



Evaluación del crecimiento bacteriano sobre varios metales

Dipl.-Ing. Eckhard Voß
Wendel GmbH, Am Güterbahnhof 30,
35683 Dillenburg, Alemania

Dipl.-Ing. Christian Störch
Waldstraße 28,
35745 Herborn, Alemania

Documento presentado en el 20º Congreso Internacional de Esmaltes en Estambul

Palabras clave: microorganismos, bacterias, gérmenes, bio-película, esmalte, plásticos, acero inoxidable, cerámicas, materiales de desinfección, nano-recubrimiento, *Legionella*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Pseudomonas*.

Introducción

En esta ponencia, se presenta el impacto que tienen los esmaltes con contenido de plata sobre los índices de supervivencia bacteriana. Además, se compara la influencia de los esmaltes con contenido de plata con las características análogas del acero inoxidable, las cerámicas, y los materiales termoplásticos. Además, se ha evaluado el impacto del nano-recubrimiento (*Crystal Guard* producido por la empresa Chemetal) sobre el esmalte. Estos materiales se utilizan principalmente para sumideros en residencias privadas y en edificios públicos. El esmalte se aplica también con frecuencia en calentadores de agua caliente usados para el calentamiento del abastecimiento de agua potable. La inhibición del crecimiento bacteriano puede ser una gran ventaja, especialmente en esta área de aplicación. A pesar de que el agua suministrada en la red de suministro de agua potable generalmente no está contaminada por ningún microorganismo dañino, se puede producir un incremento de la cantidad de organismos a causa del agua que permanece en las tuberías y los calentadores durante un largo periodo de tiempo.

Si permanece agua en las tuberías y calentadores de estos sistemas, los microorganismos construyen una bio-película en la cual pueden ser capaces de resistir las acciones de los agentes de desinfección utilizados comúnmente. Para nuestros experimentos, se usaron como indicadores dos bacterias indicadoras - *Enterococcus faecium* y *Escherichia coli* - y un típico germen de vida acuática - *Pseudomonas aeruginosa* -.

Reducción de los gérmenes:

Básicamente, los métodos están clasificados de acuerdo con el grado de impacto negativo sobre los microorganismos. Si un método se considera apto para obtener la destrucción total de todos los microorganismos, el método se designa como "esterilización."



Un ión desinfectante es un método que produce una reducción del número de gérmenes hasta un nivel en el que ya no es capaz de provocar infecciones en los humanos. Además, diferenciamos entre los métodos que muestran una acción bactericida, que significa que las bacterias son efectivamente destruidas, y aquellos que son bacteriostáticos. En estos últimos casos, se inhibe “meramente” la proliferación bacteriana. El último tipo de métodos se usa principalmente para la conservación en la tecnología alimenticia y en la industria cosmética [15].

La eficacia de un método viene indicada con la abreviación “RF”. Esta indicación se refiere al número de niveles logarítmicos en los que se ha reducido el número de microorganismos en comparación con su concentración inicial. [7, 32] Los procesos de limpieza pueden resultar en una disminución de 0.4 a 1 RF. [7]. En algunos casos, este tipo de procesos de limpieza resulta ser bastante adecuado para obtener un conjunto de objetivos. Antes de aplicar un proceso de desinfección o un proceso de esterilización, se prescriben, en todos los casos, unos simples procesos de limpieza. [14]

Las influencias físicas pueden ser perjudiciales para los microorganismos hasta el punto que ya nos son capaces de reproducirse o simplemente se mueren.

Entre los diferentes procesos térmicos se conocen bien: la aplicación de calor seco en un armario de aire caliente o la aplicación de calor a presión en un autoclave. Estos procesos son altamente eficaces, y la cantidad en que se reduce el número de gérmenes es lo suficientemente alta como para considerar estos métodos como comparables a la esterilización. Si los procesos de desinfección satisfacen los requerimientos, el producto se hierve o se somete a vapor de agua a 100 grados Centígrados. En relación con los materiales de alimentación, normalmente se aplica un método denominado “Pasteurización”. Dependiendo de qué variación de este método se utiliza, los alimentos se someten a temperaturas de entre 62 y 150 grados Centígrados durante periodos de tiempo variables. Este método se trata realmente de un compromiso entre la necesidad de eliminar las bacterias y el requerimiento de retener las características originales de los materiales de alimentación que se van de tratar.

Otro método consiste en la eliminación de microorganismos sometiéndolos a radiaciones de alta energía. Esto puede lograrse con la Radiación UV de una lámpara especial o por medio de la aplicación de radiación ionizada proveniente de sustancias radioactivas.

Recientemente se han utilizado también microondas, especialmente para la descontaminación de materiales de deshecho. [7]

Por otro lado, existen varios procesos de desinfección química. En este grupo, se pueden usar oxidantes como el Ozono, el permanganato de potasio, y el peróxido de hidrógeno. Estos productos químicos actúan a través de la oxidación de las enzimas estructurales y de las enzimas, y por lo tanto son tóxicas para las células.



Especialmente los Grupos-SH de las proteínas de las encimas se desnaturalizan por medio de la oxidación, y después de esto, ya no están disponibles para el metabolismo de la célula. [7]

Otro grupo importante de oxidantes consiste en el Cloro y en otros halógenos. Y otro grupo más esta compuesto de hidróxido de Potasio y de hidróxido de sodio. Estos dos productos químicos actúan como agentes de desinfección, por lo que el grupo OH es el componente activo de las moléculas.

Con la finalidad de desinfectar superficies e instrumentos se pueden usar aldehídos. Los alcoholes, en cambio, se aplican cuando se desinfectan las áreas cutáneas y otras superficies. [4,7]

Plata

La utilización de la Plata contra las enfermedades y para la conservación de agua potable no es nada nuevo. El uso de la plata posee una tradición de alrededor de 2500 años. Es sabido que el Rey persa Ciro transportaba su suministro de agua potable hervida en contenedores de plata para evitar que se pusiese mala. En Europa, hace unos 100 años, se comenzó el tratamiento bacteriológico del agua con plata. Sin embargo, el método es muy caro y por esta razón ya no se usa más en las mayores plantas purificadoras de agua. [15, 24]. Hoy en día, únicamente se añade plata al agua cuando se viaja por zonas tropicales o para la conservación de agua potable en contenedores de trenes o en barcos. [4, 5,15]. Además, se han desarrollado métodos para combinar la acción rápida del cloro con las capacidades de conservación de la plata.

