



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης στην εξυγίανση επιφανειών ανοξείδωτου χάλυβα με βιοϋμένια της *Listeria monocytogenes*

ΑΝΤΙΓΟΝΗ Κ. ΤΑΣΙΟΠΟΥΛΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2015





ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΙΟΤΙΚΟΥ ΕΛΕΓΧΟΥ ΚΑΙ ΥΓΙΕΙΝΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΠΟΤΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΕΠΙΣΤΗΜΗ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης στην εξυγίανση επιφανειών ανοξείδωτου χάλυβα με βιοϋμένια της *Listeria monocytogenes*

ΑΝΤΙΓΟΝΗ Κ. ΤΑΣΙΟΠΟΥΛΟΥ

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

Δροσινός Χ. Ελευθέριος, Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)
Σκανδάμης Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής
Ματαράγκας Μάριος, Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2015



ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, τα οποία προσκολλώνται σε επιφάνειες, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα και ελλοχεύει κινδύνους για τη βιομηχανία τροφίμων και τη δημόσια υγεία. Η τεχνολογία του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης αποτελεί μια νέα προσέγγιση για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση των βιοϋμενίων στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Η παρούσα μελέτη πραγματεύεται την αποτελεσματικότητα του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης που δημιουργείται από εκκενώσεις διηλεκτρικού φράγματος σε ρέον αέριο άζωτο έναντι βιοϋμενίων της *L. monocytogenes* που σχηματίζονται σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα. Μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συνθηκών πλάσματος σε βιοϋμενικούς πληθυσμούς ηλικίας 6 ημερών και αξιολογήθηκε η βιωσιμότητά τους κατόπιν της επεξεργασίας με πλάσμα τόσο με την κλασική μέθοδο απαρίθμησης αποικιών όσο και με τη μοριακή μέθοδο ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR). Από τα ευρήματα της μελέτης συμπεραίνεται ότι ορισμένα βιοϋμενικά κύτταρα κατόπιν της έκθεσής τους στην πηγή πλάσματος δεν θανατώνονται αλλά βαίνουν σε μία κατάσταση όπου παραμένουν ζωντανά αλλά μη ικανά να αναπτύξουν αποικίες σε τρυβλία. Καθώς ο μηχανισμός με τον οποίο το πλάσμα αδρανοποιεί ή/ και καταστρέφει τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε επιφάνειες δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως, αποτελεί βασική ανάγκη η συνέχιση της έρευνας με σκοπό τη διευκρίνιση αυτού του μηχανισμού.

Λέξεις κλειδιά: βιοϋμένια, *Listeria monocytogenes*, ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης, εξυγίανση

ABSTRACT

The biofilm formation by the pathogen *L. monocytogenes* attached onto surfaces is a significant problem lurking dangers for the food industry and the public health. The cold atmospheric pressure plasma technology is a new approach to control and treat in order to fight against biofilms in food processing areas. This study examines the effectiveness of cold atmospheric pressure plasma which is generated through dielectric barrier discharges by the nitrogen gas flow against *L. monocytogenes* biofilms formed on stainless steel surfaces. We studied the effect of different plasma conditions of six days old biofilm colonies and we assessed their viability as a result of treatment with plasma using both the conventional method of counting the colonies, and the molecular method of reverse transcription of polymerase quantitative chain reaction (RT-qPCR). From the findings of the study it can be concluded that some biofilm cells following the exposure to the plasma source are not killed but go to a state where they are kept live but are not capable to develop colonies on plates. Because the mechanism by which the plasma inactivates and/or destroys the microorganisms that develop and grow on surfaces has not been fully clarified, the continuation of the research aiming at clarifying this mechanism is of a great importance.

Key words: biofilms, *Listeria monocytogenes*, cold atmospheric pressure plasma, decontamination

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του Τμήματος Γεωπονικών Σπουδών του Πανεπιστημίου του Τορίνο (Department of Agricultural, Forest and Food Sciences, DISAFA) κατά το χρονικό διάστημα Νοέμβριος 2014- Μάρτιος 2015. Η μελέτη αυτή διεξήχθη στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος «Biofilm Fight» το οποίο βρίσκεται σε εξέλιξη και αναμένεται να ολοκληρωθεί τον Οκτώβριο του 2015.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα Καθηγητή, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Δροσινό Ελευθέριο για τη βοήθεια που μου προσέφερε στην παρούσα μελέτη.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Cocolin Luca Simone και την Καθηγήτρια κα Ράντσιου Καλλιόπη για την άψογη συνεργασία μας και την ευκαιρία που μου έδωσαν να ασχοληθώ με ένα πεδίο μεγάλου επιστημονικού ενδιαφέροντος όπως είναι η Τεχνολογία του Πλάσματος.

Επιθυμώ να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Επιτροπής Επίκουρους Καθηγητές, κ. Σκανδάμη και κ. Ματαράγκα για τον χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη και την αξιολόγηση της εργασίας μου καθώς επίσης και για τις εποικοδομητικές τους παρατηρήσεις.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Παραμυθιώτη Σπυρίδωνα για τις συμβουλές, τις επισημάνσεις κατά τη διάρκεια συγγραφής της μελέτης μου.

Θα ήθελα επίσης να απευθύνω τις ευχαριστίες μου προς τη Μεταδιδάκτορα Alessandria Valentina για την εποικοδομητική συνεργασία μας και την αμέριστη βοήθειά της σε κάθε βήμα της έρευνάς μου.

Τέλος, αφιερώνω τη μεταπτυχιακή μου εργασία στους γονείς μου. Είναι το ελάχιστο που μπορώ να κάνω ως ευχαριστώ για τη στήριξη και συμπαράστασή τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

	σελ.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ABSTRACT	6
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>Listeria monocytogenes</i>.....	11
1.1 Γενικά χαρακτηριστικά.....	13
1.2 Κατανομή στο περιβάλλον.....	14
1.3 Συσχετισμός με τρόφιμα.....	15
1.4 Συνθήκες ανάπτυξης και επιβίωσης.....	16
1.5 Έλεγχος της <i>L. monocytogenes</i>	18
1.6 Κλινικά χαρακτηριστικά και κίνδυνοι για την υγεία.....	18
1.7 Τρόποι μετάδοσης της νόσου και Θεραπεία.....	21
1.8 Επιδημιολογικά δεδομένα.....	22
1.9 Νομοθεσία.....	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Ο παθογόνος μικροοργανισμός <i>L. monocytogenes</i> σε αβιοτικές επιφάνειες επιχειρήσεων τροφίμων.....	27
2.1 Η προσέγγιση της έννοια του βιοϋμενίου.....	29
2.2 Η σημασία των βιοϋμενίων για τη βιομηχανία τροφίμων.....	31
2.3 Στάδια σχηματισμού και ανάπτυξης βιοϋμενίων.....	33
2.4 Δομή βιοϋμενίου.....	38
2.5 Κυτταρική επικοινωνία- Quorum sensing.....	39
2.6 Η σημασία των βιοϋμενίων <i>L. monocytogenes</i> για τη βιομηχανία τροφίμων.....	42
2.7 Σχηματισμός βιοϋμενίων από τον μικροοργανισμό <i>L. monocytogenes</i>	44
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Έλεγχος και απομάκρυνση βιοϋμενίων- Μέθοδοι εξυγίανσης.....	52
3.1 Συνήθεις μέθοδοι εξυγίανσης.....	54
3.2 Άλλες μέθοδοι εξυγίανσης.....	58
3.3 Ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης (<i>Cold atmospheric pressure plasma</i>).....	61
Σκοπός της μελέτης.....	72
Κεφάλαιο 4. Μεθοδολογία της μελέτης.....	73
4.1 Βακτηριακά Στελέχη.....	74
4.2 Μοριακός χαρακτηρισμός στελεχών με την τεχνική <i>rep-PCR</i>	75
4.2.1 Απομόνωση- Ποσοτικοποίηση ολικού DNA από τα βακτηριακά κύτταρα.....	75
4.2.2 Μοριακή τεχνική <i>rep-PCR</i>	78
4.2.3 Ανίχνευση των προϊόντων της <i>rep-PCR</i> με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	80

4.3 <i>In vitro</i> σχηματισμός βιοϋμενίων από στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού <i>Listeria monocytogenes</i> σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα.....	81
4.3.1 Προετοιμασία κουπονιών.....	82
4.3.2 Διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων.....	82
4.3.3 Αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων από τα κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα και προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων και βιοϋμενικών κυττάρων.....	83
4.3.4 Προσδιορισμός καλλιεργήσιμων κυττάρων.....	86
4.4 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης έναντι βιοϋμενίων που αναπτύσσονται σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα.....	86
4.4.1 Πειραματικός σχεδιασμός.....	87
4.4.2 Επιλογή βακτηριακών στελεχών.....	87
4.4.3 Ερευνητικά στάδια	88
<u>1^ο Ερευνητικό Στάδιο</u>	
4.4.3.1 Διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων.....	89
4.4.3.2 Επεξεργασία κουπονιών με πλάσμα.....	90
4.4.3.3 Δημιουργία και συνθήκες πλάσματος.....	90
4.4.3.4 Προσδιορισμός της θερμοκρασίας.....	90
4.4.3.5 Προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων και βιοϋμενικών κυττάρων που επιβίωσαν μετά την επεξεργασία με πλάσμα με την κλασική μέθοδο απαρίθμησης καλλιεργήσιμων κυττάρων (μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης-spread plate technique).....	91
4.4.3.6 Μελέτη της ικανότητας επιβίωσης των στελεχών <i>L. monocytogenes</i> στα κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα μετά από την επεξεργασία των βιοϋμενίων τους με πλάσμα όπως καθορίζεται από τη μοριακή μέθοδο Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR).....	91
4.4.3.6.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων.....	99
4.4.3.6.2 Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης.....	100
<u>2^ο Ερευνητικό Στάδιο</u>	
4.4.3.7 Επεξεργασία κουπονιών με πλάσμα.....	100
4.4.3.8 Διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων.....	101
<u>3^ο Ερευνητικό Στάδιο</u>	
4.4.3.9 Διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων.....	102
4.4.3.10 Επεξεργασία κουπονιών με πλάσμα και συνθήκες πλάσματος.....	103
4.5 Στατιστική Ανάλυση.....	106
Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα και Συζήτηση.....	107
5.1 Αποτελέσματα της <i>ger-PCR</i>	108

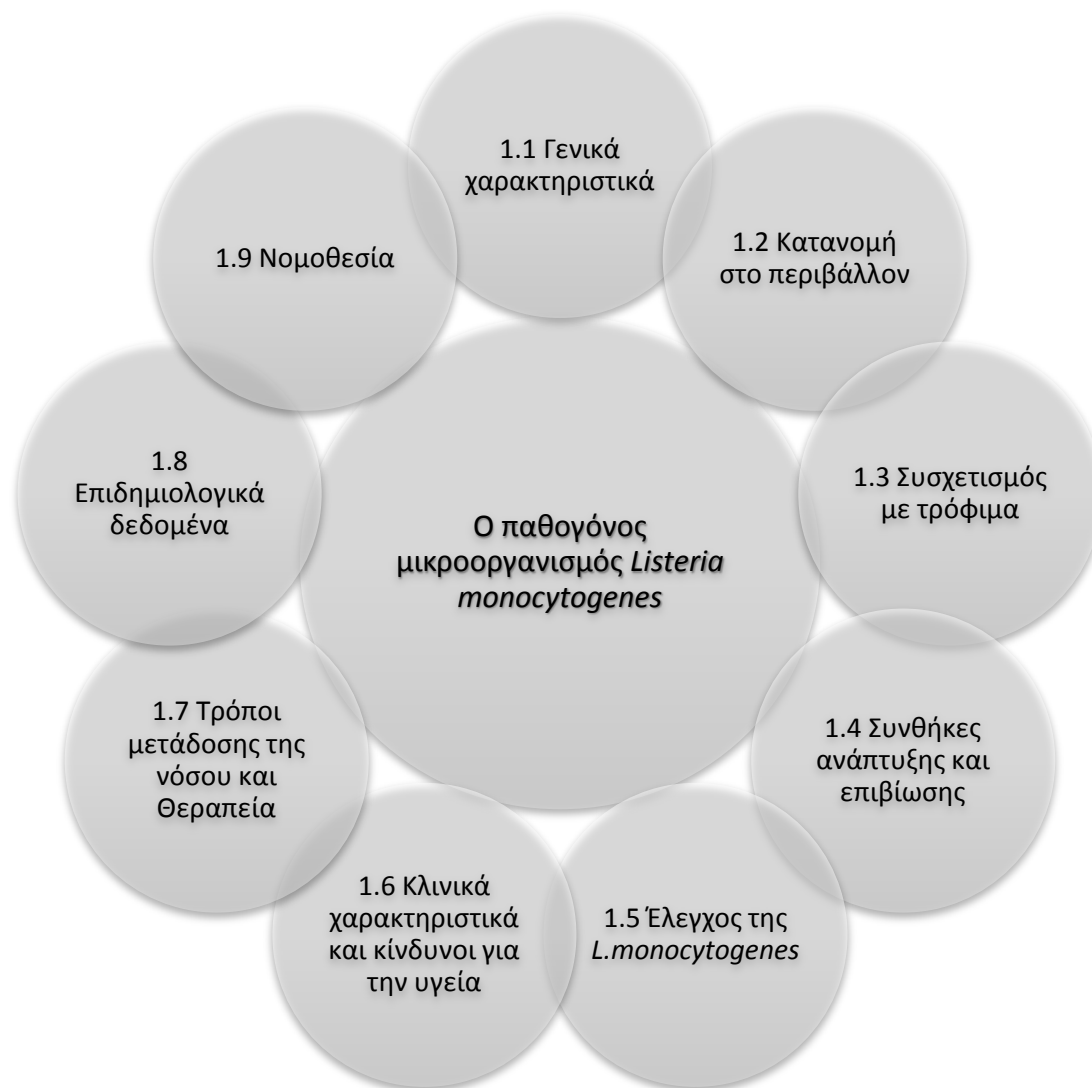
5.2 <i>In vitro</i> σχηματισμός βιοϋμενίων από στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού <i>L. monocytogenes</i> σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα.....	108
5.3 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης έναντι βιοϋμενίων που αναπτύσσονται σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα.....	111
<u>1^ο Ερευνητικό Στάδιο</u>	
5.3.1 Προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων και βιοϋμενικών κυττάρων που επιβίωσαν μετά την επεξεργασία με πλάσμα με την κλασσική μέθοδο απαρίθμησης καλλιεργήσιμων κυττάρων (μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης- <i>spread plate technique</i>).....	112
5.3.2 Μελέτη της ικανότητας επιβίωσης των στελεχών <i>L.monocytogenes</i> στα κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα μετά από την επεξεργασία των βιοϋμενίων τους με πλάσμα όπως καθορίζεται από τη μοριακή μέθοδο Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR).....	115
<u>2^ο Ερευνητικό Στάδιο</u>	
5.4 Διερεύνηση της ανασταλτικής δράσης προεπεξεργασμένων κουπονιών με ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης στην προσκόλληση και ανάπτυξη βιοϋμενίων.....	123
<u>3^ο Ερευνητικό Στάδιο</u>	
5.5 Διερεύνηση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών που έχουν επιβιώσει στις μεταλλικές επιφάνειες μετά την επεξεργασία τους με πλάσμα.....	125
Κεφάλαιο 6. Συμπεράσματα.....	129
Παραρτήματα.....	134
Παράρτημα I- Ποσοτικοποίηση του DNA.....	135
Παράρτημα II- Διάταξη ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης (<i>cold atmospheric pressure plasma, CAP</i>).....	136
Παράρτημα III- Ποσοτικοποίηση του RNA.....	140
Παράρτημα IV- Φωτογραφικό υλικό.....	141
Βιβλιογραφία.....	144

Κεφάλαιο 1


Ο παθογόνος μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*

Στο Κεφάλαιο 1 θα γίνει αναφορά των βασικών χαρακτηριστικών του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, θα παρουσιαστούν τα κλινικά χαρακτηριστικά και οι τρόποι μετάδοσης της λιστερίωσης καθώς και οι επιπτώσεις που επιφέρει η παρουσία του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού στα τρόφιμα.

Οι βασικοί άξονες του κεφαλαίου απεικονίζονται στο **Σχήμα 1**.



Σχήμα 1. Βασικοί άξονες του 1^{ου} Κεφαλαίου.



1.1 Γενικά χαρακτηριστικά

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι το παθογόνο αίτιο της λιστερίωσης (listeriosis). Η επικινδυνότητα αυτού το μικροοργανισμού βασίζεται στην ικανότητά του να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (έως -1.5°C) και σε σχετικά υψηλά επίπεδα άλατος (έως 16%), στην εκτεταμένη παρουσία του στη φύση και στη σοβαρότητα της ασθένειας που προκαλεί, με σημαντικά ποσοστά θνητότητας.

Η *L. monocytogenes* είναι ένα θετικό κατά Gram, μη σπορογόνο, αερόβιο και προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο που ανήκει στην οικογένεια των *Listeriaceae*. Τα κύτταρα της *L. monocytogenes* είναι μικρά, σε σχήμα κοκκοβάκιλλου ή βάκιλλου, με διαστάσεις 0.5-2.0 μm σε μήκος και 0.4-0.5 μm σε διάμετρο. Έχουν στρογγυλεμένες άκρες και απαντώνται υπό μορφή μεμονωμένων κυττάρων ή αλυσίδων μικρού μήκους και σχήματος V ή Y, ή με μορφή πασσάλων¹.

Με βάση τα ευρήματα μοριακών αναλύσεων, το γένος *Listeria* περιλαμβάνει εννέα είδη αναγνωρισμένα επισήμως, τα οποία είναι τα εξής: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, και *L. grayi*^{2,3}. Πρόσφατα ταυτοποιήθηκε ένα νέο είδος για το οποίο προτάθηκε το όνομα *L. fleischmannii* sp. nov.⁴. Παλιότερα το *L. dinitrificans* θεωρείτο ως ξεχωριστό είδος του γένους *Listeria*, ωστόσο πλέον έχει επαναταξινομηθεί στο νέο γένος *Jonesia*. Μεταξύ των ειδών του γένους *Listeria*, μόνο η *L. monocytogenes* και η *L. ivanovii* είναι παθογόνα⁵.

Η *L. monocytogenes* είναι ένα ιδιαίτερης σημασίας παθογόνο βακτήριο για τον άνθρωπο ενώ η *L. ivanovii* έχει ενοχοποιηθεί για πρόκληση ασθενειών πρωτίστως σε ζώα⁶.

