

Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación a los biofilms y su repercusión en la seguridad alimentaria

Miembros del Comité Científico

Andreu Palou Oliver, Juan José Badiola Díez, Arturo Anadón Navarro, Albert Bosch Navarro, Juan Francisco Cacho Palomar, Ana María Cameán Fernández, Alberto Cepeda Sáez, Lucas Domínguez Rodríguez, Rosaura Farré Rovira, Manuela Juárez Iglesias, Francisco Martín Bermudo, Manuel Martín Esteban, Albert Más Barón, Teresa Ortega Hernández-Agero, Andrés Otero Carballeira, Perfecto Paseiro Losada, Daniel Ramón Vidal, Elías Rodríguez Ferri, M^º Carmen Vidal Carou, Gonzalo Zurera Cosano

Secretario

Jesús Campos Amado

Número de referencia: AESAN-2010-002

Documento aprobado por el Comité Científico en su sesión plenaria de 17 de febrero de 2010

Grupo de Trabajo

Lucas Domínguez Rodríguez (Coordinador)
Juan José Badiola Díez
Alberto Cepeda Sáez
Albert Más Barón
Elias Rodríguez Ferri
Gonzalo Zurera Cosano
Sonia Téllez Peña (C. Externa)

Resumen

En las últimas dos décadas, se ha puesto de manifiesto que las bacterias no se encuentran en el medio ambiente exclusivamente de forma libre, comportándose como seres unicelulares, como se creía, sino que, en muchas ocasiones, pueden encontrarse formando parte de comunidades microbianas con un sistema de organización más típico de los organismos coloniales, creciendo adheridas a superficies y embebidas en matrices extracelulares que ellas mismas sintetizan. A estas estructuras biológicas se las denomina biofilms.

La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos que permite incrementar sus posibilidades de supervivencia en el medio ambiente y supone la aparición de un nuevo concepto de "bacteria" como organismo unicelular que puede ser capaz de formar estructuras complejas con interrelaciones entre sus individuos que están muy próximas al comportamiento de los organismos pluricelulares. El estudio de estas poblaciones microbianas organizadas se incluiría como un nuevo campo de doctrina dentro de la microbiología.

El mecanismo de formación de los biofilms es muy complejo, dependiendo de numerosos factores tanto intrínsecos al microorganismo como propios del medio que lo rodea. Este hecho hace que sea muy difícil generalizar en cuanto a las características específicas de estas comunidades bacterianas y por lo tanto complica su comprensión. Sin embargo, una consecuencia de la formación de estas estructuras es que los métodos habituales de control y eliminación (desinfectantes, antibióticos, etc.) de las formas libres (planctónicas) de las bacterias se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm.

Hoy día sabemos que los biofilms no son una rareza, si no que más bien representan una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza y su presencia ejerce un enorme impacto en diversos aspectos de la vida humana con múltiples implicaciones tanto sanitarias como tecnológicas. Estas repercusiones son especialmente importantes en el ámbito de la industria alimentaria, donde su control y eliminación puede representar un problema, cuyo abordaje difiere del hasta hoy día aplicado para el de las bacterias en forma libre. En cualquier situación, la eliminación del biofilm es una tarea muy difícil y exigente que puede resultar

sumamente cara y complicada. Para conseguir controlar este problema, cada industria debería involucrarse en la investigación y desarrollar su propia tecnología dependiendo de las variables inherentes a sus procesos.

En síntesis, es un campo nuevo de trabajo que tenemos que empezar a conocer en toda su extensión para valorar sus repercusiones y abordar las soluciones que se plantean.

Palabras clave

Biofilms, industria alimentaria, bacteria, limpieza y desinfección, *quorum sensing*, toxiinfecciones alimentarias.

Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Food Safety and Nutrition (AESAN) in relation to biofilms and its impact on Food Safety.

Abstract

In the last two decades, it has been noted that bacteria are found not only free in the environment, as unicellular organisms, but on many occasions may be found forming part of microbial communities with an organization system more typical of colonial organisms, i.e. adhering to surfaces and embedded in extracellular matrices that they synthesize for themselves. These biological structures are known as biofilms.

The formation of biofilms is an adaptive strategy of micro-organisms that allows an increase in their possibilities of surviving in the environment and implies a new concept of "bacteria" as a unicellular organism capable of forming complex structures with inter-relations between individuals that are very close to the behaviour of multi-cellular organisms. The study of these organized microbial populations would be included as a new field of analysis within Microbiology.

The mechanism for the formation of biofilms is very complex, depending on numerous factors inherent to the micro-organism or typical of the surrounding medium. This fact makes it very difficult to generalize in terms of the specific characteristics of these bacterial communities and therefore complicates their understanding. Nonetheless, a consequence of the formation of these structures is that the normal methods for the control and elimination (disinfectants, antibiotics, etc.) of free forms (planktonic) of bacteria are often ineffective against biofilms.

Nowadays, biofilms are known to be not a rarity but rather represent a habitual growth form for bacteria in nature and their presence has an enormous impact on various aspects of human life with multiple health and technological implications. These repercussions are particularly important in the field of the food industry, where their control and elimination may represent a problem with a different approach than that so far applied for free bacteria. In any situation, the elimination of biofilms is a very difficult and demanding task that may turn out to be extremely expensive and complicated. In order to bring this problem under control, each industry must become involved in research and develop its own technology depending on the variables inherent to its own processes.

In summary, it is a new field of work that we have to begin to explore in all its extension in order to assess its repercussions and adopt the proposed solutions.

Key words

Biofilms, Food Industry, bacteria, cleaning and disinfection, *quorum sensing*, foodborne diseases.

Introducción

Los biofilms se definen como comunidades complejas de microorganismos que crecen embebidos en una matriz orgánica polimérica autoproducida y adherida a una superficie viva (biofilm de mucosa) o inerte y que pueden presentar una única especie microbiana o un abanico de especies diferentes (Carpentier y Cerf, 1993) (Costerton, 1995) (Costerton et al., 1999) (Davey y O'Toole, 2000) (Kraigsley et al., 2002).

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 o libre (forma planctónica), como las estudiadas en el laboratorio, sino que la gran mayoría pueden encontrarse formando parte de los biofilms que acabamos de definir (forma sésil) (Donlan, 2002).

Estos dos estados que pueden adoptar las bacterias se diferencian fenotípicamente, siendo necesario incluir este nuevo concepto en la definición de biofilm. Así, un biofilm sería una comunidad microbiana sésil caracterizada por células que están unidas irreversiblemente a un sustrato o interfaz o entre sí, embebidas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares autoproducidas y que exhiben un fenotipo diferente al de esas mismas células en forma planctónica con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes. Esta definición resulta de gran utilidad, ya que existen algunas poblaciones bacterianas que cumpliendo con los criterios anteriores de un biofilm, que implicaban la existencia de una matriz polimérica extracelular y el crecimiento adherido a una superficie, no asumen realmente el fenotipo biofilm. Estas poblaciones de "no-biofilm", que incluyen las colonias de bacterias que crecen en la superficie del agar, se comportan como células planctónicas "varadas" en una superficie y que no presentan ninguna de las características fenotípicas ni de resistencia inherentes a las biopelículas verdaderas (Donlan y Costerton, 2002).

La percepción creciente de que las bacterias forman estructuras biológicas precisas ha constituido un aliciente a la investigación acerca de las propiedades físicas y químicas de los biofilms, la caracterización de su morfología, y sus formas de desarrollo (Serra, 2003).

La formación de biofilms es una estrategia adaptativa de los microorganismos, ya que el crecimiento en biofilm ofrece cuatro ventajas importantes: (I) protege a los microorganismos de la acción de los agentes adversos, (II) incrementa la disponibilidad de nutrientes para su crecimiento, (III) facilita el aprovechamiento del agua, reduciendo la posibilidad de deshidratación y (IV) posibilita la transferencia de material genético (ADN). Todas estas circunstancias pueden incrementar sus capacidades de supervivencia. Como consecuencia, los métodos habituales de desinfección o el uso de antibióticos se muestran a menudo ineficaces contra las bacterias del biofilm (Costerton et al., 1999) (Donlan, 2002).

Podemos encontrar biofilms en todos los medios donde existan bacterias: en el medio natural, clínico o industrial. Solo se requiere la presencia de un entorno hidratado y una mínima cantidad de nutrientes, ya que pueden desarrollarse sobre todo tipo de superficies (hidrofobas o hidrófilas, bióticas o abióticas) (Kraigsley et al., 2002). Desde un punto de vista antropológico, los biofilms nos pueden resultar perjudiciales o beneficiosos. Así pues, existen biofilms sobre las rocas marinas, alrededor de las raíces vegetales y en la piel o la microbiota intestinal. Los podemos encontrar en el interior de las tuberías, en el grifo de la cocina o en el desagüe del refrigerador. También están en la placa dental o contaminando instrumentos implantados como catéteres, prótesis, marcapasos, etc. A nivel tecnológico se emplean para la transformación de productos fermentados, o también en la depuración del agua

residual, por ejemplo, cuando se hace pasar por los filtros de arena donde proliferan selectivamente (Donlan, 2002) (Serra, 2003).

