

BIOFILMS: CONTAMINACIÓN CRUZADA EN INDUSTRIA ALIMENTARIA.

Biofilms: cross contamination in the food industry.

FABIÁN GONZÁLEZ-RIVAS^{*1}, FABIO FONTECHA-UMAÑA², JOSÉ JUAN RODRÍGUEZ-JEREZ²

CONFLICTO DE INTERESES:

Los autores certifican que no existe ningún conflicto de interés relacionado con la publicación de esta revisión.

ABSTRACT:

Cross-contamination from surfaces, equipment and hands to food is one of the main pathways for pathogens to arrive to food, which seriously compromises public health. The ability of bacteria to adhere to surfaces and form resistance structures, known as biofilms, aggravates the problem because of the difficulties involved in their detection and elimination. Biofilms use to inactivate the disinfectant agents, allowing the survival of the microorganisms that compose it. Also, with some regularity, the biofilm disintegrates disseminating microorganisms over the installation, generating

¹Profesor de los Estudios de Ciencias de la Salud, Universidad de Vic-Universidad Central de Cataluña, Campus Manresa (U-Manresa), 08242 Manresa (Barcelona) España. +34679339925. fgonzalez@umanresa.cat

²Grupo de Investigación AMicS, Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona. +34935811448. josejuan.rodriguez@uab.cat

new contamination focus. Therefore, in order to maintain adequate hygiene standards in the food production process, strategies to prevent the biofilms development are key. This involves following cleaning and disinfection protocols, as well as designing facilities and equipment that allows to carry on those protocols in the proper way.

RESUMEN:

La contaminación cruzada desde superficies, equipos y manos a alimentos es una de las principales vías de llegada de patógenos a los alimentos, lo que compromete gravemente la salud pública. La capacidad de las bacterias de adherirse a las superficies y formar estructuras de resistencia, conocidas como biofilms, agrava el problema por las dificultades que entrañan su detección y eliminación. Los biofilms tienen capacidad de inactivar los agentes desinfectantes, lo que permite la supervivencia de los microorganismos que lo componen. Además, con cierta regularidad el biofilm se disgrega diseminando los microorganismos por la instalación, generando nuevos focos de contaminación. Por ello, de cara a mantener unos estándares higiénicos adecuados en el proceso de producción de alimentos, son claves las estrategias para prevenir la formación de biofilms. Ello pasa por seguir unos protocolos de limpieza y desinfección, así como por diseñar unas instalaciones que permitan el tratamiento adecuado.

Palabras clave:

Contaminación cruzada, Toxiinfección, Biofilm, Biocidas, Higienización.

Key words:

Cross contamination, Food-borne diseases, Biofilm, Biocide, Sanitization.

INTRODUCCIÓN:

Las toxiinfecciones y las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), comprenden un amplio grupo de enfermedades causadas por bacterias patógenas, parásitos, contaminantes químicos y biotoxinas; además de las reacciones individuales del cuerpo humano a los microorganismos (OMS, 2006).

Las enfermedades de transmisión por alimentos constituyen un gran problema a nivel mundial, tanto en lo referente al perjuicio para las personas, como a los costes económicos que originan (OMS, 2007).

La European Food Safety Authority (EFSA) y el European Center of Disease Control (ECDC, 2012), documentaron en 2010 un total de 5.262 brotes de enfermedades de origen alimentario en la Unión Europea, causados principalmente por *Salmonella* y *Campylobacter*, afectando a 43.473 personas, de los cuales, 4.695 fueron hospitalizadas y 25 murieron.

La transferencia bacteriana conocida como “contaminación cruzada” es un término general que hace referencia a la contaminación directa o indirecta, por parte de microorganismos, desde una matriz contaminada (ya sean alimentos, superficies de trabajo u operarios, entre otras) a otra matriz no contaminada. Por otro lado, el término recontaminación hace referencia a la contaminación de los alimentos después de haber sido sometidos a tratamiento higienizante (Carrasco y cols., 2012).

La contaminación cruzada juega un papel importante en la transmisión de patógenos a productos frescos. Un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud en el año 1995 (Schmidt, K y cols., 2001), en el ámbito europeo, determinó que el 25% de los brotes de toxiinfecciones alimentarias fueron asociados a contaminaciones cruzadas; donde intervenían, como factores determinantes, prácticas higiénicas ineficientes, superficies contaminadas y la falta de higiene de los manipuladores. La vigilancia y control de la contaminación microbiana de las superficies está en auge, cumpliendo en parte con el aseguramiento de la calidad y la debida notificación de brotes alimentarios, en cuyas vías de contaminación se han visto implicadas superficies, equipos y/o utensilios contaminados que entran en contacto directo con el (Reij y Den Aantrekker, 2004).

Los patógenos, con bajas dosis infectivas, pueden estar presentes en las manos de un alto número de manipuladores de alimentos y, si se suma un bajo nivel de barreras, estos pueden ser fácilmente transferibles a superficies alimentarias, donde podrían sobrevivir durante largos periodos de tiempo. En condiciones adecuadas, incluso podrían seguir siendo viables después de la limpieza y desinfección, convirtiendo a las superficies en una importante fuente de contaminación. Esto aumenta el peligro de contaminaciones cruzadas, con el consiguiente riesgo para la salud pública (Humphrey y cols., 1994; De Cesare y cols., 2003; Reij y Den Aantrekker, 2004; Todd y cols., 2010).

La contaminación cruzada vía equipos contaminados y pobre higiene personal, durante la preparación de alimento, contribuye a la transmisión de los patógenos alimentarios (Olsen y cols., 2000; Kassa y cols., 2001). Después de la preparación de alimentos crudos contaminados, los patógenos son rápidamente dispersados a las superficies de contacto y a los utensilios de limpieza (Cogan y cols., 1999; de Boer y Hahné, 1990).

