



Universidad Complutense de Madrid  
Depto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos

---

# Los biofilms como reto para la industria alimentaria

**Carmen San José Serrán**

[serran@vet.ucm.es](mailto:serran@vet.ucm.es)

**Vigo, 12 de abril de 2011**

# ¿Qué es un biofilm microbiano?

- Una comunidad de **MICROORGANISMOS** que crecen agregados en una interfase. Los más estudiados son los presentes en interfases sólido/líquido y en las sólido/aire en ambiente húmedo. En esos casos se pegan a la superficie.
- Se entiende que la superficie sólida es **INERTE**, o al menos no interacciona específicamente con los microorganismos. Según este criterio, no se suele considerar como biofilm la microbiota intestinal, pero sí la placa dental, o los microorganismos adheridos a frutas y hortalizas mínimamente procesadas.
- En los biofilms, las células microbianas están embebidas en una **MATRIZ** gelatinosa y cohesiva. Está constituida por agua, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos e iones varios. La mayor parte suelen ser materiales extracelulares producidos por las células embebidas, pero hay también ahí restos de células muertas y materiales captados del entorno. La matriz proporciona protección y un entorno confinado.

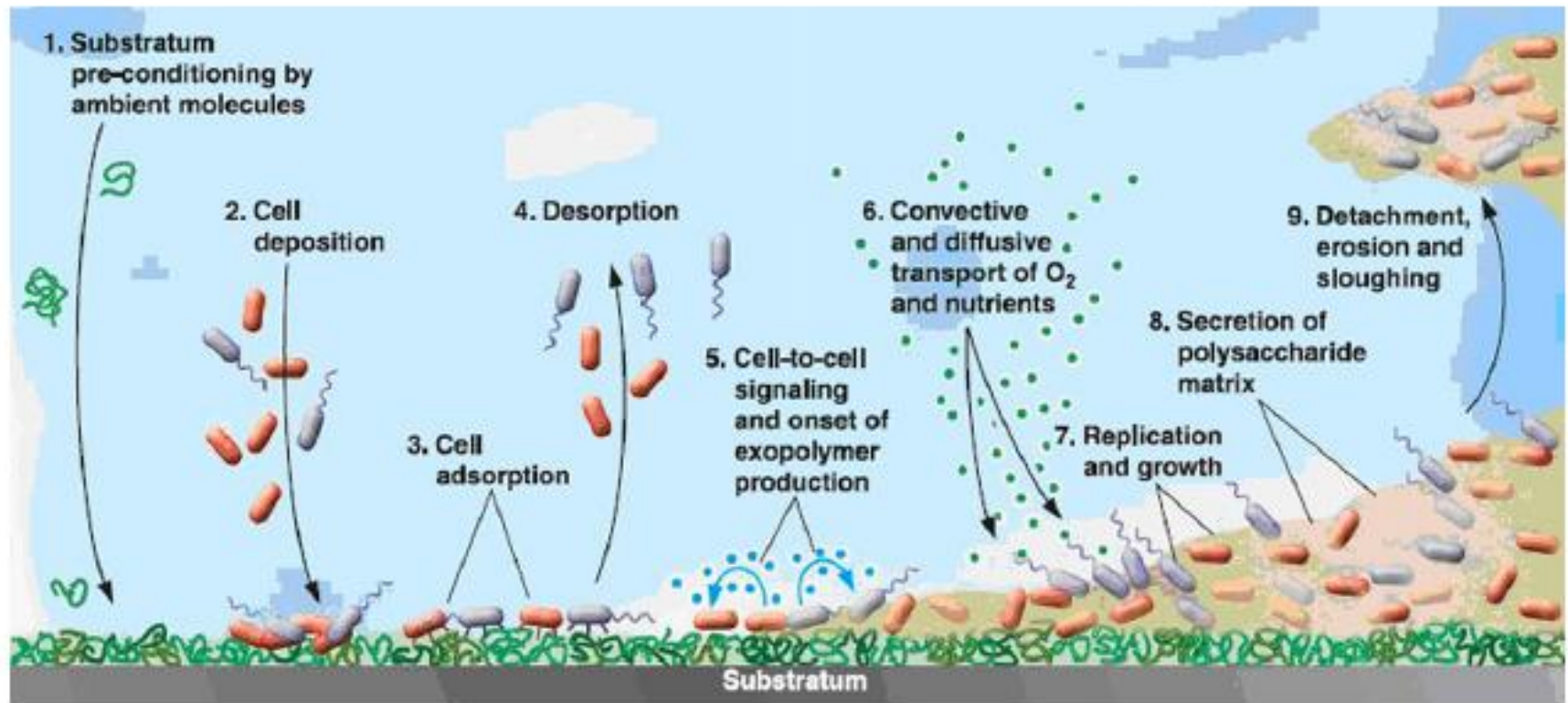
# ¿Qué microorganismos se adhieren y sobre qué?

- **Arqueas, bacterias, levaduras, algas: todos** los organismos unicelulares ensayados. Diversos protozoos pueden “pastar” sobre biofilms microbianos. La velocidad de formación de biofilms, sin embargo, depende del microorganismo, superficie, nutrientes, temperatura, y otras condiciones ambientales.
- **Sería la forma de crecimiento “por defecto”**. Se cree que en la naturaleza hay más microorganismos adheridos (o sea en biofilms) que planctónicos (esto es, en suspensión). Hay **paso de células**, entre la población adherida y la planctónica, en un sentido u otro, según las condiciones ambientales.
- Los biofilms naturales (no de laboratorio) son habitualmente **consorcios, con más de una especie**. Algunos se comportan como colonizadores primarios de una superficie, acogiendo a otros.
- **Cualquier superficie** puede servir como soporte (mineral, cerámica, metálica, polimérica, etc) aunque algunas puedan ser más favorables que otras (por su microtopografía, hidrofobicidad, iones liberados, etc).

