

El control de los *biofilms*: un reto para la ciencia y la industria alimentaria

Belén Orgaz Martín

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

Los biofilms son **comunidades microbianas** agregadas entre sí y localizadas en interfases. El paso del **modo de vida** libre o planctónica al fijo o sésil de los biofilms, implica un **cambio de fenotipo**, que abarca por ejemplo la producción de materiales extracelulares adhesivos, la pérdida de apéndices de movilidad y el cambio a un metabolismo más anaerobio. Están considerados el modo de vida más exitoso ampliamente distribuido (dominante) en la Tierra en ambientes reales, tanto naturales, donde llevan a cabo importantes procesos biogeoquímicos como en ambientes industriales. De hecho, el modo de vida planctónico (la base de la microbiología clásica) parece ser más bien excepcional en la naturaleza, cuando los nutrientes son muy abundantes o cuando, al revés, se han agotado y las células adheridas se desprenden y dispersan para colonizar nuevos nichos. Hasta ahora no se ha descrito ninguna superficie, ya sea natural o artificial, sobre la que no puedan formarse biofilms (aunque sea de forma lenta en algunos casos). Los biofilms pueden adoptar estructuras muy diversas, dependientes de las especies integrantes, la superficie sobre la cual se adhieren y la velocidad de flujo de los fluidos circundantes, en definitiva, del entorno donde se formen (Costerton y col. 1995; Costerton, 2007).

Existen biofilms de utilidad práctica, como los que se usan como forma natural de inmovilización de microorganismos para el tratamiento de efluentes, de vertidos o bien la producción de compuestos de interés, como alimentos (vinagre) y aditivos. Todos los organismos superiores, incluyendo los seres humanos estamos colonizados por microorganismos que tienen un papel protector muy importante. Sin embargo, son los perjudiciales los que centran la atención por las repercusiones que tiene su presencia, tanto en entornos clínicos como en entornos industriales, entre ellos el alimentario. En el primer caso, se asocian con infecciones persistentes en plantas y animales, incluyendo humanos, con la contaminación de implantes y otro tipo de dispositivos médicos, como catéteres, marcapasos y sondas. Se estima que el 80 % de las infecciones humanas tratadas en países desarrollados, están causadas por biofilms (*e.g.* caries dental, periodontitis, infecciones del tracto genitourinario y aquellas asociadas a la colonización de dispositivos médicos) (Donlan y Costerton, 2002). Además, son responsables de la contaminación de algunos alimentos y del agua de bebida así como del deterioro de equipos

PROCESO DE FORMACIÓN DE BIOFILMS

La formación del biofilm se inicia cuando bacterias que están en suspensión contactan con una superficie y comienzan a adherirse, primero de forma reversible, es decir, mediante uniones débiles que pueden romperse aplicando escasa energía (p. ej. En esta etapa un simple lavado sería suficiente para eliminarlas). Si las células quedan finalmente adheridas, estas uniones se van fortaleciendo, transformándose en uniones fuertes de carácter irreversible. Esto va acompañado del aumento de la producción de sustancias extracelulares adhesivas que las anclan firmemente a las superficies y entre ellas dando lugar a la formación de densas estructuras denominadas **microcolonias**. La **microcolonia** se considera la unidad estructural básica de los biofilms. La **maduración** del biofilm es una etapa donde suceden varios procesos a la vez: la multiplicación celular, la incorporación de nuevas células desde el medio y el aumento de la producción de matriz, que generalmente resulta del aumento del espesor del biofilm. Este proceso, lejos de ser azaroso, está regulado y se apoya en un sofisticado sistema de comunicación celular (*quorum sensing*).

Las células del biofilm pueden escapar mediante procesos **pasivos**, es decir, debidos a fuerzas externas que provocan que se desprendan o bien células o bien fragmentos íntegros de biofilm. Los más importantes son la **desorción** que tiene lugar durante las primeras etapas de formación del biofilm, cuando las células aún no están firmemente adheridas a la superficie y el **desprendimiento**, que puede ser debido por ejemplo a la colisión de partículas contra el biofilm (denominado en este caso abrasión), la erosión, los cambios a flujos donde el rozamiento es elevado o cuando hay elementos externos que producen fricción. El **escape activo** del biofilm, es lo que específicamente se denomina **dispersión** y se caracteriza por un cambio fenotípico que permite a las células abandonar el biofilm. Este cambio normalmente se desencadena cuando las células sienten determinadas señales que a través de mecanismos de regulación se traducen en cambios fisiológicos que facilitan su liberación. Las moléculas señal pueden ser producidas por el propio microorganismo, como consecuencia de cambios en el entorno, como la escasez de nutrientes (Petrova y Sauer, 2016). Se ha visto que algunos de estos cambios dan lugar a la producción de enzimas que degradan la matriz, fenómeno caracterizado por la aparición de agujeros en la estructura y denominado dispersión de semillas (del inglés *seeding dispersal*). También parece clave, el papel del 3,5-diguanilato cíclico (c-di-GMP) como interruptor que regula la transición del modo de vida adherido al plantónico. Niveles elevados de este segundo mensajero intracelular promueven la formación de biofilm mientras que bajos niveles se relacionan con la vuelta al estado planctónico (Jenal and Malone, 2006). Así, la dispersión activa convierte a los biofilms en un foco constante de diseminación de microorganismos a otras localizaciones.

