



Biofilms: supervivencia de los microorganismos, peligro invisible en los alimentos

Dra. Carolina Ripollés Àvila
Dr. José Juan Rodríguez Jerez

Introducción

Los microorganismos tienen la capacidad de adherirse a superficies, formando agregados celulares que se mantienen unidos entre sí gracias a que se encuentran dentro de una matriz autoproducida, constituida por un conglomerado de distintos tipos de biopolímeros compuestos por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), proteínas y ADN extracelular. Dichas comunidades microbianas adheridas a superficies son conocidas como biofilms. Aunque durante mucho tiempo se ha creído que era una forma de resistencia menor, los resultados científicos nos están indicando que los microorganismos habitualmente tienden a formar biofilms, de manera que las bacterias en estado planctónico (libres en el medio ambiente) son una situación intermedia.

Se han encontrado registros fósiles con acumulaciones sucesivas de biofilms calcificados que se remontan a unos 3.700 millones de años. La formación de biofilms se conoce desde el siglo XVII, cuando Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) observó microorganismos sobre la superficie de los dientes mediante un microscopio de construcción propia, pero no es hasta mediados del siglo XX cuando se describen con más detalle, se identifica su importancia para la supervivencia de microorganismos y se relacionan con enfermedades de transmisión alimentaria.

Los microorganismos en los biofilms

Los microorganismos que conforman estos biofilms tienen propiedades que no presentan en estado planctónico debido a que estos:

- pueden adquirir nuevas características a través de la transferencia horizontal de genes.
- están protegidos de las fluctuaciones ambientales.
- pueden cooperar entre ellos para acceder a una mayor disponibilidad de alimentos e incrementar su eficiencia metabólica.

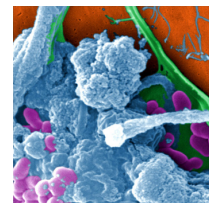
Así, los biofilms confieren a los microorganismos resistencia frente a agentes antimicrobianos, luz ultravioleta, desecación y tratamientos con desinfectantes, de modo que se incrementa la capacidad que tienen las bacterias para sobrevivir al estrés ambiental relacionado con los entornos de procesado de los alimentos, tales como la refrigeración, la desinfección, la acidez y la salinidad.

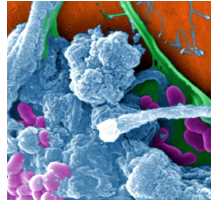
Las comunidades de microorganismos que conforman los biofilms pueden estar compuestas por una o por múltiples especies. En la industria alimentaria los biofilms no suelen estar formados por simples agrupaciones tridimensionales de microorganismos idénticos, sino por subpoblaciones heterogéneas con comportamientos distintos, que contribuyen al éxito global del biofilm.

Los biofilms multiespecie han demostrado ser más resistentes a biocidas que los mono-especie. Esto se debe, en parte, a su estructura más compleja. Por ejemplo, *E. coli* O157:H7, cuando coexiste en biofilms con *Acinetobacter calcoaceticus*, puede llegar a producir una cantidad de biomasa cuatrocientas veces mayor en comparación con el monocultivo bajo las mismas condiciones ambientales. Una de las explicaciones propuestas para justificar el motivo por el cual los biofilms multiespecie tienen una resistencia a biocidas superior, en comparación con los

Noviembre
- Diciembre
de 2018

Página 1 de 4





mono especie, es la naturaleza específica y la composición de la matriz. Se ha demostrado que las interacciones entre microorganismos potencian la formación de estas estructuras para poder protegerse eficientemente del entorno en general.

La coexistencia de diferentes microorganismos permite el intercambio de información entre ellos, lo que permite la agrupación y el trabajo conjunto en la protección del grupo. En gran medida, dicha información se transmite mediante la liberación de sustancias químicas, que implican la activación de los factores que permiten la agrupación de los microorganismos. Este mecanismo de comunicación intermicrobiana es conocido como *quorum sensing* y puede ser uno de los focos de estudio en el control de microorganismos.

