

Struttura del biofilm e sue implicazioni pratiche

Kemper Srl – Laboratorio R. e S.

La capacità di qualsiasi tipo di superficie di adsorbire sostanze di natura organica e umidità, crea le condizioni necessarie per l'attrazione di diverse classi di microrganismi (spore, batteri, eumiceti e alghe), che vengono stimolate alla costruzione del biofilm.

Nei sistemi composti da serbatoi e tubazioni in cui scorrono o stazionano fluidi come: le soluzioni acquose di diversa composizione, emulsioni oleose, impasti a bassa viscosità, acque reflue o di raffreddamento ecc., il biofilm si sviluppa ad una velocità elevata al punto che, se non viene rimosso periodicamente, si può giungere all'occlusione della condotta e/o alla comparsa di tutta una serie di fenomeni che alterano la buona funzionalità impiantistica.

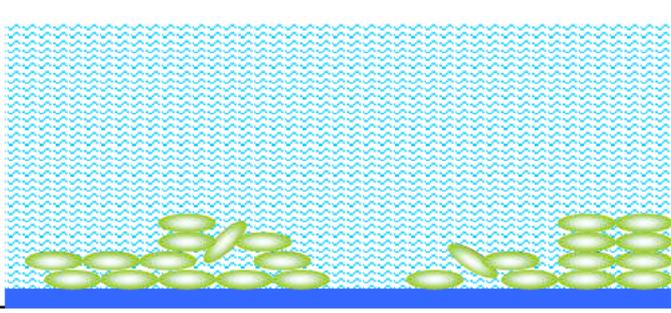
I più noti sono: lo sviluppo di incrostazioni e di punti di corrosione (a carico, ovviamente, delle superfici metalliche), formazione del fouling e riduzione dell'efficienza di scambio termico; dal punto di vista igienico va, invece, evidenziata la possibilità che la complessa struttura del biofilm può 'ospitare' anche ceppi patogeni dei microrganismi (virus compresi) i quali, rimanendo indifferenti all'azione biocida degli agenti antimicrobici, possono in un secondo tempo, far emergere la loro potenziale capacità tossi-infettiva ai danni dell'uomo (ciò vale non solo per il comparto dell'industria alimentare ma anche per quello sanitario).

Se noi immergiamo un vetrino sterile per microscopia in un flusso d'acqua contenente una minima quantità di sostanze nutritive, nell'arco di tempo che va da alcuni giorni fino ad alcune settimane, l'ecosistema microbico svilupperà un consistente complesso di microrganismi immersi in una massa di esopolisaccaridi da essi stessi prodotta (la matrice).

Questo fenomeno non è la risultante di un processo casuale ma, al contrario, lo è di una sequenza ben definita di passaggi che, idealmente, possono essere così descritti (Fig. 1) :

- formazione, nel giro di alcuni minuti e per adsorbimento, di uno strato di sostanze organiche (principalmente polisaccaridi e glicoproteine) che conferiscono nuove proprietà chimico-fisiche alla superficie. Giocano qui un ruolo fondamentale le cariche elettrostatiche superficiali (solitamente positive) e le forze di Van der Waals; con questo nuovo 'rivestimento' aumenta la probabilità di adesione delle cellule dei microrganismi planctonici dove, peraltro, possono essere già state attratte per interazione con la loro carica elettrostatica di superficie (che è negativa). Queste cellule microbiche sono denominate come **colonizzatori primari**.
- Potenziamento delle adesine che conferiscono carattere irreversibile all'aderenza dei batteri alla superficie; da questo momento in poi diventa estremamente difficoltoso tentare di staccarli. Vengono catturate altre cellule microbiche che sono denominate come **colonizzatori secondari**; il tempo necessario per questa fase è di alcuni minuti.
- Il terzo passaggio, che può necessitare di alcune ore fino a qualche giorno, implica lo sviluppo delle popolazioni colonizzatrici adese, grazie alla disponibilità di sostanze nutritive presenti nel precedente strato di sostanze organiche.
- A questo punto, quarta fase, diventa significativa la produzione di esopolisaccaridi che vanno a costituire la matrice del biofilm; la quantità prodotta è pari a un fattore maggiore di 100 rispetto alla massa di cellule batteriche coinvolte nella sua sintesi.
- Le colonie microbiche si organizzano in gruppi, anche eterogenei, chiamati **cell cluster**, che si ripetono più volte lungo tutto il suo spessore, mentre la matrice comincia a formare dei canali

