



**Escola de Prevenció
i Seguretat Integral**

Vinculada a la **UNIB**

ESTUDIO DEL BIOFILM: Formación y Consecuencias

**Glòria Piera Serra
Curso 2002-2003**

Resumen

Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos recubiertas de un polímero extracelular que les ayuda a retener el alimento y a protegerse de agentes tóxicos.

Se forman espontáneamente en presencia de humedad y pueden vivir con mínimas trazas de nutrientes. Se adaptan a un medio adverso mientras lo cambian a su alrededor y se le vuelven a adaptar, esta cualidad se basa en la activación de diversos grupos de genes. A partir de ellos sintetizan las proteínas que necesitan para numerosas acciones.

Se fijan fuertemente a una superficie, contra la repulsión inicial, y la modifican mientras captan más nutrientes y nuevas bacterias con las que iniciaran más cambios como por ejemplo, la síntesis del glicocalix, el polímero extracelular de tipo polisacárido que da estructura y protección a la comunidad.

Un biofilm desarrollado es muy resistente, y un problema cuando se precisa un entorno limpio y desinfectado. Los microbios de los biofilms pueden significar un reservorio de bacterias, involucrarse en contaminaciones cruzadas, obturar las conducciones de líquidos, y poner serias dificultades a la higiene.

De todos modos, un buen programa de limpieza y desinfección ha demostrado ser el mejor método de mantener la carga microbiana en unos niveles mínimos.

Índice

ESTUDIO DEL BIOFILM: FORMACIÓN Y CONSECUENCIAS	1
RESUMEN	2
ÍNDICE.....	3
EL BIOFILM, INTRODUCCIÓN	4
DEFINICIÓN	4
FASES DE DESARROLLO DEL BIOFILM	6
ACONDICIONAMIENTO DE LA SUPERFICIE	7
ADSORCIÓN Y FIJACIÓN.....	7
MADURACIÓN: EL GLICOCALIX	9
COOPERACIÓN ENTRE ESPECIES	10
CRECIMIENTO Y DISPERSIÓN.....	12
RAZONES PARA EL DESARROLLO DEL BIOFILM	13
EL ALIMENTO	13
LA PROTECCIÓN: RESISTENCIA A LOS BIOCIDAS	14
CONSECUENCIAS DE LA PRESENCIA DEL BIOFILM EN LA INDUSTRIA Y LOS ESTABLECIMIENTOS ALIMENTARIOS.....	15
PRODUCTO ACABADO	15
CONDUCCIÓN DE AGUA.....	17
LIMPIEZA	17
DESINFECCIÓN.....	19
PRESENCIA Y PROVECHO DEL BIOFILM EN OTROS ÁMBITOS.....	20
• <i>En el agua</i>	20
• <i>Tratamiento anaeróbico de efluentes complejos</i>	20
• <i>Inmovilización de microorganismos para la obtención de productos industriales</i>	21
• <i>En clínica</i>	21
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24

EL BIOFILM, Introducció

Desde que empezó a desarrollarse la microbiología, los investigadores han podido observar los microorganismos libres que obtenían de diversos medios naturales y, más adelante, investigarlos a partir de los que podían hacer crecer en medios de cultivo artificiales, preparados en el laboratorio.

El hecho de poder aislar microorganismos puros a partir de cultivos en condiciones específicas, ha permitido un gran avance de esta ciencia con aplicaciones clínicas, agrícolas e industriales. Se han podido conocer los causantes de las enfermedades infecciosas y buscarles remedio, la actividad de las bacterias nitrificantes y programar el barbecho, promover la transformación de diversos alimentos para hacerlos más duraderos, para obtener sustancias específicas y muchas otras cosas. La importancia de estos descubrimientos y aplicaciones no puede menospreciarse, y el provecho de la tecnología que se ha derivado de ellas nos ha llegado a todos.

Hace cerca de un siglo que la mayoría de trabajos microbiológicos se basan en las propiedades de cultivos puros de microorganismos y de los mismos organismos individualmente. Pero, en realidad, los cultivos puros no existen en el medio natural, sino que los microorganismos se combinan en grandes colonias limosas donde los diversos individuos establecen relaciones y dependencias.

Definición

Los biofilms son comunidades complejas de microorganismos y polímeros extracelulares, fijas a una superficie, que pueden presentar una única especie o un abanico de especies diferentes (Costerton, 1995; Davey y O'Toole, 2000; Kraigsley et en el., 2002). J.W. Costerton dirige el Centro para la Ingeniería del Biofilm en la Universidad del Estado de Montana. Este centro fue fundado en el año 1990 para recoger y estudiar las diversas y sorprendentes apreciaciones que

iban descubriéndose, por parte de equipos multidisciplinares de ingenieros, biólogos, químicos y especialistas en medio ambiente.

Podemos encontrar biofilms en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Solo necesitan un entorno hidratado y una mínima presencia de nutrientes, porque pueden desarrollarse sobre superficies hidrófobas o hidrófilas, bióticas o abióticas (Milleret en el., 1987; Marshall, 1992; Fletcher, 1988; O'Toole y Kolter, 1998a, 1998b; Kraigsley et en el, 2002). La clase de material de la superficie parece que tiene poca influencia sobre el crecimiento del biofilm.

Desde un punto de vista antropológico, algunos biofilms nos resultan perjudiciales y otros nos son beneficiosos. Así pues, tenemos biofilms sobre las rocas marinas y los cascos de los barcos, alrededor de las raíces vegetales y en la piel o la flora intestinal de los animales superiores. Los encontramos en el jarro de las flores de hace días, en el grifo de la cocina o en el desagüe del refrigerador. También están en la placa dental y en el oído infectado, o contaminando productos implantados como catéteres, marcapasos, etc., que pueden dejar su carga al moverse o ser extraídos. Parecen estar involucrados en la corrosión y obstrucción de tuberías diversas pero también en la depuración del agua residual, por ejemplo, cuando se hace pasar por los filtros de arena donde proliferan selectivamente.

