



## Biofilms en la industria cárnica bovina. El caso de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga – STEC

Estas comunidades bacterianas pueden tener un gran impacto en la inocuidad de los alimentos y en la salud pública

Rodríguez, R., Frizzo, L.S. y Martínez Espinosa, E.L.

En esta sección se va a considerar a *Escherichia coli* productor de toxina Shiga como un caso paradigmático de organismo formador de biofilm en la industria cárnica. Se analizan sus atributos relevantes, algunos aspectos de su biología molecular, los factores que afectan la transferencia de esos organismos desde las superficies de contacto a los productos cárnicos, la tolerancia a los sanitizantes, así como evidencias que sugieren la posible participación de los biofilms de STEC en lo que se ha dado en llamar “períodos de alto nivel de contaminación” en la carne bovina.

En la industria de la carne en general, y la bovina en particular, esta temática es una preocupación relevante porque los organismos patógenos de transmisión alimentaria pueden formar biofilms en áreas de las plantas cárnicas que son difíciles de sanitizar adecuadamente. Como se ha mencionado, las bacterias en los biofilms son más tolerantes a la desinfección que las bacterias individuales. Por otra parte, está demostrado que en su estado natural los

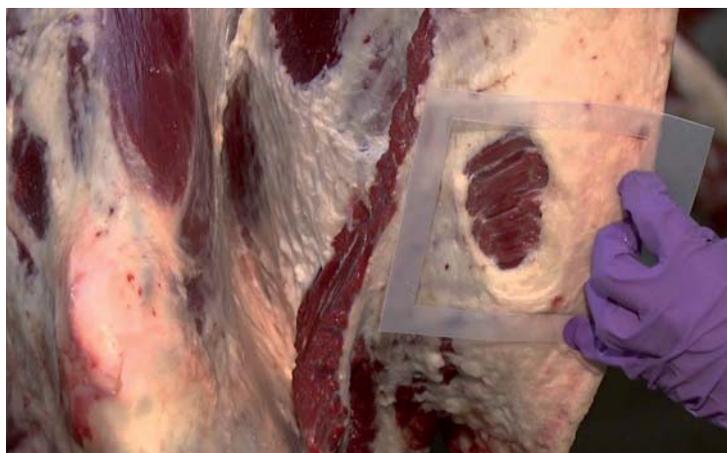
## INOCUIDAD

biofilms consisten en múltiples especies bacterianas y que las complejas interacciones dentro de esa comunidad influyen significativamente en su capacidad para tolerar la sanitización. Esas comunidades bacterianas unidas a las superficies tienen potencialmente un tremendo impacto en la seguridad alimentaria y en la salud pública.

Las cepas patógenas de *E. coli* se dividen de acuerdo con los síntomas clínicos y los mecanismos de patogénesis en varios grupos (patotipos), los cuales varían en sus períodos de incubación y en la duración de la enfermedad que producen. Hay cinco patotipos característicos, ETEC (Enterotoxigénico), EPEC (Enteropatógeno), EIEC (Enteroinvasivo), EGgEC o EAEC (Enteroagregativo) y EHEC (Enterohemorrágico), dentro de este último se hallan los *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC). La presencia de STEC en las plantas procesadoras de carne y de alimentos ha sido bien documentada y se ha sugerido que la capacidad para formar biofilms en diferentes superficies es responsable de la distribución y persistencia de STEC en dichos establecimientos. Cabe señalar que la formación de biofilms en STEC depende de la cepa y los factores asociados no son necesariamente representativos de todos los biofilms de STEC. Veremos, sin embargo, algunos atributos y mediadores destacados en este proceso. Los aspectos generales de la arquitectura, comunicación, heterogeneidad fisiológica y estructural de los biofilms, por otro lado, se describen en la sección inicial de este artículo.

La motilidad impulsada por flagelos se considera un factor importante durante el paso inicial de la formación de biofilms por *E. coli*, porque las cepas que carecen de flagelos no producen biofilms. Además, se ha sugerido que la motilidad impulsada por flagelos también está involucrada en la formación de biofilms de STEC no O157: H7.

