

## 5. Las biopelículas microbianas, un búnker de uso habitual

CARMEN SAN JOSÉ Y BELÉN ORGAZ

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

### 1. LAS BIOPELÍCULAS NO SON UNA SUCIEDAD CUALQUIERA

Todos los días nos lavamos los dientes. Una operación rutinaria para hacer frente a la biopelícula (o *biofilm* en inglés) microbiana que nos es más familiar: la placa dental. Se forman biofilms cuando los microorganismos crecen agregados en algún tipo de interfase, sólido-líquido, sólido-aire, líquido-aire o entre líquidos inmiscibles, unidos por material extracelular propio, siempre que haya materia orgánica y humedad suficientes (1, 2).

Prácticamente todos los microorganismos ensayados son capaces de formar biofilms, a más o menos velocidad. Los más conocidos son los biofilms bacterianos y los que se forman sobre superficies sólidas: minerales, metálicas, poliméricas y por supuesto orgánicas. Puede tratarse de tejidos más o menos funcionales o sus residuos, de restos no estructurados de alimentos procesados o, por ejemplo, de compuestos volatilizados (procedentes de una combustión o una fritura) y luego solidificados sobre una superficie inerte, como la pared de una cocina. Pueden pues encontrarse depósitos de suciedad no estructurada (incluyendo o no microorganismos) por debajo o por encima de un biofilm.

A nivel doméstico, las cocinas y los baños son los lugares preferidos por los biofilms. No es casual que para estos sitios, las rutinas higiénicas tradicionales estén basadas en procedimientos mecánicos, ayudados por el calor, los detergentes y desinfectantes. Como en el caso de la placa dental, enjuagar o aclarar solo sirven para desplazar la materia orgánica recién depositada.

Aunque desde el punto de vista de la seguridad alimentaria interesan los microorganismos adheridos relacionados con algún eslabón de la cadena alimentaria, una buena parte de los conocimientos que se aplican para su control proceden de estudios básicos y médicos. Se ha estimado que en el 80% de las infecciones hay biofilms implicados (3-6).

## **2. UNA MATRIZ ADHESIVA**

La tenacidad con que los biofilms se aferran a las superficies, es la propiedad que dificulta su limpieza. Se debe a que las células producen al fijarse materiales extracelulares (Polymeric Extracellular Substances, EPS) que con el agua (90-95%) forman pastas o geles muy adhesivos, lo que se llama glicocalix o matriz (7). Es lo que engloba y agrega a las células y las fija a la superficie o sustrato. En un principio se pensó que la trama de la matriz estaba constituida por un único polisacárido. Luego se ha ido viendo que, aparte de uno o varios tipos de polisacárido, en la matriz suele haber proteínas, DNA y lípidos. Entre los componentes puede haber productos específicos y también detritus, incluyendo restos de células muertas y moléculas o partículas atrapadas del medio exterior. Se cree que la matriz tiene fundamentalmente una misión protectora, pero algunos componentes pueden en ocasiones servir como alimento a organismos residentes. La firmeza de la adhesión está relacionada con la velocidad, dirección y turbulencia del flujo en contacto (8).

## **3. EL ASENTAMIENTO**

La fijación e inmovilización es el efecto fundamental del biofilm: las células dejan de ser móviles y errantes, para hacerse sedentarias. El paso del modo de vida planctónico al modo sésil conlleva cambios fenotípicos importantes y una interacción cambiante entre el entorno y la expresión génica (9-12). La primera etapa de esa transición tiene lugar tras el acercamiento, pasivo o por quimotaxis, a la superficie. Es la retención por fuerzas débiles, electrostáticas, de Van der Waals o de interacción hidrofóbica. Una fijación tenue e inestable, que puede ser revertida por las fuerzas de cizalla del flujo tangencial y es por tanto más fácil de mantener en lugares protegidos, poco afectados por el flujo, como rincones, ángulos, resquicios, grietas, poros o microalteraciones del relieve de la superficie, como los arañazos o surcos causados por el roce o el empleo de productos abrasivos de limpieza (Figura 1).

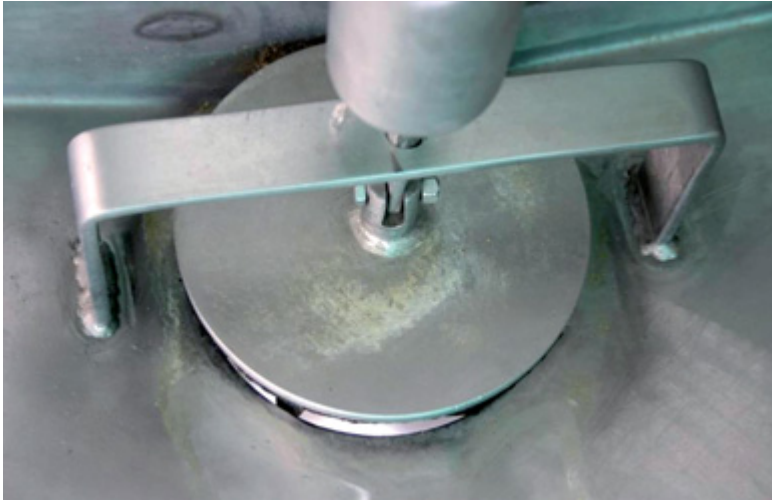


FIGURA 1. Restos visibles de biofilms microbianos en el desagüe de un tanque de recepción de leche cruda en una quesería.