A la compleja regulación del proceso de formación de los biofilms, hay que sumarle todos aquellos factores que pueden influenciarle. Entre ellos, características propias del sustrato, del medio en que se forman y los de los microorganismos que lo integran. Además, en un mismo biofilm pero en distintas localizaciones del mismo, puede haber células que se encuentren en distintos estados de desarrollo y por tanto con perfiles fenotípicos distintos.

VENTAJAS DE VIVIR EN BIOFILMS

La formación de biofilms desde un punto de vista metabólico es pues un proceso muy costoso. Además, las células alojadas en estas estructuras están sometidas a condiciones estresantes y no siempre óptimas. Cabe preguntarse pues ¿por qué los biofilms son tan exitosos? En definitiva, ¿qué rasgos les diferencian de la vida como células en suspensión y cuáles son las ventajas de vivir en una comunidad?

La matriz de los biofilms

El primer elemento claramente diferenciador entre el modo de vida planctónico y el adherido es la matriz. Aunque su composición es variable porque depende de factores como la/s especie/s integrantes, el medio de cultivo y el sistema utilizado para desarrollar los biofilm entre otros, se ha estimado que hasta un 97% de la misma es agua, junto con sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que producen los microorganismos (Flemming y Wingender, 2010). Entre los componentes mayoritarios de estas EPS están polisacáridos, proteínas y ADN extracelular (eADN). Recientemente ha cobrado importancia el papel de este último como elemento clave tanto para la adhesión como para el mantenimiento de la estructura del biofilm (Harmsen y col. 2010).

En definitiva, la matriz es una red polimérica que retiene grandes cantidades de agua en su interior, es decir un gel viscoso que engloba las células. Una de sus funciones por tanto es actuar de soporte físico de las células que forman parte del biofilm. Además, al actuar como un hidrogel que retiene agua, protege a las células frente a condiciones ambientales adversas, como la desecación. Desde un

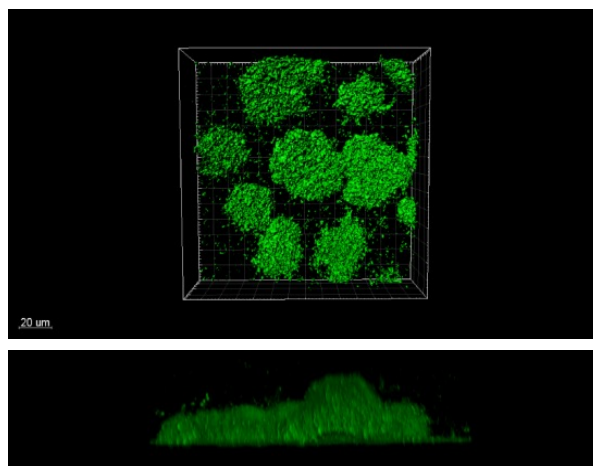
punto de vista de la reología, los biofilms se consideran fluidos viscoelásticos. Esto les otorga una plasticidad estructural que, entre otras cosas, permite que puedan adaptarse rápidamente a los cambios externos. Por ejemplo, se ha descrito que en presencia de estrés hidrodinámico intenso, se generan fragmentos de biofilm móviles (*streamers*) que facilitan la colonización de otras superficies. La estructura abierta de la matriz permite el intercambio de nutrientes, gases y otras moléculas del ambiente de bajo peso molecular mediante fenómenos de difusión pasiva. Además, la presencia de grupos cargados positiva y negativamente permite la retención de sustancias que se acumulan en la matriz. Esto posibilita el desarrollo de biofilms en ambientes oligotróficos. Entre los compuestos retenidos es fundamental el papel de las enzimas. Muchas de ellas serán responsables de la inactivación de agentes antimicrobianos y de las reacciones de deterioro en los alimentos al desprenderse fragmentos de biofilms (Jahid y Ha, 2014).

Por último, la propia matriz puede ser utilizada como alimento por las células. Cuando estas se lisan, sus productos de desecho permanecen retenidos en la matriz y pueden convertirse en una fuente de nutrientes para las células restantes (Flemming y col. 2016). En definitiva, la matriz no es un mero soporte sino que tiene una función muy activa en la preservación de los biofilms.