En los últimos veinte años, ha ido creciendo la percepción de que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente en una forma unicelular, planctónica o libre, como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría se encuentran principalmente formando parte de los biofilms que acabamos de definir. Esta percepción ha constituido un aguijón para incitar a investigar más acerca de las propiedades físicas y químicas de los biofilms, la caracterización de su morfología, y sus formas de desarrollo.

Fases de Desarrollo del Biofilm

En el mismo momento en que se acaba la limpieza de un depósito o una conducción de agua, empieza a desarrollarse el biofilm. Si ponemos un cristal limpio y estéril en una corriente de agua que contenga unos nutrientes mínimos, al cabo de un tiempo variable se habrá formado un ecosistema microbiano que establecerá complejas relaciones individuales y se engranará en una masa de polisacáridos producida extracelularmente por los mismos pobladores (Biofilm Online Manual, 1998).

El biofilm bacteriano empieza a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie. La capacidad de la célula para realizar este ataque inicial depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas (Costerton, 1995; O'Toole et en el., 2000; Kraigsley et en el, 2002). Aunque la combinación de los factores que influyen en el desarrollo del biofilm dependen en principio de la especie, algunas características son comunes a la mayoría de bacterias estudiadas hasta ahora.

Después de la unión inicial, la célula empieza a crecer y a esparcirse sobre la superficie en una monocapa, mientras forma micro colonias. Mientras tanto, las células cambian su comportamiento y dan lugar a la compleja arquitectura del biofilm maduro. El más evidente de estos cambios es la producción de la matriz de exopolisacáridos que cementará todo el conjunto (Danese et en el., 2000). Mientras el biofilm va creciendo suceden otros cambios. Si las condiciones ambientales lo permiten, se puede extender hacia áreas no infectadas o liberar algunas células, que recuperan las cualidades planctónicas y actúan como las semillas que reparte el viento, hacia nuevas superficies.

La formación de un biofilm pues, no es un proceso aleatorio sino que sigue una sistemática que permite su predicción. Se han identificado cinco fases: Una adsorción reversible de la bacteria a la superficie, una unión irreversible, una primera fase de maduración con crecimiento y división, la segunda fase de

producció del exopolímero, y el desenvolupament final de la colònia amb dispersió de cèl·lules colonitzadores.

Acondicionamiento de la superficie

Las bacterias son capaces de formar biofilms sobre muchas superficies bióticas y sobre todas las abióticas probadas.

La capacidad de unirse a diversos plásticos, cristal y metales, depende de las proteínas específicas de su cubierta y de los apéndices motrices. Los estudios muestran que el acero inoxidable puede ser tan susceptible como el plástico (Pedersen, 1990). La acción del aire o de la humedad sobre el acero inoxidable, poco a poco crea una capa de óxido de cromo sobre el que se pega la suciedad orgánica. Así se pre-acondiciona el sustrato para la adhesión de las bacterias.

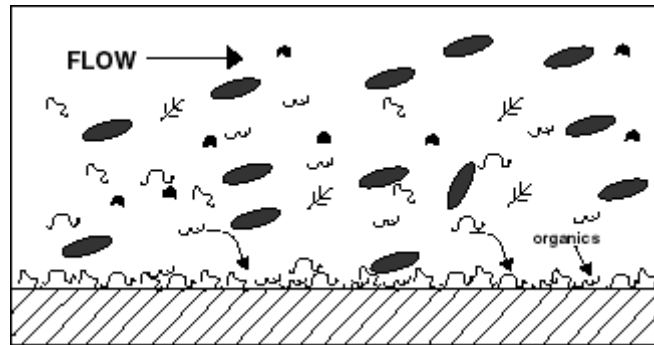
El biofilm puede desarrollarse sobre casi cualquier tipo de superficie, gracias a que previamente entra en contacto la materia orgánica presente en el agua. En la interfase agua/superficie se deposita una capa orgánica, que cambia las propiedades químicas y físicas de la superficie y mejora las posibilidades de fijación de las bacterias.

Adsorción y Fijación

La adhesión de los microbios a un sustrato puede ser activa (por los flagelos, pili, adhesinas, cápsulas y cargas de superficie) o pasiva (por gravedad, difusión y dinámica de fluidos). En condiciones normales, las células bacterianas son repelidas por la superficie ya que presentan cargas eléctricas iguales.

En unos minutos, las bacterias libres que encuentran la superficie acondicionada, forman con ella una unión reversible que depende de las cargas eléctricas de la bacteria. Son atracciones de tipo electrostático o hidrófobo y fuerzas de Van der Waals, sin unión química. Si esta unión se mantiene suficiente tiempo, aparecen nuevas estructuras químicas y físicas que la harán permanente y irreversible.

En casos de gran densidad de poblaci3n o ante la precariedad de nutrientes que hay en el agua potable, algunos microorganismos son capaces de responder individualmente con una alteraci3n de su pared celular para hacerla hidr3foba y, por lo tanto, con m1s afinidad hacia las superficies (Mayette 1992). Cuando llegan a la capa base, m1s pr3xima a la pared de la tuber1a y casi sin flujo de agua, son



atra1dos por la superficie donde tantear1n una uni3n y intentaran fijarse a ella.

Figura 1.- Transporte de una c3lula bacteriana a la superficie acondicionada: adsorci3n, desorci3n y adsorci3n irreversible (Characklis 1990).