Fig. 1 - FORMAZIONE DEL BIOFILM

TEMPO		DESCRIZIONE DEL FENOMENO		
1	secondi minuti		Attrazione elettrostatica dei colonizzatori primari (con carica negativa), sulle superfici caricate positivamente. Adesione di tipo reversibile.	
	2	minuti		Potenziamento delle adesine ; adesione irreversibile dei batteri sulla superficie. Cattura di altre cellule batteriche (colonizzatori secondari).
	3	ore giorni		Crescita dei batteri.
	4	ore giorni		Formazione della matrice per produzione di esopolisaccaridi; avvio della organizzazione dei cell cluster . Completamento della struttura del biofilm, con formazione dei canali alla base.
	5	giorni mesi		Consolidamento dello sviluppo della matrice, adesione esterna di altri batteri e di particelle di sostanze di varia natura. Aumento dello spessore del biofilm con struttura alveolare.

- interni in modo tale da poter far accedere la soluzione acquosa, con i nutrienti solubili, anche alla sua base. Immagini al microscopio elettronico, hanno potuto evidenziare un'ampia varietà di

forme che risultano dipendenti dalla sua età e dalle condizioni di crescita ma, in ogni caso, la struttura appare sempre eterogenea e fittamente canalizzata.

- L'ultimo passaggio comporta il consolidamento dell'intera struttura del biofilm attraverso la reazione di gelificazione della matrice, la quale gli conferisce una discreta resistenza quando viene esposto alle sollecitazioni meccaniche.
- Contemporaneamente, il suo strato più esterno viene coinvolto in uno scambio ionico con i soluti dello spessore d'acqua adesivo (strato di diffusione) e cattura ulteriori cellule microbiche e particelle insolubili presenti nel volume d'acqua.
- Il tempo necessario va da alcuni giorni fino a qualche mese.

Tutte le specie microbiche che costituiscono i cell cluster, creano delle comunità che cooperano per il mantenimento funzionale dell'intero complesso attraverso lo scambio di molecole organiche derivanti dalla metabolizzazione di sostanze idrosolubili e intrappolate sulla superficie del biofilm.

Un esempio è dato dalla presenza dei batteri cellulolitici i quali, attraverso la degradazione della cellulosa, liberano nel mezzo circostante zuccheri monomeri prontamente utilizzati dai batteri fermentatori che liberano, a loro volta, acidi organici e CO₂.

Questi ultimi costituiscono la fonte di carbonio e di energia per altre specie batteriche quali: i solfito riduttori e i metano batteri.

Oltre allo scambio di metaboliti, si può avere anche quello di materiale genetico che darà come risultato una selezione di popolazioni microbiche meglio adattate per la crescita all'interno del biofilm.

Si creano, quindi, condizioni micro-ambientali di sviluppo decisamente più favorevoli rispetto a quelle esistenti nella massa di liquido planctonico e ciò, lo si può evidenziare attraverso le conte microbiche le quali daranno risultati significativamente diversi tra il prelievo effettuato nel liquido colturale e quello ottenuto per swabbing della superficie del recipiente che lo contiene.

Il ruolo della matrice

La matrice è composta per il 90% del suo peso da acqua e per il resto, come già detto, da polisaccaridi secreti dai microrganismi verso l'esterno della loro cellula.

I monosaccaridi più impiegati (in relazione alle specie coinvolte), sono: il glucosio, il galattosio, il mannosio e lo xilosio.

I gruppi carbossilici liberi presenti nelle catene polisaccaridiche creano una distribuzione di cariche negative in grado di attrarre i cationi bivalenti disponibili nelle soluzioni acquose (solitamente calcio e magnesio), che vengono poi utilizzati per la formazione di legami chimici a ponte tra le catene polimeriche, conferendo caratteristiche di elasticità e di resistenza allo sforzo di taglio generato dal flusso di una massa liquida in movimento.

Tuttavia, in presenza di un biofilm maturo, tale flusso riesce a staccare dei frammenti che, venendo trasportati in altre parti dell'impianto, colonizzeranno le superfici ancora libere estendendo gradualmente l'intero fenomeno (fig. 2).

Tra i gruppi funzionali caricati negativamente e i corrispettivi presenti in soluzione, si attiva anche

uno scambio ionico che genera un flusso di nutrienti che dall'esterno diffonde verso l'interno della biomassa.

Entrambi questi fenomeni sono localizzati tra la superficie limite della matrice e il già citato strato di diffusione che ne è a stretto contatto.

Tra gli anioni scambiati vi possono essere i carbonati e i fosfati che formeranno dei nuclei cristallini dei corrispondenti sali di calcio i quali daranno il via allo sviluppo delle incrostazioni; questo processo è molto più accentuato negli scambiatori di calore dove la resa dello scambio termico viene seriamente compromessa.