Έχουν αναγνωρισθεί 13 διαφορετικοί ορότυποι της *L. monocytogenes*, εκ των οποίων οι 1/2a, 1/2b και 4b προκαλούν την πλειονότητα (90%) των λοιμώξεων από λιστέρια⁷. Παγκοσμίως, ο ορότυπος 4b έχει συνδεθεί με σχεδόν το 50% των κρουσμάτων λιστερίωσης και με όλες τις μεγάλες επιδημίες λιστερίωσης στην Ευρώπη και τη Βόρεια Αμερική από το 1980 και έπειτα.

Όταν το βακτήριο αυτό αναπτύσσεται σε θερμοκρασία δωματίου (20°C - 25°C) παρουσιάζει ικανότητα κίνησης λόγω των περίτριχων μαστιγίων που διαθέτει (peritrichous flagella), με τα οποία πραγματοποιεί χαρακτηριστική περιστροφική κίνηση, ενώ στερείται κίνησης σε θερμοκρασίες άνω των 37°C καθώς μειώνεται η ικανότητά της να παράγει την πρωτεΐνη φλαγγελίνη (flagellin) στη θερμοκρασία αυτή⁸.

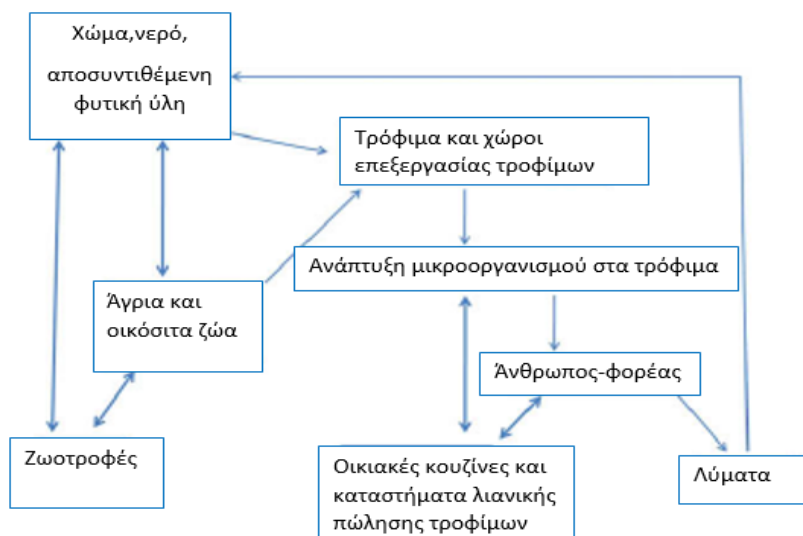
1.2 Κατανομή στο περιβάλλον

Η *L. monocytogenes* παρουσιάζει μια ευρεία διασπορά στη φύση και αυτό βασίζεται στην ικανότητα της να επιβιώνει κάτω από τις δυσμενείς συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος. Απαντάται με μεγάλη συχνότητα στο έδαφος, σε υδάτινα περιβάλλοντα (ποτάμια, λίμνες, κανάλια), σε μέρη με αυξημένη βλάστηση και σε αποσυντιθέμενη οργανική ύλη. Η συνεχής απομόνωση του παθογόνου από το έδαφος και τα φυτά υποδηλώνει ότι έχει σαπροφυτικό χαρακτήρα και αποτελεί μέλος της μικροβιοχλωρίδας στο περιβάλλον εδάφους-φυτών. Ο μικροοργανισμός απαντάται ακόμα σε τεχνητό περιβάλλον όπως οι αποχετεύσεις, όπου μπορεί να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα⁹.


Η παρουσία του μικροοργανισμού σε πολλούς από τους παραπάνω βιότοπους οφείλεται πιθανότατα σε κοπρανώδη μόλυνση. Φορείς του μικροοργανισμού ενδέχεται να είναι ο άνθρωπος και τα ζώα, οι οποίοι δύνανται να μολυνθούν μέσω της κατανάλωσης μiasμένων τροφίμων και ζωοτροφών αντίστοιχα. Ο μικροοργανισμός εντοπίζεται στα κόπρανα του ανθρώπου και των ζώων. Η ικανότητα επιβίωσης του παθογόνου κατά τη διάρκεια επεξεργασίας λυμάτων είναι ιδιαίτερης σημασίας όταν επεξεργασμένα ή μη λύματα και κόπρανα ανθρώπων και ζώων χρησιμοποιούνται ως λίπασμα του εδάφους.

Απομονώνεται συχνά από το περιβάλλον μονάδων επεξεργασίας τροφίμων όπου μπορεί να αναπτυχθεί σε τοίχους, δάπεδα, υπονόμους, οροφές και στον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων¹⁰. Συχνά η παρουσία στελεχών του παθογόνου σε μονάδες επεξεργασίας τροφίμων είναι παρατεταμένη λόγω της ικανότητας του μικροοργανισμού να σχηματίζει βιοϋμένια (biofilms) σε επιφάνειες επεξεργασίας, στον εξοπλισμό ή σε δάπεδα¹¹.

Στο **Σχήμα 2** παρουσιάζονται οι οδοί διάδοσης (routes of transmission) της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον και στην τροφική αλυσίδα.



Σχήμα 2. Οδοί διάδοσης της *L. monocytogenes* στο περιβάλλον και στην τροφική αλυσίδα.




1.3 Συσχετισμός με τρόφιμα

Η κατανάλωση μiasμένων τροφίμων είναι η κύρια οδός μετάδοσης της λιστερίωσης (80-90% των περιπτώσεων). Κατά το παρελθόν ο μικροοργανισμός δε θεωρείτο σημαντικός τροφιμογενής παθογόνος μικροοργανισμός με αποτέλεσμα τα επίπεδα της λιστερίωσης στον άνθρωπο να επισκιάζονται από άλλες τροφιμογενείς ασθένειες και τα κρούσματα λιστερίωσης να μην καταγράφονται. Μέχρι πρότινος, η λιστερίωση χαρακτηριζόταν ως αναδυόμενο τροφιμογενές νόσημα, κυρίως λόγω της αναγνώρισης του ρόλου που διαδραματίζουν τα τρόφιμα στη μετάδοσή του. Το γεγονός ότι η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένη στο περιβάλλον σηματοδοτεί την παρουσία του μικροοργανισμού σε προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης¹².

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά κάθε τροφίμου δίνουν τη δυνατότητα της κατηγοριοποίησης σε τρόφιμα υψηλού ρίσκου και χαμηλού ρίσκου όσον αφορά την πιθανότητα του μικροοργανισμού να αναπτυχθεί σε αυτά. Κατ' αυτήν την έννοια είναι ουσιαστικός και αναγκαίος ο έλεγχος της παρουσίας του μικροοργανισμού σε προϊόντα, όπως τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα με μεγάλη διάρκεια ζωής, καθώς επιτρέπουν την ανάπτυξη του παθογόνου αυτού σε υψηλά επίπεδα. Παρόλο που το παθογόνο εντοπίζεται συχνά στις πρώτες ύλες, συνήθως δεν επιζεί μετά τη θερμική επεξεργασία. Επομένως η κύρια πηγή μόλυνσης των τελικών προϊόντων φαίνεται να είναι το περιβάλλον επεξεργασίας (διαμείανση).

Τρόφιμα που μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* είναι τα ακόλουθα:

- ωμά θαλασσινά, καπνιστό ψάρι, καπνιστά μύδια/στρείδια
- έτοιμες ανάμεικτες σαλάτες με νωπά λαχανικά
- προμαγειρεμένα προϊόντα κρέατος τα οποία μπορούν να καταναλωθούν χωρίς επιπλέον μαγείρεμα ή ζέσταμα, όπως πατέ, αλλαντικά, μαγειρεμένα κομμάτια κρέατος ή κοτόπουλου
- προπαρασκευασμένα γεύματα που ζεσταίνονται χωρίς να βράσουν
- μη παστεριωμένο γάλα ή γαλακτοκομικά προϊόντα προερχόμενα από μη παστεριωμένο γάλα
- μαλακά παγωτά που δεν είναι συσκευασμένα
- μαλακά τυριά όπως μπρι, καμαμπέρ, ρικόττα
- σάλτσες για σαλάτες και dips, τα οποία ενδεχομένως έχουν έρθει σε επαφή με ωμά λαχανικά



1.4 Συνθήκες ανάπτυξης και επιβίωσης

Η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένη στο περιβάλλον και έχει την ικανότητα να επιβιώνει και να αναπτύσσεται υπό αντίξοες συνθήκες. Η ανάπτυξή της σε τρόφιμα εξαρτάται από τα ιδιαίτερα (ενδογενή) χαρακτηριστικά του κάθε προϊόντος (π.χ. pH, ενεργότητα νερού), από εξωγενή χαρακτηριστικά (π.χ. θερμοκρασία αποθήκευσης, σχετική υγρασία) και από τις τεχνικές επεξεργασίας που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή του (π.χ. μαγείρεμα, μη-θερμική επεξεργασία)¹³.

Ωστόσο η *L. monocytogenes* διαθέτει πολύπλοκους φυσιολογικούς μηχανισμούς προσαρμογής σε συνθήκες καταπόνησης. Στα τρόφιμα τέτοιες συνθήκες αποτελούν η χαμηλή θερμοκρασία (συντήρηση τροφίμων υπό ψύξη), η αυξημένη οσμωτική πίεση (αλάτιση ή προσθήκη σακχάρων) και η αυξημένη οξύτητα (τρόφιμα που υπόκεινται σε μικροβιακή ζύμωση). Αναμφισβήτητα, η ικανότητα της *L. monocytogenes* να προσαρμόζεται και να πολλαπλασιάζεται σε χαμηλές θερμοκρασίες δημιουργεί το σημαντικότερο πρόβλημα στη βιομηχανία τροφίμων, δεδομένου ότι η συντήρηση των τροφίμων υπό ψύξη αποτελεί την πιο διαδεδομένη πρακτική συντήρησης των τροφίμων στις αναπτυγμένες χώρες.

Η θερμική επεξεργασία (ή εντονότερες θερμικές διεργασίες) είναι επαρκής για να αδρανοποιήσει κύτταρα της *L. monocytogenes* που δύνανται να αναπτυχθούν σε νωπά τρόφιμα. Ωστόσο η διαμείωση των τροφίμων μετά τη θερμική επεξεργασία τους κατά τους μετέπειτα χειρισμούς (π.χ. κοπή σε φέτες, συσκευασία) με τη *L. monocytogenes*, από μολυσμένες επιφάνειες, εξοπλισμό ή υλικά συσκευασίας, αποτελεί το συνηθέστερο αίτιο παρουσίας του μικροοργανισμού στα έτοιμα προς κατανάλωση (RTE-Ready To Eat) τρόφιμα. Η ικανότητα της *L. monocytogenes* να πολλαπλασιάζεται σε ορισμένες κατηγορίες RTE τροφίμων που συντηρούνται για μακρύ χρονικό διάστημα υπό ψύξη αποτελεί το συνηθέστερο αίτιο τροφιμογενών λοιμώξεων.

Η ύπαρξη διαστελεχιακών διαφορών στη συμπεριφορά της *L. monocytogenes* σε συνθήκες καταπόνησης, αλλά και η επίδραση της προϊστορίας των κυττάρων της *L. monocytogenes* σε περιπτώσεις επιμόλυνσης RTE τροφίμων είναι παράμετροι που δυσκολεύουν την πρόβλεψη της συμπεριφοράς του παθογόνου στα RTE τρόφιμα. Για παράδειγμα, προηγούμενη έκθεση της *L. monocytogenes* σε στρεσογόνες καταστάσεις καθιστά συνήθως τα κύτταρα πιο ανθεκτικά σε μετέπειτα εντονότερες καταστάσεις στρες του ίδιου ή διαφορετικού τύπου (adaptation ή cross-protection)¹⁴.

Ορισμένα από τα όρια για τους παράγοντες επιβίωσης και ανάπτυξης της *L. monocytogenes* παρατίθενται στον **Πίνακα 1**. Άλλοι παράγοντες ή συνδυασμοί διαφόρων παραγόντων (Τεχνολογία των εμποδίων-Hurdle technology) μπορεί επίσης να έχουν εφαρμογή, αν αυτό αποδεικνύεται επιστημονικά¹⁵.

Πίνακας 1. Όρια ανάπτυξης και επιβίωσης για τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes*^α.

Παράγοντας	Κατώτερο όριο ανάπτυξης	Ανώτερο όριο ανάπτυξης	Βέλτιστες συνθήκες ^β	Επιβίωση αλλά όχι ανάπτυξη ^γ
Θερμοκρασία (°C)	-1.5 έως +3	45	30 έως 37 °C	-18 °C
pH^δ	4.2 έως 4.3	9.4 έως 9.5	7	3.3 έως 4.2
a_w^ε	0.90 έως 0.93	> 0.99	0.97	< 0.90
Περιεκτικότητα σε αλάτι (%)^{στ}	< 0.5	12 έως 16	0.7%	≥ 20
Ατμόσφαιρα	Ανάπτυξη είτε παρουσία είτε απουσία οξυγόνου π.χ. σε συσκευασία σε κενό αέρος ή σε τροποποιημένη ατμόσφαιρα			
Θερμική επεξεργασία κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του τροφίμου¹⁶	Απαιτείται συνδυασμός θερμοκρασίας- χρόνου για μείωση του αριθμού των κυττάρων του παθογόνου κατά D6.			
			Θερμοκρασία (°C)	D6 value (6 log μείωση)
			65	10 min
			70	2 min
			85	1 sec

^αΤα όρια για την ανάπτυξη και την επιβίωση της *L. monocytogenes* που παρουσιάζονται σε αυτόν τον πίνακα βασίζονται σε έρευνες που διεξήχθησαν κατά κύριο λόγο σε εργαστηριακά θρεπτικά μέσα υπό βέλτιστες συνθήκες και θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο ως εκτιμήσεις για τις επιπτώσεις στα τρόφιμα.

^β Στις βέλτιστες συνθήκες η ανάπτυξη της *L. monocytogenes* είναι ταχύτατη.

^γ Η περίοδος επιβίωσης του μικροοργανισμού ποικίλει ανάλογα με το είδος του τροφίμου και άλλων παραγόντων.

^δ Υδροχλωρικό οξύ ως μέσο οξίνισης (η παρεμπόδιση εξαρτάται από το είδος του οξέος που χρησιμοποιείται).

^ε Με χρήση χλωριούχου νατρίου (NaCl).

^{στ} Ποσοστό επί τοις εκατό χλωριούχου νατρίου, υδατική φάση.

Οι συνθήκες:

- pH 5 έως 5.5 και a_w<0,95
- pH <5 σε οποιαδήποτε τιμή a_w
- a_w≤ 0,92 σε οποιαδήποτε τιμή pH

έχουν αποδειχτεί κατάλληλες για την παρεμπόδιση της παρουσίας και ανάπτυξης του παθογόνου στα τρόφιμα¹⁷.

1.5 Έλεγχος της *L. monocytogenes*

Τις τελευταίες δεκαετίες παρά την αύξηση των κανονισμών για την ασφάλεια των τροφίμων και την εφαρμογή συστημάτων διαχείρισης όπως το HACCP, οι πολυάριθμοι θάνατοι και οι εκατοντάδες τροφιμογενείς λοιμώξεις που έχουν αποδοθεί στη *L. monocytogenes*, έχουν αυξήσει την ανησυχία και τις απαιτήσεις των καταναλωτών για την παραγωγή τροφίμων αυξημένης ποιότητας και εγγυημένης ασφάλειας¹⁸. Ταυτόχρονα οι ανακλήσεις προϊόντων και οι εκδηλώσεις λιστερίωσης επιφέρουν μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις στη βιομηχανία τροφίμων, στη ζωική και φυτική παραγωγή και στα εθνικά συστήματα δημόσιας υγείας. Για την παρακολούθηση και τον έλεγχο της *L. monocytogenes* στη βιομηχανία τροφίμων είναι αναγκαία η ανάπτυξη και η εφαρμογή συστήματος HACCP και η καθιέρωση αποτελεσματικών μέτρων ελέγχου. Κάθε κρούσμα λιστερίωσης που διαγιγνώσκεται πρέπει να δηλώνεται και να διερευνάται προσεκτικά με σκοπό τον έγκαιρο εντοπισμό των πηγών μόλυνσης και την αναγνώριση παραγόντων κινδύνου έτσι ώστε να λαμβάνονται κατάλληλα μέτρα πρόληψης και ελέγχου.

Η γενικευμένη εμφάνιση της *L. monocytogenes* και η αυξημένη ικανότητά της να αναπτύσσεται και να επιβιώνει σε ψυχρό περιβάλλον σε σύγκριση με τους περισσότερους μικροοργανισμούς, την καθιστά σημαντική πρόκληση στην παραγωγή τροφίμων. Αυτό ισχύει ιδίως για τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα στα οποία μπορεί να αναπτυχθεί και τα οποία δεν υποβάλλονται σε θερμική κατεργασία κατά την παραγωγή. Το ίδιο ισχύει και για τα τρόφιμα που ενδέχεται να έχουν μολυνθεί από το περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένου του περιβάλλοντος παραγωγής κατά την παρασκευή τους.

Οι παραγωγοί έτοιμων για κατανάλωση τροφίμων, δηλαδή τροφίμων που προορίζονται από τον παραγωγό για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση χωρίς να χρειάζονται μαγείρεμα ή άλλη επεξεργασία ικανή να εξαλείψει ή να μειώσει τους μικροοργανισμούς, αποτελούν αιτία ανησυχίας. Οι παραγωγοί τροφίμων είναι ιδιαίτερα σημαντικό να λαμβάνουν μέτρα για τον έλεγχο της μετάδοσης της *L. monocytogenes* καθώς και για την ανάπτυξής της στο προϊόν μέχρι το τέλος της διάρκειας διατήρησής του. Η γνώση και η τεκμηρίωση του δυναμικού ανάπτυξής της σε ένα τρόφιμο είναι απαραίτητη και πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν όταν ο παραγωγός καθορίζει την ασφαλή διάρκεια διατήρησης του προϊόντος¹⁹.

1.6 Κλινικά χαρακτηριστικά και κίνδυνοι για την υγεία

Η *L. monocytogenes* συγκεντρώνει το ενδιαφέρον των μικροβιολόγων, των ιατρών αλλά και του καταναλωτικού κοινού λόγω της αυξημένης παθογένειας που παρουσιάζει. Η λιστερίωση είναι μια ασθένεια με χαμηλή συχνότητα εμφάνισης, αλλά

υψηλά ποσοστά νοσηλείας και θνητότητας, ειδικά στις ομάδες υψηλού κινδύνου²⁰, με αποτέλεσμα να συγκαταλέγεται ανάμεσα στις πιο σοβαρές αιτίες θανάτου από τροφιμογενείς λοιμώξεις.

