

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 446**

51 Int. Cl.:

C11D 3/00 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

C11D 11/00 (2006.01)

A61L 2/18 (2006.01)

C11D 3/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2010 PCT/EP2010/065567**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.04.2012 WO12048758**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10765797 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2627747**

54 Título: **Procedimiento para la eliminación de biopelículas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.02.2017

73 Titular/es:
**REALCO SA (50.0%)
Avenue Albert Einstein 15
1348 Louvain La Neuve, BE y
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (50.0%)**

72 Inventor/es:
**BOELS, GAUTHIER;
BLACKMAN, GORDON;
FAILLE, CHRISTINE;
LEQUETTE, YANNICK y
CLARISSE, MARTINE**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 602 446 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la eliminación de biopelículas

La invención hace referencia al campo de la eliminación de biopelículas. De manera más particular, la invención se refiere a un procedimiento para eliminar las biopelículas.

5 La higiene adquiere una importancia creciente en la industria alimentaria, en los hospitales y, en particular, en el campo de la cirugía, en las instalaciones de potabilización y desalinización de aguas, en el tratamiento de las aguas de proceso y, en especial, en las aguas utilizadas en torres de refrigeración y en las necesidades de la vida diaria, por ejemplo, las lentes de contacto. A menudo, se observa que durante la circulación de agua sobre un soporte, los microorganismos que circulan libremente en el agua pueden adherirse a la superficie. A continuación, estos
10 microorganismos pueden desarrollar una matriz extracelular adhesiva compuesta por sustancias polímeras. El conjunto de microorganismos adheridos a una superficie e incluidos en una matriz de este tipo se denomina biopelícula. Por lo general, estas biopelículas están compuestas de bacterias.

Desgraciadamente, se observa que esta matriz es muy resistente y puede representar una barrera para los agentes que podrían actuar contra los microorganismos. Los tratamientos clásicos basados en sosa y/o que comprenden diferentes biocidas no actúan de forma suficientemente eficaz puesto que no penetran en la totalidad del espesor de la biopelícula, o resultan inhibidos por determinadas moléculas que componen dicha matriz. Por lo tanto, el tratamiento sólo tiene una eficacia parcial sobre la superficie superior de la biopelícula. Además, esto último puede también captar otros microorganismos - especialmente, patógenos – adicionales a los inicialmente presentes.

Por el documento WO98/26807 se conoce un procedimiento de tratamiento enzimático de una película biológica. En ese procedimiento, se pone en contacto la biopelícula con una composición de limpieza que comprende una o múltiples hidrolasas para eliminar o liberar la capa de biopelícula de la superficie. En una segunda etapa, la biopelícula se pone en contacto con una composición desinfectante y bactericida para degradar las células bacterianas presentes en la película. Sin embargo, el empleo simultáneo de estas dos composiciones determina un grado de inactivación de ciertas enzimas en la mezcla final. Por lo tanto, se pueden mejorar la rapidez y eficacia de la limpieza con el uso de una composición en la que no se produzca la inactivación de enzimas.

Asimismo, por el documento US2003/0205247 se conoce la utilización de soluciones acuosas que contienen enzimas para la limpieza de depósitos de almacenamiento o fermentación, que contienen una o múltiples enzimas seleccionadas de las siguientes: lacasas, peroxidasas, oxidorreductasas, transferasas, isomerasas, liasas o ligasas, y un agente espesante con un amplificador de espuma. El campo de acción de las soluciones anteriormente mencionadas es relativamente restringido, específico para las cervecerías, puesto que las enzimas seleccionadas e ilustradas son particularmente conocidas por ser activas sobre los polifenoles que constituyen principalmente los residuos de la fermentación, taninos y análogos. El agente espesante es una sustancia que modifica la viscosidad y la tixotropía de la solución, que se utiliza con la finalidad de permitir una mejor adherencia de la solución y/o espuma sobre las superficies de los depósitos tratados. Estas soluciones no son apropiadas para la limpieza de instalaciones diferentes de recipientes y depósitos (que comprenden, por ejemplo, numerosas tuberías) y no son adecuadas para la eliminación de otros tipos de microorganismos y, por tanto, para una amplia variedad de biopelículas.

El documento WO 92/13807 da a conocer el uso de una composición que permite la eliminación de la biomasa y de biopelículas de sustratos en sistemas acuosos, es decir, en sistemas en los que se hace circular o se almacena agua. Este tipo de sistema adolece de la presencia de biomasa y de biopelículas alcalinas o ácidas debidas al tipo de organismo generalmente presente en esta clase de instalaciones.

Para resolver este problema, el documento WO 92/13807 prevé la utilización de polisacáridos y/o de proteasas y de tensioactivos aniónicos tales como SDS o DBS (dodecilsulfato sódico y ácido dodecilsulfónico, respectivamente) para la eliminación de la biomasa y las biopelículas.

El documento WO 2006031554 se refiere, igualmente, a un procedimiento para retirar, reducir o desestructurar las biopelículas presentes sobre una superficie (sustrato), en donde este procedimiento se basa en la aplicación, sobre el sustrato, de una alfa-amilasa derivada de una bacteria.

Desgraciadamente, este tipo de composición y estos procedimientos según el estado de la técnica no son eficaces para una extensa gama de biopelículas generadas por diversos microorganismos, y exhiben una eficacia limitada para la eliminación de biopelículas.

50 Tal como se puede comprobar por el texto anterior, estas composiciones y estos procedimientos siempre están dirigidos a un tipo de biopelícula o un microorganismo diana y/o a una aplicación particular.

Existe, por lo tanto, la necesidad de una composición y un procedimiento capaces de eliminar biopelículas, que sean eficaces dentro de un intervalo razonable de tiempo, actúen sobre una amplia gama de biopelículas producidas por una extensa variedad de microorganismos o grupos de microorganismos, que no sean perjudiciales para el soporte de la biopelícula, y que actúen tanto para prevenir el desarrollo de biopelículas como sobre biopelículas formadas desde mucho tiempo antes y que han alcanzado un grado de cohesión y resistencia importante.