Comunidades estructuradas

Otra de las grandes diferencias entre los microorganismos en suspensión y los biofilms es que estos últimos forman comunidades altamente estructuradas. Hasta que en 1991 el grupo de Lawrence y col (1991) consiguieran las primeras imágenes de un biofilm mediante microscopía confocal (CLSM), se consideraba que los biofilms eran meras asociaciones desestructuradas de células pegadas a las superficies. Con los avances en microscopía, se demostró que estas comunidades tenían una compleja arquitectura en 3 dimensiones. Los trabajos pioneros empleaban como microorganismo modelo productor de biofilm a *Pseudomonas aeruginosa*. Este microorganismo, es el principal colonizador del epitelio pulmonar de los enfermos de fibrosis quística. Pues bien, los biofilms de *P. aeruginosa* presentaban una estructura que morfológicamente se asemejaba a los champiñones. Otras especies del género *Pseudomonas* también se organizan siguiendo este patrón, como se observa en esta imagen de CLSM obtenida por nuestro grupo y perteneciente a un biofilm maduro de *P. fluorescens* (Figura 1).

Figura 1. Imagen propia de microscopía confocal (CLSM)



de un biofilm de 48 h de *Pseudomonas fluorescens* B52.
Las células fueron teñidas con Syto.

Así que durante casi 25 años se aceptó que esta estructura era común a todos los biofilms. Sin embargo, a día de hoy se han descrito patrones estructurales muy diversos, que dependen de

multitud de factores, entre ellos el o los microorganismos integrantes, la velocidad y el tipo de flujo (laminar o turbulento), los nutrientes y la temperatura de desarrollo. Todos estos patrones sin embargo, tienen en común que parecen responder a una organización regulada. Es decir, la estructura no es aleatoria sino que la forma en que se organizan células y matriz y la distribución de las especies en biofilms mixtos están perfectamente orquestadas. Además, la arquitectura/estructura que adoptan los biofilms condiciona en parte su fortaleza. De hecho, estudios recientes relacionan estrechamente la estructura que adoptan los biofilms con su resistencia a distintos tipos de estrés (Bridier y col. 2010).

La estructuración en capas tiene varias consecuencias. Entre ellas, que la difusión a través del entramado células-matriz está en parte limitada. En ambientes donde hay oxígeno disuelto, las capas superiores del biofilm son aerobias. En ellas, el consumo de oxígeno por parte de los microorganismos aerobios es más rápido que su velocidad de difusión, lo que da lugar a la existencia de zonas anaerobias en las capas profundas. Además de limitación de oxígeno, en estas capas hay condiciones muy severas de escasez de nutrientes y acumulación de productos de desecho. Esto genera la existencia de micronichos a lo largo de la estructura, que promueven la diversidad genética y fenotípica y por ende la adaptación de las células a distintos ambientes (Costerton, 2007).

Así, las bacterias que forman parte del mismo biofilm pueden tener distintos niveles de estrés, distinta velocidad de crecimiento y estar en estados fisiológicos distintos (Serra y Hengge, 2014). Habrá células viables y cultivables, células muertas, pero una gran parte de la población de un biofilm se estima que está en fase estacionaria o en fase de latencia. Las células en estado de latencia, viables no cultivables (VBNC) y persistoras (variantes fenotípicas de una población normal que resultan tolerantes a los antibióticos) pese a que mantienen indicadores de viabilidad, al no multiplicarse no se ven afectados por compuestos cuya actividad reside en actuar sobre distintas dianas que atañen precisamente a la multiplicación (Lewis, 2005). Las consecuencias de esto son, que por un lado hay una parte de la población de los biofilms que se está infravalorando y que tras un tratamiento una parte importante de la población que no ha sido dañada, en condiciones favorables puede repoblar el biofilm.

Puga y col. (2016a) evaluaron la capacidad de recuperación de biofilms desarrollados en condiciones favorables y en condiciones de estrés por frío tras tratarlos con quitosano, un antimicrobiano de origen natural. Los resultados mostraron que los biofilms desarrollados en frío se recuperaban de forma más eficiente que los desarrollados a 20°C, sugiriendo que en los primeros podría haber mayor población de células persistoras. Además, secciones transversales de imágenes de CLSM de estos biofilms mostraron que las células situadas en las capas más enterradas de la estructura se recuperaban antes, precisamente aquellas sujetas a condiciones más estresantes.

Este hecho, tiene importantes implicaciones en entornos reales, donde la mayor parte de los biofilms que se forman integran distintas especies. En estos casos es de prever que aquellas especies localizadas en las capas profundas estén más protegidas frente a los daños físico-químicos. Puga y col. (2014) evidenciaron mediante CLSM que en biofilms mixtos con *P. fluorescens*, *Listeria monocytogenes* se localizaba preferentemente en las capas profundas de los biofilms. Otros autores han descrito resultados similares con cepas de *Staphylococcus aureus* y *Legionella* que se alojan en biofilms mixtos bajo el cobijo de otras especies (Bridier y col. 2012; Stewart y col. 2012).

La resistencia de los patógenos tendría pues que ser considerada en relación a las interacciones ecológicas y las estructuras que pueden formar con las especies con las que conviven.