- **Κατηγορίες ατόμων που διατρέχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να νοσήσουν**

Οι υγιείς ενήλικες και τα παιδιά σπάνια εμφανίζουν απειλητικές για τη ζωή κλινικές εκδηλώσεις. Στις ομάδες υψηλού κινδύνου ανήκουν: οι έγκυες (20 φορές πιο πιθανό να νοσήσουν από ότι οι άλλοι υγιείς ενήλικες) και τα έμβρυά τους, τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι, οι καρκινοπαθείς, οι μεταμοσχευμένοι, οι αιμοκαθαιρόμενοι, οι διαβητικοί, οι ηπατοπαθείς, οι ασθενείς με AIDS (300 φορές πιο πιθανό να νοσήσουν σε σχέση με άτομα που διαθέτουν φυσιολογικό ανοσοποιητικό σύστημα), οι ασθενείς που πάσχουν από νοσήματα του αίματος και οι ασθενείς που βρίσκονται υπό αγωγή με ανοσοκατασταλτικά, κυτταροστατικά ή κορτικοστεροειδή.

- **Παράγοντες υπεύθυνοι για τη διάδοση του βακτηρίου της λιστερίωσης**

Παράγοντες που οδήγησαν στη διάδοση του βακτηρίου της λιστερίωσης με αποτέλεσμα την αύξηση της επίπτωσης του νοσήματος είναι: οι αλλαγές στον τρόπο ζωής και η υιοθέτηση διαφορετικών διατροφικών συνηθειών (πρόχειρο και τυποποιημένο φαγητό), οι μετακινήσεις πληθυσμών (μετανάστες, πρόσφυγες, ταξιδιώτες), οι νέες εφαρμοζόμενες πρακτικές στον τομέα της κτηνοτροφίας, η αύξηση της διεθνούς βιομηχανίας, η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά, η αύξηση των ευαίσθητων/ ευπαθών πληθυσμιακών ομάδων²¹.

- **Λοιμογόνος δόση**

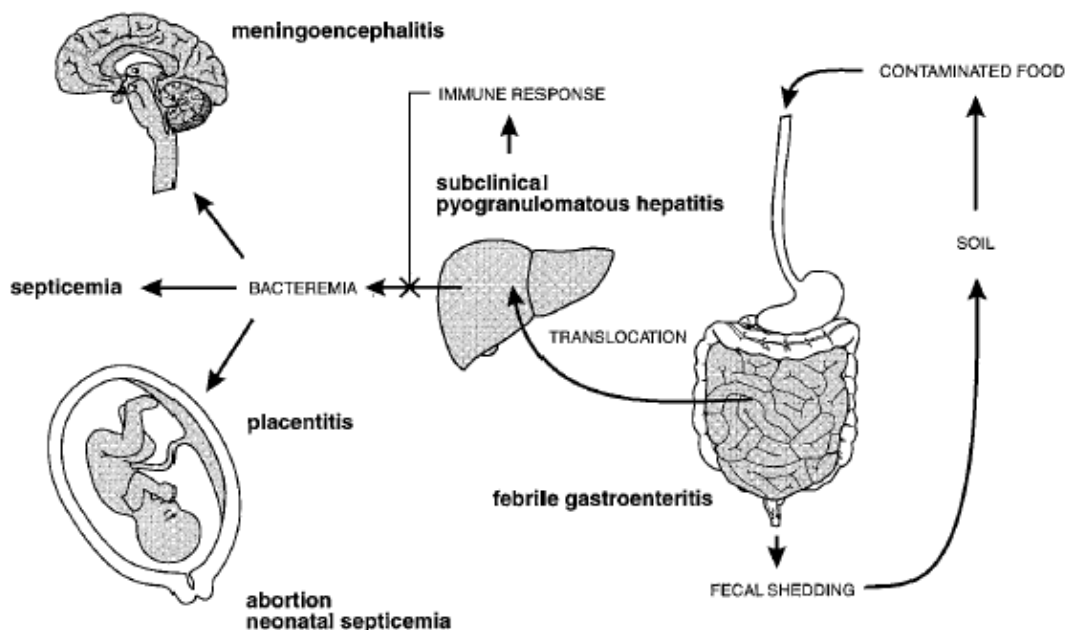
Η ελάχιστη μολυσματική δόση δεν είναι σαφώς καθορισμένη και θεωρείται ότι εξαρτάται από την ανοσολογική κατάσταση του ξενιστή, από τη λοιμογόνο δύναμη του κάθε στελέχους και από τις ιδιότητες του τροφίμου (π.χ. λιπαρά τρόφιμα προστατεύουν τα βακτήρια από τη δράση του γαστρικού οξέος)²². Γενικά, υπάρχουν ενδείξεις ότι η μολυσματική δόση είναι χαμηλή, πιθανότατα μικρότερη από 1000 κύτταρα²³, ωστόσο μελέτες έχουν αποδείξει πως οι εμπλεκόμενες περιπτώσεις λιστερίωσης, κατά το παρελθόν, σχετίζονταν με υψηλά επίπεδα του παθογόνου στο τρόφιμο^{24,25}. Σύμφωνα με τους Sim και συν. (2002)²⁶ έπειτα από παρακλινικές μελέτες τροφιμογενών κρουσμάτων επιδημικής λιστερίωσης απαιτούνται πληθυσμοί από 1.9×10^5 CFU/g έως 1.2×10^9 CFU/g για να προκληθεί ασθένεια σε άτομα υγιή, που δεν ανήκουν στις ευπαθείς ομάδες.

- **Παθογένεια- Κλινικά χαρακτηριστικά- Συμπτώματα**

Το γεγονός ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών συνθηκών υποδηλώνει ότι η ανθρώπινη έκθεση στο

παθογόνο αυτό είναι συχνή. Ωστόσο, όπως έχει ήδη αναφερθεί η συχνότητα εμφάνισης λιστερίωσης είναι χαμηλή δεδομένου ότι παθογένεια δύναται να εκδηλωθεί μόνο εάν ένα άτομο, που ανήκει σε μία από τις ομάδες κινδύνου, εκτεθεί σε αρκετά υψηλή δόση του παθογόνου²⁷. Η μέση περίοδος επώασης του νοσήματος (ο χρόνος μεταξύ της μόλυνσης και της εκδήλωσης συμπτωμάτων) είναι τρεις εβδομάδες, αλλά μπορεί να κυμανθεί από τρεις έως εβδομήντα ημέρες.

Η παθογένεια της *L. monocytogenes* επικεντρώνεται στη δυνατότητά της να επιζήσει και να πολλαπλασιάζεται στα φαγοκυτταρικά κύτταρα των ξενιστών. Η *L. monocytogenes* εισάγεται αρχικά στα κύτταρα-ξενιστές μέσω των φαγοσωμάτων και στη συνέχεια δημιουργεί βλεφαρίδες, χρησιμοποιώντας τους μηχανισμούς του κυττάρου- ξενιστή, για να μεταφερθεί απευθείας από κύτταρο σε κύτταρο. Η ανάπτυξη του μικροοργανισμού ξεκινά από το έντερο, ενώ στη συνέχεια τα κύτταρα διατρύπουν τον εντερικό βλεννογόνο και μέσω της κυκλοφορίας του αίματος φτάνουν στα διάφορα όργανα και στους ιστούς²⁸. Η παρουσία της ενδοκυτταρικά στα φαγοκυτταρικά κύτταρα επιτρέπει επίσης την πρόσβαση στον εγκέφαλο και πιθανώς τη μοσχευματική μετανάστευση στο έμβρυο από τις έγκυες γυναίκες (Σχήμα 3).




Σχήμα 3. Σχηματική αναπαράσταση της φυσιολογίας της λιστερίωσης στον άνθρωπο.²⁹

Σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), η κλινική εικόνα του νοσήματος περιλαμβάνει πυρετό, μυαλγίες και ενίοτε συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα όπως ναυτία ή διάρροια. Αν η λοίμωξη

επεκταθεί στο νευρικό σύστημα εμφανίζονται συμπτώματα όπως κεφαλαλγία, δυσκαμψία του αυχένα, σύγχυση, έλλειψη ισορροπίας ή σπασμοί. Ένας ασθενής ο οποίος θα εμφανίσει σηψαιμία ή μηνιγγίτιδα θα χρειαστεί να νοσηλευτεί για αρκετές εβδομάδες.

Οι υγιείς ενήλικες και τα παιδιά όταν μολύνονται με τον παθογόνο αυτό μικροοργανισμό, συνήθως δεν εμφανίζουν κλινικά συμπτώματα ή εμφανίζουν κλινική εικόνα γαστροεντερικής ασθένειας ή ήπιας γρίπης. Ασυμπτωματική λοίμωξη μπορεί να έχουν άτομα όλων των ηλικιών δεδομένου ότι η *L. monocytogenes* είναι ευρέως διαδεδομένη στη φύση. Παρόλα αυτά η κλινική της σημασία περιορίζεται στην περίπτωση των εγκύων, καθώς μπορεί να αποβεί μοιραία για το έμβρυο³⁰.

Οι έγκυοι εμφανίζουν συνήθως ήπια συμπτώματα γρίπης, με κύριο σύμπτωμα τον πυρετό. Ανάλογα με την ηλικία της κύησης η μόλυνση της μητέρας είναι δυνατό να οδηγήσει σε αποβολή, θνησιγενές νεογνό, πρόωρο τοκετό ή σε σοβαρή λοίμωξη του νεογνού. Τα ανοσοκατεσταλμένα άτομα από υποκείμενα νοσήματα ή από κατανάλωση φαρμάκων και οι ηλικιωμένοι είναι πιο πιθανό να εμφανίσουν διεισδυτική λιστερίωση, μία μορφή λιστερίωσης με σημαντικές επιπλοκές. Στη διεισδυτική λιστερίωση η λοίμωξη επεκτείνεται στο νευρικό σύστημα και εμφανίζεται υψηλός πυρετός, κεφαλαλγία, δυσκαμψία του αυχένα, σύγχυση, έλλειψη ισορροπίας ή σπασμοί.



1.7 Τρόποι μετάδοσης της νόσου και Θεραπεία

• Τρόποι μετάδοσης της νόσου

Η νόσος μεταδίδεται μέσω της κατανάλωσης μολυσμένων τροφίμων. Η *L. monocytogenes* υπάρχει στο έδαφος, στις χορτονομές, στις ζωοτροφές, στο νερό, στις λάσπες και στα λύματα. Τα λαχανικά μπορεί να μολυνθούν από το χώμα ή από την κοπριά, όταν αυτή χρησιμοποιείται σα λίπασμα. Ορισμένα κατοικίδια, πτηνά και άγρια θηλαστικά μπορεί να μεταφέρουν το βακτηρίδιο, χωρίς να νοσούν, και να μολύνουν τρόφιμα ζωικής προέλευσης, όπως το κρέας και τα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Η μετάδοση του νοσήματος γίνεται κατά κανόνα:

- μέσω της εντερο-στοματικής οδού με την κατανάλωση τροφίμων που μολύνονται από ασθενείς ή ασυμπτωματικούς φορείς του νοσήματος. Αν και τα υγιή άτομα μπορεί να καταναλώσουν μολυσμένα τρόφιμα χωρίς να νοσήσουν, τα ευπαθή άτομα (ηλικιωμένοι, ανοσοκατεσταλμένοι, κ.ά.) είναι πιθανό να νοσήσουν από λιστερίωση ακόμα και μετά την κατανάλωση τροφίμων μολυσμένων με χαμηλό μικροβιακό φορτίο. Τα λαχανικά μπορεί να μολυνθούν από το χώμα ή από την κοπριά, όταν αυτή χρησιμοποιείται ως λίπασμα.
- μέσω της επαφής με πάσχοντα ζώα ή με τις απεκκρίσεις τους.

- από τη μητέρα στο έμβryo είτε μέσω του πλακούντα κατά τη διάρκεια της κύησης είτε κατά τον τοκετό³¹.

- **Θεραπεία**

Η θεραπευτική αντιμετώπιση της λιστερίωσης περιλαμβάνει τη χορήγηση αντιβιοτικών. Η αμπικιλίνη θεωρείται αποτελεσματικό φάρμακο αντιμετώπισης ενώ συχνά χορηγείται συνδυασμός αμπικιλίνης-γενταμικίνης. Η δεξαμεθαζόνη μπορεί να χορηγηθεί πριν την αντιβιοτική θεραπεία για την μείωση του εγκεφαλικού οιδήματος. Όταν διαγνωστεί η λοίμωξη στη διάρκεια της εγκυμοσύνης η άμεση χορήγηση αντιβιοτικών στην έγκυο μπορεί να προλάβει τη λοίμωξη του εμβρύου. Τα νεογνά που νοσούν λαμβάνουν την ίδια αντιμικροβιακή αγωγή με τους ενήλικες.



Το πρώτο επίσημο κρούσμα λιστερίωσης που συνδέθηκε με την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου, καταγράφηκε στον Καναδά το 1981. Τουλάχιστον 41 περιπτώσεις λοιμώξεων από τις οποίες οι 17 ήταν θανατηφόρες, συνδέθηκαν με την κατανάλωση έτοιμης λαχανοσαλάτας. Κατόπιν επιδημιολογικών μελετών, διαπιστώθηκε ότι το κύριο συστατικό της σαλάτας (λάχανο) ήταν μολυσμένο με *L. monocytogenes*, πηγή της οποίας ήταν η κοπριά που χρησιμοποιείτο για τη λίπανση του χωραφιού όπου καλλιεργούνταν τα λάχανα. Έκτοτε κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980 η συχνότητα των δηλωμένων τροφιμογενών κρουσμάτων λιστερίωσης αυξήθηκε δραματικά. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται ενδεικτικά κρούσματα τροφιμογενούς λιστερίωσης που εκδηλώθηκαν κατά τη χρονική περίοδο 1981-2015.

Πίνακας 2. Ενδεικτικά κρούσματα λιστερίωσης^{32,33,34,35}.

Χώρα	Έτος	Τρόφιμο	Κρούσματα	Θάνατοι
Καναδάς	1981	Λαχανοσαλάτα	41	17
ΗΠΑ	1983	Παστεριωμένο γάλα	49	14
Ελβετία	1983-1987	Μαλακό τυρί	122	34
ΗΠΑ	1985	Τυρί μεξικάνικου τύπου από μη παστεριωμένο γάλα	142	30
Αγγλία	1987-1989	Πατέ	355	95
ΗΠΑ	1989	Γαρίδες	2	μη καταγεγραμμένοι
Αυστραλία	1991	Καπνιστά μύδια	4	0
Νέα Ζηλανδία	1992	Καπνιστά μύδια	4	2
Γαλλία	1993	Πηκτή χοιρινού	280	63
Γαλλία	1995	Μαλακό τυρί	17	4
Φιλανδία	1998-1999	Βούτυρο	25	6

Πίνακας 2. (συνέχεια).

ΗΠΑ	2000	Αλλαντικά από κρέας	29	7
		γαλοπούλας		
ΗΠΑ	2000-2001	Τυρί μεξικάνικου τύπου από μη παστεριωμένο γάλα	12	5
Ελβετία	2005	Τυρί	10	3
Τσεχία	2006	Ώριμα τυριά και ανάμεικτες σαλάτες	75	12
Γερμανία	2006-2007	Τυρί από παστεριωμένο γάλα	189	26
Καναδάς	2008	Έτοιμα προς κατανάλωση κρεατοσκευάσματα	56	20
Αυστρία-Γερμανία	2009	Τυρί Quargel	34	8
ΗΠΑ	2011	Πεπόνια	147	33
ΗΠΑ	2012	Ρικόττα	22	4
ΗΠΑ	2013	Τυρί	6	1 + 1 αποβολή εμβρύου
ΗΠΑ	2014	Καραμελωμένα μήλα	35	7
ΗΠΑ	2015-	Παγωτό και κατεψυγμένα σνακ	10	3

Η θνητότητα εξαιτίας της λιστερίωσης είναι μεγάλη σε σύγκριση με τα άλλα τροφιμογενή νοσήματα. Εκδηλώνεται όπως έχει ήδη αναφερθεί κυρίως σε εγκύους, νεογέννητα, ηλικιωμένους, καθώς και σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Το βακτήριο είναι υπεύθυνο κυρίως για την εμφάνιση μεμονωμένων κρουσμάτων ωστόσο τα τελευταία χρόνια έχουν περιγραφεί επιδημικές εξάρσεις σε χώρες όπως οι Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής, η Νορβηγία, η Γερμανία, η Αυστρία και η Ελβετία.

- **Διεθνή επιδημιολογικά δεδομένα για τη λιστερίωση**

Σύμφωνα με την τελευταία ετήσια έκθεση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA)³⁶, η καταγραφή περιπτώσεων λιστερίωσης παρουσιάζει αυξητική τάση. Τα κρούσματα λιστερίωσης αυξήθηκαν κατά 8,6% μεταξύ του έτους 2012 και 2013 παρουσιάζοντας επίσης αύξηση και κατά την προηγούμενη πενταετία. Μολονότι ο αριθμός των επιβεβαιωμένων περιστατικών είναι σχετικά χαμηλός (1.763 κρούσματα), υπάρχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς οι αναφερόμενες λοιμώξεις από *L. monocytogenes* είναι ως επί το πλείστον σοβαρές, με επιθετική μορφή της νόσου και υψηλά ποσοστά θανάτων σε σχέση με άλλα τροφιμογενή νοσήματα. «Η αύξηση των αναφερθέντων επιθετικών μορφών της νόσου είναι ιδιαίτερης σημασίας καθώς η λοίμωξη προέρχεται κυρίως από έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα και μπορεί να οδηγήσει σε θάνατο, ιδιαίτερα μεταξύ του αυξανόμενου πληθυσμού των ηλικιωμένων ανθρώπων και των ασθενών με

ανοσοκαταστολή», δηλώνει ο Mike Catchpole, επικεφαλής επιστήμονας του Ευρωπαϊκού Κέντρου για τον Έλεγχο των Λοιμώξεων (ECDC).

Το Κέντρο για την Πρόληψη και τον Έλεγχο των Νοσημάτων της Αμερικής (CDC), εκτιμά ότι περίπου 1.600 ασθένειες και 260 θανάτοι που οφείλονται σε λιστερίωση συμβαίνουν κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής. Το 2013 η μέση ετήσια επίπτωση της λιστερίωσης ήταν 0.26 κρούσματα ανά 100.000 άτομα. Το 2011 καταγράφηκε επιδημία λιστερίωσης με 147 κρούσματα και 33 θανάτους σε 28 πολιτείες της χώρας για την οποία ενοχοποιήθηκαν πεπόνια που είχαν παραχθεί σε φάρμα του Κολοράντο ενώ το 2012 σημειώθηκε επιδημία με 22 κρούσματα και τέσσερις θανάτους (δεδομένα έως τα τέλη Οκτωβρίου) σε 14 πολιτείες από εισαγόμενο τυποποιημένο τυρί (**Πίνακας 2**). Τέλος στον Καναδά από το 2002 έως το 2012 (Οκτώβριο) αναγνωρίστηκαν πέντε επιδημίες λιστερίωσης με συνολικό αριθμό 245 κρούσματα και 25 θανάτους³⁷.

