



dr n. tech. ANNA ŁAWNICZEK-WAŁCZYK (ORCID: 0000-0001-8234-340X)

prof. dr hab. n. med. RAFAŁ L. GÓRNY (ORCID: 0000-0001-5703-5835)

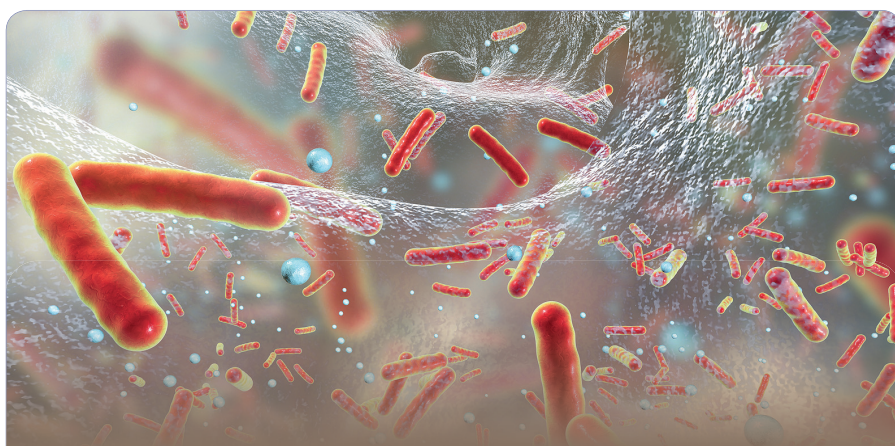
Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy

Kontakt: anlaw@ciop.pl

DOI: 10.54215/BP.2022.03.6.Lawniczek-Walczyk

Biofilm jako zagrożenie w zakładach produkcji i przetwarzania żywności

Fot. Dr_Microbe/Bigstockphoto



Rozwój mikroorganizmów tworzących biofilm na powierzchniach użytkowych w zakładach produkcji i przetwarzania żywności często prowadzi do jej psucia się oraz stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Szczególnie niebezpieczne dla zdrowia człowieka są biofilmy wytwarzane przez chorobotwórcze bakterie, takie jak *Campylobacter jejuni*, patogenne szczepy *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* czy drożdże z rodzaju *Candida*. Celem artykułu jest przybliżenie czytelnikom wiedzy na temat mechanizmów powstawania biofilmów, zagrożeń wynikających z rozprzestrzeniania się biofilmotwórczych patogenów, a także metod zapobiegania i usuwania biofilmu w zakładach produkcji i przetwórstwa żywności.

Słowa kluczowe: biofilm, produkcja żywności, patogeny, lekooporność

Biofilm as a threat in food production and processing facilities

The development of biofilm-forming microorganisms on usable surfaces in food production and processing facilities often results in food spoilage and poses a serious threat to public health. Particularly dangerous to human health are biofilms formed by pathogenic bacteria such as *Campylobacter jejuni*, pathogenic strains of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* and yeasts of the genus *Candida*. The purpose of this article is to provide readers with an overview of the mechanisms of biofilm formation, the risks associated with the spread of biofilm-forming pathogens, and methods of biofilm prevention and removal in food production and processing plants.

Keywords: biofilm, food production, pathogens, drug resistance

Co to jest biofilm?

Wiele gatunków bakterii i grzybów charakteryzuje się zdolnością adhezji do różnych rodzajów powierzchni i tworzenia na nich przestrzennie zorganizowanych społeczności nazywanych biofilmem. Komórki biofilmu są osadzone w gęstej macierzy utworzonej

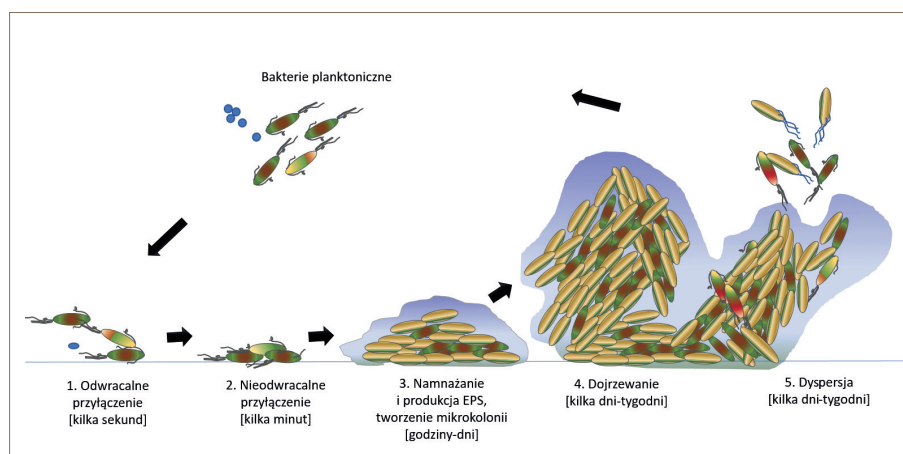
z zewnątrzkomórkowych substancji egzopolimerowych (ang. *extracellular polymeric substances*, EPS), produkowanych przez same mikroorganizmy. Macierz EPS zapewnia ochronę mikroorganizmom i sprawia, że w określonych warunkach są one bardziej przystosowane do środowiska zewnętrznego niż tzw. komórki planktoniczne (niezwiązane w biofilmie, swobodnie

pływające) [1, 2]. Mikroorganizmy tworzące biofilm są wszechobecne w otaczającym nas środowisku i często wykorzystywane w wielu dziedzinach naszego życia (tab. 1). Zagęszczenie komórek w biofilmach skutkuje znacznym zwiększeniem ich aktywności biochemicznej w porównaniu z komórkami planktonicznymi. Obserwowany wzrost zainteresowania tematyką zrównoważonej żywności i agrokultury spowodował dynamiczny rozwój badań nad zastosowaniem biofilmów w produkcji żywności i preparatów biotechnologicznych (probiotyków i innych leków oraz substancji chemicznych). Biofilmy znajdują zastosowanie także jako bi nawozy i czynniki biokontroli w procesach bioremediacji czy w oczyszczaniu ścieków [3, 4].