Resistencia de los biofilms a los desinfectantes

La resistencia a los agentes antimicrobianos es la característica de los biofilms que tiene una mayor repercusión para la industria alimentaria, porque influye directamente en la efectividad de las operaciones de limpieza y desinfección.

Existen numerosos estudios que demuestran que la eficacia antimicrobiana de los desinfectantes se ve disminuida cuando las bacterias conforman un biofilm, en comparación con el momento en que dichas bacterias se encuentran en estado planctónico. Normalmente, unos 10 mg/L de cloro son suficientes para tener un efecto biocida significativo para bacterias en estado planctónico, pero cuando estas se encuentran en un biofilm, como mínimo se requiere una concentración cien veces superior. Este incremento de la resistencia a biocidas, lejos de estar asociada con los niveles de adherencia de la bacteria o su sensibilidad al biocida en estado planctónico, se relaciona con el desarrollo y la estructura del biofilm. De esta manera, la mayor resistencia se da en biofilms maduros con una estructura compleja. Por esta razón, los estudios para conocer en qué grado se eliminan estas estructuras *in*

vitro deberían replicar con el mayor grado de similitud posible lo que se encuentra en la industria, es decir, biofilms maduros. Muchos de los estudios realizados hasta el momento se han realizado con células adheridas y formando microcolonias, en vez de estudiarse con modelos de biofilms maduros y resistentes, con mayor tiempo de incubación. Hoy en día sería muy importante la adaptación de los protocolos existentes para la formación de biofilms y su estandarización.

Más aún, sería muy interesante que se pudieran reproducir las condiciones exactas que se encuentran en la industria alimentaria.

Mecanismos de resistencia

Entre los mecanismos a los que se les atribuye esta mayor resistencia de los microorganismos frente a los desinfectantes, cuando están en modo biofilm, se debe destacar:

- Difusión lenta o incompleta del biocida hacia el interior del biofilm.

- Distinta fisiología de las células que lo conforman.

- Diferenciación de una parte de la población a células persistentes.

- Expresión de distintas respuestas de adaptación al estrés.

La matriz extracelular que rodea las bacterias actúa como un filtro que no deja pasar moléculas con carga eléctrica elevada, como podrían ser determinados biocidas. De este modo, el biocida solo podrá estar en contacto con las zonas más próximas a la superficie del biofilm y, por tanto, las únicas bacterias que se van a ver afectadas serán aquellas que estén a un nivel más superficial puesto que estarán expuestas a concentraciones elevadas de biocida. Aquellas bacterias situadas en zonas más internas del biofilm no entrarán en contacto con el biocida o, en el caso de que entren, estarán expuestas a concentraciones subletales, con lo que su viabilidad no se vería afectada.



La exposición de los microorganismos a concentraciones subletales podría facilitar el desarrollo de resistencias al biocida. De hecho, algunas cepas de *L. monocytogenes*, persistentes en industrias alimentarias, son más resistentes a distintos desinfectantes, entre ellos al amonio cuaternario. Dicha característica, lejos de ser una adaptación ambiental, se trata de una resistencia genética adquirida, lo que tiene implicaciones importantes en los ambientes de procesado industrial. Además, la exposición de *L. monocytogenes* a concentraciones subinhibitorias de amonio cuaternario y la consecuente selección de microorganismos resistentes puede aumentar la capacidad de estas bacterias para formar biofilms y sobrevivir al tratamiento de desinfección posterior, incluso con altas concentraciones de los mismos compuestos.

Repercusión de los biofilms en la industria alimentaria

En la industria alimentaria se considera que la presencia de biofilms en las superficies es un problema potencial, ya que pueden actuar como un vehículo de transmisión y una fuente de contaminación microbiológica persistente, con unas consecuencias importantes por lo que respecta a la seguridad alimentaria y a la calidad de los alimentos.

De igual modo, partes residuales de la matriz exopolimérica que hayan quedado remanentes en la superficie, porque no se hayan eliminado por los procedimientos de limpieza, proporcionan un espacio para el anclaje de otros microorganismos que puedan llegar al sistema.

