

Mètodes òptics per a la detecció de biofilms *in situ*

Optical methods for detecting biofilms in situ

NURIA DE FRANCISCO CAMPRUBÍ

Graduada en ciència i tecnologia dels aliments (CTA), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.



BERNAT PEREZ-PLAYÀ

Centre d'Innovació, Recerca i Transferència en Tecnologia dels Aliments (CIRTTA), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.



CAROLINA RIPOLLES-AVILA

Professora agregada Serra Húnter, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.



MANUEL CASTILLO

Centre d'Innovació, Recerca i Transferència en Tecnologia dels Aliments (CIRTTA), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona.



RESUM: Els biofilms són estructures microbianes altament resistents que suposen un risc per a la seguretat alimentària, ja que permeten a microorganismes patògens, com la *Salmonella* o *Listeria monocytogenes*, persistir en superfícies de contacte amb aliments de la indústria alimentària als processos habituals de neteja i desinfecció. La presència de biofilms pot provocar contaminació creuada, deteriorament de productes, ineficiència d'equips i riscos per a la salut pública. En aquest estudi, es revisen els mètodes òptics disponibles per a la detecció de biofilms *in situ* i en temps real, amb l'objectiu d'identificar tècniques aplicables a la indústria alimentària que facilitin una detecció ràpida i eficaç. Es presenta una classificació dels mètodes segons la naturalesa de la mesura, la necessitat de mostreig i el tipus de lectura. D'entre les tècniques revisades, es destaquen sensors de fluorescència, espectroscòpia i tecnologies basades en fibra òptica com a opcions més prometedores. També es proposa la combinació de mètodes fixos i portàtils com a estratègia òptima per al monitoratge i control eficaç de biofilms. Aquest enfocament pot millorar els protocols d'higiene i contribuir a la seguretat alimentària basant-se en una detecció ràpida i específica.

ABSTRACT: *Biofilms are highly resistant microbial structures that pose a risk to food safety, as they allow pathogenic microorganisms such as Salmonella or Listeria monocytogenes to persist on food-contact surfaces in the food industry despite standard cleaning and disinfection procedures. The presence of biofilms can cause cross-contamination, product spoilage, equipment inefficiency, and public health risks. This study reviewed available optical methods for the in situ and real-time detection of biofilms, aiming to identify techniques applicable to the food industry that enable rapid and effective detection. A classification of methods is presented based on the nature of the measurement, sampling requirements, and type of signal reading. Among the techniques reviewed, fluorescence sensors, spectroscopy, and fiber-optic-based technologies stand out as the most promising options. The combination of fixed and portable methods is also proposed as an optimal strategy for efficient biofilm monitoring and control. This approach could improve hygiene protocols and contribute to food safety through fast specific detection.*

PARAULES CLAU: biofilms, mètodes òptics, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas*, higiene, espectroscòpia, fluorescència, *in situ*, neteja i desinfecció, indústria alimentària, fibra òptica.

KEYWORDS: *biofilms, optical methods, Salmonella, Listeria monocytogenes, Pseudomonas, hygiene, spectroscopy, fluorescence, in situ, cleaning and disinfection, food industry, optical fiber.*

1. INTRODUCCIÓ

Un dels problemes principals a la indústria alimentària en referència a la innocuïtat dels aliments i consegüent transmissió de malalties està representat per la supervivència de microorganismes patògens o alterants que formen biofilms. La capacitat dels microorganismes per formar aquestes estructures, relacionades amb la protecció davant dels processos de neteja i desinfecció comuns, en dificulta l'eliminació i en desencadena la persistència al llarg del temps. En conseqüència, els microorganismes que conformen aquestes estructures poden romandre al medi ambient després del sanejament (Coughlan *et al.*, 2016) i provocar deteriorament dels aliments, risc de malalties de transmissió alimentària, pèrdues econòmiques degudes al rebuig del producte contaminat i mal funcionament en els equips, com, per exemple, la ineficiència energètica causada per la formació de biofilms en superfícies de transferència de calor, entre d'altres (Téllez, 2010).

Les condicions ambientals que hi ha a les instal·lacions alimentàries propicien, en molts casos, la presència d'una comunitat microbiana molt diversa depenent del tipus d'indústria alimentària que es consideri (Ripolles-Avila *et al.*, 2019). Aquesta comunitat pot formar biofilms que alberguen múltiples espècies, incloent-hi microorganismes patògens, que podrien conduir al desenvolupament de malalties (Piera, 2003), fins a microorganismes que deterioren els aliments (Srey *et al.*, 2013; Røder *et al.*, 2016). Per això, és molt important detectar aquestes estructures, amb la finalitat de prendre decisions de manera ràpida i fiable en relació amb els procediments de neteja i desinfecció emprats a la indústria alimentària i per, posteriorment, prevenir-ne la formació (Ripolles-Avila *et al.*, 2020).

«Els biofilms són agregats de microorganismes que es mantenen adherits a una superfície viva o inerta.»

La dificultat per detectar biofilms *in situ* o amb rapidesa en complica l'eliminació, de manera que es pot propagar i agreujar la problemàtica associada a la seva existència. Alguns dels mètodes actuals requereixen un cert temps per a l'obtenció dels resultats i, per tant, la posterior presa de decisions es produeix de manera tardana. D'entre les metodologies existents per a la detecció de biofilms, destaquen les òptiques per la seva idoneïtat quant a l'obtenció de resultats immediats.

L'objectiu del present treball ha estat realitzar una cerca bibliogràfica amb la finalitat d'identificar mètodes d'anàlisi capaços de detectar, en temps real, la presència de biofilms en superfícies de la indústria alimentària. Aquest treball s'ha centrat en la revisió de literatura científica relacionada amb estudis bibliogràfics, experimentals o projectes que existeixen fins al moment, incloent-hi també documentació tècnica d'equips comercials.

2. DEFINICIÓ DE BIOFILM I ETAPES DE FORMACIÓ

Els biofilms són agregats de microorganismes que es mantenen adherits a una superfície viva o inerta. Les diferents cèl·lules que els conformen es troben unides entre si, formant una matriu extracel·lular autoproduïda. Aquesta matriu té les funcions de concentrar nutrients de l'ambient a l'interior del biofilm, impedir o dificultar la penetració d'antimicrobians, evitar la dessecació i afavorir una correcta adhesió de l'estructura a la superfície (Coughlan *et al.*, 2016). Aquesta matriu actua com a sistema de protecció i està constituïda per substàncies polimèriques extracel·lulars (EPS), entre les quals destaquen les proteïnes, els sucres i l'ADN extracel·lular (Costeron, 1995; Flemming *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2018).