Powstawanie biofilmu ma też negatywne konsekwencje. Rozwój niepożądanych biofilmotwórczych mikroorganizmów na powierzchniach użytkowych w zakładach produkcji i przetwarzania żywności często prowadzi do jej psucia się oraz stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego [1, 2]. Duża wilgotność i nagromadzenie materiału organicznego na powierzchniach roboczych, zwłaszcza w trudno dostępnych miejscach, takich jak tanki, rurociągi, wirówki, urządzenia do obróbki mięsa (wilki, nadziewarki, kutry, narzędzia do pakowania), tworzą idealne środowisko do powstania biofilmu. Namnażające się komórki biofilmu wydzielają różnorodne enzymy, np. lipazy lub proteazy, które mogą zmieniać właściwości organoleptyczne produktów oraz powodować awarię elementów wyposażenia wskutek korozji, wzrostu tarcia elementów maszyn, ograniczenia przepływu w rurach, obniżania wymiany ciepłej itp. Konsekwencją są wysokie straty finansowe w przemyśle spożywczym. Szczególnie niebezpieczne dla zdrowia publicznego są biofilmy wytwarzane przez takie bakterie, jak *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* oraz drożdże z rodzaju *Candida*. Patogeny te mogą tworzyć dojrzałe struktury biofilmu nawet w ciągu kilkunastu godzin od rozpoczęcia kolonizacji takich powierzchni, jak sztuczne tworzywa, szkło czy stal nierdzewna [1, 2, 5]. Wiele biofilmotwórczych mikroorganizmów jest

Tabela 1. Wykorzystanie biofilmów w różnych gałęziach gospodarki [2-4]
 Table 1. Application of biofilms in different branches of industry [2-4]

Mikroorganizmy biofilmotwórcze	Zastosowanie
<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Lactobacillus</i> (<i>L. delbrueckii</i> , <i>L. lactis</i>), <i>Streptococcus thermophilus</i>	produkcja serów długodojrzwających
<i>Enterococcus</i> spp., <i>Lactobacillus</i> (<i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i>), <i>Pediococcus</i> (<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>), <i>Staphylococcus</i> (<i>S. carnosus</i> , <i>S. xylosus</i>), <i>Penicillium</i> (<i>P. chrysogenum</i> , <i>P. nalgiovense</i>)	produkcja wędlin i kielbas długodojrzwających
<i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Pichia membranifaciens</i>	produkcja fermentowanych czarnych oliwek
<i>Candida</i> spp., <i>Debaryomyces hansenii</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Lactobacillus pentosus</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Lactococcus</i> spp., <i>Pediococcus</i> spp., <i>Saccharomyces</i> spp., <i>Pichia</i> (<i>P. guilliermondii</i> , <i>P. spp.</i>), <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	produkcja zielonych oliwek w stylu greckim i hiszpańskim
<i>Acetobacter aceti</i>	produkcja kwasu octowego i octu
<i>Rhizopus oryzae</i>	produkcja kwasu fumarowego
<i>Lactobacillus</i> (<i>L. amylophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. fructivorans</i>), <i>Pseudomonas fragi</i> , <i>Streptomyces viridosporus</i> , <i>Thermoactinomyces vulgaris</i> , <i>Rhizopus oryzae</i>	produkcja kwasu mlekowego
<i>Zymomonas mobilis</i> , <i>Sacharomyces cerevisiae</i>	produkcja etanolu w bioreaktorze
<i>Escherichia coli</i>	produkcja amylazy w bioreaktorze
<i>Aspergillus niger</i>	produkcja kwasu cytrynowego, celulazy i ksylanazy
<i>Acetobacter</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Azospirillum</i> spp., <i>Azotobacter</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Beijerinckia</i> spp., <i> Bradyrhizobium</i> spp., <i>Colletotrichum</i> spp., <i>Erwinia</i> spp., <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Mesorhizobium ciceri</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serratia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> , <i>Rhizobium</i> spp.	nawóz biologiczny i ochrona roślin (biokontrola)
<i>Acetobacterium</i> sp., <i>Alcaligenes</i> spp., <i>Alcanivorax</i> spp., <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus terreus</i> , <i>Arthrobacter</i> spp., <i>Bacillus</i> spp., <i>Burkholderia</i> spp., <i>Cunninghamella</i> spp., <i>Cycloclasticus</i> spp., <i>Dehalococcoides</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Mycobacterium</i> spp., <i>Phanaerochaete chrysosporium</i> , <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhizobium</i> spp., <i>Rhodococcus</i> spp., <i>Sphingomonas</i> spp., <i>Rhizopus nigricans</i>	bioremediacja gleby zanieczyszczonej toksycznymi pestycydami, węglowodorami, alkanami i metalami ciężkimi
<i>Comamonas denitrificans</i> , <i>Brachymonas denitrificans</i> , <i>Aeromonas</i> sp., <i>Pseudomonas</i> spp., <i>Nitrosomonas</i> , <i>Ralstonia</i> sp., <i>Bacillus</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Methylobacterium</i> spp., <i>Enterobacter agglomerans</i> , <i>Cronobacter sakazakii</i> , <i>Pantoea agglomerans</i>	oczyszczanie ścieków