Durante la etapa de uni3n reversible las c3lulas bacterianas a1n muestran movimiento Browniano, y se eliminan f1cilmente al fregar. La uni3n irreversible significa el anclaje de ap3ndices bacterianos y la producci3n de exopol1meros. La acci3n mec1nica necesaria para desengancharlo ser1 mayor cuanto m1s tiempo lleve activo el biofilm.

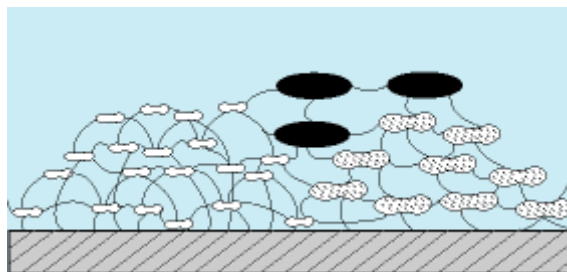
Para adaptarse a la vida del biofilm, una bacteria ha de sufrir cambios radicales. El cambio del medio donde se encuentra activa diferentes genes que codifican nuevas prote1nas estructurales y enzimas. Estos genes y prote1nas son los que explican la fijaci3n y la resistencia de las bacterias incluidas en los biofilms ante los antibi3ticos o los desinfectantes. A partir del a1o 2000, los avances en prote3mica y en gen3mica han permitido avanzar en el estudio de sistemas complejos como los biofilms. Se han podido identificar 800 prote1nas que cambian de concentraci3n a lo largo de las cinco fases de desarrollo (Whiteley et en el. 2001; Singh et en el. 2002).

Maduración: el glicocalix

La tranquilidad que reina en este ambiente, favorece el crecimiento y la división de las células y permite iniciar la fabricación de una mezcla de polímeros polianiónicos, limosa y pegajosa, que excreta al exterior para mantener unidas las células, entre ellas y con la superficie.

La composición del exopolímero es poco conocida, pero consta de polisacáridos o glicoproteínas de diversos azúcares, como glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina y otros. También puede contener proteínas libres, fosfolípidos y ácidos nucleicos o teicoicos (Chmielewski y Frank, 2003). Se sirven de ellos para retener los nutrientes y para proteger a las bacterias de los diversos biocidas.

El glicocalix de material polimérico se excreta desde la pared celular bacteriana en una formación radicular que recuerda la de una araña. Se estructura a partir de grupos de polisacáridos neutros o portadores de cargas eléctricas, que suman a la



adherencia la capacidad de actuar como un sistema de intercambio iónico para atrapar y concentrar los nutrientes que encuentre.

Figura 2.- Diagrama de la estructura de un biofilm desarrollado
(Center for Biofilm Engineering)

Cuando los nutrientes se concentran, las células primitivas se reproducen con menos limitaciones; las células hijas producirán su propio glicocalix y aumentará exponencialmente la superficie de intercambio iónico y el volumen de una próspera colonia bacteriana.

En un biofilm maduro, la mayor parte de su volumen está ocupado por la matriz laxamente organizada (75-95%) alrededor de unas pocas bacterias (5-25%) (Geesey, 1994), que proporciona una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua disponible.

A pesar de todo, los estudios que han permitido descubrir esta estructura han sido realizados en agua y aguas residuales. Pero en la industria alimentaria se dan niveles muy altos de nutrientes junto a depósitos macroscópicos y microscópicos de residuos alimentarios, el estrés frecuente de la limpieza y desinfección, y otros factores cuya influencia no ha sido aún considerada (Chmielewski y Frank, 2003).

Cooperación entre especies

Al cabo de pocos días de la primera colonización, otros microbios quedan atrapados en el glicocalix por captación física y atracción electrostática. Hongos o bacterias sin movilidad propia serán capaces de aprovechar materiales residuales de los primeros habitantes, y de producir sus propios residuos que serán aprovechados por otros microbios, a su vez.

Desde el biofilm más simple (por ejemplo, una colonia bacteriana en agar nutritivo) al más complejo (las interacciones de los microorganismos patógenos con las células huéspedes, o las poblaciones bacterianas que viven naturalmente en el lodo), la comunidad metabólica coopera de una manera compleja, como el tejido vivo de un organismo multicelular. Las diferentes especies viven en un nicho mínimo, superespecializado y hecho a medida. Si una especie genera residuos tóxicos, otra los devorará con avidez. Así se consigue coordinar los recursos bioquímicos de todos los habitantes del biofilm; se reúnen los diferentes enzimas de los que disponen numerosas especies de bacterias para abastecerse de aportes nutritivos que ninguna especie sola podría digerir. También servirán para responder al ataque de diversos biocidas.

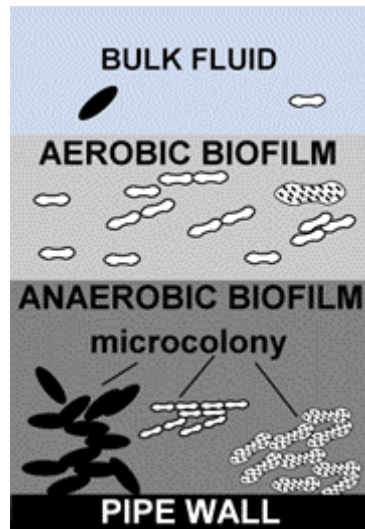


Figura 3.- Consorcio de microorganismos en un biofilm (Borestein, 1994)

Se puede desarrollar un biofilm anaeróbico bajo la capa aeróbica.

La estructura se permeabiliza con una red de canales atravesados por agua, residuos bacterianos, enzimas, nutrientes, metabolitos y oxígeno. Los gradientes de iones y moléculas que se establecen entre las diversas zonas, proporcionan el impulso necesario para derivar las sustancias hacia los alrededores del biofilm (vg. Figura 3). Es precisamente en la periferia de la estructura donde se localizan la mayoría de células viables, cuyo número se reduce con la edad del biofilm; en un biofilm joven se han detectado cerca de un 80% de células viables, y tan solo un 50% en un biofilm antiguo (Wimpenny et en el., 2000).