- **Επιδημιολογικά Δεδομένα για τη λιστερίωση στην Ελλάδα για τη χρονική περίοδο 2004–2013 όπως προκύπτουν από το σύστημα υποχρεωτικής δήλωσης νοσημάτων του Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ)³⁸**

Στην Ελλάδα δηλώθηκαν συνολικά 73 κρούσματα λιστερίωσης κατά το διάστημα 2004-2013. Η κατανομή των δηλωθέντων κρουσμάτων καθώς και η επίπτωση της λιστερίωσης κατ' έτος για το χρονικό διάστημα 2004-2013 παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3**. Η μέση ετήσια τιμή του αριθμού των κρουσμάτων ήταν 7.30 (τυπική απόκλιση: 3.47). Η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση ήταν 0.65 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού ενώ την περίοδο αυτή δε δηλώθηκε κάποια επιδημία λιστερίωσης.

***Πίνακας 3.** Αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων και επίπτωση της λιστερίωσης στην Ελλάδα, κατ' έτος, σύμφωνα με το Σύστημα Υποχρεωτικής Δήλωσης Νοσημάτων για τη χρονική περίοδο 2004-2013. (ΚΕΕΛΠΝΟ)*

ΕΤΟΣ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΚΡΟΥΣΜΑΤΩΝ	ΕΤΗΣΙΑ ΕΠΙΠΤΩΣΗ (ΑΝΑ 1.000.000 ΠΛΗΘΥΣΜΟΥ)
2004	3	0.27
2005	8	0.72
2006	7	0.62
2007	10	0.90
2008	1	0.10
2009	4	0.35
2010	10	0.90
2011	9	0.80
2012	11	0.97
2013	10	0.89

Το νόσημα παρουσίασε υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στην ηλικιακή ομάδα 65 έτη και άνω (μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση: 2.40 κρούσματα/1.000.000 πληθυσμού), με δεύτερη σε συχνότητα την ηλικιακή ομάδα 0-4 έτη (0.73 κρούσματα/1.000.000 πληθυσμού) Κατά την ίδια περίοδο η μέση ετήσια δηλούμενη επίπτωση ήταν 0.74 κρούσματα/1.000.000 στους άνδρες και 0,58/1.000.000 στις γυναίκες.

Η μέση μηνιαία δηλούμενη επίπτωση της λιστερίωσης για τη χρονική περίοδο 2004-2013 ήταν αυξημένη την άνοιξη, με κορύφωση τον Μάρτιο και μειωνόταν σταδιακά τους επόμενους μήνες παρουσιάζοντας και πάλι αύξηση τον Αύγουστο.

Στο σύνολο των δηλωθέντων κρουσμάτων, τα 38 (51.4%) αφορούσαν ανοσοκατεσταλμένα άτομα. Κατά το ίδιο χρονικό διάστημα η θνητότητα του νοσήματος ήταν υψηλή, καθώς στο σύνολο των κρουσμάτων με γνωστή έκβαση (n=38) καταγράφηκαν 12 (31.6%) θάνατοι.

Η λιστερίωση παρουσιάζει χαμηλή δηλούμενη επίπτωση στην Ελλάδα. Σύμφωνα με τα δεδομένα του Ευρωπαϊκού Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, η μέση δηλούμενη επίπτωση στις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και στις χώρες της ΕΕΑ/ΕΦΤΑ (European Economic Area/European Free Trade Association) το 2011 ήταν 3.1 κρούσματα ανά 1.000.000 πληθυσμού . Στην ερμηνεία της διαφοράς αυτής πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν η ενδεχόμενη υποδηλώση στα συστήματα επιτήρησης. Η ηλικιακή κατανομή των κρουσμάτων, η συχνή εμφάνιση του νοσήματος σε ανοσοκατεσταλμένα άτομα και η υψηλή θνητότητα είναι ευρήματα συμβατά με αυτά των άλλων ευρωπαϊκών χωρών. Τέλος, η εποχικότητα είναι επίσης εύρημα και των άλλων χωρών της Ευρώπης με την αύξηση της δηλωθείσας επίπτωσης να παρατηρείται κυρίως μεταξύ Μαΐου και Σεπτεμβρίου.

1.9 Νομοθεσία

Σκοπός και νομική υποχρέωση κάθε υπεύθυνου επιχείρησης τροφίμων είναι να περιορίζει στο ελάχιστο την ανάπτυξη της *L. monocytogenes* στα τρόφιμα, να ελέγχει τη πιθανή επιμόλυνση και να συμμορφώνεται με τα μικροβιολογικά κριτήρια.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει (Κανονισμός (ΕΚ) 2073/2005) μικροβιολογικά κριτήρια για την *L. monocytogenes* στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα (Πίνακας 4). Τα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα διαφοροποιούνται ανάλογα με τη δυνατότητά τους να υποστηρίξουν ή όχι την ανάπτυξη του συγκεκριμένου μικροβίου. Σύμφωνα με τον παραπάνω Κανονισμό, οι υπεύθυνοι των επιχειρήσεων τροφίμων πρέπει να μπορούν να αποδείξουν στις αρμόδιες αρχές σε ποια κατηγορία τροφίμων ως προς την συμπεριφορά της *L. monocytogenes*, ανήκουν τα τρόφιμα που διακινούν, καθώς και ποια όρια έχουν

ορίσει για τον συγκεκριμένο μικροοργανισμό καθ' όλη την διάρκεια ζωής του προϊόντος τους. Η παραπάνω διαδικασία αποτελεί μέρος της εκτίμησης της διάρκειας ζωής ενός τροφίμου έτοιμου για κατανάλωση (Self life studies).

Πίνακας 4. Παράρτημα I Κανονισμού (ΕΚ) 2073/2005 σημείο 1.1-1.3

Καθορίζεται η κατηγορία του τροφίμου, το σχέδιο δειγματοληψίας, τα μικροβιολογικά όρια, η αναλυτική μέθοδος και το στάδιο εφαρμογής του κριτηρίου.

Κατηγορία τροφίμων	Μικροοργανισμοί/οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους	Πλάνο δειγματοληψίας ⁽¹⁾		Όρια ⁽²⁾		Αναλυτική μέθοδος αναφοράς ⁽³⁾	Στάδιο στο οποίο εφαρμόζεται το κριτήριο
		n	c	m	M		
1.1. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς ⁽⁴⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Απουσία σε 25 g		EN/ISO 11290-1	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
1.2. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g ⁽⁵⁾		EN/ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους
		5	0	Απουσία σε 25 g ⁽⁷⁾		EN/ISO 11290-1	Πριν το τρόφιμο αποδεσμευτεί από τον άμεσο έλεγχο του υπαθύνου της επεξεργασίας τροφίμων που το παράγαγε
1.3. Τρόφιμα έτοιμα για κατανάλωση μη ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη <i>L. monocytogenes</i> διαφορετικά από εκείνα που προορίζονται για βρέφη και για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς ⁽⁴⁾ ⁽⁸⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		EN/ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Προϊόντα που διατίθενται στην αγορά κατά τη διάρκεια διατήρησής τους

Κεφάλαιο 2

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* σε αβιοτικές επιφάνειες επιχειρήσεων τροφίμων

Στο κεφάλαιο 2 θα γίνει αναφορά στην έννοια του βιοϋμενίου και στον ρόλο που διαδραματίζει η παρουσία του στη βιομηχανία τροφίμων. Θα αναλυθούν εκτενέστερα τα γνωρίσματα και ο ρόλος των βιοϋμενίων που σχηματίζονται από τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* σε αβιοτικές επιφάνειες επιχειρήσεων τροφίμων.

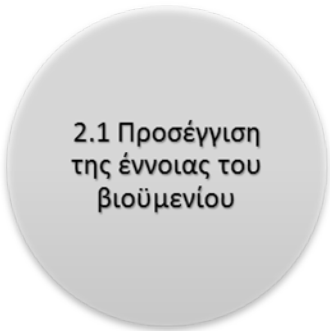
Οι ενότητες που απαρτίζουν το κεφάλαιο αυτό απεικονίζονται στο **Σχήμα 4**.



Σχήμα 4. Βασικοί άξονες του 2^{ου} Κεφαλαίου.

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) αναφέρει την ασφάλεια των τροφίμων ως μία από τις 11 προτεραιότητες και προκλήσεις αυτού του αιώνα³⁹. Στόχος του WHO είναι η δημιουργία πολιτικών και η εφαρμογή δράσεων με σκοπό τη διαφύλαξη της υγείας με ιδιαίτερο σημείο εστίασης τη μείωση των ασθενειών που προέρχονται από τρόφιμα σε παγκόσμιο επίπεδο. Επί του παρόντος, η αντιμετώπιση τροφιμογενών ασθενειών είναι πρωταρχικό μέλημα τόσο των αναπτυσσόμενων όσο και των αναπτυγμένων χωρών. Εκτιμάται ότι περίπου το 30% του πληθυσμού των βιομηχανικών χωρών πλήττεται ετησίως από τροφιμογενείς ασθένειες. Στις ΗΠΑ κάθε χρόνο εκτιμάται ότι 48.000.000 άνθρωποι υποφέρουν από τροφιμογενή νοσήματα με 2.612 θανάτους να επέρχονται από αυτά⁴⁰.

Σύμφωνα με το Αμερικάνικο Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας (NIH) και το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (CDC) τα βιοϋμένια εμπλέκονται σε περισσότερο από το 60% των περιπτώσεων εκδηλούμενων μικροβιακών ασθενειών⁴¹. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί δύνανται να σχηματίζουν βιοϋμένια στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων και να επιμολύνουν τα τελικά προϊόντα, γεγονός που καθιστά αναγκαία την εφαρμογή κανόνων υγιεινής πρακτικής σε συνδυασμό με την υλοποίηση συστημάτων διασφάλισης παραγωγής υγιεινών προϊόντων (HACCP).



2.1 Προσέγγιση της έννοιας του βιοϋμενίου

Στο μεγαλύτερο μέρος της Ιστορίας της Μικροβιολογίας οι μικροοργανισμοί θεωρούνταν πλαγκτονικοί, δηλαδή ελεύθερα αιωρούμενα κύτταρα τα οποία περιγράφονταν με βάση τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξής τους σε πλούσια θρεπτικά καλλιεργητικά μέσα. Ο Van Leeuwenhoek, τον 17^ο αιώνα για πρώτη φορά παρατήρησε με τη χρήση μικροσκοπίου, την ύπαρξη μικροοργανισμών στην οδοντική πλάκα. Η θεωρία του βιοϋμενίου διατυπώθηκε για πρώτη φορά το 1978 από τον Costerton, στην οποία εξηγούνται οι μηχανισμοί με τους οποίους οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε βιοτικές ή αβιοτικές επιφάνειες και τα οφέλη που προσφέρει η παρουσία τους στη φύση^{42,43}. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου από τους μικροοργανισμούς δεν ακολουθεί τους μηχανισμούς της Κλασικής Μικροβιολογίας και διαφέρει από τις πλαγκτονικές μορφές των μικροοργανισμών^{44,45}.

Είναι δύσκολο να αποδοθεί με συντομία και σαφήνεια η έννοια του βιοϋμενίου. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο πιο απλός αλλά ταυτόχρονα αόριστος ορισμός είναι ότι «το βιοϋμένιο είναι μια μεμβράνη που σχηματίζεται από έναν μικροοργανισμό»⁴⁶. Στην πραγματικότητα το βιοϋμένιο αποτελείται από μια κοινότητα κυττάρων ενός ή περισσότερων μικροοργανισμών τα οποία προσκολλώνται πάνω σε μία βιοτική ή αβιοτική επιφάνεια, ή διεπιφάνεια, και συγκρατούνται μεταξύ τους μέσω ινώδους δικτύου εξωκυτταρικών πολυμερικών

ουσιών (extracellular polymeric substances, EPS) που σχηματίζουν^{47,48}. Η κοινότητα αυτή των βακτηρίων είναι ιδιαίτερα περίπλοκη, παρουσιάζει υψηλό βαθμό οργάνωσης και αποτελείται όπως αναφέρθηκε από ένα ή περισσότερα είδη μικροοργανισμών, μορφή που είναι πιο συνηθισμένη στη φύση⁴⁹. Η εξωκυττάρια ουσία (EPS) εκκρίνεται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς. Η σύσταση και οι ιδιότητές της διαφέρουν ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που συνιστά το βιοϋμένιο και το φυσικό περιβάλλον όπου αυτό αναπτύσσεται. Σε γενικές γραμμές αποτελείται κυρίως από νερό (97%) και πολυσακχαρίτες (1-2%) και ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης από πρωτεΐνες, φωσφοριπίδια, τειχοϊκά οξέα, νουκλεϊκά οξέα και άλλες πολυμερικές ουσίες^{50,51}. Η εξωκυττάρια ουσία περιβάλλει τις αποικίες των μικροοργανισμών και λειτουργεί προστατευτικά ως φίλτρο στο οποίο παγιδεύονται τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για τη διατήρηση της αποικίας των μικροοργανισμών. Τα βιοϋμένια διαφέρουν σαφώς από τους ελεύθερους (πλαγκτονικούς) μικροοργανισμούς όσον αφορά τον ρυθμό ανάπτυξης και την έκφραση των γονιδίων τους⁵².

Ένα από τα κλασσικά παράδειγματα βιοϋμενίου είναι η οδοντική πλάκα, ωστόσο βιοϋμένια αναπτύσσονται σχεδόν παντού, όπως σε δεξαμενές αποθήκευσης νερού, σε ιατρικά εργαλεία, σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, στο δίκτυο σωληνώσεων ύδρευσης, σε επιφάνειες μονάδων επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, σε ποτάμια και θάλασσες, στις πέτρες, στα βράχια και στο υπέδαφος.

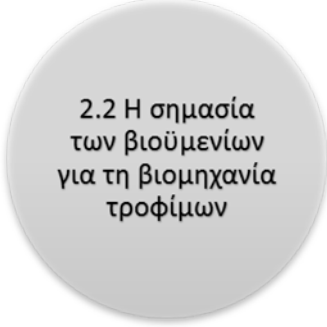
Βασικές προϋποθέσεις για την εμφάνιση των βιοϋμενίων είναι η δυνατότητα προσκόλλησης των κυττάρων και η παρουσία οργανικής ύλης, ικανής να διατηρήσει εν ζωή και να επιτρέψει τον πολλαπλασιασμό των προσκολλημένων κυττάρων⁵³. Η παραγωγή EPS παρέχει προστασία στο βιοϋμένιο καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση των θρεπτικών στοιχείων, εμποδίζεται η πρόσβαση των βιοκτόνων και αποτρέπεται ο εγκλεισμός τοξικών ουσιών και μετάλλων εντός της δομής του βιοϋμενίου ενώ ταυτόχρονα διατηρούνται τα επιθυμητά ποσοστά υγρασίας⁵⁴. Με βάση τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι στη βιομηχανία η ύπαρξη οργανικής υπολειμματικής ύλης (π.χ. υπολείμματα τροφίμων), οι ανόργανες ουσίες (που προέρχονται π.χ. από το σύστημα παροχής νερού) και η παραγωγή EPS είναι παράγοντες που προστατεύουν τη σύνθετη πολυκυτταρική οντότητα των μικροβίων (αλλοιογόνων ή/και παθογόνων) και ευνοούν την περαιτέρω ανάπτυξη βιοϋμενίων.

Στη προσκολλημένη τους μορφή τα βακτήρια εκφράζουν ένα διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα. Έτσι εμφανίζουν νέες ιδιότητες, όπως διαφορετικό ρυθμό ανάπτυξης, αυξημένη αντοχή στα απολυμαντικά και τα αντιβιοτικά, αυξημένο ρυθμό ανταλλαγής γενετικού υλικού, αυξημένη εξουδετέρωση της άμυνας του ξενιστή και επικοινωνία μεταξύ τους μέσω παραγωγής ειδικών μορίων σημάτων. Επιπλέον ο σχηματισμός βιοϋμενίου παρέχει στους μικροοργανισμούς προστασία από δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες όπως την υπεριώδη ακτινοβολία, την τοξικότητα των μετάλλων, την αφυδάτωση, τις οσμωτικές αλλαγές και τις αλλαγές στο pH^{55,56,57,58}.

Συνεπώς, η ανάπτυξη των βιοϋμενίων έχει σημαντικές επιπτώσεις σε διάφορους τομείς όπως στη βιομηχανία τροφίμων, στο περιβάλλον, στη δημόσια υγεία και στην ιατρική^{59,60}.

Ωστόσο οι συνέπειες του σχηματισμού και της ανάπτυξης βιοϋμενίων ποικίλουν, ανάλογα με τις θέσεις που αναπτύσσονται κάθε φορά οι μικροβιακές κοινότητες, από επιθυμητές (σκοπίμες), ανεπιθύμητες έως και καταστροφικές. Στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων επιδιώκεται η δημιουργία βιοϋμενίων στα φίλτρα στάλαξης με σκοπό τη βιολογική επεξεργασία αποβλήτων. Σε περιπτώσεις διαρροών υπόγειων δεξαμενών ή χωματερών τα αναπτυσσόμενα βιοϋμένια λειτουργούν ως βιοεμπόδια με σκοπό την παρεμπόδιση της περιβαλλοντικής μόλυνσης. Ανεπιθύμητα αποτελέσματα παρουσιάζονται όταν βιοϋμένια σχηματίζονται σε εναλλάκτες θερμότητας και σε αγωγούς μεταφοράς γάλακτος προκαλώντας το φαινόμενο biofouling. Τέλος, η ανάπτυξη βιοϋμενίων σε βιοϊατρικά προσθετικά υλικά και σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων είναι η αιτία πρόκλησης σοβαρών, ακόμα και θανατηφόρων λοιμώξεων⁶¹.

Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι η κατανόηση των μηχανισμών που εμπλέκονται τόσο στον σχηματισμό αλλά και τη λειτουργία των βιοϋμενίων, αποτελούν κρίσιμο θέμα όσον αφορά την αντιμετώπιση ενός προβλήματος που έχει πάρει ανησυχητικές διαστάσεις τα τελευταία χρόνια και χρήζει άμεσης και ουσιαστικής αντιμετώπισης.