En la industria alimentaria es muy común la presencia de biofilms en diferentes superficies de conducciones, equipos y materiales y así se pueden observar en industrias lácteas y fábricas de cerveza, en las cubas para el lavado de los granos de cereales, en los tableros de recorte en la industria cárnica, etc. Su presencia puede ser perjudicial e indeseable puesto que en muchos casos producen contaminaciones del producto acabado. Lo que se traduce en una disminución del periodo de conservación o incluso en una transmisión potencial de enfermedades. Desde un punto de vista tecnológico, los biofilms pueden ocasionar reducción del flujo de líquidos, reducción de la transmisión del calor, pérdidas energéticas, bloqueo de los poros de membranas y la corrosión de metales (Serra, 2003) (Fuster i Valls, 2006). Debe señalarse, también, que en el primer eslabón de la cadena alimentaria, en la producción intensiva (avicultura, porcicultura, cunicultura, etc.) la formación de biofilms en las conducciones de agua de bebida es causa de problemas que en ocasiones implican agentes patógenos.

Se realiza a continuación una revisión de las características de los biofilms y de su presencia en la industria alimentaria, así como de las medidas aplicables en la misma, para combatirlos y disminuir el riesgo asociado a su presencia.

Proceso de formación de biofilms

El desarrollo en biofilm es una forma habitual de crecimiento de las bacterias en la naturaleza. En la actualidad se considera que en condiciones ambientales adecuadas, la mayoría los microorganismos son capaces de formar biofilms (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

Aunque la composición del biofilm es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz del biofilm es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (Sutherland, 2001). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y diversos productos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda et al., 2005).

Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz del biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm se puedan encontrar diferentes ambientes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno sea distinta. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad del estado fisiológico en el que se encuentra la bacteria dentro del biofilm y dificulta su estudio (Lasa et al., 2009).

1. Fases de la formación de un biofilm

La formación de biofilm es un proceso dinámico y complejo que conlleva el ataque, colonización y crecimiento de microorganismos. No es un proceso aleatorio sino que sigue una sistemática que permite su predicción (Kumar y Anand, 1998). En él podemos identificar hasta cinco fases: una adsorción reversible de la bacteria a la superficie, una unión irreversible, una fase inicial de maduración con crecimiento y división del microorganismo, una etapa posterior de producción del exopolímero y el desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras (Figura 1).

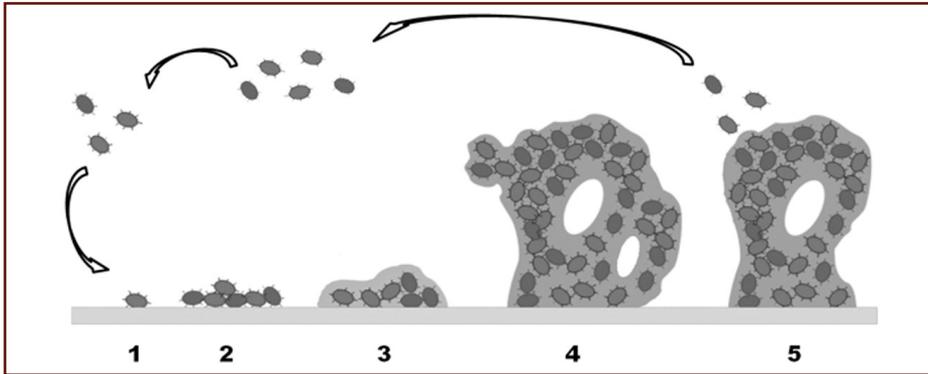


Figura 1. Fases de la formación de un biofilm. **Adaptado de** (Dirckx y Davies, 2003).

A continuación se detallan los procesos incluidos dentro de cada fase del desarrollo de un biofilm.

Fase 1. Absorción

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia de una célula sobre una superficie. Este proceso va a depender de factores ambientales, como la temperatura y el pH, y de factores genéticos que afectan a aspectos como la motilidad, la sensibilidad ambiental y presencia de determinadas proteínas en la superficie de la célula en cuestión (Kumar y Anand, 1998) (Serra, 2003) (Fuster i Valls, 2006).

En bacterias Gram negativas (por ejemplo: *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*) se ha visto que la presencia de flagelos, fimbrias de tipo I y IV y *curli* son importantes para la etapa de adherencia primaria. La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Sin embargo, aunque la motilidad ayuda al proceso no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biofilms. En el caso de las bacterias Gram positivas se ha descrito la participación de proteínas de superficie (por ejemplo: AtlE, Bap, Esp) en esta primera etapa de adherencia (Lasa et al., 2009).

La adhesión de la bacteria a la superficie es un proceso rápido que con frecuencia se produce entre 5 y 30 segundos. Algunos estudios sugieren que para el desarrollo del biofilm debe existir un número mínimo de células adheridas inicialmente a la superficie, lo que a su vez estaría influenciado por la disponibilidad de nutrientes y la temperatura y tiempo de incubación (González, 2005).

Fases 2 y 3. Adhesión a la superficie

La adhesión de la bacteria tiene lugar en dos fases; una primera fase reversible, seguida de una segunda fase irreversible (Kumar y Anand, 1998) (Fuster i Valls, 2006).

La fase reversible consiste en una unión débil de la bacteria con el sustrato mediante fuerzas de *Van der Waals*, electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. En esta fase las bacterias siguen presentando movimiento browniano y pueden ser eliminadas fácilmente con una buena limpieza (González, 2005).

La fase irreversible es dependiente del tiempo y resulta del anclaje a la superficie de los apéndices bacterianos, caso de que existan y/o de la producción por parte de las células bacterianas inicialmente

adheridas de compuestos poliméricos extracelulares. En esta fase las bacterias sintetizan la matriz de exopolisacáridos para establecer un contacto físico entre ellas y la superficie. Una vez se ha establecido, las células bacterianas se multiplican dando lugar a microcolonias y posteriormente al biofilm. Durante el proceso de adhesión, las bacterias cambian su fenotipo y llegan a ser básicamente diferentes respecto a su forma planctónica. Este cambio implica la expresión de genes específicos, se producen cambios y alteraciones en su morfología y cambia su tasa de crecimiento (Donlan y Costerton, 2002) (Chmielewsky y Frank, 2003).

La matriz de exopolisacáridos es uno de los componentes principales que interviene en el mecanismo de adhesión de los microorganismos a las diferentes superficies. Por ello, las estructuras que sobresalen desde la membrana externa como son los lipopolisacáridos, adhesinas y otras proteínas y ácidos lipoteicoicos, pueden desempeñar papeles importantes en la adhesión microbiana. Esto puede ser debido, entre otras causas, a que las sustancias poliméricas extracelulares también se producen en respuesta a la adhesión y al estímulo ambiental, como la presión osmótica, el pH, la temperatura y la falta de nutrientes (Branda et al., 2005) (Fuster i Valls, 2006). La utilidad de la matriz es retener el agua y los nutrientes y proteger a las células del biofilm de los cambios del ambiente y del ataque de predadores, antibióticos y biocidas (Sutherland, 2001) (Donlan, 2002).

Actualmente, la composición de la matriz de exopolímero no está perfectamente definida. Algunos autores han demostrado que contiene polisacáridos o glicoproteínas de distintos azúcares (glucosa, fructosa, manosa, N-acetilglucosamina, etc.). También puede contener proteínas libres, fosfolípidos, ácidos teicoicos y ácidos nucleicos. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria, por ejemplo, alginato en el caso de *P. aeruginosa*, celulosa en *S. enterica* serovar *Typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poli-Nacetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biofilm. Así, algunas cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir además de alginato un polisacárido rico en glucosa que forma una película en la interfase medio aire al que se ha denominado "Pellican" (Sutherland, 2001) (Branda et al., 2005) (Lasa et al., 2009).

En un biofilm maduro, la mayor parte de su volumen está ocupado por una matriz laxa (75-95%) alrededor de unas pocas bacterias (5-25%), que proporcionan una cubierta gelatinosa y deslizante a la superficie colonizada, con un considerable volumen de agua disponible (Chmielewsky y Frank, 2003).

Para la unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo. Este periodo es usualmente corto y varía en función de la disponibilidad de nutrientes, temperatura y presencia de antibióticos. En este sentido, varios estudios indican que las uniones irreversibles necesitan para formarse entre 20 minutos y cuatro horas a una temperatura de entre 4 y 20 °C (Fuster i Valls, 2006).

Fase 4. Crecimiento y maduración

Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células bacterianas hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como sucede durante el proceso de formación de colonias en las placas de medios con agar (Kumar y Anand, 1998) (Lasa et al., 2009).

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente del biofilm se desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le denomina maduración. Un biofilm maduro puede consistir en una simple capa de bacterias, en un polímero extracelular poroso o en múltiples capas de microcolonias sueltas o embebidas por las sustancias poliméricas extracelulares.

Este desarrollo y maduración del biofilm depende de factores como la disponibilidad de nutrientes, la diversidad microbiana de la comunidad, la disponibilidad de agua y el transporte celular (Chmielewsky y Frank, 2003).