Factores importantes para la maduración de los biofilms son los autotransportadores, proteínas específicas que participan en la secreción de polisacáridos aumentando su resistencia. Las adhesinas de autotransportador son miembros del sistema de secreción de tipo V, que se han asociado con la autoagregación y la formación de biofilms. En las cepas STEC se han identificado nueve genes de auto-

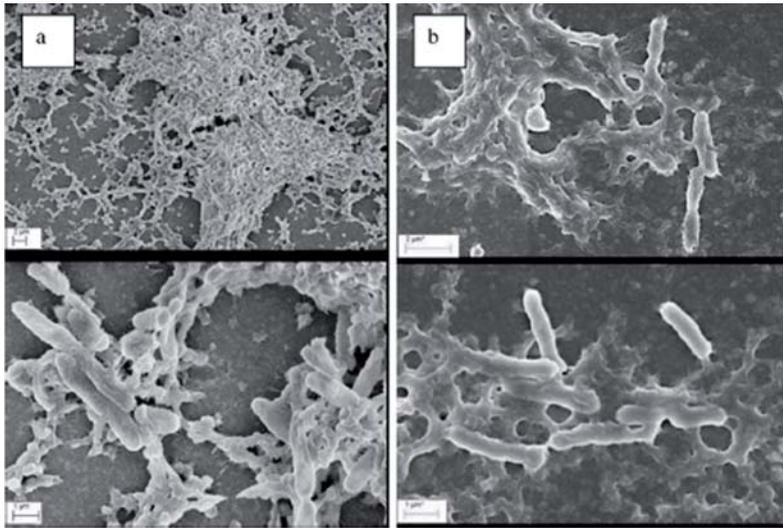


transportadores codificados por cromosomas y por plásmidos. Los productos proteicos o adhesinas de cada uno de estos genes se han asociado con la formación de biofilms. En STEC se ha encontrado que la presencia de los genes autotransportadores dentro del genoma es variable entre los diferentes serotipos. La matriz del biofilm de *E. coli* puede estar compuesta de tres EPS diferentes: poli-N-acetil glucosamina, ácido colánico y/o celulosa. Los genes que codifican las proteínas que participan en la síntesis de estos polisacáridos están presentes en los genomas de las cepas STEC. El plásmido de O157 que codifica para la enterohemolisina tiene un mediador que lo hace también para la formación de biofilm, indicando que es esencial para el desarrollo de esta comunidad en el serotipo.

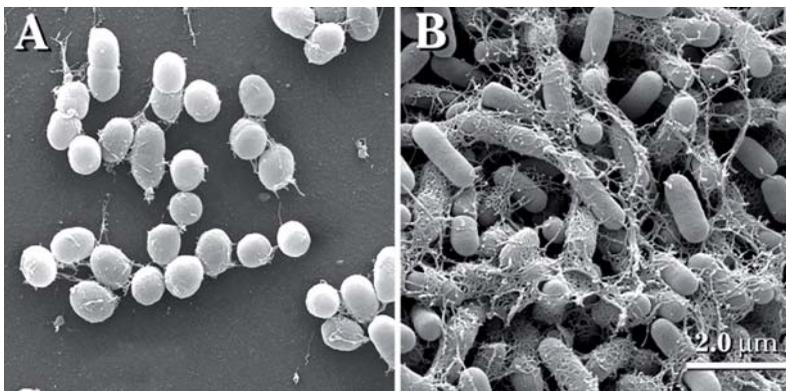
Un factor muy importante para la maduración de los biofilms lo constituye también el quorum sensing (QS). Durante los diferentes pasos de la formación de biofilms, la densidad de población de células bacterianas fluctúa y la expresión génica varía. Para coordinar la expresión génica, las bacterias se comunican mediante sistemas de QS. Los sistemas QS se basan en la secreción y/o reconocimiento de moléculas de señal llamadas autoinductores (AI). Se han identificado tres tipos de IA: AI-1, AI-2 y AI-3. Tanto AI-2 como AI-3 son producidas, secretadas y reconocidas por cepas de *E. coli*, incluidos los STEC.

El paso final en el desarrollo de los biofilms es el desprendimiento de las bacterias desde su comunidad y su dispersión, lo que contribuye a la transmisión en el medioambiente circundante. La dispersión es un proceso complejo que involucra varias señales y

**Figura 13** - Biofilm de cinco días de *E. coli* O157:H7 a 15°C, microfotografía SEM. (a) sobre acero inoxidable en medio mínimo y (b) sobre poliuretano en exudado de carne (Tomado de Marouani-Gadri, *et al.*, 2009).