Tenemos muchos ejemplos de cooperación entre las bacterias que han originado el biofilm y otros organismos. Incluso pueden colaborar con especies superiores, como la rizosfera, que envuelve las raíces de muchos árboles para protegerles de la infección fúngica. O las bacterias del rumen, que fermentan la celulosa vegetal permitiendo su digestión al huésped mamífero. También representan el alimento básico de la cadena alimentaria global, el plancton.

Crecimiento y dispersión

La colonia, en división continua, libera periódicamente unas pocas células que se repartirán corriente abajo. Estos nuevos colonizadores lo tienen más fácil que los iniciales porque desde el biofilm original se le liberaran residuos y nutrientes que podrán usar para preparar la nueva superficie con la cubierta orgánica de acondicionamiento y para alimentar otras células (Mayette, 1992). Esta colonización está relacionada con la evolución y la supervivencia de la bacteria a largo plazo.

Si las condiciones de flujo hídrico lo permiten, el equilibrio que se establece entre el crecimiento de la colonia y el movimiento del agua libera pocas células. Con un flujo intenso o turbulento se pueden liberar muchas más, incluso desenganchar partes enteras del biofilm. El nivel de estrés ambiental y la transición entre entornos diferentes son unos de los factores principales que influyen en esta liberación celular (Kraigsley, 2000).

Razones para el Desarrollo del Biofilm

El alimento

En los diversos medios donde se encuentran los microbios se dan situaciones de abundancia, incluso de exceso de nutrientes, y situaciones de austeridad y falta de nutrientes. Esta última situación se da en el agua potable, especialmente en los sistemas de agua de alta pureza, donde las bacterias activan estrategias propias de cada especie. Unos microbios cambiarán su cubierta para hacerla más hidrófoba y dirigirse hacia las paredes; otros irán moviéndose directamente con sus flagelos o pili, y otros caerán al fondo por gravedad.

En la superficie donde lleguen habrá alguna molécula orgánica o mineral que permita un cambio energético mínimo. Las partículas del entorno o las de la misma superficie pueden suministrar el sustrato inicial, puesto que las bacterias han demostrado ser capaces de obtener nutrientes de las tuberías o del revestimiento interno del sistema hídrico (Flemming y Geesey, 1990). También pueden obtener trazas de metal a partir del acero inoxidable y otros componentes metálicos. Los microorganismos oligotrofos serán pues los primeros en colonizar una superficie, y les seguirán aquellos que han evolucionado para encontrar y unirse a las superficies con tal de incrementar sus posibilidades de captar nutrientes.

Los primeros colonizadores irán concentrando las formas orgánicas de la superficie y metabolizándolas para fabricar otras nuevas.

A partir de la formación del polímero extracelular, se incrementa notablemente la capacidad de retención de nutrientes a partir del medio. Se entretienen entre la red o se le quedan adheridos. También influye la actividad de intercambio iónico que ahí se desarrolla.

El glicocalix atrapa nutrientes y otros microbios que se mezclaran con los que ya estaban allí y con sus descendientes. Las nuevas bacterias serán capaces de utilizar como nutrientes lo que otros rechacen. Finalmente se unirán todos los recursos

bioquímicos de las diferentes especies de bacterias, cada una con sus enzimas, para digerir aportes alimentarios que ninguna de ellas podría aprovechar en solitario.

La protección: Resistencia a los biocidas

El exopolímero protege a los habitantes del biofilm de la dispersión de sustancias nutritivas, del acceso de los biocidas y de la desecación.

Los limpiadores químicos mejoran la capacidad de arrastre de la suciedad por la propia agua. Allá donde ella no puede, suspenden y disuelven los residuos alimentarios al reducir la tensión superficial, por emulsión de las grasas y la peptización de las proteínas. Pero aún no sabemos como los detergentes pueden eliminar el exopolímero asociado a los biofilms. Los fabricantes de detergentes y desinfectantes aún no tienen en cuenta la estructura glicoproteica que mantiene el biofilm enganchado a la superficie. Harían falta nuevas formulaciones para poder disolver estas sustancias.

Se ha podido demostrar que las células del biofilm pueden resultar entre 10 y 1000 veces más resistentes que las células planctónicas correspondientes (Brown et en el., 1988; Stewart, 1996; Mah & O'Toole, 2001). Los biofilms presentan resistencias a un gran número de antibióticos de amplio espectro (ampicilina, estreptomicina, tetraciclinas, gentamicina...) y de biocidas oxidantes del tipo del cloro, el yodo o el ozono. Esta característica los hace muy difíciles de eliminar, incluso de controlar, en medicina y en la industria. Ha podido demostrarse la implicación del biofilm en la resistencia de las bacterias a los antibióticos. La terapia antibiótica usual elimina las bacterias en estado planctónico, pero no puede acceder a las del biofilm. Por otra parte, en él se han detectado enzimas hidrolíticos del tipo de la β -lactamasa (Widner et en el. 1990), que serían sintetizados en poca cantidad pero que se mantendrían atrapados y concentrados en la matriz del biofilm, lo que contribuiría a su protección.

Consecuencias de la presencia del biofilm en la industria y los establecimientos alimentarios

El establecimiento de bacterias adheridas a los alimentos o a las superficies en contacto con los alimentos, conlleva serios problemas higiénicos y numerosas pérdidas económicas por los productos que se llegan a desechar (Holah y Kearney, 1992; Carpentier y Cerf, 1993).

