

Turbulencia y Biofilm

Muchos sistemas de agua compendial, especialmente los sistemas de agua purificada (PW) o agua para inyectables (WFI) en frío, tienen sistemas de distribución extremadamente susceptibles a la colonización por biofilm.

SANTIAGO FERNANDEZ
AREA MANAGER ITALY & IBERIA EN
BWT PHARMA AND BIOTECH.

La calidad microbiológica en estos sistemas requiere el control y la eliminación de esta biopelícula y para ello es necesario combinar diversas estrategias, entre ellas, el mantenimiento de flujos turbulentos. En este artículo analizamos la eficacia de los flujos turbulentos como elemento de control del biofilm.

Biofilm

El biofilm es un agregado de microorganismos en el que todas las células están adheridas entre sí y que está normalmente anclado a una superficie que puede ser de casi cualquier material y rugosidad.

Las células presentes en el biofilm suelen estar incrustadas en una matriz de polisacáridos, conocida como EPS, que contiene azúcares y ADN, y que atrapa una enorme variedad de compuestos beneficiosos para el crecimiento bacteriano. En una etapa inicial el biofilm se adhiere de forma débil a la superficie y en fases posteriores los microorganismos presentes en el biofilm comienzan a sintetizar una serie de estructuras que le ayudan a adherirse a la superficie y a otras bacterias, formando una colonia estable.

Tras la formación de la colonia el biofilm inicia la producción de polisacáridos y forma el EPS. A partir de ese momento los microorganismos de la capa más exterior del EPS pueden aprovechar el mecanismo de dispersión que le ofrece el medio (PW o WFI) y abandonar la biopelícula y colonizar los entornos vecinos.

La matriz EPS es altamente resistente tanto a la sanitización térmica como a la sanitización química y solo es eficazmente removida si se actúa regularmente con ozono o con agua a más de 70°C o esterilizando a más de 121°C una vez el biofilm ya se ha establecido.



Dinámica del biofilm en un sistema

En los sistemas de agua compendiales se controla de forma regular las bacterias viables cultivables totales utilizando un recuento en placa heterotrófico que se realiza sobre varias muestras tomadas de puntos de uso representativos. Aun tomando múltiples muestras diarias estas representan una fracción muy pequeña de agua total en los sistemas de distribución y dado que las bacterias asociadas a la biopelícula suelen liberarse en ráfagas es posible que en muchas de esas muestras no se detectan bacterias o que la cantidad no sea representativa del biofilm que realmente existe en el sistema.

Sin embargo, una vez que el biofilm ha formado una colonia estable se observarán bacterias en las muestras de todos los puntos de uso y las lecturas en placa aumentarán, habitualmente de forma exponencial. Llegados a este punto es habitual llevar a cabo la desinfección del sistema y dado que los procesos habituales como el agua por encima de 70°C o el ozono son sólo parcialmente eficaces contra el biofilm una vez establecido¹, el proceso de contaminación del sistema se repetirá cíclicamente.

Control del biofilm en un sistema

Tal y como sugiere la EMA en su documento sobre control de biofilm², debe desarrollarse

una estrategia de control para evaluar los riesgos asociados a los procesos y determinar la aceptabilidad de las medidas de control existentes. La eficacia de los regímenes de muestreo también debe evaluarse de forma crítica junto con el desarrollo de una estrategia de control.

La estrategia de control debe tener en cuenta aspectos clave del diseño, incluyendo la rugosidad superficial, la calidad de las soldaduras y uniones, la ausencia de tramos muertos, y los procedimientos de sanitización, entre otros.

El documento también requiere que se garantice un flujo turbulento en las tuberías de un sistema de distribución. Este último requerimiento también se recoge por parte de la FDA/USP³.