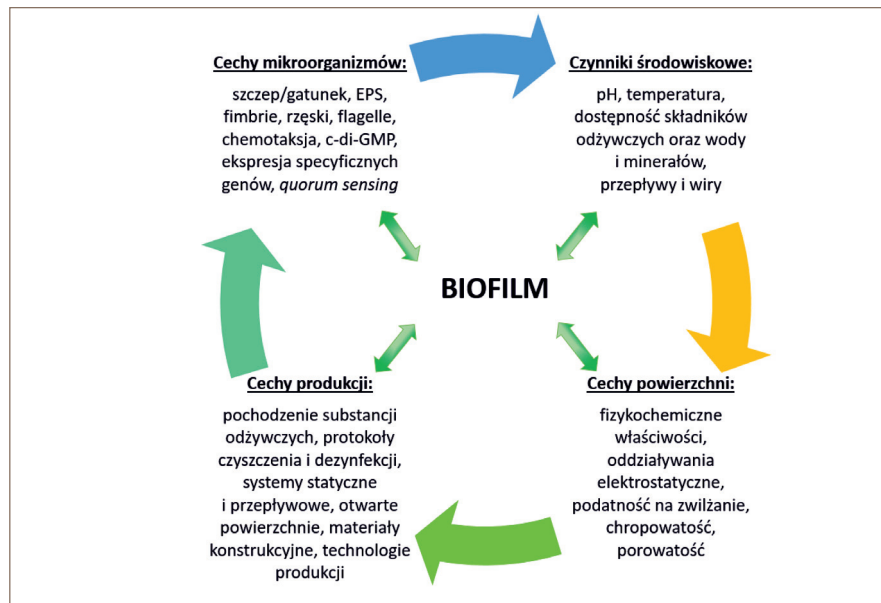
Rys. 1. Etapy formowania biofilmu [1, 2, 7]
 Fig. 1. Stages of biofilm formation [1, 2, 7]

nosicielami genów oporności na antybiotyki, co czyni te patogeny jeszcze bardziej niebezpiecznymi dla zdrowia człowieka. Z raportu Amerykańskiego Centrum Kontroli i Zapobiegania Chorób (Centers for Disease Control and Prevention – CDC) wynika, że co roku około miliona mieszkańców USA cierpi z powodu chorób wywołanych przez lekooporne patogeny przenoszone drogą pokarmową [6]. Biofilmy w zakładach produkcji i przetwarzania żywności są potencjalnymi rezerwuarami genów oporności na antybiotyki i mogą się przyczyniać do ich rozprzestrzeniania w środowisku. Dlatego też, aby stawić czoła temu problemowi zarówno w skali lokalnej, jak i globalnej, konieczne jest lepsze zrozumienie mechanizmów formowania się biofilmów oraz poszukiwanie skutecznych metod ich kontroli i eradykacji.

Celem artykułu jest przybliżenie czytelnikom wiedzy na temat: mechanizmów powstawania biofilmów, zagrożeń wynikających z rozprzestrzeniania się biofilmotwórczych patogenów oraz metod zapobiegania i usuwania biofilmu w zakładach produkcji i przetwórstwa żywności.

Proces formowania biofilmu

Zazwyczaj tworzenie biofilmu przebiega kilkietapowo (rys. 1): początkowe i odwracalne przyłączenie komórek (1), nieodwracalne przyłączenie i wzrost (2-3), dojrzwienie (4) i dyspersja (5). Niemal każdy rodzaj powierzchni użytkowej w zakładzie produkcji i przetwarzania żywności może się stać miejscem przyłączenia i rozwoju mikroorganizmów. Tworzenie biofilmu ułatwia adsorpcja na powierzchni makrocząstek (np. białek, polisacharydów, kwasów nukleinowych i kwasów humusowych) oraz mniejszych cząstek (np. kwasów tłuszczowych, lipidów), będących pozostałościami po procesach technologicznych. Cząsteczki te tworzą warstwę kondycjonującą, która pomaga w adhezji mikroorganizmów i stanowi dla nich doskonałe źródło zasobów odżywczych. Gdy powierzchnia jest już przygotowana, komórki zaczynają się do niej przyłączać. Ten początkowy kontakt bakterii z powierzchnią jest jeszcze odwracalny i może trwać kilka sekund. Wiązanie bakterii do powierzchni jest słabe i może być łatwo naruszone, np. przez płynącą wodę, jednak z czasem ulega wzmocnieniu i adhezja komórek staje się nieodwracalna [2, 7-9]. Komórki zaczynają się namnażać i produkować EPS, którego głównymi składnikami są egzopolisacharydy, kwasy nukleinowe, białka, lipidy, kwasy lipotejchowe, lipopolisacharydy i wiele innych substancji. Egzopolimery macierzy pełnią funkcję stabilizującą i scalającą komórki, nadając kształt biofilmowi. Ich zadaniem jest także ochrona społeczności komórek przed negatywnym oddziaływaniem środowiska zewnętrznego (np. chłodzeniem, zakwaszaniem, zasoleniem czy dezynfekcją). Następnie w wyniku intensywnej proliferacji dochodzi do wytworzenia mikrokolonii.