Según Scott y Bloomfield (1993) una superficie que supere el recuento de 102 ufc/cm² tiene una contaminación elevada, ya sean únicamente bacterias de origen entérico o con otras bacterias potencialmente patógenas. Sin embargo Ak y cols. (1994), en otro estudio, consideraron como elevados los recuentos que superaban 3.9*10² ufc/cm² de mesófilos aerobios.

Scott y cols. (1982) encontraron que las enterobacterias se hallaban muy frecuentemente en lugares húmedos donde solían estar en números muy elevados y eran el grupo predominante.

La familia Enterobacteriaceae es importante en la industria de la alimentación porque incluye (Zeitoun y cols., 1994):

- Patógenos intestinales.
- Los más importantes indicadores de higiene, higienización y seguridad alimentaria.
- Algunos de los más importantes agentes alterantes de alimentos.

Según Mossel y cols. (1995) el recuento de un grupo bacteriano más amplio, como es el de las enterobacterias sería más interesante que el de los coliformes, que es más limitado y proporcionaría una mejor evaluación del producto. Por ejemplo, especies como Salmonella o Yersinia, la mayoría de las cuales son incapaces de fermentar la lactosa, quedarían excluidas con un análisis estándar de coliformes pero serían detectadas con uno de enterobacterias.

CONTAMINACIÓN CRUZADA MEDIANTE BIOFILMS:

Los microorganismos tienden a adherirse a superficies vivas o inertes para colonizarlas, crecer y formar una matriz polimérica autoproducida, en la cual pueden confluir múltiples especies microbianas. A todo el conjunto se le denomina biofilm (Carpertier y Cerf, 1993). La capacidad para formar biofilms no parece restringirse a algunos grupos específicos de microorganismos y se considera, que bajo condiciones ambientales adecuadas, la inmensa mayoría de las bacterias pueden sobrevivir dentro de los biofilms (Donlan, 2002; Thomas y Nakaiishi, 2006).

Las cargas negativas de las superficies bacterianas son contrarias a la adhesión bacteriana, debido a las fuerzas de repulsión electrostáticas. Estas mantienen a las células bacterianas a una corta distancia de la superficie. Sin embargo, la superficie de las células bacterianas poseen hidrofobicidad debido a las fimbrias, flagelos y

sustancias poliméricas extracelulares (EPS) (Shi y Zhu, 2009; Simões y cols., 2010). Las EPS confieren propiedades hidrofílicas a las células bacterianas y son un componente importante de la membrana externa bacteriana, la cual juega también un papel en la fijación inicial a la superficie (Shi y Zhu, 2009).

En los entornos de procesado de alimentos, las bacterias, junto con otras moléculas orgánicas e inorgánicas, como por ejemplo las proteínas de la leche y de la carne, son adsorbidas por las superficies, formando un film, donde existe un incremento en el nivel de nutrientes remanentes sobre la superficie alimentaria haciéndola disponible a la adhesión bacteriana. Esta disposición también altera las propiedades físico-químicas de la superficie, energía libre de superficie, cambios en la hidrofobicidad y cargas electrostáticas, las cuales pueden también afectar la secuencia de eventos microbianos. (Kumar y Anand, 1998).

Bower y cols. (1996) encontraron que las esporas se adhieren mejor a las superficies de contacto de los alimentos que las células vegetativas debido al grado de hidrofobicidad de su superficie.

Para una unión irreversible entre la célula y la superficie es necesario un tiempo de contacto mínimo (Chmielewski y Frank, 2003). Si bien por lo general, el espacio temporal para el desarrollo de un biofilm es corto y varía en función de la temperatura, disponibilidad de nutrientes y presencia de antibióticos (Holah, 1995). En este sentido, varios estudios indican que las uniones irreversibles llevan de 20 minutos a 4 horas a una temperatura de entre 4 y 20°C. (Gilbert y cols., 1991).

Las adhesiones se dan rápidamente, Mittelman (1998) encontró que a menudo se producen entre 5 a 30 segundos.

Las adhesiones se dan en dos fases; una primera reversible, seguida de una segunda irreversible (Marshall y cols., 1971; Mittelman, 1998). La etapa reversible es una unión débil de la bacteria con el sustrato. En ella actúan fuerzas de Van der Waals y fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Durante la unión reversible, las bacterias siguen mostrando movimientos brownianos y se pueden eliminar de manera sencilla con una suave limpieza (Mittelman, 1998). La unión irreversible resulta del anclaje de los apéndices celulares y/o de la producción de polímeros extracelulares (Sutherland, 1983).

Carpentier y Cerf (1993) observaron que las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) proporcionan protección a los habitantes del biofilm mediante la concentración de nutrientes, previniendo el acceso de biocidas, secuestrando metales y toxinas y previniendo la desecación.

Las células bacterianas fijadas de forma irreversible, crecen y se dividen utilizando los nutrientes presentes en la película de acondicionamiento y los fluidos circundantes del medioambiente. Este proceso lidera la formación de microcolonias, las cuales se ensanchan y se unen para formar películas de células cubriendo la superficie (Kumar y Anand, 1998).

El desarrollo de un biofilm puede ocurrir sobre casi todas las superficies y cualquier medio ambiente, en el que existan microorganismos viables presentes. En la mayoría de los casos, los microorganismos se adhieren a sustratos sólidos que pueden ser vivos o inanimados y/o a las formas inorgánica y orgánica, un requisito esencial para su supervivencia y reproducción normal (Kumar y Anand, 1998).

Temperaturas altas de crecimiento se asocian con el incremento de adhesividad (Mittelman, 1998) (Smoot y Pierson, 1998 a y b), posiblemente debido a la producción de proteínas de estrés térmico asociadas con la superficie celular.