2.2 Η σημασία των βιοϋμενίων για τη βιομηχανία τροφίμων

Η παρουσία των βιοϋμενίων στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων μπορεί να προκαλέσει επιμόλυνση των προϊόντων, μειώνοντας τη διάρκεια ζωής τους και αυξάνοντας την πιθανότητα πρόκλησης τροφικών δηλητηριάσεων⁶². Οι προσκολλημένοι σε επιφάνειες μικροοργανισμοί (sessile) πλεονεκτούν έναντι των ελεύθερων πλαγκτονικών (planktonic) στο ότι είναι πιο δύσκολο να απομακρυνθούν μηχανικά από τις επιφάνειες και είναι ανθεκτικοί σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και απολυμαντικά.⁶³

Τόσο αλλοιογόνοι όσο και παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν βιοϋμένια, παρουσιάζοντας ιδιαίτερη επιμονή στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, επηρεάζοντας έτσι την ποιότητα και την ασφάλεια των τελικών προϊόντων. Οι μικροοργανισμοί αυτοί έχουν τη δυνατότητα να προσκολλώνται και να σχηματίζουν βιοϋμένια πάνω σε διάφορα υλικά όπως ο ανοξείδωτος χάλυβας, το πολυστυρένιο, το καουτσούκ, το αλουμίνιο, το γυαλί και τα πλαστικά. Η αυξημένη αντοχή που παρουσιάζουν κατά τις διεργασίες απολύμανσης θέτει σε κίνδυνο την υγεία των καταναλωτών και μπορεί να προκαλέσει μεγάλες οικονομικές απώλειες στις βιομηχανίες τροφίμων.

Στη βιομηχανία τροφίμων τα βιοϋμένια αποτελούν μια σταθερή πηγή μόλυνσης η οποία μπορεί να μεταφερθεί από τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων προς τα παραγόμενα τρόφιμα και τον περιβάλλοντα χώρο. Βιοϋμενικοί πληθυσμοί μπορούν να αποκολληθούν από την εξωκυττάρια πολυμερική μεμβράνη στην οποία εμπρικλείονται, να μολύνουν τα τρόφιμα κατά τη διάρκεια παραγωγής και επεξεργασίας τους, ή να διασπαρούν στον περιβάλλοντα χώρο δημιουργώντας άλλες εστίες μόλυνσης. Η παρουσία ανεπιθύμητων (αλλοιογόνων ή/και παθογόνων) μικροοργανισμών στα τελικά προϊόντα σε επίπεδα μεγαλύτερα από τα επιτρεπόμενα όρια που ορίζει η νομοθεσία, οφείλεται κυρίως σε διαμείωση και είναι ένδειξη μη αποτελεσματικής υγιεινής πρακτικής.

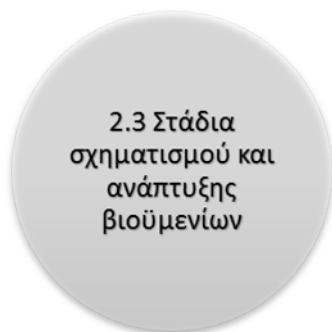
Το κύριο χαρακτηριστικό των βιοϋμενίων που σχετίζεται με την ασφάλεια και την αλλοίωση των τροφίμων είναι η αυξημένη αντοχή αυτών σε διεργασίες απολύμανσης σε σχέση με την αντοχή ελεύθερων (planktonic) μικροβιακών κυττάρων που δεν ανήκουν σε κοινότητα βιοϋμενίων. Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό πηγάζει από τον μηχανισμό σχηματισμού, τη φυσιολογία των κυττάρων και την (τρισιδιάστατη) δομή των βιοϋμενίων. Βιοϋμένια δύνανται να αναπτυχθούν σχεδόν σε όλους τους χώρους μιας εγκατάστασης επεξεργασίας τροφίμων, όπως στις επιφάνειες κατεργασίας τροφίμων, στις επιφάνειες κοπής, στις λεπίδες κοπτικών μηχανών, σε μαχαίρια, σε άλλα εργαλεία και μηχανήματα που χρησιμοποιούνται στην παραγωγική διαδικασία, σε ιμάντες μεταφοράς, σε δεξαμενές και σωληνώσεις μεταφοράς υγρών αλλά και σε σημεία που δεν έρχονται σε άμεση επαφή με τρόφιμα όπως δάπεδα, τοίχοι, υδρορροές, αποχετεύσεις. Τραχείες επιφάνειες με εσοχές στις οποίες δεν μπορούν να εισχωρήσουν τα απολυμαντικά αποτελούν άριστα σημεία ανάπτυξης βιοϋμενίων.

Ο σχηματισμός βιοϋμενίων στις μεταλλικές επιφάνειες μπορεί να προκαλέσει διάβρωση και ως εκ τούτου καταστροφή των σωληνώσεων και των μεταλλικών επιφανειών δημιουργώντας επιπρόσθετες οικονομικές ζημιές σε μια βιομηχανία τροφίμων. Η ανάπτυξη βιοϋμενίων μπορεί να προκαλέσει μηχανικές αποφράξεις και μείωση της αποτελεσματικής μεταφοράς θερμότητας. Η παρουσία βιοϋμενίων εντός των εναλλακτών θερμότητας και των σωληνώσεων οδηγεί σε μείωση της απόδοσης του εξοπλισμού και κατ' επέκταση σε αύξηση της απαιτούμενης καταναλισκόμενης ενέργειας. Διασπορά των βακτηρίων στις επιφάνειες, στα τρόφιμα και στον περιβάλλοντα χώρο επεξεργασίας τροφίμων είναι εφικτό να γίνει και μέσω των αερολυμάτων που δημιουργούνται κατά τις διεργασίες καθαρισμού.

Η πρόληψη και ο έλεγχος της παρουσίας βιοϋμενίων στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων είναι ένα πολύ σημαντικό στάδιο το οποίο πρέπει να μελετάται ενδελεχώς από τους υπεύθυνους των βιομηχανιών τροφίμων. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, καθίσταται απαραίτητη η ανάπτυξη στρατηγικών ελέγχου με στόχο την καθυστέρηση, τη μείωση ή ακόμα και την εξάλειψη της συσσώρευσης μικροοργανισμών στις επιφάνειες και τον εξοπλισμό

των εγκαταστάσεων επεξεργασίας τροφίμων. Για τον έλεγχο της ανάπτυξης των βιοϋμενίων απαιτείται η κατανόηση της αλληλεπίδρασης των μικροοργανισμών με τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα.

Αξίζει να αναφερθεί ότι οι Holah και συν. (1989) και αργότερα οι Gibson και συν. (1995) ήταν οι πρώτοι που χρησιμοποίησαν για τη μελέτη της ανάπτυξης βιοϋμενίων επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα (κουπόνια). Οι επιφάνειες αυτές προσαρμόστηκαν σε επιφάνειες βιομηχανικών εξοπλισμών που έρχονταν απευθείας σε επαφή με τρόφιμα. Αυτή ήταν και η πρώτη προσπάθεια για τη διερεύνηση του σχηματισμού βιοϋμενίων κάτω από πραγματικές συνθήκες. Τα κουπόνια απομακρύνονταν ανά καθορισμένα διαστήματα και με κατάλληλες διεργασίες μεταφέρονταν στο εργαστήριο ώστε να γίνει η αξιολόγηση του βαθμού προσκόλλησης και του ρυθμού ανάπτυξης των βιοϋμενικών κυττάρων^{64,65}.

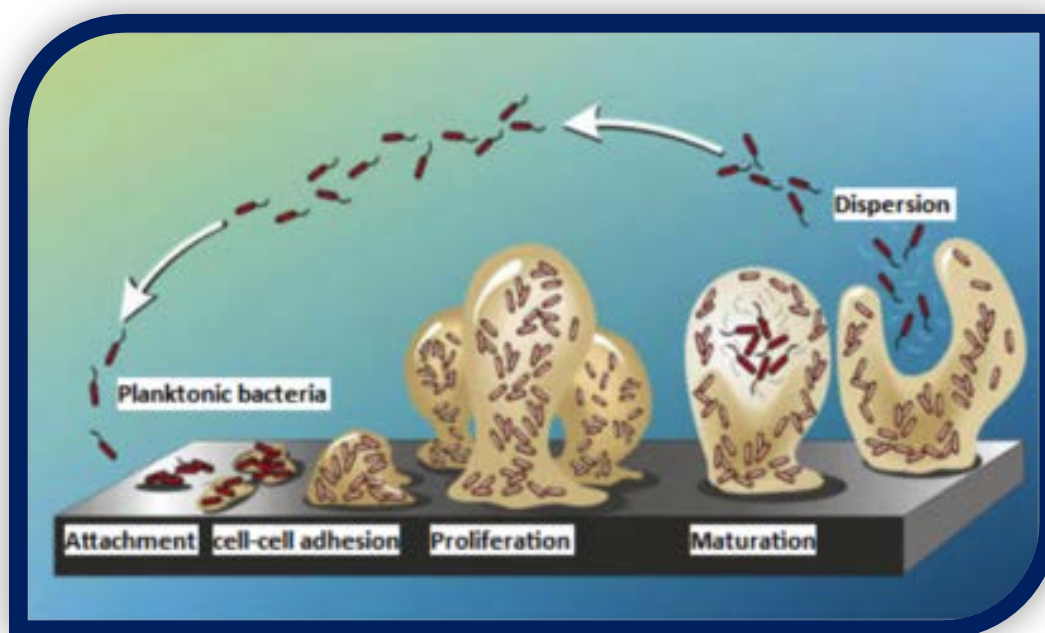


Τα βιοϋμενία θεωρούνται «δυναμικές οντότητες», ετερογενείς στον χώρο και τον χρόνο που υπόκεινται σε πολλαπλές ενδογενείς και περιβαλλοντικές επιδράσεις. Ο «δυναμικός» χαρακτήρας του βιοϋμενίου φαίνεται από τον κύκλο ζωής του ο οποίος περιλαμβάνει πέντε διακριτά στάδια (Σχήμα 5).

Στο αρχικό στάδιο λαμβάνει χώρα η προσκόλληση των πλαγκτονικών μικροοργανισμών στις επιφάνειες. Η μετάβαση των κυττάρων από τη μη προσκολλημένη τους μορφή (planktonic) στην προσκολλημένη (sessile) προκαλείται από περιβαλλοντικά σήματα. Τα προσκολλημένα βακτήρια εκφράζουν ένα διαφορετικό φαινότυπο σε σχέση με τα πλαγκτονικά⁶⁶. Η αρχική προσκόλληση των μικροοργανισμών είναι στην πραγματικότητα μια αντιστρεπτή διεργασία που εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των κυττάρων, της επιφάνειας προσκόλλησης και του περιβάλλοντος μέσου.

Τα πρώτα συστατικά που συνδέονται με μια επιφάνεια δεν είναι οι μικροοργανισμοί αλλά ίχνη οργανικής ύλης τα οποία, μαζί με την ύπαρξη νερού, δημιουργούν ένα στρώμα πάνω στην επιφάνεια. Το στρώμα αυτό το οποίο αναφέρεται στη βιβλιογραφία ως «μεμβράνη εγκλισμού», «conditioning film» ή «conditioning layer» αποτελεί πηγή θρεπτικών συστατικών για τους μικροοργανισμούς και αλλάζει ορισμένα χαρακτηριστικά της επιφάνειας όπως την ηλεκτροστατικότητα, την υδροφοβικότητα και την ελεύθερη ενέργεια, ευνοώντας έτσι την μετέπειτα προσκόλληση των κυττάρων⁶⁷. Σε περίπτωση που υπερισχύσουν απωστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις, τα βακτήρια απωθούνται από την επιφάνεια και δεν δύνανται να την προσεγγίσουν ώστε να αρχίσει η διαδικασία της προσκόλλησης. Στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων η οργανική

υπολειμματική ύλη που εναποτίθεται πάνω σε μια επιφάνεια μπορεί να περιλαμβάνει πρωτεΐνες γάλακτος, κρέατος, λίπη κ.ά.



Σχήμα 5. Στάδια σχηματισμού βιοϋμενίων : [Στάδιο 1. Αρχική προσκόλληση στην επιφάνεια Στάδιο 2. Αμετάκλητη προσκόλληση Στάδιο 3. Πολλαπλασιασμός Στάδιο 4. Ωρίμανση και δημιουργία αποικίας Στάδιο 5. Διασπορά των μικροοργανισμών και περαιτέρω πολλαπλασιασμός]

Πηγή: https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Biofilms_and_Human_Implants

Ο τρόπος προσέγγισης στην επιφάνεια εξαρτάται από την κινητικότητα των κυττάρων και η προσκόλληση σε μια επιφάνεια μπορεί να πραγματοποιηθεί ενεργητικά ή παθητικά.

Η παθητική προσκόλληση προκαλείται από τη δύναμη της βαρύτητας, ή συμβαίνει λόγω διάχυσης ή τυρβώδους ροής⁶⁸. Η ενεργή προσκόλληση εξαρτάται από τις ιδιότητες της κυτταρικής επιφάνειας. Ο ρυθμός και η έκταση της προσκόλλησης εξαρτώνται από την υδροφοβικότητα της κυτταρικής επιφάνειας, την παρουσία εξωκυτταρικών εξαρτημάτων κίνησης όπως π.χ. μαστίγια, κροσσοί, βλεφαρίδες, ινίδια, τριχίδια κ.ά. και την ικανότητα για παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ενώσεων. Επιπλέον, η επίδραση χημειοστακτικών παραγόντων στα κινούμενα βακτήρια, επηρεάζει τον τρόπο που αυτά προσεγγίζουν μια επιφάνεια καθώς μια διαβάθμιση της συγκέντρωσης θρεπτικών συστατικών έχει ως αποτέλεσμα την κίνηση των κυττάρων προς στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

Οι ιδιότητες του περιβάλλοντος μέσου όπως το pH, η ταχύτητα ροής, η ιοντική ισχύς, επηρεάζουν σημαντικά το ρυθμό της μικροβιακής προσκόλλησης σε

μια επιφάνεια. Οι παράγοντες που καθορίζουν την κυτταρική προσκόλληση και τον σχηματισμό βιοϋμενίου παρατίθενται συνοπτικά στον **Πίνακα 5**.

Πίνακας 5. Συνοπτική παρουσίαση παραγόντων που επηρεάζουν την κυτταρική προσκόλληση και τον σχηματισμό βιοϋμενίου⁶⁹.

Ιδιότητες επιφάνειας προσκόλλησης	Ιδιότητες περιβάλλοντος υγρού μέσου	Ιδιότητες κυττάρου
Υφή/τραχύτητα Υδροφοβικότητα	Ταχύτητα ροής pH	Υδροφοβικότητα Εξωκυτταρικά εξαρτήματα (μαστίγια, βλεφαρίδες κλπ.)
Χημική σύσταση επιφάνειας Φορτίο	Θερμοκρασία Διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών	Εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες (EPS) Μόρια σηματοδότησης
Μεμβράνη εγκλιματισμού (conditioning film)	Αντιμικροβιακοί παράγοντες Κατιόντα	

Ανάλογα με την ιοντική ισχύ του υδάτινου μέσου δύο είναι τα πιθανά σενάρια αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα κύτταρα και στο στρώμα οργανικής ύλης επάνω στην επιφάνεια:

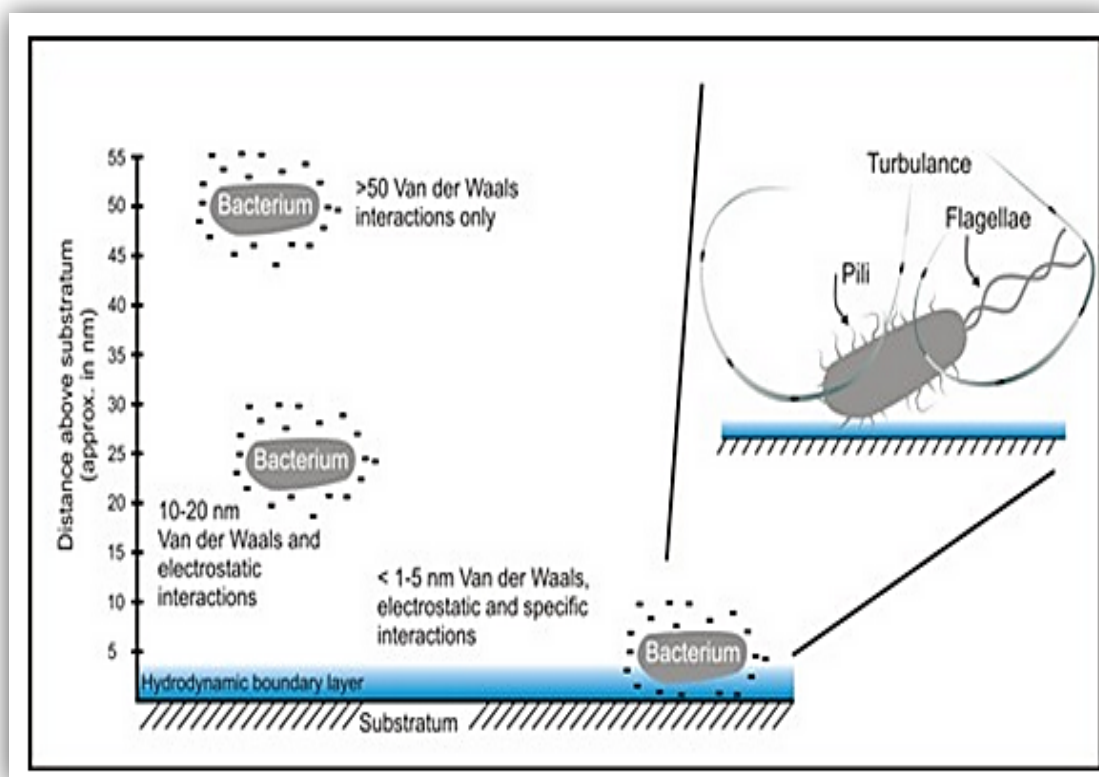
A. Ασθενής και αντιστρεπτή έλξη όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε συγκεκριμένη απόσταση από την επιφάνεια.

Τα κινούμενα κύτταρα διατηρώντας την κινητικότητάς τους (κίνηση κατά Brown) προσεγγίζουν μια επιφάνεια. Όταν τα κύτταρα βρεθούν σε απόσταση <1 nm από την επιφάνεια αναπτύσσονται δυνάμεις Van der Waals, ηλεκτροστατικές δυνάμεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, υδροδυναμικές κ.ά.⁷⁰ (**Σχήμα 6**). Οι δυνάμεις αυτές δεν είναι ισχυρές, γεγονός που επιτρέπει την εύκολη αποκόλληση των κυττάρων (π.χ. με πλύσιμο).

B. Ισχυρή και μη αντιστρεπτή έλξη όταν υπερισχύουν οι δυνάμεις Van der Waals.

Η μετάβαση από την αντιστρεπτή προσκόλληση στη μη αντιστρεπτή που αποτελεί και το επόμενο στάδιο στον κύκλο ζωής ενός βιοϋμενίου, επιτυγχάνεται όταν κάποια από τα αρχικά ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα «αγκυροβολούν» στις επιφάνειες, ξεκινούν να σχηματίζουν σταθερότερες δομές πάνω σε αυτές και παράλληλα παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες. Σε αυτό το στάδιο αναπτύσσονται ισχυρότερες δυνάμεις όπως δεσμοί υδρογόνου, ομοιοπολικοί και

ιοντικοί δεσμοί, δυνάμεις διπόλου-διπόλου καθώς και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις⁷¹ (Σχήμα 6). Σε αυτό το στάδιο ορισμένα βακτήρια υφίστανται μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων, τη λειτουργία ή/και τον φαινότυπο.