Por este motivo es preciso eliminar todos los microorganismos de las superficies en contacto con los alimentos, antes de que los contaminen y establezcan un biofilm que servirá de reservorio. El biofilm formado sobre las carnes crudas y en el entorno del proceso manipulador (superficies, utillaje y instrumentos...) aumenta considerablemente los problemas de contaminación cruzada y de contaminaciones posteriores en el proceso.

Afortunadamente, en la industria alimentaria se dan pocos biofilms correctamente desarrollados, porque pueden mantenerse controlados con programas correctos de limpieza y desinfección (Gibson et en el., 1995) que se apliquen frecuentemente.

En las industrias alimentarias lo más importante es la supervivencia de microorganismos patógenos o alterantes debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos que están en contacto con los alimentos, además de aquellos procesos que causen la dispersión en aerosol de los microbios, sobre las superficies o el producto acabado.

Producto acabado

Los biofilms formados en las superficies que están en contacto con los alimentos son la principal causa de contaminación del producto final. Las consecuencias de esta contaminación pueden conducir a pérdidas económicas dado el necesario rechazo del producto o incluso, a enfermedades debidas a toxiinfecciones alimentarias si intervienen patógenos.

Para acabar bien, es preciso empezar bien y continuar mejor. El diseño higiénico de las instalaciones y del equipo es la mejor medida preventiva; y el mantenimiento de las condiciones (programas de limpieza y desinfección), además de la manipulación correcta en todos los procesos, imprescindible.

El desarrollo de biofilms en los lugares de procesado de alimentos, incrementa la posibilidad de que se contamine el producto final. Se han de eliminar de cualquier tipo de superficies, de los suelos, los desagües, los codos de las tuberías, las juntas de goma, las bridas de unión, etc. (Ganesh y Anand, 1998). Aunque diversas investigaciones han detectado la presencia y unión de distintos microorganismos a las superficies cárnicas, especialmente en pollo (Lillard, 1986 y 1988), no está claro que la formación del biofilm se pueda favorecer por estas superficies sino más bien al contrario, los organismos estudiados han estado más relacionados con la contaminación cruzada que con el sacrificio.

Debe evitarse también que la limpieza de las instalaciones y superficies pueda provocar aerosoles del biofilm (barrer, limpiezas a alta presión...), que los disperse o los conduzca a elementos no contaminados.

En la industria lechera, especialmente sensible a cualquier contaminación, y en otras industrias alimentarias, se usan sistemas de ultrafiltración y de osmosis inversa en el fraccionamiento de la leche y otros líquidos o para la clarificación de zumos de frutas (Glover, 1985; Cheryan, 1986). Estos filtros y membranas tienen unos poros mínimos y están continuamente en contacto con el alimento; la más mínima adsorción microbiana bloquearía los poros y provocaría la colmatación del filtro. La colmatación es debida al biofilm que se le forma, pero también favorece por sí misma la formación de biofilm. Al final se reduciría el flujo con las consiguientes pérdidas de rendimiento y de producto (Cheryan, 1986)

Conducció de agua

Pueden crecer biofilms dentro de tuberías de cualquier líquido, de agua potable, aceites, productos químicos, etc. El suministro de agua potable presenta unas trazas mínimas de nutrientes que ya son suficientes para permitir su desarrollo. Por otra parte, los altos niveles de cloro residual que presenta parece que no son suficientes para evitar la formación del biofilm (Block, 1992; Marshall, 1992).

La formación de biofilms en las conducciones de agua potable ha sido ampliamente estudiada (Ridgeway y Olson, 1981; LeChevalier, Bancroft y Lee, 1987), y se demuestra como queda reducida la velocidad y la capacidad de circulación y como quedan colmatadas las tuberías, lo que nos conduce a consumir más energía para obtener menos rendimiento. Los sistemas antiincendios son especialmente importantes para prevenir la colmatación y controlar los biofilms (figura 4).

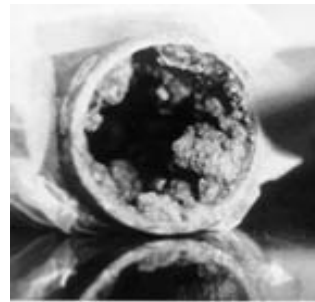


Figura 4 - Formación tuberculosa en una tubería antiincendios de acero. En los tubérculos se le encontraron bacterias oxidantes del hierro. (Mittelman, 2001)

La formación del biofilm puede bloquear el flujo, la impedancia de la transmisión térmica (Sandu y Singh, 1991) y favorecer la corrosión de superficies metálicas (Bryers, 1987), problemas que no son frecuentes en las industrias alimentarias.

Limpieza

Los biofilms son invisibles, pero pueden detectarse por el olor desagradable de zonas aparentemente limpias o el carácter viscoso que adquieren algunas superficies infestadas. Estas sensaciones de olor y tacto son las que reconocemos cuando nos referimos a una suciedad que es preciso limpiar.

El proceso de limpieza puede llegar a eliminar el 90% de los microorganismos de una superficie. Una limpieza larga y exhaustiva con detergentes alcalinos formulados con quelantes, ya resulta efectiva en la eliminación del biofilm (Dunsmore, 1981), pero no es capaz de matarlos. Las bacterias se mantienen en suspensión y pueden redepósitosarse en otro lugar y, con tiempo, agua y nutrientes, formaran un nuevo biofilm. Por eso es necesario desinfectar después de limpiar (Gibson et en el., 1999).

La principal limitación de los sistemas de limpieza reside en los problemas de acceso a diversas zonas como ranuras, grietas, finales ciegos, manchas de corrosión... que se han comentado antes. Si el biofilm queda como reservorio en estos puntos, la limpieza nunca podrá ser exhaustiva.