Comunicación dentro del biofilm

El estrecho contacto célula-célula y la elevada densidad celular en los biofilms potencian los fenómenos de comunicación celular. Las bacterias se comunican entre ellas y con otras a través (entre otras cosas) de señales químicas difusibles que ellas mismas producen, denominadas autoinductores (AI). Cuando las células perciben cierta concentración umbral de estos AI se desencadena una cascada de reacciones que da lugar a la expresión coordinada de determinados genes, entre ellos muchos que codifican factores de virulencia. Esta concentración umbral se alcanza al llegar la población a una densidad celular crítica, de ahí que este mecanismo se denomine *quorum sensing* (QS). Hasta el momento se han descrito multitud de moléculas señal que participan en la comunicación intraespecie. Es el caso de las acilhomoserín-lactonas (AHL) en Gram-negativas y los oligopéptidos de diferentes longitudes y con distintas sustituciones como autoinductores de Gram-positivas. Además, existen señales como el autoinductor II (AI-II), consideradas “universales” y responsables de la comunicación interespecie y entre reinos.

Evidentemente el biofilm es un entorno que facilita la señalización intercelular, ya que permite que las señales se concentren. En entornos abiertos, es menos probable que se alcance una concentración de señales suficiente para desencadenar determinadas respuestas. De hecho, muchos fenotipos que responden a mecanismos de QS solo se han observado en biofilms (Flemming y col. 2016).

Bienes comunes y compartidos

De todo esto se desprende que evidentemente vivir en comunidad en términos generales resulta beneficioso, aunque tenga un coste. De hecho, la mayoría de los biofilms que se forman naturalmente no están constituidos por una sola especie sino que son comunidades donde conviven especies no necesariamente filogenéticamente similares e incluso especies que pueden resultar *a priori* incompatibles. Las interacciones sociales en los biofilms pueden ser de cooperación o competición o de ambos entre las especies integrantes (Elias y Banin, 2012). La estructura que adoptan estas especies en los biofilms mixtos es determinante de las relaciones ecológicas que se establecen entre ellos y en ocasiones da lugar a la división de papeles entre las especies integrantes. Es tal la complejidad de estas interacciones que Nadell y col. (2009) propusieron el término “*la sociobiología de los microorganismos*” para referirse a esto.

Además la vida en comunidad permite a las especies integrantes que se beneficien de la existencia de lo que se conoce como **bienes comunes**, es decir, los recursos disponibles para todos los miembros de la comunidad independientemente de quien/es los produzcan. Por ejemplo, en ambientes donde la concentración de hierro libre es baja, determinadas bacterias secretan sideróforos, que son compuestos con una elevada afinidad por este elemento. Estos compuestos estarían así a disposición del resto de los miembros de la comunidad. Es por ello que en ocasiones algunas infecciones son causadas por cepas que no tienen de forma aislada la capacidad de producir sideróforos u otros factores de virulencia, es decir, aisladamente se podrían considerar cepas avirulentas, pero no así asociadas con otras. Esto está en parte revolucionando la forma de abordar la patogénesis (Xavier, 2016). La disponibilidad de bienes comunes, favorece la aparición de microorganismos *tramposos* (*cheaters*) es decir, individuos que no los producen, luego no gastan energía pero se benefician del recurso. La matriz también se puede considerar un bien común. De hecho, muchas especies, como *L. monocytogenes*, cuya producción de matriz es muy escasa se benefician de la presencia de otras especies súper productoras como *Pseudomonas* (Puga et al. 2014). Se puede decir, que en general, este estilo de vida es particularmente ventajoso para aquellos organismos que aisladamente quizás tendrían pocas oportunidades de persistir en entornos reales.

BIOFILMS COMO FORMA DE RESISTENCIA

La complejidad de estas comunidades microbianas contrasta con la ausencia de estrategias específicas para su control. De hecho, las opciones disponibles para combatirlos siguen siendo, con algunas excepciones, las que teníamos para las células en suspensión. Así, los biofilms se han convertido en una nueva forma de resistencia, cuyo origen es multifactorial. Inicialmente, la mayoría de los estudios que evaluaban la acción de agentes antimicrobianos sobre biofilms, atribuían su falta de eficacia a problemas de difusión de los mismos a través de la matriz. En algunos casos esto se ha comprobado que es así. Por ejemplo muchos compuestos cargados positivamente, entre ellos los aminoglucósidos y las sales de amonio cuaternarias pueden interactuar con polisacáridos ácidos de la matriz con carga negativa y quedar retenidos. También se ha visto que enzimas retenidas en la matriz, como las β -lactamasas producidas por, entre otros, *P. aeruginosa*, pueden hidrolizar antibióticos β -lactámicos, bloqueando su acción. Evidentemente todo esto hace que a determinadas localizaciones lleguen concentraciones sub-inhedoras que favorecen la adaptación de las células, que terminan por hacerse tolerantes (Lebeaux y col. 2014).

