

Imagen de microscopía electrónica de un biofilm formado por un gran número de bacterias *Staphylococcus aureus* y una estructura gelatinosa compuesta por la matriz extracelular

CONTROL DE LA PRESENCIA DE BIOFILMS EN LAS INDUSTRIAS ALIMENTARIAS

EN ESTE ARTÍCULO, SE DESCRIBE LA PROBLEMÁTICA OCASIONADA POR LA PRESENCIA DE BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA, ASÍ COMO DE LAS HERRAMIENTAS DISPONIBLES PARA SU DETECCIÓN Y ELIMINACIÓN. LOS BIOFILMS CONSTITUYEN UN ECOSISTEMA QUE FAVORECE EL CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS Y LOS PROTEGE DE CONDICIONES ADVERSAS DEL MEDIO, LO QUE DIFICULTA SU ELIMINACIÓN POR MÉTODOS CONVENCIONALES. ASIMISMO, LAS TÉCNICAS HABITUALMENTE EMPLEADAS PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA RESULTAN INSUFICIENTES PARA CONTROLAR LA PRESENCIA DE BIOFILMS EN LAS INSTALACIONES

Fernando Lorenzo Cartón,
Enrique J. Orihuel Inanzo,
Ramón Bertó Navarro y
Celia López Tormo

Betelgeux, S.L.
www.betelgeux.es

Betelgeux ha desarrollado una nueva herramienta que supera las dificultades para la detección sencilla y específica de biofilms, lo que permite mejorar el control de las condiciones higiénicas. Es necesario incluir, en los protocolos de control de la higiene, acciones específicas que consideren las particulares características de los biofilms para su detección y eliminación, con el fin de garantizar una correcta higiene de las instalaciones

Los biofilms o biopelículas son un caso particular de contaminación microbiológica. Los biofilms están constituidos por agrupaciones de bacterias adheridas entre sí y a una superficie, y embebidas en una matriz gelatinosa y adhesiva de naturaleza polimérica. Esta matriz extracelular es generada por los propios microorganismos y se compone de una mezcla de proteínas, polisacáridos, lípidos y ácidos nucleicos.



La formación de biofilms implica la adhesión de residuos orgánicos, la colonización por bacterias, la formación de la matriz extracelular y, finalmente, la maduración y la expansión del biofilm

La estructura del biofilm actúa como elemento protector de los microorganismos alojados mediante la concentración de nutrientes, la minimización del contacto con biocidas y otras sustancias agresivas y la prevención de la desecación del entorno. Estos factores contribuyen a que los procesos de limpieza y desinfección habitualmente efectivos frente a patógenos planctónicos (no asociados entre sí) resulten generalmente inadecuados para la eliminación de la contaminación en forma de biofilms. La formación de biofilms se produce en las industrias alimentarias en superficies en contacto con alimentos, tanto en sistemas cerrados (tuberías y circuitos), como en sistemas abiertos (mesas, cintas

de transporte, instrumentos de trabajo, etc.), debido a la presencia de microorganismos y de condiciones que facilitan su implantación y desarrollo, como son la disponibilidad de nutrientes, humedad y un sustrato adecuado. Los microorganismos en estado libre (planctónicas) pueden pasar a un estado sedentario al adherirse a restos de residuos orgánicos en las superficies, o también como respuesta a situaciones de estrés ambiental, como baja disponibilidad de nutrientes o variación de las condiciones físicoquímicas del medio. Este paso conlleva un cambio en el fenotipo de las células que las hace más aptas para su desarrollo en el entorno del biofilm. El proceso de formación del biofilm generalmente comprende una secuencia de etapas comunes en la mayoría de sistemasⁱⁱ, que son cuatro: depósito de residuos orgánicos sobre la superficie; colonización de estos restos por bacterias que se adhieren asimismo a la superficie; comunicación entre moléculas a través del mecanismo conocido como quórum sensing e inducción de la producción de la matriz extracelular; y maduración del biofilm mediante la asimilación de sustratos y crecimiento de las colonias, desprendimiento de componentes del biofilm y colonización de nuevas superficies. La gran mayoría de microorganismos son capaces de formar parte de biofilms y, de hecho, este estado es más común que el de célula planctónica debido a las ventajas ofrecidas por el biofilm respecto a protección frente a condiciones ambientales adversas y favorecimiento del crecimiento bacteriano. Por esta razón, la formación de biofilms es un aspecto importante a considerar en el mantenimiento de higiene en industria alimentaria, ya que se han reportado casos de infecciones debidas a patógenos asociados con biofilms, como es el caso de *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. y *Escherichia coli*. La formación de biofilms es una causa de problemas sanitarios y operativos en las instalaciones de producción y de manipulación de alimentos. Desde el punto de vista higiénico, los biofilms actúan como punto de anclaje y reservorio de microorganismos patógenos y alterantes, protegiéndolos frente a la acción de desinfectantes y constituyendo una fuente de contaminaciones cruzadas de los alimentos, no sólo en el lugar donde se forman sino también en puntos lejanos de las instalaciones debido al arrastre de pedazos del biofilm. Asimismo, el crecimiento incontrolado de biofilms puede causar obturaciones de tuberías conducciones y membranas, limitando o dificultando el flujo y la transferencia de energía y dando lugar a la degradación de los materiales.