**Figura 14** - Microfotografía SEM de biofilm de *E. coli* O157:H7 en vidrio, 48h a 28°C. Interfase aire (A), debajo de la interfase aire (B). (Tomado de Uhlich *et al.*, 2006).



efectores ambientales y no todas las especies bacterianas utilizan un mecanismo de dispersión único. Como se describió antes, las bacterias generalmente cambian de un estilo de vida planctónico a “un modo” biofilm al detectar cambios ambientales. La dispersión es el paso menos entendido en la formación del biofilm para todas las especies bacterianas y está escasamente investigado en STEC.

En *E. coli* no STEC, la modulación de estructuras superficiales cruciales, como los pili for-

madores de haces tipo IV, en EPEC (Enteropatógeno), y las fimbrias de adherencia agregada en EAEC (Enteroagregativo), resulta en el desprendimiento de bacterias desde el biofilm y la superficie. Por ejemplo, en EAEC, las fimbrias de adherencia (AAF) cargadas positivamente se extienden lejos de la superficie de la célula bacteriana para mediar la adherencia a la superficie cuando se produce la adhesina dispersina, porque ésta se une y neutraliza la carga de antígeno LPS (lipopolisacárido).

Cuando la dispersina se regula negativamente, los AAF cargados positivamente colapsan en la superficie bacteriana debido a su interacción con LPS cargados negativamente. Como consecuencia de este colapso, los AAF ya no se adhieren a las superficies y esa parte del biofilm se dispersa. Los mecanismos involucrados en el desprendimiento del biofilm despiertan gran interés, porque la comprensión de estos mecanismos podría conducir al desarrollo de herramientas tanto clínicas como industriales para eliminarlos. En la Figura 3 (en la primera sección de este trabajo) se aprecian las diferentes etapas de formación y maduración, incluyendo el desprendimiento de los organismos del biofilm.

Además de desarrollar biofilms en instalaciones y ambientes en la producción primaria del ganado bovino, STEC puede formar biofilms en superficies que muy a menudo se encuentran en las plantas de procesamiento de carne, como acero inoxidable, poliestireno, vidrio, poliuretano y polietileno de alta densidad, entre otras (Figuras 13 y 14).

La introducción de productos o matrices contaminadas en las plantas procesadoras da como resultado la propagación de STEC. En el entorno de una planta de procesamiento, las temperaturas habitualmente se pueden encontrar entre 4 y 15°C. Muchos estudios han demostrado que STEC puede desarrollar biofilm dentro de este rango de temperatura. Por ejemplo, *E. coli* O157:H7 es capaz de colonizar superficies de canales bovinas a 15°C (fuera

## INOCUIDAD

de horarios de producción) y 4°C (en horarios de producción). Curiosamente, la adherencia de *E. coli* O157:H7 aumentó a 4°C con el tiempo, en trabajos experimentales, en presencia de un homogenato de musculo magro. Por otro lado, *E. coli* O157:H7 puede adherirse y producir un biofilm denso en superficies que no son favorables para su unión cuando está presente el colágeno I, que es una proteína de matriz extracelular fibrosa muscular. Además de formar biofilms en homogenatos de carne, STEC también puede formar biofilms en acero inoxidable cuando se cultivan en lisados de vegetales de hojas, tal como espinaca. Las condiciones ambientales, como la temperatura y la presencia de residuos de carne o vegetales, pueden afectar la expresión de genes controlados por QS. Por ejemplo, se demostró que los biofilms de *E. coli* O157:H7 producen grandes cantidades de AI-2 cuando se cultivan en jugo de carne porcina y bovina. Con base en esta evidencia, es posible que QS impulse la formación de biofilms en las plantas de procesamiento de carne.

El uso de desinfectantes químicos a base de compuestos de amonio cuaternario y a base de peroxiacético en biofilms de una semana fue más efectivo a 4°C que a 25°C. Sin embargo, estos desinfectantes comerciales utilizados en las concentraciones recomendadas para inactivar STEC planctónico no pudieron eliminar los biofilms de STEC de las superficies de acero inoxidable.