La **tabella n°1** evidenzia chiaramente che il biofilm ha

un coefficiente di conducibilità termica inferiore a quello del calcio carbonato puro (un basso valore di questo coefficiente indica una maggiore resistenza nella trasmissione del calore).

Composto	Conducibilità termica (Kcal m ⁻¹ K ⁻¹)
CaCO ₃	2,6
CaSO ₄	2,3
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,6
Fe ₂	2,9
Analcite	1,3
Biofilm	0,6

Tab 1

Fig. 2 - EFFETTI DEL RIVESTIMENTO CON BIOFILM DELLE PARETI METALLICHE DI UN MACCHINARIO

STRUTTURA	FENOMENO	CONSEGUENZA
<p>ZONA AEROBICA</p> <p>ZONA ANAEROBICA</p>	<p>Cessione di particelle di biofilm nel mezzo circostante.</p> <p>Assorbimento dei cationi bivalenti sulla superficie della matrice.</p> <p>Scambio ionico di molecole nutritive con carica negativa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Diffusione in altri luoghi di pezzi di cell cluster in grado di sviluppare nuovo biofilm. ▪ Formazione di nuclei cristallini che danno origine alle incrostazioni. ▪ Arricchimento di sostanze nutritive rispetto al liquido circostante.
	<p>Cell cluster prevalentemente aerobico.</p> <p>Formazione di canali nella matrice.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Aumento dello spessore del biofilm con occlusione delle tubazioni. ▪ Caduta dell'efficienza di scambio termico. ▪ Insediamento di microrganismi patogeni. ▪ Blocco della diffusione e della attività delle molecole dei disinfettanti.
	<p>Cell cluster prevalentemente anaerobico.</p> <p>Formazione di celle elettrolitiche.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Avviamento dei fenomeni di corrosione a carico del metallo.

Certi processi fermentativi, soprattutto se condotti in condizioni di anaerobiosi, portano alla liberazione di acidi organici (acetico, butirrico e citrico) che favoriscono il dissolvimento degli strati protettivi delle superfici metalliche facilitando, di conseguenza, l'innescò dei fenomeni corrosivi a loro carico.

Ad occhio nudo, dopo la rimozione del biofilm, è infatti possibile osservare la comparsa di 'puntature' dovute alla formazione di piccole celle elettrolitiche che hanno eroso la superficie metallica (fig. 2).

Il tentativo di spiegare la capacità del biofilm di disattivare i principi attivi presenti nei disinfettanti, ha portato ad ipotizzare l'esistenza dei seguenti tre meccanismi (fig. 3):

1. Riduzione della concentrazione della sostanza attiva nello strato di diffusione;
2. Impossibilità delle molecole della sostanza attiva di penetrare nello spessore del biofilm;
3. Maturazione di uno stato fisiologico di resistenza di almeno una frazione della popolazione microbica dei **cell cluster**.

Nel primo caso, si verifica un abbassamento della concentrazione del disinfettante presente nello strato di diffusione dovuto al fatto che la matrice è in grado di svolgere delle reazioni chimiche di neutralizzazione.

Si dice, nella fattispecie, che essa esercita una 'domanda chimica di disinfettante'.

Solo se si supera questa soglia è possibile ottenere il ripristino della concentrazione del biocida attivo con conseguente efficacia distruttiva sulla popolazione dei cell cluster.

È ovvio che i microrganismi dispersi nella massa del liquido colturale vengono eliminati ad una velocità molto superiore.

Nella seconda ipotesi, la matrice si comporta come una semplice barriera fisica nei confronti delle molecole del disinfettante anche se ciò è in contraddizione con il fatto che, viceversa, le molecole delle sostanze nutritive riescono ad attraversarla.

Alla luce di questo paradosso, una sua versione più corretta permette di concepire la matrice come una barriera reattiva che implica l'esistenza delle stesse reazioni chimiche di disattivazione citate precedentemente.

Pertanto, utilizzando una lettura in chiave cinetica, possiamo asserire che: la resistenza alla libera permeazione è dovuta alla prevalenza della velocità di disattivazione sulla velocità di diffusione del principio attivo; alcuni dati sperimentali ricavati dallo studio dell'azione dell'ipoclorito di sodio (de Beer et al., 1994; Chen e Stewart, 1996; Xu et al., 1996), danno una conferma in questo senso.