Por otra parte, la acción misma de limpiar, química y mecánica, afecta a los materiales. Se ha podido demostrar que las condiciones de limpieza de una superficie tan inalterable como el acero inoxidable, cambia sus propiedades (Boulangue-Peterman, 1996; Sinde y Carballo, 2000): la adhesión del biofilm será diferente después de una limpieza alcalina o con ácido fuerte. En estudios comparativos llevados a cabo con materiales como el acero inoxidable, el cristal, el nylon o compuestos de polivinilo se demuestra que la limpieza puede eliminar igualmente las bacterias de cualquier superficie mientras sea nueva (LeClerq-Perlat y Lalande, 1994), pero es el acero inoxidable el que resiste mejor el desgaste que tiene lugar con el tiempo y el uso. Las irregularidades que llegue a presentar la superficie permitirán el alojamiento de bacterias y de materia orgánica y, por lo tanto han de limpiarse a fondo, pero se deberá guardar un cierto equilibrio entre la intensidad de la limpieza y el mantenimiento de los instrumentos.

Sea como sea, para eliminar el biofilm se usarán limpiadores con una buena capacidad de disolución pero este no sería el único requisito. Para asegurarse es preciso fregar intensamente o provocar fuertes turbulencias (Chmielewski y Frank, 2003) aptas para arrancar placas enteras del biofilm, separarlas de la

superficie y arrastrarlas aguas abajo. Con todo, aún convendría desinfectar los restos que queden adheridos.

Desinfección

En el entorno alimentario se llevan a cabo acciones frecuentes y efectivas de limpieza y desinfección que, unidas a otras actividades como el tratamiento térmico de los productos o la desecación, causan un considerable estrés en las células y provocan que no se reproduzcan según los métodos de cultivo habituales (Wong y Cerf, 1995). Por eso los resultados analíticos pueden ser negativos. De todos modos, los métodos sensibles como el recuento directo de células viables combinado con una técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes, ha permitido aún la detección.

Dentro del biofilm, los microorganismos se encuentran protegidos de la acción de los desinfectantes (Frank y Koffi, 1990). Esta estructura glucoproteica provoca y mantiene una serie de acciones que se combinan para crear resistencias. Por ejemplo la difusión reducida de las sustancias, los cambios fisiológicos que sufren los microbios y el bajo nivel de crecimiento que se da, además de la formación de enzimas capaces de degradar sustancias antimicrobianas.

La resistencia a los antimicrobianos parece depender de la estructura tridimensional que presenta. Cuanto más viejo y grueso sea, más resistencia le da; a la inversa, si se desmonta la estructura se pierde la resistencia (Hoyle et al., 1990). En consecuencia, la eficacia de la desinfección estará directamente relacionada con la capacidad de la limpieza previa para desenganchar y desorganizar la matriz extracelular.

Los estudios sobre el biofilm habitualmente se han desarrollado en unas condiciones de falta de nutrientes, situación habitual en el agua de bebida pero que no acostumbra a darse en el medio alimentario. En estas condiciones de déficit y la competencia que de ello se deriva, parece originarse un tipo de biofilm aún más resistente a los agentes antimicrobianos (Berg, 1982).

En cualquier situación, la eliminación del biofilm es una tarea muy difícil y exigente que puede resultar sumamente cara, poco realista incluso. Siempre quedan restos, aunque sean indetectables. La mejor eficiencia se consigue con la desinfección frecuente: un buen programa de N+D no esteriliza sino que sana, es decir, mantiene la carga microbiana en unos niveles limitados que conviene que sean mínimos.

Presencia y provecho del biofilm en otros ámbitos

- **En el agua**

En el medio acuático, el biofilm aparece y se acumula en todas las superficies sumergidas, naturales o artificiales, y así reduce la eficiencia hidrodinámica de barcos y sistemas de propulsión. El musgullo que se forma sobre los cascos marinos es debido al desarrollo de un biofilm a base de algas unicelulares, diatomeas y bacterias (Lewin, 1984). Se están usando pinturas para evitar la adhesión y colonización, sin una efectividad clara para un problema con repercusiones económicas. Y es que el aumento de fricción que resulta cuando se establece, incrementa la resistencia al agua y el consumo de combustible (Cooksey y Wiggelworth-Cooksey, 1992), con un indudable coste económico.

- **Tratamiento anaeróbico de efluentes complejos**

Algunas depuradoras de agua (residuales y de industrias alimentarias) actúan por imitación de los procesos que ocurren naturalmente en el medio ambiente, en los que un biofilm se encarga de mantener y recuperar la calidad del agua. Las bacterias de estos biofilms compiten con las del agua en unas condiciones que les resulten favorables. Además también biodegradan la materia orgánica y la mayor parte de los compuestos tóxicos, y así actúan como agentes desintoxicantes y también resultan útiles para la monitorización de estos compuestos en el medio en donde viven (Fuchs et al., 1996).

Pero los procesos de tratamiento de aguas residuales incluyen también la osmosis inversa mediante filtros, que se pueden colmatar si se desarrolla en ellos el biofilm, lo que conduciría a una reducción del flujo y al deterioro del rendimiento general del proceso (Ridgeway y Olson, 1983).

- Inmovilización de microorganismos para la obtención de productos industriales



El biofilm representa el hábitat natural de los microbios; muestran una tendencia innata a inmovilizarse en estas estructuras mucosas y organizarse en ellas en comunidades complejas capaces de fabricar excedentes de determinadas sustancias. Esta habilidad ha sido la base de los biorreactores industriales (Dermici y Pometto, 1995), sistemas cerrados que utilizan microorganismos para realizar procesos fermentativos productivos y estables.