Rys. 2. Czynniki wpływające na architekturę, skład i właściwości biofilmu [7, 9, 11, 12]

Fig. 2. Factors affecting the architecture, composition and properties of the biofilm [7, 9, 11, 12]

Dzięki mechanizmowi komunikacji pomiędzy bakteriami, tzw. *quorum sensing* (QS), możliwe jest kontrolowanie specyficznych procesów wewnątrz tworzącego się biofilmu, w tym ekspresji genów budowy ściany komórkowej i czynników wirulencji, produkcji wtórnych metabolitów i mechanizmów adaptacji do stresu (takich jak systemy konkurencji bakteryjnej czy systemy sekrecyjne). Trójwymiarowa struktura biofilmu zawiera liczne sieci kanałów dostarczających związki odżywcze, wodę oraz cząsteczki komunikacji międzykomórkowej. Należy podkreślić, że w dojrzałym biofilmie komórki mikroorganizmów stanowią ok. 10% całej masy biofilmu, a pozostałą część wypełnia EPS. Wraz z upływem czasu niektóre komórki dojrzałego biofilmu zaczynają się odrywać i rozprasać w środowisku jako komórki planktoniczne, by ponownie rozpocząć cykl tworzenia biofilmu [1, 2, 7-9].

Czynniki wpływające na rozwój biofilmu

Procesy adhezji komórek do powierzchni oraz dojrzewania i funkcjonowania biofilmu zależą od wielu czynników środowiskowych, cech gatunkowych, dostępności substancji odżywczych oraz specyfiki procesu technologicznego w zakładach produkcji i przetwarzania żywności (rys. 2) [9-11].

Właściwości powierzchni odgrywają fundamentalną rolę w tworzeniu biofilmu. Szorstka i porowata powierzchnia stanowi korzystniejsze miejsce do namnażania mikroorganizmów i zapewnia im lepszą ochronę przez czynnikami zewnętrznymi niż powierzchnia gładka i śliska. Wykazano, że dodatkowa obecność warstwy cząsteczek organicznych (takich jak białka i tłuszcze), pochodzących z produkcji mięsa

czy mleka, sprzyja tworzeniu się biofilmów chorobotwórczych bakterii, m.in. *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* czy *Enterococcus* spp. [1, 10, 11].

Niezwykle ważną rolę w tworzeniu pomostu pomiędzy mikroorganizmami a warstwą kondycjonującą zasiedlanej powierzchni odgrywa obecność u mikroorganizmów spe-

cialnych wyrostków zewnątrzkomórkowych (rzęsek, fimbrii, flagelli) oraz otoczek i śluzów. Niektóre gatunki bakterii mają zdolność tzw. wycucia powierzchni. Mechanizm wycucia powierzchniowego został dobrze opisany na przykładzie bakterii *Vibrio parahaemolyticus*, która w warunkach swobodnego pływania (komórki planktoniczne) ma pojedynczą polarną flagellę, jednak podczas kontaktu z powierzchnią wypuszcza kilka dodatkowych wyrostków, co powoduje rodzaj ruchliwości zwany rojeniem i ułatwia przyczepianie się komórki do powierzchni [2, 7]. U pałeczki *Pseudomonas aeruginosa* wykryto aż dwa mechanizmy ułatwiające wycucie powierzchni opierające się na systemie Wsp, czyli sieci transdukcji sygnału chemotaksji i układu chemoreceptorów (m.in. białka chemotaksji MCP, metylazy i esterazy metylowej) oraz obecności cykazy lub syntazy c-di-GMP (cząsteczki sygnalizacyjnej) [7, 12]. Na adhezję komórek wpływają też oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe między komórką i powierzchnią oraz między poszczególnymi komórkami. Większość bakterii obdarzona jest ujemnym ładunkiem powierzchniowym, co wynika z obecności na powierzchni ich komórek znacznej liczby grup karboksylowych, aminowych i fosforanowych. Ujemny ładunek sprzyja przyłączaniu się komórek do naładowanej dodatnio powierzchni abiotycznej [2, 10]. Hydrofobowe powierzchnie z polichloru winylu (PCV), poli(tereftalanu

Tabela 2. Przykłady zwiększonej oporności patogenów na działanie środka przeciwdrobnoustrojowego w biofilmach wielogatunkowych [16, 17, 19, 20]

Table 2. Examples of increased antimicrobial resistance of pathogens in multispecies biofilms [16, 17, 19, 20]

Mikroorganizmy biofilmotwórcze	Zastosowanie
<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> i <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	alkohol etylowy
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 i <i>Salmonella</i> Typhimurium	czwartorzędowe związki amoniowe
<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> i <i>Enterobacter cloacae</i>	chlor
<i>Salmonella</i> Typhimurium i <i>Pseudomonas fluorescens</i>	chlor
<i>Epilithonimonas</i> i <i>Aeromonas</i>	sulfatiazol
<i>Pseudomonas</i> i <i>Raoultella</i>	
<i>Pseudomonas</i> , <i>Pseudoclavibacter</i> , <i>Raoultella</i> i <i>Serratia</i>	
<i>Pseudomonas putida</i> , <i>Salmonella enterica</i> i <i>Listeria monocytogenes</i>	olejki eteryczne
<i>Listeria innocua</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	kwas nadoctowy
<i>Bacillus subtilis</i> i <i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas protegens</i> i <i>Klebsiella pneumoniae</i>	laurylosiarczan sodu
<i>Streptococcus mutants</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> i <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	chlorheksydyna
<i>Lactobacillus plantarum</i> i <i>Listeria monocytogenes</i>	chlorki benzalkoniowe

etylenu) (PET) oraz akrylu czy hydrofobowe regiony powierzchni stali nierdzewnej są częściej zasiedlane przez mikroorganizmy niż powierzchnie hydrofilowe, takie jak szkło [2, 13]. Niemniej jednak ładunek powierzchniowy komórki oraz jej hydrofobowość/hydrofilność zmieniają się pod wpływem warunków środowiskowych (temperatury, pH, dostępu do substancji odżywczych) i wieku oraz różniąc się między poszczególnymi gatunkami [2, 10].