Las propiedades bactericidas de la plata se denominan oligodinámicas. Este término indica que la plata es activa incluso en muy bajas concentraciones. [4, 5, 15, 17] La inhibición o la destrucción de los microorganismos tiene su origen en la formación de iones libres que son absorbidos en la superficie de la célula y reaccionan con los grupos de encimas y proteínas SH. Como resultado de ello, las proteínas son destruidas. [10, 14] Se impide el metabolismo debido a la perturbación de la acción enzimática, y puede producirse un daño irreversible en los gérmenes.

Feng *et al.* [21] han mostrado de forma impresionante que la plata tiene otro efecto más sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Los iones de plata provocan que se suelte la membrana entre el citoplasma y la pared de la célula de éste último orgánulo, resultando en un hueco claro y visible entre los dos orgánulos. El centro de la célula se convierte casi en transparente y el conjunto del ADN se hace visible. La célula bacteriana obviamente agrupa apretadamente su material genético. En esta fase, las propiedades reproductivas de la bacteria ya no están presentes. La plata no es el único material que se ha descubierto que posea esta capacidad. Se ha descubierto que el cobre, el mercurio, y el cadmio poseen propiedades similares. Estos tres últimos elementos, sin embargo, poseen al menos dos grandes desventajas.



Primero, son tóxicos para los seres humanos, y segundo, no son tan efectivos como la plata en cuanto a lo que se refiere a sus propiedades antibacterianas. [15] Por otro lado, los iones de plata, en concentraciones que se aplican para finalidades antibacterianas, no han presentado hasta la fecha ningún efecto dañino conocido sobre la salud humana. [15, 24,26]

En comparación con el cloro, la plata tiene la ventaja de que no cambia el olor o el sabor del agua. Además, no reacciona con el agua, y por lo tanto no da lugar a ningunas sales que podrían tener un posible efecto perjudicial para la salud humana. [15]

Se puede añadir plata a los intercambiadores de iones o a los materiales de los filtros, para su uso en los procesos del tratamiento del agua. Esto ha sido la práctica, por ejemplo, en los procesos que usan filtros Katadyn®. [15, 17]

Además de lo que se ha dicho anteriormente, es posible producir iones libres de plata por medio de una fuente de tensión. Para esta finalidad se conecta un electrodo de plata a una fuente de tensión, y el resultado es que los iones de plata se liberan en el agua. Este proceso se usa principalmente para luchar contra la *Legionella*, un tipo de bacteria que prolifera libremente en el agua en las partes de las redes de distribución de agua que no han sido calentadas adecuadamente. [15]

La eficacia de la plata se controla a través de los siguientes factores, algunos de los cuales indican la posible necesidad de realizar un tratamiento inicial del suministro de agua.

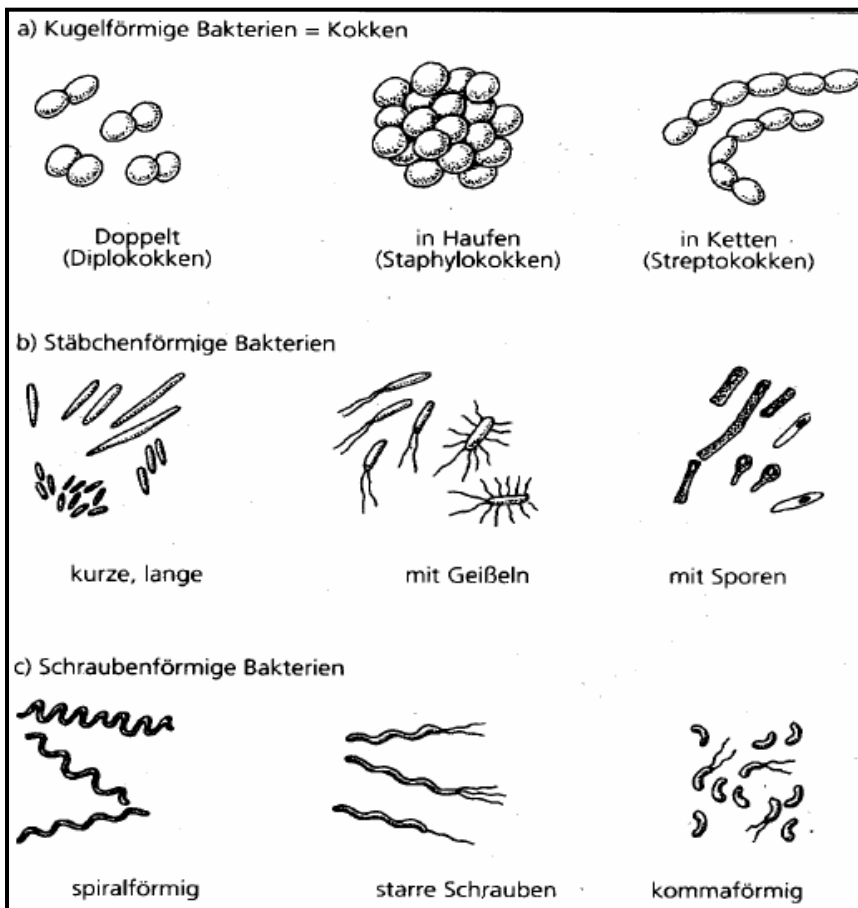
Es muy importante la concentración inicial de microorganismos, ya que cada una de las bacterias enlaza la plata, que entonces deja de estar disponible. Además, otras sustancias orgánicas, como los carbohidratos, las proteínas, y la urea también enlazan la plata. Por lo tanto, la presencia de estas moléculas reduce la concentración libre de la plata disponible para finalidades de desinfección.

La actividad de la plata depende de la temperatura, siendo similar a otros procesos químicos. Con una temperatura superior se aumenta la eficacia de los iones de plata. Por otro lado, la efectividad de la plata se ve impedida por la contaminación orgánica del agua. La cantidad de iones libres disponibles depende de la solubilidad de la sal de plata que se utiliza. Cuando se utiliza un cloruro de plata se puede obtener una concentración de 1200 µg/l. Por otro lado, el carbonato de plata logra una concentración de tan solo 500 µg/l. [15] Un incremento del contenido de sal también puede influir adversamente sobre la solubilidad, por lo tanto la aplicación se reduce al agua con un bajo contenido de sales y/o cargas orgánicas. [15] Las sales de sustancias diferentes a la plata también reducen la eficacia de esta última. Por esta razón, la aplicación de plata es útil únicamente para el tratamiento de agua con un bajo contenido de sal y una mínima polución orgánica. [15]



Microbiología general

Las bacterias son organismos unicelulares. Tienen un tamaño de 0,5-5 μm . Las bacterias pertenecen a los Procariotes. Estos son organismos que no tienen un núcleo real que esté separado de los demás contenidos de la célula por una membrana. En su lugar tienen lo que se llama un nucleoide. Este nucleoide se encuentra libre dentro del citoplasma y contiene la información genética. Varios orgánulos que se encuentran en las células de organismos superiores, como los seres humanos, no están presentes en las células bacterianas. Les faltan, por ejemplo, las mitocondrias. Así mismo, los ribosomas bacterianos son menores que los de los organismos eucarióticos (organismos con un núcleo real). Los ribosomas son fábricas de proteínas. Las mitocondrias son las centrales de energía de las células eucarióticas. En la mitocondria se transforma la energía de los alimentos en el portador de energía ATP.