La proximidad a la superficie parece ser detectada por las células, presumiblemente como modificaciones de las pautas de difusión. En esa situación, en combinación con otros factores del entorno relacionados con la densidad celular existente y las condiciones de crecimiento, se activa una especie de interruptor de la regulación, al elevarse el nivel intracelular de ácido 3',5'—ciclo— diguanílico (c-di-GMP) (13).

La densidad celular de la propia especie es percibida por las células microbianas mediante señales difusibles, llamadas autoinductores, que cada célula genera y cuya concentración externa es capaz de detectar. Al alcanzar estas señales un determinado nivel, se activa la expresión génica de diversas aptitudes, como la transferencia de plásmidos conjugativos, la esporulación, la síntesis de péptidos antimicrobianos o la formación de biofilms. A este fenómeno se le llama de Quorum Sensing (QS) (14). Los autoinductores más conocidos son las acil-homoserín lactonas (AHL) de las bacterias Gram- y determinados péptidos modificados, de las Gram +. Se conocen además señales distinguibles por especies muy distintas y además, sistemas defensivos que obstaculizan o bloquean este tipo de comunicación entre células. Su explotación parece una herramienta prometedora para controlar diversas consecuencias del crecimiento microbiano, en las infecciones y por supuesto en alimentos (15-18).

En la segunda etapa del proceso de formación de biofilms, las células pierden sus apéndices de motilidad (flagelos y otros) y activamente comienzan a afianzar su anclaje produciendo polisacáridos adherentes. Continúa la multiplicación de células en el sitio. Cuando hay varias capas, en los habitantes de las inferiores se implanta un metabolismo parcialmente anaerobio y se hace más lenta la velocidad de multiplicación. El momento en que la fijación deja de ser reversible, o sea, en que el biofilm garantiza la persistencia en el sitio, depende de la velocidad de secreción de EPS, de las características del flujo en contacto y de la agresividad y eficacia de los sistemas antibiofilm, naturales o artificiales, actuando en cada caso.

En una tercera etapa, ya de madurez, la matriz adquiere mayor grosor y complejidad. Aparece lo que se denomina arquitectura, esto es, una organización tridimensional, con huecos o canales interiores por donde circulan el agua y partículas de pequeño tamaño. La imagen más conocida de biofilms maduros, tomada por microscopía confocal, recuerda a un campo de setas (Figura 2 y <http://www.erc.montana.edu/CBEssentials-SW/bf-basics-99/default.htm>) donde hay huecos y una importante heterogeneidad de ubicaciones para las células alojadas. Esta forma de organización o diferenciación supera en complejidad lo que antes se suponía era posible en procariontas (2), pero a diferencia de lo que ocurre en formas pluricelulares, es reversible. Las células de los biofilms pueden desprenderse o desagregarse y volver a la vida planctónica.

El desprendimiento puede ser considerado como una etapa más del ciclo de vida del biofilm, a la que se puede llegar o no en función de las condiciones ambientales (5). Las células desprendidas serían como pioneros que buscan un nuevo lugar para colonizar. En los cultivos en batch, por ejemplo, se observa un desprendimiento importante, aunque no completo, al llegar a la fase estacionaria. Hay que recordar, no obstante que a lo largo del desarrollo de los biofilms y durante su mantenimiento, pueden seguir coexistiendo en el medio de cultivo células planctónicas, en mayor o menor proporción, según el organismo y el sistema de cultivo, continuo o discontinuo. La fisiología del desprendimiento está siendo estudiada con mucho interés, porque ese es el paso que determina la transferencia, esto es la incorporación de células sueltas (del patógeno o del organismo causante de deterioro) al alimento, que puede haber sido ya higienizado (19). O al torrente circulatorio en el caso de un biofilm sobre un implante, por ejemplo. También puede también producirse desprendimiento, obviamente, por el uso de procedimientos de limpieza mecánicos.