Tenemos un ejemplo de biofilm fisiológico en el tracto gastrointestinal (figura 5), que puede considerarse colonizado por una microflora inmovilizada natural, específica y muy abundante en bacterias lácticas, que ofrecen una primera barrera protectora a la colonización por bacterias patógenas. Esta inmunidad inespecífica que ofrece al organismo resulta esencial ante la ingestión de los alimentos, especialmente cuando no tienen una garantía sanitaria que le dé confianza.

Figura 5 – Microfotografía electrónica del íleo de un ratón. La capa mucosa, gruesa, cubre las microvellosidades (ASM, 2000).

- En clínica

Después de una intervención quirúrgica, es habitual seguir un tratamiento antibiótico, especialmente si se han tenido que implantar algún tipo de instrumento médico. Si cualquier bacteria, incluso la flora dérmica normal, crece

y forma un biofilm sobre la superficie del elemento a implantar (catéteres intravasculares o intrauterinos, marcapasos, bombas de medicación...) se convierten en un reservorio de bacterias. Aunque es muy poco frecuente, la infección que se manifiesta resulta extremadamente difícil de erradicar, con un riesgo elevado de volverse crónica o de provocar una sepsis. Los niveles de antibiótico necesarios para eliminar este biofilm serían tan altos que resultarían tóxicos para el paciente (Barie et en el., 1990). Como único recurso se debería extraer el instrumento. En realidad parece que más del 80% de las bacteriemias nosocomiales resultan de la contaminación de catéteres intravasculares (Archibald y Gaynes, 1997).

Tenemos otros ejemplos significativos de biofilm con significación clínica. Como la placa bacteriana que se deposita sobre los dientes, en las cistitis recurrentes (*Escherichia coli* en la vejiga urinaria) y en las infecciones crónicas de los pacientes con fibrosis quística (*Pseudomonas aeruginosa* en los pulmones).

Conclusiones

Los microorganismos no son como los hemos estudiado en la escuela. Sólo conocemos células aisladas que proceden de una estructura tridimensional compleja, el biofilm.

Hasta que la tecnología nos ha permitido detectar niveles ínfimos de presencia microbiana, habíamos creído que disponíamos de sistemas y medios para erradicarlos totalmente. Ahora sabemos que siempre quedan algunos, y aunque sean pocos, las bacterias solo precisan de un poco de humedad para iniciar una evolución conjunta que establecerá cooperaciones y sinergias en la gestión del espacio y los nutrientes.

En los últimos años se ha estudiado cómo es el biofilm y cómo eliminarlo. Se ha llegado a conocer su morfología pero no su saneamiento. Se debería profundizar en esta cuestión y buscar materiales repelentes a la adhesión y que no aporten nutrientes, formular biocidas y diseñar sistemas para asegurarse su eliminación de allá donde sea preciso. Y quizás también convendría aceptar este tipo de vida natural y procurar convivir con ella teniendo en cuenta las limitaciones que comporta.

Bibliografia

Anónimo , en www.erc.montana.edu

Archibald, L. K., and R. P. Gaynes. 1997. Hospital acquired infections in the United States: the interhospital comparisons. *Nosocomial Inf.* **11**(2):245-255.

ASM biofilm image collection 2000, en www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms/primero.html

Barie, P. S., N. V. Christou, E. P. Dellinger, W. R. Rout, H. H. Stone, and J. P. Waymack. 1990. Pathogenicity of the enterococcus in surgical infections. *Ann. Surg.* **212**(2):155-158

Berg JD, Matin A, Roberts PV. 1982 Effect of the antecedent growth conditions on the sensitivity of *Escherichia coli* to chlorine dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**:814-8

Biofilm Online Manual, 1998, que resultó de una beca del ASM Board of Education and Training para el Biofilm Curriculum Development Program de la Universidad de Pennsylvania (USA), en <http://www.personal.psu.edu/faculty/j/e/jel5/biofilms/primero.html>

Block JC 1992 Biofilms in drinking water distribution systems, en Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B (Eds). *Biofilm-Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp.469-85

Borestein 1994, en www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=143

Boulangue-Peterman, L 1996 Processes of bioadhesion on stainless steel surfaces and cleanability: a review with especial reference to food industry. *Biofouling* **10**(4):275-300

Brown, M. R., D. G. Allison, and P. Gilbert. 1988. Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: related effect? *J Antimicrob Chemother.* **22**(6):777-80.

Bryers JD. 1987 Biologically active surfaces: processes governing the formation and persistence of biofilms. *Biotechnol Prog* **3**(2):57-68.

Carpentier B, Cerf O. 1993 Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.* **75**:499-511

Center for Biofilm Engineering en www.personal.psu.edu/faculty/

Characklis 1990, en www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=143

Cheryan M. 1986 *Ultrafiltration Handbook*. Technomic, Lancaster USA

Chmielewski RAN, Frank JF 2003, Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comp. Rev. Food Sci. and Food Saf.* **2**:22-32

Cooksey KE, Wiggelworth-Cooksey B. 1992 The design of antifouling surfaces: background and some approaches, en Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B (Eds). *Biofilm-Science and Technology*. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands. pp.