A medida que madura el biofilm, se va adaptando a la presencia de nutrientes, al oxígeno y a los cambios poblacionales, formando microcolonias discretas separadas por canales de agua. La densidad estructural de la matriz se incrementa en el núcleo mientras que las capas superiores permanecen porosas. Las bacterias con un metabolismo más activo permanecen en la superficie de las capas de la matriz, cerca de los canales de agua. Los canales de agua permiten la dispersión y el intercambio de sustancias orgánicas, cationes metálicos y metabolitos. Los nutrientes se atrapan y concentran en la matriz del biofilm y se mueven por ésta por difusión. El número de bacterias viables se reduce con la edad del biofilm; así en un biofilm joven se han detectado cerca de un 80% de células bacterianas viables, y tan solo un 50% en un biofilm maduro (Branda et al., 2005) (Fuster i Valls, 2006).

Fase 5. Dispersión de células colonizadoras

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

La liberación de las bacterias desde el biofilm es la parte del proceso que menos se conoce. Se puede deber a modificaciones internas en la estructura del biofilm o producirse por actuación de fuerzas físicas (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

En el caso de *Staphylococcus aureus* se ha descrito un proceso de variación de fase producido por la inserción reversible de un elemento de inserción (IS256) en el interior del operón responsable de la síntesis del exopolisacárido del biofilm (icaADBC). El proceso de inserción del elemento parece ocurrir aleatoriamente en la población con una frecuencia de una por cada 10^6 bacterias y produce microorganismos deficientes en la capacidad de síntesis del exopolisacárido y por tanto deficientes en la formación del biofilm. Esto permite a la bacteria mantener un pequeño porcentaje de la población incapaz de sintetizar el exopolisacárido y capaz, por lo tanto, de poder escapar del biofilm. Como la inserción es un proceso reversible, el salto del elemento de inserción desde el operón provocará una nueva variación de fase. Otra alternativa descrita en *S. aureus* consiste en la obtención de variantes deficientes en la formación del biofilm debido a la eliminación de una isla de patogenicidad que contiene elementos esenciales para el proceso de formación del biofilm. En *Actinobacillus actinomycetemcomitans* se ha descrito una actividad enzimática, que degrada de forma específica el exopolisacárido de la matriz del biofilm. La presencia en distintos proteomas de hipotéticas proteínas (endoglucanasas), que podrían ser responsables de una función similar, sugiere que la degradación controlada del exopolisacárido puede representar un mecanismo controlado de liberación de bacterias del biofilm (Lasa et al., 2009).

El desprendimiento de bacterias del biofilm provocado por la acción de fuerzas físicas ha sido estudiado con mayor detalle. Los tres principales procesos que permiten la liberación celular son la erosión

(eliminación continua de pequeñas porciones del biofilm), la muda (liberación rápida y masiva) y la abrasión (desprendimiento debido a la colisión de partículas de líquido contra el biofilm). Se ha observado que la tasa de erosión se incrementa al aumentar el espesor del biofilm y la fricción en la interfaz líquido biofilm. La muda, sin embargo, resulta ser un proceso más aleatorio que la erosión y se cree que resulta del agotamiento de los nutrientes u oxígeno dentro de la estructura de biofilm. Este proceso se observa más frecuentemente en los biofilms más gruesos que se han desarrollado en ambientes ricos en nutrientes. Los biofilms formados en tuberías, filtros y entornos cargados de partículas (aguas superficiales) suelen estar sujetos a la dispersión por abrasión (Donlan, 2002).

La liberación de bacterias desde el biofilm también se ha demostrado que es un proceso especie específico; *P. fluorescens* se dispersa y recoloniza una superficie después de aproximadamente 5 h, *V. parahaemolyticus* después de 4 h y *V. harveyi* después de sólo 2 h. Este proceso probablemente proporciona un mecanismo de migración bacteriana desde áreas fuertemente colonizadas que han sido agotadas de nutrientes a áreas más favorables para el crecimiento (Donlan, 2002).

El modo de dispersión influye, aparentemente, en las características fenotípicas de los microorganismos. Los agregados erosionados desde el biofilm por fuerzas físicas mantienen ciertas características del fenotipo biofilm, como las propiedades de resistencia antimicrobiana, mientras que las bacterias que han sido dispersadas como resultado del crecimiento normal del biofilm pueden revertir rápidamente al fenotipo planctónico (Donlan, 2002).

2. Regulación del proceso de formación del biofilm

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Estudios realizados con *P. aeruginosa* han demostrado que la formación del biofilm está regulada por un proceso de *quorum sensing* o autoinducción. El sistema de *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de la población existente. En bacterias Gram negativas el principal autoinductor es la acil-homoserina lactona, mientras que en bacterias Gram positivas los autoinductores suelen ser de naturaleza peptídica. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos (Donlan, 2002) (Lasa et al., 2009).

En relación con el *quorum sensing*, se ha identificado una molécula denominada "Furanona" producida por el alga *Delisea pulcra*, con una estructura similar a las acil-homoserina lactonas. Estas moléculas se unen a los mismos receptores, pero en lugar de activarlos, los bloquean, inhibiendo la consiguiente formación de biofilm (Lasa et al., 2009). En la actualidad se está intentando desarrollar inhibidores de la formación del biofilm basados en derivados de la furanona, ya que esta molécula es extremadamente tóxica. De forma similar en *S. aureus* se ha descrito un péptido denominado RIP, que interactúa con el sistema de *quorum sensing* inhibiendo el proceso de formación del biofilm (Lasa et al., 2009).

Además del *quorum sensing*, otros reguladores globales como CsrA en *E. coli* y CytR en *V. cholerae*, son determinantes importantes para el desarrollo del biofilm de estas bacterias (Donlan, 2002). En *S. aureus* se ha demostrado que un regulador global de virulencia denominado SarA es esencial para el desarrollo del biofilm. Así, existen reguladores de virulencia que son a su vez reguladores de la formación del biofilm, sirviendo de conexión entre ambos procesos (Lasa et al., 2009).

Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación del biofilm.

En el caso de *S. e. serovar Typhimurium*, por ejemplo, la activación de la síntesis de celulosa se produce por el activador alostérico c diGMP cuya concentración depende de dos actividades enzimáticas, diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa, asociadas a enzimas que contienen los dominios GGDEF y EAL. En *S. e. serovar Typhimurium* existen al menos 21 proteínas que contienen estos dominios, y se desconoce si todas ellas afectan a la regulación del proceso de síntesis de celulosa en distintas condiciones ambientales o si son responsables de otras funciones. En *V. cholerae*, *Yersinia pestis*, *P. fluorescens* y *Gluconacetobacter xylinum*, también se han descrito proteínas con dominio GGDEF implicadas en la formación del biofilm, indicando que esta molécula es un transmisor secundario de señal común al proceso de regulación de la producción de exopolisacáridos en las bacterias (Lasa et al., 2009).

Finalmente, parece lógico que la formación de biofilm se produzca en respuesta a las condiciones ambientales y por tanto que existan sistemas de fosfotransferencia de dos-componentes que transmitan la señal ambiental al interior de la bacteria para adecuar la expresión de genes a la nueva situación ambiental (Lasa et al., 2009).

Factores que influyen en el desarrollo del biofilm

Existen varios factores que afectan al desarrollo del biofilm como son (González, 2005) (Fuster i Valls, 2006):

- Las propiedades de las superficies de contacto.
- El tiempo de contacto.
- Las características de la superficie bacteriana.
- La disponibilidad de nutrientes.
- La composición de la comunidad microbiana.
- La disponibilidad de agua.

En la siguiente tabla (Tabla 1) se muestran alguna de las variables más importantes que intervienen en el proceso de adherencia y crecimiento de los biofilms.

Tabla 1. Adherencia y crecimiento de los biofilms. Variables más importantes		
Propiedades de la superficie	Propiedades del fluido	Propiedades de la bacteria
Textura	Velocidad del flujo	Hidrofobicidad de la superficie celular
Hidrofobicidad	pH	Fimbrias
Material	Temperatura	Flagelos
	Cationes	Sustancias extracelulares poliméricas
	Presencia de agentes antimicrobianos	

Fuente: (Donlan, 2002).

1. Propiedades de las superficies de contacto

El tipo de sustrato influye en las características de la unión. Las bacterias tienden a unirse a las superficies hidrófilas uniformemente en una capa, mientras que en el caso de las superficies hidrófobas tienden a unirse en grupos (Fuster i Valls, 2006).

En algunos trabajos ha demostrado que las bacterias quedan retenidas en las imperfecciones de las superficies; además, las superficies rugosas son más difíciles de limpiar y acumulan suciedad permitiendo que las bacterias vuelvan a multiplicarse (González, 2005).

El acero inoxidable se usa frecuentemente como material para la cocina y en las instalaciones industriales porque es resistente a los golpes, a la corrosión, dura mucho tiempo y es de sencilla fabricación, además de ser estable, inerte y de fácil limpieza. A escala microscópica se observa, sin embargo, que el acero presenta diminutas oquedades que permiten una mayor retención de bacterias por el incremento del número de puntos de adhesión. Boyd et al. (2001) demostraron que los niveles de higiene en las superficies de contacto podían verse disminuidos con el uso y provocar que la superficie se deteriorase. Los defectos de las superficies pueden actuar como puntos de retención de microorganismos y materia orgánica. Las superficies rugosas acumulan suciedad y son de más difícil limpieza que las lisas. En consecuencia, los defectos de las superficies proporcionan protección a la suciedad y los microorganismos, lo que hace que las bacterias supervivientes puedan volver a multiplicarse y formar un biofilm (Fuster i Valls, 2006).