Sin embargo, muchos compuestos que difunden sin problema a través de la matriz tampoco consiguen el efecto deseado. Es decir, que junto con la matriz, la baja tasa de crecimiento de algunas células en capas profundas y la presencia de células persisteras también contribuyen a la resistencia de los biofilms (Lewis, 2005; Gefen y Balaban, 2009). Además, el estrecho contacto célula-célula favorece la transferencia genética horizontal. Muchos elementos móviles como plásmidos se acumulan en la matriz, además del ADN extracelular que puede ser un recurso más para la adquisición de genes de resistencia y genes que codifican factores de virulencia o resistencia al estrés.

En el contexto de la salud humana, lo que más preocupa de los biofilms es su habilidad para sobrevivir tras la exposición a agentes antimicrobianos, fundamentalmente antibióticos. En el contexto de la industria alimentaria, la presencia de biofilms no es menos preocupante.

BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El establecimiento de biofilms en las instalaciones de la industria alimentaria en la mayoría de los casos da lugar a problemas ya sean de tipo técnico, dañando equipos y dando lugar a pérdidas de calidad en el proceso y de tipo sanitario, debido a la proliferación y probable transferencia de microorganismos a los alimentos, junto con todo aquello que queda retenido en la matriz, incluyendo enzimas y señales de comunicación celular (Srey y col. 2013).

La industria alimentaria es un alojamiento privilegiado y a la vez hostil para los microorganismos. Privilegiado porque la materia prima que se procesa son alimentos. Sus nutrientes sirven como aporte de energía para los microorganismos y pueden intervenir en el proceso de adhesión, ya sea favorable o desfavorablemente, acondicionando las superficies. Hostil, porque las condiciones de una planta de procesamiento de alimentos no son las idóneas para la proliferación microbiana. A las bajas temperaturas, pH ácidos y desecación hay que añadir las operaciones habituales de limpieza y desinfección. Todo ello conlleva que los microorganismos que están en una planta, es decir, la microbiota residente, están muy adaptados a estas condiciones de estrés y probablemente a otras que se les puedan presentar, ya que es bien sabido que la resistencia que se adquiere frente a un determinado tipo de estrés conduce a una protección cruzada frente a otros. Si además, parte de estos microorganismos está formando biofilms en partes de equipos o localizaciones de la planta difíciles de limpiar, el problema se agrava porque muchos de ellos, incluyendo aquí, microorganismos patógenos terminan por establecerse de forma permanente. Evidentemente, el

diseño de plantas y equipos, el tipo de superficie (abierta o cerrada) así como las operaciones de mantenimiento, pueden minimizar o potenciar la formación de biofilms (San José y Orgaz, 2010).

Importancia del entorno industrial en la formación de biofilms

Como ya se apuntó anteriormente, los biofilms mixtos son prevalentes en los entornos reales, incluyendo la industria alimentaria. En estos sistemas multiespecie, la interacción entre los integrantes modifica el comportamiento global del biofilm, apareciendo nuevos fenotipos fruto de la interacción. Algunos de ellos les hacen más resistentes (Sanchez-Vizuete y col. 2015). Pese a lo trascendente de esto, el papel de la interacción en la capacidad de determinadas cepas para persistir en la industria alimentaria ha sido aún poco explorado. Existen evidencias de que cepas consideradas persistentes de *L. monocytogenes* tienen factores intrínsecos que probablemente les benefician frente a otras. Por ejemplo, algunas de ellas incorporan en su genoma secuencias de profagos que les confieren resistencia al estrés (Verghese y col. 2010) y existen evidencias de que se recuperan más rápido frente a los tratamientos con biocidas que las cepas consideradas esporádicas (Orgaz et al. 2013). Sin embargo, en estudios posteriores, observamos que estas mismas cepas no persistentes, pero en biofilms mixtos con *Pseudomonas*, un acompañante habitual de *L. monocytogenes* en las instalaciones alimentarias, se comportaban de forma idéntica a las persistentes. Así pues, los factores extrínsecos (en este caso las especies acompañantes) podrían ser más importantes para las cepas esporádicas, a efectos de supervivencia en una determinada ubicación (Puga y col., 2015).

