son carbapenemasas descritas fundamentalmente entre especies del género *Klebsiella* (Yigit *et al.*, 2001).

De entre las enzimas de la clase C destaca la enzima AmpC descrita en *Enterobacter cloacae* (Pfaller *et al.*, 1997) y que se localiza a nivel cromosómico bajo la influencia de genes reguladores, que tras contacto con cefotaxima o ceftazidina provocan la sobreexpresión de dicha enzima y el consecuente fracaso terapéutico. Las enzimas de la clase D, también denominadas oxacilinasas, presentan menor afinidad por los inhibidores de  $\beta$ -lactamasas (Biondi *et al.*, 2011). Los genes que las codifican suelen estar unidos a una secuencia de inserción o localizados en un integrón (Walther-Rasmussen y Høiby, 2006). Las carbapenemasas tipo OXA presentan una especificidad de sustrato variable y aunque su actividad en la degradación de carbapenémicos es débil, suelen conferir altos niveles de resistencia con la implicación simultánea de otros mecanismos (Poirel y Nordmann, 2006; Walther-Rasmussen y Høiby, 2006). Las enzimas pertenecientes a la clase B presentan una alta capacidad hidrolítica sobre los antibióticos carbapenémicos y se diseminan a través de plásmidos de resistencia o virulencia, lo que hace presagiar el desarrollo de bacterias pan-resistentes responsables de graves crisis sanitarias a nivel mundial (Maltezou, 2009)

#### **4. TOLERANCIA A BIOCIDAS Y DESARROLLO DE OTRAS RESISTENCIAS**

Los biocidas son ampliamente utilizados en diferentes ámbitos como el agrícola, el sanitario o en la industria alimentaria para prevenir la contaminación y transmisión de microorganismos patógenos. Aunque su actividad antimicrobiana está ampliamente probada, la eliminación de patógenos resulta difícil en ocasiones ya que numerosos factores afectan a la actividad antimicrobiana de estos compuestos. Estos factores pueden ser propios del biocida como concentración, tiempo de exposición, pH, temperatura o composición, y propios del patógeno como concentración bacteriana, tipo de microorganismo o capacidad de formación de biopelículas (Maillard, 2005). Además, se ha demostrado que la exposición a concentraciones subletales de algunos biocidas conlleva la aparición de resistencias, no sólo a otros biocidas sino también a antibióticos de importancia en clínica. De hecho, la reducción de la susceptibilidad al gluconato de clorhexidina, cloruro de benzalconio e irgasán se asocia a la resistencia a carbapenémicos,

aminoglucósidos, tetraciclina y ciprofloxacino en *Acinetobacter baumannii* (Fernández-Cuenca *et al.*, 2015).

La coselección de resistencia a distintos compuestos puede ocurrir por un mecanismo de coresistencia (presencia de dos o más mecanismos de resistencia en un organismo) o por resistencia cruzada (presencia de un mecanismo de resistencia que afecta a dos o más agentes antimicrobianos). La coresistencia a su vez puede originarse por la adquisición de un elemento genético como un plásmido, un trasposón o un integrón que contenga dos o más genes de resistencia. La resistencia cruzada puede ser debida por ejemplo a una sola bomba de exporte que elimine dos o más tipos de antimicrobianos (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012a).

Por el contrario, también se han descrito microorganismos que han desarrollado resistencia a un compuesto y como consecuencia presentan mayor sensibilidad frente a otro u otros antimicrobianos. Probablemente el mecanismo responsable es la reducción del metabolismo celular a consecuencia del desarrollo de resistencia, lo que a su vez provoca un incremento en la sensibilidad frente a otros compuestos (Pál *et al.*, 2015).

La resistencia cruzada a compuestos antimicrobianos, tras la exposición y adaptación a un biocida puede ocurrir en las siguientes situaciones: (i) cuando el biocida y el compuesto antimicrobiano actúan sobre la misma diana celular, (ii) cuando ambos comparten el mismo mecanismo de transporte, (iii) cuando los dos pueden ser eliminados por el mismo mecanismo de resistencia (Gilbert y McBain, 2003), y finalmente (iv) en situaciones donde los genes que contribuyen a la tolerancia al biocida y la resistencia al antibiótico están presentes en el mismo elemento genético móvil (Poole, 2004).

Las primeras resistencias a biocidas fueron descritas en los años 50 probablemente a causa de su frecuente empleo en distintos ámbitos como el doméstico, en escuelas, hospitales, restaurantes o granjas. Este uso, a veces excesivo, junto con la baja especificidad en los mecanismos de acción de muchas de estas sustancias, ha conducido no sólo a la disminución de la sensibilidad de los microorganismos a estas sustancias, sino también a la aparición de múltiples resistencias a través de mecanismos comunes con otros compuestos, no necesariamente relacionados estructuralmente. Entre esos compuestos, los agentes catiónicos (compuestos derivados de amonio cuaternario,

clorhexidina, diamidinas y acridinas) y el triclosán son los principales responsables de la selección y distribución de microorganismos resistentes (Russell, 2002; Randall *et al.*, 2004).

Debido al empleo frecuente de agentes catiónicos y triclosán se han detectado numerosas resistencias cruzadas y/o corresistencias en relación a estos compuestos: se ha descrito una cepa de *Serratia marcescens* adaptada a cloruro de cetilpiridinio que muestra resistencia cruzada con cloruro de benzalconio y gluconato de clorhexidina gracias a la expresión de bombas de exporte como SdeAB (Maseda *et al.*, 2009). Igualmente cepas de *S. enterica* serovar Typhimurium, *S. enterica* serovar Virchow y *E. coli* O157 adaptadas a cloruro de benzalconio muestran resistencia cruzada con clorhexidina. También se han observado resistencia cruzada frente al triclosán en cepas de *S. enterica* serovar Virchow y de *E. coli* O157 adaptadas tanto a cloruro de benzalconio como a clorhexidina (Braoudaki y Hilton, 2004a). Algunas cepas de *P. aeruginosa* adaptadas a cloruro de benzalconio muestran corresistencia con otros compuestos químicamente relacionados como cetrimida y cloruro de cetilpiridinio (Loughlin *et al.*, 2002). También se ha descrito resistencia cruzada entre cloruro de benzalconio y clorhexidina en cepas de *P. aeruginosa* (Thomas *et al.*, 2000) y de *E. coli* debido, principalmente, a la acción de bombas de exporte (Langsrud *et al.*, 2004), así como entre varios biocidas (triclosán, cloruro de benzalconio, cloruro de cetilpiridinio, diacetato de clorhexidina y fosfato trisódico) en cepas de *Campylobacter*, destacando las cepas adaptadas a fosfato trisódico que muestran un incremento en su tolerancia frente a todos los biocidas ensayados, debido a diversos mecanismos de resistencia como expresión de bombas de exporte y cambios en la composición proteica de la membrana externa (Mavri y Smole Možina, 2013). Por el contrario, se ha descrito también una mayor sensibilidad frente a diversos antimicrobianos asociados a la adaptación a biocidas en cepas de *Campylobacter* (Mavri y Smole Možina, 2013).

Los problemas relativos al desarrollo de resistencias a antibióticos se han incrementado desde los años 60, asociados a un empleo inadecuado o por una prescripción excesiva en clínica humana y en la práctica veterinaria (Gilbert y Moore, 2005). Se ha intentado frenar el aumento de estas resistencias mediante la aplicación de antisépticos y desinfectantes, como compuestos derivados de amonio cuaternario o biguanidas, en la limpieza e higiene de hospitales, clínicas veterinarias y otros lugares de

trabajo así como en el material empleado en éstos; sin embargo el mal uso que se ha hecho de estos compuestos también ha derivado en la aparición de resistencias cruzadas o corresponsencias entre ambos (Gilbert y Moore, 2005; Buffet-Bataillon *et al.*, 2012a). La resistencia frente a biocidas suele estar mediada por mecanismos inespecíficos debido a que estos compuestos suelen actuar simultáneamente sobre múltiples dianas celulares. Entre los mecanismos responsables de esta resistencia destacan la reducción en la acumulación del fármaco, descenso de la permeabilidad celular, modificación del sitio diana, modificación del propio compuesto, activación de genes de bombas de exporte y/o de sistemas de exporte, mutaciones genéticas que provoquen sobre-expresión de enzimas, inactivación de porinas o formación de biopelículas (Lambert *et al.*, 2001; Fraise, 2002; Braoudaki y Hilton, 2004a). Aparte de los mecanismos propios del microorganismo, hay que considerar la posibilidad de interacción entre diversos microorganismos y la posible transmisión de material genético entre ellos mediante conjugación, transformación o transducción, confiriendo resistencia a amplias poblaciones bacterianas. A esto hay que añadir la resistencia natural de determinadas bacterias frente a compuestos concretos (Lambert *et al.*, 2001).

La aparición de resistencias cruzadas o corresponsencias es cada vez más patente, de modo que cepas expuestas a biocidas comunes en la industria alimentaria muestran una mayor tolerancia a diversos antibióticos (Condell *et al.*, 2012; Jaglic y Cervinkova, 2012; Mavri y Smole Možina, 2013; Tandukar *et al.*, 2013; Donati *et al.*, 2014). Se ha descrito una cepa de *L. monocytogenes* resistente a cloruro de benzalconio con una tolerancia incrementada a bromuro de etidio y antibióticos como ciprofloxacino o trimetoprim, probablemente a causa del aumento en la expresión de sistemas de exporte de la familia MDR, que pueden admitir bromuro de etidio y trimetoprim como sustrato (Rakic-Martinez *et al.*, 2011). Una cepa de *E. coli* adaptada a cloruro de benzalconio también mostró un incremento en su tolerancia frente a diversos antibióticos (ampicilina, ácido nalidíxico, cloranfenicol, penicilina o proflavina) y bromuro de etidio, debido a la actividad de diversas bombas de exporte (Langsrud *et al.*, 2004). En otro estudio sobre *E. coli* la adaptación a triclosán supuso un incremento de la tolerancia a cloranfenicol, (Braoudaki y Hilton, 2004b) así como a eritromicina, tetraciclina, imipenem y trimetopim (Braoudaki y Hilton, 2004a). Además, cuando *E. coli* desarrolla resistencia frente a clorhexidina, gracias a genes de bombas de exporte como el gen *cmlA*, también presenta resistencia frente a varios antibióticos como sulfametoxazol, tetraciclina y kanamicina

(Bischoff *et al.*, 2002). La adaptación de *Serratia marcescens* a cloruro de cetilpiridinio origina resistencia cruzada con antibióticos como tetraciclina, cloranfenicol o fluoroquinolonas, y en dicha protección cruzada la bomba de exporte SdeAB juega un papel importante (Maseda *et al.*, 2009). En el género *Pseudomonas* también se han descrito tolerancias a biocidas y antibióticos; la tolerancia a clorhexidina origina un aumento en la resistencia a imipenem (Lambert *et al.*, 2001), polimixina, gentamicina, eritromicina y ampicilina (Tattawasart *et al.*, 2000), y frente a polimixina B tras adaptación a cloruro de benzalconio (Loughlin *et al.*, 2002). Algunas cepas de *Salmonella* muestran también una mayor resistencia a cloranfenicol tras adaptación a cloruro de benzalconio (Chuanchuen *et al.*, 2008). En el caso del triclosán se han detectado resistencias cruzadas y/o corresistencias frente a varios antibióticos (Randall *et al.*, 2004), como cloranfenicol o nitrofurantoina (Middleton y Salierno, 2013). La adaptación a ceftriaxona aumenta la resistencia frente a fluoroquinolonas (Santos Costa *et al.*, 2015). Por otro lado, las resistencias cruzadas y/o corresistencias entre biocidas y antibióticos no sólo se han descrito tras exposición de las cepas a biocidas, sino también por contacto previo con antibióticos. Una cepa de *Streptococcus pneumoniae* resistente a fluoroquinolonas mostró una elevada tolerancia a ceftriaxona, bromuro de etidio y acriflavina, por acción de bombas de exporte (Zeller *et al.*, 1997). Cepas de *P. aeruginosa* adaptadas a tobramicina y amikacina también ven incrementada su tolerancia a cloruro de benzalconio (Joynson *et al.*, 2002). Se ha descrito igualmente resistencia cruzada entre amoxicilina y trimetoprim/sulfametoxazol con compuestos derivados de amonio cuaternario, debido, sobre todo, a la actividad del sistema AcrAB/TolC de exporte en *E. coli* (Buffet-Bataillon *et al.*, 2012b). La resistencia a derivados de amonio cuaternario puede estar mediada por bombas de exporte como las codificadas por los genes *qacA*, *qacB*, *qacC*, *qacD*, y *qacE* responsables de incrementar la resistencia frente a varios biocidas, y que en algunos casos presentan homología con genes de bombas de exporte responsables de la resistencia frente a tetraciclina. Quizás el ejemplo más claro que vincula la tolerancia entre biocidas y múltiples antibióticos es el regulon *mar*. Las cepas que expresan la proteína Mar tienen alrededor de 60 genes cromosómicos secundarios afectados y son resistentes a tetraciclina, cloranfenicol, triclosán y aceites esenciales (Fraise, 2002).

#### 4.1. Resistencias cruzadas y cadena alimentaria

El hecho de que muchos mecanismos de tolerancia a biocidas puedan acomodar antimicrobianos de relevancia clínica y la posible unión física de determinantes genéticos implicados en la tolerancia a biocidas y la resistencia a antibióticos ha provocado un creciente interés acerca del impacto del empleo de biocidas en la industria alimentaria y la prevalencia y distribución de resistencia a antimicrobianos a lo largo de la cadena alimentaria. Varios estudios han confirmado la relación causal entre la incidencia de bacterias resistentes asociadas al ser humano y a animales domésticos destinados a consumo. Las principales vías de exposición son los alimentos, el agua, los propios humanos por contacto de persona a persona y los animales. En el caso de los productos cárnicos, el pollo, el pavo, la ternera, el cerdo y sus derivados son los principales vehículos de transmisión especialmente de cepas de *Campylobacter* y *Salmonella*, frecuentemente caracterizadas como resistentes a múltiples antibióticos y que provocan una elevada tasa de morbilidad y mortalidad (Helms *et al.*, 2004, 2006; Molbak, 2004).

Durante el procesamiento de la carne, las bacterias de origen animal pueden contaminar otros productos alimentarios, elementos de la planta procesadora o incluso a los trabajadores de la misma. Por otra parte, es posible que los microorganismos resistentes se introduzcan en la línea de producción desde exterior, a través por ejemplo de los manipuladores de alimentos. Se ha descrito tolerancia a biocidas en cepas de *S. aureus* procedentes tanto de ambientes clínicos como de aislados equinos (Bjorland *et al.*, 2003), bovinos (Bjorland *et al.*, 2001) y de origen alimentario (Heir *et al.*, 1995, 1999a, 1999b; Sidhu *et al.*, 2001). Las cepas de esta especie resistentes a meticilina (MRSA) se aíslan cada vez con mayor frecuencia de fuentes alimentarias y suponen un grave riesgo y un problema frecuente asociado a infecciones en humanos (Gould *et al.*, 2012). Además, en estas cepas se ha comprobado la presencia de bombas de exporte para compuestos como las acridinas, el bromuro de etidio, derivados de amonio cuaternario, cristal violeta y diaminas (Emslie *et al.*, 1985; Jones y Midgley, 1985) y la tolerancia incrementada frente a estos compuestos aparecen fundamentalmente en cepas de MRSA portadoras de genes que confieren resistencia frente a la gentamicina (Emslie *et al.*, 1985; Lyon y Skurray, 1987; Littlejohn *et al.*, 1991). La presencia de estafilococos tolerantes a desinfectantes como los derivados de amonio cuaternario en la cadena alimentaria es preocupante, al igual que la posible distribución de determinantes de resistencia entre

especies de este género. Este escenario podría favorecer la supervivencia, crecimiento y propagación de estafilococos enterotoxigénicos y/o cepas de relevancia clínica.

Algunas especies de estafilococos tolerantes a QACs y portadoras de los genes de resistencia *qacA/B* y *smr* aislados en distintas localizaciones dentro de la cadena de producción alimentaria, así como de productos alimentarios (Sudheim *et al.*, 1992; Heir *et al.*, 1995) han mostrado una elevada resistencia frente a diversos antibióticos, principalmente  $\beta$ -lactámicos (Heir *et al.*, 1999a). De hecho, los genes *qacA/B* y *blaZ* (que codifica para una  $\beta$ -lactamasa) residen en plásmidos comunes a cepas de estafilococos de origen alimentario y clínico (Sidhu *et al.*, 2001, 2002), por lo que es posible que el empleo de QACs para desinfección en hospitales o ambientes veterinarios pueda seleccionar estafilococos resistentes a penicilina, o viceversa.