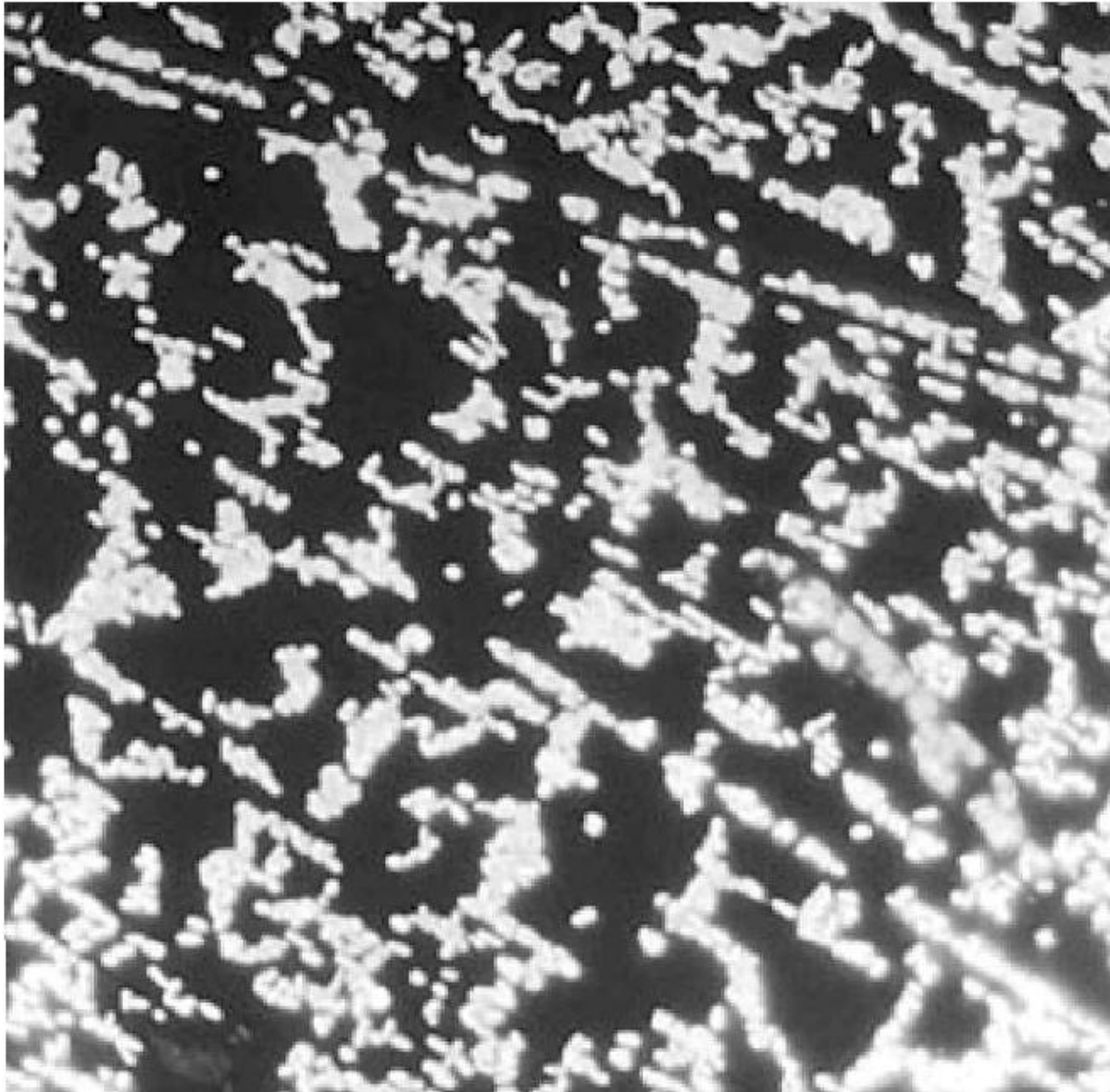
## Ventajas de la vida en biofilms (para los microorganismos)

- Condiciones ambientales más estables
- Supervivencia en nichos favorables, sin ser arrastrados de allí por el flujo de líquido
- Mayor resistencia a la desecación
- Mayor resistencia a biocidas, anticuerpos y macrófagos
- Comensalismo o cooperación con organismos de aptitudes fisiológicas diferentes
- La proximidad favorece la transferencia horizontal de genes

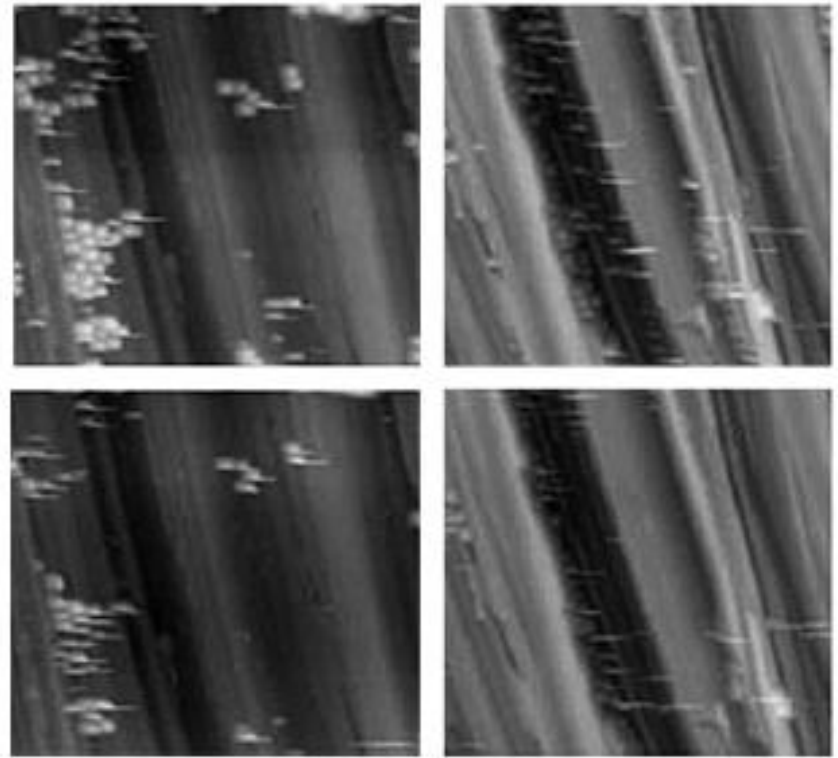
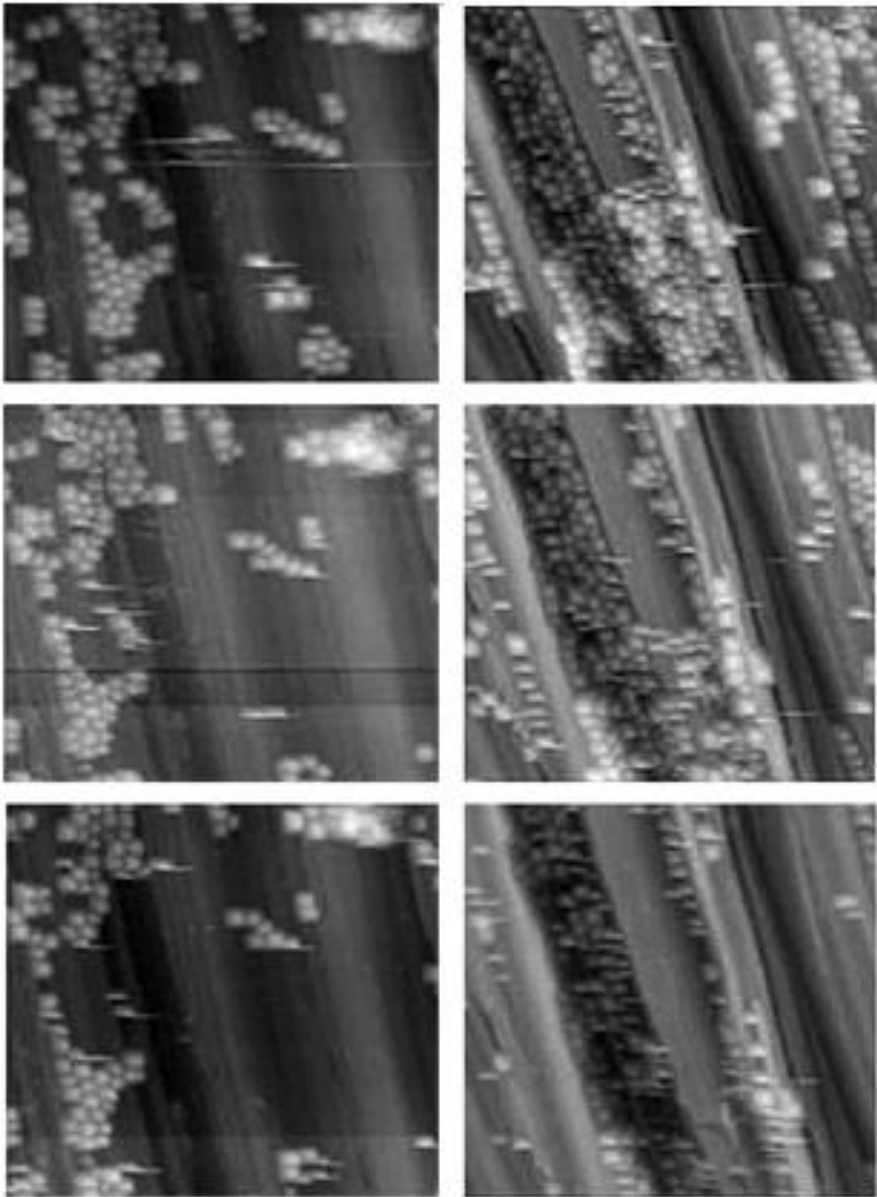
# Aspectos de la formación y desprendimiento de biofilms.