Por ello, las estructuras que protusionan desde la membrana celular como los lipopolisacáridos (LPS), adhesinas y otras proteínas y ácidos lipoteicoicos, pueden desempeñar papeles importantes en la adhesión microbiana (Chmielewski y Frank, 2003). Esto puede ser debido, entre otros, a que las sustancias poliméricas extracelulares también se producen en respuesta a la unión y al estímulo ambiental, como presión osmótica, pH, temperatura y falta de nutrientes (Davey y O'Toole, 2000).

Algunos microorganismos patógenos pueden atacar, crecer y formar biofilms sobre superficies de alimentos, equipos y entornos alimentarios. Por ejemplo, *Listeria monocytogenes* forma biofilms en los drenajes de los suelos, tanques de almacenamiento, carretillas de mano, bandas transportadoras y otros materiales que están en contacto con los alimentos (Shi y Zhu, 2009). Así mismo, en la industria láctea y, en general, aquellas que trabajan con fluidos alimentarios, presentan un problema serio con respecto a la adhesión llamado "biofouling", que es la formación de depósitos (capa de células vivas y sus productos de descomposición) sobre una superficie de contacto con un medio líquido (Trachoo, 2003). La existencia de bacterias patógenas sobre los alimentos o superficies, que están en contacto con ellos, incrementa el riesgo de inseguridad alimentaria. Es por ello que el mecanismo de formación del biofilm, en las industrias alimentarias, se ha convertido en un punto importante en los últimos años (Shi y Zhu, 2009).

La secuencia de unión de diferentes especies bacterianas influye en la composición del biofilm resultante. La población inicial que se une puede cambiar las propiedades de la superficie así las que vienen después se pueden adherir vía aso-

ciación célula a célula. En algunos casos, la unión de unas segundas especies puede incrementar la estabilidad de la población del biofilm (McEldowney y Fletcher, 1987).

En este sentido Hood y Zottola (1997) demostraron que *Listeria monocytogenes* era más propensa a adherirse al acero en presencia de *Pseudomonas fragi*.

Si las condiciones son adecuadas para un crecimiento suficiente del biofilm, por naturaleza, desarrollará una estructura organizada. A este proceso se le llama maduración. Un biofilm maduro puede consistir en una simple capa de células, en un polímero extracelular poroso o en una multicapa de microcolonias sueltas o empaquetadas por las sustancias poliméricas extracelulares. Lawrence y cols. (1991) observaron la redistribución espacial, después de la formación de microcolonias, para producir una estructura de biofilm maduro, mediante microscopía láser confocal.

La formación del biofilm es un proceso dinámico y se muestra envuelto en varias etapas (Figura 1). Disposición de la superficie, adhesión celular, formación de microcolonias, producción de EPS y formación del biofilm, por último separación y dispersión del biofilm (Kumar y Anand, 1998).

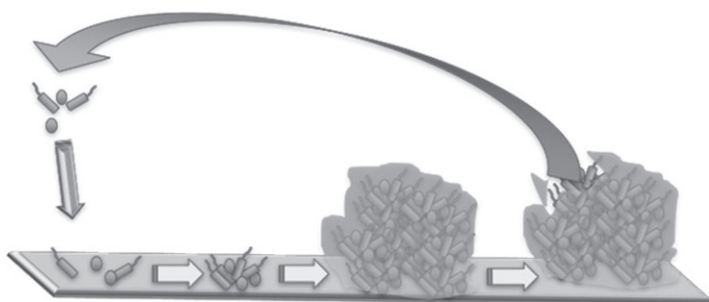


Figura 1 / *Figure 1: Formación, maduración y disgregación de un biofilm.*
Formation, maturation and disintegration of a biofilm.

En cuanto se forma la película de células sobre la superficie, se inicia la producción de EPS. La composición general de la EPS bacteriana comprende polisacáridos y proteínas; que representan del 75-89% de la composición y, en menor cantidad, ácidos nucleicos, lípidos, fosfolípidos y sustancias húmicas (Simões y cols., 2010). Los EPS ayudan al anclaje de las células a la superficie y estabiliza la colonia de las fluctuaciones del medioambiente (Characklis y Marshall, 1990).

Algunos de los factores que afectan al desarrollo del biofilm, incluido las propiedades de la superficie y de la interfase, son (Chmielewski y Frank, 2003):

- La disponibilidad de nutrientes.
- La composición de la comunidad microbiana.
- La disponibilidad de agua.
- La interacción interespecífica.
- El transporte celular.

A medida que madura el biofilm, se adapta a los nutrientes, oxígeno y cambios poblacionales y forma 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 (Bishop, 1997). Las bacterias metabólicamente más activas permanecen en la superficie de las capas de la matriz del biofilm, cerca de los canales de agua (Zhang, y Bishop, 1994). 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 (Bryers, 1987; Davey y O'Toole, 2000).

Las capas de un biofilm se pueden despegar, separar y romper. Cuando el biofilm madura, engruesa, creando unas condiciones anaeróbicas en el interior. Bryers (1987) sugirió que las condiciones anaeróbicas dan lugar a un incremento del ácido y acumulación de gas insoluble, que debilita la estructura del biofilm, causando la separación de las capas poliméricas de la superficie que los soporta.

Cuando los biofilms han alcanzado una estructura altamente organizada y se encuentran unas condiciones ambientales concretas, con la presencia de sustancias químicas en el medio circundante y alteraciones de las propiedades de los propios biofilms o del sustrato, las bacterias se desprenden de la matriz y entran en el flujo de corriente. El desprendimiento es un proceso discreto, por lo que ocurre una separación periódica de partículas relativamente grandes de biomasa (células y nutrientes). Posteriormente vuelve a comenzar el proceso de desarrollo del biofilm en un lugar diferente (Kumar y Anand, 1998; Simões y cols., 2010).