La formació de biofilms inclou diverses etapes: la fase de contacte inicial, dividida en adhesió reversible i irreversible; la fase de formació de microcolònies; la fase de maduració, i la fase de dispersió. En la primera, per tal de formar el biofilm, els microorganismes han de passar de la seva forma planctònica a la sèssil, en la qual podran adherir-se a la superfície inicialment amb caràcter reversible. Seguidament els bacteris comencen a crear adhesions permanents i converteixen la unió en ir-

reversible. Posteriorment, es produeix la formació de microcolònies, que es relaciona amb un elevat creixement de microorganismes, juntament amb la producció d'EPS, la qual cosa genera una matriu extracel·lular que ajuda a enfortir les unions amb la superfície i protegeix davant qualsevol estrès ambiental. La fase de maduració és probablement l'etapa més llarga i estable del procés i en la qual s'acaba de consolidar la matriu. També és la que està més relacionada amb els possibles problemes en entorns agroindustrials, com s'ha descrit anteriorment. Finalment, en la fase de dispersió, a causa de diversos factors interns o externs, les cèl·lules o petits grups de cèl·lules es desprenen de la superfície del biofilm per, així, perpetuar la seva vida en una altra ubicació (Coughlan *et al.*, 2016; González-Rivas *et al.*, 2018; Jiménez, 2019).

Els biofilms poden estar formats per una sola o per múltiples espècies, tot i que en la indústria alimentària solen ser més freqüents els multiespècie (Gutiérrez *et al.*, 2016). Els biofilms multiespècie proporcionen una major resistència als biocides i als canvis ambientals respecte a les comunitats monoespècie (Giaouris *et al.*, 2015). Això es deu a una major complexitat de l'estructura generada i a la composició de la matriu (González-Rivas *et al.*, 2018). Conèixer tant la possible existència de molècules comunes en matrius multiespècie com les pròpies d'una sola espècie permet desenvolupar mètodes específics que detectin l'existència d'aquestes substàncies i, per tant, es pugui correlacionar amb la presència d'aquestes estructures en les superfícies industrials.

L'èxit en l'eliminació dels biofilms depèn fonamentalment de la seva detecció primerenca, ja que, en funció d'aquesta, es prendran les decisions adients per definir els procediments idonis per eliminar-los. Alhora, tant el tipus de procediment a aplicar com el mètode òptim de detecció utilitzat dependran estretament de la composició de la matriu (Coughlan *et al.*, 2016; Ren *et al.*, 2018). Tal com s'observa, totes aquestes intervencions estan estretament interrelacionades.

A continuació, es presenta la taula 1, en què s'exposen les característiques de composició de la matriu de tres microorganismes seleccionats per la seva presència habitual en superfícies industrials i per la seva rellevància pel que fa a innocuïtat (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*) i deterioració (*Pseudomonas* spp.) (Navia *et al.*, 2010; Yang-En Tan *et al.*, 2014; Møretrø i Langsrud, 2017). D'aquesta manera, es posa de manifest la variabilitat de les matrius que generen aquests microorganismes i la complexitat en el seu estudi específic.

La distinta naturalesa i varietat en la composició de matrius generades pels microorganismes que conformen els biofilms constitueixen un camp en desenvolupament actiu, la qual cosa fa complexa la comparació de resultats en aquests moments. Per això, mitjançant la taula 1, no es poden extreure conclusions o tendències generalitzables, si bé il·lustra la complexitat i dificultat d'identificar components comuns o específics. No obstant això, seria interessant en un futur aprofundir en els compostos espe-

Taula 1. Composició de la matriu exopolimèrica de *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. i *Listeria monocytogenes*

MICROORGANISME	PROTEÏNES	POLISACÀRIDS	ALTRES
<i>Salmonella</i> spp.	Fibres amiloides («fibres curli»)ª Adhesines (Fim, Lpf, tipus IV pili, ShdA, MisL, SadA, SiiE y BapA)ª	Cel·lulosa (poli-B-(1->4)-D-glucosa) Àcid colànic (subunitats de D-glucosa, L-fucosa, D-galactosa, i sucres dels àcids de D-glucurònic amb O-acetil i piruvat) Antigen Oª	ADN extracel·lular
<i>Pseudomonas</i> spp.	Di-GMP cíclicc	Alginat Psl Pel Ramnolípids (diramnolípids, monoramnolípids, i àcids alcanòics (HAAs))c	ADN extracel·lular
<i>Listeria monocytogenes</i>	InlA, BapL, PlcA, FlaA, PBP, ActA, Lmo2504d,e	poli-B-(1,4)-N-acetilmanosamina (poly-NAM) Àcids teicoics (WTA i LTA)d	ADN extracel·lular, Àcids grassos (iso-C14:0, anteiso-C15:0 i iso-C16:0)d

Nota: a. Choong *et al.*, 2016; b. Maruzani *et al.*, 2019; c. Kim i Lee, 2016; d. Colagiorgi *et al.*, 2016; e. Colagiorgi *et al.*, 2017.

Font: Elaboració pròpia.

cífics trobats per tal de determinar si en la seva estructura química existeixen compostos comuns que puguin esdevenir dianes de detecció.

3. MÈTODES DE MOSTREIG I ANÀLISI DE SUPERFÍCIES

Els microorganismes, incloent-hi els capaços de generar biofilms, es troben en totes les baules de la indústria alimentària, de manera que en moltes ocasions colonitzen llocs de difícil accés per a les accions de neteja i desinfecció, amb la qual cosa garanteixen la seva persistència. És freqüent trobar-los a l'interior d'esquerdes, racons, punts cecs de circuits i juntes, entre altres localitzacions. Aquests constitueixen els punts de control crítics en matèria d'higiene d'instal·lacions.

