

INTERACCIONES MICROBIANAS Y SU CONTRIBUCIÓN AL DESARROLLO DE BIOFILMS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

Aumentar el conocimiento de las interacciones entre la flora residente y los microorganismos patógenos ayudará a la prevención y control de biofilms

Francisca Barbero. Responsable del Departamento de Biotecnología de A&B Laboratorios de Biotecnología. C/Paduleta esquina C/Júndiz 01015 Vitoria francis@ab-laboratorios.com

INTRODUCCIÓN

La presencia de biofilm en el ámbito alimentario es un peligro biológico de gran impacto tanto desde el punto de vista sanitario como económico, ya que puede provocar el deterioro de los alimentos, la reducción de la vida útil de los productos o la transmisión de microorganismos patógenos (1). El biofilm se define como una comunidad compleja de microorganismos, que puede estar constituida por una o varias especies que están irreversiblemente unidos a la superficie y entre sí, y embebidos en sustancias poliméricas extracelulares (EPS) que ellos mismos producen (2) y que constituye la denominada matriz. Los entornos de procesamiento de alimentos proporcionan una variedad de condiciones que favorecen el desarrollo de biofilms, entre ellos la presencia de humedad, nutrientes, los propios microorganismos procedentes de las materias primas con las que se elabora el alimento y la microbiota residente en dichos entornos.

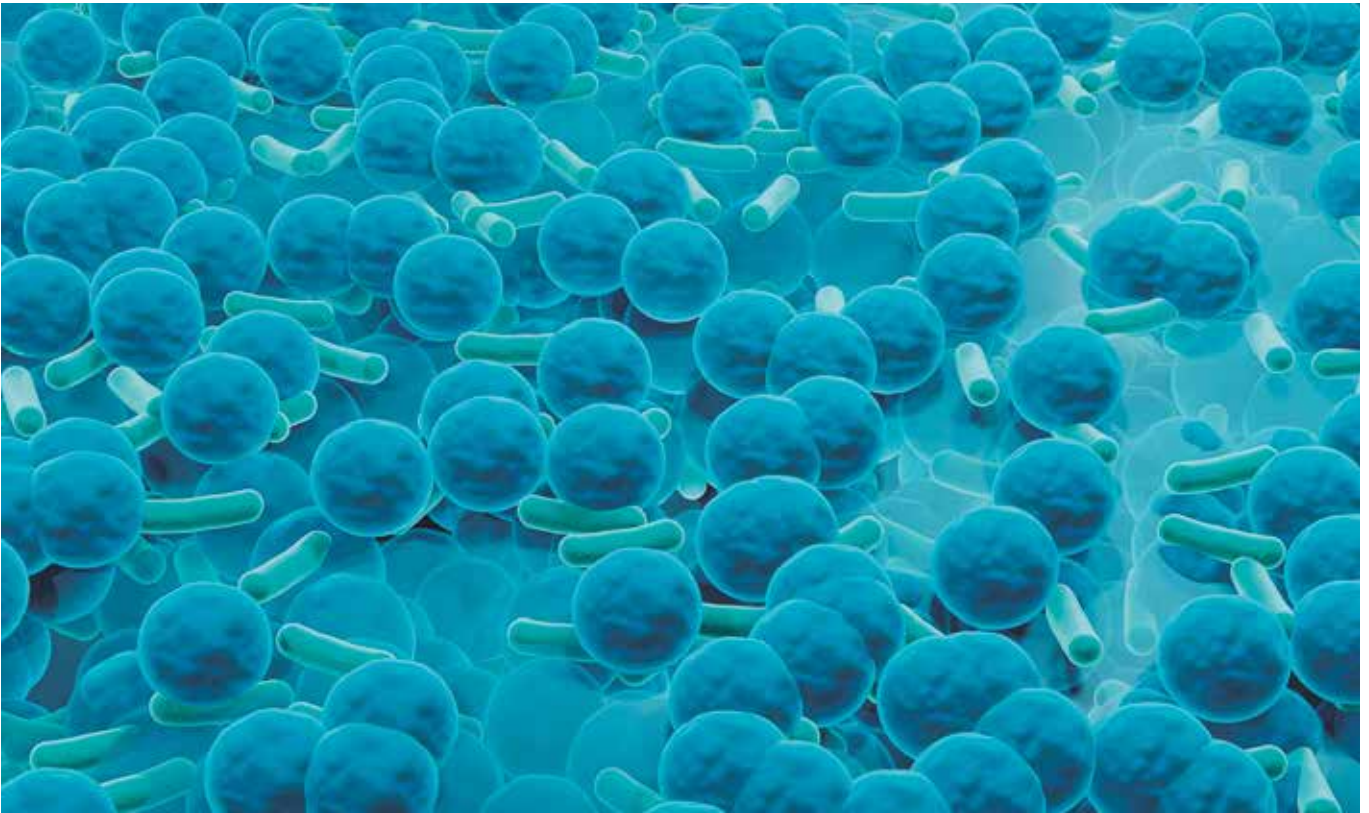
“La presencia de biofilms en el ámbito alimentario es un peligro biológico sanitario y económico”