Los biofilms son necesarios para permitir a la bacteria persistir y resistir las condiciones adversas del medio, mientras que el modo de crecimiento planctónico es importante para la propagación de bacterias. Los biofilms bacterianos infecciosos son particularmente problemáticos, debido a que las bacterias sésiles pueden soportar la respuesta inmune del hospedador y son drásticamente más resistentes a los antibióticos, biocidas y las fuerzas hidrodinámicas de cizallamiento que su contraparte, las células planctónicas (Glinel, 2012).

En los ambientes de procesado de alimentos los microorganismos tienden a adherirse a superficies, en condiciones de humedad, temperatura y nutrientes, favoreciendo la colonización, crecimiento y formación de una matriz polimérica denominada biofilm (Carpertier y Cerf, 1993; Maukonen y cols., 2003). Tales biofilms son una fuente potencialmente continua de contaminación para los alimentos que entran en contacto con las superficies contaminadas, causando enfermedades asociadas a los alimentos o el deterioro del mismo. La higiene de las superficies, por lo tanto, afecta la calidad e inocuidad del producto alimenticio. (Gibson y cols., 1999; Sinde y Carballo, 2000; Joseph y cols., 2001).

ELIMINACIÓN DE BIOFILMS:

Una incorrecta desinfección permite el crecimiento de biofilms en los entornos de procesado, lo que proporciona una mayor oportunidad para la contaminación microbiana al producto procesado. Esto incrementa el riesgo de reducir la vida comercial y de transmisión de enfermedades (Frank y Koffi, 1990; McCarthy, 1992; Wong y Ronner, 1993).

Además muchos desinfectantes se inactivan con facilidad en presencia de materia orgánica, por ello la existencia de suciedad y biofilm puede significar la reducción de su efectividad (Chmielewski y Frank, 2003).

La formación de biofilms en medioambientes de procesos de alimentos es de especial importancia, ya que tienen la capacidad para actuar como fuentes persistentes de contaminación microbiana, que pueden conducir a la alteración del alimento y/o a la transmisión de enfermedades (Van Houdt y Michiels, 2010).

La formación de biofilms en los equipos industriales, por ejemplo en la industria láctea, pueden liderar serios problemas de higiene y pérdidas económicas, ya que los microorganismos en biofilm catalizan reacciones químicas y biológicas, causando corrosión en las tuberías y tanques de almacenamiento metálicos. Al mismo tiempo pueden reducir la eficacia de transferencia de calor y aumentar la resistencia en los fluidos (Vieira y cols., 1993; Blaschek y cols., 2007).

Los biofilms son particularmente difíciles de erradicar, debido a la adhesión del microorganismo a la superficie. La formación y resistencia del biofilm se ven influenciadas por varios factores relacionados con las características estructurales y fisiológicas de la célula, la naturaleza y temperatura de los fluidos en los cuales se encuentra suspendida y las propiedades físicas y químicas de la materia en contacto,

tales como geometría, porosidad, rugosidad, composición e hidrofobicidad, temperatura y tiempo de adhesión (Foschino y cols., 2003). Los biofilms son drásticamente más resistentes a los antibióticos, biocidas y las fuerzas hidrodinámicas de cizallamiento (Glinel, 2012), incluso pueden persistir a las prácticas de higiene rutinarias, si estas no se realizan correctamente.

PREVENCIÓN DE FORMACIÓN DE BIOFILMS:

La tendencia de las superficies a facilitar la retención de microorganismos es indeseable porque su presencia supone una biotransferencia potencial. Esta hace relación a la habilidad de ser transferidas desde un sustrato inerte a otro tipo de sustrato, cuyo resultado podría dar lugar a la multiplicación y contaminación de la superficie implicada (Verran, 2002).

Las superficies con muchos defectos de dimensión y distribución (perforaciones, pozos, grietas, soldaduras, articulaciones, uniones o poros) poseen poca facilidad de limpieza, convirtiéndolos en más propensos a permanecer con suciedad y, por ende, un reservorio de microorganismos, debido a la cantidad de sitios de retención (Taylor y cols., 1998). Varios factores muestran la influencia de la retención de microorganismos sobre superficies orgánicas e inorgánicas: topografía (Verran y cols., 2010; Whitehead y Verran, 2006), presencia de varios residuos de alimento y química general de la superficie (Bernbom y cols., 2009; Whitehead y cols., 2006; Verran y cols., 2010b), el tipo de material involucrado (Teixeira y cols., 2008) y las propiedades de la superficie del microorganismo involucrado (Liu y cols., 2007).

Si las superficies alimentarias tienen carga negativa, repelen las células microbianas porque su carga neta de superficie celular es negativa (Teixeira y cols., 2005; Jansen y Kohlen, 1995).

Uno de los argumentos decisivos cuando se escogen materiales para líneas de procesamiento o equipos, junto con sus propiedades mecánicas y anticorrosivas, es la de poseer condiciones higiénicas, tales como rugosidad de la superficie, alta limpiabilidad (facilidad de limpieza), desinfectabilidad, humectabilidad (determinada por la hidrofobicidad) y la vulnerabilidad al desgaste. Todo ello influenciará la capacidad de las células para adherirse a una superficie en particular (Van Houdt y Michiels, 2010).

Las superficies comúnmente utilizadas en la industria de alimentos incluyen plástico, caucho, vidrio, cemento y acero inoxidable. De dichos materiales, el acero

inoxidable, es el más ampliamente utilizado (Holah y Thorpe, 1990; Van Houdt y Michiels, 2010).

Las superficies que tienden a facilitar la retención de microorganismos son indeseables, debido a que su presencia, suponen una transferencia potencial desde un sustrato inerte a otro tipo de sustrato, cuyo resultado podría dar lugar a la multiplicación y contaminación de la superficie implicada (Verran, 2002).