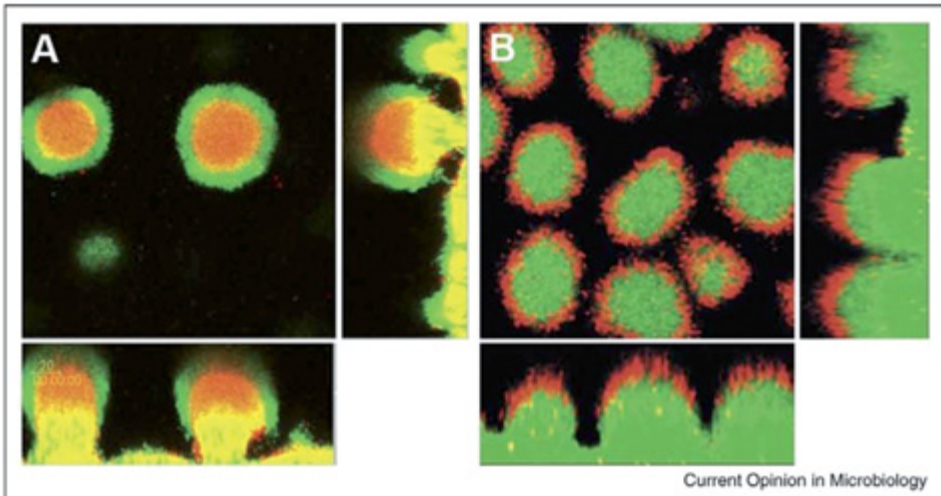


FIGURA 2. Muerte por tratamiento antimicrobiano de distintas subpoblaciones en biofilms de *P. aeruginosa*. Biofilms de 4 días de edad de una cepa de *P. aeruginosa* PAO1 marcada con *Gfp* (proteína verde fluorescente) cultivados en medio de glucosa, fueron tratados con EDTA (A) o tetraciclina (B) y después teñidos con yoduro de propidio para obtener imágenes por microscopía confocal (CSLM). Las células vivas presentan color verde y las muertas, rojo o amarillo. Las imágenes centrales muestran secciones horizontales y las de los lados, secciones ópticas verticales. La barra equivale a 20  $\mu\text{m}$ . Reproducido a partir de Parsek y Tolker-Nielsen (11) con permiso de Elsevier.

#### 4. UN MODO DE VIDA PROTEGIDO, LENTO Y CON ESPECIALIDADES

La matriz de los biofilms impone a los solutos una velocidad de difusión más lenta que la existente en el medio líquido y eso determina que dentro de ellos existan gradientes de concentración de oxígeno, nutrientes, etc., entre las zonas superficiales, en contacto directo con el medio y las profundas. La difusión, a parte de por la densidad de la trama de la matriz en conjunto, se ve afectada particularmente por la carga de los polisacáridos, que suelen contener bastante proporción de ácidos urónicos. La matriz se comporta pues como barrera y amortigua la brusquedad de los cambios que puedan tener lugar en el medio exterior (7). Se pueden pues considerar los biofilms como formas de resistencia o protección frente a la desecación, las oscilaciones en disponibilidad de nutrientes y la presencia de agentes antimicrobianos (1), fagocitos y protozoos (20).

Por otra parte y frente a la homogeneidad de condiciones entre las células planctónicas, en los biofilms se pueden pues encontrar una gran heterogenei-

dad de micronichos: desde zonas bien aireadas y nutridas pero más expuestas a condiciones o agentes adversos, hasta otras alejadas, aisladas, muy escasamente nutridas y drenadas, con un metabolismo lento y fundamentalmente anaerobio, que se multiplican a muy baja velocidad o están prácticamente durmientes (10, 12).

La diversidad de micronichos induce la manifestación de diversos fenotipos (11) y a la larga, parece propiciar también la aparición de distintos genotipos, a partir de una misma población inicial. Se cree que con el tiempo van surgiendo subpoblaciones con distintos genes “contingentes”, genes que no son operativos mientras no se produce una contingencia, esto es, una eventualidad que su activación permite superar. Puede tratarse de la aparición de un nuevo producto tóxico o un nuevo sustrato, o la desaparición de un nutriente hasta ese momento habitual. A los individuos de las subpoblaciones que en determinadas condiciones se convierten en únicos supervivientes, se les llama “persistores” (18). Han sido caracterizados varios casos por exposición a biocidas; véanse por ejemplo los puntos aislados de distinto color en la Figura 2. La distribución de los genes contingentes en distintas subpoblaciones de la misma especie es la base del concepto de un “genoma distribuido”, que amplía considerablemente las posibilidades de supervivencia de la población original.

Los tres factores citados, esto es, la función barrera de la matriz, la baja velocidad de multiplicación (ofreciendo menos dianas para la acción de los agentes antimicrobianos) y la generación de persistores, son los mecanismos que parecen sustentar la mayor resistencia de las células en los biofilms, en comparación con las correspondientes células planctónicas (3, 21, 22).

## 5. UN BÚNKER DE USO HABITUAL

Si la firmeza de la adhesión de los biofilms obstaculiza su limpieza, la baja susceptibilidad de sus células a los biocidas hace muy difícil su desinfección. Las concentraciones de biocidas requeridas para destruir las células sésiles suelen ser 10-1.000 veces mayores que las que se necesitan para matar las células planctónicas (3, 23-25).