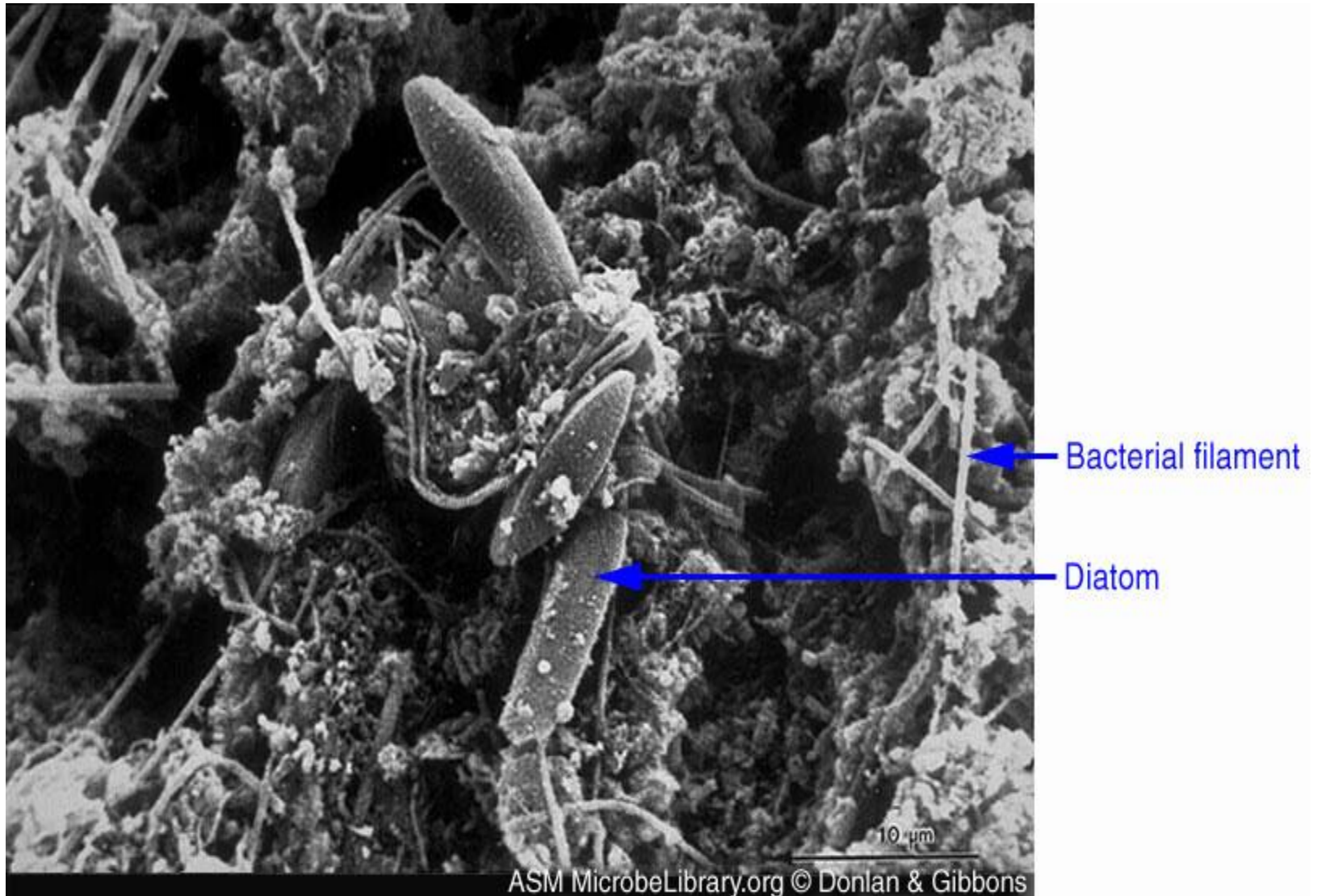
(Breyers y Ratner 2004, por cortesía de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM)).