Para solucionar este problema, la presente invención ofrece un método para la eliminación de biopelículas presentes sobre un sustrato, caracterizado por que comprende las etapas siguientes:

- 5 a) preparación de un compuesto detergente que comprende un agente secuestrante, así como un agente humectante y un agente dispersante, y de un compuesto enzimático que contiene al menos una proteasa, al menos una lacasa y al menos una polisacaridasa,
- b) disolver el compuesto detergente en una fase acuosa;
- c) disolver el compuesto enzimático en la solución formada en la etapa b) para formar una solución de una composición para eliminar las biopelículas presentes sobre un sustrato, en donde dicha solución formada tiene un pH comprendido aproximadamente entre 6,5 y 7,5,
- 10 o b') disolver el compuesto enzimático en una fase acuosa,
- c') disolver el compuesto detergente en la solución formada en la etapa b') para formar una solución para eliminar biopelículas, en donde la citada solución formada presenta un pH comprendido aproximadamente entre 6,5 y 7,5.
- d) aplicación de la solución de la citada composición formada en la etapa c) o c') sobre el sustrato durante un periodo de tiempo predeterminado, en particular, comprendido entre 15 minutos y 4 horas,
- 15 e) adición de una solución básica, después de dicha aplicación d) de la solución de la citada composición sobre dicho sustrato durante el mencionado periodo de tiempo predeterminado, de manera que se produce una elevación del pH hasta aproximadamente 8 a 9.

20 El procedimiento según la invención, basado en el uso de una composición que comprende un compuesto detergente y un compuesto enzimático que contiene al menos una proteasa, al menos una lacasa y al menos una polisacaridasa permite, sorprendentemente, mejorar de manera importante la rapidez y la eficacia de la eliminación de una biopelícula, con la capacidad de atacar distintos tipos de biopelículas. Esta composición permite eliminar la totalidad o la casi totalidad de la biopelícula, y puede actuar sobre biopelículas incluso maduras o que tengan un ciclo de desarrollo más precoz y generadas por múltiples especies o microorganismos diferentes.

25 En la actualidad, es necesario saber que ninguna composición eficaz y ningún procedimiento permiten asegurar la eliminación completa de las biopelículas existentes en las instalaciones. Por ejemplo, en el campo de la industria alimentaria, la formación de biopelículas es inevitable (a causa de la riqueza del medio ambiente). Las biopelículas presentan una actividad cíclica de crecimiento que comprende una fase de crecimiento, durante la cual se produce la acumulación de microorganismos, y una fase de desprendimiento, durante la que se desprenden trozos completos de la biopelícula a causa de la erosión y bajo la acción de su propio peso. En realidad, cuando se detecta este fenómeno en un centro industrial, se debería detener la cadena de producción y llevar a cabo diferentes ciclos de lavado alternativos con sosa y con numerosos detergentes y/o limpiadores químicos y/o enzimáticos, dado que no existen composiciones polivalentes. Esto significa muchas horas de trabajo y pérdida de rendimiento de la instalación.

35 En consecuencia, en la práctica, la producción no se interrumpe y cuando la biopelícula está en fase de ruptura, los lotes producidos están contaminados y se eliminan hasta que el nivel de contaminación por microorganismos de los alimentos producidos se encuentran nuevamente dentro de los límites aceptables según las normas vigentes. Además, las industrias no tienen previsto disponer de un stock de solución detergente o enzimática determinada para cada microorganismo susceptible de contaminar su cadena de producción.

40 De forma muy sorprendente, el procedimiento según la presente invención permite poner a disposición una composición detergente perfectamente polivalente, que permite eliminar un amplio espectro de biopelículas en diferentes tipos de instalaciones y que no requieren precauciones particulares de uso en lo que respecta a instalaciones tanto de depósitos como de tuberías. El detergente elimina una parte superficial de la biopelícula y empapa y/o hincha las estructuras orgánicas de la biopelícula gracias al carácter dispersante del agente dispersante presente en la composición detergente. Esto favorece, por tanto, el acceso del componente enzimático que fragiliza y degrada la matriz de la biopelícula. Esta acción combinada de tres tipos de enzimas y del componente detergente favorece el acceso de la composición a las capas más profundas y permite un desprendimiento óptimo de todo tipo de biopelículas, preservando al mismo tiempo el sustrato.

45 Preferiblemente, dicho al menos un componente enzimático comprende una proporción de proteasa(s) comprendida entre 10 y 50%, una proporción de lacasa(s) comprendida entre 5 y 35%, y una proporción de polisacaridasa(s) comprendida entre 5 y 20% en peso con respecto al peso total del componente enzimático, en donde se alcanza eventualmente el 100% del componente enzimático con ayuda de un excipiente o disolvente convencional, por ejemplo, un alcohol.

55 Según una realización preferida de la invención, el componente enzimático puede contener entre 1 y 10 proteasas, preferiblemente, entre 1 y 5 proteasas, más preferiblemente, puede contener 2, 3, 4 o 5 proteasas.

5 Ejemplos no limitantes de enzimas proteasas pertenecientes a la clase EC 3.4 y que se pueden utilizar en la invención son las aminopeptidasas (EC 3.4.11), dipeptidasas (EC 3.4.13), dipeptidil-peptidasas y tripeptidil-peptidasas (EC 3.4.14), peptidil-dipeptidasas (EC 3.4.15), carboxipeptidasas tipo serina (EC 3.4.16), metalocarboxipeptidasas (EC 3.4.17), carboxipeptidasas tipo cisteína (EC 3.4.18), peptidasas omega (EC 3.4.19), serina endopeptidasas (EC 3.4.21), cisteína endopeptidasas (EC 3.4.22), ácido aspártico endopeptidasas (EC 3.4.23), metaloendopeptidasas (EC 3.4.24), treonina endopeptidasas (EC 3.4.25) y las endopeptidasas pertenecientes a la clase EC 3.4.99.

Preferiblemente, las proteasas pertenecen a la clase EC 3.4.21. Las proteasas están disponibles en el comercio bajo diferentes formas que incluyen polvos, granulados, suspensiones y soluciones líquidas.

10 Las lacasas que se utilizan en la invención pertenecen a la clase EC 1.10.3.2. Las lacasas son enzimas que contienen cobre y tienen como función oxidar un sustrato en presencia de oxígeno. Más específicamente, las lacasas son oxidorreductasas que actúan con el oxígeno molecular como aceptor de electrones.