Els mètodes d'anàlisi de superfícies poden requerir o no una obtenció prèvia de mostra segons que siguin indirectes o directes. Els mètodes de mostreig es basen en procediments establerts per a la recollida i obtenció de les mostres. Els més emprats en la indústria alimentària són la presa de mostra mitjançant esponges, hisops, plaques de contacte i laminocultius, que són de fàcil ús, assequibles i ràpids. Aquests presenten una limitació a l'hora d'examinar superfícies completes, ja que habitualment la mostra es pren en una àrea molt reduïda (Ismail *et al.*, 2013). Aquest fet, sumat a la dificultat afegida que genera la presència de biofilms, els quals impedeixen l'extracció adequada dels microorganismes, pot derivar en un recompte o identificació incomplets (González-Rivas *et al.*, 2018). La finalitat de les anàlisis microbiològiques de les superfícies industrials és detectar o quantificar una possible contaminació per tal de comprovar posteriorment que els paràmetres higiènics es mantenen dins dels marges segurs. Les anàlisis de tipus directe proporcionen una base adequada per al desenvolupament de noves metodologies de detecció *in situ*.

4. CLASSIFICACIÓ DELS MÈTODES ANALÍTICS PER DETECTAR O QUANTIFICAR BIOFILMS

Existeix un ampli ventall de mètodes analítics de detecció i quantificació de biofilms vigents, que poden ser classificats des de diferents punts de vista. Per tal de facilitar l'assoliment dels objectius plantejats en aquest treball i amb l'objectiu de discriminar entre els mètodes, s'ha plantejat una classificació (taula 2) basada en els paràmetres escollits següents:

1. Directes/indirectes: segons si requereixen o no una obtenció prèvia de mostra. En els indirectes, s'indica el mètode emprat per a la recollida de mostres.
2. Naturalesa de la mesura: segons si és un mètode òptic, microscòpic, tèrmic, enzimàtic, entre d'altres.
3. Qualitatius/quantitatius: si únicament detecten o, addicionalment, quantifiquen els microorganismes presents.
4. «Temps real» / diferit: en funció de si el temps d'espera per obtenir el resultat de l'anàlisi és prou curt per poder prendre accions immediates sobre el procés (a temps real) o no (diferit).

Entre els mètodes destacats, el recompte en placa, la bioluminescència d'ATP i el BioFinder són els més àmpliament utilitzats en la indústria alimentària per la seva simplicitat. Els dos últims es caracteritzen per la seva rapidesa i utilitat en la presa de decisions *in situ*. L'inconvenient de la bioluminescència d'ATP és que no és específica exclusivament per a biofilms, sinó que també detecta la presència de matèria orgànica (Davidson *et al.*, 1999). Tanmateix, el BioFinder tindria una especificitat més elevada en la detecció de biofilms gràcies al seu principi de detecció basat en l'activitat catalasa (Ripolles-Avila *et al.*, 2018). No obstant això, segons aquest darrer estudi, el límit de detecció del mètode se situa al voltant de 10^4 UFC·cm². Per aquest motiu, el desenvolupament de mètodes més sensibles que permetin reduir aquests límits de detecció és d'alt interès.

El cost elevat d'alguns dels dispositius i el llarg temps d'espera per a l'obtenció de resultats de la majoria dels altres mètodes presentats a la taula 2 han impedit implantar-los de manera generalitzada en la indústria alimentària. Tot i així, n'han trobat aplicació en centres d'investigació (Azeredo *et al.*, 2017).

Una presa de decisions encertada i una prevenció àgil requereixen mètodes més específics i amb una resposta ràpida que satisfacin aquestes necessitats de la indústria. Els sensors òptics compleixen aquests requisits, ja que són eines potents per a la mesura en temps real de canvis fisicoquímics. Aquests dispositius presenten diversos avantatges, com ara la capacitat de monitoratge (és a dir, la determinació dinàmica de dades en funció del temps), la versatilitat, la rapidesa, el baix cost, la facilitat d'instal·lació i manteniment, així com el fet de no ser destructius ni invasius, fet que els converteix en eines ideals de control. L'aposta per aquest tipus de metodologia òptica

Taula 2. Classificació de mètodes analítics per detectar o quantificar biofilms

MÈTODE	PARÀMETRES DE CLASSIFICACIÓ			
	DIRECTE (D) / INDIRECTE (I)	NATURALES DE LA MESURA	QUALITATIU / QUANTITATIU	TEMPS REAL (R) / DIFERIT (D)
Turbidimetria	I ^a	Òptic	Quantitatiu	R
Impedimetria	I ^a	Òptic	Qualitatiu	R
Epifluorescència	D/I	Òptic	Qualitatiu i quantitatiu	R
Fluorescència per hibridació <i>in situ</i> (FISH)	I	Òptic	Qualitatiu	D
Bioluminescència del trifosfat d'adenosina (ATP)	I ^b	Òptic	Quantitatiu	R
Mètodes immunològics (ELISA)	I ^a	Colorimètric (òptic), enzimàtic	Qualitatiu	D
Microscopi electrònic de rastreig	D/I	Imatges microscòpiques generades mitjançant feix d'electrons	Qualitatiu	D
Espectrofotòmetre d'infraroig amb transformada de Fourier	D/I	Òptic	Qualitatiu i quantitatiu	R
Microscòpia confocal làser (CLSM)	D/I	Òptic	Qualitatiu i quantitatiu	R
BioFinderc	D	Enzimàtic-químic	Quantitatiu	R
Biosensors	D	Electroquímic, òptic, piezoelèctric, termomètric	Quantitatiu	R
Recompte en placa	I ^a	Microbiològic	Quantitatiu	D

Nota: *a.* Hisop, esponja, plaques de contacte o sensors de control d'higiene (SCH); *b.* només hisop; *c.* equip comercial.

Font: Elaboració pròpia.

constitueix una via de recerca amb gran potencial, ja que satisfà els requisits necessaris per al control de processos en la indústria alimentària i proporciona una sèrie de beneficis pel que fa a la seva implementació dins de la cadena de producció, al temps d'anàlisi i a la posterior presa de decisions (Castillo, 2010).

5. MÈTODES ÒPTICS I LA SEVA CLASSIFICACIÓ

Els mètodes òptics mesuren les interaccions entre l'energia electromagnètica i la matèria. Un dels paràmetres més habituals per caracteritzar aquesta energia és la longitud d'ona. L'energia electromagnètica emprada per realitzar determinacions òptiques és diversa en funció de la regió de l'espectre seleccionada. L'espectre electromagnètic (figura 1) està constituït pel conjunt de totes les ones electromagnètiques conegudes, classificades atenent la seva longitud d'ona, freqüència, nombre d'ona o energia i formant un espectre continu. Inclou els raigs

gamma, raigs X, la radiació ultraviolada, la llum visible, la radiació infraroja, la de microones i, fins i tot, les ones de radiofreqüència (*Gran enciclopèdia catalana*, 1987; Allison, 2013). Les regions de l'espectre emprades més sovint en l'aplicació de mètodes òptics són la ultraviolada i la visible. La primera, caracteritzada per les seves baixes longituds d'ona, altes freqüències i energia, s'utilitza per excitar les molècules de les mostres subjectes a avaluació. La segona, en canvi, es caracteritza per longituds d'ona més llargues i menor freqüència i energia, i és absorbida, reflectida o transmesa per les mostres un cop excitades. Aquesta última, a més, és la regió utilitzada per a les determinacions de color.

