

Los biofilms como reto para la industria alimentaria

Carmen San José

Universidad Complutense de Madrid

Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de Alimentos

Los biofilms: poco conocidos pero por todas partes

- Definición: comunidades de células microbianas embebidas en una matriz de gel adhesivo, fijadas a una superficie
- Todos los microorganismos se adhieren (más o menos)
- Todas las superficies pueden ser soportes (más o menos)

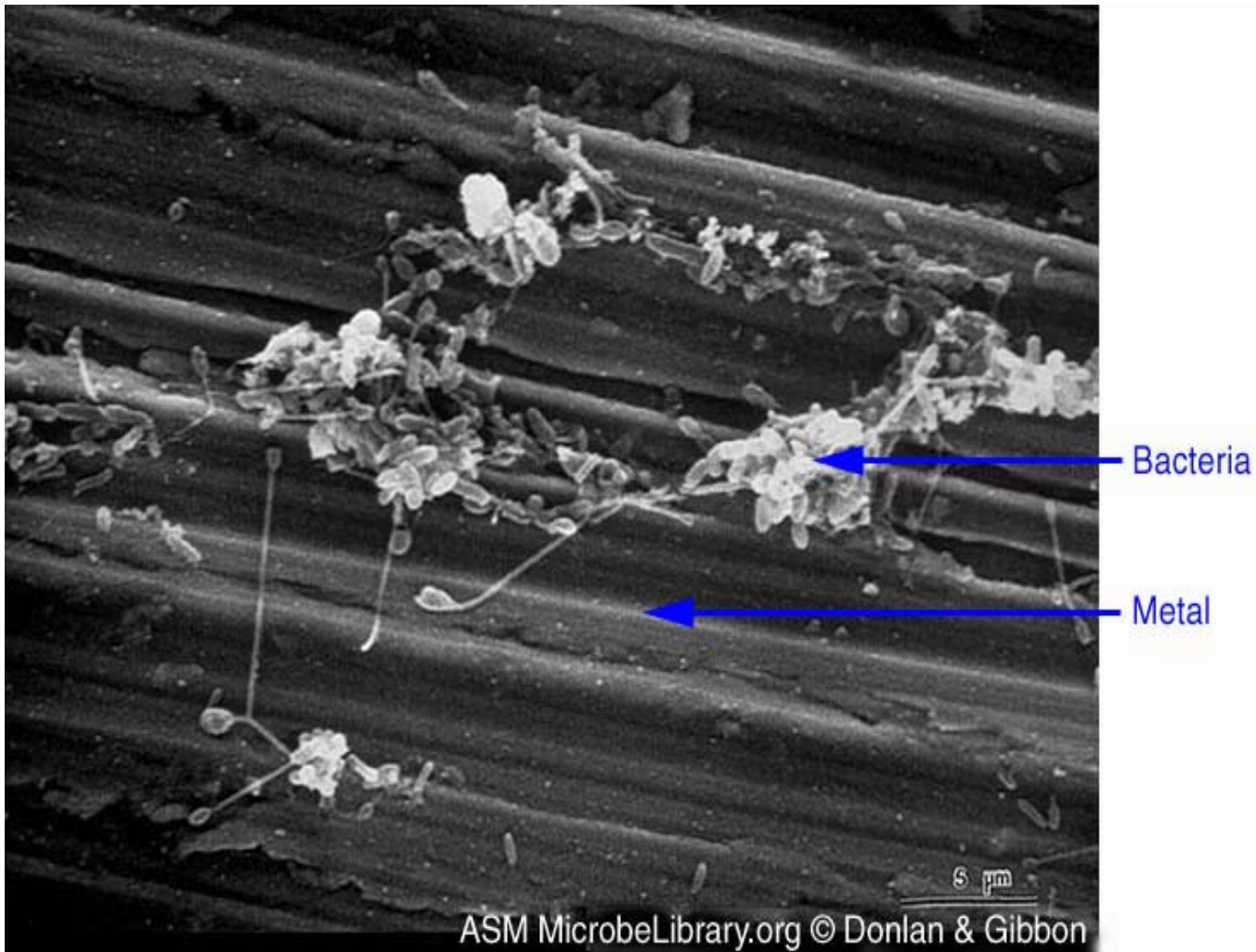
- Constituyen formas de resistencia (y no solo a la desecación)
- Forman estructuras organizativamente complejas, en el límite entre la vida uni- y multicelular