W przyrodzie bardzo często spotyka się biofilmy mieszane, będące kombinacją różnych gatunków bakterii, grzybów strzępkowych i drożdży, a także pierwotniaków, archeonów i alg. Obecność więcej niż jednego gatunku bakterii w biofilmie ma istotne zalety ekologiczne, ponieważ może ułatwiać przyleganie biofilmu do powierzchni oraz wpływać na jego architekturę. Badania laboratoryjne potwierdziły, że synergistyczne działanie kilku gatunków Gram-ujemnych bakterii w tworzeniu biofilmu w zakładach przetwórstwa surowego mleka zwiększa możliwość przeżycia patogennej bakterii *E. coli* O157:H7 [6, 9]. W doświadczeniu przeprowadzonym przez zespół da Silva Fernandes na mieszanych biofilmach tworzonych na stali nierdzewnej zaobserwowano, że chorobotwórcze bakterie *Listeria monocytogenes* wykazują większą liczebność w biofilmie mieszanym utworzonym wspólnie z *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* niż w biofilmie jednogatunkowym [14].

Oporność mikroorganizmów na środki dezynfekujące i antybiotyki

Stosowane w przemyśle spożywczym środki do dezynfekcji mają za zadanie doprowadzić do zniszczenia form wegetatywnych mikroorganizmów. Zabicie komórek następuje w wyniku destrukcji ściany komórkowej, uszkodzenia błony cytoplazmatycznej, degradacji kwasów nukleinowych i koagulacji białek. Środki dezynfekcyjne są używane w stężeniach przekraczających minimalne stężenia hamujące, a zatem powinny gwarantować inaktywację wszystkich mikroorganizmów na danej powierzchni. Niestety, komórki występujące w biofilmie wykazują od 100 do 1000 razy większą oporność na działanie środków dezynfekujących, antybiotyków czy biocydów niż komórki planktoniczne. Stąd też aktywności środków przeciwdrobnoustrojowych wobec biofilmotwórczych mikroorganizmów nie można przewidzieć na podstawie działania tych środków na monokultury lub komórki planktoniczne. Zjawisko występowania oporności biofilmów na grupy antybiotyków, środki do dezynfekcji i biocydy wynika z nałożenia na siebie wielu zmiennych czynników środowiskowych i gatunkowych. Przede wszystkim sama trójwymiarowa struktura biofilmu oraz macierz EPS (a zwłaszcza jej skład i gęstość) skutecznie ograniczają przenikanie środków przeciwdrobnoustrojowych do wnętrza biofilmu [16].

Tabela 3. Przykłady epidemii związanych z zanieczyszczeniami krzyżowymi w łańcuchu produkcji [2, 6, 8, 22, 25]
Table 3. Examples of outbreaks associated with cross-contamination in the production chain [2, 6, 8, 22, 25]

Patogen	Rodzaj żywności	Źródło skażenia	Lata
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	jogurt	pompa używana wcześniej do surowego mleka	1995
<i>Escherichia coli</i> STEC O104:H4	kanapki, sałatki	skażone kiełki kozieradki, pomidory i ogórki, opakowania	2011
<i>Salmonella</i> Agona	płatki śniadaniowe	wyposażenie i urządzenia w ciągu technologicznym	1998
<i>Salmonella enterica</i>	lody	cysterna transportująca lody, używana wcześniej do przewozu surowych jaj	1994
<i>Salmonella</i> Typhimurium	gotowana szynka	wykorzystanie brudnych pojemników na surową wieprzowinę	1991
<i>Salmonella</i> Infantis	mięso kurczaka, surowa karma dla zwierząt	zanieczyszczone mięso i urządzenia w ciągu technologicznym	2018-2019
<i>Yersinia enterocolitica</i>	mleko pasteryzowane	zanieczyszczenie po zakończeniu produkcji	1995
<i>Listeria monocytogenes</i>	masło	zanieczyszczenie linii produkcyjnej	1999
	ser	dodanie surowego mleka do pasteryzowanego wyrobu	1985

W ciągu ostatnich 25 lat zidentyfikowano wiele genetycznych wyznaczników oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe, zaangażowanych m.in. w: tworzenie EPS, regulację pomp efflux (kanałów białkowych w błonie komórkowej), aktywację odpowiedzi na stres oraz modyfikację tempa wzrostu [2, 5, 9, 15-19]. Oporność biofilmu jest też często związana z jego składem gatunkowym i fazami powstawania. W dojrzałym biofilmie wiele komórek znajdujących się w fazie stacjonarnej staje się niewrażliwa na substancje przeciwdrobnoustrojowe. W fazie stacjonarnej komórki mają osłabione procesy fizjologiczne, nie namnażają się i występują w stanie podobnym do uśpienia. Dlatego też starsze biofilmy wykazują wyższą tolerancję na środki dezynfekcyjne i antybiotyki niż ich młodsze odpowiedniki [5, 16, 17]. Ponadto synergistyczna koegzystencja patogenów i mikrobioty zasiedlającej powierzchnie w środowisku produkcji żywności może zwiększać oporność patogenów na zabiegi mycia i dezynfekcji (tab. 2) [15-20]. Wang i współpracownicy wykazali, że składniki macierzy EPS zmniejszają wrażliwość na dezynfekcję u wydzielających ją komórek. W wielogatunkowych biofilmach szczepy pozbawione zdolności do produkcji EPS korzystały z ochrony towarzyszących im szczepów, wytwarzających składniki macierzy [17]. Mimo prowadzonych w tym zakresie badań natura interakcji międzygatunkowych, zapewniających wyższą lub niższą wrażliwość na środki dezynfekcyjne w biofilmach mieszanych, nie została jeszcze w pełni poznana [18].