También se han aislado estafilococos coagulasa negativos procedentes de alimentos, muestras y manos de manipuladores en un servicio de comidas tolerantes a cloruro de benzalconio y con alta frecuencia de resistencia a antimicrobianos (Marino *et al.*, 2010). La desinfección basada en QACs tiene múltiples aplicaciones en medicina veterinaria y desarrollan un papel importante en el control de enfermedades animales. Sin embargo, se han aislado de ganado vacuno cepas de *S. aureus* resistentes a penicilina y tetraciclina, tolerantes a QACs y portadoras de un plásmido que incluye el gen *smr* y que presenta una elevada similitud con los previamente descritos en humanos y en alimentos (Bjorland *et al.*, 2001). También se ha descrito una amplia distribución de genes que proporcionan tolerancia a QACs basada en bombas de exporte (*QacA/B*, *Smr*, *QacG*, y *QacJ*) en estafilococos procedentes de leche no pasteurizada, de vacas y de rebaños de cabras productoras de leche (Bjorland *et al.*, 2005). También se han descrito susceptibilidades reducidas a QACs en cepas de *L. monocytogenes* y bacterias lácticas procedentes de alimentos o industrias alimentarias (Aase *et al.*, 2000; Heir *et al.*, 2004; Aarestrup *et al.*, 2007). Algunas cepas de *L. monocytogenes* procedentes de queso, ternera y aves presentaron baja susceptibilidad a diversos biocidas (Lemaitre *et al.*, 1998) y se demostró que estas tolerancias múltiples están asociadas a la presencia de ADN extracromosómico transferible no sólo entre cepas del género *Listeria* sino también entre *L. monocytogenes* y *S. aureus*. La exposición a concentraciones subletales de cloruro de benzalconio o triclosán también se han asociado a mutaciones que provocan menor susceptibilidad frente a genamicina y kanamicina (To *et al.*, 2002; Romanova *et al.*, 2006)

y frente a aminoglucósidos (Christensen *et al.*, 2011) en cepas de *L. monocytogenes*. Este hallazgo es realmente alarmante si se considera la relevancia de la gentamicina en el régimen clínico habitual para el tratamiento de la listeriosis en humanos. Si bien la resistencia a antimicrobianos aún no hace peligrar las intervenciones terapéuticas en casos de listeriosis, no cabe duda de que la presión selectiva asociada a la exposición a antibióticos y desinfectantes puede ocasionar una reducción en la susceptibilidad a estos agentes (Rakic-Martinez *et al.*, 2011). Si bien las especies de *Listeria* no patógenas como *Listeria innocua* y *Listeria welshimeri* son más habituales que *L. monocytogenes* en industrias alimentarias, sí que pueden contribuir a la diseminación de genes de protección frente a desinfectantes entre especies de este género (Katharios-Lanwermyer *et al.*, 2012; Ratani *et al.*, 2012).

El empleo de conservantes puede también provocar la selección de resistencia a antimicrobianos de acuerdo con diversos estudios. Algunas cepas de *Salmonella* expuestas a derivados clorados o a los conservantes nitrito sódico, benzoato sódico o ácido acético o a concentraciones subletales de fosfato trisódico, dióxido de cloro o ácido peroxiacético han mostrado menor sensibilidad frente a diversos antibióticos (Potenski *et al.*, 2003; Alonso-Hernando *et al.*, 2009).

Las bombas de exporte y los mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos (MAR) son frecuentes en bacterias Gram negativas, incluidas algunas cepas de interés en el ámbito de la seguridad alimentaria. En *E. coli* y *S. enterica* serovar Typhimurium, el fenotipo MAR media la activación de bombas de exporte y confiere una media de reducción en la susceptibilidad a antibióticos no relacionados estructuralmente de entre 4 a 8 veces (Randall *et al.*, 2008), entre los que destacan  $\beta$ -lactámicos, cloranfenicol, fluoroquinolonas y tetraciclinas (Miller *et al.*, 1994; Okusu *et al.*, 1996; Hachler *et al.*, 1991), tolerancia a disolventes orgánicos (White *et al.*, 1997) y reducción en la susceptibilidad a desinfectantes como el aceite de pino (Moken *et al.*, 1997) y el triclosán (McMurry *et al.*, 1998a). En un estudio con cepas de *E. coli* y *Salmonella* procedentes de aves sólo se detectó actividad de bombas de exporte y expulsión de componentes activos de tres desinfectantes comerciales para el hogar (triclosán, salicilato sódico y orto-fenilfenol) en cepas resistentes a antibióticos (Thorrold *et al.*, 2007). Otros aislados de *E. coli* de origen porcino resistentes al olaquinox (un agente promotor del crecimiento específico para este ganado) son portadores del gen *oqxA* de la bomba de exporte

perteneciente a la familia RND OqxAB, que reduce la sensibilidad a ciprofloxacino, norfloxacino, trimetoprim, cloruro de benzalconio, triclosan y, en menor medida, cetrimida y clorhexidina (Hansen *et al.*, 2005). Esta bomba de exporte OqxAB, que también favorece la formación de biopelículas, se localiza en plásmidos conjugativos que pueden transferirse a otras bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* (Norman *et al.*, 2008). El tratamiento con derivados de amonio cuaternario provoca el desarrollo de mutantes estables de *Salmonella* con menor susceptibilidad frente a ciprofloxacino, cloranfenicol, tetraciclina y ampicilina, así como con niveles menores de proteínas de membrana externa (Karatzas *et al.*, 2007). Sin embargo, la diseminación de estas cepas parece ser menor debido a su menor virulencia asociada, una indicación del coste fisiológico asociado al desarrollo de tolerancias a desinfectantes y otros antimicrobianos (Karatzas *et al.*, 2008).

No obstante, los estudios realizados acerca de los efectos sobre diversas cepas de los tratamientos con biocidas de empleo habitual en la industria alimentaria han dado lugar a resultados contradictorios en muchas ocasiones. La exposición de *S. enterica* serovar Typhimurium a cuatro biocidas a la concentración recomendada provocó la selección de mutantes multi-resistentes con sobre-expresión de la bomba de exporte multi-fármacos AcrEF (Whitehead *et al.*, 2011), mientras la exposición de cepas de *Salmonella* de diversos orígenes (clínicos, alimentarios, del ambiente y de aguas) a formulaciones comerciales de biocidas provocó el desarrollo de tolerancia estable exclusivamente frente a componentes individuales, pero no frente a la formulación completa (Condell *et al.*, 2012). Tampoco se ha demostrado tolerancia incrementada a agentes antimicrobianos en cepas de *Salmonella*, *E. coli*, *Staphylococcus hyicus*, *S. aureus*, *E. faecalis*, y *E. faecium* aisladas de ganado en granjas que emplean de forma habitual estos compuestos para la desinfección (Aarestrup y Hasman, 2004).

Por el contrario, estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio sobre 378 cepas procedentes de alimentos ecológicos han mostrado un total de 64 cepas (identificadas como *Pantoea* sp., *Enterobacter* sp., *Bacillus cereus*, *E. faecium*, *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Klebsiella oxytoca* y *Salmonella*), resistentes a diversos biocidas, principalmente cetrimida, cloruro de hexadecilpiridinio, clorhexidina o triclosán. De entre estos aislados, 36 cepas con elevada tolerancia frente al menos un biocida fueron también descritas como resistentes frente al menos uno de los antibióticos

ensayados, principalmente frente a amoxicilina, ciprofloxacino, cefuroxima o eritromicina (Fernández-Fuentes *et al.*, 2012). Es posible que la tolerancia a un biocida surja por un uso incorrecto o un abuso de las formulaciones, cuando el biocida se emplea a concentraciones inferiores a las recomendadas por el fabricante, si se diluye accidentalmente por mezcla con otros líquidos presentes en circuitos o fregaderos, si el biocida se aplica en presencia de materia orgánica por una incorrecta limpieza previa, o bien si se emplea a valores de temperatura o pH no óptimos (Condell *et al.*, 2012).

Las resistencias cruzadas y/o corresponsencias entre biocidas y conservantes alimentarios están poco documentadas, aunque sí se han descrito en relación a antibióticos y, más comúnmente, con otros conservantes. La exposición previa de *Salmonella enteritidis* a benzoato de sodio y nitrito de sodio induce la expresión del operón *marRAB*, que provoca un aumento en la resistencia a tetraciclina (Potenki *et al.*, 2003). Varias cepas (*S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella*) expuestas a concentraciones subletales del aceite esencial del árbol del té redujeron su susceptibilidad a varios antibióticos (McMahon *et al.*, 2007). *E. coli*, previamente expuesta a ácido p-hidroxibenzoico incrementa su supervivencia bajo estrés peroxidativo (Pu *et al.*, 2015). *S. enteritidis* adaptada a propionato muestra resistencia a estrés por ácido (Calhoun y Kwon, 2010). *L. monocytogenes* presenta protección cruzada entre cloruro sódico y nisina a través de la expresión del regulador génico *liaR* (Bergholz *et al.*, 2013). Además, dicha cepa también muestra resistencia cruzada entre lactato de potasio y nisina gracias a la expresión del también regulador génico *virR* (Kang *et al.*, 2015).

Igualmente se han descrito reducciones en la tolerancia a conservantes en diversas levaduras (*Candida lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*, *Hansenula anomala*, *Kloeckera apiculata*, *Lodderomyces elongisporus*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulopsis glabrata*) expuestas a estrés por calor, las cuales incrementaron su sensibilidad a varios aceites esenciales, como tomillo, clavo, orégano o canela, posiblemente por el daño provocado en la membrana celular (Conner y Beuchat, 1984).

El control de la resistencia a antimicrobianos es esencial, ya que no sólo se pueden transmitir a lo largo de la cadena alimentaria bacterias resistentes o multiresistentes, sino también determinantes genéticos de resistencia que pueden propagarse y provocar la aparición de nuevos microorganismos tolerantes y que únicamente pueden ser detectados

mediante el conocimiento en profundidad de los mecanismos responsables de estos rasgos de resistencia a nivel molecular (Helmuth *et al.*, 2009).

Es fundamental mejorar el conocimiento acerca de la ecología bacteriana y los factores que influyen en la supervivencia tras contacto con los biocidas, el desarrollo de resistencias cruzadas, la coselección de determinantes genéticos y la prevalencia de mutantes en el ámbito alimentario así como su capacidad de transferir determinantes genéticos de resistencia a otras especies, ya que las bacterias tolerantes a un amplio rango de compuestos antimicrobianos, incluidos los biocidas, son cada vez más frecuentes a lo largo de la cadena alimentaria.

El riesgo de desarrollo de tolerancia a biocidas disminuye considerablemente cuando las preparaciones comerciales se aplican a las concentraciones recomendadas. El riesgo de desarrollo de mutaciones o adaptaciones que confieren tolerancia también disminuye en el caso de empleo de biocidas basados en agentes oxidantes, si bien estos compuestos presentan mayores interferencias por la presencia de materia orgánica. Una limpieza previa adecuada y una desinfección con rotación de los productos empleados puede prevenir la aparición de bacterias tolerantes a los biocidas a lo largo de la cadena alimentaria. Al mismo tiempo, la implementación de programas específicos de control es fundamental, no sólo para determinar la eficacia de los procesos de desinfección, sino también la posible persistencia y propagación de tolerancia cruzada a biocidas y antibióticos o de bacterias co-tolerantes.



## **OBJETIVOS**



Los biocidas se emplean con gran frecuencia en los ámbitos clínico y agrícola, así como en la industria alimentaria para prevenir la contaminación microbiana debido a su amplio espectro de acción. Sin embargo, el empleo de dosis inadecuadas y la insuficiente limpieza previa a su empleo pueden reducir significativamente su eficacia. Bajo estas condiciones, las bacterias están expuestas de forma regular a concentraciones subletales de estos desinfectantes y esto puede provocar una reducción en la susceptibilidad no sólo al propio biocida empleado, sino a otros biocidas o a otros tipos de compuestos antimicrobianos. Dado que los biocidas y los antibióticos comparten muchos mecanismos de resistencia bacteriana, la exposición a concentraciones subletales de biocidas puede contribuir a la diseminación de la resistencia a antibióticos, un problema global al que nos enfrentamos con mayor frecuencia en las últimas décadas. Igualmente, esta presión selectiva ejercida por los biocidas puede modificar la respuesta bacteriana a procesos empleados habitualmente en la industria alimentaria, permitiendo la supervivencia de bacterias adaptadas a concentraciones de desinfectantes habitualmente eficaces, así como a diversos tratamientos físicos y químicos. La escasez de estudios acerca de la adquisición de tolerancia frente a biocidas por parte de microorganismos de origen alimentario, hace necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de la aparición de caracteres de resistencia en este tipo de microorganismos sometidos a una fuerte presión selectiva por contacto con biocidas.

Atendiendo a los antecedentes expuestos anteriormente, parece oportuno plantear los siguientes objetivos:

- Inducir el desarrollo de mecanismos de tolerancia frente a biocidas en cepas bacterianas aisladas de alimentos ecológicos y clasificadas como sensibles a dichos compuestos.
- Determinar si la adaptación a biocidas va acompañada de cambios en la sensibilidad frente a otros biocidas, conservantes y antibióticos.
- Conocer los determinantes genéticos de resistencia frente a biocidas y a antibióticos en las cepas adaptadas a biocidas.
- Evaluar la implicación de los sistemas de exporte y las modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática en la aparición de dichas resistencias.
- Determinar el coste adaptativo en las cepas estudiadas en cuanto a capacidad de crecimiento y tolerancia a agentes físicos y químicos.



## **TRABAJO EXPERIMENTAL Y RESULTADOS**



## ARTÍCULO 1

**Rebeca Gadea, Miguel Ángel Fernández Fuentes, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Elena Ortega. 2016. Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Research International*, 85, 131–143.**



Adaptive tolerance to phenolic biocides in bacteria from organic foods: Effects on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses. *Food Research International*, 85: 131–143.

Rebeca Gadea, Miguel Ángel Fernández Fuentes, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Elena Ortega. 2016.

### **Abstract**

The aim of the present study was to analyze the effects of step-wise exposure of biocide-sensitive bacteria from organic foods to phenolic biocides triclosan (TC) and hexachlorophene [2,2'-methylenebis(3,4,6-trichlorophenol)] (CF). The analysis included changes in the tolerance to the biocide itself, the tolerance to other biocides, and cross-resistance to clinically important antibiotics. The involvement of efflux mechanisms was also studied as well as the possible implication of modifications in cytoplasmic membrane fluidity in the resistance mechanisms. The influence of biocide tolerance on growth capacity of the adapted strains and on subsequent resistance to other physical stresses has also been analyzed. Repeated exposure of bacteria from organic foods to phenolic biocides resulted in most cases in partially increased tolerance to the same biocide, to dissimilar biocides and other antimicrobial compounds. Nine TC-adapted strains and six CF-adapted strains were able to develop high levels of biocide tolerance, and these were stable in the absence of biocide selective pressure. Most strains adapted to TC and one CF-adapted strain showed significantly higher anisotropy values than their corresponding wildtype strains, suggesting that changes in membrane fluidity could be involved in biocide adaptation. Exposure to gradually increasing concentrations of CF induced a decrease in heat tolerance. Biocide adaptation had no significant effects of gastric acid or bile resistance, suggesting that biocide adaptation should not influence survival in the gastrointestinal tract.

**KEYWORDS:** Antibiotics; Biocides; Tolerance; Organic foods; Stress survival

DOI: 10.1016/j.foodres.2016.04.033

© Elsevier Ltd. All rights reserved.



## ARTÍCULO 2

**Rebeca Gadea, Miguel Ángel Fernández Fuentes, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Elena Ortega. 2017. Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology*, 63, 58-71.**



Effects of exposure to quaternary-ammonium-based biocides on antimicrobial susceptibility and tolerance to physical stresses in bacteria from organic foods. *Food Microbiology* 63:58-71.