Métodos para la detección de biofilms

En condiciones normales de limpieza y desinfección, los biofilms que puedan estar presentes en las superficies son indetectables a simple vista debido a su tamaño microscópico. Además, éstos suelen aparecer con mayor frecuencia en puntos de difícil acceso para los operarios de limpieza o incluso para los detergentes y desinfectantes (zonas altas, recodos, esquinas, etc.), de manera que es difícil acceder a ellos también para el muestreo e inspección higiénica. Los biofilms también se forman en defectos de las superficies, como grietas, ralladuras u oquedades, que son

LAS TÉCNICAS HABITUALES PARA EL CONTROL DE LA CONTAMINACIÓN MICROBIOLÓGICA RESULTAN INSUFICIENTES PARA CONTROLAR LA PRESENCIA DE BIOFILMS EN LAS INSTALACIONES

difíciles de inspeccionar por métodos tradicionales. Actualmente, el control de la contaminación microbiológica se realiza empleando métodos enfocados a la detección de patógenos viables o de componentes celulares o de residuos orgánicos.

Control por luminiscencia de ATP

La bioluminiscencia de ATP es una técnica rápida para evaluar el estado higiénico de las instalaciones, y permite medir los niveles residuales de restos orgánicos o microbiológicos en superficies y aguas. Esta técnica está basada en la reacción de las moléculas de ATP, presentes en restos celulares con enzimas de tipo luciferasa, que resulta en la emisión de luz con una intensidad proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra. Esta metodología requiere el uso de hisopos o escobillas para muestrear las superficies o aguas y recoger los residuos orgánicos allí presentes. A continuación, estos hisopos se introducen en un medio reactivo y se introducen en un aparato diseñado para la medida de la bioluminiscencia emitida. Se pueden obtener así resultados rápidos (entre 5 y 10 minutos) cuantitativos sobre el estado higiénico de las instalaciones. Sin embargo, esta técnica está más bien orientada a la evaluación de la eficacia de los procesos de limpieza y desinfección, ya que la señal medida proviene tanto de microorganismos activos o inactivos como de residuos de alimentos.

Control por muestreo de superficies y cultivo

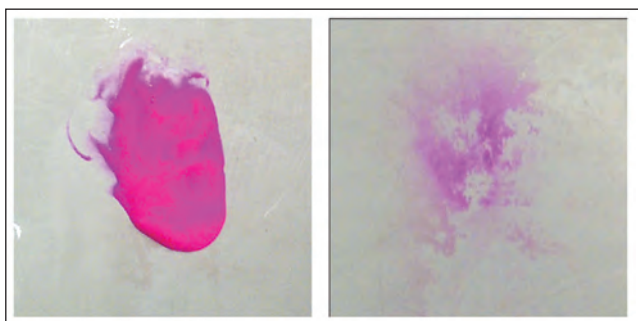
Los métodos más comunes de control de la contaminación microbiológica en superficies están basados en el muestreo de las mismas, en la incubación en un medio de cultivo y en el recuento para determinar los niveles de contaminación. El muestreo puede llevarse a cabo bien mediante el uso de escobillas o esponjas humedecidas o mediante la aplicación directa de placas con agar solidificado sobre la superficie. En el primer caso, el líquido recogido se incuba en un medio para el posterior recuento e identificación de colonias. El empleo de medios de cultivo selectivos permite la identificación de microorganismos específicos, si esto es necesario. En el caso de la utilización de placas de contacto, los microorganismos son transferidos directamente de la superficie al medio de cultivo, simplificando el proceso de análisis y reduciendo el tiempo necesario para la obtención de resultados. Sin embargo, este método limita la selectividad del análisis por el empleo de medios genéricos y la reproducibilidad del muestreo por la influencia de la presión aplicada, el tiempo, la adherencia de los distintos microorganismos y las características de la superficie.