Oporność komórek biofilmu na antybiotyki jest determinowana przez wiele czynników.

Do tych czynników należą m.in.:

- skład macierzy EPS (ograniczający dyfuzję antybiotyków),
- interakcje antybiotyków ze składnikami EPS (różne składniki EPS mogą obniżyć lub dezaktywować działanie antybiotyków),
- zdolność do produkcji specjalnych enzymów – np. β -laktamazy hydrolizującej wiązanie β -laktamowe w cząsteczce antybiotyku,
- zmiana aktywności metabolicznej komórek,
- obecność pomp efflux, które usuwają antybiotyki z komórki,
- mutacje genetyczne,
- horyzontalny transfer genów (HGT, z ang. *horizontal gene transfer*) [21].

Istotnym mechanizmem oporności na antybiotyki jest przekazywanie genów oporności w drodze HGT między poszczególnymi szczepami, gatunkami, a nawet rodzajami mikroorganizmów. Zaobserwowano, że zjawisko to może zachodzić bardziej efektywnie w biofilmie niż w komórkach planktonicznych. Niewątpliwie wysokie zagęszczenie komórek w biofilmie i zwiększona kompetencja genetyczna sprzyjają rozprzestrzenianiu się genów oporności na antybiotyki w środowisku [17, 21]. Biorąc pod uwagę nasilające się zjawisko wielolekooporności oraz niewrażliwość na procesy dezynfekcji wśród patogenów układu pokarmowego, potencjalne ryzyko kontaminacji środowiska produkcji żywności przez biofilmotwórcze mikroorganizmy stanowi istotny problem dla zdrowia publicznego. Zachodzi więc potrzeba zwrócenia szczególnej uwagi na właściwe praktyki mycia i dezynfekcji w zakładach produkcji i przetwórstwa żywności [8, 17, 21].

Wpływ biofilmu na zdrowie człowieka

Zanieczyszczenie żywności patogenami stanowi poważny problem dla zdrowia publicznego. Jak wynika z szacunków grupy referencyjnej Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) ds. epidemiologii chorób przenoszonych drogą pokarmową, w 2010 r. choroby przenoszone tą drogą spowodowały ok. 600 mln zachorowań i 420 tys. zgonów. Według badań przeprowadzonych w 1995 r. przez WHO na terenie Europy ponad 25% ognisk zatruc pokarmowych było związanych z zanieczyszczeniem krzyżowym, czyli bezpośrednim lub pośrednim przeniesieniem patogenu ze skażonej powierzchni wraz ze skażoną żywnością lub na rękach pracownika [24]. Przykłady epidemii związanych z brakiem higieny w łańcuchu produkcji żywności przedstawiono w tab. 3. Należy podkreślić, że epidemie chorób układu pokarmowego to niejedynie negatywne efekty występowania biofilmów w środowisku produkcji i przetwarzania żywności. Znacząca większość przewlekłych i nawracających infekcji u ludzi jest spowodowana przez biofilmy bakteryjne lub mieszane. Biofilmy pełnią także istotną rolę w rozprzestrzenianiu się genów oporności na antybiotyki. Antybiotykoopornymi patogenami można się zarazić przez kontakt z zanieczyszczoną żywnością, ze skażoną powierzchnią lub z odpadami [2, 6, 21]. Przykładem tego może być epidemia w USA w latach 2018-2019, wywołana przez bakterie *Salmonella Infantis*, oporną na antybiotyki, m.in. na ampicylinę, ceftriakson, chloramfenikol, ciprofloksacynę, fosfomicynę, gentamycynę, higromycynę, kanamycynę, kwas nalidyksowy, streptomycynę, sulfametoksazol, tetracyklinę i trimetoprim-sulfametoksazol. Do zakażenia doszło wskutek spożycia niedogotowanego lub dotykania surowego mięsa kurczaka, w tym pakowanej surowej karmy dla zwierząt domowych [25].

Strategie kontroli i zwalczania biofilmów

Obecnie dzięki komunikatom w mediach konsumenci na bieżąco dowiadują się o skażonych mikrobiologicznie partiach produktów spożywczych, które są szybko wycofywane z rynku. Dla producentów oznacza to jednak duże obciążenie ekonomiczne, a niekiedy nawet utratę marki. Profilaktyka powstawania biofilmu w zakładach produkcji i przetwarzania żywności jest zatem ważna nie tylko w kontekście utrzymania wysokiej jakości produktu i spełnienia wymagań dotyczących bezpieczeństwa zdrowotnego, lecz ma wyraźny aspekt ekonomiczny. Całkowite wyeliminowanie biofilmów jest zadaniem bardzo trudnym, a w wielu przypadkach niemożliwym do osiągnięcia. Istnieją jednak działania systemowe, które mogą zminimalizować ryzyko rozprzestrze-

niania się niechcianych mikroorganizmów, np. systemy tzw. dobrych praktyk, takie jak: Dobra Praktyka Produkcyjna (ang. *Good Manufacturing Practice* – GMP), Dobra Praktyka Higieniczna (ang. *Good Hygienic Practice* – GHP) czy System Analizy Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontrolnych (ang. *Hazard Analysis and Critical Control Points* – HACCP) [8, 22]. Najczęściej używane środki ograniczające rozwój biofilmu przedstawiono w tab. 4. Wyróżnia się trzy główne strategie dopasowane do różnych etapów rozwoju biofilmu. I tak, we wczesnej fazie formowania biofilmu stosuje się czyszczenie i dezynfekcję, w celu usunięcia dojrzalego biofilmu – obróbkę mechaniczną i metody chemiczne, natomiast w celu zapobiegania dyspersji biofilmu – kontrolę transdukcji sygnału QS [2, 15, 22].