Estudios realizados en botellas de agua mineral muestran que las superficies lisas de las botellas de PET (tereftalato de polietileno) apenas eran colonizadas por bacilos mientras que las superficies más rugosas e hidrofílicas del HPDE (polietileno de alta densidad) de los tapones eran pobladas por grupos de cocos (Chmielewsky y Frank, 2003).

Con respecto a las propiedades del líquido que fluye sobre la superficie en la que se va a formar el biofilm, cabe destacar que, sorprendentemente, las bacterias forman biopelículas preferentemente en entornos de alta turbulencia. Las células planctónicas pueden adherirse a superficies e iniciar la formación de biofilms en presencia de fuerzas de cizalladura que superan un número de *Reynolds*¹ de 5.000. Existen numerosas especulaciones sobre el porqué de este hecho, pero cualquiera que sea el mecanismo, se ha demostrado que los biofilms se forman preferentemente en localizaciones de alta turbulencia en sistemas naturales e industriales. Los estudios de adherencia bacteriana han demostrado que los biofilms formados en entornos de baja turbulencia, tienen una baja resistencia a la tracción y se rompen con facilidad, mientras que aquellos formados en entornos de flujo turbulento son más fuertes y resistentes a la rotura mecánica (Donlan y Costerton, 2002).

2. Tiempo de contacto

Un mayor tiempo en contacto (exposición) entre las células y el sustrato permite que se establezca un mayor número de uniones haciendo la adhesión irreversible, y por tanto, factores, como las condiciones ambientales, tipo de microorganismo, sustrato y presión en el caso de superficies de trabajo o utensilios, pueden también influir de manera importante en la mayor posibilidad de formación de biofilm (Pérez-Rodríguez et al., 2008).

3. Características de la superficie celular

Las características de la superficie celular como los flagelos, pili, proteínas de adhesión y cápsulas ejercen también su influencia. Los pili actúan como un velcro para anclar las bacterias a algunas

¹El número de *Reynolds* es un número adimensional que describe el flujo turbulento de un líquido, si este número es alto, existe un flujo turbulento, si es bajo, prevalecen las condiciones de un flujo laminar.

superficies y también actúan como quimiorreceptores, dirigiendo a la bacteria hacia a algunos sitios específicos. La pérdida de estos apéndices cambia las propiedades de superficie de la bacteria, lo que puede provocar una menor capacidad de adhesión. También se conoce que los esporos se adhieren mejor a la superficie que las células vegetativas debido al grado de hidrofobicidad de su superficie (González, 2005).

4. Disponibilidad de nutrientes

La disponibilidad de nutrientes ejerce una influencia mayor sobre la estructura y composición de biofilm. Estudios realizados sobre biofilms de *Listeria* spp. han puesto de manifiesto que niveles bajos de fosfatos estimulan el desarrollo de biofilms, aunque el efecto se reducía después de varios días (Chmielewsky y Frank, 2003). Asimismo su desarrollo depende también del tipo de azúcar utilizado, siendo la trehalosa y manosa las que proporcionan un nivel más pobre de formación de biofilm.

5. Composición y diversidad microbiana

Los biofilms multiespecies son más gruesos y estables frente al estrés ambiental que los monoespecies. En una superficie, el grosor medio de los biofilms de *Klebsiella pneumoniae* y *P. aeruginosa* monoespecie son de 15 y 30 μm respectivamente, mientras que un biofilm formado por ambas especies bacterianas presenta un grosor de 40 μm (Kumar y Anand, 1998). Esto se atribuye a la secreción combinada de las distintas sustancias poliméricas extracelulares resultantes de los diferentes microorganismos (Chmielewsky y Frank, 2003).

La implicación de la diversidad microbiana en los biofilms relacionados con la industria alimentaria no se ha determinado, ya que la mayoría de los estudios están focalizados hacia biofilms en aguas y sistemas de agua residuales. En una planta de procesamiento existen lugares como los desagües del suelo que son proclives a la formación de biofilms multiespecie debido a su alta diversidad bacteriana y otras, como una placa de calor, propicias a la formación de biofilms monoespecies (Chmielewsky y Frank, 2003).

Se ha observado la asociación de varias especies patógenas, incluyendo *Legionella pneumophila*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *E. coli* O157:H7, *S. e. serovar Typhimurium*, *V. cholerae* y *Helicobacter pylori*, en la formación de biofilms multiespecie. A pesar de que todas ellas son capaces de adherirse a una superficie y comenzar el crecimiento, la mayoría no tiene capacidad por si sola de completar el desarrollo del biofilm. Cada vez se tiene más la percepción de que los biofilms son comunidades biológicas heterogéneas que se adaptan a la evolución de las condiciones ambientales y a la composición de la Comunidad (Donlan, 2002).

6. Disponibilidad de agua

La disponibilidad de agua es un factor crucial para la viabilidad del biofilm. Una humedad relativa en torno al 90-100% posibilita el desarrollo del biofilm, por ello la mayoría de los biofilms se encuentran en ambientes acuosos como pueden ser los sistemas de conducción o tuberías de las industrias lácteas (Pérez Rodríguez et al., 2008). Sin embargo, también se ha encontrado que valores en torno al 70-80% pueden ser suficientes para permitir el desarrollo del biofilm (Keskinen et al., 2008) indicando que ambientes con humedad relativa alta (por ejemplo: aerosoles) pueden incrementar significativamente el riesgo de su aparición. La temperatura

es un factor también determinante y a la vez, relacionado con la humedad relativa, ya que se ha observado que valores en el rango 20-30 °C incrementan la probabilidad de formación del biofilm, mientras que valores por encima de este rango inciden negativamente sobre ese proceso (Else et al., 2003).

Formación de biofilms por patógenos alimentarios

A pesar de que la mayoría de las especies bacterianas tienen la capacidad de formar biofilms, algunos géneros lo forman más fácil y rápidamente que otros, como es el caso de *Pseudomonas*, *Listeria*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* y *Bacillus* (Mattila-Sandholm y Wirtanen, 1992) (Lee Wong, 1998).

En un ambiente de procesado de alimentos, la microbiota existente probablemente esté formada por una mezcla de muchas especies (Bagge-Ravn et al., 2003). Sin embargo, no se ha podido demostrar hasta la fecha si la presencia de unas especies u otras es fruto de un fenómeno de selección natural.

El conocimiento de esta microbiota, residente en las instalaciones y en el ambiente de una planta de procesado de alimentos, sería una información de gran utilidad para el diseño de los programas de limpieza y desinfección. En contraposición a los alimentos, en los que se ha investigado mucho sobre su ecología microbiana a lo largo de los últimos años, existe un vacío de información respecto a las superficies que contactan con dichos alimentos puesto que los esfuerzos se han centrado más en observar el comportamiento de patógenos específicos como *L. monocytogenes* o bacterias alterantes como *Pseudomonas* spp. En estos estudios se pudo constatar que la contaminación del producto puede ser originada directamente a partir del equipo de procesado. Algunos microorganismos como *L. monocytogenes* pueden persistir durante varios años en las superficies de estos equipos (Fuster i Valls, 2006).

Si bien son numerosas las especies susceptibles de formar biofilms en la industria de producción de alimentos se citan a continuación algunas de especial importancia en relación con la seguridad alimentaria (González, 2005).

1. *Listeria monocytogenes*

Las bacterias pertenecientes al género *Listeria* son bacilos Gram positivos cortos, regulares, no esporulados, móviles, anaerobios facultativos, catalasa positivos y oxidasa negativos. Las especies de *Listeria* están muy extendidas en el medio ambiente; se han aislado del suelo, materia vegetal en putrefacción, aguas residuales, comida animal, pollo fresco y congelado, alimentos frescos y procesados, queso, leche no procesada, desechos de matadero, así como en el tracto digestivo de humanos y animales. *L. monocytogenes* se ha aislado de numerosas especies de mamíferos, aves, peces, crustáceos e insectos, aunque su principal hábitat es el suelo y la materia vegetal en descomposición, en la cual sobrevive y crece como saprofito. Debido a su amplia distribución, estos microorganismos poseen muchas oportunidades de contaminar alimentos en distintas etapas de la producción alimentaria, siendo ésta la vía más frecuente por la que el ser humano adquiere la infección (Oteo y Alós, 2009).

L. monocytogenes es un patógeno con capacidad de proliferación en entornos fríos y húmedos, ideales para la formación de biofilms, tanto mono como multiespecíficos (Chmielewsky y Frank, 2003). Aunque también se ha observado una importante variación en la capacidad de formación de biofilm entre la distintas cepas de *L. monocytogenes* (Borucki et al., 2003). Esta bacteria está presente en el entorno doméstico y se puede encontrar también fuera de la cocina, particularmente en áreas húmedas.

Las cepas de *Listeria* presentan gran facilidad para adherirse a superficies vivas e inertes y requieren solo un corto espacio de tiempo para la unión. Para iniciar la adhesión, utiliza flagelos, pilis y proteínas de membrana. Se ha observado que *Listeria* muestra mayor adhesión cuando está en la fase de mayor actividad metabólica (González, 2005).

