

Biofilms: supervivència dels microorganismes, perill invisible als aliments

Dra. Carolina Ripollés Àvila
Dr. José Juan Rodríguez Jerez

Introducció

Els microorganismes tenen la capacitat d'adherir-se a superfícies, i formar agregats cel·lulars que es mantenen units entre si gràcies al fet que es troben dins d'una matriu autoproduïda, constituïda per un conglomerat de diferents tipus de biopolímers compostos per substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS), proteïnes i l'ADN extracel·lular. Les esmentades comunitats microbianes adherides a superfícies són conegudes com a biofilms. Encara que durant molt temps s'ha cregut que era una forma de resistència menor, els resultats científics ens indiquen que els microorganismes habitualment tendeixen a formar biofilms, de manera que els bacteris en estat planctònic (lliures en el medi ambient) són una situació intermèdia.

S'han trobat registres fòssils amb acumulacions successives de biofilms calcificats que es remunten a uns 3.700 milions d'anys. La formació de biofilms es coneix des del segle XVII, quan Anton van Leeuwenhoek (1632-1723) va observar microorganismes sobre la superfície de les dents mitjançant un microscopi de construcció pròpia, però no és fins a mitjan segle XX quan es descriuen amb més detall, s'identifica la importància per a la supervivència de microorganismes i es relacionen amb malalties de transmissió alimentària.

Els microorganismes als biofilms

Els microorganismes que conformen aquests biofilms tenen propietats que no

presenten en estat planctònic a causa que aquests:

—poden adquirir característiques noves a través de la transferència horitzontal de gens, —estan protegits de les fluctuacions ambientals,

—poden cooperar entre ells per accedir a una disponibilitat d'aliments més gran i incrementar l'eficiència metabòlica que tenen.

Així, els biofilms confereixen als microorganismes resistència davant d'agents antimicrobians, llum ultraviolada, dessecació i tractaments amb desinfectants, de manera que s'incrementa la capacitat que tenen els bacteris per sobreviure a l'estrès ambiental relacionat amb els entorns de processament dels aliments, tals com la refrigeració, la desinfecció, l'acidesa i la salinitat.

Les comunitats de microorganismes que conformen els biofilms poden estar compostes per una o per múltiples espècies. En la indústria alimentària els biofilms no solen estar formats per simples agrupacions tridimensionals de microorganismes idèntics, sinó per subpoblacions heterogènies amb comportaments diferents, que contribueixen a l'èxit global del biofilm.

Els biofilms multiespècie han demostrat ser més resistents a biocides que els monoespècie. Això es deu, en part, a la seva estructura més complexa. Per exemple, *E. coli* O157:H7, quan coexisteix en biofilms amb *Acinetobacter calcoaceticus*, pot arribar a produir una quantitat de biomassa quatre-centes vegades més gran en comparació amb el monocultiu sota les mateixes condicions ambientals. Una de les explicacions proposades per justificar el motiu pel qual els biofilms multiespècie tenen una resistència a biocides superior, en comparació amb els monoespècie, és la naturalesa específica i la composició de la matriu. S'ha demostrat que les interaccions entre microorganismes potencien la formació d'aquestes estructures per poder protegir-se eficientment de l'entorn en general.



La coexistència de diferents microorganismes permet l'intercanvi d'informació entre ells, la qual cosa permet l'agrupació i el treball conjunt en la protecció del grup. En gran manera, la informació esmentada es transmet mitjançant l'alliberament de substàncies químiques, que impliquen l'activació dels factors que permeten l'agrupació dels microorganismes. Aquest mecanisme de comunicació intermicrobiana és conegut com a percepció de quòrum i pot ser un dels focus d'estudi en el control de microorganismes.

Resistència dels biofilms als desinfectants

La resistència als agents antimicrobians és la característica dels biofilms que té una repercussió més gran per a la indústria alimentària, perquè influeix directament en l'efectivitat de les operacions de neteja i desinfecció.

Hi ha nombrosos estudis que demostren que l'eficàcia antimicrobiana dels desinfectants es veu disminuïda quan els bacteris conformen un biofilm, en comparació amb el moment en què aquests bacteris es troben en estat planctònic. Normalment, uns 10 mg/L de clor són suficients per tenir un efecte biocida significatiu per a bacteris en estat planctònic, però quan aquests bacteris es troben en un biofilm, com a mínim es requereix una concentració cent vegades superior. Aquest increment de la resistència a biocides, lluny d'estar associada amb els nivells d'adherència del bacteri o la seva sensibilitat al biocida en estat planctònic, es relaciona amb el desenvolupament i l'estructura del biofilm. D'aquesta manera, la resistència més gran es dona en biofilms madurs amb una estructura complexa. Per aquesta raó, els estudis per conèixer en quin grau s'eliminen aquestes estructures *in vitro* haurien de replicar amb el grau més gran de similitud possible el que es troba en la indústria, és a dir, biofilms madurs. Molts dels estudis duts a terme fins ara s'han fet amb cèl·lules adherides i formant microcolònies, en comptes d'estudiar-se amb models de biofilms madurs i robustos, amb més temps d'incubació. Avui dia seria molt important adaptar els protocols existents per a la

formació de biofilms i l'estandardització. Encara més, seria molt interessant que es poguessin reproduir les condicions exactes que es troben en la indústria alimentària.