Σχήμα 6. Δυνάμεις Van der Waals και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Εφόσον ένα κύτταρο προσκολληθεί σε μια επιφάνεια αρχίζει η ανάπτυξη του. Οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες σχηματίζουν γέφυρες μεταξύ των κυττάρων και των επιφανειών, γεγονός που τους επιτρέπει τη μη αντιστρεπτή προσκόλλησή τους. Στο στάδιο αυτό καθώς τα κύτταρα έχουν εδραιωθεί στις επιφάνειες, το πλύσιμο δε θεωρείται αποτελεσματικό για την απομάκρυνσή τους. Απαιτείται η εφαρμογή ισχυρότερων δυνάμεων διάτμησης όπως π.χ. τρίψιμο, ξύσιμο, ή η εφαρμογή χημικών μεθόδων όπως π.χ. χρήση απορρυπαντικών, επιφανειοδραστικών ουσιών σε συνδυασμό με χρήση θερμότητας, εάν αυτό κρίνεται αναγκαίο^{72,73,74}.

Ο πολλαπλασιασμός των προσκολλημένων κυττάρων και η ταυτόχρονη παραγωγή EPS οδηγεί στον σχηματισμό μικροαποικιών. Στο τρίτο στάδιο τα κύτταρα αναπτύσσονται σε μικροαποικίες οι οποίες πολλαπλασιάζονται και συνενώνονται διαμορφώνοντας ένα στρώμα πάνω στην επιφάνεια. Από μελέτες που εξετάζουν τον σχηματισμό βιοϋμενίων σε φυσικά συστήματα, αποδεικνύεται ότι κατά τη δημιουργία μικροαποικιών δύναται να λαμβάνουν μέρος και πλαγκτονικά κύτταρα τα οποία κινούνται στο περιβάλλον μέσο, ως αποτέλεσμα της διακυτταρικής

επικοινωνίας (quorum sensing)^{75,76}. Η σταδιακή απόθεση μικροαποικιών του ίδιου ή διαφορετικών βακτηριακών ειδών συνοδεύεται από τη συνεχή παραγωγή EPS. Το δίκτυο των εξωκυτταρικών πολυμερικών ενώσεων που αναπτύσσεται παρέχει προστασία στο βιοϋμένιο, συγκρατεί θρεπτικά στοιχεία από το περιβάλλον μέσο και αποτελεί το βασικό δομικό υλικό του βιοϋμενίου. Ο ρόλος του δικτύου EPS στη γενικότερη ύπαρξη και λειτουργία του βιοϋμενίου είναι πολύπλευρος. Σύμφωνα με τους Ophir και Gutnick (1994), το EPS προστατεύει τους μικροοργανισμούς κρατώντας το βιοϋμένιο ενυδατωμένο, αποτρέποντας την αφύγρανσή του. Έτσι δημιουργείται ένα κατάλληλο περιβάλλον για την ύπαρξη και ανάπτυξη των μικροοργανισμών⁷⁷.

Έχει προαναφερθεί ότι η ανθεκτικότητα που επιδεικνύουν τα βιοϋμενικά κύτταρα σε υψηλές συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών παραγόντων είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την αντοχή των ελεύθερα κινούμενων κυττάρων. Η ενδιαφέρουσα αυτή συμπεριφορά και αντίδραση των μικροοργανισμών σχετίζεται με το δίκτυο EPS καθώς αυτό λειτουργεί ως φραγμός και εμποδίζει τις ουσίες να φτάσουν στο εσωτερικό του βιοϋμενίου καταστρέφοντας τους μικροοργανισμούς-στόχους. Η ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων εξαρτάται επιπλέον από τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Με την πάροδο του χρόνου όσο τα βιοϋμένια αναπτύσσονται και εδραιώνονται σε μια επιφάνεια, τόσο μεγαλύτερη ανθεκτικότητα παρουσιάζουν.

Εάν επικρατούν κατάλληλες συνθήκες για τον περαιτέρω σχηματισμό μικροαποικιών, το βιοϋμένιο έχει την ικανότητα να αναπτύσσει μία οργανωμένη δομή. Στο στάδιο αυτό αναπτύσσονται πλέον μικροαποικίες στο εσωτερικό ενός ώριμου βιοϋμενίου. Το ώριμο βιοϋμένιο μπορεί να αποτελείται από ένα ή περισσότερα στρώματα κυττάρων ενώ εξωκυτταρικά πολυμερή εξακολουθούν να παράγονται. Το EPS συγκρατεί τα βακτηριακά στρώματα μεταξύ τους ενώ διάλυοι νερού και πόροι διαμορφώνουν τις μικροαποικίες στον χώρο.

Στη τελική τους κατάσταση τα βιοϋμένια παρουσιάζουν ετερογενή σύσταση ενώ οι μικροοργανισμοί εξακολουθούν να αναπτύσσονται προστατευμένοι και δομημένοι σε αποικίες. Η ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων είναι συναφής με την τρισδιάστατη δομή τους ωστόσο όταν αυτή η δομή διαταραχθεί τα βιοϋμένια παύουν να έχουν την ίδια αντοχή.

Στο τελικό στάδιο τα προσκολλημένα κύτταρα, προκειμένου να επιβιώσουν και να αποικίσουν σε μια νέα επιφάνεια αποκολλώνται από το βιοϋμένιο. Με τον όρο «αποκόλληση βιοϋμενίου» νοείται η απώλεια υλικού (όπως μικροβιακά κύτταρα και EPS), από τη δομή του βιοϋμενίου, προς το υγρό μέσο που το περιβάλλει. Ερευνητές χρησιμοποιούν του όρους «αποκόλληση» και «διασπορά» για να περιγράψουν το στάδιο κατά το οποίο τμήματα του βιοϋμενίου ή μεμονωμένα κύτταρα διαχωρίζονται από το βιοϋμένιο και «ταξιδεύουν» σε άλλες περιοχές είτε λόγω της ροής του περιβάλλοντος μέσου είτε λόγω εμφάνισης εξωκυτταρικών εξαρτημάτων κίνησης (π.χ. μαστίγια). Τα κύτταρα διαχέονται στον περιβάλλοντα χώρο με την πλαγκτονική τους πλέον μορφή⁷⁸. Τα αποδεσμευμένα

κύτταρα μπορούν να μεταφερθούν και να εγκατασταθούν σε μια καινούρια επιφάνεια ξεκινώντας έναν καινούριο κύκλο σχηματισμού βιοϋμενίου. Το φαινόμενο της αποκόλλησης είναι μια έντονα δυναμική διαδικασία η οποία εξαρτάται από πλήθος παραγόντων που σχετίζονται τόσο με φυσικοχημικές παραμέτρους όσο και με τη βιολογία των κυττάρων. Η αποκόλληση υφίσταται όταν οι δυνάμεις που δρουν πάνω σε αυτό ξεπεράσουν την δύναμη συνεκτικότητας του βιοϋμενίου⁷⁹. Φαινόμενα αποκόλλησης τμημάτων βιοϋμενίου οδηγούν σε μεταβολές στη δομή και τη μορφολογία του. Οι δυνάμεις που αναπτύσσονται μπορεί να είναι παθητικές όπως:

- υδροδυναμικές δυνάμεις, προκαλούμενες από την κίνηση του περιβάλλοντος ρέοντος υγρού οι οποίες απομακρύνουν συνεχώς τμήματα του βιοϋμενίου
- διάβρωση (erosion), όπου τα κύτταρα μπορούν να απομακρυνθούν μεμονωμένα ή σε μικρά συσσωματώματα από τα ανώτερα στρώματα του βιοϋμενίου
- διάτμηση, η οποία υπερβαίνει την ιξωδοελαστική συμπεριφορά του βιοϋμενίου
- δυνάμεις από εξωτερικούς παράγοντες, π.χ. ενέργειες ανθρώπινης προέλευσης όπως χρήση απορρυπαντικών, τρίψιμο με βούρτσα

Ωστόσο μπορεί να υπάρχουν και βιολογικοί λόγοι αποκόλλησης τμημάτων του βιοϋμενίου. Έτσι αποκόλληση μπορεί να επέλθει λόγω:

- εξάντλησης των θρεπτικών συστατικών
- έλλειψης οξυγόνου στο εσωτερικό του βιοϋμενίου
- αύξησης του πάχους του βιοϋμενίου και επικράτησης αναερόβιων συνθηκών ή
- ως απόρροια του quorum sensing⁸⁰



2.4 Δομή βιοϋμενίου

Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για τον χαρακτηρισμό της δομής των βιοϋμενίων. Σύμφωνα με τον Chmielewski (2003) υπάρχουν τρεις θεωρίες-μοντέλα που περιγράφουν την αρχιτεκτονική των βιοϋμενίων⁸¹.

Η πρώτη θεωρία αφορά το μοντέλο του μονοστρωματικού βιοϋμενίου. Σύμφωνα με αυτό τα βιοϋμένια θεωρούνται λεία, επίπεδα και ομογενή. Η άποψη αυτή διατυπώθηκε από ερευνητές που παρατηρούσαν δείγματα οδοντικής πλάκας σε μικροσκόπιο εκπομπής ηλεκτρονίων (Transmission Electron Microscopy, TEM).

Αργότερα με τη χρήση μικροσκοπίου διαφοροποιητικής παρεμβατικής αντίθεσης (Differential Interference contrast, DIC) διαπιστώθηκε η ετερογένεια που παρουσιάζουν τα βιοϋμένια στο εσωτερικό τους λόγω των μικροαποικιών, του EPS και των καναλιών νερού⁸². Το μοντέλο του «σμήνους» (swarm model) περιέγραφε το βιοϋμένιο σαν ένα ετερογενές μωσαϊκό στο οποίο παρατηρούνταν συσσωρευμένοι μικροοργανισμοί που συγκρατούνταν με EPS. Σύμφωνα με το

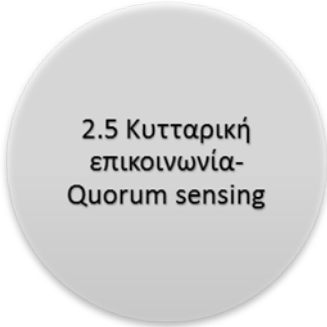
μοντέλο αυτό τα βιοϋμενικά κύτταρα παρουσιάζουν μια ιδιαίτερη χημική συγγένεια μεταξύ τους, γεγονός που τα αναγκάζει να παραμένουν ενωμένα. Με το μοντέλο αυτό ερμηνεύτηκε για πρώτη φορά η ενσωμάτωση των διαφορετικών μικροβιακών κοινοτήτων σε ένα βιοϋμένιο.

Η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM), το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με ακτίνες laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM), καθώς και η χρήση χρωστικών για τη σήμανση των μικροβιακών κυττάρων έχει συμβάλλει σημαντικά στην περιγραφή της δομής των βιοϋμενίων.

Η τρίτη και τελευταία δομή είναι αυτή της «μανιταροειδούς δομής» (mushroom model). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, τα βιοϋμένια εμφανίζουν σχήμα μανιταριού. Στις περιοχές κοντά στο στερεό υπόστρωμα η δομή στενεύει σε σχέση με το τμήμα που βρίσκεται προς την πλευρά του υγρού μέσου και το οποίο απλώνεται σε μεγαλύτερη έκταση. Αποτέλεσμα αυτών των δομών είναι η δημιουργία διαύλων νερού μέσω των οποίων επιτρέπεται η είσοδος θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου στο βιοϋμένιο, η διάχυση αυτών και η μεταφορά των παραγόντων επικοινωνίας, καθώς και η εξαγωγή των μεταβολιτών και των παραπροϊόντων των κυττάρων προς το εξωτερικό περιβάλλον τους⁸³.

Τα παραπάνω μοντέλα που αφορούν την αρχιτεκτονική των βιοϋμενίων δεν είναι τα μόνα που έχουν προταθεί. Ερευνητές έχουν παρατηρήσει ποικίλες δομές οι οποίες μπορεί να θεωρηθεί ότι αποτελούν συνδυασμό των μοντέλων που παρουσιάστηκαν στην παράγραφο αυτή.

Για παράδειγμα η δομή βιοϋμενίων του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* διαφέρει από την «κλασική» μανιταροειδή μορφή. Οι Chae και Schraft (2000) περιέγραψαν μια δομή δύο στρωμάτων κυττάρων του μικροοργανισμού αυτού. Τα βιοϋμένια καλλιεργήθηκαν πάνω σε γυάλινη επιφάνεια εντός θρεπτικού υλικού υπό στατικές συνθήκες. Με χρήση μικροσκοπίου CLSM διαπιστώθηκε ότι η δομή των βιοϋμενίων απαρτιζόταν από δύο στρώματα (άνω και κάτω στρώμα), καθένα από τα οποία περιείχε περισσότερα από 10^5 κύτταρα/cm², ενώ η ενδιάμεση περιοχή περιείχε λιγότερα από 10^5 κύτταρα/cm². Το άνω στρώμα είχε πάχος 4.54 μm το κάτω στρώμα 5.24 μm ενώ η απόσταση μεταξύ τους ήταν 2.13 μm. Οι ερευνητές εκτίμησαν ότι η δομή πιθανόν να είναι διαφορετική σε μη στατικές συνθήκες παροχής θρεπτικού μέσου⁸⁴.



2.5 Κυτταρική επικοινωνία-Quorum sensing

Τα περισσότερα είδη βακτηρίων διαθέτουν εξελιγμένα συστήματα επικοινωνίας μέσω των οποίων στέλνουν και λαμβάνουν μηνύματα προς και από τα άλλα βακτήρια. Τα βακτηριακά κύτταρα έχουν τη δυνατότητα να παράγουν και να απελευθερώνουν στο περιβάλλον τους χημικές ουσίες οι οποίες όταν φτάσουν σε μια κρίσιμη συγκέντρωση είναι υπεύθυνες

για τη ρύθμιση και την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων στο γενετικό τους υλικό. Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων - Quorum Sensing (αίσθηση απαρτίας) μέσω των χημικών ουσιών-σημάτων που απελευθερώνουν έχει αποδειχθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση, την ανάπτυξη του βιοϋμενίου και την αποκόλληση των κυττάρων από αυτό^{85,86} (Σχήμα 7).

Τα βακτήρια χρησιμοποιούν την παραγωγή, την απελευθέρωση, την ανταλλαγή και την ανίχνευση των χημικών σημάτων για να μετρούν την πυκνότητα του πληθυσμού τους και να ελέγχουν τη συμπεριφορά τους σε σχέση με τη διακύμανση του αριθμού των κυττάρων⁸⁷. Η ανταλλαγή σημάτων ανάμεσα στα διαφορετικά είδη βακτηρίων αλλά και μεταξύ των βακτηρίων του ίδιου είδους, τα βοηθά να αντιληφθούν το σχετικό πλήθος τόσο των ομοειδών όσο κι των διαφορετικών κυττάρων⁸⁸. Στη περίπτωση παθογόνων στελεχών το Quorum Sensing ρυθμίζει τη λοιμογόνο δράση τους. Ο νέος φαινότυπος που εμφανίζουν με ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων τα καθιστά λοιμογόνα όταν ο πληθυσμός τους φτάσει σε μια υψηλή συγκέντρωση³¹.

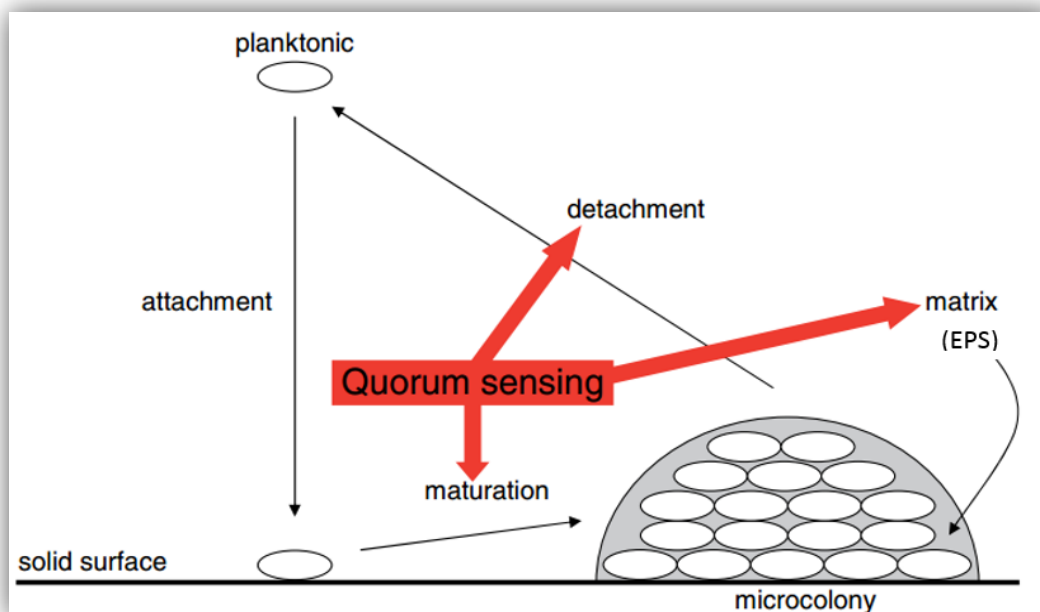
Ιδιαίτερος είναι ο ρόλος που διαδραματίζει η χημική επικοινωνία των βακτηρίων στα βιοϋμένια. Όπως έχει αναφερθεί, η δημιουργία βιοϋμενίου δεν αποτελεί απλή συνάρθρωση κυττάρων σε μία επιφάνεια. Τα κύτταρα των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται σε μορφή βιοϋμενίου δε δρουν αλλά ούτε και εκφράζουν τα διαφορετικά φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά ανεξάρτητα το ένα από το άλλο. Οι βιοϋμενικοί πληθυσμοί συμπεριφέρονται σαν μια ομάδα προκειμένου να μεταβολίσουν τα διάφορα θρεπτικά συστατικά και να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους. Στην πραγματικότητα λαμβάνει χώρα πλήθος μηχανισμών. Η συγκέντρωση μικροοργανισμών του ίδιου είδους ή και διαφορετικών ειδών οδηγεί σε σχηματισμό βιοϋμενίου μέσα από μηχανισμούς χημικών σημάτων. Τα σήματα αυτά συγκεντρώνονται τοπικά, έξω από το κύτταρο και όταν η συγκέντρωσή τους φτάσει σε ένα οριακό σημείο (κρίσιμη συγκέντρωση), τότε γίνεται «αντιληπτό» από τα κύτταρα ότι ο πληθυσμός έχει φτάσει σε μια ελάχιστη πυκνότητα- a quorum- και αρχίζει τη διαδικασία τροποποίησης της έκφρασης των γονιδίων⁸⁹. Η ποσότητα των σημάτων βοηθά τα βακτήρια να αντιληφθούν το σχετικό πλήθος τόσο των ομοειδών όσο και των διαφορετικών κυττάρων που βρίσκονται στο περιβάλλον τους⁹⁰. Η διαδικασία αυτή δίνει τη δυνατότητα στα βακτήρια να λειτουργούν συντονισμένα και να αποκομίζουν οφέλη που ποτέ δε θα μπορούσαν να επιτύχουν αν ενεργούσαν μεμονωμένα⁹¹. Οι μηχανισμοί που διαθέτουν οδηγούν τα βακτήρια στο να δημιουργούν ή να ανευρίσκουν τις συνθήκες εκείνες οι οποίες ευνοούν τη διασπορά των γονιδίων που σχετίζονται με τη διατήρηση και τον πολλαπλασιασμό τους. Στελέχη που φέρουν πλασμίδιο έχουν την ικανότητα να το μεταφέρουν σε στελέχη που δε διαθέτουν, δίνοντας τους την ικανότητα να αναπτύσσουν βιοϋμένια. Απουσία πλασμιδίων οι μικροοργανισμοί θα δημιουργούσαν μόνο μικροαποικίες, χωρίς περαιτέρω εξέλιξη³¹.