Gadea R, Fernández Fuentes MÁ, Pérez Pulido R, Gálvez A, Ortega E. 2017

### **Abstract**

In the present study, a collection of 76 biocide-sensitive bacterial strains isolated from organically produced food were adapted by repeated exposure to increasing concentrations of the quaternary ammonium compounds (QACs) benzalkonium chloride (BC) and hexadecylpyridinium chloride (HDP). The sensitivity of both wildtype strains and their corresponding QAC-adapted strains to other biocides and to antibiotics was studied. QAC tolerance increased in 88.2% of strains for BC and in 30.3% of strains for HDP, with increases in minimum inhibitory concentrations between 2 and over 100 fold. Adaptive resistance was stable after 20 subcultures in biocide-free medium for 7 and 5 of the BC- and HDP-adapted strains, respectively. Adaptation to BC and HDP also reduced the susceptibility to other biocides, mainly hexachlorophene (CF), didecyldimethylammonium bromide (AB), triclosan (TC) and chlorhexidine (CH). BC-adapted strains showed increased antibiotic resistance to ampicillin (AM) followed by sulfamethoxazol (SXT) and cefotaxime (CTX), and some showed increased sensitivity to ceftazidime (CAZ), CTX, AM and STX. Changes in antibiotic resistance in HDP-adapted strains were more heterogeneous and strain-dependent. Main efflux pump genes detected in QAC-adapted strains were *acrB*, *sugE*, *norC*, *qacE* and *qacH*, as well as antibiotic resistance genes *aac(6\_)-Ie-aph(2\_)-Ia*, *aph(2\_)-Ic*, *ant(4\_)-Ia*, *lsa*, *mrsA/B*, *ereA*, *ermB* and *cat*. Membrane anisotropy experiments revealed that QAC adaptation induced an increase in membrane rigidity in the case of BC, while response to HDP was more heterogeneous and strain-dependent. Growth capacity was significantly higher in some QAC-adapted strains and strain-dependent changes in heat tolerance were also detected in QAC-adapted strains. Gastric acid or bile resistances do not seem to be influenced by QAC adaptation.

**KEYWORDS:** Biocides; Quaternary ammonium compounds; Antibiotics; Adaptation; Resistance

PMID: 28040182

DOI: 10.1016/j.fm.2016.10.037

Copyright © Elsevier B.V.



### ARTÍCULO 3

Rebeca Gadea, Nicolás Glibota, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Elena Ortega.  
2017. Adaptation to biocides cetrimide and chlorhexidine in bacteria from organic foods: association with tolerance to other antimicrobials and physical stresses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 1758-1770.



Adaptation to biocides cetrимide and chlorhexidine in bacteria from organic foods: association with tolerance to other antimicrobials and physical stresses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65: 1758-1770.

Rebeca Gadea, Nicolás Glibota, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Elena Ortega. 2017.

**Abstract**

Chlorhexidine (CH) and quaternary ammonium compounds (QAC), such as cetrимide (CE), are widely used as disinfectants because of their broad antimicrobial spectrum. However, their frequent use for disinfection in different settings may promote bacterial drug resistance against both biocides and clinically relevant antibiotics. This study analyzes the effects of stepwise exposure to cetrимide (CE) and chlorhexidine (CH) of bacteria from organic foods and previously classified as biocide-sensitive. Gradual exposure of these strains to biocides resulted in mainly transient decreased antimicrobial susceptibility to other antibiotics and to biocides. Biocide-adapted bacteria also exhibit alterations in physiological characteristics, mainly decreased heat tolerance, or gastric acid tolerance in CE-adapted strains, while bile resistance does not seem to be influenced by biocide adaptation. Results from this study suggest that changes in membrane fluidity may be the main mechanism responsible for the acquisition of stable tolerance to biocides.

**KEYWORDS:** biocides, chlorhexidine, cetrимide, adaptation, antibiotics, resistance genes

PMID: 28177232

DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04650

Copyright © American Chemical Society



#### **ARTÍCULO 4**

**Rebeca Gadea, Nicolás Glibota, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Elena Ortega. 2017.**

**Effects of exposure to biocides on susceptibility to essential oils and chemical preservatives in bacteria from organic foods. *Food Research International*, (submitted).**



Effects of exposure to biocides on susceptibility to essential oils and chemical preservatives in bacteria from organic foods. Food Research International, (submitted).

Rebeca Gadea, Nicolás Glibota, Rubén Pérez Pulido, Antonio Gálvez, Elena Ortega. 2017.

### **Abstract**

A collection of 38 biocide-adapted strains with significant increases in their tolerance to biocides after step-wise exposure to these compounds were screened for sensitivity to essential oils and chemical preservatives. Several strains grown in presence of sublethal concentrations of quaternary ammonium compounds QACs (benzalkonium chloride, hexadecylpyridinium chloride or cetrimide) showed a generalized increase in the sensitivity to preservatives. Similar results were found among hexachlorophene- or chlorhexidine- adapted strains. Moreover, tolerance to hexadecylpyridinium chloride showed a very strong positive correlation with 4-hydroxybenzoic acid, thyme oil and sodium nitrite increased susceptibility, as well as a strong correlation with clove oil, potassium sorbate and potassium nitrate increased sensitivities. On the contrary, an increase in the tolerance to preservatives among triclosan-adapted strains was detected. Results from this study suggest that exposure of bacteria from foods to biocides is not always associated with co-selection for other antimicrobial resistances, especially against essential oils or chemical preservatives used in the food industry, so these compounds could be applied in food environments with no subsequent influence on the antimicrobial resistance selection along the food chain.

**KEYWORDS:** biocides; chemical preservatives; essential oils; adaptation; organic foods

Copyright © Elsevier B.V.



## **DISCUSIÓN GENERAL**



La excesiva aplicación de biocidas y desinfectantes en muy variados ámbitos, tanto clínicos como domésticos y en la industria alimentaria es motivo de preocupación debido a la disminución de la susceptibilidad bacteriana a estos compuestos y la consecuente reducción en su efectividad como antimicrobianos (Moore *et al.*, 2008; Buffet-Bataillon *et al.*, 2012). La exposición prolongada de las comunidades microbianas a estos compuestos favorece la selección de bacterias tolerantes a biocidas y resistentes a antibióticos (Gaze *et al.*, 2005), además de provocar el mantenimiento de un reservorio de genes de multirresistencia en dichas comunidades (Tandukar *et al.*, 2013). El origen de este problema reside en el hecho de que las bacterias emplean mecanismos comunes en la adaptación a concentraciones subinhibitorias tanto de antibióticos (Andersson y Hughes, 2014) como de biocidas (Tezel y Pavlostathis, 2015). Entre estos mecanismos destacan la modificación de la membrana externa o la membrana plasmática, alteraciones en la densidad y estructura de las porinas, hiperexpresión de bombas de exporte y adquisición de bombas específicas a través de elementos recombinantes móviles.

En el presente estudio hemos analizado el efecto de la adaptación de bacterias procedentes de alimentos ecológicos a distintos grupos de biocidas sobre la tolerancia a otros biocidas y la resistencia a antibióticos. También se ha estudiado el efecto del contacto gradual y prolongado de las cepas con estos compuestos sobre otras características fisiológicas y la respuesta frente a otros tipos de estrés (capacidad de crecimiento, tolerancia al calor, resistencia a ácidos gástricos y a sales biliares), con el objeto de evaluar las consecuencias del empleo de biocidas en la seguridad microbiológica a lo largo de la cadena alimentaria. Se han analizado biocidas bisfenólicos, derivados de amonio cuaternario y una biguanida, la clorhexidina, por su extenso empleo en diversos ámbitos tanto clínicos como domésticos y alimentarios.

Los resultados de este estudio indican que la exposición secuencial y reiterada a concentraciones crecientes de los biocidas bisfenólicos triclosán y hexaclorofeno provoca un incremento en la tolerancia frente a estos biocidas en distintas bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas procedentes de alimentos ecológicos; es más, esta exposición también induce un incremento en la tolerancia frente a otros biocidas y en la resistencia a antibióticos relevantes en clínica humana.

Diversos estudios habían demostrado ya una relación entre la tolerancia a triclosán y la resistencia frente a antibióticos (Braoudaki y Hilton, 2004a, 2004b; Randall *et al.*, 2004; Tkachenko *et al.*, 2007; Middleton y Salierno, 2013), si bien otras investigaciones no corroboran el desarrollo de dicha coselección de resistencias (Lambert, 2004; Lear *et al.*, 2006; Stickler and Jones, 2008). La relación entre la tolerancia a triclosán y el fenotipo *mar* (de resistencia a múltiples antibióticos) también se ha descrito en coliformes fecales tolerantes a triclosán aislados a partir de aguas residuales, en contraste con las cepas sensibles al biocida (Middleton y Salierno, 2013). Otros estudios, por el contrario, describen un incremento en la sensibilidad a aminoglucósidos específicos en cepas de *E. coli* tolerantes a triclosán (Cottell *et al.*, 2009). De forma similar, algunas de las cepas adaptadas a biocidas fenólicos en este estudio han mostrado una mayor sensibilidad frente a biocidas y antibióticos tras exposición a estos compuestos, comparadas con las cepas no expuestas. De hecho, hasta un 74% de las cepas adaptadas a hexaclorofeno mostraron una reducción en su resistencia al menos frente a uno de los antibióticos ensayados. Hemos encontrado también una menor tolerancia frente a uno o dos de los biocidas analizados en 16 de las 27 cepas adaptadas a hexaclorofeno (principalmente Gram negativas), si bien todas ellas mostraron una tolerancia incrementada a otros biocidas de forma paralela. Se han descrito resultados similares con anterioridad en mutantes de *E. coli* tolerantes a triclosán (Cottell *et al.*, 2009), en *Campylobacter jejuni* y *C. coli* adaptados a biocidas (Mavri y Smole Možina, 2013) y en *P. aeruginosa* tras exposición a concentraciones crecientes de diacetato de clorhexidina (Thomas *et al.*, 2000). Algunas cepas tolerantes a cloruro de benzalconio presentan también una mayor sensibilidad a tobramicina, amikacina y gentamicina (Joynson *et al.*, 2002).

La membrana externa de las bacterias Gram negativas actúa como barrera de permeabilidad para muchos agentes antimicrobianos, atributo funcional que se asocia con la presencia de componentes estructurales como el lipopolisacárido y las porinas, así como con la organización molecular concreta de los mismos (Vaara, 1992). Las modificaciones en estos componentes provocan una alteración en la permeabilidad de la membrana externa y ésta a su vez conlleva cambios en la susceptibilidad a agentes antimicrobianos. El hexaclorofeno actúa principalmente desorganizando las membranas bacterianas, de modo que la exposición gradual a este biocida puede provocar adaptaciones que faciliten la difusión de otros antimicrobianos a través de la membrana externa (Tattawasart *et al.*, 2000). Se han descrito también cambios en los perfiles de

ácidos grasos que pueden justificar las modificaciones de la membrana externa en una cepa de *P. aeruginosa* previamente adaptada a un tensioactivo anfotérico y a derivados de amonio cuaternario (Jones *et al.*, 1989; Guerin-Mechin *et al.*, 1999).

Las modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática también parecen estar implicadas en la adaptación a distintos tipos de estrés ambiental, como variaciones en la temperatura o la presión, concentraciones de iones, pH, disponibilidad de nutrientes y xenobióticos (Badaoui Najjar *et al.*, 2007; Mykytczuk *et al.*, 2007). En este estudio se han empleado medidas de anisotropía fluorescente con 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno como sonda para investigar posibles alteraciones en la fluidez de la membrana en una selección de cepas adaptadas tanto a triclosán como a hexaclorofeno y que presentaban un fenotipo de adaptación estable tras contacto con los biocidas. La anisotropía de fluorescencia da una indicación de la fluidez de membrana inversamente proporcional a los valores obtenidos, de modo que valores bajos de anisotropía indican una mayor desorganización o fluidez de la membrana (Shechter, 1997). Los resultados de este estudio muestran aumentos muy significativos de anisotropía en todas las cepas adaptadas a triclosán, así como incrementos, aunque menos significativos, en cepas adaptadas a hexaclorofeno, lo que indica una mayor rigidez de la membrana bacteriana tras la adaptación. En base a estos resultados, la adaptación a estos compuestos fenólicos, especialmente a triclosán, parece estar relacionada con cambios en la fluidez de la membrana, como se había descrito ya con anterioridad para diferentes antimicrobianos ácidos y peroxiácidos (Alonso-Hernando *et al.*, 2010). La resistencia cruzada entre biocidas encontrada en nuestros ensayos puede por tanto justificarse por una reducción inespecífica en la permeabilidad celular, como sugiere la mayor rigidez de membrana encontrada en las cepas tras crecimiento en presencia de estos biocidas, lo que bloquearía la entrada al interior celular de moléculas incluso no relacionadas estructuralmente con los mismos.

La tolerancia a biocidas fenólicos tras exposición gradual a estos compuestos se mantuvo estable tras 20 subcultivos en medio libre de biocida exclusivamente en 9 cepas adaptadas a triclosán y 6 adaptadas a hexaclorofeno. También se ha descrito una disminución rápida en la resistencia antimicrobiana de *P. aeruginosa* tras exposición a concentraciones crecientes de diacetato de clorhexidina (Thomas *et al.*, 2000), y en nuestro caso la respuesta de las bacterias procedentes de alimentos ecológicos tras el

estrés provocado por el contacto con los biocidas también parece ser temporal, al igual que se ha descrito para algunas cepas de *E. coli* (Taglicht *et al.*, 1987).

La protección bacteriana frente a los biocidas puede estar mediada no sólo por una reducción de la entrada de los mismos al interior celular sino, de forma alternativa, aunque menos habitual, por la biodegradación enzimática del compuesto. La inactivación del biocida también se ha descrito en alguna ocasión como mecanismo de resistencia, pero es menos frecuente y limitado a determinados compuestos del tipo de los organomercuriales (McDonnell y Russell, 1999; Miller, 1999). El mecanismo más frecuentemente descrito es, sin duda, la modificación en la permeabilidad de la membrana o el incremento del exporte del compuesto (McDonnell y Russell, 1999; Schweizer, 2001).

La búsqueda de genes de bombas de exporte multifármacos y de resistencia específica frente a antibióticos reveló un número limitado de determinantes de resistencia en nuestras cepas adaptadas a biocidas fenólicos. Aunque la adición de reserpina (inhibidor de la actividad de bombas de exporte en bacterias Gram positivas) no provocó una pérdida de resistencia en la mayoría de las cepas Gram positivas adaptadas, las bombas de exporte sí parecen jugar un papel relevante en la adquisición de resistencia por parte de aislados concretos, como las cepas adaptadas a triclosán *Bacillus cereus* UJA67p y *Enterococcus casseliflavus* UJA53c para la clorhexidina, así como las adaptadas a hexaclorofeno *E. casseliflavus* UJA53e para el bromuro de didecil-dimetilamonio o *B. cereus* UJA69q para el cloruro de benzalconio. También se redujo en 4 veces la concentración mínima inhibitoria de amoxicilina en la cepa *E. casseliflavus* UJA53e en presencia de reserpina. La reserpina es un potente inhibidor competitivo de las bombas de exporte con efecto sobre los miembros de las familias de transportadores de tipo ABC (ATP-binding cassette), MFS (major facilitator super-family) y RND (resistance nodulation division) (Braoudaki y Hilton, 2005; Marquez, 2005). Las diferencias en la eficiencia y las preferencias por diferentes dianas entre los inhibidores de bombas de exporte (Braoudaki y Hilton, 2005; Pannek *et al.*, 2006; Mavri y Smole Možina, 2012) provoca que la exclusión de uno de estos sistemas de exporte pueda inducir un incremento en la actividad de otro sistema, o incluso a la activación de otro sistema de resistencia. En base a los resultados de este estudio, las bombas de exporte pueden ser de gran importancia en la adaptación a biocidas fenólicos de estas cepas procedentes de alimentos

ecológicos, ya que se han detectado diversos genes de resistencia en dichas cepas. Un mecanismo similar se ha descrito previamente en *C. jejuni*, con la implicación de las bombas de exporte CmeABC y CmeDEF en la expulsión de compuestos tóxicos (Akiba *et al.*, 2006).

El estudio de la respuesta a otros tipos de estrés en cepas adaptadas a biocidas, ha puesto de manifiesto un incremento significativo de la tolerancia al calor en las cepas adaptadas a triclosán *B. cereus* UJA69q y *Pantoea annanatis* UJA59k, respecto a las cepas no expuestas al biocida. Ya se había comprobado con anterioridad el desarrollo de protección cruzada frente al calor como consecuencia de un estrés alcalino en bacterias tanto Gram positivas (Lou y Yousef, 1996; Flahaut *et al.*, 1997) como Gram negativas (Humphrey *et al.*, 1991).