Els mètodes òptics d'anàlisi es poden dissenyar per mesurar la capacitat de diverses matrius tant sòlides com líquides per absorbir energia electromagnètica, per emetre'n quan són excitats per una font d'energia o per dispersar radiació. En aquest context, és possible classificar els mètodes òptics segons el seu caràcter espectroscòpic (Douglas *et al.*, 2008; Ferrusola, 2018):

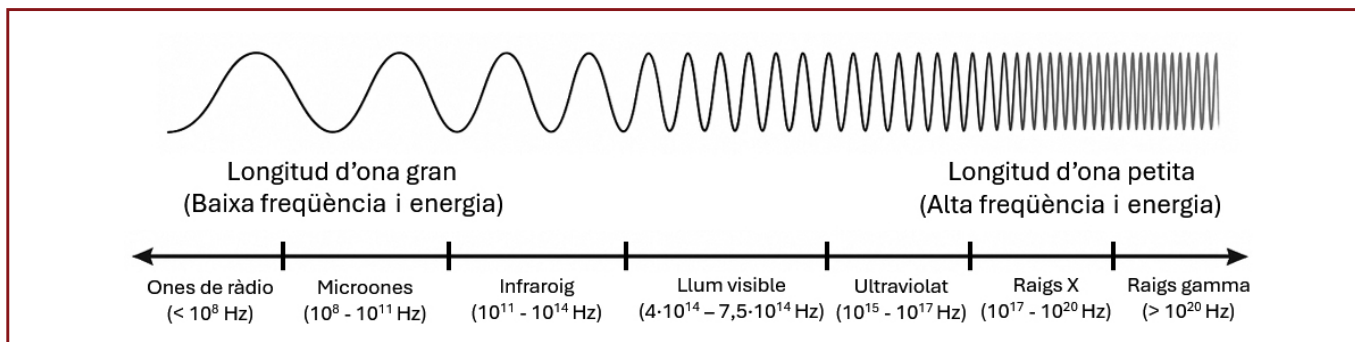


Figura 1. Espectre electromagnètic.

Font: Elaboració pròpia.

1. Espectroscòpics: Són aquells en què existeix un intercanvi d'energia entre la radiació electromagnètica i la matèria mitjançant dos tipus d'interacció.

- a. Absorció
 - i. Nivell molecular: UV visible, infraroig i microones.
 - ii. Nivell atòmic: absorció atòmica i raigs X.
- b. Emissió
 - i. Nivell molecular: luminescència (fluorescència i fosforescència).
 - ii. Nivell atòmic: espectrometria d'emissió, fotometria de flama, plasma d'acoblament inductiu (ICP), fluorescència de raigs X i fluorescència atòmica.

2. No espectroscòpics: En aquests mètodes no hi ha intercanvi d'energia, sinó que es produeixen canvis en la direcció o en les propietats físiques de la radiació electromagnètica. Aquests canvis són:

- a. Dispersió: turbidimetria i nefelometria.
- b. Refracció: refractometria, interferometria.
- c. Difracció: raigs X, electrons.
- d. Rotació òptica: polarimetria, dicromisme circular.

6. MÈTODES POTENCIALMENT APLICABLES A LA INDÚSTRIA ALIMENTÀRIA PER A LA DETECCIÓ DE BIOFILMS *IN SITU*

Després de la cerca bibliogràfica realitzada, no s'ha trobat una taula de classificació dels mètodes de detecció *in situ* existents. Per aquest motiu, a continuació es presenta una proposta de classificació de mètodes potencialment aplicables a la indústria alimentària per a la detecció de biofilms (taula 3). Tal com es pot observar, aquesta classificació s'obté atenent diferents aspectes com ara la recollida de la mostra (*in-line* / *off-line* / *at-line*), la naturalesa de la mesura, si la determinació és en temps real o en diferit, la identificació del sensor o equip, i el principi de detecció.

Per a la realització de la cerca es van emprar una sèrie de paraules clau, que s'especifiquen a continuació:

biofilm detection, biofilm detection methods, biofilm detection methods food industry, biofilm detection optical methods, fluorescence biofilm detection, real time biofilm detection, in situ biofilm detection, biofilm visualization, observation biofilms, biofilm evidence.

Taula 3. Classificació dels mètodes potencialment aplicables per a la detecció de biofilms en la indústria alimentària

MESURA	MECANISME	LECTURA	EQUIP	ANÀLISI
In-line	Ones electromagnètiques	Temps real (<i>in situ</i>)	Xip polimèric (<i>lab-on-a-chip</i>)	Variacions d'absorbància de la llum
			Sensor UV-LED	Fluorescència
			Sensor ETT	Lectura de l'espectre de transmissió
	Ones acústiques	Temps real (<i>in situ</i>)	Sensor SAW	Canvi de freqüència ressonant
At-line	Ones electromagnètiques	Temps real (<i>in situ</i>)	Bactiscan™	Fluorescència
Off-line	Ones electromagnètiques	En diferit	FISH	Fluorescència
			CLSM	Fluorescència

Font: Elaboració pròpia.

La cerca inicial va permetre seleccionar un total de quaranta-vuit articles científics i informació tècnica sobre diversos equips comercials, que es van filtrar segons la naturalesa del mètode de detecció (òptic) i la seva aplicabilitat en la indústria, i se'n van descartar vint-i-dos. Un mètode no òptic es va conservar en aquesta fase preliminar, ja que complia la major part dels requisits plantejats i presentava un gran potencial. En un segon filtratge, centrat en mètodes *in situ* i *in-line*, van quedar seleccionats sis articles científics més un equip comercial. En la taula 3 s'inclouen els set mètodes seleccionats, però només els cinc amb major aplicabilitat per a un ús *in situ*. Juntament amb l'equip comercial, es descriuen en els subapartats 6.1 a 6.5.

6.1. Xip polimèric (*lab-on-a-chip*)

Aquest prototip, proposat per Antúnez (2015), està basat en les variacions d'absorbància de la llum en el rang de longituds d'ona comprès entre 600 i 900 nm. Els seus avantatges principals són: robustesa, simplicitat, alta sensibilitat i baix cost.