Los resultados obtenidos por Scott y Bloomfield (1990 b) y Cogan y cols. (2002) mostraron que la limpieza con productos detergentes con aclarado, producía ninguna o una pequeña reducción en los niveles de contaminación, en superficies textiles, lo que indicaba que los microorganismos estaban fuertemente adheridos a las fibras del tejido. Por el contrario, el hipoclorito y los desinfectantes fenólicos producían una reducción significativa en la contaminación microbiana, si bien el hipoclorito conseguía mejores resultados que los fenólicos. Si además, las ropas contaminadas se almacenan en condiciones húmedas durante toda una noche, las células se adhieren aún con más fuerza. Para prendas almacenadas toda la noche, incluso donde se había lavado y aclarado, se encontró que el 40% de ellas estaban contaminadas con recuentos superiores a 100 ufc/cm² (Cogan y cols., 2002). Por ello, las telas guardadas durante toda la noche frente a otras lavadas inmediatamente después de ser utilizadas, la limpieza con detergente, con o sin aclarado, fue significativamente menos efectiva ($p < 0.05$) para reducir tanto el recuento de totales como el de *Salmonella*, aunque la limpieza con aclarado produce una mayor reducción tanto el recuento de totales como el de *Salmonella* comparado con el método de lavado sin aclarado (Cogan y cols., 2002).

Stevens y Holah (1993) demostraron que las bacterias estaban retenidas en las imperfecciones de las superficies. Por ello las superficies más dañadas retenían mayor número de bacterias.

Boyd y cols. (2001) demostraron que los niveles de higiene de las superficies de contacto pueden verse disminuidos con el uso, ya que puede provocar que la superficie se deteriore y los defectos de la superficie pueden actuar como sitios de retención de microorganismos y materia orgánica. Además, una vez allí, algunos microorganismos en los biofilms catalizan reacciones químicas y biológicas, causando corrosión del metal (Mittelman, 1998).

Las superficies, para su limpieza, deben ser accesibles, planas, lisas y duras. El desgaste normal de las superficies alimentarias es inevitable, por lo tanto es necesario elegir una apropiada limpieza y desinfección para eliminar microorganismos y suciedad de las superficies en un determinado entorno industrial (Flint y cols.,

1997). Para evaluar la naturaleza higiénica de una superficie, se utiliza el valor de la rugosidad media (R_a). Se trata de un parámetro estadístico que describe el promedio de las ondulaciones con respecto a un eje central (Verran y cols., 2001; Whitehead y Verran, 2006). Parece por tanto obvio que la topografía juegue un papel importante en la limpiabilidad de las superficies, incluso en la adhesión bacteriana mediante los sitios de protección que alojaría los microorganismos, evitando el estrés por cizallamiento (Jullien y cols., 2003; Jones, 2009). Sin embargo, algunos estudios (Barnes y cols., 1999; Hüsmark y Rönner, 1993) han fracasado en demostrar la relación entre los valores de R_a y la adherencia bacteriana y/o la facilidad de limpieza de la superficie.

Dentro de la industria de alimentos, el valor de R_a debe ser inferior de $0,8 \mu\text{m}$ (Flint y cols., 1997) y se utiliza para denotar una superficie higiénica. El desgaste y la abrasión pueden afectar el valor de la R_a de manera impredecible. Es importante entonces eliminar la suciedad de las superficies alimentarias, garantizando procesos eficaces de limpieza (Anónimo, 2010).

Las propiedades de las superficies alimentarias han sido tenidas en cuenta por las autoridades legisladoras en cuanto a la determinación de las especificaciones de topografía de la superficie. Por ello, cada país desarrolla y aplica su normativa. Por ejemplo, el "Standard US 3-A Sanitary Standard 01-07" (1990) de los EE.UU. especifica que las superficies que entran en contacto directo con los alimentos requieren un grado de acabado n° 4, con un valor de R_a inferior de $0,8 \mu\text{m}$, y deben estar libre de grietas y hendiduras (Frantsen y Mathiesen, 2009)

La influencia de la humectabilidad de la superficie sobre la higiene puede variar dependiendo de las cepas microbianas, sustratos y medios de suspensión (Hüsmark y Rönner, 1990; Flint y cols., 1997). La medida del ángulo de contacto, utilizando agua desionizada, es un método para definir la hidrofiliidad o hidrofobicidad de un material, también denominado humectabilidad (**Figura 2**).

Para determinar el ángulo de contacto de una gota de agua sobre una superficie se utilizan equipos de análisis de imagen, los cuales dejan caer una microgota desde una jeringa automática hacia la superficie de estudio, mientras tanto una cámara captura imágenes fijas o en movimiento, de dicha gota, y mediante un software analiza las características de la imagen, resultando en la medida del ángulo de contacto.

Las superficies sobre las cuales se deja caer una gota de agua y esta muestra ángulo de contacto cerca de los 90° son definidas como hidrofóbicas (**Figura 3A**), mientras que aquellas con bajo ángulo de contacto se describen como hidrofílicas (**Figura 3B**). Si el ángulo de contacto está cerca de 150° , la superficie demostrará