Conviene recordar que hasta hace poco, la microbiología que se practicaba en los laboratorios se hacía solo con células planctónicas. Células en suspensión, en cultivos monoespecie, con medios muy ricos en nutrientes y con todo tipo de facilidades para el crecimiento. Sin embargo, en la realidad esas condiciones tan favorables no son frecuentes. Se va llegando a la conclusión de que

en la naturaleza el modo de crecimiento más habitual, el modo “por defecto” por así decirlo, son los biofilms (26), búnkeres defensivos, contra los que, digámoslo así, no sirven las armas empleadas para combatir enemigos que luchan como individuos y al descubierto.

La microbiología aplicada a los procedimientos de limpieza y desinfección ha sido hasta ahora “de base planctónica” y las normas legales relacionadas, también. Hay pues que replantearse unos y otras, buscando nuevos recursos (18, 27-31) y procurando además un uso cuidadoso de los biocidas, ya que la exposición a concentraciones subletales puede inducir resistencia y su liberación al medio ambiente puede causar daños no siempre fáciles de predecir.

Vamos conociendo algunas características de los biofilms, o sea de los búnkeres de laboratorio, pero los reales es previsible que sean más complicados. Un aspecto que añade complejidad al asunto es que en la naturaleza, los biofilms rara vez están habitados por una sola especie.

## 6. BIOFILMS MULTIESPECIE: MUCHA VIDA SOCIAL

En los biofilms naturales conviven microorganismos compatibles. Cooperativos o al menos comensales. La concentración de células alcanzada en su seno no permite la coexistencia de organismos antagonicos, como pueden a veces observarse transitoriamente en algunos medios planctónicos con baja densidad celular.

Las combinaciones viables entre microorganismos dependen en buena parte del colonizador primario, éste es, del que llega primero, o mejor dicho, del que consigue formar un biofilm primero, que es el que selecciona cuales de los “visitantes casuales” de otras especies o cepas se quedan en “su” biofilm (32). La asociación condiciona mucho el status de estabilidad y resistencia de algunos colonizadores secundarios.

Veamos como ejemplo el caso de *Listeria monocytogenes*, una especie bastante ubicua, con algunas cepas muy patógenas. Como la listeriosis humana, aunque infrecuente, tiene una mortalidad muy alta (20-30%) hay normas legales muy exigentes en cuanto a la presencia de *L. monocytogenes* en alimentos que se comercializan como listos para el consumo (100 células viables por 100 g de alimento en Europa) y hay que vigilar muy bien la higiene de las instalaciones para cumplir ese requisito. Esta especie puede formar biofilms en solitario, pero lentamente y con la matriz muy delgada. Pero tambien puede instalarse en los biofilms de *Pseudomonas fluorescens*, por ejemplo, una especie



deteriorativa y frecuente en plantas refrigeradas, que produce rápidamente biofilms gruesos (33). El mismo número de *L. monocytogenes* por cm<sup>2</sup>, instalado solo o “bien acompañado”, representa situaciones bien distintas para el higienista. Todavía sin embargo, las pruebas de productos de limpieza y desinfección se suelen hacer con biofilms monoespecie.

Volviendo al tema de las diversas especies que cohabitan en los mismos biofilms, algunas comunidades, estudiadas in-situ mediante técnicas que no requieren cultivo, parecen mostrar ciertas pautas de ordenación. Es el caso de la microflora oral, en cuyos biofilms participan unas 500 especies bacterianas, coagregadas de forma característica (34, 35).

Además de bacterias, en los biofilms (o sobre ellos) se pueden encontrar virus (un tema muy poco estudiado) (36) y formas de vida superiores, algas, protozoos y diversos invertebrados, que pueden mantener entre sí distintos tipos de relaciones ecológicas (37, 38). Se han estudiado por ejemplo las comunidades presentes en diversos tramos de tuberías de desagüe domésticas e industriales (ambientes muy ricos en nutrientes) y en las tuberías de agua de suministro (ambientes más oligotróficos).

Como es de esperar, en los medios muy oligotróficos o extremos suelen encontrarse biofilms sencillos, o sea, de una o pocas especies, que son por ello más fáciles de controlar (es el caso de los biofilms de *Legionella* en las conducciones de ventilación de aire acondicionado) (39). Las tuberías vienen a ser reactores de flujo más o menos continuo, que se interrumpe de vez en cuando por eventos especiales, como un chorro de lejía en el desagüe, o una tormenta, o una entrada de aire (por ejemplo, al arreglar una avería) con el consiguiente aumento de turbulencia y con desprendimiento de fragmentos adheridos, en el caso del agua de suministro. En los conductos de traídas de aguas, la matriz del biofilm va incorporando con el tiempo sales y partículas, haciéndose así más dura y rugosa. Esto, junto con la disminución de la luz del conducto, contribuye también al aumento de la turbulencia y el desprendimiento de partículas, lo que empeora la calidad higiénica y técnica del agua.