Formas morfológicas básicas de las bacterias y su posición unas respecto de otras, de: Steuer et al., Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung [Guide to disinfection, sterilization, and disinfestations] Gustav Fischer Publishing house, Stuttgart 1998.

a) bacterias esféricas =cocos, en pares, (Diplococos), en grupos apretados (estafilococos), en cadenas (estreptococos), b) bacterias con forma de barra, de formas cortas o largas, con flagelos, con esporas, c) bacterias en espiral, con forma de espiral, forma de rosca, o forma de coma.

Figura 1.: Formas morfológicas básicas de las bacterias y su posición unas respecto de otras.

Morfología

Las células bacterianas tienen varias formas. Algunas son esféricas, en cuyo caso la bacteria se denomina coco. Algunas Bacterias tienen células con forma de barra, en cuyo caso se habla de bacilos. Algunas bacterias tienen forma de espiral. Se refiere a estos como espiroquetas.



Las bacterias con células en forma de coma se denominan simplemente bacterias en coma. Los micoplasmas se diferencian de las bacterias únicamente por la falta de una pared celular rígida. Existen únicamente como organismos intercelulares.

Las bacterias esféricas pueden darse en grupos apretados. En este caso se refiere a ellas como estafilococos. Los estreptococos, por otro lado, son bacterias esféricas que se dan en cadenas. Los cocos que vienen en pares se llaman diplococos, si viene en claros grupos de cuatro se refiere a ellos como tetracocos.

Las bacterias pueden clasificarse básicamente como Gram-positivas o Gram-negativas. Esta técnica de diferenciación se basa en una técnica de coloración desarrollada por el científico danés Hans Christian Gram en el año 1884.

En el caso de las bacterias que son Gram-positivas, la coloración inicial (violeta cristalino) no puede quitarse con el descolorante (mezcla de Acetona-Alcohol), y la coloración secundaria (normalmente safranina) no tiene efecto. La pared de la célula bacteriana permanece de color violeta oscuro. Las bacterias que son Gram-negativas, por otro lado, no retienen el color violeta cristalino y sí absorben el color rojo de la coloración secundaria. [1, 2, 9, 10, 12]

Las diferentes especies de bacterias se han adaptado a varias condiciones de temperatura que están definidas. Si las bacterias muestran una preferencia por las temperaturas de entre 30 y 40 grados Centígrados, se las considera que pertenecen a las especies mesófilas. Si, por el contrario, el germen prefiere las temperaturas de entre 0 y 20 grados centígrados, se le considera como psicrófilo. Las bacterias termófilas se desarrollan a temperaturas de entre 50 y 70 grados centígrados, existiendo ciertas especies que toleran temperaturas tan elevadas como los 100 grados centígrados.

Las bacterias también pueden clasificarse de acuerdo con la acidez de su medio. Muchas bacterias prefieren un medio neutral; algunas pocas especies especializadas toleran algún ácido o bien un medio alcalino. La mayoría de las especies que viven libremente necesitan agua para su metabolismo, y la concentración de sales en el agua debería estar cercana al valor fisiológico de 0.9 %. [1, 10]

Microorganismos en conexión con el agua potable

Los patógenos (bacterias que producen enfermedades) pueden ser liberados en nuestro medioambiente, a través de las secreciones de los humanos y los animales. Dependiendo de su grado de resistencia, sobreviven en mayor o menor medida a las influencias de la acidez (pH) del medio que los rodea, a las temperaturas imperantes, y a la radiación UV. [7] Si el suelo no tiene una eficacia alta en su acción filtrante, los gérmenes pueden penetrar hasta el nivel del agua subterránea. Si esto ocurre, las bacterias pueden fácilmente acabar en nuestras plantas de tratamiento del agua potable.



El agua que está micro-biológicamente contaminada puede conllevar potencialmente una serie de enfermedades graves y potencialmente mortales, como el cólera y la fiebre tifoidea. De este modo también, la *Escherichia coli*, una bacteria necesariamente presente en nuestros intestinos, puede causar una serie de condiciones potencialmente peligrosas. [11, 18]

De acuerdo con las leyes y regulaciones que controlan la calidad de nuestra agua potable, que de hecho es nuestro alimento nº 1, estipulan que no puede contener ninguna cantidad de bacterias que puedan ser perjudiciales para la salud humana. Siempre y cuando la cantidad de bacterias en nuestra agua sea inferior a 100 KBE/ml, se asume que las cualidades físicas del agua no constituyen ningún riesgo para la salud. La humanidad debería estar en deuda con Robert Koch por este descubrimiento, el bacteriólogo alemán que llevó a cabo los experimentos pertinentes con agua potable hace ya un siglo. [5, 6]

Ya que una búsqueda de patógenos es demasiado complicada y muy cara, este estudio se limita a las bacterias que muestran un patrón de distribución similar al de los patógenos, pero que son mucho más fáciles de cultivar. Por esta razón, las siguientes bacterias fueron usadas como indicadores de polución fecal: *Escherichia coli*, bacterias coliformes, y enterococos. El criterio del examen fue que se probó que estas bacterias no estaban presentes en 100 ml de la muestra. [18].

Bio-películas

Hoy en día, generalmente es aceptado el hecho de que muy pocas bacterias que viven en el agua existen como individuos singulares. En general se unen para formar lo que se viene a llamar una "Bio-película." [18, 29, 30]

Este tipo de "unión" en un conglomerado les otorga muchas ventajas a las bacterias. A través de la producción de sustancias de polímeros extra-celulares, la bacteria puede refugiarse de la eficacia de los antibióticos y los desinfectantes. Otros agentes eficaces pueden resultar ser ineficaces bajo estas circunstancias. Esto explica, por ejemplo, por qué entre 1993/1994 se murieron aproximadamente cien personas después de suministrarles un producto químico de inhalación que estaba contaminado con *Pseudomonas aeruginosa*. [29, 30]

Un estudio reveló que en un lapso de tiempo de 10 minutos, una concentración de 2 mg/l de cloro es capaz de reducir el número inicial de células bacterianas que viven libremente en un factor de 3 pasos logarítmicos. Sin embargo, el número de bacterias en la bio-película permanecía casi sin cambios cuando se evaluó después de una hora de tratamiento con cloro. [3]

Las células que están fijadas en el interior del material pueden sobrevivir largos periodos de sequía. De esta manera se hace posible el asentamiento en otros lugares.