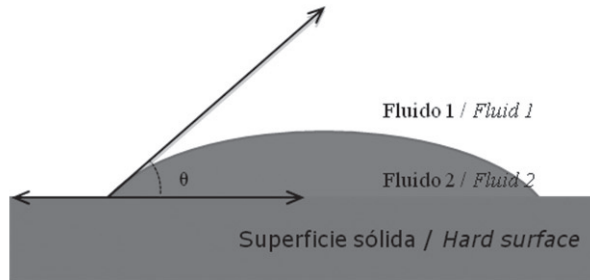


Figura 2 / *Figure 2*: Indica un ambiente en el cual una gota de un Fluido 2 (agua) está en contacto con una Superficie sólida, todo inmerso en un Fluido 1 (aire) . En este sistema el ángulo de contacto se denota con la letra griega θ , que está dado por el fluido 2 con respecto a la superficie sólida (Modificado de Neira y cols., 2007). *Indicates an environment in which a drop of Fluid 2 (water) is in contact with, all immersed in a fluid 1 (air) solid surface. In this system the contact angle is denoted by the greek letter θ , which is given by the fluid 2 relative to the solid surface (Modified Neira et al., 2007).*

características de superhidrofobicidad, comúnmente se conoce como efecto lotus. El caso opuesto también puede ocurrir cuando se observa que casi no hay ángulo de contacto, y tales superficies de los materiales son definidas como superhidrofílicas (Wang y Jiang, 2007).

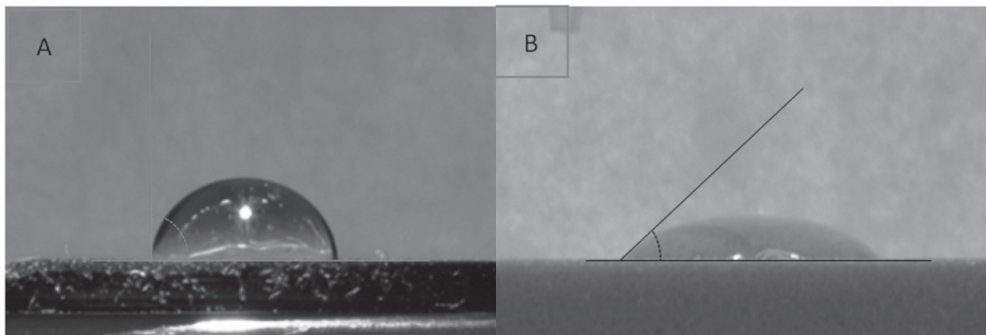


Figura 3 / *Figure 3*: Ángulo de contacto sobre diferentes superficies. 3A) superficie de silicón catalogada como hidrofóbica. 3B) superficie dura de poliéster catalogada como hidrofílica. *Contact angle on different surfaces. 3A) silicone surface classified as hydrophobic. 3B) hard surface classified as hydrophilic polyester.*

Otro parámetro a tener en cuenta son las energías libres superficiales. Son muchos los estudios que han tratado este tema y la relación que implican estas energías respecto a la condición higiénica de las superficies (Jullien y cols., 2003). Por último, otra de las características relevantes de las superficies, en contacto directo con pro-

ductos alimenticios, es la presencia de una película que mejora las propiedades de la superficie y, en consecuencia, afecta la adhesión bacteriana (Hüsmark y Rönner, 1990; Mettler y Carpentier, 1998).

CONCLUSIÓN

La adhesión de bacterias patógenas a superficies que contactan con alimentos supone un serio riesgo para la salud. La formación de biofilms y el subsiguiente desprendimiento de los mismos sobre alimentos, puede suponer una importante fuente de contaminación en alimentos y provocar importantes brotes de enfermedades transmitidas por alimentos (Frank y Koffi, 1990).

Algunos estudios han observado que los EPS proporcionan protección contra las condiciones adversas que pueden existir sobre los microorganismos del biofilm, mediante la concentración de nutrientes, previniendo el acceso de biocidas y la desecación, secuestrando metales y toxinas. Todo esto dificulta su movilización, requiriendo la aplicación de fuerzas como lavados, raspados sobre la superficie o la ruptura química de las fuerzas de fijación, a través de la aplicación de enzimas, detergentes, surfactantes, desinfectantes y calor (Carpentier y Cerf, 1993; Sauer, 2003; Van Houdt y Michiels, 2010; Simões y cols., 2010).

Las Buenas Prácticas de Fabricación (BPF) y el sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) se han establecido para controlar la calidad y seguridad alimentaria. Sin embargo, los biofilms microbianos no han sido específicamente destacados en el sistema APPCC. Por lo tanto, la topografía y características de los biofilms en los ambientes de procesado de alimentos y el desarrollo de un plan de saneamiento, debe ser considerado como pre-requisito en el sistema APPCC. Así, al mantener un sistema APPCC actualizado, con la evaluación de biofilms en las plantas de alimentos, se proporcionará una información más clara de la contaminación y ayudará en el desarrollo de sistemas de procesado libres de biofilms en la industria de los alimentos (Shi y Zhu, 2009).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha estado financiado por el proyecto RTA2014-00045-C03-03 (INIA), Ministerio de Economía y Competitividad del Reino de España.