La posible contaminación cruzada de los alimentos ecológicos con bacterias de origen ambiental es un punto crítico en este tipo de producción, y es probable que las células sometidas a estrés puedan sobrevivir a tratamientos térmicos y proliferar en el alimento durante el almacenamiento. La contaminación de estos alimentos tras su procesado con estas células termotolerantes podría igualmente permitir la supervivencia de estos patógenos durante los posteriores tratamientos previos al consumo, como ya se ha comprobado para *Listeria monocytogenes* (Taormina y Beuchat, 2001). Otros escenarios similares podrían también comprometer la seguridad de alimentos mínimamente procesados, listos para consumir o alimentos del tipo “calentar y servir” en ventas al por menor, servicios de comidas y entornos domésticos, donde los biocidas se emplean cada vez con mayor frecuencia. Por su parte, la exposición a concentraciones crecientes de hexaclorofeno, por el contrario, indujo una pérdida de la termotolerancia en 3 de las 7 cepas analizadas, que por tanto tendrían menos capacidad de supervivencia en procesados térmicos a lo largo de la cadena alimentaria.

El análisis de la tolerancia a ácidos gástricos y sales biliares en cepas expuestas a los biocidas, muestra sólo tres cepas adaptadas a triclosán (*B. cereus* UJA69q, *P. annanatis* UJA59k y *Salmonella* UJA82K) con una mayor resistencia inmediata al jugo gástrico simulado comparadas con las cepas no expuestas al biocida, si bien la resistencia tras 90 y 180 minutos de incubación fue similar en ambos grupos. La tolerancia al jugo gástrico en cepas adaptadas a hexaclorofeno no mostró diferencias significativas respecto

a las células no adaptadas. Tampoco se observaron diferencias significativas entre ambos grupos respecto a la tolerancia a sales biliares en cepas adaptadas a ambos biocidas, a excepción de la cepa *B. cereus* UJA69q adaptada tanto a triclosán como a hexaclorofeno, que mostró una mayor tolerancia tras 90 y 180 minutos de incubación, comparada con la cepa no expuesta a biocidas. La adaptación cruzada entre ácidos y sales biliares suele ser frecuente, considerando los mecanismos comunes en ambas adaptaciones, si bien las hidrolasas de sales biliares son responsables de mecanismos específicos de adaptación de bacterias del tracto gastrointestinal (DeBoever y Verstraete, 1999). Nuestros resultados, no obstante, no muestran efectos significativos en la resistencia a jugo gástrico o a sales biliares tras la exposición gradual a biocidas fenólicos en la mayoría de las cepas analizadas, lo que sugiere que la adaptación a estos biocidas no tiene influencia en la protección fisiológica frente a bacterias patógenas de origen alimentario a lo largo del tracto gastrointestinal.

La presencia de derivados de amonio cuaternario (QACs) en el medio ambiente es resultado de las actividades antropogénicas; su elevada producción a nivel mundial y posterior liberación en plantas de tratamiento de aguas residuales favorece su dispersión al agua superficial, suelos y sedimentos a través de los efluentes de dichas plantas, provocando la aparición de altas concentraciones en aguas superficiales y residuales, lodos y sedimentos (Zhang *et al.*, 2015). Los mecanismos que emplean las bacterias para sobrevivir en presencia de compuestos derivados del amonio cuaternario son similares a los desarrollados durante la adaptación a concentraciones subinhibitorias de antibióticos (Andersson y Hughes, 2012, 2014). Como consecuencia, las subpoblaciones resistentes se pueden desarrollar con mayor facilidad, pudiendo llegar a dominar las comunidades microbianas expuestas a cualquier agente antimicrobiano (Hughes y Andersson, 2012). La adaptación bacteriana a concentraciones subinhibitorias de este tipo de compuestos se produce mediante modificaciones de la membrana externa o la membrana plasmática, de la densidad y estructura de las porinas, mediante una hiperexpresión de bombas de exporte o bien adquisición de bombas de exporte específicas para QACs a través de elementos recombinantes móviles, tales como plásmidos o integrones cuando la bacteria es sometida a estrés oxidativo o después de un proceso de mutagénesis inducido por estrés (Tezel y Pavlostathis, 2012, 2015). No obstante, por lo general se desarrollan múltiples mecanismos de forma simultánea durante la adaptación bacteriana a este tipo de biocidas (Moen *et al.*, 2012).

Los resultados de nuestro estudio muestran que la exposición secuencial a concentraciones crecientes de los compuestos derivados de amonio cuaternario cloruro de benzalconio (BC) y cloruro de hexadecilpiridinio (HDP) pueden provocar la inducción de tolerancia a biocidas en una amplia variedad de bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas. Por su parte, tras exposición gradual a ceftriaxona (CE), sólo 36 de las 67 cepas analizadas se adaptaron a este biocida. Es de destacar que las cepas adaptadas a ceftriaxona fueron principalmente Gram positivas. La exposición reiterada a estos biocidas también provocó un aumento en la tolerancia frente a otros biocidas y la resistencia a antibióticos, como se había observado en estudios previos (Gaze *et al.*, 2005; Bhardwaj *et al.*, 2016). De hecho, más del 90% de las cepas adaptadas a cloruro de benzalconio mostraron tolerancias incrementadas a hexaclorofeno, bromuro de didecil-dimetilamonio, triclosán y clorhexidina. El análisis de componentes principales mostró una fuerte correlación entre el incremento de tolerancia a hexaclorofeno y a clorhexidina en cepas adaptadas a cloruro de benzalconio, lo que implica modificaciones similares en la tolerancia frente a ambos biocidas tras la exposición reiterada a cloruro de benzalconio. El 25% de las cepas adaptadas a este biocida mostraron una mayor tolerancia a los seis biocidas analizados y el 79% de las mismas también mostraron un incremento en su resistencia frente al menos uno de los antibióticos ensayados.

Por su parte, todas las cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio presentaron un incremento en su tolerancia frente a hexaclorofeno y más de un 60% de las cepas adaptadas fueron menos susceptibles a clorhexidina, bromuro de didecil-dimetilamonio, ceftriaxona y triclosán tras exposición al biocida. Se encontró una fuerte correlación entre la adaptación a cloruro de hexadecilpiridinio y el incremento de tolerancia a clorhexidina, así como una correlación moderada entre el incremento de tolerancia frente a cloruro de benzalconio y hexaclorofeno en cepas adaptadas a este biocida, lo que indica el desarrollo de modificaciones similares en la tolerancia frente a ambos biocidas tras la presión selectiva con cloruro de hexadecilpiridinio. Estos resultados sugieren rutas comunes en el desarrollo de tolerancia frente a estos biocidas tras el contacto con concentraciones subinhibitorias del biocida.

En cuanto a la adaptación a ceftriaxona, también provocó un incremento en la tolerancia a otros biocidas, y el análisis de componentes principales mostró también una

fuerte correlación entre el incremento de tolerancia frente a cloruro de benzalconio y triclosán en cepas adaptadas a este biocida.

Es de destacar que el 78% de las cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio mostraron una resistencia incrementada frente al menos uno de los antibióticos analizados, si bien también se encontró una mayor sensibilidad tanto a biocidas como a antibióticos tras exposición reiterada tanto a cloruro de benzalconio como a cloruro de hexadecilpiridinio en algunas de las cepas adaptadas. El 74% de las cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio mostraron una reducción en su resistencia frente al menos uno de los antibióticos analizados y 13 y 16 de las 67 cepas ensayadas mostraron igualmente una disminución en la tolerancia frente a cloruro de hexadecilpiridinio o ceftriaxona, respectivamente. Estudios previos también han descrito un incremento a la sensibilidad frente a tobramicina, amikacina y gentamicina en cepas tolerantes a cloruro de benzalconio (Joynson *et al.*, 2002).

El 83% de las cepas adaptadas a ceftriaxona mostraron un incremento en la resistencia al menos frente a uno de los antibióticos analizados, siendo la resistencia más habitual frente a ampicilina, seguida por sulfametoxazol y tetraciclina. Por el contrario, el 69,4% de las cepas adaptadas a este biocida mostraron una reducción en su resistencia frente a uno o dos de los antibióticos. Estos resultados coinciden con estudios previos que afirman no poder establecer una correlación clara entre la susceptibilidad reducida a formulaciones de biocidas comúnmente empleadas en la industria alimentaria y la resistencia a antimicrobianos de relevancia en clínica en una colección de cepas de *Salmonella* (Condell *et al.*, 2012).

De acuerdo con nuestros resultados, sólo 7 cepas Gram negativas adaptadas a cloruro de benzalconio y 5 cepas (3 Gram positivas y 2 Gram negativas) adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio o ceftriaxona mantuvieron estable la tolerancia adaptativa a los biocidas tras 20 subcultivos en medio libre de los compuestos. De acuerdo con estos datos la respuesta al estrés provocada por los biocidas en bacterias procedentes de alimentos ecológicos parece ser transitoria en la mayoría de las cepas, al igual que en el caso de los biocidas de tipo fenólico. Se han descrito resultados similares en cepas de *P. aeruginosa* tras exposición a concentraciones crecientes de diacetato de clorhexidina (Thomas *et al.*, 2000), al igual que reversiones totales en las concentraciones mínimas

inhibitorias para *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus epidermidis*, tras interrumpir la exposición a cetrimida (Forbes *et al.*, 2014). Estos cambios reversibles en la susceptibilidad pueden derivarse de adaptaciones fenotípicas temporales como cambios en la composición de las envueltas bacterianas (Braoudaki y Hilton, 2005), expresión de bombas de exporte (Sanchez *et al.*, 2005; Maseda *et al.*, 2009; Furi *et al.*, 2013), o inducción de respuestas al estrés (Webber *et al.*, 2008). Por el contrario, las reducciones en la susceptibilidad a antimicrobianos que se mantienen estables tras crecimiento en ausencia del agente antimicrobiano pueden atribuirse a la selección de cepas mutantes (McMurry *et al.*, 1998). Se ha descrito también corresponsencia estable entre diferentes biocidas en cepas de *P. aeruginosa* (Lambert *et al.*, 2001; Murtough *et al.*, 2001), *E. coli* O157 y *S. enterica* (Braoudaki y Hilton, 2004a). Esta correlación puede deberse a una reducción inespecífica en la permeabilidad celular, que podría impedir la entrada de moléculas no relacionadas estructuralmente al interior celular, tal como sugieren nuestros resultados, que muestran un incremento en la rigidez de la membrana en cepas tras crecimiento en presencia de QACs, principalmente cloruro de benzalconio y cetrimida. Ya previamente se había descrito que las comunidades microbianas expuestas a biocidas pueden sufrir modificaciones en la composición de sus envueltas, como la modificación en la aminoarabinosa del lípido A (Oh *et al.*, 2013). Nuestros resultados muestran valores incrementados en la anisotropía de todas las cepas adaptadas a estos dos biocidas, llegando a ser estas diferencias estadísticamente significativas en 4 de las 7 cepas adaptadas a cloruro de benzalconio y en 4 de las 5 adaptadas a cetrimida. Hay que tener presente que incluso pequeños cambios (de un 10%) en la anisotropía de fluorescencia pueden reflejar cambios pronunciados (del 25%) en la rigidez de la membrana (Aricha *et al.*, 2004). Alonso-Hernando *et al.* (2010) han descrito igualmente valores de anisotropía significativamente superiores en las membranas de células expuestas a ácido cítrico y peroxiácidos que en las no expuestas, lo que indica un incremento en la rigidez de las membranas tras crecimiento en presencia de estos compuestos. Por el contrario, la anisotropía de fluorescencia mostró tanto incrementos como disminuciones tras crecimiento de las bacterias en presencia de cloruro de hexadecilpiridinio, al igual que se ha descrito para el fosfato trisódico y el cloruro sódico acidificado (Alonso-Hernando *et al.*, 2010).

La tolerancia a compuestos derivados de amonio cuaternario mediada por bombas de exporte también se ha investigado en profundidad debido a que confiere corresponsencia

a antibióticos y a que es transferible entre especies bacterianas mediante transmisión horizontal de los genes responsables. Las bombas de exporte median la salida de biocidas del interior al exterior celular a través de un mecanismo dependiente de energía o de protones. Entre ellas, EmrE, Smr y SugE son bombas de exporte multi-fármacos (He *et al.*, 2011), mientras QacE, QacΔE1, QacF, QacG, QacH, QacI, QacJ y QacZ son determinantes de exporte específico de compuestos derivados de amonio cuaternario (Braga *et al.*, 2011). La exposición de bacterias a biocidas puede también afectar a la expresión relativa de genes relacionados con bombas de exporte (incremento de su expresión) o porinas (disminución de su expresión) (Fernández-Cuenca *et al.*, 2015). Los genes de resistencia que hemos detectado en cepas adaptadas a cloruro de benzalconio incluyen el gen de la bomba de exporte cromosómico *acrB* del sistema AcrAB/TolC, que se encontró en la mayoría de las cepas adaptadas. Esta bomba pertenece a la familia RND de bombas de tres componentes que se han descrito en bacterias Gram negativas, en particular en la familia *Enterobacteriaceae*. Otro gen de bomba de exporte cromosómico, *sugE*, perteneciente a la familia SMR de proteínas de resistencia a múltiples fármacos de pequeño tamaño, fue menos frecuente entre las cepas adaptadas. Por último, el gen *qacH*, perteneciente igualmente a la familia SMR y que confiere resistencia frente a QACs, se ha encontrado en dos cepas Gram negativas adaptadas a cloruro de benzalconio. Este hallazgo resulta de gran interés ya que *qacH* se ha descrito tanto en plásmidos de estafilococos (He *et al.*, 2014; Wassenaar *et al.*, 2015) como en la familia *Enterobacteriaceae*, donde parece estar ligado a integrones de clase I junto con genes de resistencia a antibióticos (Soufi *et al.*, 2009; Wannaprasat *et al.*, 2011).

Por el contrario, las cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio mostraron un número muy limitado de genes de bombas de exporte: *qacE* (perteneciente a la familia SMR), *norC* (de la familia MFS) y *acrB*. Tampoco se detectó un número importante de genes de bombas de exporte en cepas adaptadas a cetrimida. El gen *acrB* del sistema AcrAB/TolC se detectó en todas las cepas Gram negativas y los genes *norC* y *emeA* se detectaron en cepas de enterococos. No obstante, el papel de estas bombas de exporte en la tolerancia frente a biocidas no puede confirmarse, ya que se requieren estudios más detallados de la expresión de estos genes para probar su implicación en la adaptación de las cepas.

En seis cepas adaptadas a cloruro de benzalconio se detectaron también determinantes específicos de resistencia a antibióticos. Se han descrito genes que confieren resistencia frente a aminoglucósidos, macrólidos, quinupristina-dalfopristina y clindamicina. Entre las cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio, sólo se han encontrado los genes *cat* (cloranfenicol acetil transferasa) y *lsa* (implicado en la resistencia frente a quinupristina-dalfopristina y clindamicina). En cepas adaptadas a cetrimida sólo se detectó el determinante de resistencia a aminoglucósidos *ant(4<sub>-</sub>)-Ia* en la cepa *B. cereus* UJA82t.

La adición de reserpina sólo indujo una reducción a la mitad en las concentraciones mínimas inhibitorias de triclosán y bromuro de didecil-dimetilamonio, frente a las cepas *Staphylococcus* sp. UJA73p y *B. cereus* UJA72g adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio, respectivamente. El resto de las cepas adaptadas tanto a cloruro de benzalconio como a cloruro de hexadecilpiridinio y a cetrimida presentaron una tolerancia similar frente a biocidas y antibióticos tanto en presencia como en ausencia de reserpina, lo que sugiere que la actividad de las bombas de exporte no juega un papel primordial en la adquisición de tolerancia frente a biocidas y/o resistencia a antibióticos tras exposición gradual a QACs.

Las bacterias adaptadas a crecer en presencia de microbicidas pueden sufrir adicionalmente alteraciones fenotípicas como la disminución en su velocidad de crecimiento. Los mecanismos responsables de tales cambios y sus implicaciones aún no se conocen en profundidad, pero probablemente sean debidos a la selección de aislados con patrones de crecimiento y capacidades metabólicas alteradas (Rozen *et al.*, 2007; Latimer *et al.*, 2012), lo que a su vez puede influir en su capacidad patogénica (Rozen *et al.*, 2007; Kunz *et al.*, 2012). Puesto que la inducción de termotolerancia puede desarrollarse en bacterias expuestas a diversos tipos de estrés ambiental, es probable que también aparezca en bacterias adaptadas a crecimiento en presencia de biocidas. Igualmente, todos los factores de estrés presentes en el tracto gastrointestinal pueden afectar a la capacidad de las bacterias para mantener sus efectos en el organismo hospedador (Leeber *et al.*, 2008) y la adaptación cruzada entre la resistencia a ácidos y sales biliares puede también desarrollarse con alta probabilidad. Con el objetivo de evaluar algunos de estos mecanismos habituales de adaptación, hemos caracterizado fenotípicamente 7 cepas adaptadas a cloruro de benzalconio, 5 a cloruro de

hexadecilpiridinio y 5 a cetrimida (todas ellas con una tolerancia adaptativa estable en ausencia del biocida), en términos de velocidad de crecimiento, tolerancia al calor y resistencia frente a ácidos gástricos y sales biliares. Se ha encontrado una capacidad de crecimiento similar en la mayoría de cepas adaptadas respecto a las cepas originales para todos los tiempos de incubación ensayados. Solamente una cepa adaptada a cloruro de benzalconio y 2 cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio mostraron mayores valores de densidad óptica entre 4 y 24 horas de incubación respecto a las cepas originales, si bien sólo tras 24 horas de incubación se alcanzaron diferencias estadísticamente significativas. En cuanto a la tolerancia al calor, sólo se ha detectado mayor termotolerancia en una cepa adaptada a cloruro de benzalconio, identificada como *Enterobacter* sp. Por el contrario, 3 cepas adaptadas a cloruro de benzalconio, 4 de las 5 cepas adaptadas a cloruro de hexadecilpiridinio, así como 3 de las 5 adaptadas a cetrimida mostraron una menor termotolerancia respecto a las cepas originales no sometidas a estrés con el biocida. Estos resultados indican que la adaptación a estos biocidas representa un coste para la célula en cuanto que disminuye sus rangos de tolerancia para otros factores.