Estudios sobre este patógeno han demostrado que puede llegar a formar biofilm en maquinas loncheadoras y en otros utensilios de acero. Keskinen et al. (2008) encontraron que *L. monocytogenes* fue capaz de formar biofilm en el acero de cuchillos cuando estos fueron incubados 6-24 h a una humedad relativa aproximada del 78%. Es más, estos mismos autores indicaron que la transferencia durante fenómenos de contaminación cruzada se ve incrementada en aquellas cepas con mayor capacidad de formación de biofilm. Este hecho pone de relevancia los biofilm como un factor de importancia en la contaminación cruzada.

En la industria láctea, *Listeria* puede encontrarse presente tanto en la leche líquida como en los productos elaborados, pudiendo estar asociada a la aparición de brotes clínicos. Estudios realizados en este tipo de industria demuestran que la presencia de restos de proteínas lácteas en las conducciones reduce la adhesión bacteriana, poseyendo, según los autores, una posible capacidad inhibitoria de la formación del biofilm es sus primeras etapas. Sin embargo, una vez instaurado éste, la presencia de residuos lácteos en las conducciones favorece la supervivencia del biofilm ya que supone una fuente de nutrientes para las bacterias (Lee Wong, 1998).

2. *Salmonella* spp.

Al igual que el resto de las enterobacterias, este género está formado por bacilos cortos Gram negativos, no esporulados, anaerobios facultativos y móviles en su mayoría. Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas por la naturaleza, son bastante resistentes a las condiciones ambientales y muy poco exigentes en sus requisitos nutricionales lo que les permite un rápido crecimiento y capacidad de colonización de ambientes muy diversos, entre ellos el agua y los alimentos (Todar, 2008).

Entre las zoonosis de etiología bacteriana más importantes, la salmonelosis ocupa un lugar destacado, debido tanto a sus múltiples formas clínicas como a las repercusiones que en materia de Salud Pública tiene la aparición de brotes de esta enfermedad. Según datos de la *European Food Safety Authority* (EFSA), *Salmonella* spp. es el primer causante de brotes de toxoinfección alimentaria en la Unión Europea (UE) en los últimos años (EFSA, 2009).

Varios estudios han demostrado que *Salmonella* se puede adherir y formar biofilms en superficies que se encuentran en las plantas de procesamiento de alimentos y entre las que se incluyen plástico, cemento y acero (Joseph et al., 2001) (Chmielewsky y Frank, 2003). Esto se debe a que posee estructuras de superficie, como la SEF-17 *fimbriae*, que le facilitan la adhesión a las superficies inanimadas, dando a las células una capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas (González, 2005).

Diversos estudios han demostrado que *Salmonella*, *E. coli* y muchas otras enterobacterias producen celulosa como exopolisacárido principal de la matriz del biofilm y que la formación de éste resulta esencial para la supervivencia de la bacteria en el ambiente (Lasa et al., 2009).

En un estudio de hogares en los que se habían producido casos de toxoinfecciones por *Salmonella*, este microorganismo fue aislado del 6% de los trapos y bayetas del hogar lo que sugiere la posibilidad que el organismo pueda crecer y sobrevivir en los trapos de cocina (González, 2005).

Estudios realizados en la industria de harinas de pescado demostraron que existen diferencias entre los distintos serotipos de *Salmonella enterica* en la facilidad de producir biofilms y en la perdurabilidad de los mismos; los serotipos que mostraron mayor capacidad de formación de biofilms fueron Agona y Montevideo (Vestby et al., 2009).

3. *Escherichia coli*

Este género bacteriano está formado por bacilos Gram negativos, catalasa positivos y oxidasa negativos, no formadores de esporos, anaerobios facultativos con un amplio rango de incubación, inmóviles o móviles mediante flagelos peritricos y con necesidades nutricionales sencillas (Todar, 2008).

Escherichia coli, agente etiológico de la colibacilosis, es la especie bacteriana predominante de la microbiota normal del aparato digestivo de la mayor parte de los animales y del hombre. Es la especie tipo del género *Escherichia* y se elimina al exterior a través de las heces (Todar, 2008) (CDC, 2008).

Algunos tipos de *E. coli* son capaces de producir una toxina similar a la producida por el género *Shigella*, denominándose a este grupo *E. coli* productores de toxina Shiga o STEC (*Shiga toxin-producing E. coli*). Uno de los serotipos más frecuentemente aislados de toxii infecciones alimentarias y que pertenecen a este grupo es el *E. coli* O157:H7 (CDC, 2008).

La colibacilosis por el serotipo O157:H7 se trata de una de las zoonosis alimentarias más frecuentes e importantes en el hombre debido a la gravedad de los cuadros clínicos y al número de afectados, sobre todo por el consumo de carne de vacuno pudiendo suponer un grave riesgo para la salud pública. En el hombre, la colibacilosis entérica se produce por la penetración de *E. coli* a través de los alimentos permaneciendo en el epitelio intestinal causando, en general, cuadros de diarrea que en casos más graves pueden evolucionar a disentería, colitis hemorrágica, el síndrome urémico/hemolítico e incluso a púrpura trombocitopénica. En el caso de la colibacilosis extraintestinal se dan cuadros de infecciones urinarias, meningitis neonatales, septicemias, peritonitis, mastitis, neumonía, etc. (CDC, 2008).

Para la formación de biofilms, *E. coli* emplea flagelos, pilis y proteínas de membrana para iniciar la adhesión. Cuando ya está unida a la superficie pierde sus flagelos e incrementa la producción de sustancias poliméricas extracelulares (González, 2005) (Houdt y Michiels, 2005). Estudios han encontrado que algunas cepas de *E. coli* O157:H7 pueden desarrollar biofilms como resultado de una mayor producción de exo-polisacáridos y *Curli* (Ryu et al., 2004). Además, se ha demostrado que la formación de biofilm proporciona una mayor resistencia a *E. coli* O157:H7 cuando se expone a soluciones de hipoclorito, uno de los desinfectantes de mayor uso en la industria alimentaria (Ryu y Beuchat, 2005).

En la siguiente tabla (Tabla 2) se muestran los determinantes de superficie implicados en las diferentes fases de formación del biofilm.

Tabla 2. Determinantes de superficie de *E. coli* implicados en la formación del biofilm

Fase de formación del biofilm	Determinantes de superficie
1. Acondicionamiento y adhesión reversible	Flagelos y movilidad
2. Adhesión irreversible	Fimbrias tipo I
	<i>Curli</i>
	Sustancias poliméricas extracelulares
3. Etapa inicial de crecimiento del biofilm	Motilidad
	<i>Curli</i>
	Antígeno 43 (proteína autotransportadora)
	Sustancias poliméricas extracelulares
4. Maduración	Sustancias poliméricas extracelulares
	<i>Curli</i>
	Pili conjugativo
5. Dispersión	Flagelos y movilidad

Fuente: (Houdt y Michiels, 2005).

4. *Pseudomonas* spp.

Pseudomonas es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos, oxidasa positivos, aeróbicos estrictos aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Las *pseudomonas* son microorganismos alterantes ubicuos (Todar, 2008). Se encuentran en ambientes de procesado de alimentos incluidos desagües, suelos, verduras, superficie de las carnes y en ácidos débiles de uso común (Chmielewsky y Frank, 2003) (González, 2005).

Pseudomonas aeruginosa se considera como un patógeno nosocomial primario. Según datos del Center for Disease Control and Prevention (CDC), la incidencia media de *P. aeruginosa* en los hospitales de Estados Unidos es del 0,4% y este patógeno es el cuarto más comúnmente aislado de infecciones nosocomiales (Todar, 2008).

P. aeruginosa es el modelo bacteriano en el que se han realizado la mayoría de los estudios de formación de biofilms y regulación mediante *quorum sensing* (Golovlev, 2002). Produce gran cantidad de sustancias poliméricas extracelulares pudiéndose unir a superficies de materiales inorgánicos, como el acero inoxidable. Se comporta igual que *E. coli* perdiendo sus flagelos cuando ya está unida a la superficie e incrementando la producción de sustancias poliméricas extracelulares. Dentro del biofilm puede coexistir con *Listeria*, *Salmonella* y otros patógenos formando biofilms multiespecíficos mucho más estables y resistentes (Chmielewsky y Frank, 2003) (González, 2005).

5. *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni es una bacteria Gram negativa con forma de bastón, delgada, curva y móvil. Es un organismo microaerofílico, lo cual significa que necesita de niveles reducidos de oxígeno para sobrevivir. Es relativamente frágil y sensible a los diferentes tipos de estrés del medio ambiente (Todar, 2008).

Si observamos la clasificación emitida por la OMS (WHO, 2000), cita la campilobacteriosis como la toxiinfección alimentaria que causa la mayoría de los problemas en prácticamente todo el mundo, seguida de la salmonelosis y el cólera. Según datos de la EFSA (2009), *Campylobacter* es el primer causante de casos de toxiinfección alimentaria en la UE en los últimos años.

Aunque *Campylobacter* no se multiplica en alimentos, su dosis infectiva mínima es muy pequeña, es menor que cualquier otro patógeno. Además, la investigación experimental ha sugerido que *Campylobacter* puede tener un mayor potencial de diseminación durante la manipulación de alimentos por parte del consumidor que otros patógenos lo que incrementa el riesgo de contaminación cruzada (Joshua et al., 2006) (Hanning y Slavik, 2009).