Nuevas tecnologías para la detección rápida de biofilms

Los métodos de control microbiológico anteriormente reseñados implican un elevado coste de muestreo en el caso de la bioluminiscencia de ATP o largos tiempos de análisis, superiores a las 24 horas, en el caso del cultivo de muestras de superficies. De forma más significativa, estas técnicas no permiten evaluar la posible presencia de biofilms en las superficies, ya que están orientadas a la detección de restos celulares o microorganismos viables independientemente del estado de su asociación. Las especiales características de los biofilms, que requieren un protocolo específico para su eliminación, y su potencial peligrosidad como foco de contaminación microbiológica hacen necesaria la utilización de técnicas que permitan determinar con certeza la presencia de biofilms. En los últimos años, se han desarrollado nuevas metodologías para la detección de biofilms generalmente basadas en inmunoensayos, PCR, microscopía confocal o técnicas de fluorescencia. Sin embargo, estas técnicas requieren procedimientos analíticos complejos y equipos costosos que no suelen estar al alcance de las industrias productoras de alimentos, por lo que se hace necesario de disponer de técnicas rápidas y selectivas pero, sobre todo, sencillas y económicas, que faciliten el control de la contaminación por biofilms. Con el objetivo de cubrir esta necesidad, Betelgeux ha llevado a cabo un proyecto de I+D+i, en colaboración con el Departamento de Tecnología de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid y el centro tecnológico Ainia. Este proyecto, subvencionado por el CDTI, ha estado enfocado al desarrollo de nuevas herramientas para la detección y eliminación de biofilms que mejoren las soluciones disponibles actualmente para el control de la contaminación por biofilms. El diseño de una técnica para la detección selectiva de biofilms

BETELGEUX HA DESARROLLADO UNA NUEVA HERRAMIENTA QUE PERMITE LA DETECCIÓN SENCILLA Y ESPECÍFICA DE BIOFILMS, CON EL FIN DE MEJORAR EL CONTROL DE LAS CONDICIONES HIGIÉNICAS

EL DISEÑO DE LA TÉCNICA DE DETECCIÓN SELECTIVA DE BIOFILMS DE BETELGEUX SE BASA EN EL EMPLEO DE AGENTES DE TINCIÓN CAPACES DE TEÑIR LA MATRIZ EXTRACELULAR QUE FORMA PARTE DE LA ESTRUCTURA DE LOS BIOFILMS



La aplicación y posterior aclarado del producto TBF 300 en una superficie de acero revela la presencia de biofilm por medio de una coloración permanente y detectable a simple vista

se basó en el empleo de agentes de tinción capaces de teñir la matriz extracelular que forma parte de la estructura de los biofilms. Estos colorantes se seleccionaron en función de su capacidad para teñir biofilms formados por algunos de los patógenos más comunes en la industria alimentaria (*Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*) y la ausencia de coloración en presencia de residuos habituales en las industrias alimentarias (grasa, proteínas, aceites, etc.). Asimismo, se desarrolló un sistema para la aplicación de estos agentes de tinción sobre las superficies en forma de espuma, con el objetivo de facilitar la aplicación en un área de muestreo determinada y asegurar el tiempo de contacto necesario para la tinción del biofilm.

La identificación de la presencia de biofilms se produce tras el aclarado con agua de la superficie analizada, eliminando la espuma colorante y revelando zonas de crecimiento de biofilm que muestran una coloración permanente de color fucsia.

Como resultado de este proyecto, ya se encuentra disponible el test de detección de biofilms TBF 300, una novedosa herramienta que permite la detección rápida, sencilla y selectiva de biofilms en superficies como acero, aluminio o teflón, con un coste por muestra inferior a otras técnicas como la bioluminiscencia de ATP o el cultivo de placas. Este producto se ha ensayado en diversas industrias alimentarias, demostrando ser una herramienta muy útil para la identificación rápida de puntos donde la limpieza y desinfección no ha conseguido eliminar los biofilms presentes y que requieren una higienización más exhaustiva. De este modo, se facilita el control de la higiene en las instalaciones y se previenen contaminaciones persistentes que puedan afectar a los alimentos. TBF 300 se presenta en envases de 150 ml, fácilmente transportables y almacenables, y que permiten muestrear alrededor de 300 puntos (área de muestreo recomendada de 10 cm²), resultando así adecuado para su utilización rutinaria como parte del plan de control de la higiene de las instalaciones. El producto se aplica en forma de espuma sobre los puntos de muestreo deseados en las superficies a analizar. Tras un tiempo de contacto de cinco minutos, la espuma se aclara fácilmente con agua, arrastrando el colorante excepto en aquellas zonas en donde haya crecido un biofilm. Estas zonas contaminadas quedan marcadas tras el aclarado y son fácilmente identificables a simple vista. De este modo, la detección de zonas con presencia de biofilms se realiza de una forma rápida y sencilla.