15 La al menos una polisacaridasa usada en la invención es una enzima cuya misión es degradar los enlaces dentro de los polisacáridos. Preferiblemente, la al menos una polisacaridasa puede ser una alfa-amilasa, celulasa, hemicelulasa, glucosidasa, beta-glucanasa o pectinasa.

Más preferiblemente, la al menos una polisacaridasa puede ser una alfa-amilasa perteneciente a la clase EC 3.2.1.1, que tiene como función degradar los enlaces (1-4)-alfa-glicosídicos en los polisacáridos que contienen 3 o más unidades alfa-(1-4)-D-glucosa.

20 Preferiblemente, el componente enzimático puede comprender una proporción de lacasa(s) de aproximadamente 30%, una proporción de proteasa(s) de aproximadamente 30%, una proporción de alfa-amilasa(s) de aproximadamente 10% en peso con respecto al peso total del componente enzimático, en donde se alcanza eventualmente el 100% del componente enzimático con ayuda de un excipiente o disolvente convencional.

25 Según otra realización preferida, si el componente enzimático comprende 2 proteasas, la proporción de lacasa(s) puede ser aproximadamente de 30%, la proporción total de proteasas, aproximadamente de 30%, la proporción de alfa-amilasa(s) aproximadamente de 10% en peso con respecto al peso total del componente enzimático, en donde se alcanza eventualmente el 100% del componente enzimático con ayuda de un excipiente o disolvente convencional.

30 Por ejemplo, la relación entre cada proteasa puede estar comprendida entre 1:2 y 2:1, preferiblemente, la relación entre cada proteasa puede ser de 1:1. Las enzimas presentes en el componente enzimático ejercen una acción complementaria sobre la biopelícula. Por ejemplo, la lacasa exhibe una gran eficacia sobre la suciedad que no atacan la alfa-amilasa o las proteasas.

Según una realización preferida de la invención, el componente enzimático puede ser una solución o estar en forma sólida.

35 Preferiblemente, el componente enzimático es una solución cuyo pH puede estar comprendido entre aproximadamente 8 y 10. Preferiblemente, el componente enzimático es una solución acuosa cuyo pH puede estar comprendido entre aproximadamente 8,5 y 9,5; más preferiblemente, el pH puede ser aproximadamente de 9,0, con la finalidad de preservar al máximo la integridad de las enzimas.

40 De manera alternativa, el componente enzimático puede estar en forma sólida tal como, por ejemplo, en forma de un liofilizado, polvos, granulados o bajo cualquier otra forma que permita la solubilización de dicho componente en un disolvente, dado que finalmente estará disuelto en dicho disolvente. El disolvente puede ser agua o una solución acuosa, ácida, básica, alcohólica, tamponada o neutra. En este caso, entonces, el componente enzimático solubilizado se podrá diluir posteriormente en una solución acuosa que contiene eventualmente uno o múltiples compuestos tales como, por ejemplo, detergentes para formar la solución de limpieza.

45 En una realización conveniente según la invención, dicho al menos un componente detergente comprende una proporción de agente secuestrante comprendida entre 1 y 10% en peso con respecto al peso total del componente detergente, lo cual constituye una relación óptima entre eficacia, estabilidad y coste.

50 El agente secuestrante es una sustancia química que tiene la capacidad de formar complejos con los iones minerales, los cuales fija en una forma que impide su precipitación por reacciones habituales. A modo de ejemplo, el agente secuestrante puede ser el ácido etilendiaminotetraacético, glucono-delta-lactona, gluconato sódico, gluconato de potasio, gluconato de calcio, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, acetato sódico, sorbitol, o un compuesto que comprende un átomo de fósforo. Preferiblemente, el agente secuestrante puede ser un óxido de fósforo tal como un fosfonato, un fosfinato o un fosfato, o mezclas de los mismos, o una sal de los mismos, una amina o un óxido de amina que tiene en su estructura al menos un grupo funcional fosfina, óxido de fosfina, fosfinito, fosfonito, fosfito, fosfonato, fosfinato o fosfato, solos o en combinación, o una sal de los mismos.

Más preferiblemente, el agente secuestrante puede ser un fosfonato o una sal del mismo, una amina o un óxido de amina que en su estructura comprende al menos un grupo funcional fosfina, óxido de fosfina, fosfinito, fosfonito, fosfito, fosfonato, fosfinato o fosfato, solos o en combinación, o una sal de los mismos. Como ejemplo no limitante, el fosfonato puede tener la fórmula general $R^1(R^2O)(R^3O)P=O$, en donde R^1 , R^2 y R^3 significan, independientemente, un grupo hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquil-amino sustituido o no sustituido, aminoalquilo sustituido o no sustituido, arilo o arilo sustituido. Como ejemplo no limitante, la amina o el óxido de amina pueden comprender uno, dos o tres sustituyente(s) de fórmula general CR^4R^5W , en donde R^4 y R^5 significan, independientemente el uno del otro, un grupo hidrógeno, alquilo, alquilo sustituido, alquil-amino sustituido o no sustituido, aminoalquilo sustituido o no sustituido, arilo o arilo sustituido, y W significa un grupo fosfonato, fosfinato o fosfato. El agente secuestrante puede estar en forma de una sal de sodio, calcio, litio, magnesio o potasio; preferiblemente, el agente secuestrante puede estar en forma de una sal de sodio, calcio o potasio.

En una variante conveniente según la invención, el componente detergente comprende una proporción de agente dispersante comprendida entre 1 y 10% en peso con respecto al peso total del componente detergente.

Por lo tanto, el agente dispersante es una sustancia química que tiene la capacidad de mejorar la separación de las partículas de una suspensión con el fin de impedir la aglutinación, agregación y/o la decantación. El agente dispersante puede ser un polímero soluble o parcialmente soluble en agua tal como, por ejemplo, polietilenglicol, derivados de celulosa o un polímero que comprende al menos un resto ácido acrílico o éster acrílico. Preferiblemente, el agente dispersante es un polímero que comprende al menos un resto ácido acrílico o éster acrílico de la fórmula general $-(CH_2-CH-COOR)-$, en donde R significa un grupo hidrógeno, alquilo o alquilo sustituido, arilo o arilo sustituido. De manera particular, el agente dispersante es un polímero que tiene un peso molecular medio M_w comprendido aproximadamente entre 500 y 10.000.