Uno de los mecanismos de supervivencia de *Campylobacter* spp. en el medio ambiente es la formación de biofilms. Se ha visto que *Campylobacter* es capaz de producir estas biopelículas tanto en ambientes acuáticos como sobre superficies de acero inoxidable y de cristal. El microambiente creado en el interior del biofilm, protege a *C. jejuni* de su inactivación por la presencia de oxígeno. Se ha demostrado que esta bacteria en el interior del biofilm es capaz de sobrevivir durante una semana a 10 °C, con escasos niveles nutritivos y en condiciones atmosféricas normales, a pesar de su sensibilidad a este tipo de ambientes. También se ha observado que *C. jejuni* desarrolla biofilms más rápidamente bajo las condiciones aeróbicas más estresantes (20% O₂) que en condiciones de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂), lo que muestra la capacidad de este microorganismo de adaptar las condiciones propias del biofilm en su beneficio, actuando como reservorio de células viables (Reuter et al., 2010). Estos estudios ponen de manifiesto el papel que la formación de biofilms supone para mantener la presencia activa de *Campylobacter* en los ambientes de procesado de alimentos, aumentando el riesgo de contaminación (Murphy et al., 2006).

6. *Bacillus* spp.

Bacillus cereus es un microorganismo Gram positivo, con forma de bastón alargado, aerobio facultativo y formador de esporos (Todar, 2008).

Bacillus spp. es capaz de sobrevivir durante aquellos procesos que utilizan calor y acumularse en las tuberías y en las juntas de estos entornos de procesado de alimentos. Incluso si los fluidos calientes fluyen continuamente sobre estas superficies durante más de 16 horas, *Bacillus* y otras bacterias termorresistentes son capaces de formar biofilms (Chmielewsky y Frank, 2003) (González, 2005).

7. *Staphylococcus aureus*

Las bacterias del género *Staphylococcus* son microorganismos ubicuos difíciles de eliminar que colonizan ambientes muy dispares formando parte de la microbiota habitual de la piel, la garganta y las fosas nasales de sus hospedadores vertebrados. *Staphylococcus aureus* es un coco Gram positivo aerobio o anaerobio facultativo que produce fermentación láctica y es catalasa y coagulasa positivo. Posee numerosos factores de virulencia, en su mayoría componentes de la pared celular, y una variedad de exoproteínas que facilitan la colonización de nuevos hábitats. Estas propiedades, hacen que los estafilococos sean la causa de numerosas infecciones en mamíferos, que van desde afecciones superficiales de la piel a patologías severas como neumonías, meningitis, intoxicaciones alimentarias, shock séptico y desórdenes autoinmunes (Todar, 2008).

Es un importante patógeno alimentario, y la intoxicación estafilocócica es una de las causas más prevalentes de gastroenteritis en el mundo. Según datos de la EFSA, *S. aureus* fue el causante del 4,1% de los brotes de infecciones alimentarias acaecidos en 2006 en la UE (EFSA, 2007).

Esta bacteria se puede encontrar en alimentos crudos, equipos o manipuladores y puede pasar a otros alimentos por contaminación cruzada, si bien necesita multiplicarse hasta alcanzar concentracio-

nes de 10^5 ufc/g para producir la toxina y provocar la enfermedad. Los tiempos de supervivencia de *S. aureus* se ven incrementados con bajas temperaturas, altos pH y bajos niveles de aniones de lactato o de nitrato (González, 2005).

Biofilms en la industria alimentaria

Los biofilms pueden formarse en todo tipo de superficies en la industria alimentaria, incluyendo plástico, cristal, madera, metal y sobre los alimentos (Chmielewsky y Frank, 2003).

Puesto que pueden contener microorganismos patógenos y presentar una mayor resistencia a la desinfección, incrementan las probabilidades de contaminación del producto y de provocar infecciones alimentarias, razón por la que se considera que la presencia de biofilms en las superficies de contacto de la industria alimentaria constituye un evidente riesgo para la salud.

Uno de los principales problemas en la industria alimentaria está representado por la supervivencia de microorganismos patógenos o alterantes debido a una desinfección insuficiente de las superficies o de los instrumentos en contacto con los alimentos. En general, aquellos procesos que causen la dispersión en aerosol de los microorganismos sobre las superficies o el producto acabado, deben centrar los esfuerzos en la ejecución de los programas de prevención (Carpentier y Cerf, 1993) (Fuster i Valls, 2006).

Los biofilms formados en las superficies que están en contacto con los alimentos son la causa principal 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 si intervienen patógenos (Serra, 2003).

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 del manipulador (superficies, utillaje e instrumentos...) aumenta considerablemente los problemas de contaminación cruzada y de contaminaciones posteriores en el procesado (Serra, 2003) (Fuster i Valls, 2006).

En el caso de la carne, se ha detectado la presencia y unión de distintos microorganismos a las superficies cárnicas, especialmente en el pollo, sin embargo no está claro que la formación del biofilm se pueda ver favorecida por estas superficies sino más bien parece que los microorganismos estudiados están más relacionados con la contaminación cruzada que con el sacrificio (Carpentier y Cerf, 1993) (Serra, 2003).

Afortunadamente, en la industria alimentaria la formación de biofilms puede mantenerse controlada con programas correctos de limpieza y desinfección que se apliquen frecuentemente y de forma adecuada (Serra, 2003).

Además del riesgo de contaminación, el desarrollo de biofilms puede interferir en diferentes procesos y causar daños en los equipos. En sistemas de agua potable la formación de biofilms pueden obstruir las cañerías disminuyendo su velocidad y su capacidad de transporte originando un incremento en el consumo energético. En el sector primario, en las naves ganaderas de producción intensiva, los biofilms que se forman en las conducciones de agua y en las redes de residuales, representan un problema que agrava la dificultad para la desinfección de los circuitos, haciendo necesario recurrir a tratamientos drásticos para eliminarlos con agua caliente a presión o vapor fluyente. La formación de biofilm en intercambiadores de calor y torres de refrigeración puede reducir la transferencia de calor y

como consecuencia su eficiencia en el proceso. La formación de biofilms persistentes en las superficies metálicas puede causar corrosión debido a la producción de ácido por parte de las bacterias. Para la prevención de los riesgos y del coste de los daños que causan los biofilms son necesarios procedimientos de limpieza y desinfección efectivos (Silagyi, 2007).

La formación de biofilms en las conducciones de agua potable ha sido ampliamente estudiada y se ha descrito cómo esta presencia reduce la velocidad y la capacidad de circulación y colmata las tuberías, lo que conduce a un mayor consumo de energía para obtener un rendimiento menor (Chmielewsky y Frank, 2003). Además, la formación de biofilms puede bloquear el flujo, la impedancia de la transmisión térmica y favorecer la corrosión de superficies metálicas, problemas que son frecuentes en las industrias alimentarias (Serra, 2003).

En la industria láctea y en otras industrias alimentarias, se emplean los sistemas de ultrafiltración y de osmosis inversa durante el fraccionamiento de la leche y otros líquidos así como para la clarificación de zumos de frutas. Estos filtros y membranas tienen unos poros de muy pequeño diámetro y están continuamente en contacto con el alimento; la más mínima adsorción microbiana bloquearía los poros y provocaría la colmatación del filtro. Esto produciría una reducción del flujo con las consiguientes pérdidas de rendimiento y de producto (Serra, 2003).

Medidas aplicables en la industria encaminadas a minimizar el riesgo. Recomendaciones

Los principales objetivos del control microbiano y de la eliminación de biofilms en la industria alimentaria son prevenir el deterioro de los productos y asegurar que se cumplen las especificaciones de calidad y seguridad de los mismos.

Por todo ello no es de extrañar el afán incesante de la mayoría de industrias químicas para lograr sacar al mercado el desinfectante ideal que asegure la eliminación de los biofilms, concretamente la matriz de exopolímeros que embebe a los microorganismos (Fuster i Valls, 2006).

Los resultados de diversos estudios han demostrado que las bacterias fijadas a las superficies muestran resistencia mayor a los agentes antimicrobianos y a los efectos de condiciones medioambientales adversas. El hipoclorito sódico, por ejemplo, es incapaz de penetrar completamente en un biofilm mixto de *Pseudomona-Klebsiella* (400 μm de espesor) después de una hora de exposición.

A pesar de los programas convencionales de limpieza, las bacterias adheridas pueden sobrevivir y proliferar en las superficies de los equipos que procesan alimentos; se ha comprobado que las bacterias adheridas son mucho más resistentes a los desinfectantes que las que se hallan en suspensión, y esta resistencia se ha atribuye al "escudo microbiano" que confieren los biofilms formados por diferentes especies de microorganismos y a la gran producción de sustancias poliméricas extracelulares (González, 2005).

La restricción de agua y nutrientes, el diseño del equipo y el control de temperaturas son factores fundamentales en el control de biofilm. Sin embargo, habitualmente no es posible reducir la disponibilidad de agua, rediseñar el equipo o reducir la temperatura de actuación, por lo que su control se centra en una limpieza y desinfección efectivas de los lugares con mayor potencial para su crecimiento (Chmielewsky y Frank, 2003).

El tratamiento de limpieza y desinfección del biofilm comprende un tratamiento físico que incorpora una limpieza mecánica y el uso de agua caliente, y un tratamiento químico que implica el uso de biocidas.