Además de la compañía, el **frío** es otro de los factores extrínsecos que condiciona el tipo de biofilm que se forma. En las instalaciones donde se procesan alimentos, el frío es una de las barreras para el control de los microorganismos. Muchos son los mecanismos que tienen las bacterias para responder al estrés por frío, incluyendo modificaciones a nivel de la transcripción y de la traducción (Chaturongakul y col. 2008). La formación de biofilms también se ve afectada por el frío. Algunos estudios sugieren que el frío afecta a la cantidad y la calidad de las EPS que se producen y esto a su vez a la resistencia de los biofilms formados. Sin embargo, son escasos los estudios que evalúan el efecto de las bajas temperaturas sobre la estructura de los biofilms y si esto afecta a su resistencia. En un trabajo reciente de nuestro grupo (Puga y col. 2016a), se desarrollaron biofilms mixtos de *L. monocytogenes* y *P. fluorescens* a 20°C (templados) y a 4°C (fríos). Las cepas de *L. monocytogenes* provenían de entornos alimentarios y habían sido catalogadas como persistentes. Al comparar biofilms con la misma densidad celular pero desarrollados a distintas temperaturas, observamos mediante CLSM que el frío compactaba drásticamente la estructura de los biofilms. Quisimos ver si estos biofilms fríos eran más o menos resistentes frente al mismo tratamiento. Observamos que las estructuras más compactas (frías) se conservaban prácticamente intactas tras el tratamiento, aunque la población viva se reducía en ambos casos drásticamente. Además, al revitalizar los biofilms tratados, observamos que los fríos se recuperaban de forma más eficiente que los templados, es decir, al cabo de 24 h de incubación el porcentaje de células vivas era superior en los primeros. Así, el estrés por frío podría aumentar la fracción de células persistentes en estos biofilms. En el entorno alimentario esto es muy relevante, porque en ocasiones, tras la aplicación de los tratamientos de limpieza y desinfección, se registra un buen resultado aparente que cambia pasadas unas horas, habiéndose repoblado los biofilms y recuperado los niveles iniciales de contaminación. Así los biofilms fríos serían en esencia potencialmente más peligrosos.

Otro aspecto a considerar en las instalaciones de la industria alimentaria (aunque esto se podría también extrapolar a cualquier entorno) es que los biofilms no eliminados, envejecen. Quisimos ver el papel del **envejecimiento** en la estructura (Puga y col. 2016b). Usamos para este trabajo biofilms monoespecie y mixtos de *L. monocytogenes* y *P. fluorescens*. Observamos mediante CLSM al usar una tinción diferencial de células y matriz que por efecto del paso del tiempo, se perdían las capas

apicales de células, probablemente por los fenómenos de dispersión activa antes mencionados, y que las células residuales (las de las zonas profundas) aparecían totalmente cubiertas por matriz a modo de manta. Esto podría protegerlas de los daños físico-químicos y favorecer su persistencia. Si a esto le sumamos que especies como *L. monocytogenes* tienden a localizarse precisamente en estas zonas enterradas, también se verían beneficiadas en estas estructuras envejecidas. Este hallazgo podría contribuir a explicar la mayor resistencia de los biofilms más envejecidos a los tratamientos de limpieza y desinfección.

Considerando todos estos factores globalmente, la formación, arquitectura y por tanto la funcionalidad y la resistencia de los biofilms resultan de la interconexión entre multitud de factores que están relacionados con el entorno industrial en el que se encuentran.

ESTRATEGIAS DE CONTROL DE BIOFILMS

Las estrategias para el control de biofilms se centran en cada una de las etapas de su desarrollo. Están las que tratan de evitar, enlentecer o minimizar la adhesión de microorganismos a las superficies y las encaminadas a eliminar los biofilms ya establecidos.

La primera línea de actuación para prevenir o enlentecer la adhesión es modificar las propiedades superficiales del material que hace de sustrato. Por ejemplo, se han diseñado materiales con modificaciones a nivel de la hidrofobicidad y materiales que incorporan nanopartículas de compuestos con actividad bactericida como la plata o el dióxido de titanio.

El recubrimiento de materiales con agentes antimicrobianos adsorbidos o unidos de forma covalente es el método más usado para prevenir la adhesión en catéteres e implantes. Así, mezclas de antibióticos y antisépticos se han empleado para el recubrimiento de catéteres tanto intra- como extra-luminalmente. Su eficacia sin embargo es limitada. En ocasiones los compuestos se consumen antes de que termine la vida útil del dispositivo. Además, estos recubrimientos pueden terminar “tapizados” por otros componentes del medio, lo que merma su eficacia. Por otro lado, el uso de antibióticos en recubrimientos siempre es controvertido por el riesgo de que conduzca a la selección de cepas resistentes. Por ello, la tendencia actual es usar para los recubrimientos compuestos naturales como péptidos bioactivos y biosurfactantes, como la surfactina.

En la industria alimentaria no se puede emplear cualquier recubrimiento superficial, porque se debe garantizar que los compuestos empleados no migren a los alimentos y que no presenten toxicidad. El control ecológico es una alternativa interesante en este contexto. Determinadas cepas de bacterias lácticas productoras de bacteriocinas son capaces de interferir en la capacidad de formación de biofilms de *L. monocytogenes*. La adsorción de bacteriocinas, como la nisina, sobre superficies modelo consigue disminuir los niveles de contaminación de *L. monocytogenes*. Sin embargo, tanto la nisina como otros agentes antimicrobianos a dosis sub-inhedoras pueden estimular la formación de biofilms porque muchos de ellos actúan como moléculas señal (Romero y col. 2011). Así, la habilidad de ciertas moléculas de inducir respuestas diversas en función de su concentración, fenómeno conocido como hormesis, se debe tener en consideración a la hora de proponer nuevas medidas anti-biofilm.