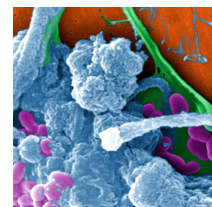
Mecanismes de resistència

Entre els mecanismes a què se'ls atribueix aquesta resistència més gran dels microorganismes davant dels desinfectants, quan estan a manera de biofilm, s'ha de destacar:

- Difusió lenta o incompleta del biocida cap a l'interior del biofilm.
- Diferent fisiologia de les cèl·lules que el conformen.
- Diferenciació d'una part de la població a cèl·lules persistents.
- Expressió de diferents respostes d'adaptació a l'estrès.

La matriu extracel·lular que envolta els bacteris actua com un filtre que no deixa passar molècules amb càrrega elèctrica elevada, com podrien ser determinats biocides. D'aquesta manera, el biocida només podrà estar en contacte amb les zones més pròximes a la superfície del biofilm i, per tant, els únics bacteris que es veuran afectats són aquells que siguin a un nivell més superficial ja que estaran exposats a concentracions elevades de biocida. Aquells bacteris situats en zones més internes del biofilm no entraran en contacte amb el biocida o, en el cas que entrin, estaran exposats a concentracions subletals, amb la qual cosa la viabilitat no se'n veuria afectada.

L'exposició dels microorganismes a concentracions subletals podria facilitar el desenvolupament de resistències al biocida. De fet, algunes soques de *L. monocytogenes*, persistents en indústries alimentàries, són més resistents a diferents desinfectants, entre ells a l'amoni quaternari. La característica esmentada, lluny de ser una adaptació ambiental, es tracta d'una resistència genètica adquirida, la qual cosa té implicacions importants





en els ambients de processament industrial. A més, l'exposició de *Listeria monocytogenes* a concentracions subinhibitòries d'amoni quaternari i la selecció consegüent de microorganismes resistents pot augmentar la capacitat d'aquests bacteris per formar biofilms i sobreviure al tractament de desinfecció posterior, fins i tot amb altes concentracions dels mateixos compostos.

Repercussió dels biofilms en la indústria alimentària

En la indústria alimentària es considera que la presència de biofilms a les superfícies és un problema potencial, ja que poden actuar com un vehicle de transmissió i una font de contaminació microbiològica persistent, amb unes conseqüències importants pel que fa a la seguretat alimentària i a la qualitat dels aliments.

De la mateixa manera, parts residuals de la matriu exopolimèrica que hagin quedat romanents a la superfície, perquè els hagin eliminat els procediments de neteja, proporcionen un espai per a l'ancoratge d'altres microorganismes que puguin arribar al sistema.

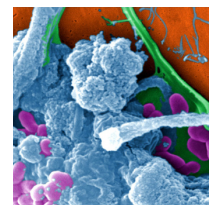
En la indústria, la probabilitat que les superfícies i els materials —canonades, ganyets, ganxos, juntes o cintes transportadores— siguin colonitzades per microorganismes és molt elevada amb els procediments de neteja i desinfecció habituals, ja que les restes orgàniques derivades del processament dels aliments són un medi apropiat per al desenvolupament de microorganismes i la posterior formació de biofilms. El grau de protecció dels biofilms pot permetre que microorganismes mesòfils, com *E. coli* O157:H7, puguin proliferar a temperatures de refrigeració en superfícies en contacte amb els aliments, i contribuir a la creació i la proliferació de biofilms mixtos en situacions inesperades.

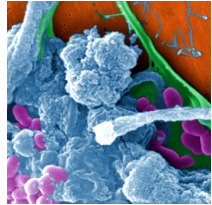
La presència de biofilms en la indústria, a part de causar problemes per la qual cosa es refereix a salut pública i deteriorament de productes, també poden ocasionar problemes a les instal·lacions i equips de processament dels aliments, com la

disminució de la capacitat de transferència de calor i el flux de les conduccions, o l'increment de la velocitat de corrosió de les superfícies.

Conclusions

L'existència de residus orgànics a les superfícies de les indústries alimentàries, juntament amb una elevada quantitat de microorganismes, permet que aquests microorganismes es propaguin, que s'adhereixin a les superfícies industrials i generin biofilms. Aquests biofilms són formes de resistència dels microorganismes, la qual cosa fa que els processos d'higienització habituals siguin insuficients. Les conseqüències seran una proliferació inesperada i una persistència de microorganismes patògens i/o responsables de l'alteració dels aliments, la qual cosa requerirà un tractament de control específic.





MÉS INFORMACIÓ

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 spray 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.