Más preferiblemente, el agente dispersante es un polímero del ácido acrílico. En particular, el agente dispersante puede ser un homopolímero del ácido acrílico con un peso molecular medio comprendido aproximadamente entre 2.000 y 6.000.

En otra realización según la invención, el componente detergente comprende una proporción de agente humectante comprendida entre 1 y 15% en peso con respecto al peso total del componente detergente.

El agente humectante es una sustancia química anfífila o una composición que comprende dicha sustancia química anfífila, que modifica la tensión superficial entre dos superficies. El agente humectante tiene la ventaja de favorecer la expansión de un líquido sobre un sólido. El agente humectante puede ser aniónico, catiónico, no iónico o anfótero. Preferiblemente, el agente humectante puede ser un humectante aniónico o no iónico, es decir, que la parte hidrófila tiene una carga negativa o no contiene ninguna carga neta, o puede ser una composición que comprende un humectante aniónico. De manera más particular, el agente humectante puede ser un éster de sacarosa o una composición que comprende un sulfato sódico de alquilo y un alcohol.

De manera conveniente y preferible, en el componente detergente según la invención, dicho agente humectante no forma espuma con el calor y se selecciona, preferiblemente, del grupo de sulfato sódico de alquilo C_6 a C_{10} , alcohol éter sulfatos C_6 a C_{10} , sulfonatos de alquil-arilos C_6 a C_{10} .

El hecho de que el agente humectante sea un agente humectante que no genera espuma con el calor permite su utilización en instalaciones que comprenden múltiples tuberías y tubos, evitando de este modo la formación de espuma y sin alterar sino, por el contrario, mejorando el rendimiento como tensioactivo y/o emulsionante de la composición según la invención. Se entiende que el aporte de una solución detergente eficaz que no produce espuma limita las etapas de limpieza, lo cual es especialmente deseable sobre todo en instalaciones con múltiples tubos o tuberías.

Al igual que el componente enzimático, el componente detergente puede estar en forma sólida para disolver en un disolvente y/o en una fase acuosa o en forma líquida.

Cuando está en forma sólida, se puede disolver directamente en la solución formada por el componente enzimático que, eventualmente, ya está diluido en la fase acuosa, o se disuelve en un disolvente previamente a su dilución en la solución formada por el componente enzimático y la fase acuosa, o en la fase acuosa directamente, antes de la dilución del componente enzimático.

Cuando el componente detergente se encuentra en forma líquida, se alcanza eventualmente un 100% del componente detergente, por lo general, con ayuda de agua y antes de aplicarlo sobre la biopelícula, se diluirá en la fase acuosa que, eventualmente, ya contiene el componente enzimático.

Por el término "disolver", en el sentido de la presente invención, se entiende una disolución de un compuesto sólido en una fase líquida (disolvente), o una dilución de un compuesto líquido en otra fase líquida en la que el compuesto líquido es miscible.

De manera alternativa, según la invención, las etapas b) y c) o b') y c') se pueden llevar a cabo de forma simultánea para obtener una solución de dicha composición según la invención.

Según una realización preferida de la invención, el pH de la solución formada en la etapa b) está comprendido aproximadamente entre 11,0 y 14,0, preferiblemente comprendido aproximadamente entre 12,0 y 14,0 y, de forma muy preferible, comprendido entre 12,8 y 13,8.

5 Según la invención, el pH de la solución de dicha composición formada en la etapa c) o c') está comprendido entre 6,5 y 7,5 y se agrega una solución básica a la citada aplicación d) de la solución de dicha composición sobre dicho sustrato durante el periodo de tiempo predeterminado indicado, de manera que se produce una elevación del pH hasta aproximadamente 8 a 9.

10 De este modo, cuando se aplica la composición según la invención sobre el sustrato, el pH predominante está comprendido entre 6,5 y 7,5, lo cual permite que las condiciones de actividad de la lacasa sean óptimas. A continuación, al efectuar el aumento del pH hasta aproximadamente 8 a 9, las otras enzimas alcanzan, por su parte, su eficacia óptima, con el resultado de que la biopelícula será eliminada de forma especialmente conveniente, puesto que cada una de las enzimas presentes estará en condiciones óptimas para llevar a cabo su acción, y la biopelícula será desprendida y eliminada por completo. Además, puesto que en las instalaciones donde se pueden formar biopelículas se utilizan por lo general componentes básicos, no se agrega ningún componente exógeno que pudiera ser problemático para validar la etapa de limpieza. Por ejemplo, para higienizar una instalación, es frecuente aplicar sosa y, por lo tanto, en el marco de la presente invención se limita el aporte de sustancias de diferente naturaleza.

15 Preferiblemente, la temperatura de la solución del componente detergente formada durante la etapa b) o c') puede estar comprendida aproximadamente entre 35°C y 50°C. Según una realización preferida de la invención, la composición según la invención se aplica sobre un sustrato cubierto por una biopelícula durante aproximadamente 30 a 50 minutos, lo que representa un periodo de aplicación relativamente corto para una eficacia de este tipo.

20 El presente método permite eliminar eficazmente la totalidad o la casi totalidad de la biopelícula, dejando sobre el sustrato solamente células aisladas, desprovistas de la protección de la matriz. La acción posterior de un biocida permite destruir la cepa microbiana. Por consiguiente, tras la aplicación de una solución de la composición según la invención, una fase de desinfección posterior será mucho más eficaz que después de la aplicación de una fase de limpieza convencional, que no permite esta eliminación total de la matriz.

25 De esta forma, según una realización preferida de la invención, el método comprende, además, una etapa ulterior de aplicación de un biocida. Los biocidas pueden ser, por ejemplo y de manera no limitante, de tipo oxidante tal como el ácido peracético, peróxido de hidrógeno, monopersulfato de potasio e hipoclorito sódico. Según la invención, la aplicación de un biocida debe ser posterior a la aplicación de la composición según la invención para evitar la inactivación de las enzimas presentes en dicha composición por parte de los biocidas.

En las reivindicaciones adjuntas se mencionan otras realizaciones según la invención.

A partir de la descripción que se ofrece a continuación, que carece de carácter limitante y que hace referencia a los dibujos adjuntos y a los ejemplos, se podrán deducir características, detalles y ventajas adicionales de la invención.

