

COMPARACIÓN DE MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE EFECTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN PELÍCULAS PLÁSTICAS

Cancela E¹, Matos L¹, Fiszman G¹, Eisenberg P², Blanco Massani M^{2*}

(1) INTI Biotecnología Industrial (2) INTI Plásticos,

*blanco@inti.gov.ar

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

Mientras la investigación avanza en el campo de los materiales activos, muchos polímeros con actividad antimicrobiana muestran aplicaciones comerciales promisorias; sin embargo, la metodología para evaluar su efectividad es muy variada, resultando difícil llevar a cabo análisis comparativos unificados. Si bien existen métodos cuantitativos normalizados, su aplicación en la determinación de la actividad antimicrobiana resulta compleja cuando se requieren ensayar muchas películas simultáneamente. En contraste, los métodos semi-cuantitativos más sencillos ofrecen resultados subjetivos.

En este trabajo se analizaron dos estrategias metodológicas con el fin de determinar la actividad antimicrobiana en plásticos. Para ello, se evaluaron películas plásticas antimicrobianas utilizando un método de difusión y uno de recuento en placa (adaptación de la norma ASTM E2149).

DESCRIPCIÓN

Muestras plásticas

Se ensayaron dos películas de polietileno, la película P, adicionada con un agente biocida (mineral de silicio modificado con ión plata (Ag⁺)) y la película L (un control sin actividad antimicrobiana). En ambos casos las muestras se procesaron cortando discos de un diámetro de 0,5 mm. Todas las muestras fueron esterilizadas de ambos lados con luz UV (15' cada lado) (Philips germicida 15W) y se mantuvieron en condiciones estériles hasta el momento de su uso.

Microorganismos

-*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) como representante del grupo de las bacterias Gram positivas.

-*Escherichia coli* (ATCC 25922) como representante del grupo de las bacterias Gram negativas.

Evaluación de la actividad antimicrobiana en plásticos

Método cualitativo. Se utilizó el método de difusión en agar [1]. Se sembraron placas de medio mínimo Luria Bertani (LB) (Britania) agar semisólido con 100 µl de cultivos *overnight* de los microorganismos previamente mencionados. Sobre la superficie de las placas se colocaron los discos correspondientes a cada una de las muestras a evaluar. Se incluyó un disco (C) impregnado con cloranfenicol (50 µg/disco) como control positivo de inhibición.

Luego de incubar las placas durante 20 h a 36 ± 2 °C en estufa se evaluó la aparición de halos de inhibición del crecimiento bacteriano.

El ensayo fue realizado en dos experimentos independientes por triplicado.

Método cuantitativo. El procedimiento utilizado se basó en la norma ASTM E2149 [2] con algunas modificaciones. *S. aureus* ATCC 25923 y *E. coli* ATCC 25922 se cultivaron por separado (18 hs a 28°C) y se formularon inóculos iniciales de 10⁵ unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) en solución fisiológica. El inóculo inicial de cada microorganismo fue incubado a temperatura ambiente y en agitación con 5 discos de cada una de las muestras plásticas (P y L), manteniendo la relación área de muestra/inóculo (25.8 cm²/10⁵ UFC/ml) referenciada en la norma ASTM E2149. Luego de 1 hora de incubación se realizaron los plaques para llevar a cabo el recuento de colonias correspondiente a la muestra activa (P) y el control sin agente biocida (L). Los resultados se compararon e informaron como reducción del crecimiento de las variables transformadas logarítmicamente.

Tratamiento estadístico.

Los valores de recuento se informaron como log₁₀ ± la incertidumbre asociada al método de recuento de colonias. El cálculo de incertidumbre se llevó a cabo sobre las variables transformadas logarítmicamente (log₁₀ UFC/ml) según la ecuación 1

$$(1) U = 2S_R$$

Siendo S_R la desviación de reproducibilidad obtenida como el promedio de las diferencias cuadráticas de resultados entre series de placas inoculadas en condiciones de reproducibilidad [3]. La incertidumbre expandida para cada microorganismo resulta:

$$U (S. aureus) = 0,28 \log_{10} \text{ UFC/ml}$$

$$U (E. coli) = 0.21 \log_{10} \text{ UFC/ml}$$

La comparación entre pares se realizó por la prueba T, utilizando el Software libre para análisis estadístico PaSt [4]

RESULTADOS

Los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana en plástico utilizando el método cualitativo se muestran en la Figura 1. Se observó la presencia de áreas oscuras (sin crecimiento) en las placas sembradas con *S. aureus* ATCC 25923 tanto para el disco C conteniendo cloranfenicol como para la película

P (Fig. 1a), mientras que no se observó inhibición debida a la película L (sin antimicrobiano). Ninguna de las películas plásticas ensayadas presentó inhibición frente a *E. coli* ATCC 25922, obteniéndose actividad antimicrobiana solo para el control con cloranfenicol (Fig. 1b).