Materiales y métodos

Bacterias utilizadas en este estudio

Escherichia coli

Escherichia coli se clasifica como una bacteria Gram-negativa. Este organismo posee flagelación peritrica. Por ello puede moverse activamente. *Escherichia coli* es un componente normal y parte de la flora intestinal fisiológica de los humanos y otros animales de sangre caliente, y se excreta con las heces. Ya que este germen muestra una baja presencia natural en el agua, y demuestra ser fácil de cultivar *in vitro*, se ha usado como indicador de la polución fecal del agua en varios análisis de agua potable. *Escherichia coli* es un patógeno facultativo y puede causar infecciones al entrar en contacto con zonas susceptibles del cuerpo, como los tractos urinarios-genitales. Si la *Escherichia coli* encuentra el camino hasta el sistema circulatorio, puede causar el envenenamiento de la sangre. En este contexto, es interesante reseñar que el 15% de las infecciones adquiridas en hospitales (nosocomiales) están causadas por *Escherichia coli*. [9, 10, 12]

Además de las formas patógenas facultativas y no-patógenas, algunas cepas de *Escherichia coli* son patógenos intestinales. La ingestión de estas formas puede causar diarrea. En muchos casos son la causa de las diarreas provocadas al viajar, conocidas también como “la Venganza de Moctezuma”.

Enterococcus faecium

Enterococcus faecium pertenece a los cocos Gram-positivos. Aparecen en forma de cadenas en espiral. Estas bacterias pertenecen a la flora normal del intestino grueso de los humanos. Sin embargo, si estos organismos consiguen alcanzar otras partes del cuerpo humano, pueden causar infecciones graves y potencialmente peligrosas.

Este germen patógeno es responsable de varias enfermedades como las infecciones en heridas, infecciones del tracto urinario-genital, y la Endocarditis, una condición en la cual las bacterias atacan las válvulas del corazón. *Enterococcus faecium* se encuentra en segunda posición detrás de *Escherichia coli* respecto a las causas de las infecciones del tracto urinario genital. [9, 10, 12, 18]

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa pertenece a las bacterias Gram-negativas. Causa el pus color turquesa y es temida entre las infecciones adquiridas en hospitales (nosocomiales). En los EE.UU., el 11% de todas las infecciones nosocomiales son causadas por este patógeno. El germen está vinculado al porcentaje mayor de infecciones bacterianas letales. [18]

Esta bacteria con forma de barra tiene un tamaño de 2 a 4 μm y tiene una flagelación polar. También son ciliados. *Pseudomonas aeruginosa* puede adherirse a las superficies con la ayuda de los cilios. Estos organismos se dan singularmente, en pares, o en cadenas cortas.



Es un patógeno humano y es capaz de producir compuestos de polímeros extra-celulares, que juegan un importante papel en la generación de bio-películas. Las bacterias del genero *Pseudomonas* prefieren condiciones medioambientales aeróbicas y temperaturas de entre 20-30 grados Centígrados. [9, 10, 12]

Al contrario de las dos bacterias mencionadas anteriormente, este microorganismo tiene una amplia distribución en nuestro medioambiente. También puede aislarse de las muestras de agua y suelo. Puede crecer tanto sobre plantas como en los intestinos de los humanos y de los animales. [10] En los hospitales este patógeno puede transmitirse a través del uso de palanganas, humidificadores, endoscopios, equipo para respiración artificial y los tubos del mismo, utensilios de cocina, y varios equipo de limpieza más.

Vasijas de prueba



Figura 2.: Vasija de prueba con esmalte blanco con contenido de plata

Esmalte blanco con contenido de Plata

Las vasijas se crearon a partir de una plancha de acero con un grosos de 1 mm. Tienen un diámetro interior de $D_i = 73$ mm. Esto resulta en un área de la superficie inferior de 4,190 mm². Con un relleno de 20 ml, la superficie total en contacto con la suspensión bacteriana es de 5,290 mm². Las vasijas de prueba tienen una superficie esmaltada blanca.

Esmalte blanco sin plata

Las dimensiones de estas vasijas de prueba son idénticas a las descritas anteriormente. Por consiguiente, el área de contacto es también de 5,290 mm². El esmalte es el esmalte blanco que se usa comúnmente para estas inmersiones.

Esmalte blanco con contenido de plata y recubrimiento de "Crystal Guard"

Estas vasijas no se pueden diferenciar por ningún medio visual de las vasijas descritas anteriormente. Por esta razón, una ilustración adicional no parece ser lo más indicado. El esmalte blanco tiene como finalidad de uso el recubrimiento de las superficies de los sumideros.

Esmalte blanco sin plata y recubrimiento de "Crystal Guard"

Este material también se usa para el recubrimiento de superficies de sumideros. Por medios ópticos no se puede diferenciar este material del esmalte blanco descrito anteriormente.



Figura 3.: Vasija de prueba hecho de acero inoxidable ST4301.

Acero de alta gradación

Los vasijas de acero de alta gradación tienen casi las mismas dimensiones que los que se describen anteriormente, excepto por las insignificantes desviaciones causadas por la ausencia de una capa de esmalte. La designación material es: ST4301. Para este tipo de acero, las descripciones indican un contenido del 18% de cromo, el 8.9% de níquel, y el 1% de manganeso.



Figura 4.: Vasija de prueba recubierta con materiales plásticos.

Materiales plásticos

Este metal de color gris oscuro se produce y comercializa bajo el nombre "Kerrock" por un productor croata. De acuerdo con un estudio pericial realizado por la Autoridad de Comercio del Estado de Baviera, este material es adecuado para su uso en conexión con productos alimenticios. El diámetro interior es comparable a las vasijas descritas anteriormente.



Figura 5.: Vasija de prueba hecho de cerámica.

Cerámicas

Hemos seleccionado pequeñas vasijas hechas de cerámica como cuarto material básico para ser usado en este estudio. Tienen un diámetro interior comparable al de las vasijas descritas anteriormente. Las vasijas están esmaltadas con vidriado para gres.