Tampoco han mostrado nuestros resultados efectos significativos sobre la resistencia a jugo gástrico o a sales biliares tras exposición a los biocidas derivados de amonio cuaternario, lo que sugiere que la adaptación a dichos biocidas no tiene influencia en la supervivencia de las bacterias a lo largo del tracto gastrointestinal. Probablemente se requieran múltiples tipos de estrés subletal para incrementar la resistencia al calor y/o los ácidos en las bacterias aisladas de alimentos ecológicos, como se ha descrito previamente en *L. monocytogenes* (Skandamis *et al.*, 2008).

Por su parte, la clorhexidina es probablemente el biocida más empleado en productos antisépticos, tanto para higiene de las manos como en productos orales, así como desinfectante y conservante. La tolerancia a este biocida se vio incrementada en un elevado porcentaje de las cepas sometidas a contacto gradual con el mismo (un 88% de las cepas ensayadas), como ya se había descrito previamente en cepas de *E. faecalis* (Kitagawa *et al.*, 2016). De nuevo, la exposición reiterada a este biocida también provocó un aumento en la tolerancia frente a otros biocidas y la resistencia a antibióticos, detectándose una fuerte correlación entre la tolerancia a cloruro de benzalconio y cloruro de hexadecilpiridinio en cepas adaptadas a clorhexidina, lo que

sugiere mecanismos de adaptación similares a ambos biocidas tras el contacto gradual de las cepas con este biocida.

La disminución en la susceptibilidad al digluconato de clorhexidina se asocia con la resistencia a carbapenémicos, aminoglucósidos, tetraciclina y ciprofloxacino (Fernández-Cuenca *et al.*, 2015). La clorhexidina también induce la expresión de los genes de resistencia a vancomicina tipo *vanA* así como de genes asociados a resistencia a daptomicina y a alteraciones en la síntesis de la pared celular (Bhardwaj *et al.*, 2016). Entre las cepas adaptadas a clorhexidina que hemos analizado, un 92% muestran un incremento de resistencia al menos frente a uno de los antibióticos ensayados. La resistencia a imipenem fue la más frecuente entre las cepas adaptadas a clorhexidina, seguido por ceftazidima, sulfametoxazol, tetraciclina y cefotaxima. Por el contrario, 18 de las 67 cepas adaptadas a este biocida mostraron una reducción en su resistencia al menos frente a un antibiótico.

En cuanto al estudio de genes de resistencia, los principales genes de bombas de exporte detectados en cepas adaptadas a clorhexidina fueron *qacH* y *acrB*, y sólo en la cepa *B. cereus* UJA67p se describieron determinantes específicos de resistencia a antibióticos: el gen *mecA*, que codifica la síntesis de una proteína de unión a penicilina alternativa (PBP29 o PBP2a), el gen de fosfotransferasa tipo I (*mphA*) y los determinantes de resistencia a aminoglucósidos *ant(4\_-)Ia* y *aph(2\_-)Ic*. De nuevo los ensayos con el inhibidor de bombas de exporte para bacterias Gram positivas reserpina mostraron una tolerancia similar a biocidas y antibióticos en presencia y ausencia del compuesto, lo que apoya la hipótesis de la poca relevancia de las bombas de exporte en el desarrollo de resistencias tras adaptación a este biocida.

Nuestros resultados, de forma similar a lo descrito para los otros tipos de biocidas, muestran valores significativamente superiores en la anisotropía de todas las cepas adaptadas a este biocida respecto a las cepas no adaptadas, por lo que también en este caso la modificación en la fluidez de la membrana parece jugar un papel primordial en los procesos de adaptación.

En cuanto a la velocidad de crecimiento, fue similar en cepas adaptadas y en las no expuestas al biocida en todos los tiempos de incubación analizados. Sólo se detectaron

valores de densidad óptica significativamente superiores tras 24 horas de incubación en dos cepas adaptadas a clorhexidina, respecto a las cepas no adaptadas.

La tolerancia al calor se vio tanto incrementada como disminuida tras el contacto gradual con clorhexidina, en función de la cepa analizada. Las resistencias a jugo gástrico y a sales biliares no se vieron modificadas tras exposición al compuesto, lo que sugiere que el contacto con clorhexidina no influye en la supervivencia de las cepas a lo largo del tracto gastrointestinal.

En conclusión, la exposición reiterada de bacterias a biocidas tanto fenólicos como derivados de amonio cuaternario o clorhexidina *in vitro* puede desencadenar una disminución en la susceptibilidad al mismo biocida, así como frente a otros compuestos antimicrobianos, tanto biocidas como antibióticos. Esta adaptación puede ser temporal o estable, probablemente debido a adaptaciones fenotípicas temporales o bien a la selección de mutaciones genéticas estables, respectivamente. No obstante, hemos observado también cepas adaptadas a biocidas con una mayor sensibilidad tanto frente a biocidas como a antibióticos respecto a las cepas no adaptadas, especialmente tras exposición a hexaclorofeno. El transporte activo puede ser uno de los mecanismos responsables de estas tolerancias adaptativas, y varios tipos de bombas de transporte parecen estar implicadas, aunque sólo en cepas concretas. El incremento en la rigidez de la membrana provocado tras la exposición prolongada a los biocidas ensayados también parece desempeñar un papel esencial en la tolerancia adaptativa estable frente a estos biocidas. La adaptación bacteriana al estrés provocado por hexaclorofeno, biocidas derivados de amonio cuaternario y clorhexidina también provoca alteraciones en otras características fisiológicas, principalmente una disminución en la tolerancia al calor, por lo que se puede recomendar el empleo de estos biocidas para prevenir la proliferación de bacterias patógenas durante el almacenamiento posterior de los alimentos. Sin embargo, la resistencia frente a jugo gástrico y a sales biliares no se ve alterada por la adaptación a estos biocidas, por lo que estos compuestos podrían igualmente emplearse en industrias alimentarias sin riesgo a una posterior influencia en la protección fisiológica frente a patógenos alimentarios a lo largo del tracto gastrointestinal.

Por último, hemos estudiado el efecto de la adaptación a diferentes tipos de biocidas en la tolerancia bacteriana a conservantes químicos y aceites esenciales de empleo habitual en la industria alimentaria. La función principal de los conservantes

empleados en estas industrias es mejorar el aroma o el sabor de los alimentos, la calidad nutricional y, esencialmente, retardar o evitar el crecimiento microbiano, la germinación y el desarrollo de esporas, así como la prevenir de formación de biopelículas (Lim *et al.*, 2016; Pandey *et al.*, 2015; Zemke *et al.*, 2015). Debido al frecuente uso de los conservantes, principalmente en alimentos procesados, aunque también en la industria farmacéutica y otros ámbitos de la vida cotidiana, resulta de gran interés conocer la influencia que tiene la adaptación de bacterias a biocidas sobre la sensibilidad a estos conservantes. Por otro lado, se emplean habitualmente aceites esenciales como antimicrobianos naturales en la industria alimentaria para prevenir o controlar la contaminación cruzada durante las operaciones de procesamiento de los alimentos (Possas *et al.*, 2016). Por todo ello hemos considerado de gran interés acometer el estudio de la tolerancia a aceites esenciales y conservantes químicos en bacterias procedentes de alimentos ecológicos adaptadas a distintos tipos de biocidas.

Si bien habíamos descrito previamente la capacidad de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas procedentes de alimentos ecológicos de adaptarse a biocidas y que la exposición gradual a estos compuestos también provoca un incremento en la tolerancia frente a otros biocidas y la resistencia a antibióticos, los resultados obtenidos en este estudio indican un incremento generalizado en la sensibilidad de las bacterias adaptadas a biocidas tanto frente a aceites esenciales como a conservantes químicos, tras exposición prolongada a todos los compuestos analizados, excepto frente a triclosán. Este biocida, por el contrario, induce un incremento significativo de la resistencia frente a ambos tipos de conservantes. Ya se había demostrado previamente la relación entre la tolerancia a triclosán y la resistencia frente a diversos antibióticos (Randall *et al.*, 2004; Braoudaki y Hilton, 2004b; Tkachenko *et al.*, 2007), así como entre la resistencia a triclosán y el fenotipo *mar* (de resistencia a múltiples antibióticos) en coliformes fecales (Middleton y Salierno, 2013). A bajas concentraciones el triclosán inhibe la enzima dependiente de NADPH enoil-acil reductasa (Schweizer, 2001), pero a concentraciones más elevadas también presenta efectos membranotrópicos (Villalain *et al.*, 2001). Estos múltiples sitios diana probablemente expliquen el frecuente desarrollo de resistencias tras exposición a este biocida.

El análisis de componentes principales de la modificación de la tolerancia a conservantes en cepas adaptadas a biocidas ha mostrado una fuerte correlación entre el

incremento en la tolerancia a cloruro de hexadecilpiridinio y el incremento en la susceptibilidad a la mayoría de conservantes analizados. Igualmente se han encontrado fuertes correlaciones al analizar la susceptibilidad a los conservantes ensayados por pares, en cepas adaptadas a dicho biocida. Esto sugiere que se desarrollan modificaciones similares en la tolerancia a estos compuestos tras la presión selectiva ejercida por el cloruro de hexadecilpiridinio, al igual que habíamos observado previamente respecto a la tolerancia a diversos biocidas.

La reducción en la susceptibilidad al digluconato de clorhexidina se ha asociado a resistencia frente a antibióticos carbapenémicos, aminoglucósidos, tetraciclina y ciprofloxacino (Fernández-Cuenca *et al.*, 2015). Este biocida también favorece la expresión de genes de resistencia frente a vancomicina y a daptomicina y los cambios a nivel de expresión génica también provocan alteraciones adicionales en la síntesis de la pared celular (Bhardwaj *et al.*, 2016). Sin embargo, en este estudio no hemos encontrado incrementos en la tolerancia a conservantes tras exposición a clorhexidina.

Por su parte, el mecanismo de acción de los biocidas derivados de amonio cuaternario es complejo e implica múltiples procesos como pérdida de osmorregulación de la membrana, inhibición de enzimas respiratorias, disipación de la fuerza protón motriz y estrés oxidativo (Blazquez *et al.*, 2012; Ceragioli *et al.*, 2010). El mecanismo más extendido que provoca la disminución en la susceptibilidad frente a QACs es el incremento en la actividad de las bombas de exporte (Poole, 2005), aunque hay otros mecanismos que probablemente también estén implicados tales como la alteración en la composición de ácidos grasos y otros cambios a nivel de la membrana bacteriana (Ferreira *et al.*, 2011; Guerin-Mechin *et al.*, 1999). Los ensayos de medidas de anisotropía previos ya habían revelado que la adaptación a biocidas puede provocar un incremento de la rigidez de la membrana, especialmente tras contacto con triclosán. Este mecanismo puede ser igualmente responsable del desarrollo de resistencias frente a conservantes tras contacto prolongado y gradual con este biocida en concreto.

Los resultados de este estudio muestran un incremento en la susceptibilidad a conservantes alimentarios en bacterias procedentes de alimentos ecológicos tras exposición gradual a diversos tipos de biocidas. La exposición de bacterias a miembros de una clase de antimicrobianos puede afectar a su susceptibilidad frente a otros tipos de

compuestos. Sin embargo, no hay evidencias definitivas que confirmen la importancia clínica de la coselección de patógenos resistentes a antibióticos a causa del empleo de biocidas en ámbitos hospitalarios y de asistencia sanitaria. Los datos disponibles en el ámbito alimentario son mucho más escasos que en clínica, por lo que la significancia de las asociaciones entre resistencias frente a distintos tipos de compuestos en bacterias de origen alimentario es aún incierta, como confirman los datos de este estudio.



**CONCLUSIONES**



1. La exposición reiterada de bacterias procedentes de alimentos ecológicos a los biocidas cloruro de benzalconio, cloruro de hexadecilpiridinio, cetrimida, triclosán, hexaclorofeno o clorhexidina provoca un incremento en la tolerancia a los mismos, especialmente tras exposición a concentraciones crecientes de cloruro de benzalconio o clorhexidina.
2. La tolerancia a biocidas provocada por la exposición a concentraciones subletales de estos compuestos es transitoria en la mayoría de las cepas.
3. La exposición a biocidas provoca el desarrollo de tolerancia frente a otros biocidas en las cepas estudiadas, encontrándose correlaciones positivas significativas entre algunas de estas tolerancias.
4. La presión selectiva ejercida por el contacto con biocidas provoca el desarrollo de resistencias a diversos antibióticos en un elevado porcentaje de las cepas analizadas.
5. El estudio de los determinantes genéticos de resistencia sugiere que la tolerancia a biocidas y la resistencia a antibióticos no se debe a la adquisición de genes de resistencia.
6. La actividad de bombas de exporte tampoco parece jugar un papel primordial en la adquisición de tolerancias a biocidas o resistencias a antibióticos, excepto en cepas concretas adaptadas a biocidas fenólicos.
7. La presión selectiva ejercida por el contacto con concentraciones crecientes de los biocidas estudiados provoca un incremento en la rigidez de la membrana bacteriana que puede justificar la adquisición de resistencias múltiples estables.
8. Las cepas con fenotipo estable de tolerancia a biocidas muestran alteraciones en otras características fisiológicas como la capacidad de crecimiento y la tolerancia al calor.
9. La resistencia a jugo gástrico o sales biliares de las cepas estudiadas no se ve influenciada por la adaptación a los biocidas.
10. Las cepas sometidas a presión selectiva con concentraciones subletales de cloruro de benzalconio, cloruro de hexadecilpiridinio, cetrimida, hexaclorofeno y clorhexidina muestran un incremento generalizado en su sensibilidad a conservantes químicos y aceites esenciales empleados habitualmente en la industria alimentaria.
11. Las cepas adaptadas a triclosán, por el contrario, presentan una mayor tolerancia a conservantes químicos y aceites esenciales.



**CONCLUDING REMARKS**



1. Repeated exposure of bacteria from organic foods to the biocides benzalkonium chloride, hexadecylpyridinium chloride, cetrимide, triclosan, hexachlorophene or chlorhexidine resulted in most cases in increased tolerance to the same biocide, particularly after step-wise exposure to benzalkonium chloride or chlorhexidine.
2. Biocide tolerances detected after exposure of bacteria to sublethal concentrations of biocides were transient in most of strains.
3. Biocide exposure results in decreases in the antimicrobial susceptibility of bacteria to other biocides, with significant positive correlations in some instances.
4. Selective pressure with biocides often induces decreases in antimicrobial susceptibility to clinically relevant antibiotics in bacterial strains.
5. The study of genetic determinants suggest that biocide tolerance and antibiotic resistance is not due to acquisition of resistance genes.
6. The activity of efflux pumps does not play an essential role in the acquisition of tolerance to biocides or resistance to antibiotics after step-wise exposure to biocides, except for some specific strains adapted to phenolic biocides.
7. Higher membrane rigidity after growth in the presence of biocides seems to play an important role in the stable biocide tolerance detected in adapted strains.
8. Stable adaptation to antimicrobial stress induced by biocides causes alterations in other physiological characteristics as growth capacity and heat tolerance.
9. Gastric acid fluid and bile resistance is not influenced by biocide adaptation of bacteria from organic foods.
10. Strains grown in presence of sublethal concentrations of benzalkonium chloride, hexadecylpyridinium chloride, cetrимide, hexachlorophene or chlorhexidine show a generalized increase in the sensitivity to chemical preservatives and essential oils.