Ważnym elementem walki z biofilmem jest dobór wyposażenia ciągu technologicznego w zakładzie oraz używanie środków do impregnacji. Przeprowadzane regularnie procesy czyszczenia zapewniają usunięcie resztek żywności i zapobiegają tworzeniu się warstwy kondycjonującej na powierzchni urządzeń i wyposażenia. Dostępne na rynku nowe rozwiązania, takie jak system *Cleaning-In-Place* (CIP), umożliwiają dokładne czyszczenie całego lub części ciągu technologicznego bez konieczności ręcznego demontażu lub ręcznego czyszczenia przez operatora, co zwiększa efektywność sanityzacji i dezynfekcji [22].

Należy podkreślić, że efektywne usuwanie biofilmów z powierzchni jest możliwe tylko dzięki odpowiedniej kombinacji czterech elementów:

Tabela 4. Metody kontroli biofilmu w środowisku produkcji i przetwarzania żywności [2, 8, 22, 23]

Table 4. Biofilm control methods in food production and processing environments [2, 8, 22, 23]

Metoda	Przykłady
Metody chemiczne	<p>związki chemiczne najczęściej stosowane w preparatach dezynfekcyjnych:</p> <ul style="list-style-type: none"> • alkohole – etanol, izopropanol • związki chloru – chloramina, podchloryn sodu, podchloryn wapnia • aldehydy – glutaraldehyd, formaldehyd • związki jodu – jodyna, jodofory • IV-rzędowe związki amoniowe (QACs) – chlorek benzalkoniowy, chlorek benzetonowy • biguanidy – chlorheksydyna • fenole – fenol, krezol i ich pochodne • substancje utleniające – ozon, nadtlenek wodoru, kwas nadociowy
Ochrona powierzchni poprzez jej modyfikację	<ul style="list-style-type: none"> • nanopowłoki z trimetylosilkanu • powłoki z polietylenoglikolem (PEG) • pokrycie szczotkami polimerowymi z politlenku etylenu (PEO) • membrany polietylenowe (PE) • plazma tlenowa na materiałach węglowych • plazma azotowa na anodzie węglowej • powłoki bakteriobójcze/bakteriostatyczne (Ag^{2+}, Fe_3O_4, TiO_2, ZnO, CuO, MgO) • funkcjonalizowanie lizozymem lub nizyną
Kontrola transdukcji sygnału bakteryjnego (interferencja <i>quorum sensing</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • wygaszacze QQS (ang. <i>quorum sensing quenchers</i>) – enzymy obejmujące laktonazę, acylazę, oksydoreduktazę i paraoksonazę • inhibitory QS (ang. <i>quorum sensing inhibitors</i> – QSI) – np. N-oktanoilol-L-HSL (C8-HSL) oraz naturalne związki, jak furanon, ajoen, naringina, kurkumina, miód
Metody biologiczne	<ul style="list-style-type: none"> • metoda enzymatyczna – przerwanie macierzy biofilmu bakteryjnego: DNazy, endonukleazy restrykcyjne, hydrolazy glikozydowe, proteazy, dyspersyna B • użycie bakteriofagów – SAP-26, Listex P100 (eliminacja biofilmów obecnych w przetworzonych produktach mięsnych) • bakteriocyny: nizyna (aktywna wobec Gram-dodatnich bakterii i produkowana przez <i>Lactococcus lactis</i>), pediocyny (aktywne wobec <i>Listeria monocytogenes</i> i produkowane przez <i>Enterococcus</i> spp.), laktokiny (aktywne wobec <i>Brochothrix thermosphacta</i> i wytwarzane przez <i>Lactococcus</i> spp.)
Metody fizyczne	<ul style="list-style-type: none"> • mechaniczne czyszczenie • wysoka lub niska temperatura • fale ultradźwiękowe • pole elektryczne

- składu i stężenia użytych preparatów przeciwdrobnoustrojowych,
- czasu ekspozycji,
- temperatury,
- mechanicznego działania.

Usuwanie dojrzałych struktur biofilmu wymaga intensywnej czynności mechanicznych, czyli szorowania i skrobienia w połączeniu z użyciem środków czyszczących i dezynfekujących. Spryskiwanie środkami do sanizacji zanieczyszczonej powierzchni usuwa tylko wierzchnią warstwę i wystawia kolejne, głębsze warstwy komórek biofilmu na działanie substancji odżywczych występujących w środowisku produkcji żywności. Odsłonięte komórki zaczynają przejmować nowe funkcje i wytwarzają duże ilości zewnątrzkomórkowych polisacharydów, które szczelnie chronią wewnętrzne warstwy komórek biofilmu przed dyfuzją środków przeciwdrobnoustrojowych. Niedokładne mycie i dezynfekcja mogą zatem przyspieszyć wzrost i rozwój biofilmu na danej powierzchni oraz zwiększyć oporność mikroorganizmów na stosowane dezynfektanty [2, 8, 22, 23].