Una vez formados, el tratamiento ideal sería el que permitiera eliminar tanto las células como la matriz, ya que la matriz *per se* puede actuar de punto de anclaje para otros microorganismos. Entre estos tratamientos, el **empleo de enzimas** es quizás uno de los más efectivos para eliminar sino la totalidad una parte del biofilm (Orgaz y col. 2006; Orgaz y col. 2007). Lo ideal es emplear mezclas de enzimas para atacar a todos los componentes de la matriz. Los daños estructurales que producen, debilitan la matriz y facilitan el acceso de otros biocidas que se usen después. Existen ya en el mercado muchas soluciones de limpieza con base enzimática que incorporan combinaciones de enzimas. Las limpiezas enzimáticas no sustituyen a los métodos convencionales pero sí les

complementan. En ocasiones se recomiendan limpiezas enzimáticas cuando hay una contaminación recurrente en una planta de procesamiento de alimentos o bien cada cierto tiempo para prevenirlas.

Los **bacteriófagos** son virus que específicamente infectan a las bacterias y en principio son inofensivos para los animales y plantas, por lo que se consideran actualmente una alternativa para el control de los biofilms. Los fagos virulentos infectan a la bacteria e inician el ciclo lítico, que termina con la lisis del hospedador y la diseminación de las partículas víricas. Además, muchos fagos inducen en el hospedador la producción de proteínas líticas como endolisinas y depolimerasas que atacan también a la matriz de los biofilms. Hasta ahora la mayor parte de los estudios sobre el empleo de fagos se han centrado en el entorno clínico, donde una vez aislado el microorganismo responsable de una infección se puede recurrir a un banco de fagos (Chan y Abedon, 2015). En la industria alimentaria, la empresa holandesa Microcos ha comercializado, entre otros, Listex P100 para la eliminación de *L. monocytogenes* de superficies. La eficacia de los bacteriófagos para eliminar biofilms está sin embargo aún en entredicho. Hay autores que apuntan a que el material liberado tras la lisis celular podría beneficiar a las células supervivientes, que tendrían así nutrientes disponibles (Brooks y Flint, 2008). También se podría cuestionar su eficacia en entornos reales donde prevalecen los biofilms multiespecie.

Los sistemas de QS, que entre otras muchas cosas intervienen en diversas etapas del desarrollo de los biofilms, se han convertido en una posible diana para su control. Así pues, inhibir o bloquear la comunicación entre bacterias para impedir que se organicen es crucial para su control. Estas estrategias, muchas de ellas inspiradas en la naturaleza, se engloban bajo el término de *quorum quenching* (QQ) (Zhu y col. 2013). Esto se puede conseguir por varias vías: mediante la degradación de moléculas señal, fundamentalmente por vía enzimática. Hay varios tipos de enzimas que cancelan señales de tipo AHL, como lactonasas, oxidasas y reductasas y paraoxonasas. Las primeras pueden ser producidas por muchas especies bacterianas, también plantas y las últimas se encuentran en mamíferos; también se podría actuar inhibiendo la síntesis de moléculas señal, bien usando inhibidores de las enzimas encargadas de su síntesis o bien inhibiendo la síntesis de sus precursores. El empleo de análogos de las AHL, naturales o sintéticos, que compiten por estas por la unión a los receptores interfiere en la señalización. Algunos ejemplos de estos análogos son las furanonas halogenadas producidas por el alga *Delisea pulchra* y extractos de frutas como fresas y uvas (Kalia, 2013).

Sin duda todas estas estrategias tienen un enorme potencial para el control de los biofilms, si bien es cierto que la heterogeneidad de estas comunidades microbianas nos lleva a pensar que quizás no haya una única forma de control sino probablemente cada problema requiera una solución concreta. En definitiva, en un futuro quizás se tienda a conocer primero al “enemigo” y en base a sus características desarrollar un tratamiento “a la carta”.

BIBLIOGRAFÍA

Bridier, A., del Pilar Sanchez-Vizueté, M., Le Coq, D., Aymerich, S., Meylheuc, T., Maillard, J. Y., & Briandet, R. (2012). Biofilms of a *Bacillus subtilis* hospital isolate protect *Staphylococcus aureus* from biocide action. *PloS one*, 7(9), e44506.

Bridier, A., Dubois-Brissonnet, F., Boubetra, A., Thomas, V., & Briandet, R. (2010). The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *Journal of microbiological methods*, 82(1), 64-70.

Brooks, J. D., & Flint, S. H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International journal of food science & technology*, 43(12), 2163-2176.

Chan, K B y Abedon, TS. (2015). Bacteriophages and their enzymes in biofilm control. *Current pharmaceutical design*, 21(1), 85-99.