El sistema de detecció contínua, amb una alta sensibilitat, consisteix en un xip polimèric de baix cost (*lab-on-a-chip*) per a la detecció selectiva dels biofilms en els primers estadis de la seva formació utilitzant una interfície aigua-biofilm. Per dur a terme les mesures òptiques es va fer servir un espectròmetre de fibra òptica acoblat al xip polimèric, i la mostra s'il·luminava mitjançant una font de llum halògena.

El xip microfluídic és de polimetacrilat de metil estructurat en dues capes. La capa inferior conté els elements òptics, concretament dues guies d'ones, una enfront de l'altra, a una distància de 300 µm. Entre totes dues guies d'ones, el xip presenta un patró micromètric per promoure l'adhesió bacteriana i la posterior formació en el temps de biofilms. La capa superior conté els elements microfluídics, que són un canal fluídic gravat amb làser i la corresponent entrada/sortida fluídica.

El principi de detecció es fonamenta en el mesurament de les variacions de pèrdua d'acoblament entre les dues guies d'ones com a conseqüència de canvis en l'índex de refracció en l'àrea de detecció. En tenir un índex de refracció efectiu més alt que l'aigua, qual-sevol capa de biofilm existent que connecti totes dues guies d'ones sense interrupcions redueix l'angle d'obertura del feix de llum procedent de la guia d'ones recta, i així augmenta el nombre de fotons acoblats a la guia d'ones corbada.

La formació de biofilm en l'àrea de detecció (entre ambdues guies d'ones) produeix un gran augment inicial en la magnitud de l'absorbància, a causa dels canvis en l'índex de refracció esmentats, seguit d'una disminució important quan els biofilms cobreixen completament aquesta àrea (àrea de detecció). Associat a aquests canvis d'absorbància es relacionen canvis de resposta espectral del biofilm, que proporcionen un avantatge addicional a la detecció. Aquest comportament teòric, descrit per l'autor, permet la diferenciació entre biofilms i incrustacions salines (la interferència més comuna en el monitoratge de biofilms), ja que els biofilms confinen la llum i en canvi les incrustacions de sal la dispersen. El llinar de detecció es va establir en 40 cèl·lules adherides per µm².

6.2. Sensor UV-LED

Aquest mètode, proposat per Fischer *et al.* (2012), es basa en la detecció de la fluorescència intrínseca del biofilm. Els seus avantatges principals són: baix consum d'energia, baix cost econòmic, alta sensibilitat, resposta ràpida, flexibilitat i robustesa. El disseny es basa en un tub fotomultiplicador que s'utilitza per a la detecció de la llum, un capçal sensor amb una superfície transparent on s'estableix el biofilm, una font de llum i una fibra òptica recol·lectora.

El biofilm format sobre una superfície transparent és retroil·luminat mitjançant un UV-LED d'ona contínua (emissió no polsada a 280 nm amb un angle d'obertura de 120°). La llum de fluorescència emesa pel biofilm es recull i es guia mitjançant 540 fibres òptiques multimode de sílice (diòxid de silici) foses, cadascuna amb un diàmetre de nucli de 185 µm. La longitud d'ona d'excitació es va seleccionar perquè coincidís amb el màxim d'absorció del triptòfan (280 nm).

Aquest sistema de detecció òptica és capaç de monitorar biofilms des de les primeres cèl·lules d'unió (amb un llinar mínim de detecció de 4.000 cèl·lules bacterianes · cm⁻²) fins a un biofilm complex completament desenvolupat. Fischer *et al.* (2012) plantegen millores i actualitzacions del sensor. Per exemple, es podria implementar fàcilment la detecció multicanal basada en matrius de LED que operen a diferents longituds d'ona d'excitació o mesuraments de fluorescència resolts espectralment mitjançant la integració de diversos microespectròmetres sensibles en els rangs d'emissió corresponents. Tal millora permetria, almenys teòricament, el mesurament simultani de la biomassa i l'activitat cel·lular mitjançant determinació combinada de fluorescència de triptòfan i trifosfat d'adenosina (ATP).

6.3. Sensor endotraqueal (endotraqueal tube sensor, ETT)

El sensor endotraqueal proposat per Kurmoo *et al.* (2020) es basa en la lectura de l'espectre de transmissió (lectura entre 600-1.000 nm) generat per modificacions de l'índex de refracció. Els seus principals avantatges són: robustesa, petita grandària, baix cost econòmic, facilitat de fabricació i capacitat de quantificar la biomassa.

Aquest desenvolupament mèdic proposa un mètode sensible per a la detecció de la colonització microbiana de dispositius en etapes primerenques, per prevenir el desenvolupament d'infeccions greus en pacients intubats. Es va utilitzar un tub endotraqueal (ETT) amb un sensor de fibra òptica incorporat en el seu lumen (figura 2).

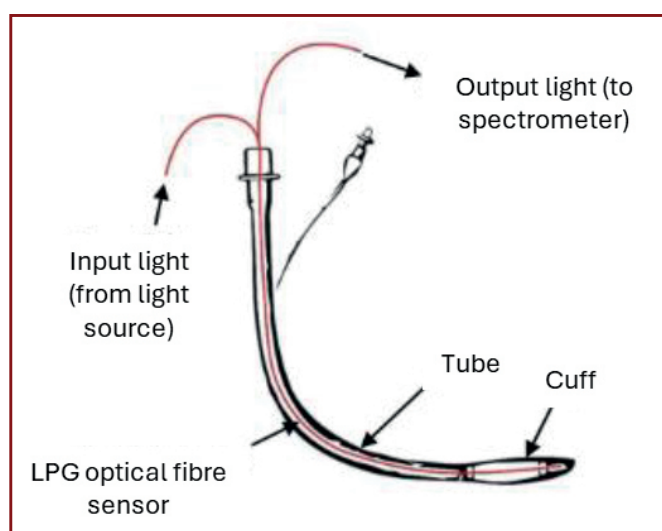


Figura 2. Esquema del sensor ETT.

Font: Kurmoo *et al.*, 2020, amb llicència Creative Commons Reconeixement (CC by 3.0).