35 Figura 1 representa un gráfico que muestra la cantidad de células de una cepa de *Pseudomonas fluorescens* presente sobre un sustrato, tras la aplicación de diferentes soluciones de tratamiento.

Figura 2 representa un gráfico que muestra la cantidad de células de una cepa de *Bacillus mycoïdes* presente sobre un sustrato, tras la aplicación de diferentes soluciones de tratamiento.

40 Figura 3 representa un gráfico que muestra la cantidad de células de una cepa de *Bacillus cereus* presente sobre un sustrato, tras la aplicación de diferentes soluciones de tratamiento.

Figura 4 muestra imágenes de la superficie de un sustrato, captadas con un microscopio de epifluorescencia, tras la aplicación de diferentes soluciones de tratamiento sobre dicho sustrato, que está recubierto por una biopelícula de la cepa *Pseudomonas fluorescens*.

45 Figura 5 muestra imágenes de la superficie de un sustrato, captadas con un microscopio de epifluorescencia, tras la aplicación de diferentes soluciones de tratamiento sobre dicho sustrato, que está recubierto por una biopelícula de la cepa *Bacillus mycoïdes*.

Figura 6 muestra imágenes de la superficie de un sustrato, captadas con un microscopio de epifluorescencia, tras la aplicación de diferentes soluciones de tratamiento sobre dicho sustrato, que está recubierto por una biopelícula de la cepa *Bacillus cereus*.

50 Figura 7 ilustra los resultados de la coloración de biopelículas antes de la limpieza con soluciones limpiadoras (A) y después de la limpieza con dichas soluciones (B).

Figura 8 es un gráfico que presenta la eficacia de cuatro enzimas frente a biopelículas procedentes de la cepa *Chryseobacterium meningosepticum*.

Figura 9 es un gráfico que presenta la eficacia de cuatro enzimas frente a biopelículas procedentes de la cepa *Bacillus cereus*.

Figura 10 es un gráfico que presenta la eficacia de cuatro enzimas frente a biopelículas procedentes de la cepa *Pseudomonas fluorescens*.

5 En las figuras, los elementos idénticos o análogos tienen las mismas referencias.

Obsérvese que las figuras y ejemplos que se muestran a continuación no ilustran el procedimiento según la invención, sino que hacen referencia al efecto de las soluciones aplicadas para la eliminación de biopelículas presentes sobre un sustrato.

Ejemplo 1

10 Descripción de la selección de condiciones experimentales: los ensayos se llevan a cabo en el marco de un procedimiento de limpieza *in situ* (NEP, por sus siglas en francés) en una planta piloto industrial. Las biopelículas se desarrollan sobre una cara plana de un cilindro de acero inoxidable con el centro perforado. Este cilindro, una vez introducido en una canalización de diámetro interior igual al diámetro exterior del cilindro, provoca un estrechamiento brusco del diámetro de este, forzando al líquido a pasar a través de la perforación central. Esta restricción implica alteraciones del flujo, produciendo de este modo zonas muertas en la superficie del cilindro. Estas zonas muertas son favorables para la formación de una biopelícula y muy desfavorables para su desprendimiento mecánico causado por el flujo. Por lo tanto, representan típicamente las zonas difíciles para eliminar una biopelícula.

20 Se utilizan tres cepas diferentes: *Pseudomonas fluorescens* (suministrada por la Universidad de Cornell, Departamento de Ciencias de la Alimentación, Ítaca, Nueva York, 14853, EE.UU. [Kathryn J. Boor, kjb4@cornell.edu]), *Bacillus mycoides* (suministrada por el laboratorio AFSSA en Maison-Alfort, Francia [Brigitte Carpentier, b.carpentier@lerpac.afssa.fr]), y *Bacillus cereus* (suministrada por INRA, UR638, Processus aux Interfaces et Hygiène des Matériaux, Villeneuve d'Ascq, Francia [Christine Faille, Christine.faille@lille.inra.fr]).

25 Se prepara un medio de cultivo de la forma siguiente: extractos de carne en polvo (Biokar) se disuelven en agua destilada al 0,1% y se esterilizan. Sobre la superficie del cilindro se depositan 20 mL de inóculo al 5×10^7 UFC/mL en una solución de caldo de tripticasa soya (TSB, Biokar). Los cilindros se incuban en una cámara de humedad a 30°C durante 2 horas para permitir la adhesión de las células. A continuación, se retira la solución de TSB y se sustituye por 20 mL del medio de cultivo de carne y se incuban los cilindros durante 24 horas a 30°C. Entonces, se sustituye el medio de cultivo por un medio fresco a base de carne y los cilindros se incuban nuevamente durante 24 horas.

30 El procedimiento de limpieza consiste en introducir los cilindros contaminados con la biopelícula en las canalizaciones derechas de una planta industrial piloto que se limpia por circulación (procedimiento de limpieza *in situ* – NEP). Las soluciones de tratamiento se hacen circular durante 30 minutos a 45°C con un caudal de 300 L/h. Para dos de las cepas, los ensayos se llevaron a cabo también con un caudal de 600 L/h. Cada ensayo se repite tres veces y se calcula el valor medio.

35 El desarrollo y la eliminación de las biopelículas se siguen por observación a microscopía y por la cuantificación de las células viables presentes en los cilindros por recuento en medio de Tripticasa Soya Agar tras el desprendimiento de las células.

Descripción del protocolo de preparación de la composición

40 El componente detergente se prepara mezclando en un volumen determinado de agua un fosfonato, un poliacrilato y un humectante aniónico. Las correspondientes proporciones en el componente detergente son 3%, 4% y 3%. El pH de la solución se ajusta a 13,3 por dilución. Se prepara una solución del componente enzimático. Esta comprende una proporción de 30% de proteasas (EC 3.4.21), 30% de lacasa (EC 1.10.3.2) y 10% de alfa-amilasa (EC 3.2.1.1) y un excipiente convencional.

45 El pH de la solución del componente enzimático se lleva a 9 por adición progresiva de una solución de hidróxido de potasio. La solución de la composición según la invención se prepara agregando el componente detergente y el componente enzimático en agua. La solución de dicha composición según la invención comprende 1% de componente detergente y 0,05% del componente enzimático. El pH de la solución de dicha composición según la invención fue aproximadamente de 10.