La mayoría de los biofilms que se encuentran en entornos naturales, clínicos o industriales son biofilms multiespecie, constituidos al menos por dos o más especies de microorganismos en lugar de una sola especie. Diversas investigaciones sobre el desarrollo de biofilm multiespecie reportan que la formación de estos biofilms puede dar lugar a la propagación y persistencia de microorganismos patógenos en entornos de procesamiento de alimentos, (3). La formación de biofilms de especies mixtas constituye

una adaptación común de los patógenos y la microbiota autóctona para una supervivencia prolongada en su nicho alimentario (4). En diferentes trabajos de investigación sobre ecología microbiana y co-ocurrencia de bacterias patógenas y la microbiota residente (5,6,7), se indica que la persistencia o prevalencia de cepas patógenas en superficies después del proceso de limpieza y desinfección puede deberse a un efecto protector por parte de la microbiota residente que coexiste con ellas en esa compleja estructura que conforma el biofilm. Además, varios estudios han descrito que la tolerancia a diferentes desinfectantes es mayor en los biofilms mixtos o multiespecie que en los biofilms formados por una única especie y que la composición de la matriz del biofilm y las características de la superficie influyen en gran medida en la efectividad del desinfectante (8). Por lo tanto, el mayor conocimiento de las interacciones ecológicas establecidas entre las poblaciones microbianas de los biofilms multiespecie desarrollados en la industria alimentaria, ha de considerarse como una herramienta clave para la prevención y control de los mismos, lo que a su vez permitirá mejorar y optimizar la gestión de la seguridad alimentaria.

BIOFILM Y SU FORMACIÓN

El crecimiento de los microorganismos está determinado por dos fenotipos: células planctónicas (es decir, entidades biológicas individuales o células individuales que pueden flotar o nadar en un medio líquido) o agregados sésiles o biofilms (es decir, un conjunto de células adheridas entre sí o en alguna superficie). Sin embargo, se ha demostrado que las células microbianas están organizadas principalmente en comunidades de biofilms complejas, por lo que rara vez se encuentran como células individuales en su entorno natural. Este desarrollo en comunidad es una estrategia a la que recurren los microorganismos para adaptarse a las diversas condiciones de estrés



El biofilm se define como una comunidad compleja de microorganismos.

impuestas por el medio ambiente. Los factores abióticos que son fundamentales en la formación de biofilms en un entorno de procesamiento de alimentos son: la temperatura, las propiedades de la superficie, los nutrientes, el pH, la actividad del agua y los agentes estresantes (desinfectantes y agentes antimicrobianos).

Tanto en la industria alimentaria como en entornos naturales, el biofilm está integrado por más de una especie de microorganismos, los cuales se encuentran inmersos en una matriz extracelular conformada por sustancias poliméricas extracelulares (EPS), que incluyen polisacáridos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (3) y está altamente hidratada (figura 1).

Las EPS desempeñan funciones estructurales y funcionales clave que son esenciales para las propiedades del biofilm, entre ellas la unión inicial de las células a las superficies; formación y mantenimiento de microcolonia y de la estructura del biofilm maduro, y una mayor resistencia del biofilm al estrés ambiental y a los desinfectantes, y en consecuencia es responsable de la persistencia del biofilm en la industria alimentaria. En algunos casos, la matriz de EPS también permite a las bacterias capturar nutrientes (9). Una vez adheridas

las células a las superficies, la producción adicional de EPS forma una matriz que las rodea y las cementa, manteniéndolas muy cerca y permitiendo interacciones intercelulares en un espacio confinado (10).