Το Quorum Sensing ελέγχει τον τρόπο με τον οποίο συμβιώνουν τα κύτταρα, ρυθμίζει την κινητικότητα των κυττάρων⁹², τη μεταφορά γενετικού υλικού από κύτταρο σε κύτταρο⁹³, την παθογένεια, τη σπορογονία, τη βιοφωταύγεια, τη βιοσύνθεση ενζύμων, τη βιοσύνθεση αντιμικροβιακών και αντιβιοτικών ουσιών, το σχηματισμό των βιοϋμενίων και την παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών^{27,33,94,95,96}.

Τα τελευταία χρόνια παρουσιάζεται μια αύξηση του αριθμού των ερευνητικών προσπαθειών που φανερώνουν την άμεση σχέση που έχει η διαμόρφωση της μορφολογίας των βιοϋμενίων με συστήματα Quorum Sensing για ένα μεγάλο εύρος βακτηρίων^{97,98,99}. Επιπλέον από ερευνητικές μελέτες υπάρχουν ενδείξεις ότι συστήματα Quorum Sensing ρυθμίζουν και ελέγχουν την παραγωγή συγκεκριμένων πρωτεϊνών που παράγονται από ορισμένα βακτήρια οι οποίες συμβάλλουν στην αποκόλληση τμημάτων του βιοϋμενίου, στα στάδια της ανάπτυξης όπου ο πληθυσμός των κυττάρων είναι μεγάλος ή υπάρχει έλλειψη σε θρεπτικά συστατικά^{100,101}. Πιστεύεται ότι όταν ο πληθυσμός των κυττάρων σε ένα βιοϋμένιο είναι ιδιαίτερα μεγάλος ή η ποσότητα των θρεπτικών υλικών είναι περιορισμένη, τα κύτταρα αναπτύσσουν μηχανισμούς ώστε αφ' ενός να αντιλαμβάνονται τις εκάστοτε συνθήκες και αφετέρου στην περίπτωση που αυτές δεν ευνοούν την ανάπτυξή τους να έχουν τη δυνατότητα να απελευθερώνονται στο ευρύτερο περιβάλλον σε μια προσπάθεια να αποικίσουν σε καινούριες περιοχές με μεγαλύτερη διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά¹⁰².

Στις δύο κατηγορίες μικροοργανισμών, Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, το σύστημα διακυτταρικής επικοινωνίας περιλαμβάνει την παραγωγή και ανίχνευση μορίων σημάτων που καλούνται αυτοεπαγωγείς¹⁰³. Τα Gram-αρνητικά βακτήρια χρησιμοποιούν μόρια σηματοδότησης τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των ακυλιωμένων λακτονών της ομοσερίνης (acylated homoserine lactones, AHLs)¹⁰⁴ ενώ τα Gram-θετικά χρησιμοποιούν ολιγο-πεπτίδια ως «χημικά σήματα».

Το QS φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, δίνοντας αφορμή για τη χρησιμοποίησή του ως ένα νέο «εργαλείο» για την αντιμετώπιση και τον έλεγχο των παθογόνων μικροοργανισμών στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων.



Σχήμα 7. Η επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων - Quorum Sensing στον κύκλο ζωής του βιοϋμενίου. Οι συνθήκες περιβάλλοντος πυροδοτούν αρχικά ορισμένες αλλαγές στην έκφραση μιας υποομάδας γονιδίων, απαιτούμενων για τον σχηματισμό του βιοϋμενίου. Το βιοϋμένιο παράγεται και αυτή η ανάπτυξη με τη σειρά της μεταβάλλει το μικροπεριβάλλον της περιοχής, οδηγώντας έτσι σε επιπρόσθετες αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και σε περαιτέρω ωρίμανση του βιοϋμενίου¹⁰⁵.

2.6 Η σημασία των βιοϋμενίων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* για τη βιομηχανία τροφίμων

Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*, τα οποία προσκολλώνται σε επιφάνειες, αποτελεί σημαντικό πρόβλημα και ελλοχεύει κινδύνους για τη βιομηχανία τροφίμων. Το παθογόνο αυτό βακτήριο μπορεί να εγκατασταθεί στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και να επιβιώσει για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται στις

επιφάνειες των γραμμών επεξεργασίας τροφίμων μπορούν να επιμολύνουν τα παραγόμενα προϊόντα προκαλώντας κίνδυνο για τη δημόσια υγεία¹⁰⁶. Τα κύτταρα που αναπτύσσονται με τη μορφή βιοϋμενίου παρουσιάζουν αντοχή σε αντιμικροβιακές και απολυμαντικές ουσίες αυξάνοντας έτσι τη πιθανότητα επιμόλυνσης των παραγόμενων τροφίμων. Η αποτελεσματική εξάλειψη των βιοϋμενίων από τους χώρους επεξεργασίας τροφίμων αποτελεί μείζον μέλημα για τη βιομηχανία τροφίμων.

Η λιστερίωση όπως έχει αναφερθεί, έχει σχετικά μικρή συχνότητα εμφάνισης, αλλά παρουσιάζει υψηλά ποσοστά νοσοκομειακής περίθαλψης και θνητότητας σε σχέση με άλλα τροφιμογενή νοσήματα. Πολλές περιπτώσεις λιστερίωσης έχουν συνδεθεί με φαινόμενα διαμείωσης λόγω κακών χειρισμών ή

αναποτελεσματικής υγιεινής πρακτικής στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Η *L. monocytogenes* εμφανίζεται συχνά στις εγκαταστάσεις βιομηχανιών τροφίμων και θεωρείται ο κύριος παράγοντας πρόκλησης τροφικής δηλητηρίασης έπειτα από κατανάλωση μολυσμένων έτοιμων προς κατανάλωση τροφίμων (RTE-Ready To Eat). Σύμφωνα με τους Truelstrup Hansen and Vogel (2011), η κύρια αιτία παρουσίας αυτού του μικροοργανισμού στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, μετά τη διεργασία της θερμικής επεξεργασίας, είναι η άμεση επαφή του τροφίμου με μολυσμένες επιφάνειες και μηχανήματα που χρησιμοποιούνται κατά την παραγωγή και την επεξεργασία των τροφίμων¹⁰⁷. Η μόλυνση των τελικών προϊόντων από τον παθογόνο αυτό μικροοργανισμό θεωρείται σημαντική απειλή για την ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων.

Το 2008 σημειώθηκαν στον Καναδά 56 κρούσματα και 20 θάνατοι λόγω κατανάλωσης μολυσμένων κρεατοσκευασμάτων έτοιμων προς κατανάλωση (RTE-Ready To Eat). Στελέχη *L. monocytogenes* απομονώθηκαν από τις κοπτικές μηχανές του εργοστασίου παραγωγής των προϊόντων αυτών¹⁰⁸. Μια βιομηχανία παραγωγής προϊόντων αρτοποιίας στις Ηνωμένες Πολιτείες προχώρησε σε ανάκληση παρτίδων από 128 διαφορετικά είδη προϊόντων τα οποία είχαν διατεθεί στην αγορά. Και σε αυτή την περίπτωση, η κοπτική μηχανή ήταν η αιτία επιμόλυνσης των προς τεμαχισμό προϊόντων¹⁰⁹.

Η άμεση μεταφορά του μικροοργανισμού από την επιφάνεια επεξεργασίας στο προϊόν εξαρτάται από τον αρχικό αριθμό κυττάρων του μικροοργανισμού, τη σύνθεση του τροφίμου, τη θερμοκρασία, τον τύπο του υλικού της επιφάνειας και την παρουσία άλλης μικροχλωρίδας¹¹⁰.

Στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* έχουν την ικανότητα να αναπτύσσονται σε επιφάνειες παρουσία άλλων μικροχλωρίδων επιμολύνοντας τα παραγόμενα προϊόντα¹¹¹. Στελέχη τα οποία απομονώνονται επανειλημμένα από την ίδια εγκατάσταση για μεγάλα χρονικά διαστήματα χαρακτηρίζονται ως «επίμονα στελέχη» (persistent strains). Η επίμονη παραμονή έχει συνδεθεί με την ικανότητα των στελεχών να σχηματίζουν βιοϋμένια και να αναπτύσσουν μηχανισμούς αυξημένης αντίστασης έναντι αντιμικροβιακών παραγόντων.

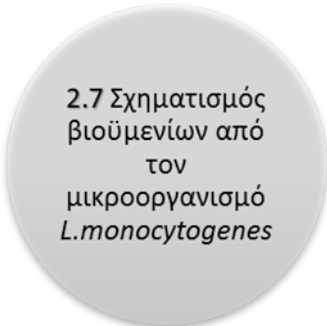
Συνήθεις περιοχές στις οποίες εντοπίζονται πληθυσμοί της *L. monocytogenes* είναι οι γεμιστικές μηχανές, ο εξοπλισμός συσκευασίας, τα εξαρτήματα και ο εξοπλισμός που χρησιμοποιούνται για την εμβάπτιση των προϊόντων σε άλμη, εργαλεία χειρός, γάντια, οι χώροι ψύξης και κατάψυξης^{112,113,114}. Σύμφωνα με τους Jones και συν. (1997), η επικινδυνότητα του βακτηρίου *L. monocytogenes* οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητά του να αναπτύσσεται σε μια ευρεία περιοχή θερμοκρασιών¹¹⁵. Δεδομένου ότι το βακτήριο αυτό είναι ψυχρότροφο, μπορεί να πολλαπλασιάζεται στους χώρους αποθήκευσης τροφίμων. Ακόμη και ένας αρχικά μικρός αριθμός κυττάρων του μικροβίου μπορεί να μολύνει τα τρόφιμα και να προκαλέσει νόσο¹¹⁶.

Επιπρόσθετα, η ισχυρή προσκόλληση και η αυξημένη ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού αυτού καθιστά μη εφικτή την εξάλειψή του ιδιαίτερα σε περιοχές όπου είναι δύσκολο να καθαριστούν, όπως π.χ. εσοχές, «νεκρές» περιοχές, διαβρωμένα υλικά όπως και χώροι οι οποίοι είναι δύσκολα προσβάσιμοι στη μηχανική καθαριότητα όπως π.χ. αποχετεύσεις, μεταφορικοί μάντες, φθαρμένα λάστιχα στεγανοποίησης κ.ά. Η παρουσία και η επιμονή του μικροοργανισμού αυτού στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί πρόκληση για τη βιομηχανία τροφίμων¹¹⁷.

Πλήθος ερευνητών μελετούν τους μηχανισμούς με τους οποίους η *L. monocytogenes* προσκολλάται και αναπτύσσεται σε αβιοτικές επιφάνειες. Έχει αποδειχθεί ότι στελέχη *L. monocytogenes* έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν βιοϋμένια σε επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα, αλουμίνιο, πλαστικό (Teflon, Nylon), πολυπροπυλένιο, καουτσούκ και γυαλί^{118,119}.

Η εκπόνηση μελετών για τη διερεύνηση τη επιβίωσης του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* στη γραμμή επεξεργασίας τροφίμων μπορεί να βελτιώσει τις παρεμβατικές στρατηγικές και να μειώσει τον κίνδυνο για την υγεία. Η πρόληψη της ανάπτυξης ή εναλλακτικά η παρεμπόδιση της εξάπλωσης των βιοϋμενίων στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων και στα τρόφιμα μεταφράζεται σε χαμηλότερο οικονομικό κόστος για τη βιομηχανία με ταυτόχρονη διασφάλιση της ποιότητας και ασφάλειας των προϊόντων.

Κατά συνέπεια, η κατανόηση των μηχανισμών προσκόλλησης, ανάπτυξης και αποκόλλησης των βιοϋμενίων του μικροοργανισμού αυτού έχει μεγάλη σημασία για τις επιχειρήσεις τροφίμων. Η βελτιστοποίηση των διαδικασιών ελέγχου απαιτεί περαιτέρω έρευνα και σε βάθος κατανόηση των παραγόντων που επιδρούν στα στάδια ζωής ενός βιοϋμενίου.



2.7 Σχηματισμός
βιοϋμενίων από
τον
μικροοργανισμό
L.monocytogenes

Όπως αναφέρουν οι Donlan και Costerton (2002), η ανάπτυξη ενός βιοϋμενίου εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες οι κυριότεροι από τους οποίους είναι: οι ιδιότητες του υγρού θρεπτικού μέσου (σύσταση, θερμοκρασία ανάπτυξης, pH, υγρασία, ύπαρξη αντιμικροβιακών παραγόντων), οι φυσικοχημικές ιδιότητες του υποστρώματος (τραχύτητα, υδροφοβικότητα), οι φυσικοχημικές δυνάμεις πρόσφυσης, τα γενετικά χαρακτηριστικά των στελεχών, η παρουσία άλλων μικροοργανισμών, ο χρόνος επαφής και ο αριθμός των κυττάρων που ενοφθαλμίζονται. Οι παράγοντες αυτοί επιδρούν σε όλα τα στάδια του κύκλου ζωής ενός βιοϋμενίου: από την αρχική προσκόλληση μέχρι την ωρίμανση και την αποκόλληση κυττάρων ή τμήματος του βιοϋμενίου από μια επιφάνεια¹²⁰.

Στη συνέχεια θα παρουσιαστεί η επίδραση των παραγόντων αυτών παραθέτοντας απόψεις-συμπεράσματα ερευνητών που έχουν ασχοληθεί με τη μελέτη των βιοϋμενίων.

1) Αρχική προσκόλληση των πλαγκτονικών κυττάρων *L. monocytogenes*

Οι Takhistov και George (2004) παρατήρησαν την ικανότητα ταχείας προσκόλλησης κυττάρων *L. monocytogenes* (εντός 3-5 sec) σε τυχαία σημεία πάνω σε επιφάνειες από αλουμίνιο. Η έκταση της προσκόλλησης ήταν αρχικά μικρή και τα κύτταρα αναπτύσσονταν ομοιόμορφα, ωστόσο με την πάροδο του χρόνου, παρατηρήθηκε συσώρευση και ανάπτυξη των κυττάρων με αποτέλεσμα τον σχηματισμό μικροαποικιών¹²¹. Κατά το αρχικό στάδιο προσκόλλησης οι ερευνητές Beresford και συν. (2001) διέκριναν ότι ορισμένα κύτταρα δεσμεύονταν με τρόπο αντιστρεπτό ενώ άλλα κύτταρα προσκολλούνταν μη αντιστρεπτά, με τον αριθμό των τελευταίων να αυξάνεται συνεχώς¹²². Σύμφωνα με τους Van Houdt R. και Michiels C.W. (2010), η παρουσία μαστιγίων διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο στάδιο αυτό. Η κινητικότητα των κυττάρων μέσω μαστιγίων είναι απαραίτητη προϋπόθεση ώστε να προσεγγίσουν μια επιφάνεια, επιτρέποντας στα κύτταρα να ξεπεράσουν τις υπάρχουσες απωθητικές δυνάμεις οι οποίες αποτρέπουν την πρόσδεσή τους σε μια επιφάνεια¹²³.

Επίδραση εξωτερικών παραγόντων: θρεπτικά συστατικά, ιδιότητες επιφάνειας, pH

Θρεπτικό μέσο. Η σύσταση του θρεπτικού μέσου είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζει την πυκνότητα των κυττάρων που αναπτύσσονται σε βιοϋμένιο. Αρκετοί ερευνητές παρατήρησαν ότι ισχυρότερη προσκόλληση κυττάρων *L. monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα έλαβε χώρα όταν αυτά καλλιεργήθηκαν σε πλούσιο θρεπτικό υλικό απ' ό,τι σε φτωχό^{124,125}. Οι Djordjevic και συν. (2002) και Moltz και συν. (2005) συμπέραναν ότι τα κύτταρα προσκολλώνται ισχυρότερα όταν καλλιεργούνται σε αραιωμένες ποσότητες εμπλουτισμένων θρεπτικών μέσων^{126,127}. Ωστόσο σε αντιφατικά αποτελέσματα κατέληξαν οι Jaradat και Bhunia (2002) οι οποίοι διαπίστωσαν μείωση της έκφρασης πρωτεϊνών προσκόλλησης (*Listeria* adhesion protein- LAP) όταν τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε πλούσιο θρεπτικό υλικό με υψηλή συγκέντρωση γλυκόζης¹²⁸.

Οι Stepanovic και συν. (2004) μελέτησαν το ρυθμό ανάπτυξης των βιοϋμενίων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* ενοφθαλμίζοντας ίσες ποσότητες του μικροοργανισμού σε πλούσια και σε φτωχά θρεπτικά υλικά. Μεγαλύτεροι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων παρατηρήθηκαν στο μέσο καλλιέργειας BHI (brain heart infusion broth, BHI) ενώ μικρότερη ανάπτυξη έλαβε χώρα σε αραιό (1:20) TSB (Tris Buffered Saline) που περιείχε μη αραιωμένο TBS και ζωμό κρέατος.¹²⁹

Ιδιότητες επιφάνειας. Έχει ήδη αναφερθεί ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να αποικίζει και να σχηματίζει βιοϋμένια σε ποικιλία επιφανειών που συναντώνται στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Οι Beresford και συν. (2001) διερεύνησαν την ικανότητα προσκόλλησης του στελέχους 10403 S σε επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα, καουτσούκ, πλαστικό, πολυπροπυλένιο και γυαλί. Συμπέραναν ότι το στέλεχος αυτό προσδένεται ισχυρά σε όλα τα είδη επιφανειών εκτός από την επιφάνεια προπυλενίου¹³⁰.