Por otra parte, la adhesina fimbrial Curli, debido a sus propiedades amiloides, puede proteger a las bacterias de agentes antibacterianos como el cloro o los desinfectantes de amonio cuaternario. Se ha demostrado que la tolerancia de los desinfectantes por STEC en biofilms no depende del serotipo sino de la cepa. También se ha demostrado que al 100% de humedad relativa (HR), los biofilms de *E. coli* O157:H7 eran más resistentes a los desinfectantes que a una HR más baja. Además, los biofilms más extensos fueron más resistentes a los protocolos de limpieza y desinfección y el tratamiento repetido podría dar como resultado la presencia de *E. coli* O157:H7 viable pero no cultivable que pueden, a su vez, regenerarse como un biofilm. En conjunto, estos



datos indican que la eficacia del desinfectante puede estar limitada contra STEC que crece dentro de la comunidad en el biofilm.

La capacidad de secretar EPS está relacionada con la formación de biofilm en superficies de acero inoxidable. La producción de EPS también puede proteger *E. coli* O157:H7 de los tratamientos desinfectantes. Al igual que con la fimbria Curli, la producción de EPS puede no ser esencial para la formación de biofilms en el acero inoxidable por patógenos, incluido STEC. Se ha demostrado que las bacterias que producen poco o ningún EPS, incluido *E. coli* O157:H7, podrían colonizar un biofilm maduro formado por otras bacterias productoras de EPS. Aunque los desinfectantes pueden reducir o eliminar por completo a STEC dentro del biofilm, es posible que la recolonización por STEC u otras bacterias sea más fácil si los protocolos de limpieza no eliminan completamente la matriz de esos biofilms.





Además de la protección que ofrece la matriz del biofilm contra los desinfectantes, está bien establecido que, en general, para *E. coli* las subpoblaciones de crecimiento lento y latentes son altamente tolerantes a los tratamientos antibacterianos. Las células de esta subpoblación se denominan células persistentes tolerantes a múltiples fármacos y son variantes latentes que surgieron de las células regulares. La aparición de células persistentes ocurre con mayor frecuencia dentro de las poblaciones de biofilms que desde las poblaciones planctónicas. Esta variación no heredable podría permitir que STEC sobrevivan al proceso de saneamiento y permanezcan encerradas en la matriz del biofilm. Estas células podrían entonces contribuir al restablecimiento de un biofilm dentro de la planta de procesamiento.

En la industria de la carne, por otro lado, se han determinado “períodos de alto nivel de contaminación” con STEC, que han sido definidos como un período de tiempo durante el cual las plantas comerciales de carne experimentan una tasa de contaminación más alta que lo habitual, por ej. con *Escherichia coli* O157:H7. En cada evento de alta contaminación (EAC), el análisis genético ha mostrado que la mayoría de las cepas de *E. coli* O157: H7 pertenecen a un tipo dominante singular. Las cepas relacionadas con los EAC han mostrado, adicionalmente, una potencia significativamente mayor de formación de biofilms “maduros” después de la incubación durante cuatro a seis días, en condiciones experimentales. Estos biofilms de las cepas provenientes de EAC también exhibieron una resistencia significativamente mayor a la desinfección. Estos datos sugieren que la formación de biofilms y la resistencia a la desinfección podrían tener un papel en la contaminación de la carne en EAC por STEC, lo que resalta la importancia de la desinfección adecuada y completa de las superficies de contacto y el equipo de procesamiento en las plantas de la cadena cárnica. La limpieza minuciosa y frecuente de los residuos de carne y exudados durante la producción y manipulación es fundamental también, de acuerdo con lo descrito sobre la función favorable del jugo de carne en esas comunidades, para reducir la formación de biofilm de STEC, incluso bajo temperaturas de refrigeración.

## DESDE 1922 EN LA INDUSTRIA ARGENTINA

- **Caramelo Líquido Natural**  
Para flanes, postres, comidas agrícolas, helados.
- **Colorante Caramelo Líquido Natural**  
Para heladerías, panaderías, licores, aperitivos, amargos, laboratorios, salsa de soja.
- **Salsas frutilla, chocolate, maracuyá, durazno y caramelo.**

**Productos elaborados con azúcar de 1<sup>ra</sup> calidad. Asesoramiento técnico. Desarrollo de productos. Laboratorio propio.**








[www.bacigalupo.com.ar](http://www.bacigalupo.com.ar) - [alimentos@bacigalupo.com.ar](mailto:alimentos@bacigalupo.com.ar) Tel: (54 11) 41156428/6480 41397834/7835