“Los entornos de procesamiento de alimentos favorecen el desarrollo de biofilms”

En cuanto a la población microbiana que podemos encontrar en los biofilms que se generan en la industria alimentaria, además de las bacterias que componen la flora residual, también suelen estar presentes bacterias patógenas formadoras de biofilm. Las especies patógenas que se han identificado en biofilms multiespecie desarrollados en la industria alimentaria, comprenden varias especies, entre ellas las más relevantes son *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* y *Staphylococcus aureus*. Con respecto a la flora residente se ha encontrado que en industrias alimentarias que procesan carne, pescado o alimentos

frescos y en las que el ambiente productivo es húmedo, existe una predominancia de bacterias Gram negativas como: especies de la familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Psychrobacter* y *Stenotrophomonas*. Entre ellas destaca el género *Pseudomonas* por su gran capacidad de producir EPS (11) y por ser un género que coexiste dentro de los biofilms con patógenos como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* enterica formando biofilms multiespecie, más estables y resistentes (12). Las bacterias Gram positivas parecen ser más prevalentes en la industria láctea y en entornos productivos secos, en los que se identifican normalmente *Bacillus spp.*, *Staphylococcus spp.*, y bacterias lácticas (7).

“La tolerancia a desinfectantes es mayor en los biofilms mixtos o multiespecie”

La formación de biofilms confiere muchas ventajas a las células microbianas en el entorno alimentario, como la resistencia física (contra la desecación), la resistencia

mecánica (contra las corrientes líquidas en las tuberías) y la protección química contra los productos químicos, antimicrobianos y desinfectantes utilizados en la industria (13).

La formación de biofilm (figura 2) podría describirse como un proceso de cinco pasos: 1. una adhesión inicial reversible de microorganismos planctónicos a la superficie; 2. transición de la unión reversible a irreversible por la producción de polímeros extracelulares (EPS) y agregación celular; 3. desarrollo de la estructura del biofilm; 4. maduración del biofilm; 5. dispersión de células de biofilm en el medio ambiente circundante (14).

La adhesión inicial de los microorganismos es reversible (15). Dicha adhesión depende de varios factores como las propiedades de las superficies, las propiedades fisicoquímicas de los microbios y las condiciones ambientales (16). Estos primeros microorganismos se denominan colonizadores primarios, que empiezan a secretar su correspondiente EPS y se agregan entre sí. La co-adhesión de los colonizadores primarios iniciales es crucial para la colonización de biofilm, mientras que un aumento en la producción de EPS es esencial para la unión de



Algunas cepas pueden persistir tras el proceso de limpieza y desinfección.



Las comunicaciones entre especies pueden causar comportamientos sociales de carácter neutral, cooperativos o competitivos.

los colonizadores secundarios a las microcolonias, ya que el EPS funciona como un cemento intercelular en la proliferación de biofilm al unir las células y mediar una coagregación sucesiva a medida que la biopelícula madura (17). Esta cohesión celular junto con las diferentes interacciones fisicoquímicas que se desarrollan entre los microorganismos y las superficies, dan lugar a una adhesión irreversible.

“Las sustancias poliméricas extracelulares son esenciales para las propiedades del biofilm”

Una vez que se establece la primera capa de la biopelícula, las células de la misma especie u otras especies van uniéndose, incrementándose el tamaño del biofilm, en el cual las bacterias se organizan de acuerdo a su metabolismo y tolerancia aerodinámica. A medida que el biofilm madura, se generan más capas de EPS secretado por las bacterias que quedan atrapadas en el biofilm.

Después de la maduración de la biopelícula, sigue el paso de dispersión, que también es crítico para el ciclo de vida de la biopelícula. Los biofilms se dispersan debido a una serie de factores, como la falta de nutrientes, la intensa competencia y el sobrecrecimiento de la población. La liberación de

bacterias planctónicas promueve el inicio de nuevos biofilms en otro lugar.