Un caso muy característico en el que las comunidades microbianas soportan una cantidad importante de otras formas de vida adheridas, es el de los cascos de los barcos (40, 41). Sobre las primeras capas de bacterias y algas, pueden crecer una gran diversidad de invertebrados, muchos de ellos con exoesqueleto duro, moluscos por ejemplo. Los biofilms pueden ahí alcanzar varios centímetros de grosor y eso aumenta mucho el rozamiento del casco del barco al desplazarse, disminuyendo la velocidad alcanzable. Este “bioensuciamiento” hace aumentar



el gasto de combustible y las pérdidas por tener el barco inactivo durante las paradas para limpieza. Además, los productos químicos empleados para el desprendimiento son frecuentemente muy contaminantes. Hay por eso actualmente muchos proyectos en marcha para desarrollar componentes antibiofilm para pinturas y recubrimientos para barcos de todo tipo.

## 7. LOS BIOFILMS “BUENOS”

Aunque suele ocurrir que de lo malo se habla más, también hay por supuesto biofilms útiles para los humanos. Biofilms naturales útiles son por ejemplo los que forman las bacterias fijadoras de nitrógeno sobre las raíces de las leguminosas, aumentando el rendimiento de éstas y mejorando la calidad agrícola de los suelos.

La utilización más extendida de determinados biofilms “de diseño” son los tratamientos secundarios para aguas residuales urbanas, aunque también se van empleando cada vez más para las aguas residuales industriales, para biorremediación y también para aprovechamiento de residuos de minería.

En el mundo alimentario hay biofilms empleados tradicionalmente para la elaboración de alimentos; es el caso de la levadura “flor” que se desarrolla en una interfase líquido/aire, la superficie de los vinos finos y olorosos. Un biofilm puede considerarse como una forma natural de inmovilización de células microbianas y como tal se emplean para la producción industrial de algunos aditivos alimentarios, ácidos orgánicos, por ejemplo.

Hay otro aspecto positivo de la formación espontánea de biofilms: es el fenómeno de exclusión competitiva. Algunos colonizadores primarios (por ejemplo, determinadas bacterias lácticas) excluyen a otros potenciales colonizadores (por ejemplo, *L. monocytogenes*). Esto ha sido estudiado por ejemplo en desagües de plantas de procesado de aves (42). Sería pues un caso de antagonismo, opuesto al ya citado de cooperación entre *P. fluorescens o putida* frente a algunas cepas de *Listeria*, que apuntábamos antes.

## 8. LOS BIOFILMS “MALOS”

Dado que los biofilms son una forma de resistencia o de supervivencia de los microorganismos, hay bastantes casos y situaciones en que pueden constituir un problema para nuestra especie.

Como ya se ha mencionado, el tema más importante son las infecciones. La formación de biofilms en el organismo hace a los patógenos más inaccesibles, más resistentes a los mecanismos defensivos naturales y a los tratamientos con antibióticos u otros biocidas, cronificando la infección (3, 4, 21). El asunto es particularmente difícil cuando falla algún aspecto defensivo. Es el caso de la fibrosis quística, una enfermedad hereditaria y recesiva que afecta a las glándulas secretoras; el exceso de mucus en las vías respiratorias alimenta el crecimiento de biofilms microbianos, cuya matriz tiende a ocluir los conductos. También han sido muy estudiados los biofilms que se desarrollan en los grandes quemados, con mucha superficie corporal expuesta a las infecciones y un sistema inmune desbordado. Una colonización con grandes costes para el sistema sanitario es la de los catéteres e implantes, que con cierta frecuencia han de ser sustituidos por esta razón, particularmente en el caso de pacientes inmunodeprimidos.

Aparte de los biofilms que crecen en el interior del cuerpo, interesan mucho en el mundo sanitario los que pueden crecer en equipos e instalaciones (quirófanos, unidades dentales, unidades de diálisis, etc.) ya que los distintos fluidos y materiales a los que se pueden transferir fragmentos de biofilm, pueden entrar en contacto con heridas abiertas. Además, la exposición subletal a desinfectantes (y otros biocidas), al intentar sin éxito eliminar las células de un biofilm, induce la aparición de resistencias. El empleo de dispositivos o piezas de un solo uso es un recurso útil, pero no siempre aplicable. Preocupa particularmente en el contexto clínico la mayor frecuencia de la transferencia genética horizontal observada dentro de los biofilms (43) que podría ampliar considerablemente la velocidad y diversificación de la extensión de las resistencias a biocidas. Muchos de los problemas que se plantean en este contexto son similares a los que pueden aparecer en la industria alimentaria, aunque los recursos para combatirlos son en este caso mucho más modestos.