- Ignorados por la microbiología clásica (hasta hace poco)
- Ignorados por la legislación (previsiblemente por poco tiempo)

Grandes

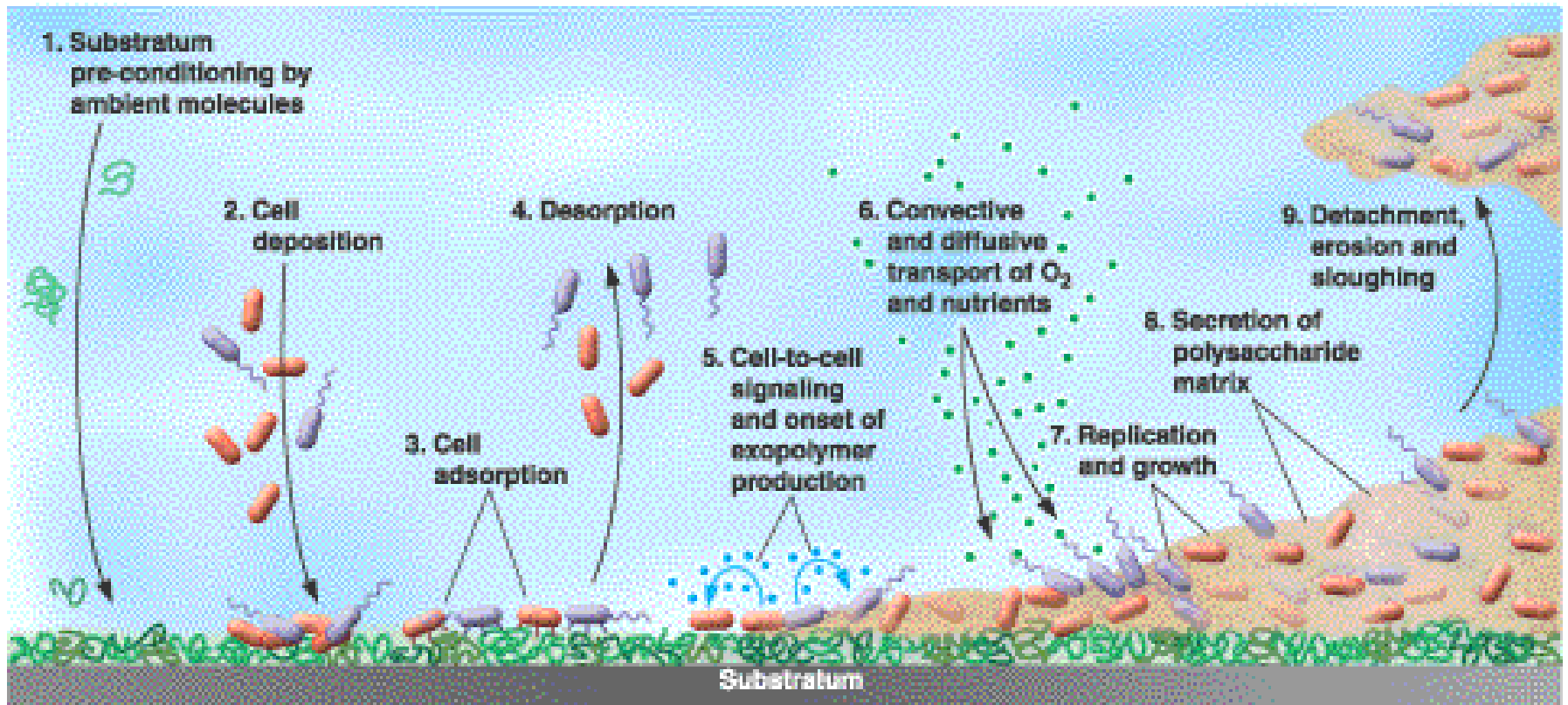


o pequeños

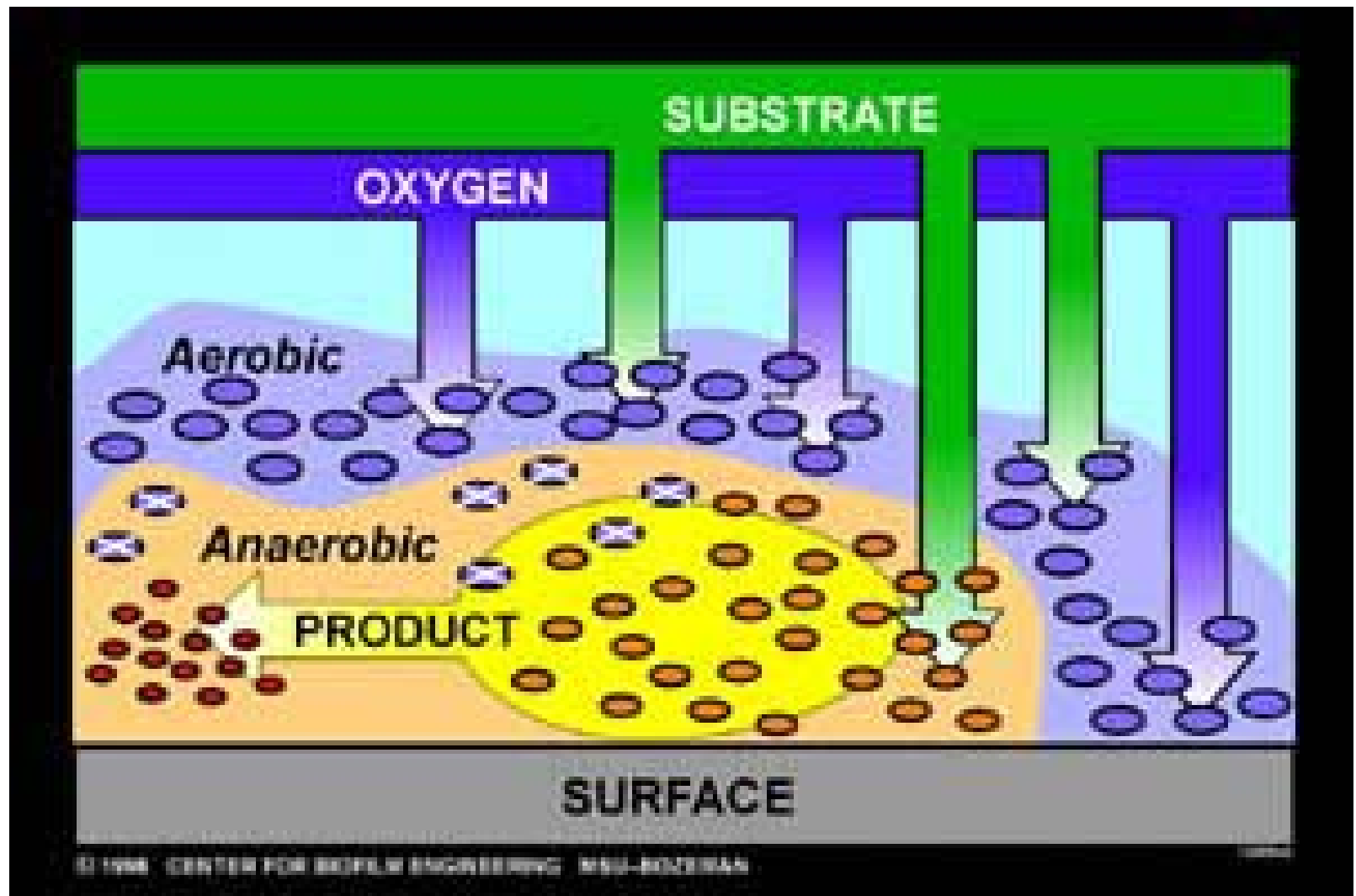


Microorganismos no identificados sobre la superficie (90:10 Cu/Ni) de un condensador industrial. Barra de escala=5μ

Esquema de la formación y desprendimiento de biofilms



Esquema de la estructura de un biofilm maduro



Vida sedentaria (biofilms) versus vida nómada (planctónica)