INTERACCIONES BACTERIANAS EN EL BIOFILM

En los biofilms multiespecie se establecen asociaciones complejas e interacciones entre las diferentes especies, que confieren a la comunidad importantes ventajas, pero que van a tener un gran impacto en la seguridad alimentaria, debido a la mayor resistencia que dichos biofilms muestran frente a los desinfectantes (14) y a la persistencia de los patógenos que quedan protegidos por ellos (18).

Las bacterias en un consorcio de biofilms multiespecie, se comunican principalmente a través de cuatro mecanismos altamente específicos (figura 3), a saber, las interacciones físicas, el intercambio de material genético, las relaciones metabólicas y el uso de señales difusibles, que en muchos casos, solo tienen lugar cuando las respectivas especies bacterianas forman una biopelícula multiespecie (17). Tales interacciones pueden influir en el crecimiento y la supervivencia de los miembros del biofilm y también en sus propiedades potenciales de virulencia que, a su vez, podrían influir en la patogenicidad general de tales estructuras (19).

Las interacciones físicas, que tienen lugar de célula a célula, son la co-adhesión y co-agregación, que en conjunto fomentan las comunicaciones mutualistas

entre las células adyacentes en el biofilm. La adherencia de las células bacterianas a las células inmovilizadas se denomina co-adhesión, mientras que la unión de las células microbianas en suspensión se conoce como co-agregación. Estas dos interacciones proporcionan diversos sitios de unión para que las bacterias planctónicas se adhieran en el proceso de desarrollo de biofilms (17).

“Los biofilms generados en la industria alimentaria suelen incluir bacterias patógenas”

Otra interacción que puede tener consecuencias importantes para la fisiología de los biofilms, así como para su evolución, es el intercambio genético entre los residentes de las biofilms multiespecie, mediante procesos de transferencia horizontal de genes (HGT) como la conjugación. Esta transferencia horizontal en biofilms multiespecies, resulta en nuevas combinaciones genéticas y facilita la creación de nuevos genotipos que podrían volverse problemáticos. Los biofilms multiespecie también facilitan el HGT por transformación, gracias a las grandes cantidades de ADN extracelular que existe en el biofilm, y que se convierte en una importante fuente común de información genética utilizable para los miembros de la comunidad de biofilms (19).

“La adhesión inicial de los microorganismos es reversible”

Desde el punto de vista metabólico, las bacterias que viven dentro de las comunidades a menudo tienen acceso a una gama más amplia de nutrientes que las células individuales que viven aisladas de otras especies. Este servicio comunitario es proporcionado por bacterias que facilitan el crecimiento de otras o a través de un metabolismo obligatoriamente mutualista (también llamado “sintrofismo metabólico”), lo que resulta en dependencias bioquímicas complejas y multiespecie. El sintrofismo metabólico sugiere que las bacterias cooperan porque diferentes especies poseen vías bioquímicas complementarias necesarias para liberar nutrientes del medio ambiente que

son utilizados por otras que coexisten con ellas (8). Además del sintrofismo, las relaciones nutricionales dentro de un biofilm multiespecie podrían ser de tipo competitivo, por nutrientes limitantes que pueden determinar la supervivencia y la persistencia en dicho biofilm.

La comunicación a través de señales químicas difusibles, conocida como Quorum Sensing, juega un papel importante en el establecimiento de biofilms multiespecie. Los sistemas de Quorum Sensing parecen estar involucrados en todas las fases de la formación de biofilms. Regulan la densidad de población y la actividad metabólica dentro del biofilm maduro para adaptarse a las demandas nutricionales y los recursos disponibles. Es el mecanismo utilizado por las bacterias para comprender los cambios en su entorno y, en consecuencia, aplicar estrategias específicas que permitan la adaptación al estrés ambiental en el espacio y el tiempo. En su forma más simple, la señalización de célula a célula resulta de la producción de moléculas señal pequeñas y difusibles llamadas autoinductores. Las moléculas señal se secretan a nivel basal durante el crecimiento bacteriano por las células emisoras y se acumulan en el entorno circundante. Cuando estas moléculas alcanzan una concentración correspondiente al nivel umbral, las moléculas de señalización se unen a los receptores proteicos en la célula bacteriana, activando la expresión de genes asociados con la formación de biofilm (20).