11. On the contrary, an increase in the tolerance to chemical preservatives and essential oils was detected among triclosan-adapted strains.

## **REFERENCIAS**



Aarestrup, F.M. and Hasman, H. **2004**. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary Microbiology*, 100: 83-89.

Aarestrup, F.M., Knochel, S. and Hasman, H. **2007**. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* from food products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4: 216-221.

Aase, B., Sundheim, G., Langsrund, S. and Rorvik, L.M. **2000**. Occurrence of and a possible mechanism for resistance to a quaternary ammonium compound in *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 62: 57-63.

Adair, F.W., Geftic, S.G. and Gelzer, J. **1969**. Resistance of *Pseudomonas* to Quaternary Ammonium Compounds I. Growth in Benzalkonium Chloride Solution. *Applied Microbiology*, 18: 299-302.

Ahn, Y., Kim, J.M., Kweon, O., Kim, S., Jones, R.C., Woodling, K., Gamboa da Costa, G., LiPuma, J.J., Hussong, D., Marasa, B.S. and Cerniglia, B.S. **2016**. Intrinsic resistance of *Burkholderia cepacia* complex to benzalkonium chloride. *mBio*, 7: e01716-16.

Akiba, M., Lin, J., Barton, Y.-W. and Zhang, Q. **2006**. Interaction of CmeABC and CmeDEF in conferring antimicrobial resistance and maintaining cell viability in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 52-60.

Al-Adham, I., Haddadin, R. and Collier, P. **2013**. Types of microbicidal and microbistatic agents. In *Russell, Hugo & Ayliffe's principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. A. Fraiese, P.A. Lambert and J.-Y. Maillard (Eds.); Blackwell Publishing Ltd., Massachusetts (USA).

Alippi, A.M., León, I.E. and López, A.C. **2014**. Tetracycline-resistance encoding plasmids from *Paenibacillus larvae*, the causal agent of American foulbrood disease, isolated from commercial honeys. *International Microbiology*, 17: 49-61.

Alonso-Hernando, A., Capita, R., Prieto, M. and Alonso-Calleja, C. **2009**. Comparison of antibiotic resistance patterns in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains pre-exposed and exposed to poultry decontaminants. *Food Control*, 20: 1108-1111.

Alonso-Hernando, A., Alonso-Calleja, C. and Capita, R. **2010**. Effects of exposure to poultry chemical decontaminants on the membrane fluidity of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 137: 130-136.

Ambler, R.P. **1980**. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 289: 321-331.

Andersson, D.I. and Hughes, D. **2012**. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resistance Updates*, 15: 162-172.

Andersson, D.I. and Hughes, D. **2014**. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12: 465-478.

Aricha, B., Fishov, I., Cohen, Z., Sikron, N., Pesakhov, S., Khozin-Goldberg, I., Dagan, R. and Porat, N. **2004**. Differences in membrane fluidity and fatty acid composition between phenotypic variants of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 186: 4638-4644.

Badaoui Najjar, M., Chikindas, M. and Montville, T.J. **2007**. Changes in *Listeria monocytogenes* membrane fluidity in response to temperature stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 73: 6429-6435.

Bergholz, T.M., Tang, S., Wiedmann, M. and Boor, K.J. **2013**. Nisin resistance of *Listeria monocytogenes* is increased by exposure salt stress and is mediated via LiaR. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 5682-5688.

Bhardwaj, P., Ziegler, E., Adams, H. and Palmer, K.L. **2016**. Chlorhexidine Induces VanA-Type Vancomycin Resistance Genes in Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60: 2209-2221.

Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva K, Banks, E.D., Johnston, M.D., Barton, H.A. and Wright, G.D. **2012**. Antibiotic resistance is prevalent in an isolated cave microbiome. *PLoS One*, 7: e34953.

Biondi, S., Long, S., Panunzio, M. and Qin, W.L. **2011**. Current trends in  $\beta$ -lactam based  $\beta$ -lactamases inhibitors. *Current Medical Chemistry*, 18: 4223-4236.

Bischoff, K.M., White, D.G., McDermott, P.F., Zhao, S., Gaines, S., Maurer, J.J. and Nisbet, D.J. **2002**. Characterization of chloramphenicol resistance in beta-hemolytic *Escherichia coli* associated with diarrhea in neonatal swine. *Journal of Clinical Microbiology*, 40: 389-394.

Bjorland, J., Sunde, M. and Waage, S. **2001**. Plasmid-borne *smr* gene causes resistance to quaternary ammonium compounds in bovine *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39: 3999-4004.

Bjorland, J., Steinum, T., Sunde, M., Waage, S. and Heir, E. **2003**. Novel plasmid-borne gene *qacJ* mediates resistance to quaternary ammonium compounds in equine *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus simulans*, and *Staphylococcus intermedius*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 3046-3052.

Bjorland, J., Steinum, T., Kvitle, B., Waage, S., Sunde, M. and Heir, E. **2005**. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *Journal of Clinical Microbiology*, 43: 4363-4368.

Blazquez, J., Couce, A., Rodriguez-Beltran, J. and Rodriguez-Rojas, A. **2012**. Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Current Opinion in Microbiology*, 15: 561-569.

Boeris, P.S., Domenech, C.E. and Lucchesi, G.I. **2007**. Modification of phospholipid composition in *Pseudomonas putida* A ATCC 12633 induced by contact with tetradecyltrimethylammonium. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1048-1054.

Braga, T.M., Marujo, P.E., Pomba, C. and Lopes, M.F.S. **2011**. Involvement, and dissemination, of the enterococcal small multidrug resistance transporter QacZ in resistance to quaternary ammonium compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 283-286.

Braoudaki, M. and Hilton, A.C. **2004a**. Adaptive resistance to biocides in *Salmonella* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *Journal of Clinical Microbiology*, 42: 73–78.

Braoudaki, M. and Hilton, A.C. **2004b**. Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. *FEMS Microbiology Letters*, 235: 305-309.

Braoudaki, M. and Hilton, A.C. **2005**. Mechanisms of resistance in *Salmonella enterica* adapted to erythromycin, benzalkonium chloride and triclosan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25: 31–37.

Buffet-Bataillon, S., Tattevin, P., Bonnaure-Mallet, M. and Jolivet-Gougeon, A. **2012a**. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds – a critical review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39: 381-389.

Buffet-Bataillon, S., Le Jeune, A., Le Gall-David, S., Bonnaure-Mallet, M. and Jolivet-Gougeon, A. **2012b**. Molecular mechanisms of higher MICs of antibiotics and quaternary ammonium compounds for *Escherichia coli* isolated from bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67: 2837-2842.

Bush, K. and Miller, G.H. **1998**. Bacterial enzymatic resistance: beta-lactamases and aminoglycoside-modifying enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, 1: 509-515.

Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B. and Vahaboglu, H. **2016**. Resistance mechanisms. *Annals of Translational Medicine*, 4: 326.

Calhoun, L.N. and Kwon, Y.M. **2010**. The effect of long-term propionate adaptation on the stress resistance of *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Applied Microbiology*, 109: 1294-1300.

Caris-Veyrat, C., Amiot, M.J., Tyssandier, V., Grasselly, D., Buret, M., Mikolajczak, M., Guillard, J.C., Bouteloup-Demange, C. and Borel, P. **2004**. Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6503-6509.

Ceragioli, M., Mols, M., Moezelaar, R., Ghelardi, E., Senesi, S. and Abee, T. **2010**. Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of *Bacillus cereus* to various disinfectant treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 3352-3360.

Christensen, E.G., Gram, L. and Kastbjerg, V.G. **2011**. Sublethal triclosan exposure decreases susceptibility to gentamicin and other aminoglycosides in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 4064-4071.

Chuanchuen, R., Beinlich, K., Hoang, T.T., Becher, A., Karkhoff-Schweizer, R.R. and 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* mutant overexpressing *MexCD-OprJ*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 428-432.

Chuanchuen, R., Pathanasophon, P., Khemtong, S., Wannaprasat, W. and Padungtod, P. **2008**. Susceptibilities to antimicrobials and disinfectants in *Salmonella* isolates obtained from poultry and swine in Thailand. *The Journal of Veterinary Medical Sciences*, 70: 595-601.

Coenye, T., Van Acker, H., Peeters, E., Sass, A., Buroni, S., Riccardi, G. and Mahenthiralingam, E. **2011**. Molecular Mechanisms of Chlorhexidine Tolerance in *Burkholderia cenocepacia* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 1912-1919.

Condell, O., Iversen, C., Cooney, S., Power, K.A., Walsh, C., Burgess, C. and Fanning, S. **2012**. Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 3087-3097.

Conner, D.E. and Beuchat, L.R. **1984**. Sensitivity of heat-stressed yeast to essential oils of plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 229-233.

Cottell, A., Denyer, S.P., Hanlon, G.W., Ochs, D. and Maillard, J.-Y. **2009**. Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *Journal of Hospital Infection*, 72: 71-76.

Davies, C., White, S.W. and Nicholas, R.A. **2001**. Crystal structure of a deacylation-defective mutant of penicillin-binding protein 5 at 2.3-Å resolution. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 616-623.

De Boever, P. and Verstraete, W. **1999**. Bile salt deconjugation by *Lactobacillus plantarum* 80 and its implication for bacterial toxicity. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 345-52.

Donati, V., Feltrin, F., Hendriksen, R.S., Svendsen, C.A., Cordaro, G., García-Fernández, A., Lorenzatti, S., Lorenzetti, R., Battisti, A. and Franco, A. **2014**. Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Klebsiella* spp. from Companion Animals in Italy. *PLoS ONE* 9: e90564.

Emslie, K.R., Townsend, D.E. and Grubb, W.B. **1985**. A resistance determinant to nucleic acid-binding compounds in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 20: 139-145.

Fang, C.-T., Chen, H.-C., Chuang, Y.-P., Chang, S.-C. and Wang, J.-T. **2002**. Cloning of a cation efflux pump gene associated with chlorhexidine resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2024-2028.

Fernández-Cuenca, F., Tomás, M., Caballero-Moyano, F.J., Bou, G., Martínez-Martínez, L., Vila, J., Pachón, J., Cisneros, J.-M., Rodríguez-Baño, J. and Pascual, Á. **2015**. Reduced susceptibility to biocides in *Acinetobacter baumannii*: association with resistance to antimicrobials, epidemiological behavior, biological cost and effect on the expression of genes encoding porins and efflux pumps. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70: 3222-3229.

Fernández-Fuentes, M.A., Ortega Morente, R., Abriouel, H., Pérez Pulido, R. and Gálvez, A. **2012**. Isolation and identification of bacteria from organic foods: sensitivity to biocides and antibiotics. *Food Control*, 26: 73-78.

Ferreira, C., Pereira, A.M., Pereira, M.C., Melo, L.F. and Simoes, M. **2011**. Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyldimethyldodecylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 1036-1043.

Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J.-C. and Auffray, Y. **1997**. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 812–814.

Fraise, A.P. **2002**. Biocide abuse and antimicrobial resistance – a cause for concern? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 11-12.

Forbes, S., Dobson, C.B., Humphreys, G.J. and McBain, A.J. **2014**. Transient and sustained bacterial adaptation following repeated sublethal exposure to microbicides and a novel human antimicrobial peptide. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 5809-5817.

Fuangthong, M., Julotok, M., Chintana, W., Kuhn, K., Rittiroongrad, S., Vattanaviboon, P. and Mongkolsuk, S. **2011**. Exposure of *Acinetobacter baylyi* ADP1 to the biocide

chlorhexidine leads to acquired resistance to the biocide itself and to oxidants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66: 319-322.

Furi, L., Ciusa, M.L., Knight, D., Di Lorenzo, V., Tocci, N., Cirasola, D., Aragonés, L., Coelho, J.R., Freitas, A.T., Marchi, E., Moce, L., Visa, P., Northwood, J.B., Viti, C., Borghi, E., Orefici, G., Consortium, T.B., Morrissey, I. and Oggioni, M.R. **2013**. Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57: 3488–3497.

Gandhi, P.A., Sawant, A.D., Wilson, L.A. and Ahearn, D.G. **1993**. Adaptation and growth of *Serratia marcescens* in contact lens disinfectant solutions containing chlorhexidine gluconate. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 183-188.

Ganeshnarayan, K., Shah, M.S., Libera, M.R., Santostefano, A. and Kaplan, B.J. **2009**. Poly-N-Acetylglucosamine matrix polysaccharide impedes fluid convection and transport of the cationic surfactant cetylpyridinium chloride through bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 1308-1314.

Gaze, W.H., Abdousslam, N., Hawkey, P.M. and Wellington, E.M.H. **2005**. Incidence of class 1 integrons in a quaternary ammonium compound-polluted environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 1802-1807.

Gerba, C.P. **2015**. Quaternary ammonium biocides: efficacy in application. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 464-469.

Gilbert, P. and McBain, A.J. **2003**. Potential Impact of Increased Use of Biocides in Consumer Products on Prevalence of Antibiotic Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 189-208.

Gilbert, P. and Moore, L.E. **2005**. Cationic antiseptic: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99: 703-715.

Goddard, P.A. and McCue, K.A., **2001**. Phenolic compounds. In *Disinfection, sterilization and preservation*; S.S. Block (Ed.); Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia (USA).

Gould, I.M., David, M.Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T. and Peters, G. **2012**. New insights into methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39: 96-104.

Guerin-Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. and Laveau, J.Y. **1999**. Specific variations of fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 induced by quaternary ammonium compounds and relation with resistance to bactericidal activity. *Journal of Applied Microbiology*, 87: 735–42.

Guerin-Mechin, L., Dubois-Brissonnet, F., Heyd, B. and Laveau, J.Y. **2000**. Quaternary ammonium compounds stresses induce specific variations in fatty acid composition of *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Food Microbiology*, 55: 157-159.

Güldas, H.E., Kececi, A.D., Cetin, E.S., Ozturk, T. and Kaya, B.Ü. **2016**. Evaluation of antimicrobial efficacy of cetrime and *Glycyrrhiza glabra* L. extract against *Enterococcus faecalis* biofilm growth on dentin discs in comparison with NaOCl. *Dental Material Journal*, 35: 721-727.

Hachler, H., Cohen S.P. and Levy, S.B. **1991**. *marA*: a regulated locus which controls expression of chromosomal multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 173: 5532-5538.

Haglund, A., Johansson, L., Berglund, L. and Dahlstedt, L. **1999**. Sensory evaluation of carrots from ecological and conventional growing systems. *Food quality and preference*, 10: 23-29.

Hajšlová, J., Schulzova, V., Slanina, P., Janné, K., Hellenäs, K.E. and Andersson, Ch. **2005**. Quality of organically and conventionally grown potatoes: four-year study of

micronutrients, metals, secondary metabolites, enzymic browning and organoleptic properties. *Food Additives and Contaminants*, 22: 514-534.

Hansen, L.H., Sørensen, S.J., Jørgensen, H.S. and Jensen, L.B. **2005**. The prevalence of the OqxAB multidrug efflux pump amongst olaquinox-resistant *Escherichia coli* in pigs. *Microbial Drug Resistance*, 11: 378-382.

Hay, A.G., Dees, P.M. and Sayler, G.S. **2001**. Growth of a bacterial consortium on triclosan. *FEMS Microbiology Ecology*, 36: 105-112.

He, G-X., Zhang, C., Crow, R.R., Thorpe, C., Chen, H., Kumar, S., Tsuchiya, T. and Varela, M.F. **2011**. SugE, a new member of the SMR family of transporters, contributes to antimicrobial resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 3954-3957.

He, G-X., Landry, M., Chen, H., Thorpe, C., Walsh, D., Varela, M.F. and Pan, H. **2014**. Detection of benzalkonium chloride resistance in community environmental isolates of staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*, 63: 735-741.

Heath, R.J., Rubin, J.R., Holland, D.R., Zhang, E., Snow, M.E. and Rock, C.O. **1999**. Mechanism of triclosan inhibition of bacterial fatty acid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 274: 11110-11114.

Heath, R.J., Li, J., Roland, G.E. and Rock, C.O. **2000**. Inhibition of the *Staphylococcus aureus* NADPH-dependent enoyl-acyl carrier protein reductase by triclosan and hexachlorophene. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 4654-4659.

Heir, E., Sundheim, G. and Holck, A.L. **1995**. Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. *Journal of Applied Bacteriology*, 79: 149-156.

Heir, E., Sundheim, G. and Holck, A.L. **1999a**. Identification and characterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococci from the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, 48: 211-219.

Heir, E. Sundheim, G. and Holck, A.L. **1999b**. The *qacG* gene on plasmid *pST94* confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. *Journal of Applied Microbiology*, 86: 378-388.