- El fenotipo adherido: papel de las señales y los mensajeros reguladores
- Equilibrio (cambiante) entre las dos formas de vida
- Biofilms mono- o multiespecies
- Diversos nichos, diversas especies y clones
- Distintas fisiologías, distintas velocidades de multiplicación
- Relaciones sociales transitorias y duraderas
- Mayor diversidad, mayor estabilidad

Estudios de laboratorio

- Cepas muy conocidas
- 1-2 cepas, rara vez microcosmos
- Medios de cultivo ricos, simples, bien conocidos
- Superficies de soporte de un solo uso, limpias, homogéneas, fácilmente desmontables y observables
- Técnicas de observación sofisticadas (microscopía, microelectrodos, marcajes, etc)

- **En condiciones reales:**
 - Muchas especies, conocidas o no, de viabilidad variable
 - Medios complejos, fluctuantes, a veces pobres o desequilibrados
 - Condiciones de stress (particularmente en la industria alimentaria)
 - Superficies gastadas, con estratificación de residuos
 - Técnicas de observación generalmente no directas

Biofilms en la industria alimentaria

Deseados:

- Como forma de inmovilización de células, para tratar efluentes y para obtención de algunos aditivos

Indeseados:

- Pueden alojar a los microorganismos recién llegados y a los ya residentes en la planta, expuestos y supervivientes a condiciones de stress (calor, frío, acidez, antimicrobianos, etc).
- Se limpian y desinfectan con dificultad.
- Causan problemas de **seguridad** (microorganismos patógenos), **calidad y vida útil** (microorganismos deteriorativos) y **tecnológicos**: recubrimiento de superficies de intercambio de calor, alteración del flujo de fluidos y oclusión de conductos y orificios, y daños a los materiales de las superficies, directos e indirectos, por la agresividad de los procedimientos mecánicos y químicos empleados para desalojarlos.

Porqué existen y persisten

- Se forman preferentemente en lugares donde se limpia poco, nada, mal o de tarde en tarde: allí tienen tiempo para crecer e incluso madurar.
- Las células están protegidas por la matriz frente a los agentes antimicrobianos y además, al multiplicarse más lentamente que las células planctónicas, son menos vulnerables a ellos.
- La matriz es un gel cohesivo, a veces firme, difícil de desprender.
- Los fragmentos de biofilm con células viables, al desprenderse pueden dispersarse en líquidos y aerosoles.
- Los aerosoles pueden mantenerse incluso horas; pueden depositarse sobre superficies en contacto con alimentos, o sobre alimentos ya procesados.
- Aunque las células sean destruidas por los desinfectantes, la matriz puede permanecer intacta o dejar residuos.
- Los restos de matriz facilitan la fijación de nuevas células y el desarrollo de nuevos biofilms.

TABLE 2. *Chlorine resistance of planktonic Listeria monocytogenes cells grown in tryptic soy broth at 32°C for 20 h*

Isolate	No. of tubes (of 9) with growth with chlorine concn (ppm) of:				Initial log CFU/ml	SD	Subtype ^a
	20	40	60	80			
12378	9	9	7	1	9.30	0.08	2b
YM-6	9	6	6	0	9.31	0.03	2d
YM-3	9	9	7	1	9.20	0.05	2d
302	9	9	8	2	9.26	0.23	1a
303	9	9	0	0	9.26	0.02	1a
961	9	9	0	0	9.04	0.33	1c
960	9	6	8	0	9.25	0.06	1c
18	9	9	0	0	9.43	0.46	3g
G3990	9	8	7	0	9.31	0.07	4g
SA	9	9	8	0	9.37	0.09	4g
12374	9	9	0	0	9.29	0.03	4g
17	9	9	9	0	9.16	0.17	4f
G3982	9	9	5	1	9.32	0.10	4f

^a Strains were subtyped in previous work (8).