Estas comunicaciones entre especies, dependiendo de los mecanismos moleculares implicados, pueden causar comportamientos sociales de carácter neutral, cooperativos o competitivos, siendo estos dos últimos los que van a influir en la organización y funcionalidad de una comunidad de biofilms multiespecie.

Las interacciones bacterianas se clasifican como cooperación cuando todos los miembros de la comunidad se benefician de alguna manera por la presencia de los demás, y esto a menudo conduce a un aumento de formación de biofilms. Esto se puede lograr mediante la provisión de capacidad de formación de biofilms a la comunidad, produciendo sustancias que puedan servir como nutrientes para las especies que cohabitan, eliminando metabolitos que de otro modo ralentizarían el crecimiento, o mediante cualquier combinación de todos estos. Las interacciones metabólicas cooperativas también se sugieren mediante la observación de que ciertas especies bacterianas pueden modificar el microambiente local, haciéndolo más adecuado para el crecimiento de otros organismos, por ejemplo,

cambiando el pH o la concentración de oxígeno (19). Las interacciones cooperativas también permiten proteger a especies con poca capacidad de formar biofilm o no formadoras de biofilm y que son menos tolerantes a los cambios del entorno.

“Las bacterias en biofilms multiespecie se comunican mediante cuatro mecanismos”

Investigaciones realizadas en entornos de la industria alimentaria, muestran posibles interacciones cooperativas entre patógenos y flora bacteriana residente, que pueden contribuir a aumentar la colonización y formación de biofilms de especies como *L. monocytogenes* o *Salmonella enterica*. Los estudios muestran que *L. monocytogenes* se puede establecer en biopelículas con *Pseudomonas*, como una parte menor de la población bacteriana total. Curiosamente, la presencia de *L. monocytogenes* puede inducir una mayor producción de matriz en biofilms con *Pseudomonas* y *L. monocytogenes* puede protegerse contra la desecación y la desinfección (7).

Otros trabajos indican otros géneros bacterianos como *Flavobacterium sp.*, que contribuyen a la formación de biofilms de *L. monocytogenes* (19). También se han señalado que *L. monocytogenes* persiste en biofilms multiespecie formados en consorcio con géneros como *Acinetobacter* y *Janthinobacterium* (6). En otras investigaciones se ha reportado que la bacteria *Ralstonia insidiosa* facilita formación de biofilm por *L. monocytogenes*, *S. enterica* y *E. coli* gracias a su alta eficiencia en la utilización de nutrientes, proporcionando un microambiente para la acumulación y supervivencia bacteriana. También se ha reportado que *Pseudomonas spp.* tiene un efecto positivo en la fijación de *L. monocytogenes* en las superficies de acero inoxidable (21).

Otros estudios reportan que la producción de biofilms de *Salmonella spp.* puede ser promovida por la presencia de otras bacterias, como por ejemplo *Staphylococcus piscifermentans* y *Pseudomonas sp* (19) y que la producción de biofilm por parte de *Salmonella* se ve incrementada en biofilms multiespecie formados con *Proteus* y *E. coli* (22).

Respecto a las interacciones competitivas comunes suelen consistir en relaciones antagónicas entre

los miembros de la comunidad por las fuentes de nutrientes, el oxígeno y el espacio disponible para colonizar. Una estrategia competitiva es evitar la colonización de otras especies por ocupación rápida de todos los sitios de adhesión disponibles. La competencia también se puede establecer mediante la producción de compuestos (por ejemplo, bacteriocinas, ácidos orgánicos, biosurfactantes, enzimas) que pueden inactivar, inhibir el crecimiento o prevenir la unión de otras especies o incluso provocar el desprendimiento de sus células de las estructuras de la biopelícula (21).

En diversas investigaciones se recogen resultados que muestran la inhibición de *L. monocytogenes* por la presencia de una flora residente integrada por la especie *Lactococcus lactis* en biofilms de doble especie (23). Los cocultivos de *L. monocytogenes* con varios Gram negativos incluyendo *Serratia spp.*, *Aeromonas sp.* y *P. fluorescens* han mostrado que limitan su crecimiento (19). También se ha indicado que *Staphylococcus sciuri* disminuye la formación de biofilms de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable (21). En estos casos la competencia por los nutrientes y la producción de metabolitos antilisteriales se atribuyen como responsables del control del biofilm de *L. monocytogenes*.