Podsumowanie

Biofilmy powstałe na powierzchniach użytkowych, elementach maszyn oraz wyposażenia w środowisku produkcji żywności są odpowiedzialne za rozprzestrzenianie się chorobotwórczych bakterii, które mogą zagrażać zdrowiu zarówno konsumentów, jak i pracowników. Najlepszą strategią profilaktyczną przeciwko biofilmom jest przygotowanie odpowiedniego planu higieny i stosowanie się do wymaganego reżimu sanitarnego w zakładach produkujących lub przetwarzających żywność. Zapobieganie adhezji patogenów do powierzchni kontaktujących się z żywnością oraz ograniczenie kontaminacji krzyżowej pozwolą na utrzymanie wysokiej jakości produktów oraz zapewnią ich bezpieczeństwo zdrowotne. Szybka detekcja i zapobieganie rozwojowi biofilmu mają istotne znaczenie zarówno dla zdrowia publicznego, jak i rozwoju gospodarki na dzisiejszym globalizującym się rynku, gdzie dużą wagę przykłada się do międzynarodowego handlu i konsumpcji surowej lub niezawierającej konserwantów żywności.

BIBLIOGRAFIA

[1] DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 2002, 8(9): 881-890, doi: 10.3201/eid0809.020063.

[2] MUHAMMAD, M.H., et al. Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. *Frontiers in Microbiology*. 2020, 11: 928, doi: 10.3389/fmicb.2020.00928.

[3] TURHAN, E.U., et al. Beneficial biofilm applications in food and agricultural industry. [In:] A. Malik, et al. (eds.). *Health and safety aspects of food processing technologies*. Springer, 2020, pp. 445-469, doi: 10.1007/978-3-030-24903-8_15.

[4] LEROY, F., et al. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 106(3): 270-285, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.027.

[5] OBE, T., et al. Antimicrobial tolerance, biofilm formation, and molecular characterization of *Salmonella* isolates from poultry processing equipment. *Journal of Applied Poultry Research*. 2021, 30(4): 100195, doi: 10.1016/j.japr.2021.100195.

[6] Antibiotic resistance threats in the United States 2019. *Centres of Disease Control and Prevention (CDC)*. Atlanta 2019, doi: 10.15620/cdc:82532.

[7] ARMBRUSTER, C.R., PARSEK, M.R. New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 2018, 115(17): 4317-4319, doi: 10.1073/pnas.1804084115.

[8] GALIÉ, S., et al. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9: 898, doi: 10.3389/fmicb.2018.00898.

[9] WHITEHEAD, K.A., VERRAN, J. Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry. *Current Opinion in Food Science*. 2015, 2: 84-91, doi: 10.1016/j.cofs.2015.02.003.

[10] GIAOURIS, G., et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science*. 2014, 97(3): 298-309.

[11] DOUROU, D., et al. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology*. 2011, 149(3): 262-268.

[12] CHEN, A.I., et al. *Candida albicans* ethanol stimulates *Pseudomonas aeruginosa* WspR-controlled biofilm formation as part of a cyclic relationship involving phenazines. *PLOS Pathogens*. 2014, 10(10): e1004480.

[13] CERCA, N., et al. Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Research in Microbiology*. 2005, 156(4): 506-514, doi: 10.1016/j.resmic.2005.01.007.

[14] DA SILVA FERNANDES, M., KABUKI, D.Y., KUAYE, A.Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, 200: 5-12.

[15] MYSZKA, K., CZACZYK, K. Bacterial biofilms on food contact surfaces – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*. 2011, 61(3): 173-180.

[16] SANCHEZ-VIZUETE, P., et al. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6: 705, doi: 10.3389/fmicb.2015.00705.

[17] WANG, R., et al. Mixed biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. *Journal of Food Protection*. 2013, 76(9): 1513-1522, doi: 10.4315/0362-028X.JFP-13-077.

[18] KART, D., et al. Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Biofouling*. 2014 30(3): 377-383, doi: 10.1080/08927014.2013.878333.

[19] PARIJS, I., et al. Competitive inter-species interactions underlie the increased antimicrobial tolerance in multispecies brewery biofilms. *The ISME Journal*. 2018, 12(8): 2061-2075, doi: 10.1038/s41396-018-0146-5.

[20] WICAKSONO, W.A., et al. Enhanced survival of multi-species biofilms under stress is promoted by low-abundant but antimicrobial-resistant keystone species. *Journal of Hazardous Materials*. 2021, 422: 126836, doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.126836.

[21] ABEBE, G.M. The role of bacterial biofilm in antibiotic resistance and food contamination. *International Journal of Microbiology*. 2020, doi: 10.1155/2020/1705814.

[22] ZHAO, X., et al. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *The Royal Society of Chemistry*. 2017, 7: 36670-36683.

[23] MACIEJEWSKA, M., BAUER, M., DAWGUL, M. Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego. *Postępy Mikrobiologii*. 2016, 55(1): 3-11.

[24] WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. WHO, 2015, <https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases> (7.02.2022).

[25] Antibiotic resistance, food, and food animals, <https://www.cdc.gov/foodsafety/challenges/antibiotic-resistance.html> (7.02.2022).

Opracowano i wydano na podstawie wyników V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2020-2022 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (projekt nr II.PB.12 pt. „Badanie narażenia pracowników sektora przetwórstwa mięsnego na szkodliwe drobnoustroje bakteryjne ze szczególnym uwzględnieniem szczepów posiadających zdolność formowania biofilmu”). Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.