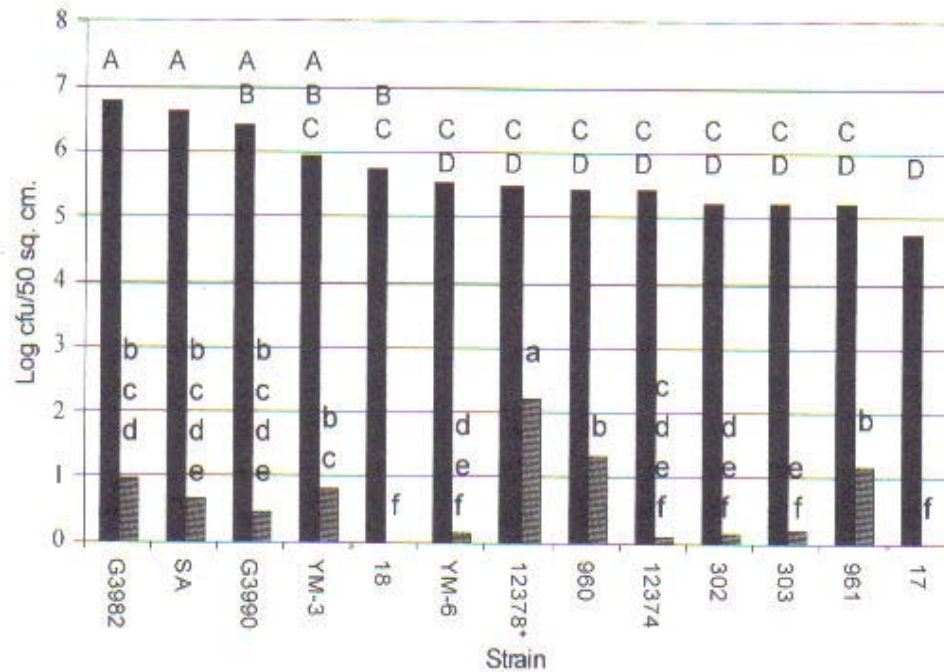


FIGURE 1. Viable *Listeria monocytogenes* (strain and subtype) in biofilms (log CFU/50 cm²) before and after treatment for 5 min with 60 ppm chlorine. Biofilms were grown at 32°C for 24 h in TSB. CFU on untreated biofilms were determined by plating detached cells on TSAYE with incubation at 32°C for 48 h. CFU on treated biofilms were determined by overlaying the treated surface with TSAYE containing 1 g/liter sodium pyruvate and 0.5 g/liter potassium tellurite with incubation at 32°C for 48 h. Letters above the bars indicate means (n = 4) separated using the Duncan's multiple range test ($\alpha = 0.05$). *Average depicted for isolate includes estimates from two trials in which colonies were too numerous to count (>500).

Recursos actuales contra biofilms

- Prevenir e identificar dónde se forman: sitios con agua, materia orgánica y microorganismos contaminantes, y con limpieza y desinfección insuficiente.
- Eliminar esos sitios (secando, evitando salpicaduras y entrada/persistencia de contaminantes, sustituyendo los elementos con peor diseño higiénico), o limpiarlos mejor.
- Poner a punto procedimientos especiales de limpieza y desinfección para la eliminación de biofilms:
 - procedimientos mecánicos que no causen abrasión
 - agentes enzimáticos (para degradar la matriz)
 - quelantes (para desestabilizar la matriz)
 - procedimientos químicos convencionales con mayores concentraciones o mayor tiempo de exposición
 - control de aerosoles
- Verificar periódicamente la eficacia de estos métodos.

Bibliografía seleccionada

Revisión de alimentos:

1. **Chmielewski and J.F. Frank (2004)** "Biofilm formation and control in food processing facilities" *Comprehensive Rev. Food Sci. & Food Safety* 2, 22-32 (disponible en www.ift.org)

Revisiones generales:

2. **Beloin C. and J.-M. Ghigo (2005)** "Finding gene-expression patterns in bacterial biofilms" *Trends in Microbiology* 13, 16-20.
3. **Donlan R.M. and J.W. Costerton (2002)** "Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms" *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 167-193.
4. **Hall-Stoodley L. and P. Stoodley (2005)** "Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens" *Trends in Microbiology* 13, 7-10.
5. **Kolter R. and E.P. Greenberg (2006)** "The superficial life of microbes" *Nature* 441: 300-3002. (**introducción breve y amena**)
6. **Stoodley P., K. Sauer, D.G. Davies and J.W. Costerton (2002)** "Biofilms as complex differentiated communities" *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 187-209.