Métodos

Preparación de las vasijas de prueba

Antes de iniciar las series de pruebas, las vasijas de prueba fueron aclaradas repetidamente con agua caliente y finalmente aclarados con agua destilada. Las vasijas hechas de acero y cerámica fueron calentadas a 180 grados centígrados durante dos horas en una incubadora de aire caliente, con el fin de asegurar la esterilidad en el momento en que se inicia la prueba. Debido a su limitada estabilidad térmica, las vasijas hechas de materiales sintéticos fueron esterilizadas en un autoclave a 121 grados centígrados y a una presión de 1 bar durante 30 minutos. Las vasijas sobrevivieron el proceso sin daños.

Con el fin de asegurar que los gérmenes transportados en el aire no pudiesen corromper los resultados del experimento, cada vasija se cubrió con un plato Petri de vidrio. Estos platos Petri se lavaron después de cada aplicación y fueron esterilizados a 180 grados Celsius. Los platos Petri se mantuvieron guardados protegidos de los gérmenes y el polvo.

Relleno de las vasijas con la suspensión de prueba

Se coge una colonia de bacterias del medio de cultivo, para obtener la misma concentración inicial para cada serie de experimentos, utilizando para ello una esponja de hilos esterilizada y se traslada al tubo de ensayo que contiene 4.5 ml de agua de dureza estándar. La suspensión se homogeniza usando para ello un aparato agitador de Vortex y, cuando se requiera, rebajado con WSH para ajustar el líquido al estándar Mc Farland deseado de 0.5. Los ajustes se usan mediante una gubia de despuntado producido por Becton Dickenson. La concentración necesaria se determinó en una serie de experimentos preliminares. Esta concentración se obtuvo a través de diluir más la suspensión por medio del WSH. Se rellena la suspensión final en una botella de vidrio con tapa de rosca. Se necesitan entre 600 y 900 ml de suspensión bacteriana, dependiendo del número de vasijas que se han de someter a prueba. Para asegurarse de que la suspensión bacteriana en cada vasija de prueba contiene la misma concentración de gérmenes, se agita concienzudamente cada vez que se retira la suspensión. Se saca la suspensión de prueba de la botella usando una pipeta estéril de 20 ml. El plato Petri que cubre la vasija de prueba se levanta ligeramente, permitiendo la inserción de la pipeta y el depósito de la suspensión de prueba. Una vez que se han rellenado las vasijas de prueba con la suspensión bacteriana, se introducen en una incubadora donde permanecen durante 24 horas a una temperatura de 20 grados centígrados.



Muestreo

Una vez que las vasijas de prueba han sido incubadas durante 24 horas bajo condiciones constantes, se retiran de la incubadora y se trasladan a una plataforma de agitación con el fin de homogeneizar la suspensión. La plataforma de agitación desplaza las vasijas con una rotación de 125 min^{-1} . Durante este proceso se puede observar en cada vasija un claro movimiento ondulante de la suspensión.

Se cubren las vasijas con láminas de celulosa durante el proceso de homogenización, con el fin de asegurar que la Radiación UV de la luz diurna no corrompa los resultados. Después de exactamente 10 minutos, se retira la primera vasija de la plataforma de agitado y se coloca sobre el banco de trabajo del laboratorio. Inmediatamente después, se levanta ligeramente la tapa de vidrio de la vasija. Con la punta estéril de una pipeta Eppendorf de $200 \mu\text{l}$ se sueltan las bacterias que puedan estar adheridas a la superficie de la vasija. Con este propósito se absorbe la solución con la pipeta y se vuelve a soltar. Esto se repite tres o cuatro veces. Después de este proceso, se toman dos muestras de $200 \mu\text{l}$ de cada una de las suspensiones, y cada muestra se coloca sobre un plato Petri relleno de DST-Agar. La muestra se distribuye de forma homogénea sobre la superficie de Agar por medio de una Espátula Drigalski de acero inoxidable. Entonces se incuban los platos Petri con la muestra a 37 grados centígrados durante 24 horas. Una vez que se han cogido las muestras, la suspensión de prueba restante se traslada desde las vasijas de prueba a un bote Erlenmeyer que contiene un desinfectante con el fin de eliminar los organismos de prueba. Las muestras para el AAS se esterilizan por medio del añadido de lejía de cloro $100 \mu\text{l}$, para asegurarse que no se produzca ninguna contaminación de los elementos del sistema de prueba o del personal.

La decisión de usar el proceso de espátula se tomó porque este método, comparado con el método de la placa de vidrio, facilita el recuento de colonias bacterianas que se desarrollan sobre el DST, ya que están en un único plano. La segunda ventaja del método consiste en que los gérmenes no se someten al estrés térmico del Agar caliente [13]. No se seleccionó la técnica del filtro de membrana porque este último método habría requerido muchos más recursos materiales y se habría tardado mucho más tiempo en llevarlo a cabo.

Recuento de las colonias que se han desarrollado sobre el medio de cultivo

Después de que se hayan mantenido los platos Petri inoculados con el medio de crecimiento DST durante 24 horas a 37 grados centígrados en la incubadora, se retiran y se colocan sobre una superficie oscura. De este modo, se facilita el reconocimiento y el recuento de las colonias que se han desarrollado sobre el medio de cultivo. Si la cantidad de colonias que se han desarrollado sobre las placas es menor o cercana a 300, se recuentan todas las colonias. En el caso de series de pruebas en las que más de 300 colonias se desarrollan en el medio en cada plato Petri, se elige una porción representativa de la placa y únicamente se toman en cuenta las colonias que se han desarrollado en esa sección.



Por medio de las matemáticas se calcula la cantidad total de colonias para el total de la placa de medio de cultivo. Para este propósito, es de gran asistencia la división de las placas tal y como se han diseñado sobre el fondo.

Se recuentan por lo menos tres o cuatro placas para cada material sometido a prueba. Se calcula el valor medio de los recuentos. Este valor medio se computa y registra para todos y cada uno de los tipos de material sometido a prueba.

La cantidad de bacterias se relaciona con la concentración inicial de la suspensión bacteriana. La reducción del número de bacterias se expresa como un porcentaje. Los valores medios que se obtienen en las diferentes series de pruebas se usan para la evaluación final.