Descripción de los ensayos y de sus resultados.

Ensayo con la cepa de *Pseudomonas fluorescens*

50 El gráfico que se representa en la Figura 1 muestra la cantidad de biopelícula presente en la pared del cilindro tras la aplicación de soluciones de tratamiento, bajo las condiciones descritas anteriormente. Las superficies del sustrato estuvieron recubiertas por una biopelícula formada por la cepa *Pseudomonas fluorescens*. La cantidad inicial de biopelícula presente, antes del tratamiento, se designa A1 en la Figura 1.

A continuación, se compararon tres soluciones: una solución que comprende solamente agua (B1), una solución de sosa al 0,5% (C1) y una solución de la composición según la invención (D1). Las soluciones se aplicaron con un caudal de 300 L/h y a una temperatura de 45°C. La solución (B1), que comprende agua, permite comprobar el desprendimiento mecánico de la biopelícula por el flujo.

- 5 De esta forma, se observa que la biopelícula es resistente al desprendimiento mecánico, dado que las cantidades de biopelícula son idénticas (curvas A1 y B1). La aplicación de una solución de la composición según la invención permite una reducción importante de la biopelícula (curva D1, 10^3 UFC) en relación con una solución de sosa (curva C1, 10^5 UFC). La composición según la invención es, por lo tanto, más eficaz que el tratamiento de referencia (solución de sosa) sobre una biopelícula resistente al desprendimiento mecánico.
- 10 La Figura 4 muestra múltiples imágenes de la superficie de un sustrato, captadas con un microscopio de epifluorescencia, después de la aplicación de las diferentes soluciones de tratamiento a 300 L/h. La imagen (B4) muestra la superficie del sustrato tratada con la solución de agua, la imagen (C4) muestra la superficie del sustrato tratada con la solución de sosa al 0,5% y la imagen (D4) muestra la superficie del sustrato tratada con la solución de la composición según la invención.
- 15 Estos datos muestran de forma clara que la composición según la invención ha eliminado la totalidad de la matriz de las biopelículas (coloración difusa) y no quedan más que células aisladas o pequeños grupos de células distribuidos en una sola capa sobre las superficies, sin protección de una matriz. La solución de sosa, por sí misma, no permitió eliminar por completo la matriz (coloración difusa) que protege parcialmente las células residuales. Por consiguiente, una fase posterior de desinfección será mucho más eficaz después de la aplicación de una solución de la
- 20 composición según la invención.

Ensayo con la cepa de *Bacillus mycoïdes*

- El gráfico que se representa en la Figura 2 muestra la cantidad de biopelícula presente en la pared del cilindro tras la aplicación de soluciones de tratamiento, bajo las condiciones descritas anteriormente. Las superficies del sustrato estuvieron recubiertas por una biopelícula formada por la cepa *Bacillus mycoïdes*. La cantidad inicial de biopelícula presente, antes del tratamiento, se representa en la curva (A2).
- 25

A continuación, se compararon cinco soluciones: una solución que comprende solamente agua (B2), una solución de sosa al 0,5% (C2), una solución de la composición según la invención (D2 y F2), y una solución de sosa al 2% (E2). Las soluciones A2 a D2 se aplicaron en un caudal de 300 L/h, en tanto que las soluciones E2 y F2 se aplicaron en un caudal de 600 L/h.

- 30 La biopelícula de *Bacillus mycoïdes* es relativamente sensible al desprendimiento mecánico y su cantidad se reduce en 90% por aplicación de la solución (B2). La aplicación de la solución de la composición según la invención (D2 y F2) mostró rendimientos equivalentes a los de la solución de sosa (C2 y E2), a caudales tanto de 300 L/h como de 600 L/h.
- 35 La Figura 5 muestra múltiples imágenes de la superficie de un sustrato, captadas con un microscopio de epifluorescencia, después de la aplicación de las diferentes soluciones de tratamiento a 300 L/h. La imagen (B5) muestra la superficie del sustrato tratada con una solución de agua, la imagen (C5) muestra la superficie del sustrato tratada con una solución de sosa al 0,5% y la imagen (D5) muestra la superficie del sustrato tratada con la solución de la composición según la invención.
- 40 Estos datos demuestran claramente que la composición según la invención ha eliminado la casi totalidad de la matriz de las biopelículas, dejando solamente células aisladas y pequeños grupos de células distribuidos en una sola capa, sin la protección de la matriz. La solución de sosa no permitió una eliminación más eficaz de la biopelícula. Por lo tanto, la acción posterior de una solución desinfectante será más eficaz si se ha utilizado previamente una solución de la composición según la invención.

Ensayo con la cepa de *Bacillus cereus*

- 45 El gráfico que se representa en la Figura 3 muestra la cantidad de biopelícula presente en la pared del cilindro tras la aplicación de soluciones de tratamiento, bajo las condiciones descritas anteriormente. Las superficies del sustrato estuvieron recubiertas por una biopelícula formada por la cepa *Bacillus cereus*. La cantidad inicial de biopelícula presente, antes del tratamiento, se representa en la curva (A3).
- 50 Se compararon cinco soluciones: una solución que comprende solamente agua (B3), una solución de sosa al 0,5% (C3), una solución de la composición según la invención (D3 y F3), y una solución de sosa al 2% (E3). Las soluciones B3, C3 y D3 se aplicaron en un caudal de 300 L/h, en tanto que las soluciones E3 y F3 se aplicaron en un caudal de 600 L/h. Un caudal más elevado influye sobre el desprendimiento mecánico.

La biopelícula de *Bacillus cereus* es totalmente resistente al desprendimiento mecánico (curvas A3 y B3). La composición según la invención muestra una mayor eficacia al caudal de 300 L/h en relación con una solución de

sosa al 0,5% (C3) e, incluso, con un caudal de 600 L/h, con respecto a una solución de sosa más concentrada (curva E3).

5 La Figura 6 muestra múltiples imágenes de la superficie de un sustrato, captadas con un microscopio de epifluorescencia, después de la aplicación de las diferentes soluciones de tratamiento. La imagen (B6) muestra la superficie del sustrato tratada con una solución de agua, la imagen (C6) muestra la superficie del sustrato tratada con una solución de sosa al 0,5% y la imagen (D6) muestra la superficie del sustrato tratada con la solución de la composición según la invención.