Heir, H., Lindstedt, B.A., Røtterud, O.J., Vardund, T., Kapperud, G. and Nesbakken, T. **2004**. Molecular epidemiology and disinfectant susceptibility of *Listeria monocytogenes* from meat processing plants and human infections. *International Journal of Food Microbiology*, 96: 85-96.

Helms, M., Vastrup, P., Gerner-Smidt, P. and Molbak, K. **2004**. Mortality associated with foodborne bacterial gastrointestinal infections. *Ugeskrift for Læger*, 166: 491-493.

Helms, M., Simonsen, J. and Molbak, K. **2006**. Foodborne bacterial infection and hospitalization: a registry-based study. *Clinical Infections Diseases*, 42: 498-506.

Helmuth, R., Schroeter, A., Malorny, B., Miko, A. and Guerra, B. **2009**. Tracing antibiotic resistance along the food chain: why and how. *Global Issues in Food Science and Technology*, 16: 248-262.

Hoang, T.T. and Schweizer, H.P. **1999**. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* enoyl-acyl carrier protein reductase (FabI): a target for the antimicrobial triclosan and its role in acylated homoserine lactone synthesis. *Journal of Bacteriology*, 181: 5489-5497.

Huffer, S., Clark, M.E., Ning, J.C., Blanch, H.W. and Clark, D.S. **2011**. Role of alcohols in growth, lipid composition, and membrane fluidity of yeasts, bacteria, and archaea. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 6400-6408.

Hughes, D. and Andersson, D.I. **2012**. Selection of resistance at lethal and non-lethal antibiotic concentrations. *Current Opinion in Microbiology*, 15: 555-560.

Humphrey, T. J., Richardson, N.P., Gawler, A.H.L. and Allen, M.J. **1991**. Heat resistance of *Salmonella enteritidis* PT4: the influence of prior exposure to alkaline conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 12: 258-260.

Hwang, Y.Y., Ramalingam, K., Bienek, D.R., Lee, V., You, T. and Alvarez, R. **2012**. Antimicrobial activity of nanoemulsion in combination with cetylpyridinium chloride in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57: 3568-3575.

Jaglic, Z. and Cervinkova, D. **2012**. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds – the *qac* genes and their role: a review. *Veterinarni Medicina*, 57: 275-281.

Jiménez Fernández, R. **2010**. En *Por qué consumir alimentos ecológicos*, Edición Privada. Winihard Grafics, s.l. (España).

Johansson, L., Haglund, A., Berglund, A., Lea, P. and Risvik, E. **1999**. Preference for tomatoes, affected by sensory attributes and information about growth conditions. *Food quality and preference*, 10: 289-298.

Jones, I.G. and Midgley, M. **1985**. Expression of a plasmid-borne ethidium resistance determinant from *Staphylococcus aureus* in *Escherichia coli*: evidence for an efflux system. *FEMS Microbiology Letters*, 28: 355-358.

Jones, M.V., Herd, T.M. and Chrisite, H.J. **1989**. Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to amphoteric and quaternary ammonium biocides. *Microbiology*, 58: 49–61.

Joynson, J.A., Forbes, B. and Lambert, R.J. **2002**. Adaptive resistance to benzalkonium chloride, amikacin and tobramycin: the effect on susceptibility to other antimicrobials. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 96-107.

Kang, J., Wiedmann, M., Boor, K.J. and Bergholz, T.M. **2015**. VirR-mediated resistance of *Listeria monocytogenes* against food antimicrobials and cross-protection induced by exposure to organic acid salts. *Applied and Environmental Microbiology*, 81: 4553-4562.

Karatzas, K.A., Webber, M.A., Jorgensen, F., Woodward, M.J., Piddock, L.J. and Humphrey, T.J. **2007**. Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60: 947-955.

Karatzas, K.A., Randall, L.P., Webber, M.A., Piddock, L.J., Humphrey, T.J., Woodward, M.J. and Coldham, N.G. **2008**. Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 1508-1516.

Katharios-Lanwermeier, S., Rakic-Martinez, M., Elhanafi, D., Ratani, S., Tiedje, J.M. and Kathariou, S. **2012**. Coselection of cadmium and benzalkonium chloride resistance in conjugative transfers from nonpathogenic *Listeria* spp. to other listeriae. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 7549-7556.

Kazemi, M., Kermanshahi, R.K., Dehkordi, E.H., Payami, F. and Behjati, M. **2012**. Resistance index of penicillin-resistant bacteria to various physicochemical agents. *ISRN Microbiology*, volumen 2012: article ID 789474.

Kido, Y., Kodama, H., Uraki, F., Uyeda, M., Tsuruoka, M. and Shibata, M. **1988**. Microbial degradation of disinfectants. II. Complete degradation of chlorhexidine. *Eisei Kagaku*, 34: 97-101.

Kitagawa, H., Izutani, N., Kitagawa, R., Maezono, H., Yamaguchi, M. and Imazato, S. **2016**. Evolution of resistance to cationic biocides in *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry*, 47: 18–22.

Kumar, S., Floyd, J.T., He, G. and Varela, M.F. **2013**. Bacterial antimicrobial efflux pumps of the MFS and MATE transporter families: a review. In *Recent Research Developments in Antimicrobial Agents & Chemotherapy*. S. Pandali (Ed.); Research Signpost.

Kunz, A.N., Begum, A.A., Wu, H., D'Ambrozio, J., Robinson, J.M., Shafer, W.M., Bash, M.C. and Jerse, A.E. **2012**. Impact of fluoroquinolone resistance mutations on gonococcal fitness and in vivo selection for compensatory mutations. *The Journal of Infectious Diseases*, 205: 1821–1829.

Lambert, R.J.W., Joynson, J. and Forbes, B. **2001**. The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. *Journal of Applied Microbiology*, 91: 972–984.

Lambert, R.J. **2004**. Comparative analysis of antibiotic and antimicrobial biocide susceptibility data in clinical isolates of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* between 1989 and 2000. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 699–711.

Langsrud, S., Sundheim, G. and Holck, A.L. **2004**. Cross-resistance to antibiotics of *Escherichia coli* adapted to benzalkonium chloride or exposed to stress-inducers. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 201-208.

Latimer, J., Forbes, S. and McBain, A.J. **2012**. Attenuated virulence and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* following sublethal exposure to triclosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56: 3092-3100.

Lear, J.C., Maillard, J.-Y., Dettmar, P.W., Goddard, P.A. and Russell, A.D. **2006**. Chloroxylenol- and triclosan-tolerant bacteria from industrial sources—susceptibility to antibiotics and other biocides. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57: 51–56.

Lebeer, S., Claes, I.J., Verhoeven, T.L., Shen, C., Lambrichts, I., Ceuppens, J.L., Vanderleyden, J. and De Keersmaecker, S.C.J. **2008**. Impact of *luxS* and suppressor mutations on the gastrointestinal transit of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 4711-4718.

Leelaporn, A., Paulsen, I.T., Tennent, J.M., Littlejohn, T.G. and Skurray, R.A. **1994**. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative

Lemaitre, J.P., Echchannaoui, H., Michaut, G., Divies, C. and Rousset, A. **1998**. Plasmid-mediated resistance to antimicrobial agents among listeriae. *Journal of Food Protection*, 61: 1459-1464.

Levin, B.C. and Freese, E. **1977**. Comparison of the effects of two lipophilic acids, hexachlorophene and decanoate, on *Bacillus subtilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 12: 357-367.

Leyer, G.J. and Johnson, E.A. **1993**. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1842-1847.

Li, X.-Z. and Nikaido, H. **2009**. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69: 1555-1623.

Lim, S.C., Foster, N.F. and Riley, T.V. **2016**. Susceptibility of *Clostridium difficile* to the food preservatives sodium nitrite, sodium nitrate and sodium metabisulphite. *Anaerobe*, 37: 67-71.

Littlejohn, T.G., Di Berardino, D., Messerotti, L.J., Spiers, S.J. and Skurray, R.A. **1991**. Structure and evolution of a family of genes encoding antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *Gene*, 101: 59-66.

Lou, A. and Yousef, A. E. **1996**. Resistance of *Listeria monocytogenes* to heat after adaptation to environmental stresses. *Journal of Food Protection*, 59: 465–471.

Loughlin, M.F., Jones, M.V. and Lambert, P.A. **2002**. *Pseudomonas aeruginosa* cells adapted to benzalkonium chloride show resistance to other membrane-active agents but no to clinically relevant antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 631-639.

Lyon, B.R. and Skurray, R. **1987**. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: genetic basis. *Microbiological Reviews*, 51: 88-134.

Maillard, J-Y. **2005**. Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, I: 307-320.

Maillar, J.-Y. **2013**. Factors affecting the activities of microbiocides. In *Russell, Hugo & Ayliffe's principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. A. P. Fraise, P.A. Lambert and J.-Y. Maillard (Eds.); Blackwell Publishing Ltd., Massachusetts (USA).

Maltezou, H.C. **2009**. Metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33: 405: e1-7.

Marino, M., Frigo, F., Bartolomeoli, I. and Maifreni, M. **2010**. Safety-related properties of staphylococci isolated from food and food environments. *Journal of Applied Microbiology*, 110: 550-561.

Marquez, B. **2005**. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. *Biochimie*, 87: 1137-1147.

Martos, J., Ferrer Luque, C.M., González-Rodríguez, M.P., Arias-Moliz, M.T. and Baca, P. **2013**. Antimicrobial activity of essential oils and chloroform alone and combined with cetrimide against *Enterococcus faecalis* biofilm. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 3: 44-48.

Maseda, H., Hashida, Y., Konaka, R., Shirai, A. and Kourai, H. **2009**. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetyltrimidinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53: 5230-5235.

Mavri, A. and Smole Možina, S. **2012**. Involvement of efflux mechanisms in biocide resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Journal of Medical Microbiology*, 61: 800–808.

Mavri, A. and Smole Možina, S. **2013**. Development of antimicrobial resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* adapted to biocides. *International Journal of Food Microbiology*, 160: 304–312.

McDonnell, G. and Russell, A.D. **1999**. Antiseptics and disinfectants: Activity, action and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 147-179.

McMahon, M.A.S., Blair, I.S., Moore, J.E. and McDowell, D.A. **2007**. Habituation to sub-lethal concentrations of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) is associated with reduced susceptibility to antibiotics in human pathogens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 125-127.

McMurry, L.M., Oethinger, M. and Levy, S.B. **1998**. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394: 531-532.

McNeil, J.C., Hulten, K.G., Kaplan, S.L. and Mason, E.O. **2014**. Decreased susceptibilities to retapamulin, mupirocin, and chlorhexidine among *Staphylococcus aureus* isolates causing skin and soft tissue infections in otherwise healthy children. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 2878-2883.

Middleton, J.H. and Salierno, J.D. **2013**. Antibiotic resistance in triclosan tolerant fecal coliforms isolated from surface waters near wastewater treatment plant outflows (Morris County, NJ, USA). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 88: 79-88.

Miller, P.F., Gambino, L.F., Sulavik, M.C. and Gracheck, S.J. **1994**. Genetic relationship between *soxRS* and *mar* loci promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38: 1773-1779.

Miller, S.M. **1999**. Bacterial detoxification of Hg (II) and organomercurials. *Essays in Biochemistry*, 34: 17-30.

Moen, B., Rudi, K, Bore, E. and Langsrud, S. **2012**. Subminimal inhibitory concentrations of the disinfectant benzalkonium chloride select for a tolerant subpopulation of *Escherichia coli* with inheritable characteristics. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 4101-4123.

Moken, M.C., McMurry, L.M. and Levy, S.B. **1997**. Selection of multiple antibiotic resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: roles of the *mar* and *acrAB* loci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 2770-2772.

Molbak, K. **2004**. Spread of resistant bacteria and resistance genes from animals to humans – the public health consequences. *Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 51: 364-369.

Moore, L.E., Ledder, R.G., Gilbert, P. and McBain, A.J. **2008**. *In vitro* study of the effect of cationic biocides on bacterial population dynamics and susceptibility. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 4825–4834.

Morita, Y., Murata, T., Mima, T., Shiota, S., Kuroda, T., Mizushima, T., Gotoh, N., Nishino, T. and Tomofusa, T. **2003**. Induction of *mexCD-oprJ* operon for a multidrug efflux pump by disinfectants in wild-type *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 991-994.

Murtough, S. M., Hiom, S.J., Palmer, M. and Russell, A.D. **2001**. Biocide rotation in the healthcare setting: Is there a case for policy implementation? *Journal of Hospital Infection*, 48: 1–6.

Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Leduc, L.G. and Ferroni, G.D. **2007**. Fluorescence polarization in studies of bacterial cytoplasmic membrane fluidity under environmental stress. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 95: 60–82.

Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Twine, S.M., Ferroni, G.D. and Leduc, L.G. **2010a**. Membrane fluidity and fatty acid comparisons in psychrotrophic and mesophilic strains of *Acidithiobacillus ferrooxidans* under cold growth temperatures. *Archives of Microbiology*, 192: 1005-1018.

Mykytczuk, N.C.S., Trevors, J.T., Ferroni, G.D. and Leduc, L.G. **2010b**. Cytoplasmic membrane fluidity and fatty acid composition of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in response to pH stress. *Extremophiles: life under extreme conditions*, 14: 427-441.

Niggli, U. **2007**. History and concepts of food quality and safety in organic food production and processing. In *Handbook of organic food safety and quality*; J. Cooper, U. Niggli and C. Leifert (Eds.); Woodhead Publishing Limited, Cambridge (England).

Norman, A., Hansen, L.H., She, Q. and Sørensen, S.J. **2008**. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid*, 60: 59-74.

Oh, S., Tandukar, M., Pavlostathis, S.G., Chain, P.S. and Konstantinidis, K.T. **2013**. Microbial community adaptation to quaternary ammonium biocides as revealed by metagenomics. *Environmental Microbiology*, 15: 2850-2864.

Okada, M., Hiramatsu, D., Okihara, T. and Matsumoto, T. **2016**. Adsorption and desorption behaviors of cetyltrimethylammonium chloride on hydroxyapatite nanoparticles with different morphologies. *Dental Materials Journal*, 35: 651-658.

Okusu, H., Ma, D. and Nikaido, H. **1996**. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple antibiotic-resistant (Mar) mutants. *Journal of Bacteriology*, 178: 306-308.

O'Malley, L.P., Shaw, C.H. and Collins, A.N. **2007**. Microbial degradation of the biocide polyhexamethylene biguanide: isolation and characterization of enrichment consortia and determination of degradation by measurement of stable isotope incorporation into DNA. *Journal of Applied Microbiology*, 103: 1158-1169.

Pál, C., Papp, B. and Lázár, V. **2015**. Collateral sensitivity of antibiotic-resistant microbes. *Trends in Microbiology*, 23: 401-407.

Pandey, R., Pieper, G.H., Ter Beek, A., Vischer, N.O., Smelt, J.P., Manders, E.M. and Brul, S. **2015**. Quantifying the effect of sorbic acid, heat and combination of both on germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* spores at single cell resolution. *Food Microbiology*, 52: 88-96.

Pannek, S., Higgins, P.G., Steinke, P., Jonas, D., Akova, M., Bohnert, J.A., Seifert, H. and Kern, W.V. **2006**. Multidrug efflux inhibition in *Acinetobacter baumannii*: comparison between 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenyl-arginine- $\beta$ -naphthylamide. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 970-974.

Paulsen, I.T., Brown, M. H. and Skurray, R.A. **1996**. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiological Reviews*, 60: 575-608.

Pfaller, M.A., Jones, R.N., Marshall, S.A., Coffman, S.L., Hollis, R.J., Edmond, M.B. and Wenzel, R.P. **1997**. Inducible Amp C  $\beta$ -lactamase producing gram-negative bacilli from blood stream infections: Frequency, antimicrobial susceptibility, and molecular epidemiology in a national surveillance program (SCOPE). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 28: 211-219.

Piddock, L.J.V. **2006**. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 19: 382-402.

Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C. and Nordmann, P. **2003**. Outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 41: 3542-3547.

Poirel, L. and Nordmann, P. **2006**. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*, 12: 826-836.

Poole, K. **2002**. Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92: 55S-64S.

Poole, K. **2004**. Acquired resistance. In *Russell, Hugo & Ayliffe's principles and practice of disinfection, preservation and sterilization*. A. P. Fraise, P.A. Lambert and J.-Y. Maillard (Eds.); Blackwell Publishing Ltd., Massachusetts (USA).

Poole, K., **2005**. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 20-51.

Possas, A.M., Posada-Izquierdo, G.D., Pérez-Rodríguez, F. and García-Gimeno, R.M. **2016**. Modeling the transfer of *Salmonella* Enteritidis during slicing of ready-to-eat turkey products treated with thyme essential oil. *Journal of Food Science*, 81: M2770–M2775.