Según el *Australian Food Safety Centre of Excellence* (AFSCE, 2007) un proceso correcto de limpieza higiénica de una instalación alimentaria debe incluir las siguientes etapas:

1. Retirada de residuos y limpieza en seco.
2. Pre-lavado.
3. Lavado (aplicación del agente detergente).
4. Enjuague y posterior eliminación del exceso de agua.
5. Desinfección (aplicación del biocida o de agua a más de 80 °C) y enjuague posterior si es recomendado por el fabricante.
6. Secado higiénico.
7. Verificación de la eficacia y monitorización del sistema.

1. Limpieza

El proceso de limpieza se define como el conjunto de operaciones destinadas a eliminar la suciedad adherida a una superficie, sin alterar a ésta (AFSCE, 2007). Este proceso puede llegar a eliminar el 90% de los microorganismos de una superficie (Serra, 2003).

La principal limitación de los sistemas de limpieza reside en los problemas de accesibilidad a diversas zonas como ranuras, grietas, finales ciegos, etc. Si el biofilm queda como reservorio en estos puntos, la limpieza nunca podrá ser exhaustiva (Serra, 2003). Además un procedimiento de limpieza efectivo debe romper o disolver la matriz de sustancias poliméricas extracelulares asociada al biofilm, para permitir que los agentes higienizantes tengan acceso a la células bacterianas viables (Chmielewsky y Frank, 2003).

Existen varios métodos clásicos para la eliminación mecánica de biofilm como el cepillado, pero no es una opción muy factible para aéreas de difícil acceso. Más recientemente se emplean tratamientos con ultrasonidos, campos magnéticos o pulsos eléctricos solos o en combinación con ácidos orgánicos o biocidas.

El uso periódico de agua caliente puede ser empleado para eliminar las bacterias de biofilms. No obstante, se requieren temperaturas de 95 °C durante un periodo superior a 100 minutos lo que no hace muy práctico en determinadas situaciones.

La eliminación de las bacterias adheridas, de manera irreversible, es difícil y requiere de la aplicación de tratamientos físicos agresivos (cepillado o raspado), de tratamientos químicos (enzimas, detergentes, surfactantes, etc.) y/o de calor, los cuales provocan alteraciones en las superficies sobre las que se aplican (González, 2005).

Se ha podido demostrar que las condiciones de limpieza de una superficie tan inalterable como el acero inoxidable, cambia sus propiedades. 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, 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 (Serra, 2003).

Se ha observado que la limpieza con álcalis y especialmente con EDTA, son más efectivas que la limpieza con ácidos para eliminar el biofilm (Chmielewsky y Frank, 2003) (González, 2005).

2. Desinfección

La desinfección se define como el proceso que mediante la utilización de agentes químicos o físicos permite reducir a niveles insignificantes el número de microorganismos que hay en una superficie (AFSCE, 2007).

Biocidas

Los biocidas se definen como las sustancias activas y preparados que contengan una o más sustancias activas, presentados en la forma en que son suministrados al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo nocivo por medios químicos o biológicos (Real Decreto 1054/2002).

La resistencia de los biofilms a la acción de los biocidas parece depender de la estructura tridimensional. Cuanto más viejo y grueso sea, mayor resistencia posee y a la inversa, si se desmonta la estructura pierde la resistencia. En consecuencia, la eficacia de la desinfección, estará directamente relacionada con la capacidad de la limpieza previa para desenganchar y desorganizar la matriz extracelular (Serra, 2003).

Asimismo, se ha comprobado que el hipoclorito sódico y los desinfectantes aniónicos son mejores para eliminar las sustancias poliméricas extracelulares excretadas por *Listeria* y *Salmonella* en acero inoxidable que los compuestos de amonio cuaternario y el yodo (González, 2005).

A continuación se expone una clasificación de los biocidas (Edstrom, 2003).

Biocidas oxidantes

Cloro. Es el biocida más efectivo y menos caro. No solo elimina las bacterias de biofilms, también destruye el polímero extracelular. Son necesarias concentraciones más elevadas de cloro para eliminar los biofilms que las bacterias libres. Altas concentraciones de cloro durante cortos periodos de tiempo son más efectivas que bajas concentraciones durante un tiempo elevado. Hay, sin embargo, una limitación al uso del cloro y la concentración empleada teniendo en cuenta que el cloro corroe el acero inoxidable.

Dióxido de cloro. Tiene una actividad similar al cloro. Presenta la dificultad de su inestabilidad, lo que le exige ser preparado *in situ*. Es también corrosivo de metales.

Ozono. Es aproximadamente dos veces más efectivo que el cloro a la misma concentración. Presenta el problema de su inestabilidad, debiéndose generar *in situ*, y el de su baja solubilidad en agua. Debe emplearse en materiales que sean resistentes al ozono.

Peróxido de hidrógeno (10% v). Es utilizado como biocida contra bacterias por su rápida degradación a agua y oxígeno. Su efectividad contra biofilms requiere de más estudios.

Biocidas no oxidantes

Compuestos de amonio cuaternario. Son efectivos surfactantes que ayudan a remover los biofilms de la superficie. Presenta el inconveniente de que su eliminación requiere un exhaustivo aclarado.

Formaldehído. Se ha utilizado principalmente en la industria farmacéutica. Su efectividad contra los biofilms es todavía cuestionada. No es corrosivo para el acero inoxidable.

El *hipoclorito sódico* y los *desinfectantes aniónicos* han demostrado ser más efectivos que los compuestos de amonio cuaternario para la eliminación de las sustancias poliméricas extracelulares excretadas por *Listeria* y *Salmonella* en acero inoxidable.

Existen métodos biológicos que han demostrado también un cierto éxito en la prevención y eliminación de biofilms, así la nisina, un péptido antimicrobiano aprobado para su uso en quesos, se ha empleado con éxito en la reducción del ataque de *L. monocytogenes* a la superficie.

Otros mecanismos de desinfección

En los últimos años se han venido desarrollando diferentes métodos físicos como alternativa al uso de biocidas. La tendencia futura será la aplicación de técnicas sostenibles de desinfección que reduzcan el uso de biocidas, disminuyendo la posible contaminación ambiental.

Algunos de los métodos que se han probado con éxito en los programas de desinfección son:

- **Radiación UV.** Se aprovecha la capacidad bactericida de las radiaciones ultravioletas C ($\lambda=254$ nm) para realizar la desinfección de materiales. Sólo desinfecta las partes del objeto en los que inciden los rayos de forma perpendicular. El tiempo necesario de exposición vendrá determinado en cada aparato, pero oscila entre 3 y 5 minutos para cada zona que sea necesario irradiar. Las radiaciones UV pueden aplicarse a cualquier tipo de material, sin embargo para los pinceles y otros instrumentos de cerdas es aconsejable utilizar otro sistema de desinfección previo, ya que es difícil que los rayos incidan en la base de las cerdas o en las zonas internas.
- **Desinfección solar fotocatalítica.** El método SODIS (Desinfección Solar del Agua) usa la energía solar para destruir los microorganismos patógenos que causan enfermedades transmitidas por el agua. Los microorganismos patógenos son vulnerables a dos efectos de la luz solar: la radiación en el espectro de luz UV-A (longitud de onda 320-400 nm) y el calor (incremento en la temperatura del agua). Se produce una sinergia entre estos dos efectos, ya que el efecto combinado de ambos es mucho mayor que la suma de cada uno de ellos independientemente. Ha demostrado ser efectiva en la eliminación de bacterias (*E. coli* O157H7, *V. cholerae*, *Salmonella* e. *Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*), protozoos (*Cryptosporidium*, *Acanthamoeba*) y hongos (*Candida albicans*, *Fusarium solani*).
- **Filtración.** Este procedimiento es aplicable a la esterilización de líquidos mediante su paso a través de membranas porosas con diámetro de poro de 0,35 micras. Los filtros que se utilizan no retienen virus ni micoplasmas.
- **Campos electromagnéticos.** Método novedoso que se encuentra actualmente en desarrollo que permite la desinfección del agua mediante la exposición a campos electromagnéticos con frecuencias de entre 10 KHz y 8 GHz. Este método ha mostrado ser muy efectivo, más que el calentamiento.

to por métodos térmicos convencionales. Sin embargo, dependiendo de la bacteria a inactivar hay frecuencias que resultan más bactericidas que otras, por lo que se requieren más estudios hasta su utilización a nivel comercial.

Por último, cabe destacar que el diseño higiénico de las instalaciones y del equipo es la mejor medida preventiva, siendo además imprescindible el mantenimiento de las condiciones y de la correcta manipulación en todos los procesos (Serra, 2003).

Conclusiones del Comité Científico

La presencia de biofilms en la Industria alimentaria puede suponer un importante problema tanto tecnológico como de Salud Pública. Las características propias de esta forma de crecimiento bacteriano, que implica un comportamiento diferente ante los procesos de limpieza y desinfección de las células plactónicas frente a las que se han ensayado la mayoría de los agentes. Por lo tanto, la dificultad existente para eliminar estas formaciones una vez instauradas hace que la prevención sea, una vez más, la estrategia de elección a la hora de controlar este problema.