Protocolos para el control de la presencia de biofilms

La presencia de biofilms en las industrias alimentarias supone un peligro potencial debido a que pueden actuar como reservorio de patógenos causantes de alteraciones en los alimentos o enfermedades en los consumidores y trabajadores. Los métodos de control microbiológico y desinfección habituales no son eficaces frente a este tipo de contaminación microbiológica, ya que están diseñados para controlar bacterias en estado libre. Por esta razón, resulta necesario incluir en los planes de APPCC de las industrias alimentarias precauciones especiales para detectar la posible presencia de biofilms y asegurar su eliminación de forma eficaz. Un aspecto importante del control de biofilms consiste en la identificación de puntos negros en las instalaciones. Estas zonas o puntos tienen especiales dificultades para su higienización y suelen presentar de forma persistente niveles inadecuados contaminación microbiológica, generalmente en forma de biofilms. La identificación de puntos negros y de otros puntos críticos que puedan favorecer la presencia de patógenos se basa en el análisis de las instalaciones y de las operaciones, tanto de producción como de limpieza y desinfección que tienen lugar. El control de estos puntos críticos es necesario para asegurar que los niveles de contaminación se sitúan dentro de los límites de aceptabilidad. Especialmente, se hace necesario determinar la posible presencia de biofilms que puedan ser causantes de futuras contaminaciones. La confirmación de la presencia o ausencia de biofilms en las superficies requiere el uso de técnicas adecuadas para este fin. El muestreo de superficies y medida de bioluminiscencia de ATP proporciona información rápida sobre el estado higiénico de las instalaciones, pero no permite determinar si la contaminación

detectada corresponde a un biofilm. Por otra parte, el muestreo microbiológico responde sólo a microorganismos viables y puede dar lugar a falsos negativos en el caso de biofilms. Por estas razones, resulta necesario implantar, en los sistemas de control de la higiene, la utilización de técnicas específicas para la detección de biofilms. En este sentido, el test de detección de biofilms desarrollado por Betelgeux, TBF 300, permite el muestreo de distintos puntos en las superficies de interés y la detección de áreas de crecimiento de biofilms para su posterior tratamiento. La eliminación de biofilms requiere el tratamiento de las superficies con productos específicos que sean capaces de degradar la matriz extracelular del biofilm. Estos productos deben ser empleados entre las fases de limpieza y desinfección, con el objetivo de conseguir una degradación eficaz de la matriz protectora en ausencia de residuos y permitir el acceso del desinfectante a los microorganismos, facilitando su eliminación. La utilización periódica de productos específicos para la eliminación de biofilms previene el crecimiento de los mismos y debe ser implantada como mecanismo para la mejora de las condiciones higiénicas en las instalaciones. Finalmente, es necesario evaluar la eficacia de estas operaciones de limpieza y desinfección y tratamientos específicos para la eliminación de biofilms, empleando las técnicas antes descritas con el fin de asegurar una correcta higiene.

Conclusiones

La presencia de biofilms supone un motivo de preocupación en la industria alimentaria, ya que suponen una fuente potencial de contaminación microbiológica y de degradación de los equipos y materiales. Los biofilms son generalmente resistentes a los métodos de limpieza y desinfección generalmente empleados, y los métodos de control microbiológico actuales resultan insuficientes para su detección e identificación. Por estos motivos, es necesario implantar como parte de los planes de APPCC protocolos específicos para el control de la presencia de biofilms. Estos protocolos deben incluir la utilización de técnicas para la detección de biofilms y el empleo de productos adecuados para su eliminación eficaz. Betelgeux ha desarrollado una nueva herramienta para la detección selectiva de biofilms, TBF 300, así como una gama de detergentes diseñados para la eliminación eficaz de los mismos.

DENTRO DE LOS PLANES DE APPCC, ES NECESARIO IMPLANTAR PROTOCOLOS ESPECÍFICOS PARA CONTROLAR LA PRESENCIA DE BIOFILMS, DETECTÁNDOLOS CON HERRAMIENTAS COMO LA TBF 300 DE BETELGEUX

• REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA DE AUTORES
La bibliografía completa de este artículo puede ser solicitada en alimentacion@rbi.es

SERVICIO EXCLUSIVO PARA SUSCRIPTORES

Nuevas herramientas para la DETECCIÓN Y ELIMINACIÓN DE BIOFILMS

TBF300 Detección rápida de Biofilms

BETELENE BF31 Nuevos productos para la
BETELENE BF31EC Eliminación de Biofilms



 Betelgeux

www.betelgeux.es - Tel: 962 871 345 - betelgeux@betelgeux.es