10 Estas imágenes demuestran una vez más que la composición según la invención elimina la casi totalidad de la matriz de las biopelículas, dejando únicamente células aisladas o pequeños grupos de células distribuidos en una sola capa, sin la protección de una matriz.

La solución de sosa no permite una eliminación eficaz de la biopelícula. La fase de desinfección del sustrato siguiente a la fase de eliminación de la biopelícula será, por consiguiente, más eficaz después de la aplicación de una solución de la composición según la invención durante esta fase de eliminación.

15 Los diversos ensayos efectuados en este ejemplo demuestran la eficacia de la composición según la invención para eliminar una biopelícula de un sustrato. La composición según la invención demuestra ser más eficaz que una solución de sosa empleada actualmente según la técnica anterior. La composición según la invención se muestra también muy eficaz para numerosos tipos de biopelículas producidas por bacterias diferentes. La composición según la invención ofrece, por lo tanto, una solución eficaz a los problemas mencionados en la técnica y que son conocidos por el experto en la materia.

20 Ejemplo 2

Del mismo modo, se han llevado a cabo ensayos en dos líneas de producción industrial (industria de producción de mantequilla y de margarina). Los testigos de acero inoxidable (8 x 1 cm) se depositan durante 15 días en los circuitos de producción que presentan contaminaciones esporádicas. A continuación, estos testigos se someten a ciclos de producción y limpieza convencionales en esas instalaciones.

25 La presencia de una biopelícula en la instalación se determinó por el desarrollo de una biopelícula sobre los testigos. En la instalación, se aplicó un procedimiento de limpieza *in situ* específico, haciendo intervenir la composición según la invención, en presencia de testigos contaminados; la eficacia se demostró por la eliminación de las biopelículas formadas en los testigos.

30 La presencia e importancia de las biopelículas sobre los testigos se determinaron en laboratorio, por medio de la coloración de los testigos y comparación de la coloración obtenida con una escala visual (método HYDROBIO®, BKG), así como por observación a microscopía óptica (40x y 100x).

Se analizaron dos protocolos de limpieza: el primer protocolo sirvió de referencia y corresponde a la aplicación de soluciones conocidas en la técnica; el segundo protocolo incluye una etapa adicional de aplicación de una solución de la composición según la invención.

35 En particular, el protocolo I comprende las etapas siguientes: limpieza con agua, limpieza alcalina, enjuague, higienización (o desinfección) y enjuague final. El protocolo I se aplicó cada 32 horas durante una semana. La limpieza con agua se realizó durante 15 minutos a una temperatura comprendida entre 60 y 65°C. La limpieza alcalina permite limpiar las canalizaciones de la materia orgánica presente tras un ciclo de producción. Esta etapa se llevó a cabo con una solución de sosa al 3,5%, que se aplicó durante 2*15 minutos a una temperatura comprendida entre 70 y 75°C.

40 La etapa de higienización permite la eliminación de gérmenes que están eventualmente todavía presentes, pero sin la protección de la matriz de la biopelícula. Esta etapa comprendió la aplicación de una solución de Deptil OX al 1,5% (HYPRED) durante 2*15 minutos a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C. La solución de Deptil OX contiene una mezcla de ácido peracético y de peróxido de hidrógeno. Las etapas de enjuague se llevaron a cabo durante 15 minutos a una temperatura comprendida entre 20 y 25°C.

El protocolo II difirió del protocolo I por que comprendió una etapa de limpieza específica, previa a la etapa de higienización (o desinfección). Además, el protocolo II se aplicó solamente una vez.

45 La etapa de limpieza específica consistió en la aplicación de una solución de la composición según la invención. Esta mezcla se aplicó durante 30 minutos a una temperatura comprendida entre 40 y 45°C. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

50

Tabla 1

	Cantidad de biopelícula tras el protocolo I (g/m ²)	Cantidad de biopelícula tras el protocolo II (g/m ²)
Línea de producción 1	25	<5
Línea de producción 2	25 a 35	<5

5 El protocolo I no permitió limitar ni impedir el crecimiento de una biopelícula, a pesar de la etapa de higienización (desinfección). Por consiguiente, la biopelícula que se formó sobre los testigos de acero inoxidable en el centro de la instalación es muy resistente. La aplicación del protocolo II, que incluyó una etapa de limpieza específica con una solución de la composición según la invención, permitió una eliminación mucho más eficaz de esta biopelícula (por debajo del límite de detección). De este modo, se demuestra una eficacia superior de la limpieza específica que, por lo tanto, constituye una solución innovadora a los problemas de la técnica anterior.

Ejemplo 3

10 Se llevaron a cabo ensayos que permitieron comparar los valores óptimos de pH.

Se desarrollaron biopelículas sobre testigos de acero inoxidable previamente lavados y esterilizados. Se preparó un inóculo bacteriano (*Pseudomonas aeruginosa*) por cultivo durante 16 horas en un medio TSB al 10% (caldo de triptona soya). Este precultivo se diluyó para obtener una densidad óptica (DO) de 0,05 a 600 nm y se depositaron 500 µl de esta solución sobre cada testigo. Los testigos se incubaron durante 48 horas en placas de Petri mantenidas húmedas y colocadas en una estufa a 30°C. Después de 2 horas, se sustituyó la solución bacteriana con 500 µl de medio fresco, TSB al 10%. Después de 24 horas, se renovó este medio de cultivo.

15 A continuación, los testigos se limpiaron y se insertaron en soportes metálicos, separados por tuercas. Entonces, se introdujeron en soluciones de limpieza. Los testigos se mantuvieron sumergidos en las citadas soluciones de limpieza durante un tiempo total de 30 minutos.

20 Las soluciones de limpieza son las siguientes:

1. Composición según la invención a pH 4,5, inmersión durante 30 minutos
2. Composición según la invención a pH 7, inmersión durante 30 minutos
3. Composición según la invención a pH 9,7, inmersión durante 30 minutos

25 Seguidamente, los testigos se introdujeron en tubos de ensayo que contenían 10 ml de una solución de TSB + Tween 80 al 0,5% para el recuento de bacterias. Los tubos de ensayo se incubaron durante 5 minutos sobre la mesa, antes de ser tratados por sonicación durante 2 minutos treinta segundos y sometidos a tratamiento de vórtice durante 30 segundos. Se repitieron las etapas de incubación, sonicación y vórtice.