El requerimiento de flujo turbulento lo encontramos también en la Guía de Ingeniería para Sistemas de Agua y Vapor de la ISPE⁴ que en particular señala que:

- En general, se reconoce que el flujo turbulento está indicado por un número de Reynolds > 4000 . Los sistemas de distribución se han diseñado a menudo para operar con velocidades de flujo nominales de ≥ 3 pies/s (0.9 m/s), lo que excede en gran medida el umbral de flujo turbulento, y, por lo tanto, puede tener un mayor detrimento en la fragilidad y el desarrollo de la biopelícula. La selección de una velocidad nominal de diseño debe basarse en especificaciones razonables teniendo en cuenta el costo de capital/operación. (8.6.2)
- Tradicionalmente, las velocidades de flujo > 5 pies/s (1.5 m/s) se han considerado la norma de diseño para los sistemas de tuberías del sistema de agua de compendio. La teoría era que un flujo de agua de mayor velocidad reduce la probabilidad de adhesión bacteriana a las superficies y, como resultado, minimiza la formación de biopelículas. Se entiende que

es poco probable que la formación de biopelículas se vea afectada de forma significativa por la velocidad, por lo que el diseño del sistema puede evaluarse de forma más adecuada en el contexto de la dinámica apropiada del sistema y la idoneidad del equipo/material. (10.4.5.5)

A pesar de que tanto los organismos reguladores como la ISPE sugieren claramente que los anillos deben ser operados en régimen turbulentos sin necesidad de ir a elevados Reynolds, muchos anillos existentes y de nuevo diseño siguen anclados en esos requerimientos de velocidad, que no solo implican consumos de energía innecesarios, sino que además son ineficaces en el control microbiológico.

Veamos los factores que afectan a la turbulencia como herramienta eficaz en el control del biofilm.

Turbulencia y cizalladura

El cálculo exacto de los flujos turbulentos en tubería es hoy por hoy imposible. Sabemos

que al pasar de ser lineal a turbulento una parte variable del fluido pasa de ser paralelo al conducto a presentar múltiples fluctuaciones con diferentes velocidades y direcciones, el resultado vectorial es una importante componente perpendicular a la línea de avance del fluido.

Esa componente normal a la dirección de avance genera fuerzas de cizalladura en las paredes de la tubería. Esas fuerzas de cizalladura son una medida de la capacidad del flujo para mantener limpia la pared de la tubería.

Por otro lado, por más turbulento que ese flujo sea, siempre queda una lámina adyacente a la pared que mantiene un flujo laminar debido a la viscosidad el fluido y al coeficiente de fricción de la pared, es la capa límite. Las partículas dentro la capa límite permanecen en esa región y el espesor de esta limita la acción del flujo turbulento sobre la pared de la tubería, por ello, el diseño de un anillo de distribución debe tener como objetivo desarrollar una fuerza de cizalladura

en la pared suficientemente alta y una capa límite suficientemente fina como medio para remover el máximo de biofilm o evitar su establecimiento.

El grosor de la capa límite es función de la ley de la fricción de Colebrook que establece la relación entre un factor de fricción (λ) y el número de Reynolds (Re) y que combinada con la ecuación de Prandtl permite calcular la fuerza de cizalladura en las paredes (t). De ese cálculo obtenemos (para una temperatura constante de 70°C y una tubería de diámetro interior 120 mm) los siguientes valores⁶:

Vh	Re	λ	t
m/s	/	/	N/m ²
0.25	30000	0.024	0.19
0.5	60000	0.020	0.63
1.0	120000	0.017	2.13
1.5	180000	0.0155	4.36
2.0	240000	0.0150	7.5

Es decir, que al incrementar la velocidad la fuerza de cizalladura se incrementa, aunque

media partner
líder del sector



F+ Farmespaña Industrial
Revista Profesional para Promotores de la Industria Farmacéutica y Biotecnológica

INDUSTRIA COSMÉTICA

energética

ECOCONSTRUCCIÓN

FARMABIOTEC
Revista de biotecnología aplicada a la salud

PI PHARMA INDUSTRIAL INDIA

energetica

📍 Pollensa, 2 - Ed. Artemisa, Of. 12 • 28290 Las Rozas (Madrid) ☎ +34 916 308 591

✉ info@grupo-omnimedia.com 🖱 grupo-omnimedia.com

no de forma proporcional y aun aumentando la velocidad en los anillos de forma sustancial la fuerza de cizalladura en la pared no pasa de 10 N/m².