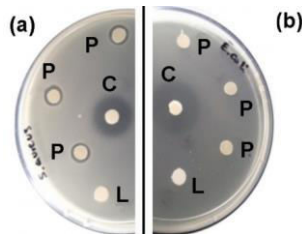


Figura 1. Evaluación de la actividad antimicrobiana por el método cualitativo frente a (a) *S. aureus* ATCC 25923 (b) *E. coli* ATCC 25922. C: disco con Cloranfenicol (50 µg/disco); L: película plástica; P: película plástica con agente biocida.

Los métodos de determinación de actividad antimicrobiana a través de la evaluación de zonas de inhibición involucran la difusión del agente antimicrobiano en el medio de cultivo a partir de un sustrato, y la inhibición del crecimiento por la presencia del antimicrobiano en una concentración que excede la concentración mínima inhibitoria (CIM) para ese antimicrobiano frente al microorganismo sensible [5]. Los resultados obtenidos por el método de difusión en agar sugieren que el agente antimicrobiano presente en el plástico activo (P) se encontraría por debajo de la CIM necesaria para inhibir el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922, resultando sólo efectivo frente a *S. aureus* ATCC 25923.

El método cuantitativo basado en la norma ASTM E2149 permitió cuantificar la viabilidad de los microorganismos luego de estar en contacto con las películas plásticas. Para el recuento de *S. aureus* ATCC 25923 se observaron diferencias significativas ($P < 0,05$) cuando la bacteria se incubó en presencia de la película activa (P) respecto al control sin agente biocida (L), obteniéndose una reducción del crecimiento de 3,19 unidades logarítmicas (Tabla 1). Para *E. coli* ATCC 25922, en cambio, no se observaron diferencias significativas ($P \geq 0,05$) en el recuento obtenido en presencia de la película activa y el control sin agente biocida (Tabla 1).

Tabla 1. Recuento de microorganismos luego de ser incubados en presencia de las películas plásticas.

Microorganismo sensible	Recuento bacteriano (\log_{10} UFC/ml)	
	Película P	Película L
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	$3.19 \pm 0,28^a$.*
<i>E. coli</i> ATCC 25922	3.82 ± 0.21^b	3.90 ± 0.21^b

* Recuento menor que 30 UFC/ml

^{a-b} letras diferentes indican diferencias significativas entre valores ($P < 0,05$)

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos mediante el método cualitativo, confirmando que la cantidad de biocida presente en el plástico resultaría eficiente para la inhibición de *S. aureus* e insuficiente para inhibir el crecimiento de *E. coli*. La diferencia en la susceptibilidad al agente activo podría estar relacionada con la estructura diferencial entre la pared celular de Gram negativas respecto a las Gram positivas. El método cuantitativo además, podría utilizarse para determinar el efecto del tiempo de exposición del microorganismo al agente antimicrobiano presente en el plástico. Asimismo, dado que el método cuantitativo permitió evaluar la reducción en la viabilidad de los microorganismos expuestos al agente antimicrobiano, consideramos a éste como el método más apropiado para la evaluación de efectividad de matrices plásticas aditivadas con agentes biocidas.

Por otro lado, el método cualitativo permitió evaluar de forma rápida y sencilla la presencia o ausencia de actividad biocida en un plástico por la presencia o ausencia de inhibición del crecimiento del microorganismo sensible, esto permitiría utilizar el método para controles de calidad de plásticos activos rápidos.

Conclusión

El presente trabajo permitió poner a punto un método cualitativo y uno cuantitativo para determinar la actividad antimicrobiana en plásticos. El análisis de los resultados mostró que ambos métodos aportan información complementaria. Mientras el método de difusión en agar resultó ser más sencillo que la adaptación de la norma ASTM, este último permitió calcular la reducción del crecimiento de los microorganismos sensibles. A partir de los resultados evaluados concluimos que el método de difusión (cualitativo) podría ser utilizado para la evaluación rápida (y a bajo costo) de múltiples películas (empleado usualmente para la determinación de la CIM); mientras que el método de recuento (cuantitativo) permitiría cuantificar el efecto antimicrobiano específico, siendo más apropiado para la evaluación de efectividad de polímeros aditivados con agentes biocidas.

Asimismo, destacamos la participación del INTI en el desarrollo de técnicas cuyo objetivo principal es dar respaldo científico-tecnológico a las innovaciones industriales de la región.

REFERENCIAS

1. Blanco Massani, y col. (2008) *Food addit contam* **25**, 1424–1430
2. ATMS E2149-10 ASTM *International standard* (2010).
3. ISO/TS 19036
4. Hammer y col (2001). *Palaeontologia Electronica* 4 9.
5. Green y col (2011). *Biointerphases* 6 13.
6. Cowan y col (2003) *J Ind Microbiol Biotechnol* 30 10.