30 A continuación, se recuperaron los testigos y el medio que comprendió la solución TSB + tween al 0,5% se sometió a diluciones en serie usando agua peptonada (agua peptonada libre de indol: preparar 10 mL de una disolución a 15 g/L. Seguidamente, diluir 1 mL de esta solución en 1 litro de agua estéril) y, a continuación, se extendieron sobre una placa de Petri, incubando a 30°C durante una noche antes del recuento.

35 Asimismo, la biopelícula se sometió a coloración de la forma siguiente: los testigos se escurrieron y sumergieron en la solución de coloración selectiva para las proteínas de la matriz de la biopelícula durante 10 minutos. Seguidamente, los testigos se sumergieron en las diferentes soluciones de limpieza 1 a 3, anteriormente mencionadas, durante 10 minutos en 2 ocasiones (las soluciones de limpieza se sustituyeron entre las dos etapas de limpieza), antes de secar al aire libre.

Resultados:

A pH ácido (4,5): sobre la superficie de la placa de Petri se desarrolló una capa de bacterias, lo que indica la presencia de una gran cantidad de biopelícula residual en los testigos.

40 A pH neutro (7): sobre la superficie de la placa de Petri se desarrolló una capa de bacterias.

A pH alcalino (9,7): ausencia de bacterias en las placas de Petri.

45 La Figura 7 muestra los resultados de las coloraciones de las biopelículas. La Figura 7A ilustra los testigos antes de la limpieza con las soluciones limpiadoras 1 a 3, en tanto que la figura B ilustra los testigos de acero después de la limpieza con las soluciones 1 a 3 de izquierda a derecha. Tal como se puede observar, una limpieza a pH alcalino con la composición según la invención es claramente más eficaz que a pH ácido o a pH neutro; la biopelícula formada sobre el testigo se desprende por completo a pH alcalino, en tanto que persiste con otros valores de pH.

Ejemplo comparativo

Se llevó a cabo un ensayo dirigido a determinar la eficacia de cuatro enzimas con respecto a tres cepas bacterianas.

5 Los resultados de este ensayo se presentan en las Figuras 8 a 10. Las biopelículas se desarrollaron sobre testigos (12) de acero en conformidad con el Ejemplo 3.

Por lo tanto, se utilizaron cuatro testigos para cada cepa bacteriana (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus* y *Chryseobacterium meningosepticum*). A continuación, se enjuagaron los testigos con agua antes de incubarlos por separado durante 30 minutos con una solución de limpieza que contenía, respectivamente, una primera proteasa, una segunda proteasa, una lacasa y una polisacaridasa.

10 La Tabla 2 muestra el resultado de los recuentos bacterianos, mientras que las Figuras 8 a 10 presentan en la ordenada el logaritmo de los resultados de los recuentos bacterianos y en la abscisa, el tipo de enzima empleado.

Tabla 2.

	<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Nivel inicial de contaminación	2×10^8	7×10^6	2×10^8
Primera proteasa	4×10^5	7×10^2	1×10^2
Segunda proteasa	2×10^6	9×10^3	$3,8 \times 10^4$
Lacasa	8×10^3	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^2$
Amilasa	1×10^5	$9,6 \times 10^4$	$3,9 \times 10^6$

15 Tal como se puede observar, ciertas cepas bacterianas son más sensibles a la acción de la polisacaridasa y la lacasa, como ocurre con *Chryseobacterium meningosepticum* (Gram-). *Bacillus cereus* (Gram+) es en sí mismo más sensible a la combinación de las dos proteasas, en tanto que *Pseudomonas fluorescens* (Gram-) es más sensible a la combinación de la primera proteasa y lacasa.

20 Debe entenderse que la presente invención no está limitada en ningún caso a las realizaciones descritas anteriormente y que es posible realizar modificaciones sin desviarse del ámbito de las reivindicaciones adjuntas. Por ejemplo, en relación con los campos de aplicación de las composiciones según la invención, estas han demostrado ser especialmente útiles para un uso en remojo, por ejemplo, en el terreno hospitalario (limpieza de material de laboratorio, de material quirúrgico), o por circulación a través de tuberías tal como, por ejemplo, en la industria agroalimentaria, en las instalaciones de acondicionamiento de aire, en instalaciones de desalinización y potabilización de aguas, para los cascos de barcos y todo tipo de material sumergido, en circuitos de máquinas lavadoras, lavavajillas, etc. o también por remojo y por circulación en tuberías.

25

RESUMEN

“PROCEDIMIENTO DE ELIMINACIÓN DE BIOPELÍCULAS”

Procedimiento para la eliminación de biopelículas presentes en un sustrato.

REIVINDICACIONES

1. Método para la eliminación de biopelículas presentes sobre un sustrato, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) preparación de un componente detergente que comprende un agente secuestrante, así como un agente humectante y un agente dispersante, y de un componente enzimático que contiene al menos una proteasa, al menos una lacasa y al menos una polisacaridasa,
- b) disolver el componente detergente en una fase acuosa,
- 10 c) disolver el componente enzimático en la solución formada en la etapa b), para formar una solución de una composición para la eliminación de las biopelículas presentes sobre un sustrato, en donde dicha solución formada tiene un pH comprendido entre 6,5 y 7,5, o
- b') disolver el componente enzimático en una fase acuosa,
- c') disolver el componente detergente en la solución formada en la etapa b'), para formar una solución para la eliminación de biopelículas, en donde dicha solución formada tiene un pH comprendido entre 6,5 y 7,5,
- 15 d) aplicación de la solución de dicha composición, formada en la etapa c) o c'), sobre el sustrato durante un periodo predeterminado de tiempo, en particular comprendido entre 15 minutos y 4 horas,
- e) adición de una solución básica después de la citada aplicación d) de la solución de dicha composición sobre dicho sustrato, durante el citado periodo predeterminado de tiempo, con el fin de elevar el pH hasta aproximadamente 8 a 9.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado por que comprende, adicionalmente, una etapa posterior de aplicación de un biocida sobre el sustrato.