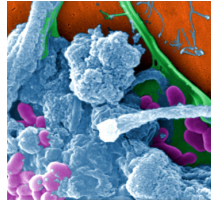
En la industria, la probabilidad de que las superficies y materiales —tuberías, cuchillos, ganchos, juntas o cintas transportadoras— sean colonizadas por microorganismos es muy elevada con los procedimientos de limpieza y desinfección habituales, pues los restos orgánicos derivados del procesado de los alimentos son un medio apropiado para el desarrollo de microorganismos y la posterior

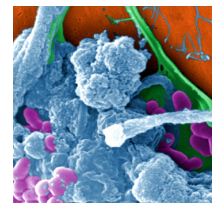
formación de biofilms. El grado de protección de los biofilms puede permitir que microorganismos mesófilos, como *E. coli* O157:H7, puedan proliferar a temperaturas de refrigeración en superficies en contacto con alimentos, contribuyendo a la creación y proliferación de biofilms mixtos en situaciones inesperadas.

La presencia de biofilms en la industria, aparte de causar problemas por lo que se refiere a salud pública y deterioro de productos, también pueden ocasionar problemas en las instalaciones y equipos de procesado de los alimentos, como la disminución de la capacidad de transferencia de calor y el flujo de las conducciones, o el incremento de la velocidad de corrosión de las superficies.

Conclusiones

La existencia de residuos orgánicos en las superficies de las industrias alimentarias, junto a una elevada cantidad de microorganismos, permite la proliferación de estos, que se adhieren a las superficies industriales y generen biofilms. Estos biofilms son formas de resistencia de los microorganismos, lo que hace que los procesos de higienización habituales sean insuficientes. Las consecuencias serán una proliferación inesperada y una persistencia de microorganismos patógenos y/o responsables de la alteración de los alimentos, lo que requerirá de un tratamiento de control específico.





MÁS INFORMACIÓN

Álvarez JC, Sanz S, Rodríguez-Jerez JJ. Evaluación de la contaminación en superficies de corte mediante metodología avanzada: microscopía de epifluorescencia directa y aplicación de espray revelador. *Eurocarne*. 2016;247:62-71.

Fuster-Valls N, Hernández-Herrero M, Marín-de-Mateo M, Rodríguez-Jerez JJ. Effect of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless steel surfaces. *Food Control*. 2008;19:308-14.

González-Rivas F, Ripolles-Avila C, Fontecha-Umaña F, Ríos-Castillo AG, Rodríguez-Jerez JJ. Biofilms in the spotlight: detection, quantification, and removal methods. A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. 2018;17:1261-76.

Montañez-Izquierdo VY, Salas-Vázquez DI, Rodríguez-Jerez JJ. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control*. 2012;23:470-7.

Ripolles-Avila C, Ríos-Castillo AG, Rodríguez-Jerez JJ. Development of a peroxide biodetector for a direct detection of biofilms produced by catalase-positive bacteria on food-contact surfaces. *CyTA-Journal of Food*. 2018;16(1):506-15.

Ripolles-Avila C, Ríos-Castillo AG, Guerrero-Navarro AE, Rodríguez-Jerez JJ. Reinterpretation of a classic method for the quantification of cell density within biofilms of *Listeria monocytogenes*. *J Microbiol Exp*. 2018; 6(2):70-75.

Ripolles-Avila C, Hascöet AS, Guerrero-Navarro AE, Rodríguez-Jerez JJ. Establishment of incubation conditions to optimize the in vitro formation of mature *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces. *Food Control*. 2018; 92:240-8.

Ripolles-Avila C, Cervantes-Huaman BH, Hascöet AS, Yuste J, Rodríguez-Jerez JJ. Quantification of mature *Listeria monocytogenes* biofilm cells formed by an in vitro model: a comparison of different methods. *Int J Food Microbiol*. 2018 Oct 25;289:209-14.