CONCLUSIONES

El biofilm es una estructura viva que nace, se reproduce y puede perpetuarse en el tiempo si no conseguimos erradicarlo completamente. La formación del biofilm en la industria alimentaria depende de varios factores tanto abióticos como bióticos, siendo estos últimos los que mayor peso tienen en su desarrollo. Las interacciones que se pueden llegar a establecer entre las diferentes especies bacterianas que integran un biofilm multiespecie pueden ser complejas, favoreciendo en algunos casos el desarrollo y persistencia de microorganismos patógenos, y en otros casos limitando el desarrollo de estos. Estas interacciones se convierten por tanto en un factor clave que va a condicionar el desarrollo y persistencia del biofilm, y en definitiva la seguridad alimentaria. Se hace necesario por tanto, profundizar en mayor medida y aumentar el conocimiento de las interacciones entre la flora residente y los microorganismos patógenos en los propios entornos alimentarios, lo que ayudará a definir y establecer estrategias eficaces para la prevención y el control de biofilms, y como resultado reducir o eliminar el riesgo biológico asociado a los mismos. ■

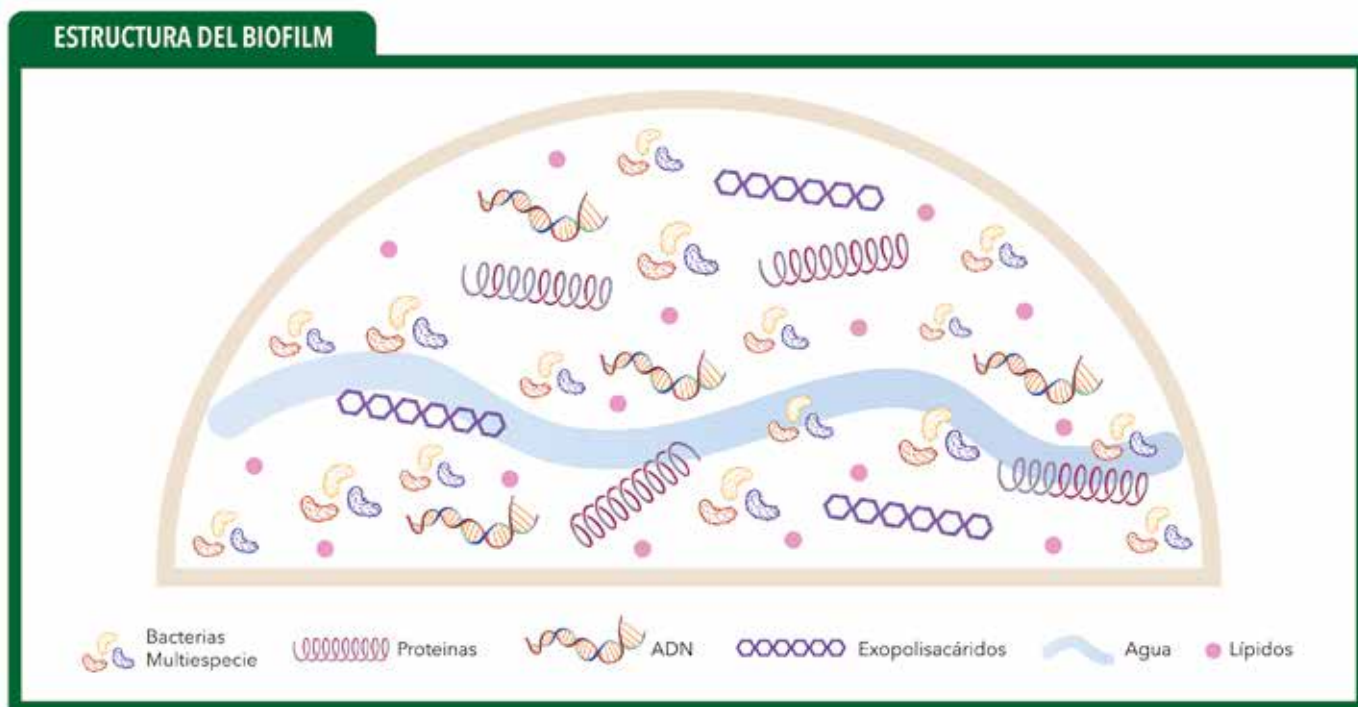


Figura 1. Estructura del biofilm.