Chaturongakul, S., Raengpradub, S., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2008). Modulation of stress and virulence in *Listeria monocytogenes*. *Trends in microbiology*, 16(8), 388-396.

Costerton, J. W. (2007). *The biofilm primer* (Vol. 1). Springer.

Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.

Elias, S., & Banin, E. (2012). Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS microbiology reviews*, 36(5), 990-1004.

Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633. Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.

Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA and Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology* 14, 563–575 (2016) doi:10.1038/nrmicro.2016.94

Gefen, O., & Balaban, N. Q. (2009). The importance of being persistent: heterogeneity of bacterial populations under antibiotic stress. *FEMS microbiology reviews*, 33(4), 704-717.

Harmsen, M., Lappann, M., Knöchel, S., & Molin, S. (2010). Role of extracellular DNA during biofilm formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and environmental microbiology*, 76(7), 2271-2279.

Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2014). The Paradox of Mixed-Species Biofilms in the Context of Food Safety. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(5), 990-1011.

Jenal, U., & Malone, J. (2006). Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.*, 40, 385-407.

- Kalia, V. C. (2013). Quorum sensing inhibitors: an overview. *Biotechnology advances*, 31(2), 224-245.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., & Caldwell, D. E. (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology*, 173(20), 6558-6567.
- Lebeaux, D., Ghigo, J-M and Beloin, C. (2014) Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 78(3):510-543.
- Lennon JT, Jones SE (2011). Microbial seed banks: The ecological and evolutionary implications of dormancy. *Nat Rev Microbiol* 9: 119-130.
- Lewis, K. (2005). Persister cells and the riddle of biofilm survival. *Biochemistry*, 70(2), 267-274.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., & Foster, K. R. (2009). The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology reviews*, 33(1), 206-224.
- Orgaz, B., Kives, J., Pedregosa, A. M., Monistrol, I. F., Laborda, F., & SanJosé, C. (2006). Bacterial biofilm removal using fungal enzymes. *Enzyme and microbial technology*, 40(1), 51-56.
- Orgaz, B., Neufeld, R. J., & SanJose, C. (2007). Single-step biofilm removal with delayed release encapsulated Pronase mixed with soluble enzymes. *Enzyme and microbial technology*, 40(5), 1045-1051.
- Orgaz, B., Puga, C. H., Martínez-Suárez, J. V., & SanJose, C. (2013). Biofilm recovery from chitosan action: A possible clue to understand *Listeria monocytogenes* persistence in food plants. *Food Control*, 32(2), 484-489.
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2016). Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Current opinion in microbiology*, 30, 67-78.
- Puga CH, SanJose C, Orgaz B. (2014) Spatial distribution of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas fluorescens* in mixed biofilms. In *Listeria monocytogenes, food sources, prevalence and management strategies*. New York, USA: Nova Publishers. pp.115-131.
- Puga, C.H. SanJose, C. and Orgaz B. (2016a) Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. *Food Control*, 65, 143-151.
- Puga C.H, Orgaz B, SanJose C. *Listeria monocytogenes* impact on mature or old *Pseudomonas fluorescens* biofilms during growth at 4 and 20°C. (2016b) *Frontiers in Microbiology*, doi: 10.3389/fmicb.2016.00134.
- Romero, D., Traxler, M. F., López, D., & Kolter, R. (2011). Antibiotics as signal molecules. *Chemical reviews*, 111(9), 5492-5505.
- Sanchez-Vizuet P, Orgaz B, Aymerich S, Le Coq D and Briandet R. (2015) Pathogens protection against the action of disinfectants in multiespecies biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi: 10.3389/fmicb.2015.00705

- SanJose C. y Orgaz B. Los biofilms microbianos, un bunker de uso habitual (2012) En Aspectos Higiénicos de los Alimentos Microbiológicamente Seguros. B. Sanz (Ed). pp:129-142. Monografía XXXI. Real Academia Nacional de Farmacia. ISBN: 978-84-937389-9-0
- Serra, D. O., & Hengge, R. (2014). Stress responses go three dimensional—the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environmental microbiology*, 16(6), 1455-1471.
- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572-585.
- Stewart, C. R., Muthye, V., & Cianciotto, N. P. (2012). Legionella pneumophila persists within biofilms formed by Klebsiella pneumoniae, Flavobacterium sp., and Pseudomonas fluorescens under dynamic flow conditions. *PloS one*, 7(11), e50560.
- Verghese, B., Lok, M., Wen, J., Alessandria, V., Chen, Y., Kathariou, S., & Knabel, S. (2011). comK prophage junction fragments as markers for Listeria monocytogenes genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation, and persistence. *Applied and environmental microbiology*, 77(10), 3279-3292.
- Xavier, J. B. (2016). Sociomicrobiology and pathogenic bacteria. *Microbiology spectrum*, 4(3).
- Zhu, J., & Kaufmann, G. F. (2013). Quo vadis quorum quenching?. *Current opinion in pharmacology*, 13(5), 688-698.