Potenki, C.J., Gandhi, M. and Matthews, K.R. **2003**. Exposure of *Salmonella enteritidis* to chloride or food preservatives increases susceptibility to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 220: 181-186.

Pu, W., Wang, D. and Zhou, D. **2015**. Structural characterization and evaluation of the antioxidant activity of phenolic compounds from *Astragalus taipaihanensis* and their structure-activity relationship. *Scientific Reports*, 5: 13914.

Quisno, R. and Foter, M.J. **1946**. Cetylpyridinium chloride: I. Germicidal properties. *Journal of Bacteriology*, 52: 111-117.

Rakic-Martinez, M., Drevets, D.A., Dutta, V., Katic, V. and Kathariou, S. **2011**. *Listeria monocytogenes* strains selected on ciprofloxacin or the disinfectant benzalkonium chloride exhibit reduced susceptibility to ciprofloxacin, gentamicin, benzalkonium chloride, and other toxic compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 8714-8721.

Randall, L.P., Cooles, S.W., Piddock, L.J.V. and Woodward, M.J. **2004**. Effect of triclosan or a phenolic farm disinfectant on the selection of antibiotic-resistant *Salmonella enterica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54: 621–627.

Randall, L.P., Bagnall, M.C., Karatzas, K.A., Coldham, N.C., Piddock, L. and Woodward, M.J. **2008**. Fitness and dissemination of disinfectant-selected multiple-antibiotic-resistant (MAR) strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61: 156-162.

Ratani, S.S., Siletzky, R.M., Dutta, V., Yildirim, S., Osborne, J.A., Lin, W., Hitchins, A.D., Ward, T.J. and Kathariou, S. **2012**. Heavy metal and disinfectant resistance of *Listeria monocytogenes* from foods and food processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 6938-6945.

Rema, T., Lawrence, J.R., Dynes, J.J., Hitchcock, A.P. and Korber, D.R. **2014**. Microscopic and spectroscopic analyses of chlorhexidine tolerance in *Delftia acidovorans* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 5676 – 5686.

Rensch, U., Klein, G. and Kehrenberg, C. **2013**. Analysis of triclosan-selected *Salmonella enterica* mutants of eight serovars revealed increased aminoglycoside susceptibility and reduced growth rates. *PLOS ONE*, 8: e78310.

Romanova, N.A., Wolffs, P.F., Brovko, L.Y. and Griffiths, M.W. **2006**. Role of efflux pumps in adaptation and resistance of *Listeria monocytogenes* to benzalkonium chloride. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 3498-3503.

Romanowska, J., Reuter, N. and Trylska, J. **2013**. Comparing aminoglycoside binding sites in bacterial ribosomal RNA and aminoglycoside modifying enzymes. *Proteins*, 81: 63-80.

Rossi, F., Godani, F., Bertuzzi, T., Trevisan, M., Ferrari, F. and Gatti, S. **2008**. Health-promoting substances and heavy metal content in tomatoes grown with different farming techniques. *European Journal of Nutrition*, 47: 266.

Rozen, D.E., McGee, L., Levin, B.R. and Klugman, K.P. **2007**. Fitness costs of fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 412–416.

Ruiz-Linares, M., Ferrer-Luque, C.M., Arias-Moliz, T., de Castro, P., Aguado, B. and Baca, P. **2014**. Antimicrobial activity of alexidine, chlorhexidine and cetrimide against *Streptococcus mutants* biofilm. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 13: 41.

Russell, A.D. **1997**. Plasmids and bacterial resistance to biocides. *Journal of Applied Microbiology*, 82: 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: 121S–135S.

Russell, A.D. **2003**. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 750-763.

Saier, M.H., Paulsen, I.T., Sliwinski, M.K., Pao, S.S., Skurray, R.A. and Nikaido, K. **1998**. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *The FASEB Journal*, 12: 265-274.

Salton, M.R.J. **1968**. Lytic agents, cell permeability and monolayer penetrability. *The Journal of General Physiology*, 52: 277–252.

Sanchez, P., Moreno, E. and Martinez, J.L. **2005**. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 781-782.

Santos Costa, S., Viveiros, M., Rosato, A.E., Melo-Cristino, J. and Couto, I. **2015**. Impact of efflux in the development of multidrug resistance phenotypes in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiology*, 15: 232.

SCENIHR, 2009. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks. **Enero 2009**. *Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides 24e25*. [http://ec.europa.eu/health/ph\\_risk/committees/04\\_scenihhr/docs/scenihhr\\_o\\_021.pdf](http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_021.pdf)

Schlett, C.D., Millar, E.V., Crawford, K.B., Cui, T., Lanier, J.B., Tribble, D.R. and Ellis, M.W. **2014**. Prevalence of chlorhexidine-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* following prolonged exposure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58: 4404-4410.

Schmidt, S., Wittich, R.-M., Erdmann, D., Wilkes, H., Francke, W. and Fortnagel, P. **1992**. Biodegradation of diphenyl ethers and its monohalogenated derivatives by *Sphingomonas* sp. Strain SS3. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 2744-2750.

Schmidt, S., Fortnagel, P. and Wittich, R.-M. **1993**. Biodegradation and transformation of 4,4'- and 2,4-dihalodiphenyl ethers by *Sphingomonas* sp. Strain SS33. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 3931-3933.

Schweizer, H.P. **2001**. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters*, 202: 1-7.

Shechter, E. **1997**. Fluidité Membranaire. In *Biochimie et Biophysique des Membranes. Aspects Structuraux et Fonctionnels*. E. Shechter (Eds.), Paris: Masson, Paris (France).

Shmon, C. **2003**. Assessment and preparation of the surgical patient and the operating team. In *Textbook of Small Animal Surgery*. D. Slatter (Ed.); Elsevier Science, Philadelphia (USA).

Sidhu, M.S., Heir, E., Sorum, H. and Holck, A. **2001**. Genetic linkage between resistance to quaternary ammonium compounds and  $\beta$ -lactam antibiotics in food-related *Staphylococcus* spp. *microbial Drug Resistance*, 7: 363-371.

Sidhu, M.S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K. and Holck, A. **2002**. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with  $\beta$ -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 2797-2803.

Skandamis, P.N., Yoon, Y., Stopforth, J.D., Kendall, P.A. and Sofos, J.N. **2008**. Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology*, 25: 294-303.

Soufi, L., Abbassi, M.S., Saenz, Y., Vinue, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S. and Torres, C. **2009**. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 1067–1073.

Sreenivasan, P.K., Haraszthy, V.I. and Zambon, J.J. **2012**. Antimicrobial efficacy of 0.05% cetylpyridinium chloride mouthrinses. *Letters in Applied Microbiology*, 56: 14-20.

Stickler, D.J. and Jones, G.L. **2008**. Reduced susceptibility of *Proteus mirabilis* to triclosan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 991–994.

Stockdale, E. and Watson, C. **2008**. Organic farming and food systems: Definitions and key characteristics. In *Health Benefits of Organic Food: Effects of the Environment*. I. Givens, S. Baxter, A.M. Minihane and E. Shaw (Eds.); CAB International, Trowbridge (UK).

Strahilevitz, J., Jacoby, G.A., Hooper, D.C. and Robicsek, A. **2009**. Plasmid mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 22: 664-689.

Sun, J., Deng, Z. and Yan, A. **2014**. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453: 254-267.

Sundheim, G., Hagtvedt, T. and Dainty, R. **1992**. Resistance of meat associated staphylococci to a quaternary ammonium compound. *Food Microbiology*, 9: 191-167.

Sutton, L. and Jacoby, G.A. **1978**. Plasmid-determined resistance to hexachlorophene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 13: 634-636.

Taglicht, D., Padan, E., Oppenheim, A.B. and Schuldiner, S. **1987**. An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 169: 885-887.

Takase, I., Omori, T. and Minoda, Y. **1986**. Microbial degradation products from biphenyl-related compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*, 50: 681-686.

Tanaka, T., Murayama, S., Tuda, N., Nishiyama, M., Nakagawa, K., Matsuo, Y., Isohama, Y. and Kido, Y. **2005**. Microbial degradation of disinfectants. A new chlorhexidine degradation intermediate (CHDI), CHDI-C, produced by *Pseudomonas* sp. strain no. A-3. *Journal of Health Science*, 51: 357-361.

Tandukar, M., Oh, S., Tezel, U., Konstantinidis, K.T. and Pavlostathis, S.G. **2013**. Long-term exposure to benzalkonium chloride disinfectants results in change of microbial community structure and increased antimicrobial resistance. *Environmental Science and Technology*, 47: 9730-9738.

Taormina, P.J. and Beuchat, I.R. **2001**. Survival and heat resistance of *Listeria monocytogenes* after exposure to alkali and chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2555–2563.

Tattawasart, U., Maillard, J.-Y., Furr, J.R. and Russell, A.D. **1999**. Development of resistance to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride in *Pseudomonas stutzeri* and changes in antibiotic susceptibility. *Journal of Hospital Infection*, 42: 219-229.

Tattawasart, U., Maillard, J.-Y., Furr, J.R. and Russell, A.D. **2000**. Outer membrane changes in *Pseudomonas* to chlorhexidine diacetate and cetylpyridinium chloride. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16: 233–238.

Tezel, U. and Pavlostathis, S.G. **2012**. Role of quaternary ammonium compounds on antimicrobial resistance in the environment. In *Antimicrobial Resistance in the Environment*. P.L. Keen and M.H.M.M. Montforts (Eds.), John Wiley and Sons, New Jersey (USA).

Tezel, U. and Pavlostathis, S.G. **2015**. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. *Current Opinion in Biotechnology*, 33: 296-304.

Thomas, L., Maillard, J.-Y., Lambert, R.J.W. and Russell, A.D. **2000**. Development of resistance to chlorhexidine diacetate in *Pseudomonas aeruginosa* and the effect of a “residual” concentration. *Journal of Hospital Infection*, 46: 297-303.

Thorrold, C.A., Letsoalo, M.E., Dusé, A.G. and Marais, E. **2007**. Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 315-320.

Tkachenko, O., Shepard, J., Aris, V.M., Joy, A., Bello, A., Londono, I., Marku, J., Soteropoulos, P. and Peteroy-Kelly, M.A. **2007**. A triclosan–ciprofloxacin cross- resistant

mutant strain of *Staphylococcus aureus* displays an alteration in the expression of several cell membrane structural and functional genes. *Research in Microbiology*, 158: 651–658.

To, M.S., Favrin, S., Romanova, N. and Griffiths, M.W. **2002**. Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 5258–5264.

Uyeda, M., Suzuki, K., Yokomizo, K., Kawata, H., Shiosaki, T., Watanabe, K., Mori, Y. and Kido, Y. **1997**. Formation of a chlorhexidine degradation intermediate through pyruvate incorporation by *Pseudomonas* sp. no. A-3. *Biocontrol Science*, 2: 35-38.

Vaara, M. **1992**. Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56: 395–411.

Vahaboglu, H., Öztürk, R., Aygün, G., Coşkun, F., Yaman, A., Kaygusuz, A., Leblebicioglu, H., Balik, I., Aydin, K. and Otkun, M. **1997**. Widespread detection of per-1-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases among nosocomial *Acinetobacter* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Turkey: A nationwide multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 2265-2269.

Valkova, N., Lépine, F., Valeanu, L., Dupont, M., Labrie, L., Bisailon, J.-G., Beaudet, R., Shareck, H. and Villemur, R. **2001**. Hydrolysis of 4-hydroxybenzoic acid esters (parabens) and their aerobic transformation into phenol by the resistant *Enterobacter cloacae* strain EM. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2404-2409.

Villalain, J., Mateo, C. R., Aranda, F. J., Shapiro, S. and Micol, V. **2001**. Membranotropic effects of the antibacterial agent triclosan. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 390: 128–136.

Wales, A.D. and Davies, R.H. **2015**. Co-selection of resistance to antibiotics, biocides and heavy metals, and its relevance to foodborne pathogens. *Antibiotics*, 4: 567-604.

Walther-Rasmussen, J. and Høiby, N. **2006**. OXA-type carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57: 373-383.

Wannaprasat, W., Padungtod, P. and Chuanchuen, R. **2011**. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37: 457–461.

Wassenaar, T. M., Ussery, D., Nielsen, L. N. and Ingmer H. **2015**. Review and phylogenetic analysis of *qac* genes that reduce susceptibility to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus species*. *European Journal of Microbiology and Immunology (Bp)*, 5: 44–61.

Webber, M.A., Coldham, N.G., Woodward, M.J. and Piddock, L.J.V. **2008**. Proteomic analysis of triclosan resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62: 92-97.

White, D.G., Goldman, J.D., Demple, B. and Levy, S.B. **1997**. Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179: 6122-6126.

Whitehead, R.N., Overton, T.W., Kemp, C.L. and Webber, M.A. **2011**. Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to high level biocide challenge can select multidrug resistant mutants in a single step. *PLoS One*, 6: e22833.

Wu, S., Piscitelli, C., de Lencastre, H. and Tomasz, A. **1996**. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA* from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microbial Drug Resistance*, 2: 435-441.

Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K. and Tenover, F.C. **2001**. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45: 1151-1161.

Zeller, V., Janoir, C., Kitzis, M.D., Gutmann, L. and Moreau, N.J. **1997**. Active efflux as a mechanism of resistance to ciprofloxacin in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 1973-1978.

Zemke, A.C., Gladwin, M.T. and Bomberger, J.M. **2015**. Sodium Nitrite blocks the activity of aminoglycosides against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59: 3329–3334.

Zhang, C., Cui, F., Zeng, G.M., Jiang, M., Yang, Z.Z., Yu, Z.G., Zhu, M.Y. and Shen, L.Q. **2015**. Quaternary ammonium compounds (QACs): A review on occurrence, fate and toxicity in the environment. *Science of the Total Environment*, 518–519: 352–362.

## **ANEXO NORMATIVAS ALIMENTOS ECOLÓGICOS Y BIOCIDAS**

Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de febrero de **1998**, relativa a la comercialización de biocidas.

Orden, de 4 de octubre de **1989**, por la que se aprueba el Reglamento de la Denominación Genérica «Agricultura Ecológica» y su Consejo Regulador.

Real Decreto 3349/1983, de 30 de noviembre de **1983**, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas.

Real Decreto 162/1991, de 8 de febrero de **1991**, por el que se modifica la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Fabricación, Comercialización y Utilización de los Plaguicidas.

Real Decreto 1852/1993, de 22 de octubre de **1993**, sobre producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios.

Real Decreto 443/1994, de 11 de marzo de **1994**, por el que se modifica la reglamentación técnico-sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de los plaguicidas.

Real Decreto 1054/2002, de 11 octubre de **2002**, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas.

Reglamento (CEE) N° 2092/1991 del Consejo, de 24 de junio de **1991**, sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios.

Reglamento (CE) N° 1804/1999 del Consejo, de 19 de julio de **1999**, por el que se completa, para incluir las producciones animales, el Reglamento (CEE) n° 2092/91 sobre la producción agrícola ecológica y su indicación en los productos agrarios y alimenticios.

Reglamento (CE) N° 1896/2000 de la Comisión, de 7 de septiembre de **2000**, relativo a la primera fase del programa contemplado en el apartado 2 del artículo 16 de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre biocidas.

Reglamento (CE) N° 2032/2003 de la Comisión, de 4 de noviembre de **2003**, relativo a la segunda fase del programa de trabajo de diez años contemplado en el apartado 2 del artículo 16 de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la comercialización de biocidas y por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 1896/2000.

Reglamento (CE) N° 1048/2005 de la Comisión, de 13 de junio de **2005**, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2032/2003 relativo a la segunda fase del programa de trabajo de diez años contemplado en el artículo 16, apartado 2, de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la comercialización de biocidas.

Reglamento (CE) N° 1849/2006 de la Comisión, de 14 de diciembre de **2006**, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 2032/2003 relativo a la segunda fase del programa de trabajo de diez años contemplado en el artículo 16, apartado 2, de la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a la comercialización de biocidas.

Reglamento (CE) N° 834/2007 del Consejo de 28 de junio de **2007** sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos y por el que se deroga el reglamento (CEE) N° 2092/91.

Reglamento (CE) 889/2008 de la Comisión de 5 de septiembre de **2008** por el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos, con respecto a la producción ecológica, su etiquetado y control.

Reglamento (CE) 1235/2008 de la Comisión de 8 de diciembre de **2008** por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) 834/2007 del Consejo en lo referente a las importaciones de productos ecológicos procedentes de terceros países.

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.