Les variacions en l'índex de refracció del medi, com a conseqüència de l'adhesió bacteriana o de la producció d'EPS propers a la superfície del sensor, provoquen canvis de senyal mesurables. Aquests canvis de senyal de l'espectre de transmissió de sortida són recollits per un espectròmetre i enviats a un ordinador. La forta correlació exponencial observada entre la inversa de la biomassa i la resposta espectral va demostrar que el canvi de longitud d'ona (desplaçament dels pics d'atenuació en funció de l'acumulació de biomassa) podria emprar-se com una mesura precisa de la formació de biofilms. Aquesta correlació es va establir a través del monitoratge paral·lel del canvi de longitud d'ona de les bandes d'atenuació (resposta espectral) i la mesura de biomassa amb microscòpia confocal 3D del creixement de *Pseudomonas aeruginosa* (utilitzada com a referència). El sensor té

un límit de detecció de $81 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$ i també pot detectar la pèrdua de massa del biofilm, fet que possibilita verificar l'eficàcia dels tractaments d'eliminació aplicats. Aquest mateix principi de mesura podria adaptar-se a entorns alimentaris, col·locant la sonda en superfícies per tal de detectar biofilms tant en la producció d'aliments líquids com sòlids.

6.4. Bactiscan™

Aquest dispositiu, creat per EIT International, es basa en la detecció per fluorescència. Els avantatges principals que presenta són: robustesa, facilitat d'ús, portabilitat i escassa necessitat de capacitació de l'operador.

Bactiscan™ consisteix en una font de llum portàtil que utilitza un feix de llum d'alta intensitat de quatre longituds d'ona combinades que treballa, en alternança, en els marges de l'espectre UV. Les longituds d'ona específiques que il·lumina la mostra fan que uns certs components del biofilm emetin fluorescència de color turquesa o verd. Permet il·luminar una gran superfície i obtenir un resultat immediat, no destructiu, que revelarà la presència (cèl·lules viables i no viables) de biofilms, floridures, bacteris i altres contaminants en una multitud d'àrees de la indústria alimentària, mèdica i veterinària sense necessitat de productes químics o reactius addicionals o consumibles.

Està dissenyat per detectar la capa S o capa superficial de proteïna que embolcalla els bacteris. Aquesta capa està formada per una matriu bidimensional de proteïnes que presenta una estructura cristal·lina. Les anàlisis d'aminoàcids van revelar que les proteïnes de la capa S d'organismes de diferents branques filogenètiques són bastant similars en la seva composició general. Normalment, les proteïnes de la capa S posseeixen un alt contingut d'aminoàcids àcids i hidròfobs (Fagan i Fairweather, 2014). Les longituds d'ona, una vegada fusionades, rebotaran en l'estructura cristal·lina de la proteïna i emetran la inconfusible llum turquesa-verda (Pawlowsky i Perez, 2012; Limburn, 2020). És necessari indicar, però, que els aminoàcids aromàtics fenilalanina, tirosina i triptòfan presenten fluorescència a 284, 302 i 340 nm, respectivament (Ayala, 2018), la qual cosa suggereix que el mecanisme de fluorescència en què es basa la tecnologia és complex.

6.5. Sensor d'ona acústica de superfície (sensor SAW)

Encara que no és un sistema de mesura òptica, el sensor SAW proposat per Kim *et al.* (2012) compleix els altres

requisits de la cerca realitzada (mesura *in situ*, en continu...) i presenta grans qualitats, motiu pel qual s'ha decidit incloure'l en el present treball.

El sensor SAW està basat en el canvi de freqüència ressonant. Els seus principals avantatges són: alta sensibilitat, baix consum energètic, transmissió de dades i possibilitat de càrrega sense fil, és reutilitzable (ecològic), rendible amb plasma d'oxigen) i està construït amb materials biocompatibles.

El sensor desenvolupat permet el monitoratge en temps real de la formació i creixement d'un biofilm mitjançant un model que replica els creixements que tenen lloc en un sèrum animal o un mitjà de creixement. Està constituït per primes capes piezoelèctriques d'òxid de zinc (ZnO) passivades amb una fina pel·lícula biocompatible d'òxid d'alumini (Al₂O₃) per protegir la seva superfície de la corrosió dels líquids i per dos transductors interdigitals (IDT).

La funció principal dels IDT és convertir els senyals elèctrics en ones acústiques de superfície (SAW) i viceversa, mitjançant la generació de forces mecàniques distribuïdes periòdicament a través de l'element piezoelèctric (ZnO). En els estudis a llarg termini com aquest, és necessari invertir la posició del sensor per evitar la corrosió dels metalls dels IDT exposats directament a l'entorn líquid.

El sensor pot detectar canvis en la massa o la viscositat del biofilm a causa de l'atenuació de la velocitat d'ona acústica, que provoca un canvi en la freqüència ressonant. Les freqüències detectades pel sensor IDT s'analitzen en un equip digital i el tractament de dades es fa a través d'un programa informàtic.

La pel·lícula de ZnO utilitzada en aquest sistema genera una velocitat d'ona acústica de 4814 m · s⁻¹ i les freqüències d'operació del sensor SAW són de 401 a 406 MHz, dissenyades per complir la regulació establerta per la Comissió Federal de Comunicacions per a futures aplicacions de detecció de biofilms en entorns mèdics.

El límit de detecció obtingut pel sensor va ser d'aproximadament 5,3 pg. Atès que la massa d'un bacteri és

d'aproximadament 1 pg (Davis *et al.*, 1973), aquest límit de detecció confirma l'aplicació del sensor SAW per al monitoratge de biofilms bacterians.

7. CONCLUSIONS

Sobre la base dels estudis científics trobats, s'han observat dues clares tendències: d'una banda, la utilització de sensors de fibra òptica situats en superfícies o a l'interior de conduccions i equips, i, d'una altra banda, la seva detecció en superfícies externes basada en la utilització de dispositius portàtils que en permeten la visualització mitjançant fluorescència. Tots aquests sensors que proporcionen lectures *in situ* i en temps real són candidats idonis per monitorar de manera automàtica i comprovar que els protocols de neteja i desinfecció tant aplicats a superfícies com en equips dotats de CIP (*Cleaning In Place*) han estat efectius en l'eliminació de biofilms i, en cas contrari, permeten que la presa de decisions correctores sigui ràpida.

Tenint en compte que tots aquests mètodes tenen o poden tenir aplicabilitat en la indústria alimentària, la millor opció per tenir sota control la problemàtica dels biofilms en una empresa seria combinar l'ús d'almenys dos mètodes: un de fix, basat en sensors que permeti el monitoratge de l'interior d'una canonada o qualsevol element de difícil inspecció, i un altre de portàtil, que permetés analitzar de manera ràpida totes les superfícies d'interès. Aquest últim podria ser BactiscanTM, ja que amb ell es pot inspeccionar grans àrees i nombrosos equips de producció. No obstant això, com que no està dissenyat per integrar-lo en sistemes automàtics de control, el seu ús i interpretació requereixen personal tècnic.