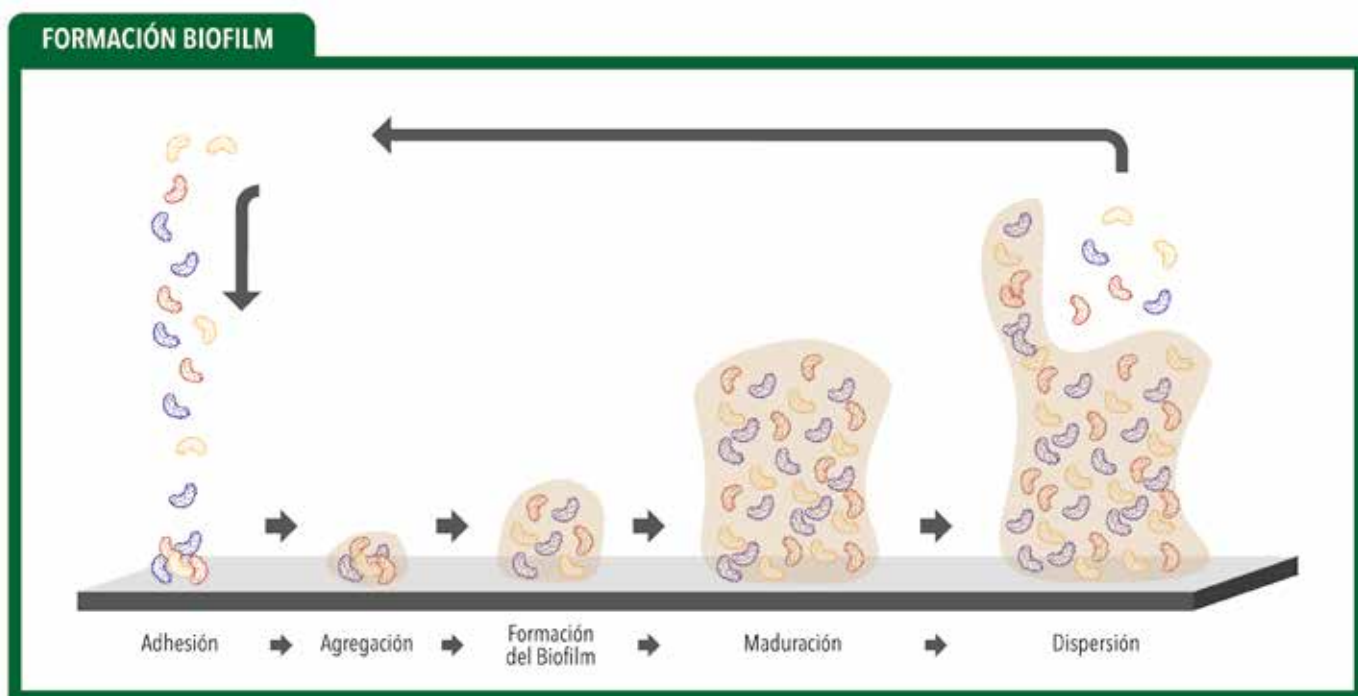


Figura 2. Etapas de la formación del biofilm.