La cadena de suministro de alimentos (producción y transporte de materias primas, procesado, almacenamiento y distribución) tiene diversos aspectos relacionados con el desarrollo de biofilms (19, 27-29, 44). Suelen ser prioritarios los aspectos sanitarios, debidos a la proliferación y persistencia de patógenos, pero también son importantes los aspectos técnicos y de calidad. Con frecuencia, estos aspectos están estrechamente ligados y es difícil tratarlos de forma independiente en la práctica. Porque los microorganismos responsables de unos y otros están ubicados en los mismos biofilms, o porque un problema puede desencadenar otro. Por ejemplo, los biofilms que se desarrollan sobre una superficie intercambiadora de calor (un problema técnico) pueden actuar como aislantes térmicos y ser la causa de un calentamiento insuficiente y de esa forma de la fabricación de un pro-

ducto no seguro desde el punto de vista microbiológico (un problema sanitario). Otros problemas técnicos frecuentes derivados de la formación de biofilms son la oclusión de placas o membranas filtrantes, el atascamiento de tuberías y desagües, el cierre incompleto de válvulas y el bioensuciamiento de superficies de dispositivos de control o medida. En el caso de presencia de biofilms de bacterias sulforreductoras (muy infrecuentes en el entorno alimentario, pero importantes en petroquímica) el principal problema es la corrosión.

El principal problema sanitario de los biofilms en la industria alimentaria es que, al resistir muchos de los tratamientos de limpieza y desinfección convencionales, los microorganismos alojados pueden hacerse persistentes en la planta y comportarse como reservorios de patógenos, que en algún momento pueden transferirse al alimento, antes, durante o después del procesado. Los casos más estudiados son sin duda los referentes a *Listeria* (45, 46).

## **9. FACTORES QUE PROPICIAN EL DESARROLLO DE BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA**

La eficacia de la función específica de un equipo o instalación depende en buena medida del material con que está construido. En el caso de las superficies en contacto con alimentos, además, ese material, al igual que el diseño, ha sido elegido porque no favorece la incorporación al alimento de contaminantes químicos o microbianos. En otras palabras, porque se limpia bien y se ensucia relativamente poco.

Esto sigue siendo vigente al incorporar el criterio de minimizar el riesgo de aparición de biofilms. En particular, hay al menos tres cuestiones a tener en cuenta. Por una parte que las superficies hidrofóbicas en general parecen menos favorables a la adhesión primaria. Esto es importante para zonas barridas por un flujo tangencial, pero no tanto cuando se produce una deposición orgánica no afectada por el flujo. En segundo lugar, que la mayoría de las películas condicionantes favorecen el desarrollo de un biofilm sobre ellas (47), aunque algunos componentes parece que podrían formar películas desfavorables. Es pues conveniente eliminar restos orgánicos, incluyendo restos de matriz de biofilm, aunque las células en ellos contenidas ya no sean viables. Y tercero, que son preferibles los materiales duros, que soporten los tratamientos de limpieza sin rayaduras.

Sin embargo, en la industria alimentaria los materiales empleados son relativamente poco diversificados y con frecuencia poco relacionados con las ca-

racterísticas físicas, sobre todo superficiales aunque también reológicas, del alimento que se va a procesar en contacto con ellos. Una mejor selección del material y el empleo de un surfactante de uso alimentario pueden mejorar los resultados y sería conveniente tener este aspecto en cuenta en el momento de la formulación o reformulación de un alimento. A veces un factor externo puede contribuir a la interacción entre alimento y superficie; es el caso de la humedad ambiental. Las piezas o recubrimientos a base de geles de proteína o almidón, por ejemplo, tienden al secarse a hacerse más cohesivos con la superficie en contacto y a dejar así más residuos al desprenderse; residuos que a su vez son más cohesivos que la superficie limpia para las piezas siguientes.

Las propiedades originales de las superficies abiertas suelen verse empeoradas por efecto de la abrasión que suele conllevar la limpieza manual o el efecto cáustico de algunos productos de limpieza. Los arañazos, grietas y puntos de corrosión son lugares propicios a la deposición de materia orgánica y el desarrollo prolongado de biofilms. Las superficies internas de circuitos cerrados, higienizables de forma frecuente y reproducible por procedimientos CIP (Cleaning-In-Place), que no comportan daños superficiales, son más seguras en este sentido.

A veces puede haber de origen un diseño deficiente de las superficies abiertas, con muchos ángulos, recovecos y juntas. Lo más frecuente es sin embargo que los peores sitios sean consecuencia de arreglos o ampliaciones posteriores al montaje de la planta: soldaduras con mucho relieve, reparaciones poco netas, o acoplamiento mal integrado de elementos nuevos, con por ejemplo tramos largos de cintas transportadoras o líneas de procesado que se cruzan para adaptarse al espacio disponible (complicando el control de cada línea), o que dejan poco espacio para pasar o limpiar. Por cierto que las cintas y otros elementos transportadores suelen ser de los componentes más difíciles de mantener libres de biofilms, por sus articulaciones y por la exposición a aerosoles, salpicaduras, etc. También hay que evitar suelos o recubrimientos de suelos con defectos de nivelado, que permiten charcos. Todo ello aporta puntos que acumulan restos orgánicos y agua, y son poco accesibles para la limpieza y desinfección. Un punto particularmente importante son los desagües, a los que se podría llamar, junto con las zonas circundantes, el paraíso de los biofilms resistentes a biocidas; requieren vigilancia para evitar atascos, junto con un aclarado cuidadoso y un desmontaje y muestreo frecuentes.