Resultados

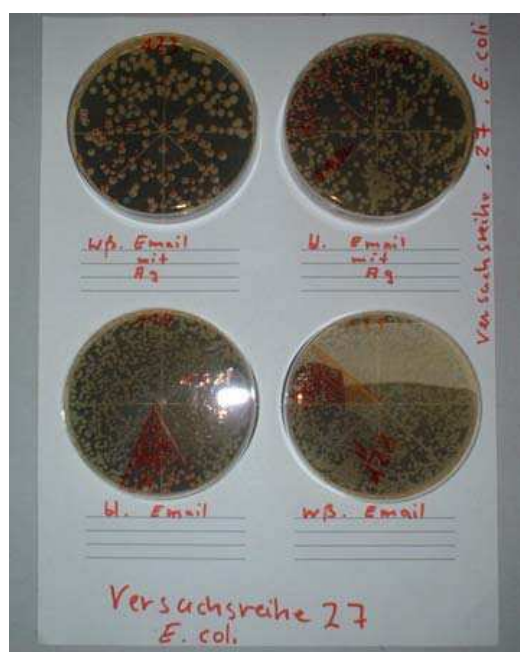


Figura 6.: Varios medio de cultivo.

Escherichia coli tras una incubación de 48 horas

Tras la incubación durante 2 días, se observó una reducción de *Escherichia coli* del 99.8 % en las vasijas de prueba con recubrimiento de esmalte con contenido de plata. Para las vasijas recubiertas con un esmalte blanco simple sin añadido de plata, la reducción se sitúa en el 44.2 %. Tras 48 horas de incubación, en las vasijas de acero inoxidable se produce una reducción del contenido bacteriano del 93%. La reducción del contenido bacteriano en las vasijas de plástico se sitúa en el 39%.

Las pruebas con el segundo material con contenido de plata - "Crystal Guard" – muestran una reducción de la concentración inicial de bacterias en un 100%. Sin añadir plata la reducción de gérmenes es únicamente del 22.0%. En los vasijas de cerámica se obtiene una reducción de gérmenes del 48.8%.

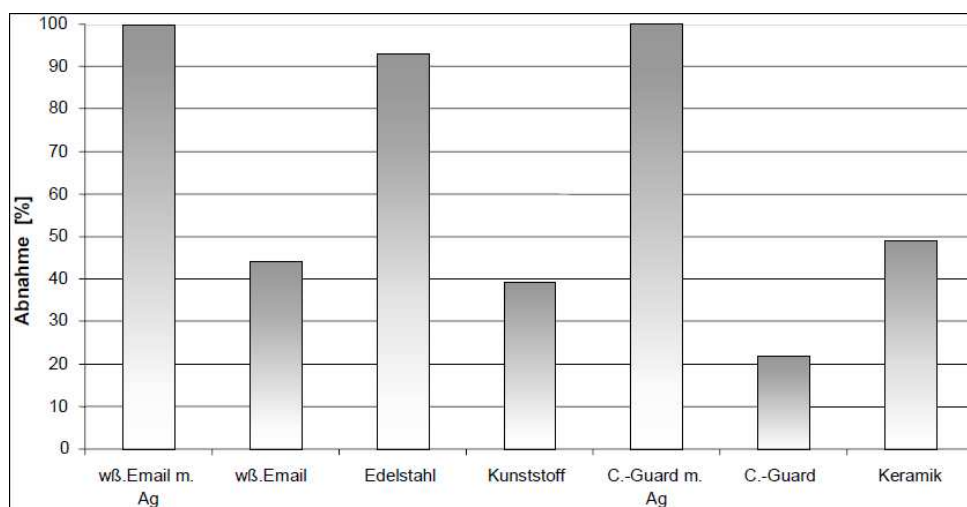


Figura 7.:
Reducción del número de *Escherichia coli* tras 48 horas.

Enterococcus faecium tras incubación durante 48 horas

Después de la incubación durante dos días, las vasijas recubiertas con esmalte blanco con contenido de plata que se han sometido a prueba muestran una reducción de *Enterococcus faecium* del 88.1%. La reducción análoga en el caso de las vasijas recubiertas con esmalte blanco sin contenido de plata es del 86.8%. Las vasijas de acero inoxidable consiguieron eliminar el 88.5% de las bacterias. La reducción de los gérmenes en el caso de las vasijas hechos con materiales plásticos fue del 87%. Las vasijas con recubrimiento de esmalte con contenido de plata "Crystal Guard" fueron de hecho capaces de neutralizar el 87% de los gérmenes. En el caso de las vasijas hechas de materiales de cerámica, la reducción del número de bacterias se mantuvo casi igual. El *Enterococcus faecium* muestra un bajo índice de supervivencia en todas las superficies sometidas a prueba. El esmalte con contenido de plata no muestra ninguna reducción más pronunciada de las cantidades en comparación con las otras superficies que se han sometido a prueba.

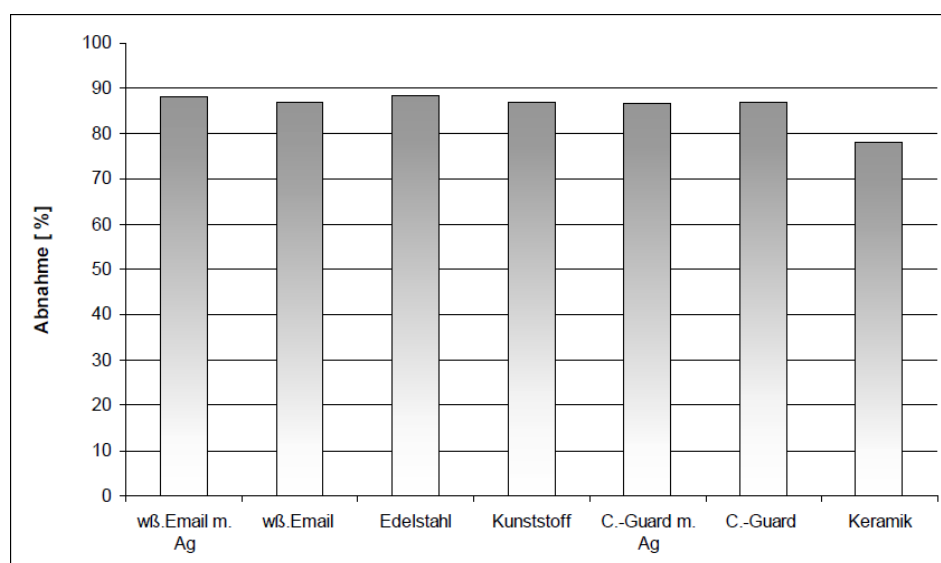


Figura 8.:
Reducción de las cantidades de *Enterococcus faecium* tras 48 horas.