Altri agenti fortemente ossidanti come: acqua ossigenata, acido peracetico e l'ozono mostrano lo stesso tipo di comportamento quando entrano in contatto con la biomassa mentre, quelli che presentano molecole più voluminose (come ad esempio i sali d'ammonio quaternario), incontrano una vera e propria barriera-ostacolo alla loro diffusione.

Per il terzo ed ultimo caso, occorre distinguere, nel biofilm, l'esistenza di due strati di cell cluster: uno più profondo, a stretto contatto con la superficie e uno più superficiale, a stretto contatto con quello di diffusione (questa versione è chiamata ipotesi eterogenea).

La differenza sostanziale tra i due, consiste nel fatto che il secondo si trova, per ovvi motivi, in uno stato di maggiore disponibilità nutrizionale che permette il sostentamento di una buona attività di crescita.

Viceversa nel primo strato, i cell cluster pur essendo vitali, vengono a trovarsi in uno stato di 'non crescita' oppure di crescita molto limitata; se ne deduce che, nello spessore del biofilm, esistono due velocità di crescita il cui valore medio è sempre la metà di quella che caratterizza i microrganismi dispersi nel liquido planctonico o colturale.

I due stati fisiologici in cui vengono a trovarsi le popolazioni microbiche inducono ad una differente sensibilità, e quindi efficacia, nei confronti dell'agente biocida: le cellule in fase di sviluppo vengono uccise, le altre no.

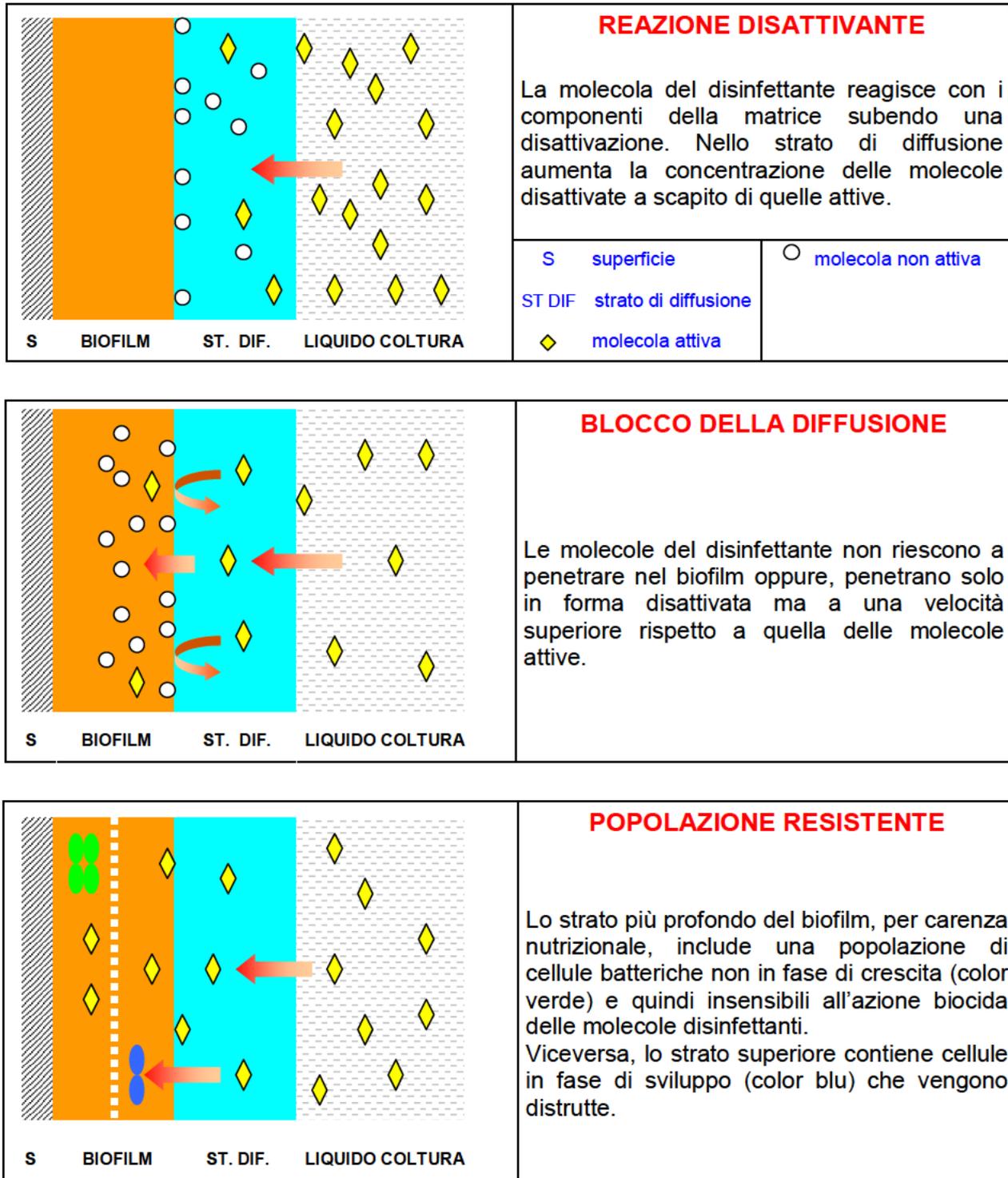
Alcuni autori hanno anche ipotizzato la possibilità dell'insorgenza di una popolazione microbica fenotipica, sempre insensibile ai disinfettanti e che nulla hanno a che vedere con i precedenti stati fisiologici; i fattori predisponenti a tale presenza sono il diretto contatto con la natura chimica delle superfici oppure il raggiungimento di una densità cellulare critica.