La heterogenicidad y condiciones de formación de los biofilms, que dependen de la bacteria o bacterias implicadas, la matriz en el que se encuentran, así como del proceso tecnológico, hace que sea muy difícil el realizar recomendaciones muy específicas a parte de aquellas genéricas que hemos expuesto y, por lo tanto, se hace necesario desarrollar investigaciones a este respecto.

Recomendaciones del Comité Científico

Como recomendaciones para evitar la formación y el desarrollo de biofilms se pueden citar:

1. Limpieza y desinfección

- Prever e identificar dónde se forman los biofilms: sitios con agua, materia orgánica y microorganismos contaminantes y lugares con limpieza y desinfección insuficiente.
- Poner a punto programas de limpieza y desinfección para la eliminación de los mismos.
- Cumplir rigurosamente todas las etapas del proceso de limpieza y desinfección en cada tratamiento.
- Rotar los productos químicos para evitar adaptación de los microorganismos.
- Evitar aerosoles y dispersión de la suciedad mezcladas con las soluciones de lavado (barrer, usar mangueras de presión).
- Inspección de los equipos tras la limpieza, tanto visual como microbiológica.
- Verificar periódicamente la eficacia de los métodos de limpieza y desinfección.

2. Diseño de los equipos e instalaciones

- Seleccionar equipos cuyo diseño minimice los puntos, internos o externos, donde puedan desarrollarse los biofilms y elegir equipos diseñados para reforzar la higiene:
 - Todas las áreas y partes deberían ser accesibles para la limpieza manual e inspección o fácilmente desmontables.

- Incluir suelos impermeables a la humedad y fáciles de limpiar.
- No emplear falsos techos con paneles desunidos que permiten incorporar fácilmente la suciedad.
- Los equipos incluidos en las líneas productivas deberían ser tan fáciles de limpiar como sea posible.
- Las soldaduras deben ser lisas y continuas.
- Los equipos deben incorporar sistemas de vaciado y drenado. Las superficies en contacto con los alimentos deben ser inertes, lisas y no porosas.
- Un programa de mantenimiento periódico de los equipos:
 - Las unidades dañadas, con picaduras o corroídas deben ser reparadas o sustituidas.
 - Reparar los equipos, o sus componentes, para prevenir la deposición de alimentos que más tarde podrían ser difícilmente eliminables.
 - Utilizar herramientas específicas para la reparación de maquinaria que interviene en la producción de precocinados. Limpiar las herramientas antes de cada uso.
 - Si se utiliza aire comprimido, mantener y sustituir regularmente los filtros.
- Cumplimiento de las Buenas Prácticas de Manipulación.

Referencias

- AFSCE (2007). Australian Food Safety Centre of Excellence. Cleaning and Sanitizing Factsheet. Disponible en: <http://www.foodscience.csiro.au/factsheets/sanitationfactsheet.pdf> [acceso: 1-12-2009].
- Bagge-Ravn, D., Gardshodn, K., Gram, L. y Fønnesbech, B.V. (2003). Comparison of sodium hypochlorite based foam and peroxyacetic acid based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: Survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 66 (4), pp: 592-598.
- Borucki, M.K., Peppin, J.D., White, D., Loge, F. y Call, D.R. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp: 7336-7342.
- Boyd, R.D., Verran, J., Hall, K.E., Underhill, C., Hibbert, S. y West, R. (2001). The cleanability of stainless steel as determined by X-ray photoelectron spectroscopy. *Applied Surface Science*, 172 (1-2), pp: 135-143.
- Branda, S.S., Vik, S., Friedman, L. y Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13, pp: 20-26.
- Carpentier, B. y Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences with particular references to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75, pp: 499-511.
- CDC (2008). Center for Disease Control and Prevention. *Escherichia coli*. Disponible en: http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html [acceso: 10-11-2009].
- Chmielewsky, R.A.N. y Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, pp: 22-32.
- Costerton, J.W., Stewart, P.S. y Greenberg, E.P. (1999). Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, pp: 1318-1322.
- Costerton, J.W. (1995). Overview of microbial biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, pp: 137-140.
- Davey, M.E. y O'Toole, G.O. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4), pp: 847-867.
- Dirckx, P. y Davies, D. (2003). Five stages of biofilm development in *Pseudomonas aeruginosa*. Disponible en: http://www.genomenetwork.org/articles/06_02/biofilms_image1.shtml
- Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8 (9), pp: 881-890.
- Donlan, R.M. y Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15 (2), pp: 167-193.

- Edstrom (2003). Biofilms. The key to understanding and controlling bacterial growth in Automated Drinking Water Systems, Second Edition by Paula H. Dreeszen.
- EFSA (2007). European Food Safety Authority. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2006. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Zoon_report_2006_en,0.pdf?ssbinary=true [acceso: 10-11-2009].
- EFSA (2009). The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. Disponible en: http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/Report/zoonoses_report_2007,3.pdf?ssbinary=true [acceso: 10-11-2009].
- Else, T.A., Pantle, C.R. y Amy, P.S. (2003). Boundaries for Biofilm Formation: Humidity and Temperature. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, pp: 5006-5010.
- Fuster i Valls, N. (2006). Importancia del control higiénico de las superficies alimentarias mediante técnicas rápidas y tradicionales para evitar y/o minimizar las contaminaciones cruzadas. Disponible en: http://www.tesisenred.net/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX1005107165210//nfv1de1.pdf [acceso: 10-11-2009].
- Golovlev, E.L. (2002). The Mechanism of Formation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Type of Structured Population. *Microbiology*, 71 (3), pp: 249-254.
- González, F.R. (2005). Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad de desinfectantes *in situ* de productos limpiadores comerciales. Disponible en: http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-0119106-165553//fgr1de1.pdf [acceso: 13-10-2009].
- Hanning, I. y Slavik, M. (2009). *Campylobacter jejuni* as a primary colonizig biofilm former. *International Journal of Poultry Science*, 8 (1), pp: 1-6.
- Houdt, R.V. y Michiels, C.W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156, pp: 626-633.
- Joseph, B., Otta, S.K. y Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella spp.* on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64, pp: 367-372.
- Joshua, G.W.P., Guthrie-Irons, C., Karlyshev, A.V. y Wren, B.W. (2006). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. *Microbiology*, 152, pp: 387-396.
- Keskinen, L.A., Todd, E.C.D. y Ryser, E. (2008). Transfer of Surface-Dried *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel Knife Blades to Roast Turkey Breast. *Journal of Food Protection*, 71, pp: 176-181.
- Kraigsley, A., Ronney, P.D. y Finkel, S.E. (2002). Dynamics of self-propagating fronts of motile bacteria. Disponible en: <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/BacterialFronts.html> [acceso: 10-11-2009].
- Kumar, C.G. y Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42, pp: 9-27.
- Lasa, I., del Pozo, J.L. y Penadés, J.R. (2009). Biofilms Bacterianos e infección. Disponible en: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/vol28/n2/colaba.html> [acceso: 13-10-2009].
- Lee Wong, A.C. (1998). Biofilms in Food Processing Enviroments. *Journal of Dairy Science*, 81, pp: 2765-2770.
- Mattila-Sandholm, T. y Wirtanen, G. (1992). Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International*, 8 (4), pp: 573-603.
- Murphy, C., Carroll, C. y Jordan, K.N. (2006). Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*, 100, pp: 623-632.
- Oteo, J. y Alós, J.I. (2009). *Listeria* y listeriosis. Disponible en: http://www.seimc.org/control/revi_Bacte/listeria.htm [acceso: 10-11-2009].
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M. y Zurera, G. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 19, pp: 131-144.
- Real Decreto 1054/2002 de 11 de octubre, por el que se regula el proceso de evaluación para el registro, autorización y comercialización de biocidas. BOE 247 de 15/10/2002, Sec 1, pp: 36188-36220.
- Reuter, M., Mallett, A., Pearson, B.M. y van Vliet, A.H. (2010). Biofilm formation in *Campylobacter jejuni* is increased

- under aerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. Disponible en: <http://aem.asm.org/cgi/reprint/AEM.01878-09v1?view=long&pmid=20139307> [acceso: 1-03-2010].
- Ryu, J.H. y Beuchat, L.R. (2005). Biofilm Formation by *Escherichia coli* O157:H7 on Stainless Steel: Effect of Exopolysaccharide and Curli Production on Its Resistance to Chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*, 7, pp: 247-254.
- Ryu, J.H., Kim, H. y Beuchat, L.R. (2004). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *Journal of Food Protection*, 67, pp: 2123-2131.
- Serra, P.G. (2003). Estudio de biofilms: formación y consecuencia. Disponible en: <http://magno.uab.es/epsi/alimentaria/biofilm.pdf> [acceso: 13-10-2009].
- Silagyi, K.S. (2007). Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. Disponible en: <http://www.lib.umd.edu/drum/bitstream/1903/7806/1/umi-umd-5089.pdf> [acceso: 13-10-2009].
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147, pp: 3-9.
- Todar, K. (2008). *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. Disponible en: http://www.textbookofbacteriology.net/kt_toc.html [acceso: 10-11-2009].
- Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E. y Nesse, L.L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 5:20. Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1746-6148-5-20.pdf> [acceso: 01-12-2009].
- WHO (2000). World Health Organization. *Campylobacter*. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/en/> [acceso: 1-12-2009].