***Pseudomonas aeruginosa* tras incubación de 48 horas**

Después de la incubación durante 2 días, se obtuvieron los siguientes resultados: para las vasijas de prueba que se han recubierto con esmalte blanco con contenido de plata se puede observar una reducción de las bacterias del 99.7%. En el caso de esmalte blanco la reducción a lo largo del mismo tiempo de incubación fue del 46.1%. La reducción alcanzada por los vasijas de acero inoxidable fue del valor de 91.3%.

En todas las series de pruebas con vasijas hechos de materiales plásticos, hay un sorprendente incremento en el número de bacterias. Este incremento es demasiado elevado como para poder evaluarlo con las técnicas seleccionadas para este estudio. En los vasijas recubiertos con el segundo tipo de esmalte con contenido de plata, hay un descenso de la densidad bacteriana del 100%, y, en la mayoría de los casos, no quedó ninguna bacteria que pudiese ser cultivada sobre el medio utilizado en nuestro estudio. En el caso del material que se ha denominado "Crystal- Guard", se estableció una reducción de las bacterias del 82.8%. En el caso de las vasijas hechas de cerámica la reducción es del 61.3%. Los resultados obtenidos con este peligroso patógeno humano demuestran mejor la acción positiva del esmalte con contenido de plata.

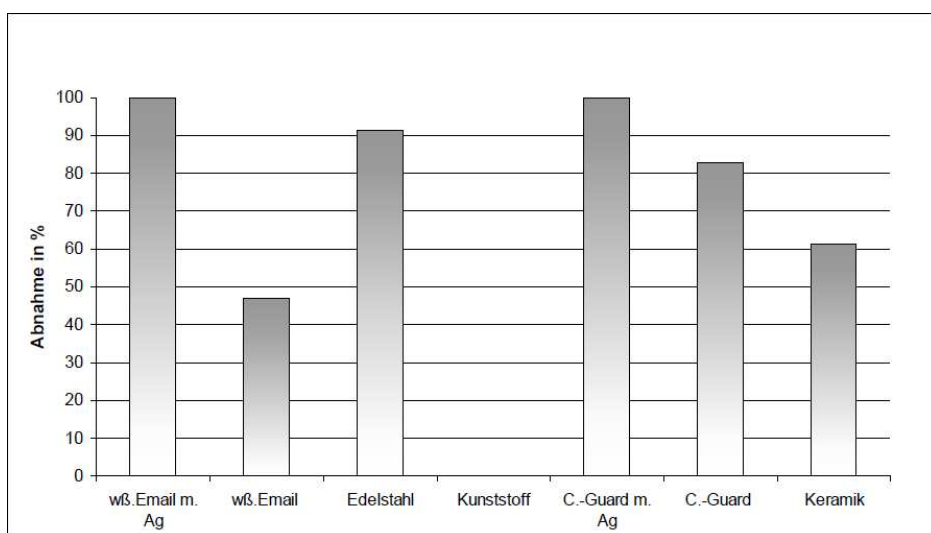


Figura 9.:
Reducción de la cantidad de *Pseudomonas aeruginosa* tras 48 horas.

Sumario

Aún dando por supuesto que el agua que se añade inicialmente a nuestros depósitos de agua potable se corresponde a los valores establecidos al efecto por las autoridades sanitarias estatales, existe un cierto "envejecimiento" hasta que el agua llega a los grifos de los consumidores finales. De esta manera debido al estancamiento o debido al desprendimiento de bacterias y materias orgánicas de una bio-película puede producirse un perjuicio de este precioso alimento. Ya que hasta las cantidades más pequeñas de materiales nutrientes pueden dar lugar a la formación de bio-películas, se puede recomendar el uso, bajo estas circunstancias, de materiales de trabajo que al menos inhiban la adherencia de bacterias a las paredes de las tuberías y los calentadores.



En nuestros experimentos hemos simulado los efectos de agua potable estancada sobre las superficies de los varios materiales de trabajo. Los resultados son realmente interesantes. Somos capaces de establecer el hecho de que algunos materiales tienen un claro impacto sobre la capacidad de supervivencia de las bacterias. Estos resultados son importantes para todos los productos con recubrimientos de esmalte.

En el caso de las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, se pudo observar una fuerte inhibición del crecimiento bacteriano cuando se utilizaba esmalte con contenido de plata. En el caso del germen Gram-positivo *Enterococcus faecium*, el potencial de supervivencia de los gérmenes es bajo en todas las superficies que se han sometido a prueba. El acero inoxidable 4301 muestra una acción bactericida, que, sin embargo, es menor que la del esmalte con contenido de plata. Las superficies de plástico incrementan considerablemente el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, un germen que es un claro patógeno para los humanos. Las cerámicas con un vitrificado blanco-titanio no tienen un impacto reconocible en el crecimiento de bacterias. Los resultados obtenidos con recubrimientos hidrófobos son inconsistentes y por lo tanto inconclusos, y no se pudo detectar ninguna acción bactericida o inhibición de los gérmenes.

Por medio de este estudio que se ha llevado a cabo en las instalaciones de un laboratorio estatal, se pudo establecer de forma clara la acción reductora de gérmenes del esmalte con contenido de plata, respecto a los organismos de prueba Gram-negativos. De este modo se pueden mejorar las características positivas de las superficies esmaltadas, sobre la base de estos resultados experimentales, y los correspondientes materiales de recubrimiento pueden aplicarse a un gran número de productos.

Bibliografía

- [1] Hirsch-Kaufmann, Monica, Schweiger, Manfred (2000). Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 4. Edition, Thieme Publishing House, Stuttgart & New York
- [2] Koecke, Hans Ulrich, Emschermann, Peter, Härle, Eckhart (2000). Biologie; Lehrbuch der allgemeinen Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler, 4. Edition, Schattauer Publishing House, Stuttgart & New York
- [3] Lengeler, Joseph W., Drews, Gerhart, Schlegel, Hans G. (1999). Biology of the prokaryotes, Thieme Publishing House, Stuttgart & New York
- [4] Beck, Ernst G., Schmidt, Pavel, (1996). Hygiene: Umweltmedizin; 100 Tabellen 6. Edition, Ferdinand Enke Publishing House, Stuttgart
- [5] Borneff, Joachim, Borneff, Marianne, (1991). Hygiene: Ein Leitfaden für Studenten und Ärzte, 5. Auflage, Thieme Publishing House, Stuttgart & New York
- [6] Gundermann, K. O., Rüden, H., Sonntag, H. G. (1991). Lehrbuch der Hygiene; G. Fischer Publishing House, Stuttgart & New York
- [7] Steuer, Walter, Lutz-Deffinger, Ursula, Schubert, Friedemann (1998). Leitfaden der Desinfektion, Sterilisation und Entwesung; mit Grundlagen der Mikrobiologie, Infektionslehre, Epidemiologie und der tierischen Schädlingen, 7. Edition, G. Fischer Publishing House, Stuttgart, Jena, Lübeck & Ulm
- [8] Askeland, Donald R. (1996). Materialwissenschaften: Grundlagen, Übungen, Lösungen, übersetzt von Wolfgang Fahland und Wilfried Holzhäuser, Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin & Oxford;