Microscopía de epifluorescencia directa. Bacterias retenidas en los arañazos de una superficie de acero inoxidable que ha sufrido abrasión (Verran 2002)



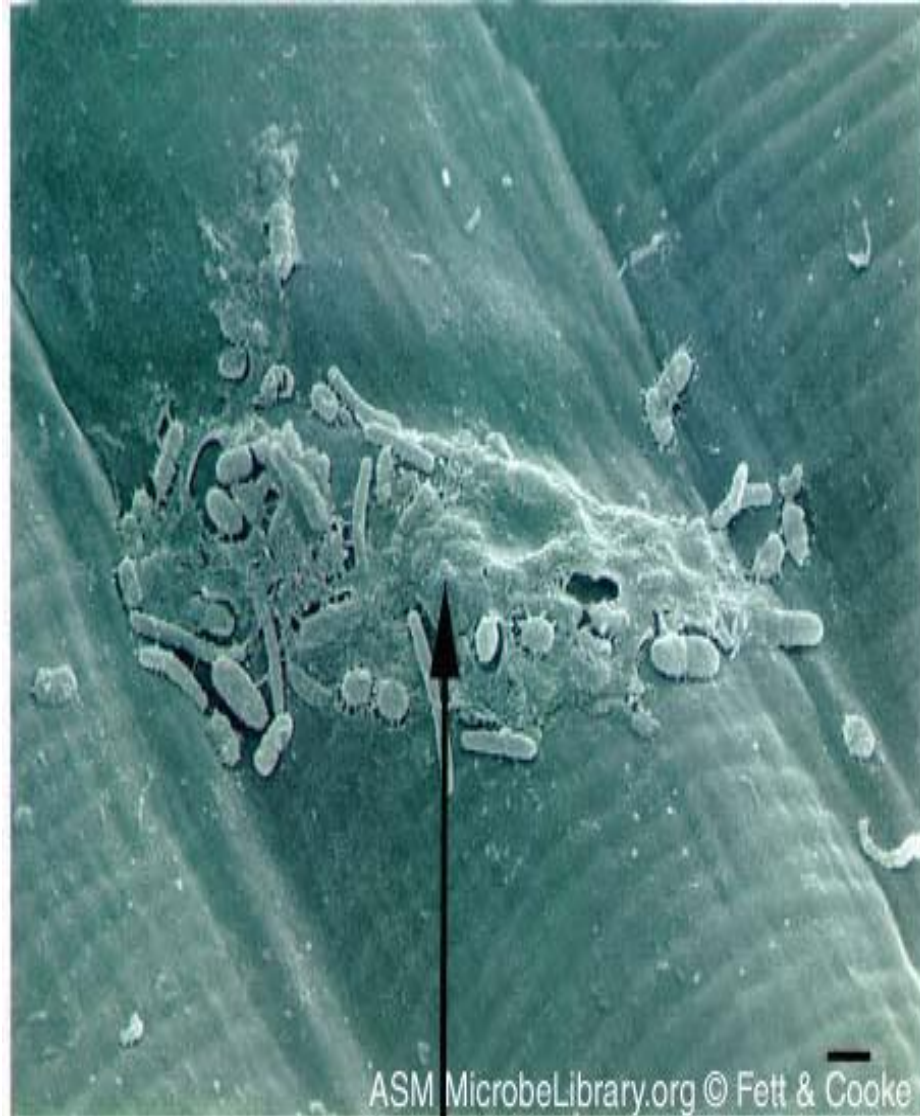
Células de *Staphylococcus aureus* adheridas sobre acero inoxidable, antes y después de un cepillado con agua y detergente. Imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM). (Verran, 2008)



Microorganismos no identificados en un condensador industrial de acero blando, tras 8 semanas de exposición. El biofilm incluye productos de corrosión, partículas de arcilla, diversos tipos de bacterias y diatomeas. SEM. Barra de escala = 10 μ



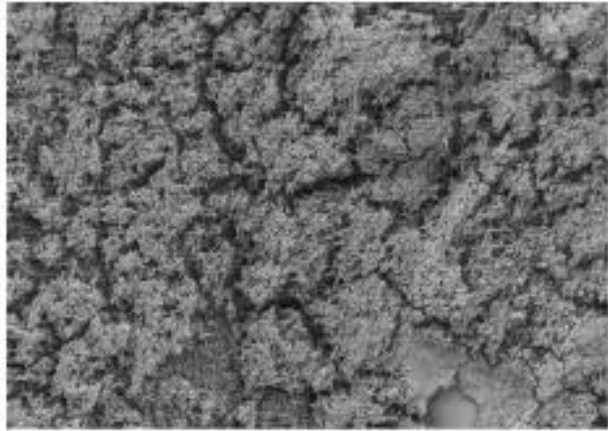
## Brotos de alfalfa



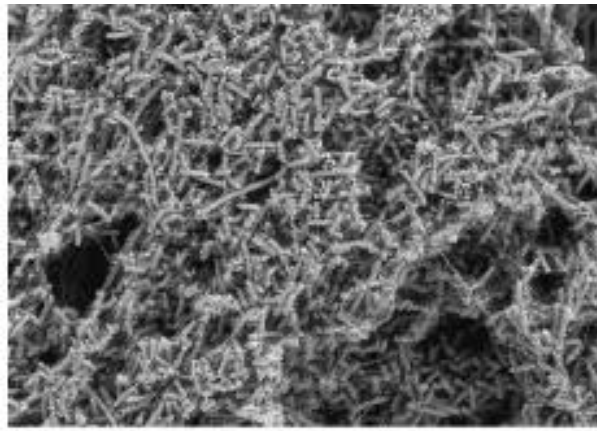
Bacterial exopolysaccharide

BAR= 1 $\mu$ m

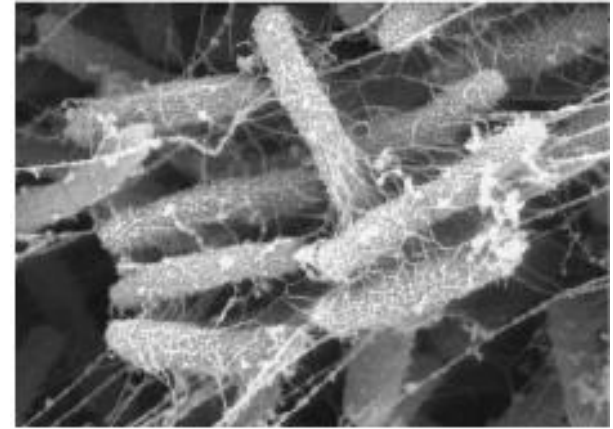
Biofilm natural sobre hipocotilo de brote de alfalfa.  
Bacterias no identificadas, incluyendo cocos y bacilos.