Conclusioni

In natura lo sviluppo del biofilm è un fenomeno del tutto normale quanto provvidenziale (nel terreno, ad esempio, è responsabile delle reazioni di biodegradazione delle sostanze inquinanti),

ma negli ambienti dove è richiesto un preciso standard igienico diventa un problema da gestire con attenzione.

Fig.3 - MECCANISMI DI DISATTIVAZIONE DEI DISINFETTANTI



Negli impianti per la lavorazione degli alimenti e delle bevande, la sua distruzione rimane una condizione inderogabile per il mantenimento di un buon stato di efficienza funzionale e dal momento che le strategie preventive non sono ancora ben affinate (1), è evidente che l'esito della 'lotta' dipende dalla bontà dei protocolli di detergenza e sanificazione ambientale.

Tuttavia un ruolo determinante lo gioca la fase progettuale di questi macchinari la quale deve favorire, in linea generale, la presenza del maggior numero possibile di parti smontabili e l'impiego di materiali costruttivi caratterizzati da una forte inerzia chimica nei confronti delle materie in lavorazione. I vantaggi che si ottengono, consistono in una maggiore facilità di ispezione e di pulizia delle superfici interne, fino ad arrivare alla completa sostituzione del pezzo qualora il grado di usura raggiungesse livelli intollerabili.

Le soluzioni detergenti fortemente alcaline, meglio se portate in temperatura (dai +50° ai +80°C) e immesse in circolo per un periodo di tempo compreso tra i 20 e i 30 minuti, riescono ad eliminare il biofilm; nel caso degli scambiatori di calore occorre, invece, utilizzare dei bagni acidi per favorirne la disincrostazione mentre la frequenza applicativa di tali trattamenti deve essere rispettata con molto rigore al fine di bloccare il prosieguo dei fenomeni di stabilizzazione della biomassa che la porterebbero ad un aumento di volume con tutto ciò che ne consegue.

Per ultimo si ricorda che un trattamento esclusivamente sanificante è stato dimostrato non sufficiente per il raggiungimento di tale scopo.

(1) Alcuni autori hanno sperimentato l'applicazione di un campo elettrico che altera l'attrazione elettrostatica delle componenti del biofilm sulle superfici, mentre altri hanno incorporato dei principi attivi sanificanti che ostacolano fortemente le prime due fasi della sua formazione.

BIBLIOGRAFIA

- I. **Pratten J., Willis K., Barnett P., Wilson M.**, 1998.
In vitro studies of the effect of antiseptic-containing mouthwashes on the formation and viability of Streptococcus sanguis biofilm.
J. Appl. Microbiol., 84 (6), pp. 1149-55.
- II. **Das JR, Bhakoo M., Jones MV, Gilbert P.**, 1998.
Changes in the biocide susceptibility of Staphylococcus epidermidis and Escherichia coli cells associated with rapid attachment to plastic surfaces.
J. Appl. Microbiol., 84 (5), pp. 852-8.
- III. **Bower C. K., Mc Guire J., Daeschel M.A.**, 1996.
The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces.
Trends Food Sci. Technol. 7, pp. 152-57.
- IV. **Frank J. F., Koffi R. A.** (1990).
Surface-adherent growth of Listeria monocytogenes is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat.
J. Food Prot. 53, pp. 550-54.
- V. **Characklis W. J., Marshall K. C.**, 1990.
Biofilms.
John Wiley and Sons, p. 316.
- VI. **Saez R., Rittmann J.**, 1987
Improved pseudoanalytical solution for s. in biofilm kinetics.
Biotechnology and Bioengineering, vol. 32.