INTERACCIONES MICROBIANAS EN EL BIOFILM

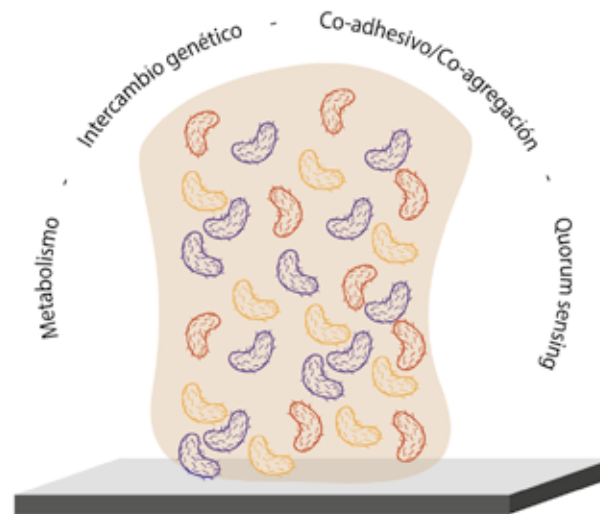


Figura 3. Interacciones microbianas.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Kretli Winkelströter, L. y cols. (2014) Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microbial Ecology* 68:35-46.
- 2- McLean, R. J. C. y cols. (2012) Training the biofilm generation – a tribute to J. W. Costerton. *J. Bacteriol.* 194:6706-6711.
- 3- Li, Q. y cols. (2021). Formation of multispecies biofilms and their resistance to disinfectants in food processing environments: A Review. *J Food Prot* 84 (12): 2071-2083.
- 4- Iqbal Kabir Jahid y Sang-Do Ha (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.
- 5- Tan, X. y cols. (2019) The occurrence of *Listeria monocytogenes* is associated with built environment microbiota in three tree fruit processing facilities. *Microbiome* 7:115.
- 6- Zwirzitz, B. y cols. (2021) Co-occurrence of *Listeria* spp. and spoilage associated microbiota during meat processing due to cross-contamination events. *Front Microbiology* 5:12.
- 7- Fagerlund, A. y cols. (2021) Microbial diversity and ecology of biofilms in food industry environments associated with *Listeria monocytogenes* persistence. *Current opinion in Food Science* 37:171-178.
- 8- Diego García-Gonzalo y Rafael Pagán (2015) Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: A Review. *Journal of Postdoctoral Research* 3(6):3-13.
- 9- Czaczyk, K. y Myszkka K. (2007) Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. *Pol. J. Environ. Stud.* 16(6):799-806.
- 10- H.C. Flemming, H.C. y cols. (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat. Rev. Microbiol.* 14:563-575.
- 11- Carrascosa, C. y cols. (2021) Microbial biofilms in the food industry—A comprehensive review. *Int J Environ Res Public Health.* 18(4): 2014-2045.
- 12- Grigore-Gurgu, L. y cols. (2019) Biofilms formed by pathogens in food and food processing environments. *Bacterial Biofilms* (book chapter)1-32.
- 13- Galié, S. y cols. (2018) Biofilms in the food industry: Health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology* 9:898
- 14- Myszkka, K. y Czaczyk, K. (2011) Bacterial biofilms on food contact surfaces – a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci* 61(3):173-180.
- 15- Chittapilly Dass, S. y Wang, R. (2022) Biofilm through the Looking Glass: A Microbial Food Safety Perspective. *Pathogens* 2022, 11(3):346-361.
- 16- Zeng Jia (2022) Antifouling strategies-interference with bacterial adhesion. *Focus on Bacterial Biofilms* (book chapter).
- 17- Joshi, R.V. y cols. (2021) We are one: multispecies metabolism of a biofilm consortium and their treatment strategies. *Front Microbiol.* 12:635432.
- 18- Ripolles-Avila, C. y cols. (2022) Dual-species biofilms formation between dominant microbiota isolated from a meat processing industry with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*: Unraveling their ecological interactions. *Food Microbiol.* 105:104026.
- 19- Giaouris, E. y cols. (2015) Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 8:841.
- 20- Stubbendieck, R. M. y cols. (2016) Bacterial Communities: Interactions to Scale. *Front. Microbiol.* 7:1234.
- 21- Skandamis, P. N. y Nychas G.-J. E. (2012) Quorum sensing in the context of food microbiology. *Appl Environ Microbiol* 78(16):5473-5482.
- 22- Ruwandeeepika, D. y cols. (2021) Interaction of *Salmonella* with *E. coli* and *Proteus* spp. in Biofilm Formation. *Journal of Advances in Microbiology* 21(12):30-45.
- 23- Habimama, O. y cols. (2011) Spatial competition with *Lactococcus lactis* in mixed-species continuous-flow biofilms inhibits *Listeria monocytogenes* growth. *Biofouling* 27(9):1965-1972.