Está por otra parte la cuestión del mantenimiento de los equipos, empezando por la vigilancia y frecuencia de sustitución de piezas que sufren mucho desgaste y cuyas irregularidades de relieve pueden proporcionar refugio para los

microorganismos. La humedad ambiental en una planta de procesado, que suele subir mucho durante la limpieza y desinfección abierta, puede causar abombamiento y desprendimiento de la pintura de paredes y techos, transportando fragmentos de biofilms antiguos y abriendo huecos donde pueden establecerse otros nuevos.

La materia prima perdida por corte o vertido poco preciso, fricción o adhesión a la superficie en contacto, representa casi siempre materia orgánica que puede alimentar el desarrollo de biofilms, ya sea sobre la superficie en contacto con el alimento o sobre paredes, suelos u otras superficies que no se limpian a diario de forma reproducible. A veces los problemas de generación y dispersión de residuos están originados por una función técnicamente difícil de perfeccionar. Cuantos más residuos deje el procesado y cuanto más sinuosa sea la sala o más abarrotada de aditamentos esté, mayor es el riesgo de que queden partículas desplazadas por algún rincón y por tanto, más rigurosa ha de ser la limpieza.

Hay que tener en cuenta que la limpieza con chorros de agua o vapor a presión desprende biofilms, pero también los fragmenta y dispersa en las gotas de los aerosoles generados. Estas gotas pueden permanecer en suspensión en el aire durante un tiempo que con frecuencia supera el de parada de los equipos para limpieza y desinfección, depositándose después poco a poco por toda la planta recién limpia o con un nuevo ciclo de producción en marcha. Esta redistribución por aerosoles “deslocaliza” los biofilms, que pueden pasar de los sitios esperables a otros menos vigilados o accesibles, facilitando la persistencia en la planta de los microorganismos implicados.

Generalmente, la eficacia de los procedimientos de limpieza y desinfección se mide por la concentración residual de microorganismos viables por centímetro cuadrado. Aunque ese parámetro se consiga bajar, los restos de matriz de biofilm que quedan tras la pérdida de viabilidad de las células se comportan como película condicionante, que favorece la incorporación de nuevas células y el desarrollo de un nuevo biofilm sobre el antiguo (19, 47). Por eso tienen interés los tratamientos enzimáticos que desprenden, erosionan o permeabilizan la matriz de los biofilms (48, 49).

Los biofilms están llevando a una revisión general de las normas higiénicas en la industria alimentaria (30, 50, 51) y, dentro de los sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC), al diseño de programas de limpieza y desinfección “customizados”, esto es, pormenorizados y ajustados a los detalles de operación, diseño y status de mantenimiento de cada planta concreta (29, 52).

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 49-79.
2. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 187-209.
3. Donlan, R. M. & Costerton, J. W. (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 167-193.
4. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004) Bacterial biofilms: from the natural world to infectious disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 95-108.
5. Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. (2005) Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. *Trends Microbiol.* **13**: 7-10.
6. Parsek, M. & Singh, P. (2003) Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 677-701.
7. Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L. & Kolter, R. (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**: 20-26.
8. Simões, M., Pereira, M. O. & Vieira, M. J. (2007) The role of hydrodynamic stress on the phenotypic characteristics of single and binary biofilms of *Pseudomonas fluorescens*. *Water Sci. Technol.* **55**: 437-445.
9. An, D. & Parsek, M. R. (2007) The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 292-296.
10. Monds, R. D. & O'Toole, G. A. (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.* **17**: 73-87.
11. Parsek, M. R. & Tolker-Nielsen, T. (2008) Pattern formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 560-566.
12. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. & Davies, D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* **184**: 1140-1154.
13. Cotter, P. A. & Stibitz, S. (2007) c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**: 17-23.
14. Jayaraman, A. & Wood, T. K. (2008) Bacterial Quorum Sensing: Signals, Circuits, and Implications for Biofilms and Disease. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **10**: 145-67.
15. Ammor, M. S., Michaelidis, C. & Nychas, G.-J. E. (2008) Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. Review. *J. Food Protect.* **71**: 1510-1525.
16. Annous, B. A., Fratamico, P. M. & Smith, J. L. (2009) Quorum sensing in biofilms: Why bacteria behave the way they do. *J. Food Sci.* **74**: R24-R37.