X 50

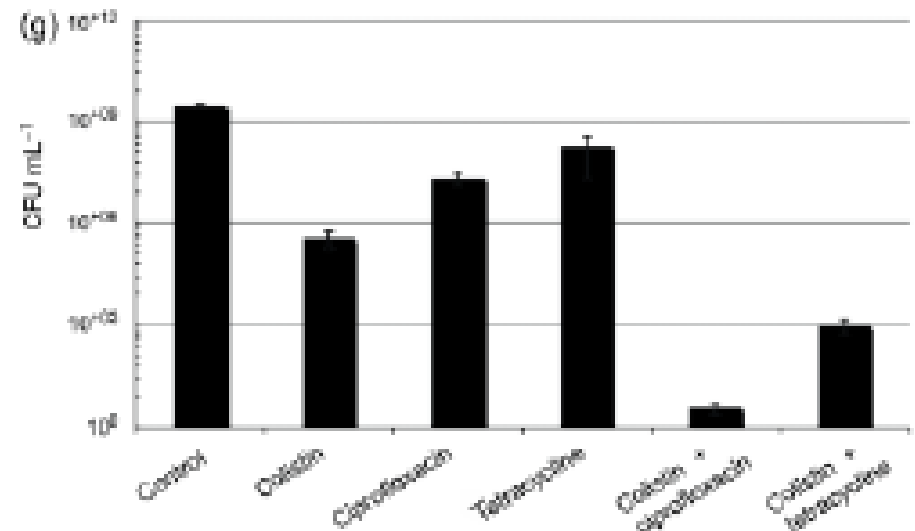
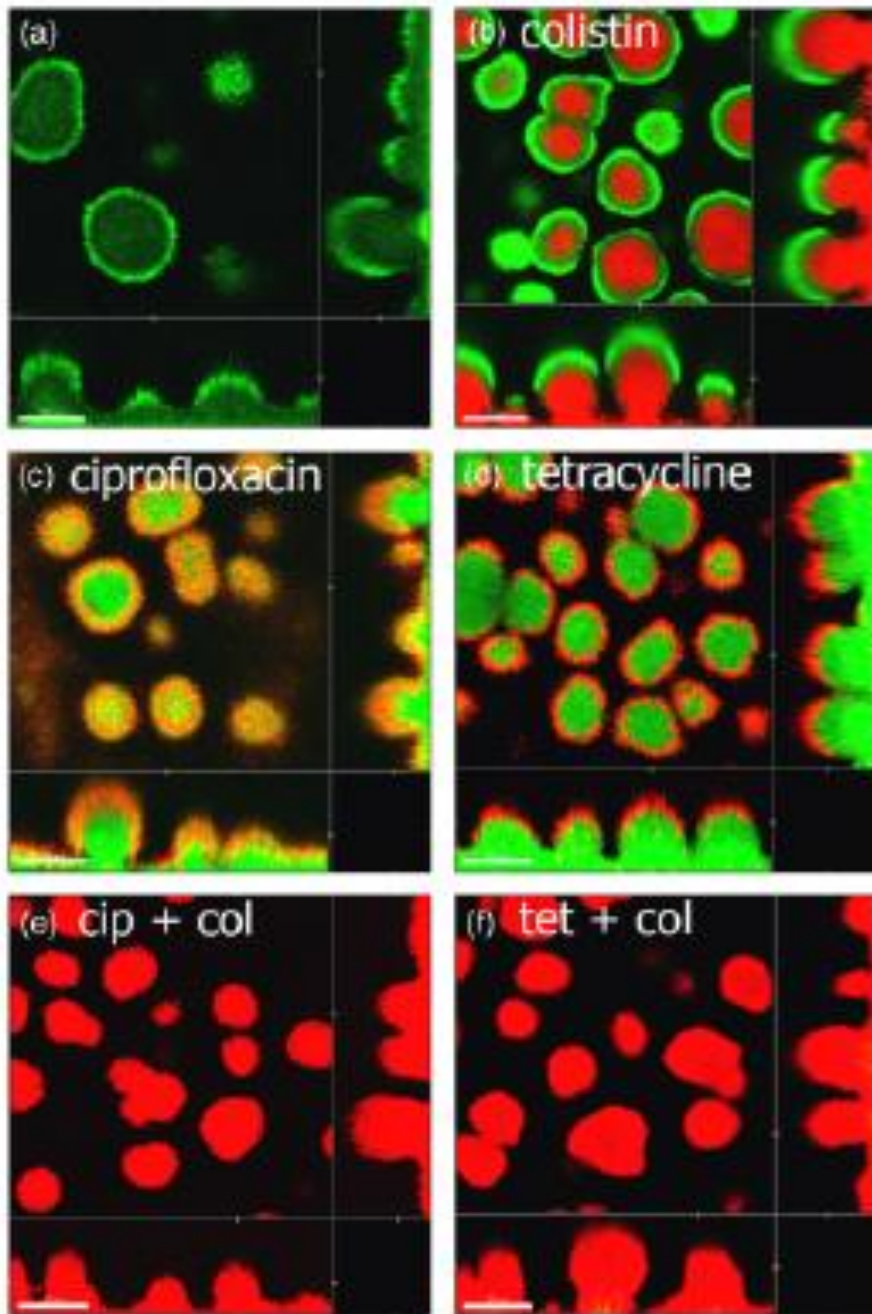


X 2 000



X 20 000

Biofilm de una cepa de *E. coli* patógena, en imágenes de microscopía electrónica de barrido, a distintos aumentos. A 50 aumentos, se ve un poco la estructura, con canales entre microcolonias. (Ghigo y col. 2003)



### Actividad metabólica y susceptibilidad a antibióticos de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa*.

En cada imagen de microscopía confocal de la izquierda, hay un corte cenital y dos sagitales. Las células vivas se ven verdes y las muertas, rojas (ver \*). Control, arriba a la izquierda. Concentraciones usadas: 25 µg/ml de colistina, 60 µg/ml de ciprofloxacina, 200 µg/ml de tetraciclina. La barra blanca mide 50 µm.

\* Las células que aparecen verdes es porque están vivas y sintetizan una proteína fluorescente verde (Gfp) codificada por un fragmento de DNA introducido artificialmente. Las células muertas están teñidas con yoduro de propidio, que solo entra en las células que tienen dañada la membrana. Tomado de Harmsen 2010.

# Cambios fenotípicos en las células del biofilm

- Pérdida de motilidad
- Producción de polisacáridos adhesivos
- Adaptación a mayor densidad celular
- Adaptación a diversos grados de anaerobiosis (múltiples vías metabólicas)
- Mayor resistencia a biocidas (distintos mecanismos)
- Distintas modalidades de relaciones ecológicas
- De la mayor parte de los genes con expresión diferente en biofilms no se conoce aun la función

# Relevancia de los biofilms en la industria alimentaria

- **Problemas sanitarios y pérdidas en calidad y vida útil** del producto: microorganismos procedentes de materias primas, agua, aire, operarios, etc, se pueden instalar como biofilms en la planta. De no ser eliminados, estos se pueden comportar como reservorios, desde los que pueden transferirse al alimento procesado.
- **Problemas tecnológicos:**
  - Alteración de propiedades de superficies (fricción, transferencia de calor)
  - Obturación de conductos, orificios, filtros, válvulas
  - Ensuciamiento de dispositivos instalados para medida y muestreo
  - Facilitación de la corrosión
- **Recurso biotecnológico:** los biofilms son una forma natural de inmovilización de células microbianas (utilizables para la obtención de ingredientes y aditivos, tratamiento de aguas residuales, biorremediación, etc).