Com a exemple de sensor fix es triaria una adaptació del sensor ETT, ja que, a banda de tenir la capacitat de detectar els primers estadis de la colonització de biofilms, pot monitorar i quantificar tant el seu creixement com la seva pèrdua. A l'hora de decidir cap on enfocar el disseny d'un nou mètode «ideal» a partir de la informació recopilada, els mètodes basats en sensors de fibra òptica per fluorescència podrien ser els més atractius, ja que amb ells s'obre un ampli camp de recerca no sols cap a la detecció de biofilms, sinó cap a la identificació de les espècies que el conformen mitjançant la caracterització de fluoròfors presents en la paret cel·lular i matriu exopolimèrica, de manera que, utilitzant diferents longituds d'ona, es poguessin identificar les diferents espècies bacterianes.

«El sensor SAW està basat en el canvi de freqüència ressonant.»

REFERÈNCIES

- ALLISON, R. R. (2013). «The electromagnetic spectrum: current and future applications in oncology». *Future Oncology* [en línia], 9 (5), p. 657-667. <<https://doi.org/10.2217/fon.13.12>>.
- ANTÚNEZ, B. (2015). *Early detection of biofilms using low-cost polymeric optical lab-on-a-chip*. Tesi de màster. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria de Telecomunicació de Barcelona. <<https://upcommons.upc.edu/handle/2117/78457>> [Consulta: 15 abril 2025].
- AYALA, O. (2018). *Application of native fluorescence tracers for quick evaluation of thermal damage in milk*. Tesi doctoral. Universitat Autònoma de Barcelona.
- AZEREDO, J.; AZEVEDO, N. F.; BRIANDET, R.; CERCA, N.; COENYE, T.; COSTA, A. R.; STERNBERG, C. (2017). «Critical review on biofilm methods». *Critical Reviews in Microbiology* [en línia], 43 (3), p. 313-351. <<https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>>.
- CASTILLO, M. (2010). «Incorporación de sensores ópticos al procesado de alimentos». A: AUCEO, S.; CASTILLO, M.; DARNE, J. M.; ESCRIU, R.; GALET, A.; GUAMIS, B.; RODRÍGUEZ, O.; TORRES, D. V. *Tecnologías transversales de interés para las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética*. Madrid: International Marketing & Communication, SA, p. 89-107.
- CHOONG, F. X.; BÄCK, M.; FAHLÉN, S.; JOHANSSON, L. B.; MELICAN, K.; RHEN, M.; NILSSON, K.; RICHTER-DAHLFORS, A. (2016). «Real-time optotracing of curli and cellulose in live *Salmonella* biofilms using luminescent oligothiophenes». *NPJ Biofilms and Microbiomes* [en línia], 2, 16024. <<https://doi.org/10.1038/npjbiofilms.2016.24>>.
- COLAGIORGI, A.; BRUINI, I.; DI CICCIO, P. A.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. (2017). «*Listeria monocytogenes* biofilms in the wonderland of food industry». *Pathogens* [en línia], 6 (3), 41. <<https://doi.org/10.3390/pathogens6030041>>.
- COLAGIORGI, A.; DI CICCIO, P. A.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. (2016). «A look inside the *Listeria monocytogenes* biofilms extracellular matrix». *Microorganisms* [en línia], 4 (3), 22. <<https://doi.org/10.3390/microorganisms4030022>>.
- COSTERTON, J. W. (1995). «Overview of microbial biofilms». *Journal of Industrial Microbiology* [en línia], 15 (3), p. 137-140. <<https://doi.org/10.1007/BF01569816>>.
- COUGHLAN, L. M.; COTTER, P. D.; HILL, C.; ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ, A. (2016). «New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (Bio)control of bacterial biofilms in the food industry». *Frontiers in Microbiology* [en línia], 7, 1641. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01641>>.
- DAVIDSON, C. A.; GRIFFITH, C. J.; PETERES, A. C.; FIELDING, L. M. (1999). «Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing». *Luminescence* [en línia], 14, p. 33-38. <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1522-7243\(199901/02\)14:1<33::AID-BIO514>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1522-7243(199901/02)14:1<33::AID-BIO514>3.0.CO;2-I)>.
- DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, N.; GINSBERG, H. S. (1973). *Bacterial physiology: microbiology*. 2a ed. Maryland: Harper and Row, p. 96-97.
- DOUGLAS, A.; JAMES, F.; STANLEY, R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. 6a ed. Mèxic: Cengage Learning, p 1001.
- FAGAN, R. P.; FAIRWEATHER, N. F. (2014). «Biogenesis and functions of bacterial S-layers». *Nature Reviews: Microbiology* [en línia], 12 (3), p. 211-222. <<https://doi.org/10.1038/nrmicro3213>>.
- FERRUSOLA, E. (2018). *Aplicación de métodos ópticos para la determinación de los parámetros de calidad de la carne*. Treball de final de grau. Universitat Autònoma de Barcelona.
- FISCHER, M.; WAHL, M.; FRIEDRICH, G. (2012). «Design and field application of a UV-LED based optical fiber biofilm sensor». *Biosensors and Bioelectronics* [en línia], 33 (1), p. 172-178. <<https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.12.048>>.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. (2016). «Biofilms: an emergent form of bacterial life». *Nature Reviews: Microbiology*, 14 (9), p. 563-575. <<https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>>.
- GIAOURIS, E.; HEIR, E.; DESVAUX, M.; HEBRAUD, M.; MØRETRO, T.; LANGSRUD, S.; DOULGERAKI, A.; NYCHAS, G.-J.; KACANOVA, M.; CZACZYK, K.; OLMEZ, H.; SIMOES, M. (2015). «Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens». *Frontiers Microbiology* [en línia], 6, 841. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>>.
- GONZÁLEZ-RIVAS, F.; RIPOLLES-AVILA, C.; FONTECHA-UMAÑA, F.; RÍOS-CASTILLO, A. G.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2018). «Biofilms in the spotlight: Detection, quantification, and removal methods». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [en línia], 17 (5), p. 1261-1276. <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12378>>.
- GRAN ENCICLOPÈDIA CATALANA. (1987). «Espectre electromagnètic» [en línia]. <<https://www.enciclopedia.cat/ec-gec-0153201.xml>> [Consulta: 15 abril 2025].
- GUTIÉRREZ, D.; HIDALGO-CANTABRANA, C.; RODRÍGUEZ, A.; GARCÍA, P.; RUAS-MADIEDO, P. (2016). «Monitoring in real time the formation and removal of biofilms from clinical related pathogens using an impedance-based technology». *PLoS one* [en línia], 11 (10), e0163966. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163966>>.
- ISMAIL, R.; AVIAT, F.; MICHEL, V.; BAYON, I. le; GAY-PERRET, P.; KUTNIK, M.; FÉDÉRIGHI, M. (2013). «Methods for recovering microorganisms from solid surfaces used in the food industry: A review of the literature». *International Journal of Environmental Research and Public Health* [en línia], 10 (11), p. 6169-6183. <<https://www.mdpi.com/1660-4601/10/11/6169#>>.
- JIMÉNEZ, M. (2019). *Biofilms, microorganismos alterantes y deterioro de productos cárnicos*. Treball de final de grau. Universitat Autònoma de Barcelona.
- KIM, S. K.; LEE, J. H. (2016). «Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*». *Journal of Microbiology* [en línia], 54, p. 71-85. <<https://doi.org/10.1007/s12275-016-5528-7>>.
- KIM, Y. W.; SARDARI, S. E.; MEYER, M. T.; ILIADIS, A. A.; WU, H. C.; BENTLEY, W. E.; GHOSSI, R. (2012). «An ALD aluminum oxide passivated surface acoustic wave sensor for early biofilm detection». *Sensors and Actuators B* [en línia], 163, p. 136-145. <<https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.01.021>>.
- KURMOO, Y.; HOOK, A. L.; HARVEY, D.; DUBERN, J.-F.; WILLIAMS, P.; MORGAN, S. P.; ALEXANDER, M. R. (2020). «Real time monitoring of biofilm formation on coated medical devices for the reduction and interception of bacterial infections». *Biomaterial Science* [en línia], 8, 1464. <<https://doi.org/10.1039/c9bm00875f>>.
- LIMBURN, R. (2020). *Assessment of Bactiscan instrument for detection of food industry biofilms* [en línia]. Campden BRI: Food and Drink Innovation. <<https://www.eit-international.com/wp-content/uploads/2021/01/Bactiscan-Validation-CampdenBRI-FN.1120.pdf>> [Consulta: 15 abril 2025].
- MARUZANI, R.; SUTTON, G.; NOCERINO, P.; MARVASI, M. (2019). «Exopolymeric substances (EPS) from *Salmonella enterica*: Polymers, proteins and their interactions with plants and abiotic surfaces». *Journal of Microbiology* [en línia], 57, p. 1-8. <<https://doi.org/10.1007/s12275-019-8353-y>>.
- MØRETRO, T.; LANGSRUD, S. (2017). «Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [en línia], 16 (5), p. 1022-1041. <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>>.
- NATIONAL AERONAUTICS AND SPACE ADMINISTRATION (NASA) (2013). *Imagine the universe* [en línia]. <<https://imagine.gsfc.nasa.gov/science/toolbox/emspectrum1.html>> [Consulta: 15 abril 2025].
- NAVIA, D. P.; SAMUEL VILLADA, H.; MOSQUERA, S. A. (2010). «Las biopelículas en la industria de alimentos». *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* [en línia], 8 (2), p. 118-128. <<https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/740/367>> [Consulta: 15 abril 2025].
- PAWLOWSKY, K.; PEREZ, B. (2012). *Assessment of a novel biofilm detection device* [en línia]. Campden BRI: Food and Drink Innovation. <<https://www.eit-international.com/wp-content/uploads/2020/06/Campden-BRI-Assessment-2012.pdf>> [Consulta: 15 abril 2025].
- PIERA, G. (2003). *Estudio del biofilm: Formación y consecuencias* [en línia]. Treball de final de grau. Escola de Prevenció i Seguretat Integral. <http://www.adiveter.com/ftp_public/A1070308.pdf> [Consulta: 15 abril 2025].
- REN, Y.; WANG, C.; CHEN, Z.; ALLAN, E.; MEI, H. C. van der; BUSSCHER, H. J. (2018). «Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: Substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing». *FEMS Mi-*