De acuerdo con Riedewald⁷ la fuerza de cizalladura necesaria para evitar o remover biofilm establecido por la mayor parte de las bacterias debe ser superior a los 130N/m², estando en pocos casos por debajo de los 28 N/m².

A partir de estos datos y de sus propias observaciones, Klauer⁵ establece que el efecto del diámetro de la tubería sobre la fuerza de cizallamiento es irrelevante excepto a altas velocidades (> 2 m/s) y que la capa límite no varía sustancialmente en tamaño con independencia del número de Reynolds.

De modo que podemos establecer que a partir de que se ha formado un régimen turbulento (Re> 4000) y con independencia del diámetro y la velocidad, la fuerza de cizalladura en un anillo siempre será sensiblemente inferior a la fuerza mínima necesaria para desprender un biofilm ya formado⁷⁸.

Turbulencia y nutrientes

La mayoría de los sistemas de agua compendial existentes operan en la región de flujo turbulento mucho más allá del número de Reynolds crítico, a velocidades entre 1 y 1.5 m/s. El flujo turbulento generado favorece el transporte de nutrientes al biofilm en gran medida.⁹ A velocidades mayores a 1 m/s el biofilm se ve afectado por la mayor fuerza de cizalladura (aunque eso implica una mayor adhesión como veremos a continuación), por el contrario, a velocidades menores el transporte de nutrientes se restringe y la menor velocidad favorece una adhesión menos intensa, lo que facilita la eliminación del biofilm durante las sanitizaciones periódicas.

Por ello la tasa máxima de crecimiento de una biopelícula se producirá a velocidades de fluido de aproximadamente 1m/s, (dependiendo del tipo de bacteria).⁸

Velocidad y adhesión

La velocidad del agua en los sistemas de distribución juega un papel clave en la formación y adhesión del biofilm.

De acuerdo Tsagkari et al.¹⁰ el flujo turbulento no se correlacionaba con una reducción de las biopelículas sino que la turbulencia potencia tanto la formación inicial como el desarrollo de biopelículas en las superficies accesibles, algo que concuerda

con los estudios ya vistos previamente en este artículo.

Por otro lado¹¹ se ha demostrado que Reynolds elevados y altas fuerzas de cizalladura conducen a biopelículas más densas que son mecánicamente más estables

En flujo lineal, Tsagkari verificó que el biofilm formaba estructuras dispersas con baja densidad compuestas por muchas microcolonias con bacterias densamente empaquetadas y mantenidas juntas por EPS y con un bajo nivel de adhesión a las paredes. Por contra en flujo turbulento esas estructuras eran menos compactas formadas mayoritariamente por EPS y presentaban una forma de serpentina que seguía la línea de avance del fluido, mostrando un alto nivel de adhesión

En otro estudio, Howsam¹² verificó que entre 0,4-4 m s⁻¹, la mayor resistencia de biofilm se produce a las velocidades más altas. Al igual que observo Tsagkari, al parecer los biofilms son capaces de comprimirse bajo presión y presentan una gran resistencia a las fuerzas de cizalladura.

Finalmente, Christensen¹³ indica que el biofilm posee propiedades viscoelásticas que contribuyen a aumentar la resistencia a la fricción y posibilita que los biofilms no se desprendan a estas velocidades más altas, sino que se vuelvan más compactos y se estabilicen. Santos et al.¹⁴ observaron biofilms menos estables a velocidades bajas de 0,5 m s⁻¹, y sugirieron que se formaba un biofilm con un carácter menos robusto

En resumen

En general la mayor parte de los estudios disponibles coinciden en observar el mismo fenómeno: flujos altamente turbulentos además de proporcionar condiciones de absorción de nutrientes mejoradas, mejoran el crecimiento celular y la precipitación de compuestos que contribuyen al biofouling. También se verifica que altas velocidades de fluido generan una mayor resistencia al desprendimiento del biofilm y que a las velocidades máximas de operación de un anillo las fuerzas de cizalladura generadas son sensiblemente inferiores a las necesarias para desprender el biofilm.