# Especies microbianas halladas en biofilms de industria alimentaria

## Ejemplos (Shi & Zhu, 2009)

Lugar	Aislados de los biofilms (%)	Referencia
Planta de procesamiento de leche, líneas de pasteurización	<i>Bacillus cereus</i> (12) <i>Escherichia coli</i> (11) <i>Shigella sp.</i> (11) <i>Staphylococcus aureus</i> (8)	Sharma y Anand, 2002
Planta de helados, cinta transportadora o unidad de alimentación	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Shigella</i>	Gunduz & Tuncel, 2006
Unidad procesadora de caviar	<i>Neisseriaceae</i> (25) <i>Pseudomonas</i> (6) <i>Vibrio</i> (10) <i>Listeria</i> (3)	Bagge-Ravn y col. 2003
Planta de procesamiento de gambas	<i>Pseudomonas</i> (66) <i>P. fluorescens</i> <i>P. putida</i>	Guobjornsdottir y col. 2005
Planta de procesamiento de pescado	<i>Enterobacteriaceae</i> (27) <i>Serratia liquefaciens</i>	Guobjornsdottir y col. 2005

## Resistencia aumentada de biofilms a biocidas. Compuestos de amonio cuaternario. *Bacillus*

Inactivation of *B. cereus* cell by Spartec, a quaternary ammonia compound

Concentration (ppm)	Cell type	Population reduction (log CFU/ml or chip) after time of exposure (s) <sup>a</sup>				
		15	30	60	180	300
100	planktonic	5.58	5.72A <sup>b</sup>	5.78A	6.27A	–
	attached single cell	– <sup>c</sup>	4.22B	4.50B	4.83B	4.83A
	biofilm <sup>d</sup>	–	1.36C	1.33C	1.54C	1.90B
	milk-biofilm <sup>e</sup>	–	0.77C	1.06C	1.36C	1.18C
200	planktonic	5.94	6.20A	6.25A	6.30A ←	–
	attached single cell	–	4.20B	4.34B	4.50B	4.83A
	biofilm	–	1.55C	1.68C	2.03C	2.09B
	milk-biofilm	–	1.25C	1.01C	1.04D ←	0.98C

<sup>a</sup> Obtained by subtracting final population (log CFU/ml or chip) after treatment from original population (log CFU/ml or chip).

<sup>b</sup> Common letters within the same column for the same treatment denote results that are not significantly different ( $P > 0.05$ ;  $N = 5$ ).

<sup>c</sup> Not determined.

<sup>d</sup> *B. cereus* biofilm developed on clean stainless steel chip after 8 days, incubation in SLB.

<sup>e</sup> *B. cereus* biofilm developed on milk pre-soiled stainless steel chip after 8 days, incubation in SLB.

## Resistencia aumentada de biofilms a biocidas. Hipoclorito sódico. Bacillus

Inactivation of *B. cereus* cell by sodium hypochlorite

Concentration (ppm)	Cell type	Population reduction (log CFU/ml or chip) after time of exposure (s) <sup>a</sup>				
		15	30	60	180	300
25	planktonic	5.52	5.91A <sup>b</sup>	5.79A	6.02A	–
	attached single cell	– <sup>c</sup>	4.04B	4.20B	4.50B	4.50A
	biofilm <sup>d</sup>	–	1.52C	1.70C	1.83C	2.09B
	milk-biofilm <sup>e</sup>	–	1.12C	1.18C	1.33C	1.28C
50	planktonic	5.54	5.87A	6.01A	6.25A	–
	attached single cell	–	4.30B	4.20B	4.40B	4.83A
	biofilm	–	2.27C	2.21C	2.18C	2.27B
	milk-biofilm	–	0.94D	1.30C	1.31D	1.51C

<sup>a</sup> Obtained by subtracting final population (log cfu/ml or chip) after treatment from original population (log CFU/ml or chip).

<sup>b</sup> Common letters within the same column for the same treatment denote results that are not significantly different ( $P > 0.05$ ;  $N = 5$ ).