BIBLIOGRAFÍA

- Ak, N. O., Cliver, D. O., & Kasparl, C. W. (1994). Decontamination of Plastic and Wooden Cutting Boards for Kitchen Use. *Journal of Food Production*, 57(1), 23–30.
- Anónimo. (2010). Factors affecting fouling and cleanability of open food contact surfaces. A report on findings from the EU Integrated Project Pathogen Combat.
- Arenas, G. N., & M, L. A. C. (2007, julio). Procedimiento para medir ángulos de contacto en sólidos particulados finos. *Scientia et Technica*.
- Barnes, L. M., Lo, M. F., Adams, M. R., & Chamberlain, A. H. (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 65(10), 4543–8.
- Bernbom, N., Ng, Y. Y., Jørgensen, R. L., Arpanaei, A., Meyer, R. L., Kingshott, P., ... Gram, L. (2009). Adhesion of food-borne bacteria to stainless steel is reduced by food conditioning films. *Journal of Applied Microbiology*, 106(4), 1268–1279.
- Bishop, P. L. (1997). Biofilm structure and kinetics. *Water Science and Technology*, 36(1), 287–294.
- Blaschek, H. P., Wang, H. H., & Agle, M. E. (2007). *Biofilms in the Food Environment*. Biofilms in the Food Environment. Blackwell Publishing Ltd.
- Boer, E. de (Inspectorate for H. P. Z. T. N., & Hahne, M. (1990). Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. *Nutrition Week (USA)*.
- Bower, C. K., McGuire, J., & Daeschel, M. A. (1996). The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends in Food Science & Technology*, 7(5), 152–157.
- Boyd, R. D., Cole, D., Rowe, D., Verran, J., Paul, A. J., & West, R. H. (2001). Cleanability of soiled stainless steel as studied by atomic force microscopy and time of flight secondary ion mass spectrometry. *J. Food Prot.*, 64(1), 87–93.
- Bryers, J. D. (1987). Biologically Active Surfaces: Processes Governing the Formation and Persistence of Biofilms. *Biotechnology Progress*, 3(2), 57–68.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *The Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 499–511.
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012, marzo). Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*.
- Cogan, T. A., Bloomfield, S. F., & Humphrey, T. J. (1999). The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. *Letters in Applied Microbiology*, 29(5), 354–358.
- Cogan, T. A., Slader, J., Bloomfield, S. F., & Humphrey, T. J. (2002). Achieving hygiene in the domestic kitchen: the effectiveness of commonly used cleaning procedures. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 885–892.
- Characklis and all. (1990). Biofilms : basis for an interdisciplinary approach. In W.G. Characklis and K.C. Marshall (ed.), *Biofilms*. Wiley New York., 3–15.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22–32.
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867.
- De Cesare, A., Sheldon, B. W., Smith, K. S., & Jaykus, L.-A. (2003). Survival and persistence of *Campylobacter* and *Salmonella* species under various organic loads on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 66(9), 1587–1594.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.

- EFSA. (2012). European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union \rSummary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10, 442.
- Flint, S. H., Bremer, P. J., & Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant□description, current concerns and methods of control. *Biofouling*, 11(1), 81–97.
- Foschino, R., Picozzi, C., Civardi, A., Bandini, M., & Faroldi, P. (2003). Comparison of surface sampling methods and cleanability assessment of stainless steel surfaces subjected or not to shot peening. *Journal of Food Engineering*, 60(4), 375–381.
- Frank, J. F., & Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal Of Food Protection*, 53(7), 550–554.
- Frantsen, J. E., & Mathiesen, T. (2009). Specifying stainless steel surfaces for the brewery, dairy and pharmaceutical sectors. *NACE - International Corrosion Conference Series*.
- Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E., & Holah, J. T. (1999). Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 41–48.
- Gilbert, P., Evans, D. J., Evans, E., Duguid, I. G., & Brown, M. R. (1991). Surface characteristics and adhesion of *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 71(1), 72–77.
- Glinel, K., Thebault, P., Humblot, V., Pradier, C. M., & Jouenne, T. (2012, mayo). Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches. *Acta Biomaterialia*.
- Holah, J. T. (1995). Disinfection of food production areas. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 14(2), 343–363.
- Holah, J. T., & Thorpe, R. H. (1990). Cleanability in relation to bacterial retention on unused and abraded domestic sink materials. *The Journal of applied bacteriology*, 69(1980), 599–608.
- Hood, S. K., & Zottola, E. A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2–3), 145–153.
- Humphrey, T. J., Martin, K. W., & Whitehead, A. (1994). Contamination of hands and work surfaces with *Salmonella enteritidis* PT4 during the preparation of egg dishes. *Epidemiology and Infection*, 113(3), 403–409.
- Husmark, U., & Rönner, U. (1990). Forces involved in adhesion of *Bacillus cereus* spores to solid surfaces under different environmental conditions. *The Journal of applied bacteriology*, 69(4), 557–562.
- Husmark, U., & Rönner, U. (1993). Adhesion of *Bacillus cereus* spores to different solid surfaces: Cleaned or conditioned with various food agents. *Biofouling: The journal of Bioadhesion and Biofilm research*, 7(1), 57–65.
- Jansen, B., & Kohnen, W. (1995). Prevention of biofilm formation by polymer modification. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(4), 391–396.
- Jones, A. (2009). Choosing antimicrobial additives for plastics. *Plastics, Additives and Compounding*, 11(4), 26–28.
- Joseph, B., Otta, S. K., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 64(3), 367–372.
- Jullien, C., Bénézech, T., Carpentier, B., Leuret, V., & Faille, C. (2003). Identification of surface characteristics relevant to the hygienic status of stainless steel for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 56(1), 77–87.
- Kassa, H., Harrington, B., Bisesi, M., & Khuder, S. (2001). Comparisons of microbiological evaluations of selected kitchen areas with visual inspections for preventing potential risk of foodborne outbreaks in food service operations. *Journal of Food Protection*, 64(4), 509–513.

- Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2), 9–27.
- 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.
- Liu, Y., Li, J., Qiu, X., & Burda, C. (2007). Bactericidal activity of nitrogen-doped metal oxide nanocatalysts and the influence of bacterial extracellular polymeric substances (EPS). *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 190(1), 94–100.
- Marshall, K. C., Stout, R., & Mitchell, R. (1971). Mechanism of the Initial Events in the Sorption of Marine Bacteria to Surfaces. *Journal of General Microbiology*, 68(3), 337–348.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003, junio 1). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: A review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*.
- McCarthy, S. A. (1992). Attachment of *Listeria monocytogenes* to chitin and resistance to biocides. *Food technology*, 46(12), 84–87.
- McEldowney, S., & Fletcher, M. (1987). Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surfaces. *Archives of Microbiology*, 148(1), 57–62.
- Mettler, E., & Carpentier, B. (1998). Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. *Journal of Food Protection*, 61(1), 57–65.
- Mittelman, M. W. (1998). Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2760–2764.
- Mossel, D.A.A., Corry, C.B., Struijk, C.B. y Baird, R. M. (1995). *Major taxonomic characteristics*. (J. W. and Sons, Ed.) (1st ed.). New York.
- Olsen, S. J., MacKinnon, L. C., Goulding, J. S., Bean, N. H., & Slutsker, L. (2000). Surveillance for foodborne-disease outbreaks--United States, 1993-1997. *MMWR. CDC Surveillance Summaries : Morbidity and Mortality Weekly Report. CDC Surveillance Summaries / Centers for Disease Control*, 49(1), 1–62.
- Reij, M. W., & Den Aantrekker, E. D. (2004, febrero 15). Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*.
- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation. *Genome biology*, 4(6), 219.
- Scott, E., & Bloomfield, S. F. (1990). The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. *The Journal of applied bacteriology*, 68(3), 271–278.
- Scott, E., Bloomfield, S. F., & Barlow, C. G. (1982). An investigation of microbial contamination in the home. *The Journal of Hygiene*, 89(2), 279–293.
- Scott, E., & Bloomfield, S. F. (1993). An in-use study of the relationship between bacterial contamination of food preparation surfaces and cleaning cloths. *Letters in Applied Microbiology*, 16(3), 173–177.
- Schmidt, K. (2001). *WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe : seventh report, 1993-1998*. Berlin: Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine ;FAO/WHO Collaborating Centre for Research and Training in Food Hygiene and Zoonoses.
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407–413.
- Simões, M., Simões, L. C., & Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17(4), 439–447.

- Smoot, L. M., & Pierson, M. D. (1998). Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* Scott A to attach to food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1293–1298.
- Smoot, L. M., & Pierson, M. D. (1998). Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to Buna-N rubber and stainless steel. *Journal of Food Protection*, 61(10), 1286–1292.
- Stevens, R. A., & Holah, J. (1993). The effect of wiping and spray-wash temperature on bacterial retention on abraded domestic sink surfaces. *J. Appl. Bacteriol.*, 75(sink 9), 91–94.
- Sutherland, I. W. (1983). Microbial exopolysaccharides -- their role in microbial adhesion in aqueous systems. *Critical Reviews in Microbiology*, 10(2), 173–201.
- Taylor, R., Maryan, C., & Verran, J. (1998). Retention of oral microorganisms on cobalt-chromium alloy and dental acrylic resin with different surface finishes. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 80(5), 592–597.
- Teixeira, P., Lima, J., Azeredo, J., & Oliveira, R. (2008). Adhesion of *Listeria monocytogenes* to materials commonly found in domestic kitchens. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(7), 1239–1244.
- Teixeira, P., Lopes, Z., Azeredo, J., Oliveira, R., & Vieira, M. J. (2005). Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. *Food Microbiology*, 22(2–3), 247–251.
- Thomas, J. G., & Nakaishi, L. A. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *Journal of the American Dental Association (1939)*, 137 Suppl, 10S–15S.
- Todd, E. C. D., Michaels, B. S., Greig, J. D., Smith, D., Holah, J., & Bartleson, C. A. (2010). Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 7. Barriers to reduce contamination of food by workers. *Journal of Food Protection*, 73(8), 1552–1565.
- Trachoo Nathanon. (2003). Biofilms and the food industry. *Journal Science Technology*, 25, 807–815.
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2010, octubre). Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*.
- Verran, J. (2002). Biofouling in Food Processing: Biofilm or Biotransfer Potential? *Food and Bioproducts Processing*, 80(4), 292–298.
- Verran, J., & Boyd, R. D. (2001). The relationship between substratum surface roughness and microbiological and organic soiling: A review. *Biofouling*, 17(1), 59–71.
- Verran, J., Packer, A., Kelly, P., & Whitehead, K. A. (2010). The retention of bacteria on hygienic surfaces presenting scratches of microbial dimensions. *Letters in Applied Microbiology*, 50(3), 258–263.
- Verran, J., Packer, A., Kelly, P., & Whitehead, K. A. (2010). Titanium-coating of stainless steel as an aid to improved cleanability. *International Journal of Food Microbiology*, 141 Suppl, S134–9.
- Vieira, M. J., Melo, L. F., & Pinheiro, M. M. (1993). Biofilm formation: Hydrodynamic effects on internal diffusion and structure. *Biofouling*, 7(1), 67–80.
- Wang, S., & Jiang, L. (2007). Definition of Superhydrophobic States. *Advanced Materials*, 19(21), 3423–3424.
- Whitehead, K. A., & Verran, J. (2006). The Effect of Surface Topography on the Retention of Microorganisms. *Food and Bioproducts Processing*, 84(4), 253–259.
- Whitehead, K. A., Rogers, D., Colligon, J., Wright, C., & Verran, J. (2006). Use of the atomic force microscope to determine the effect of substratum surface topography on the ease of bacterial removal. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 51(1), 44–53.
- WHO. (2006). The global burden of foodborne diseases : taking stock and charting the way forward. WHO.
- WHO. (2007). Food safety and foodborne illness. WHO, 237.

- Wong, A. C., & Ronner, A. B. (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber. *Journal of food protection*, 56(9), 750–758.
- Zeitoun, A. A. M., Debevere, J. M., & Mossel, D. A. A. (1994). Significance of Enterobacteriaceae as index organisms for hygiene on fresh untreated poultry, poultry treated with lactic acid and poultry stored in a modified atmosphere. *Food Microbiology*, 11(2), 169–176.
- Zhang, T. C., & Bishop, P. L. (1994). Structure, Activity and Composition of Biofilms. *Water Science and Technology*, 29(7), 335–344.