17. Gobetti, M., De Angelis, M., Di Cagno, R., Minervini, F. & Limitone, A. (2007) Cell-cell communication in food related bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **120**: 34-45.
18. Richards, J. J. & Melander, C. (2009) Controlling bacterial biofilms. *Chembiochem.* **10**: 2287-2294.
19. Verran, J., Airey, P., Packer, A. & Whitehead, K. A. (2008) Microbial retention on open food contact surfaces and implications for food contamination. *Adv. Appl. Microbiol.* **64**: 224-246.
20. Matz, C. & Kjelleberg, S. (2005) Off the hook-how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* **3**: 302-307.
21. Cloete, T. E. (2003) Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Int. Biodet. Biodegrad.* **51**: 277-282.
22. Turner, R. J., Zannoni, D., Hynes, M. F. & Ceri, H. (2008) Antimicrobial agents and biofilms: resistance/tolerance is multifactorial. *Chimica Oggi.* **26**: 18-20.
23. Brown, M. R. W. & Gilbert, P. (1993) Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *J. Appl. Bacteriol. Symp.* **74 (Suppl)**: 87S-97S.
24. Lewis, K. (2001) Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 999-1007.
25. Stewart, P. & Costerton, J. W. (2001) Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet.* **358 (9276)**: 135-138.
26. Jefferson, K. K. (2004) What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiol. Lett.* **236**: 163-173.
27. Brooks, J. D. & Flint, S. H. (2008) Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* **43**: 2163-2176.
28. Chmielewski, R. A. N. & Frank, J. F. (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2**: 22-32.
29. Fratamico, P. M., Annous, B. A. & Gunther IV, N. W. (2009) Biofilms in the food and beverage industries. CRC and Woodhead Publ. Ltd. ISBN 9781845694777.
30. Manivannan, G. (editor) (2008) Disinfection and decontamination. Principles, applications and related issues. CRC Press. ISBN 978-0-8493-9074-6.
31. Shi, X. & Zhu, X. (2009) Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci Technol.* **20**: 409-413.
32. Carpentier, B. & Chassaing, D. (2004) Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *Int. J. Food Microbiol.* **97**: 111-122.



33. Sasahara, K. C. & Zottola, E. A. (1993) Biofilm formation by *Listeria-monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems. *J. Food Prot.* **56**: 1022-1028.
34. Avila, M., Ojcius, D.M. & Yilmaz, O. (2009) The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* **28**: 405-411.
35. Hojo, K., Nagaoka, S., Ohshima, T. & Maeda, N. (2009) Bacterial Interactions in Dental Biofilm Development. *J. Dental Res.* **88**: 982-990.
36. Heistad, A., Scott, T., Skaarer, A. M., Seidu, R., Hanssen, J. F. & Stenstrom, T. A. (2009) Virus removal by unsaturated wastewater filtration: effects of biofilm accumulation and hydrophobicity. *Water Sci. Technol.* **60**: 399-407.
37. Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B. & Givskov, M. (2002) Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **78**: 79-97.
38. Nadell, C. D., Xavier, J. B. & Foster, K. R. (2009) The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**: 206-224.
39. Taylor, M., Ross, K. & Bentham, R. (2009) *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microb. Ecol.* **58**: 538-547.
40. Almeida, E., Diamantino, T. C. & de Sousa, O. (2007). Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progr. Org. Coatings.* **59**: 2-20.
41. Hopkins, G. A. & Forrest, B. M. (2008) Management options for vessel hull fouling: an overview of risks posed by in-water cleaning. *ICES J. Mar. Sci.* **65**: 811-815.
42. Zhao, T., Podtburg, T. C., Zhao, P., Schmidt, B. E., Baker, D. A., Cords, B. & Doyle, M. P. (2006) Control of *Listeria* spp. by competitive-exclusion bacteria in floor drains of a poultry processing plant. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 3314-3320.
43. Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 255-261.
44. Tarver, T. (2009) Biofilms, a threat to food safety. *Food Technol.* **63** (2): 46-52.
45. Møretrø, T. & Langsrud, S. (2004). *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms.* **1**: 107-121.
46. Vázquez-Villanueva, J., Orgaz, B., Ortiz, S., López, V., Martínez-Suárez, J. V. & SanJose, C. (2009) Predominance and persistence of a single clone of *Listeria ivanovii* in a Manchego cheese factory over six months. *Zoonoses Public Health* (en prensa).

47. Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gympse, P. & Vogel, B. F. (2007) Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. **18**: 1165-1171.
48. Xavier, J. B., Picioreanu, C., Rani, S. A., Loosdrecht, M. C. M. V. & Stewart, P. S. (2005) Biofilm-control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix-a modelling study. *Microbiol*. **151**: 3817-3832.
49. Orgaz, B., Neufeld, R. J. & SanJose, C. (2007) Single-step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. *Enz. Microb. Technol.* **40**: 1045-1051.
50. Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E. & Holah, J. T. (1999) Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J. Appl. Microbiol.* **87**: 41-48.
51. Wirtanen, G. & Salo, S. (2003) Disinfection in food processing-efficacy testing of disinfectants. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **2**: 293-306.
52. Tomaselli, Y. (2006) Integrated management of cleaning and disinfection programs for bio-adhesion control and biofilm removal in food industries-a review. *Mitteil. Lebensmittel. Hyg.* **97**: 209-225.