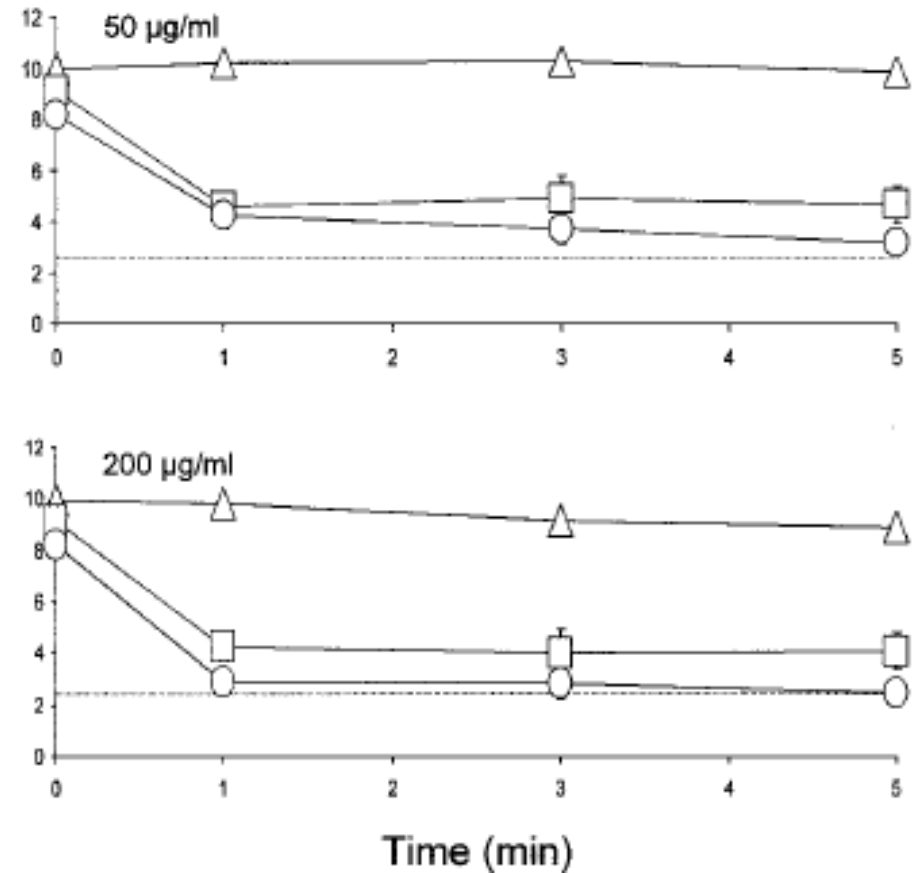
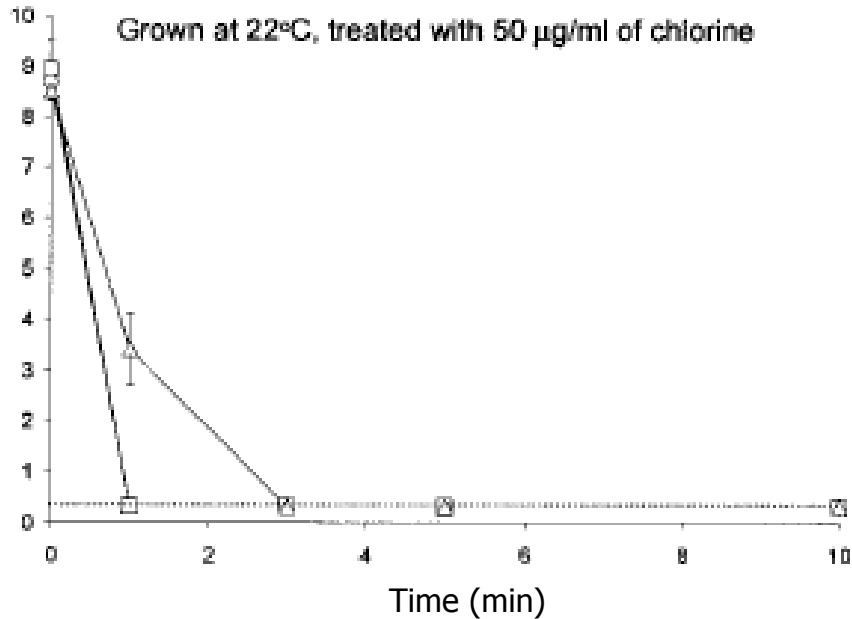
<sup>c</sup> Not determined.

<sup>d</sup> *B. cereus* biofilm developed on clean stainless steel chip after 8 days, incubation in SLB.

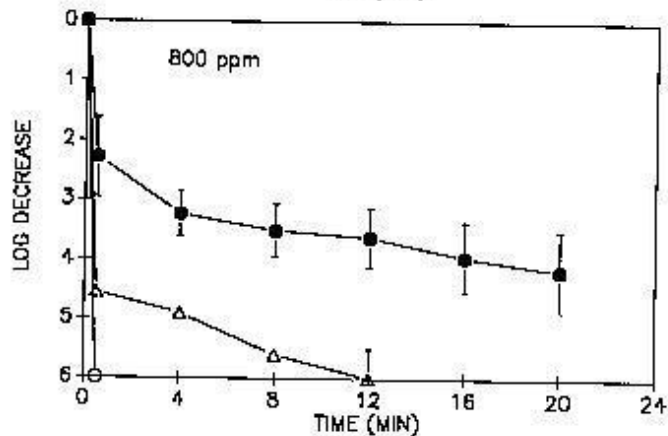
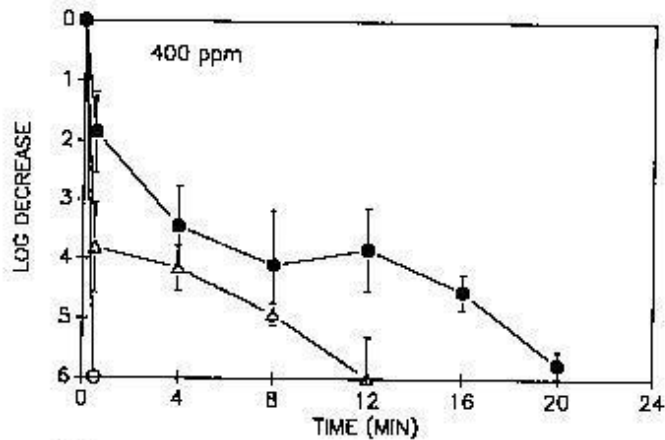
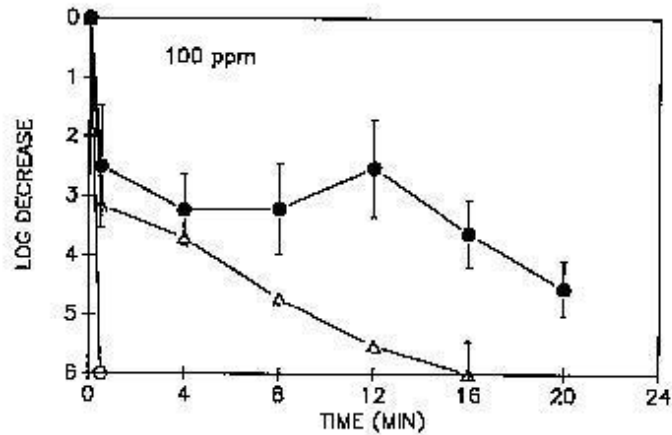
<sup>e</sup> *B. cereus* biofilm developed on milk pre-soiled stainless steel chip after 8 days, incubation in SLB.



## Resistencia aumentada a biocidas. Hipoclorito sódico. E. coli



Comparación del efecto bactericida. A la izquierda, células planctónicas; a la derecha, biofilms de 3 cepas de E. coli. En ordenadas, log<sub>10</sub> CFU/cupón.