crobiology Reviews [en línia], 42 (3), p. 259-272. <<https://doi.org/10.1093/femsre/fuy001>>.

RIPOLLES-AVILA, C.; HASCOËT, A. S.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. V.; CAPITA, R.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2019). «Evaluation of the microbiological contamination of food processing environments through implementing surface sensors in an iberian pork processing plant: An approach towards the control of *Listeria monocytogenes*». *Food Control* [en línia], 99, p. 40-47. <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.013>>.

RIPOLLES-AVILA, C.; MARTÍNEZ-GARCIA, M.; CAPELLAS, M.; YUSTE, J.; FUNG, D. Y. C.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2020). «From hazard analysis to risk control using rapid methods in microbiology: A practical approach for the food industry». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [en línia], 19 (4), p. 1877-1907. <<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12592>>.

RIPOLLES-AVILA, C.; RÍOS-CASTILLO, A. G.; RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. (2018). «Development of a peroxide biotector for a direct detection of biofilms produced by catalase-positive bacteria on food-contact surfaces». *CYTA - Jour-*

nal of Food [en línia], 16 (1), p. 506-515. <<https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1418434>>.

RÖDER, H. L.; SØRENSEN, S. J.; BURMÖLLE, M. (2016). «Studying bacterial multispecies biofilms: Where to start?». *Trends in Microbiology* [en línia], 24 (6), p. 503-513. <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.02.019>>.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S. D. (2013). «Biofilm formation in food industries: A food safety concern». *Food Control* [en línia], 31 (2), p. 572-585. <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>>.

TÉLLEZ, S. (2010). «Los biofilms y su repercusión en la industria alimentaria». *VISAVET Divulgación*. <<https://www.visavet.es/es/articulos/biofilms-repercusion-industria-alimentaria.php>> [Consulta: 15 abril 2025].

YANG-EN TAN, S.; CHUEN CHEW, S.; YANG-YI TAN, S.; GIVSKOV, M.; YANG, L. (2014). «Emerging frontiers in detection and control of bacterial biofilms». *Current Opinion in Biotechnology* [en línia], 26, p. 1-6. <<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.08.002>>.