- [9] Klein, P. (Begr.), Hahn, Helmut (Hrsg.), Falke, Dietrich, Kaufmann, Stefan H.E., Ullmann, Uwe (2001). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie 4. Edition, Springer Publishing House, Berlin, Heidelberg & New York
- [10] Köhler, W., Eggers, H. J., Fleischer, B., Marre, R., Pfister, H., Pulverer, G. (Hrsg.) (2001). Medizinische Mikrobiologie, 8. Edition, Urban & Fischer Publishing House, München & Jena
- [11] Madian, Michael T., Martinko, John M., Parker, Jack, Brock, Thomas D. (Begr.) [Brook biology of microorganisms] (2000) Mikrobiologie. Translated from the English by Kurt Beginnen, Julia Karow, Brigitte Pakendorf, Lothar Seidler, Olaf Werner, German Translation, Edited by Werner Goebel, Spektrum Akad. Publishing House, Berlin
- [12] Kayser, Fritz H., Bienz, Kurt A., Eckert, Johannes, Zinkernagel, Rolf M. (2001). Medizinische Mikrobiologie, verstehen, lernen, nachschlagen, 10. Edition, Thieme Publishing House, Stuttgart & New York
- [13] Bast, Eckhard (2001). Mikrobiologische Arbeitsmethoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken; 2. Edition, Spektrum Akadem. Publishing House, Heidelberg & Berlin
- [14] Kappstein, Ines, (2002). Nosokomiale Infektionen; Prävention, Labor-Diagnostik, Antimikrobielle Therapie, 2. Edition, W. Zuckschwerdt, München, Bern, Vienna & New York
- [15] Wallhäußer, Karl Heinz (1985). Praxis der Sterilisation-Desinfektion-Konservierung-Keimidentifizierung-Betriebshygiene, 4. Edition, Thieme Publishing House, Stuttgart & New York.
- [16] Schoenen, Dirk, Schöler, H.F. (1983). Trinkwasser und Werkstoffe: Praxisbeobachtungen und Untersuchungsverfahren, Fischer Publishing House, Stuttgart & New York
- [17] Schmidt, Joachim, Naumann, Günter, Horsch, Wolfgang, Fickweiler, Eckart, (1990). Sterilisation, Desinfektion, Konservierung, und Entwesung in der med. u. pharmazeut. Praxis, 2. Edition, Thieme Publishing House, Leipzig.
- [18] Höll, Karl, Grohmann, Andreas (Hrsg.) (2002). Wasser: Nutzung im Kreislauf, Hygiene, Analyse und Bewertung, 8. Edition, de Gruyter Publishing House, Berlin & New York.
- [19] Kölle, Walter (2001). Wasseranalysen - richtig beurteilt; Grundlagen, Parameter, Wassertypen, Inhaltsstoffe, Grenzwerte nach Trinkwasserverordnung und EU-Richtlinie; Wiley-VCH Publishing House, Weinheim.
- [20] Flemming, Hans Curt (1994). Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen / H.-C. Flemming. Forschungs- und Entwicklungsinstitut für Industrie- und Siedlungswasserwirtschaft, sowie Abfallwirtschaft e. V., Stuttgart – München : Oldenburg
Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft; 129
Zugl.: Stuttgarter, Univ. Habil.-Schrift., 1994
R. Oldenburg Publishing House, München
- [21] Feng, Q.L., Wu, J., Chen, G.Q., Cui, F.Z., Kim, T.N., Kim, J.O (2000). A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*;
Journal Biomed. Material Res, **52**: 662-668
- [22] Cowan, Marjore M., Abshire, Kelly Z., Houk, Stephanie L., Evans, Suzanne M. (2003). Antimicrobial efficacy of silver-zeolite matrix coating on stainless steel, Journal of industrial Microbiology & Biotechnology, **30**: 102-106
- [23] Multanen, Markku, Talja, Martti, Hallanvuori, Saija, Siitonen, Anja, Välimaa, Tero, Tammela, Teuvo L. J., Seppälä, Jukka, Törmälä, Pertti (2000). Bacterial adherence to silver nitrate coated poly-L-lactic acid urological stents in vitro, Urol Res, **28**: 327-331
- [24] Silver, Simon (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds, Microbiology Reviews, **27**: 341-353
- [25] Bellantone, Maria, Williams, Huw D., Hench, Larry L. (2002). Broad-Spectrum Bactericidal Activity of Ag₂ O-Doped Bioactive Glass; Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **46**: 1940-1945
- [26] Davies, Richard L., Etris, Samuel F. (1997). The development and function of silver in water purification and disease control, Catalysis Today, **36**: 107-114
- [27] Rusin, P., Bright, K., Gerba, C. (2003). Rapid reduction of *Legionella pneumophila* on stainless steel with zeolite coatings silver and zinc ions,
Letters in Applied Microbiology, **36**: 69-72



- [28] Rivera-Garza, M., Olguin, M.T., Garcia-Sosa, I., Alcantara, D., Rodriguez-Fuentes, G. (2000). Silver supported on natural Mexican zeolite as an antibacterial material, *Microporos and Mesoporous Materials*, **39**: 431-444
- [29] Anonym, Der Biofilm-Bildung, Eigenschaften und Wirkungen; (2002)
Der Hygieneinspektor, **12**: 21-28
- [30] Costerton, J.W., Stewart, Philip S. (2001). Bekämpfung bakterieller Biofilme,
Spektrum der Wissenschaft; **11**: 58 ff
- [31] Bicanova M, Thinschmidt G. (1985). Oligodynamische Wirkung der Silberionen auf Mikroorganismen,
Pharmazie, **40**: 736
- [32] Gebel, J., Werner, H.-P., Kirsch-Altena, A., Bansemir, K. Standardmethoden der DGHM zur Prüfung chemischer Desinfektionsverfahren, mhp-Verlag GmbH, Wiesbaden,
Stand: 1. September 2001
- [33] OXOID Handbuch (1993), 5. Auflage, Unipath GmbH Wesel