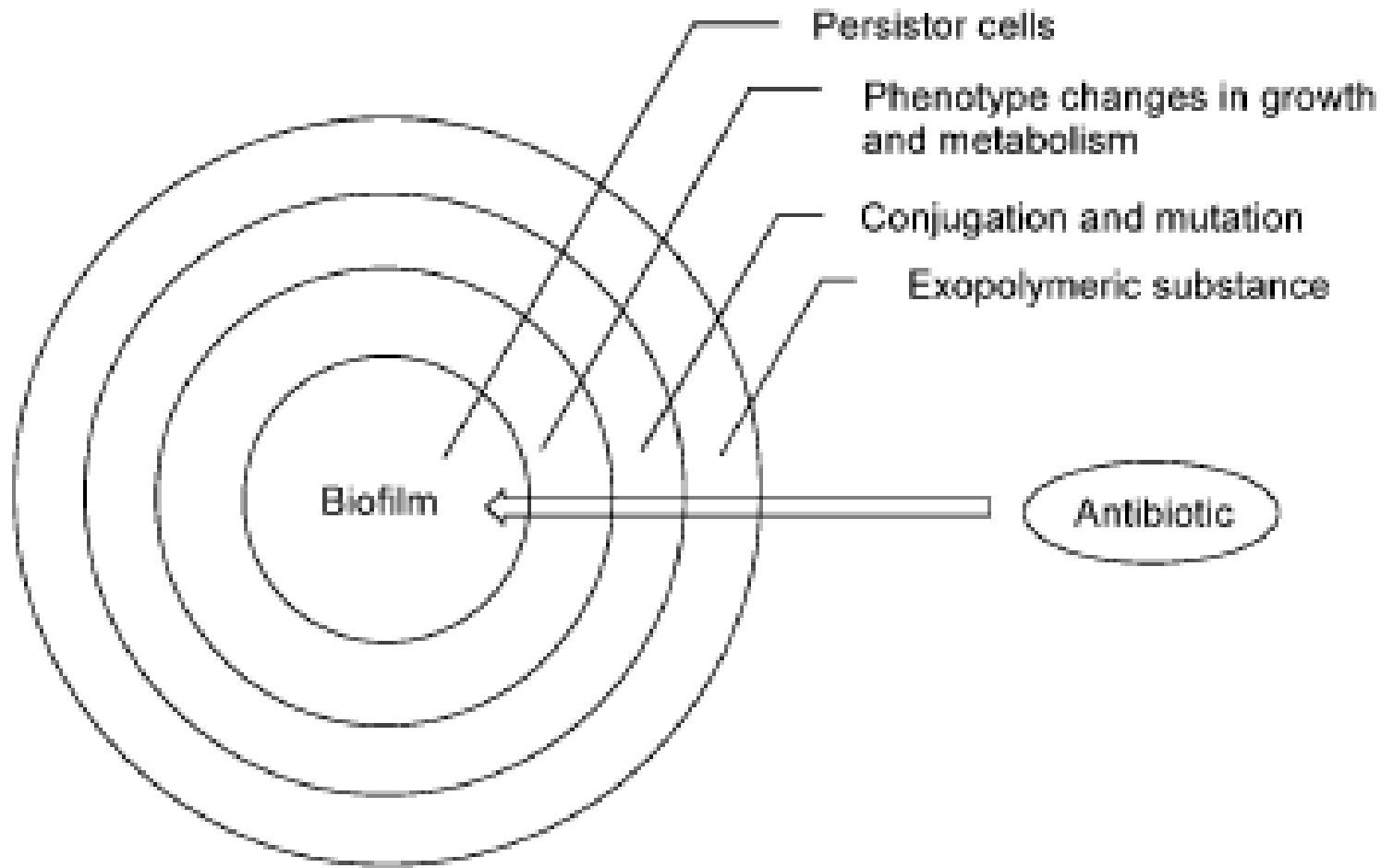


## MENOR SUSCEPTIBILIDAD A BIOCIDAS DE CÉLULAS EN BIOFILMS.

Hipoclorito sódico. *Listeria monocytogenes*

Reducción logarítmica de células planctónicas (●), células individuales adheridas (Δ) y microcolonias adheridas (■) de *Listeria monocytogenes* por exposición a 100, 400 y 800 ppm de cloruro de benzalconio.

(tomado de Koffi y Frank 1990, J. Food Protection 53, 550-554)



**Figure 1.** Conceptual diagram of biofilm resistance mechanisms to antimicrobial therapy.

# Recursos básicos contra biofilms en la industria alimentaria

1. Diseño de equipos e **instalación global** fácilmente accesibles para la limpieza.
2. Mantener las **superficies pulidas**; evitar abrasión, corrosión, empalmes con holgura, huecos o resquicios, perforaciones o soldaduras poco alisadas.
3. **Reponer** frecuentemente piezas de materiales agrietables o fácilmente dañados.
4. Minimizar durante la producción las **salpicaduras, manchas, charcos**, superficies humedecidas con condensados y restos de líquidos en codos de conducciones.
5. **Identificar en la planta los sitios** mas favorables para el desarrollo de biofilms.
6. **Desmontar** para limpiar lo que tenga resquicios no accesibles.
7. Evitar **películas de acondicionamiento** por limpieza insuficiente.
8. Eliminar mecánica- o químicamente **la matriz** de los biofilms.
9. Controlar durante la limpieza **los aerosoles**, que transportan restos de biofilm.
10. Adoptar **frecuencias de limpieza** que eviten llegar a tener biofilms maduros.

## La lucha contra los biofilms. Etapas

- ✓ Prevenirlos, de forma higiénica
- ✓ Detectarlos, sobre todo después de la L+D
- ✓ Mejorar la limpieza y desinfección:
  - ✓ agentes ya autorizados
  - ✓ nuevos agentes
- ✓ Prevenirlos y/o eliminarlos, de forma “fisiológica”

# Tendencias en la investigación contra biofilms de la industria alimentaria

## Fisiología microbiana:

Caracterizar el mecanismo de acción de los biocidas y los mecanismos de inducción de resistencias.

Estudiar el fundamento de los "persistores", fracción de células mas resistentes ante el stress.

Identificar las condiciones ambientales que influyen en la formación y desprendimiento de biofilms, caracterizando sus sistemas de regulación, intra- y extracelular, y en particular los mecanismos de Quorum Sensing (QS), basados en densidad celular. Identificar los autoinductores operativos en cada caso, junto con precursores y antagonistas, así como las enzimas que los producen y degradan y las fuentes de todos ellos, en alimentos o el entorno.

## Ecología microbiana:

Identificar los microorganismos dominantes en cada entorno alimentario y la base de su asociación.

Identificar posibles microorganismos antagonistas para diseñar sistemas de exclusión mutua.

Estudio del empleo de fagos para controlar biofilms.

## Microbiología alimentaria:

Nuevos métodos físicos de inhibición o destrucción microbiana

Nuevos principios antimicrobianos o antibiofilms (p.ej. contra autoinductores)

Vigilancia de resistencias cruzadas a condiciones de procesado/preservación de alim. y agentes de L+D

Estudio de sinergias de productos y/o procesos

## Sostenibilidad:

"Cerrar" los procesos (por ejemplo, procurar no producir y sobre todo, diseminar, resistencias)

Usar agentes biodegradables o naturales y/o minimizar la acción de los agentes sobre el entorno.

Ahorrar agua y energía.

**Gracias por su atención**

Carmen San José Serrán

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de Alimentos  
Facultad de Veterinaria  
Universidad Complutense de Madrid

[serran@vet.ucm.es](mailto:serran@vet.ucm.es)