Costerton, J. W. 1995. Overview of microbial biofilms. *J. Indus. Microbiol.* **15**:137-140

Danese, P. N., L. A. Pratt, and R. Kolter. 2000. Exopolysaccharide production is required for development of <i>Escherichia coli</i> K-12 biofilm architecture. <i>J Bacteriol.</i> 182 (12):3593-6.
Davey, M. E., and G. O. O'Toole. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular gelimproics. <i>Microbiol. Mol. Biol. Revs.</i> 64 (4):847-67.
Dermici A, Pometto III EN EL. 1995 Repeated batch fermentation in biofilm reactors with plastic-composite supports for lactic acid production <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 43 :585-90
Dunsmore DG, 1981 Bacteriology control of food equipment surfaces by cleaning systems. <i>J Food Prot</i> 44 (1):15-27
Fletcher, M. 1988. Attachment of <i>Pseudomonas fluorescens</i> to glass and influence of electrolytes on substratum separation distance. <i>J. Bacteriol.</i> 170 (5):2027-2030.
Frank J, Koffi R. 1990 Surface adherence growth of <i>Listeria monocytogenes</i> is associated with increased resistance to surfactants sanitizers and heat. <i>J Food Prot</i> 53 (7):550-4
Fuchs S, Haritopoulou T, Wilhelmi M. 1996 Biofilms in freshwater ecosystems and their use as pollutant monitor. <i>Water Sci. Technol.</i> 37 :137-40
Ganesh Kumar G, Anand SK. 1998 Significance of microbial biofilms in food industry: a review. <i>Int J. Food Microbiol.</i> 42 : 9-27
Geesey 1994, en www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=143
Gibson et en el. 1995 Biofilms and their detection in the food industry R&D Report n°1, Campden & Chorleywood Food Research Association, Glos, U.K.
Gibson H et en el. 1999 Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms <i>J. Appl Microbiol</i> 87 :41-8.
Glover HACE. 1985 Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry. National Institute for Research in Dairy, Reading, England, UK
Holah JT, Kearney IR. 1992 Introduction to biofilms in the food industry, en Melo LF, Bott TR, Fletcher M, Capdeville B (Eds). <i>Biofilm-Science and Technology.</i> Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands, pp. 35-41.
Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. 1990 The biofilm glycocalyx as a resisting factor. <i>J. Antimicrob. Chemoter.</i> 26 :1-6
Kraigsley A, Ronney PD, Finkel Se, 2000 Dynamics of self-propagating fronts of motile bacteria, en http://carambola.usc.edu/research/biophysics/BacterialFronts.html
Kraigsley A, Ronney PD, Finkel Se, 2002 Hydrodynamic influences on biofilm formation and growth, en http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html
LeChevalier MW, Bancroft TM, Lee RG. 1987 Examination and characterization of distribution system biofilms. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 53 :2714-24

LeClerq-Perlat MN, Lalande M. 1994 Cleanability in relation to surface chemical composition and surface finishing of some materials commonly used in food industries. <i>J. Food Eng.</i> 23 :501-17
Lewin R, 18-984 Microbial adhesion is a sticky problem. <i>Science</i> 224 :375-7
Lillard HS 1986 Distribution of “attached” <i>Salmonella tiphymurium</i> between poultry skin and a surface following water immersion. <i>J. Food Prot.</i> 49 :449-53
Lillard HS 1988 Effect of surfactants donde changes in ionic strength of attachment <i>Salmonella tiphymurium</i> to poultry skin and muscle. <i>J. Food Sci.</i> 53 :727-30
Mah, T.-F., and G. A. O’Toole. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agentes. <i>TIMS.</i> 9 :34-39.
Marshall KC, 1992 Biofilms: an overview of bacterial adhesion, activitu and control at surfaces. <i>Am Soc. Micobiol. News</i> 58 : 202-7
Mayette 1992, en www.edsom.com/Resources.cfm?doc_id=143
Miller, M. J., and D. G. Ahearn. 1987. Adherence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> to hydrophilic contact ler substrata. <i>J. Clin. Microbiol.</i> 25 (8):1392-1397.
Mittelman MA 2001 Microbially influenced corrossion of sprinkler piping in http://www.pmengineer.com/CDA/ArticleInformadoion/features/BNP_Featurea_Item/0,2732,24897,00.htm
O’Toole et en el., 2000. Biofilm formation as microbial development. <i>Annu. Rev. Microbiol.</i> 54 :49-79.
O’Toole, G. A., and R. Kolter. 1998a. Flagelolar and twitching motility are necessary for <i>Pseudomonas</i> biofilm development. <i>Mol. Microbiol.</i> 30 (2):295-304.
O’Toole, G. A., and R. Kolter. 1998b. The initiation of biofilm formation in <i>Pseudomonas fluoresc</i> proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a gelimpioic analysis. <i>Mol. Microbiol.</i> 28 :449-461.
Pedersen, Suècia 1990, en www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=143
Ridgeway HF, Olson BH, 1981 Scanning electron microscopi evidence for bacterial colonization of a drinking water distribution system <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> 41 :274-8
Ridgeway HF, Olson BH, 1983 Microbial fouling of reverse osmosis membranas used in advanced wastewater treatment technology: Chemical, bacteriological and structural analysis. <i>Apl. Environ. Microbiol.</i> 45 :1066-84
Sandu C, Singh RK. 1991 Energy increase in operation and cleaning due to heat-exchanger fouling in milk pasteurization. <i>Food Technol</i> 45 (12):84-91.
Sinde E, Carballo J. 2000 Attachment of <i>Salmonella</i> spp anb <i>Listeria monocytogenes</i> to stainless steel, rubber and polytetrafluoretethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. <i>Food Microbiol</i> 17 :439-47
Singh PK et en el. 2002, A component of innate immunity prevents bacterial biofilm developement. <i>Nature</i> 417 :552-555.



Stewart, P. S. 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* **40**(11):2517-22.

Whiteley M et en el. 2001, Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* **413**:860-864.

Widner AF, Frei R, Rajcic Z, Zimmerli W. 1990 Correlation between *in vivo* and *in vitro* efficacy of antimicrobial agentes agains foreig body infections *J. Infect. Dis.* **162**:96-102

Wimpenny J et en el. 2000, Heterogeneity in biofilms, *FEMS Microbiol Rev* **24**:661-71

Wong ACL, Cerf O. 1995 Biofilms:Implications for hygiene monitoring of dairy surfaces. *IDF Bull.* **302**:40-4