El enfoque clásico para velocidades de recirculación en anillos favorece Reynolds elevados, o, de forma a más simple, establece velocidades mínimas en torno a 1,0 o 1.5 m/s, sin embargo, esta configuración no

sólo no está refrendada por las diferentes farmacopeas, organismos reguladores o la propia ISPE, sino que además se muestra contraproducente generando estructuras de biofilm más estables, más resistentes y mejor adheridas.

Una buena gestión del biofilm en el anillo pasa por definir velocidades relativamente bajas, que no provoquen esas intensas adhesiones y que deben ser combinadas con un diseño y fabricación correcta de los anillos y con sanitizaciones continuas o regulares por temperatura u ozono.

De acuerdo a los estudios y en conformidad con las recomendaciones de las farmacopeas y la ISPE el uso de Reynolds en torno a 20.000 resulta adecuado para conseguir un balance óptimo entre remoción y limitación de la adhesión del biofilm al tiempo que permite un ahorro energético significativo.

Tanto desde un punto de vista de riesgo microbiológico, como de consumo energético, muchos anillos están hoy en día funcionando o se diseñan aun de manera mejorable, y tanto por los nuevos requerimientos de control y limitación del riesgo del Anexo I de las GMPs como por la necesaria reducción del consumo energético, este es un buen momento para abordar este punto ●

1. USP <1231> WATER FOR PHARMACEUTICAL PURPOSES. 5.3.1 & 5.3.2
2. EMA Questions and answers on production of water for injections by non-distillation methods – reverse osmosis and biofilms and control strategies
3. USP <1231> WATER FOR PHARMACEUTICAL PURPOSES. 5.1.13
4. ISPE Baseline Guide-Water and Steam System Volume 4-3rd Ed-OCT-2019
5. Piping. An examination of pipe self-cleaning in high purity systems. Jörg Klauer. Ultrapure Water March 2001
6. Grasshoff 1980–Untersuchungen zum strömungsverhalten von flüssigkeiten...
7. Reidewald 1997–BIOFILMS IN PHARMACEUTICAL WATERS
8. Powell, M.S., N.K. Slater, (1982). Removal Rates of Bacterial Cells from Glass Surfaces by Fluid Shear. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 24. pp. 2527-2537.
9. Bird, Steward, Lightfoot, (1966). Transport Phenomena. John Wiley & Sons, New York.
10. E. Tsagkari et al (2017) Turbulence accelerates the growth of drinking water biofilms
11. Rochex A, Godon JJ, Bernet N, Escudie R (2008) Role of shear stress on composition, diversity and dynamics of biofilm bacterial communities. Water Res 42(20):4915-4922
12. Howsam P. 1995. A question of scale and slime. Water and Waste-water Treatment April: 39-47.
13. Christensen BE and WG Characklis. 1989. Physical and chemical properties of biofilms. In: Biofilms (Characklis WG and Marshall KC, eds), pp 93-130. John Wiley-Interscience, New York
14. Santos R, ME Callow and TR Bott. 1992. Coated surfaces in relation to biofilm formation. In: Biofilms Science and Technology (Melo TF, Bott TR, Fletcher M and Capdeville B, eds), pp 105-110. NATO series, Kluwer Academic, London.



Desde 1992, cuidando del aire que respiras.

Casi 30 años fabricando soluciones de filtración, poniendo nuestra experiencia al servicio de la protección de las personas, los procesos y el medio ambiente.



Sabemos que la calidad es fundamental. Por eso, hemos trabajado para tener las certificaciones que lo ratifican y nuestros filtros tengan la calidad que mereces.