Οι Meylheuc και συν. (2001) παρατήρησαν ότι το στέλεχος LO28 προσκολλάται καλύτερα σε ανοξείδωτο χάλυβα απ' ό,τι σε πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE)¹³¹. Οι Smoot και Pierson (1998) παρατήρησαν ότι η αρχική πρόσδεση του στελέχους Scott A σε ανοξείδωτο χάλυβα ήταν πιο γρήγορη σε σύγκριση με το καουτσούκ (Buna-N rubber) αλλά η προσκόλληση ήταν πιο ισχυρή στο δεύτερο υλικό¹³². Οι Ronner και Wong (1993), Helke και Wong (1994) σε μελέτες που προσομοίαζαν τη διαδικασία CIP διαπίστωσαν ότι το καουτσούκ δεν ευνοούσε αλλά δρούσε ανασταλτικά στην ανάπτυξη βιοϋμενίων από κύτταρα *L. monocytogenes*^{133,134}.

Σύμφωνα με τα ευρήματα των Blackman και Frank (1996), η ικανότητα της *L. monocytogenes* να σχηματίζει βιοϋμένια σε ανοξείδωτο χάλυβα, Teflon, Nylon και σε στεγανοποιητικό υλικό δαπέδου από πολυεστέρα μεταβάλλεται σε σχέση με τη θερμοκρασία επώασης και τη σύσταση του θρεπτικού μέσου. Με TSB ως θρεπτικό μέσο, η ανάπτυξη βιοϋμενικών πληθυσμών ήταν μεγαλύτερη στο στεγανοποιητικό υλικό από πολυεστέρα τόσο στους 21°C όσο και στους 10°C. Όταν ως μέσο ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε ένα καθορισμένης χημικής σύστασης θρεπτικό υλικό, δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός βιοϋμενίων. Ένα από τα γενικά συμπεράσματα που διατύπωσαν οι ίδιοι ερευνητές ήταν ότι η *L. monocytogenes* προσκολλάται ταχύτερα σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα και Teflon απ' ό,τι σε Nylon¹³⁵.

pH. Αρκετοί ερευνητές έχουν μελετήσει την επίδραση διαφορετικών συνθηκών οξύτητας στην ανάπτυξη βιοϋμενίων. Ο Herald και Zottola (1988) παρατήρησαν μεγαλύτερη προσκόλληση κυττάρων σε αλκαλικό περιβάλλον (pH=8) απ' ό,τι σε όξινο (pH=5)¹³⁶. Σύμφωνα με τους Smoot και Pierson (1998) στο στάδιο της αρχικής προσκόλλησης σε επιφάνεια καουτσούκ, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη προσκόλληση κυττάρων σε χαμηλές τιμές pH (pH=5.5) απ' ό,τι σε υψηλές τιμές pH (pH = 7 ή pH= 8.5). Ωστόσο τα κύτταρα που καλλιεργήθηκαν σε pH=7 έδειξαν μικρότερη ικανότητα προσκόλλησης όταν κατόπιν τοποθετούνταν σε pH=9 σε σχέση με κύτταρα που τοποθετούνταν σε όξινες ή ουδέτερες συνθήκες¹³⁷.

Θερμοκρασία και υγρασία. Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας στην αρχική προσκόλληση, από αποτελέσματα ερευνητικών μελετών διαπιστώνεται ότι η προσκόλληση κυττάρων *L. monocytogenes* αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας^{138,139}. Το βακτήριο έχει την ικανότητα να αναπτύσσεται σε ένα εύρος

θερμοκρασιών, συμπεριλαμβανομένων των θερμοκρασιών που υφίστανται στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων, γεγονός που το καθιστά επικίνδυνο¹⁴⁰. Σύμφωνα με τους Norwood και Gilmour (2001), η βέλτιστη προσκόλληση του μικροοργανισμού σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα, παρατηρείται στους 18°C, συγκριτικά με τους 4°C και 30°C¹⁴¹. Οι Smoot και Pierson (1998) διαπίστωσαν ότι ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στους 30°C και στους 45°C σε σχέση με τους 10°C¹⁴².

Σε διαφορετικές εκτιμήσεις κατέληξαν οι Herald και Zottola (1988) οι οποίοι βρήκαν ότι η προσκόλληση των κυττάρων ήταν μεγαλύτερη στους 21°C απ' ό τι στους 35°C και στους 10°C¹⁴³. Οι Moltz και Martin (2005) έδειξαν ότι ενώ ο αριθμός των κυττάρων ήταν μεγαλύτερος στους 20°C απ' ό τι στους 37°C, μετά από 2 ώρες επώασης, μετά την πάροδο 20 ωρών επώασης μεγαλύτερες συγκεντρώσεις βιοϋμενικών πληθυσμών αναπτύχθηκαν όταν η θερμοκρασία ήταν 37°C¹⁴⁴. Σε γενικές γραμμές, η αυξημένη προσκόλληση εκτιμάται ότι σχετίζεται με την ύπαρξη μαστιγίων. Ωστόσο θεωρείται ότι σημαντικό ρόλο διαδραματίζει και η κινητικότητα των μαστιγίων¹⁴⁵.

Ως ψυχρότροφος μικροοργανισμός, η *L. monocytogenes* έχει την ικανότητα να αναπτύσσει βιοϋμένια σε θερμοκρασίες ψύξης. Οι Norwood και Gilmour (2001) διαπίστωσαν ότι τόσο μονοκαλλιέργειες των στελεχών Scott A και FM876 όσο και μεικτές καλλιέργειες αυτών με άλλα είδη μικροοργανισμών προσκολλώνται σε ανοξειδωτο χάλυβα στους 4°C, 18°C και 30°C, με μεγαλύτερη ανάπτυξη να παρατηρείται στις υψηλότερες θερμοκρασίες (18°C, 30°C)¹⁴⁶. Οι Mafu και συν. (1990) παρατήρησαν την ικανότητα κυττάρων του παθογόνου αυτού να προσκολλώνται σε μια ποικιλία επιφανειών μετά από 20 λεπτά παραμονής σε θρεπτικό υλικό σε θερμοκρασία δωματίου και μετά από 60 λεπτά παραμονής σε θερμοκρασία ψύξης¹⁴⁷.

Οι Helke και Wong (1994) διαπίστωσαν αυξημένα ποσοστά επιβίωσης βιοϋμενικών κυττάρων στους 6°C σε σχέση με τους 25°C πιθανόν λόγω της χαμηλής σχετικής υγρασίας σε αυτή τη θερμοκρασία. Οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν ότι ποσοστά επιβίωσης ήταν μεγαλύτερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες και υψηλότερες τιμές σχετικής υγρασίας¹⁴⁸. Γενικά έχει διαπιστωθεί, ότι σε συνθήκες σχετικής υγρασίας πάνω από 70%, όσο αυξάνει η θερμοκρασία ανάπτυξης, τόσο αυξάνεται και ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων *L. monocytogenes* σε επιφάνειες¹⁴⁹.

Τα αποτελέσματα των παραπάνω μελετών δείχνουν ότι οι περιβαλλοντικές συνθήκες επηρεάζουν σημαντικά το στάδιο της αρχικής προσκόλλησης των κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* και διαπιστώνεται ότι οι βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης διαφέρουν μεταξύ των στελεχών.

Επίδραση της παρουσίας μεμβράνης εγκλιματισμού (conditioning film) στην αρχική βακτηριακή προσκόλληση.

Η συσσώρευση οργανικών και ανόργανων μορίων σε μια στερεή αβιοτική επιφάνεια (μεταλλική, πλαστική, γυάλινη κλπ.) ή σε μια διεπιφάνεια (π.χ. μεταξύ αέρα-τροφίμου, τροφίμου-επιφάνειας ή αέρα-τροφίμου) δρα ως υπόστρωμα ανάπτυξης για τον μικροοργανισμό. Η εναπόθεση οργανικών μορίων όπως π.χ. πρωτεΐνες, επηρεάζει σημαντικά τη βακτηριακή προσκόλληση καθώς μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας όπως την ελεύθερη ενέργεια, την υδροφοβικότητα και το ηλεκτροστατικό φορτίο.

Ορισμένοι ερευνητές έχουν αποδείξει ότι η παρουσία θρεπτικών ουσιών στην επιφάνεια δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη κυττάρων *L. monocytogenes*. Οι Parker και συν. (2001) υποστηρίζουν ότι οι πρωτεΐνες δρουν ως ανταγωνιστές των θέσεων σύνδεσης επί των επιφανειών ανοξειδωτού χάλυβα, μειώνοντας έτσι την ικανότητα των κυττάρων να προσκολλώνται¹⁵⁰. Ωστόσο άλλες ομάδες ερευνητών υποστηρίζουν ότι η παρουσία μεμβράνης εγκλιματισμού δρώντας ως πηγή θρεπτικών στοιχείων για τον μικροοργανισμό ευνοεί την εναπόθεση και πρόσδεση των κυττάρων επί της επιφάνειας^{151,152}, άποψη η οποία είναι γενικά επικρατέστερη.

Επίδραση της κινητικότητας των κυττάρων

Η παρουσία μαστιγίων και ιδιαίτερα η κινητικότητα αυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των κυττάρων *L. monocytogenes*. Ο μικροοργανισμός παράγει 4 έως 6 μαστίγια και παρουσιάζει κινητικότητα σε θερμοκρασίες έως 30°C (**Εικόνα 1**). Σε υψηλότερες θερμοκρασίες, συμπεριλαμβανομένης και της θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος χάνει την ικανότητα κίνησης. Οι Vatanyoorsaiarn και συν. (2000) συμπέραναν ότι η παρουσία μαστιγίων επηρεάζει μόνο το αρχικό στάδιο προσκόλλησης των κυττάρων¹⁵³.



Εικόνα 1. Απεικόνιση μαστιγίων του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* (εικόνα από μικροσκόπιο SEM)

Πηγή:http://textbookofbacteriology.net/Listeria_2.html

2) Ωρίμαση βιοϋμενίου- Σχηματισμός μικροαποικιών

Οι Takhistov και George (2004) παρατήρησαν ότι μετά την αρχική προσκόλληση κυττάρων *L. monocytogenes* νέα κύτταρα προσκολλούνται στη μήτρα των εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών που είχε παραχθεί από τα αρχικά προσδεδεμένα κύτταρα. Ανέφεραν ότι θυγατρικά κύτταρα δεν αποσπάστηκαν από τα μητρικά προσκολλημένα αλλά αντ' αυτού σχημάτισαν μικροαποικίες σε μη κατειλημμένες περιοχές στις οποίες υπήρχε πληθώρα θρεπτικών ουσιών. Με τη πάροδο του χρόνου αυξανόταν ο αριθμός και το μέγεθος των μικροαποικιών, σχηματίζοντας γέφυρες μεταξύ τους¹⁵⁴. Προέκυψε τελικά ένα «βακτηριακό δίκτυο» (“bacterial web”) η δομή του οποίου έμοιαζε με το μοντέλο της κηρήθρας όπως αναφέρουν οι Marsh και συν. (2003)¹⁵⁵.

Αναφέρονται οι παράγοντες που έχουν σημαντική επίδραση σε αυτή τη φάση του κύκλου ζωής του βιοϋμενίου:

Επίδραση του περιβάλλοντος μέσου κατά την ωρίμαση του βιοϋμενίου

Τα ευρήματα των περισσότερων μελετών δείχνουν ότι ο σχηματισμός βιοϋμενίου από κύτταρα *L. monocytogenes* υφίσταται όταν αυτά βρεθούν σε περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Έχει επιπλέον μελετηθεί η επίδραση των διαφορετικών θρεπτικών στοιχείων στον σχηματισμό βιοϋμενίου. Οι Kim και Frank (1995) μελέτησαν τις επιδράσεις του φωσφόρου, των αμινοξέων, της θρυπτόνης και άλλων υδατανθράκων που εμπεριέχονταν στο θρεπτικό υλικό MWB (modified Welshimer's broth, MWB) κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίων από κύτταρα *L. monocytogenes*. Μείωση ή αύξηση της ποσότητας του φωσφορικού άλατος σε σχέση με την τυπική σύστασή του στο MWB (37.52 g/l) επέφερε μείωση στην ανάπτυξη βιοϋμενικών κυττάρων. Μείωση των επιπέδων των αμινοξέων οδήγησε σε μείωση του ρυθμού σχηματισμού βιοϋμενίων κατά τις πρώτες 7 ημέρες επώασης αλλά μετά από 12 ημέρες ανάπτυξης, η ποσότητα των προσκολλημένων κυττάρων ήταν ανεξάρτητη της συγκέντρωσης των αμινοξέων. Όσον αφορά τις πηγές άνθρακα παρουσία μαννόζης και τρεαλόζης, παρατηρήθηκε υψηλός ρυθμός ανάπτυξης βιοϋμενίων απ' ότι παρουσία γλυκόζης ή γλυκοζαμίνης ως πηγή άνθρακα¹⁵⁶.

Έρευνα έχει διεξαχθεί και για την επίδραση του τρόπου τροφοδοσίας του θρεπτικού υλικού. Οι Rodrigues και συν. (2009) μελέτησαν την επίδραση των συνθηκών τροφοδοσίας σε διάφορες θερμοκρασίες. Παρατηρήθηκε ότι τα βιοϋμενία που σχηματίζονταν υπό συνθήκες ημιδιαλείποντος έργου (fed-batch) ήταν μεταβολικά πιο ενεργά από αυτά που σχηματίζονταν σε συνθήκες διαλείποντος έργου (batch mode)¹⁵⁷.

Ο ρόλος της μήτρας των εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών

Το δίκτυο EPS είναι υπεύθυνο για τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του βιοϋμενίου και θεωρείται ένα από τα βασικά στοιχεία που καθορίζουν τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητές του¹⁵⁸.

Οι εξωκυτταρικές πολυμερικές ουσίες που παράγονται από τα κύτταρα *L. monocytogenes* διαφέρουν αρκετά από αυτές που παράγονται από τα είδη *Pseudomonas* spp. και *Staphylococcus* spp. Η παραγωγή EPS έχει δειχθεί ότι

επηρεάζεται από τις εκάστοτε πειραματικές συνθήκες. Στα πειράματα των Mafu και συν. (1990) παρατηρήθηκε έναρξη της παραγωγής εξωκυτταρικού υλικού (extracellular material, ECM) σε μία ποικιλία επιφανειών σε λιγότερο από 1 ώρα επώασης. Το υλικό αυτό είχε ινώδη μορφή, παρόμοια με αυτή της μήτρας των εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (EPS) που παρατήρησαν οι Marsh και συν. (2003)^{159,160}.

Τις τελευταίες δεκαετίες διεξάγονται προσπάθειες για την απεικόνιση του στρώματος EPS που παράγεται από κύτταρα της *L. monocytogenes* με χρήση μακροσκοπικών τεχνικών. Η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) χρησιμοποιείται κατά κόρον για την περιγραφή της δομής των βιοϋμενίων. Μετά από τη σταθεροποίηση των δειγμάτων και την προετοιμασία αυτών μέσω μιας σειράς βημάτων, τοποθετούνται για εξέταση στο μικροσκόπιο. Έχει διαπιστωθεί ο σχηματισμός ενός τρισδιάστατου δικτύου βακτηριακών κυττάρων μέσα στο οποίο οι μικροοργανισμοί ενσωματώνονται και παρουσιάζουν μικρή ή μεγαλύτερη ακινητοποίηση¹⁶¹. Σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται η παρουσία ινιδίων εντός των μικροαποικιών, γεγονός που υποδεικνύει την παρουσία EPS^{162,163,164}. Ωστόσο είναι δύσκολο να εκτιμηθεί κατά πόσον τα ινίδια απαντώνται φυσικά εντός των βιοϋμενίων ή σχηματίζονται ώστε να προστατευτούν οι βιοϋμενικοί πληθυσμοί από αφυδάτωση που μπορεί να προκύψει κατά την προετοιμασία του δείγματος.

Τεχνικές φθορισμού χρησιμοποιούνται με σκοπό τη χρώση κυττάρων *L. monocytogenes* για την απεικόνισή τους με χρήση μικροσκοπίου φθορισμού ή συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με ακτίνες laser (Confocal Laser Scanning Microscopy, CLSM)¹⁶⁵.

Ο Bogucki και συν. (2003) μελέτησαν τη μήτρα EPS που παράγεται από κύτταρα *L. monocytogenes* σε CLSM χρησιμοποιώντας τη χρωστική κόκκινο ρουθίνιο για τη διερεύνηση της παρουσίας εξωκυτταρικών όξινων πολυσακχαριτών μεταξύ των αναπτυσσόμενων κυττάρων¹⁶⁶. Οι ίδιοι μελετητές σύγκριναν 80 διαφορετικά στελέχη ως προς την ικανότητά τους να παράγουν EPS. Διαπίστωσαν ότι τα στελέχη που ανέπτυξαν μεγαλύτερους πληθυσμούς βιοϋμενικών κυττάρων, παρήγαγαν αισθητά μεγαλύτερες ποσότητες EPS¹⁶⁷. Οι Chae και συν. (2006) αξιολόγησαν τη διαφορά μεταξύ συνολικής εξωκυτταρικής γλυκόζης και συνολικών εξωκυτταρικών υδατανθράκων που παράγονται από πλαγκτονικά και προσκολλημένα κύτταρα μετά από 3 ώρες επώασης στους 37°C. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής τα προσκολλημένα κύτταρα παρήγαγαν μεγαλύτερες ποσότητες εξωκυτταρικών υδατανθράκων σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα ωστόσο η ακριβής σύνθεση αυτών δεν έχει προσδιοριστεί¹⁶⁸.

Σε μια πρόσφατη έρευνα οι Rodrigues και συν. (2008) χρησιμοποίησαν μικροσκόπιο ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM) για τη μελέτη του στρώματος EPS. Η χρήση μικροσκοπίου AFM επιτρέπει την απεικόνιση των βιοϋμενίων *in situ* και δεν απαιτεί χρησιμοποίηση χρωστικών ή προετοιμασία των δειγμάτων¹⁶⁹. Οι ερευνητές εντόπισαν παραγωγή EPS η οποία προερχόταν από τα κύτταρα *L. monocytogenes* τα οποία αναπτύσσονταν εντός των μικροαποικιών¹⁷⁰.

Η ανάπτυξη των προαναφερθέντων μακροσκοπικών τεχνικών έχει συμβάλει στην κατανόηση του ρόλου της μήτρας EPS ωστόσο περαιτέρω έρευνα είναι αναγκαία ώστε να γίνεται εφικτή η σαφής ποσοτικοποίηση της EPS και η αξιολόγηση της σύνθεσής της.

3) Αποκόλληση βιοϋμενίου

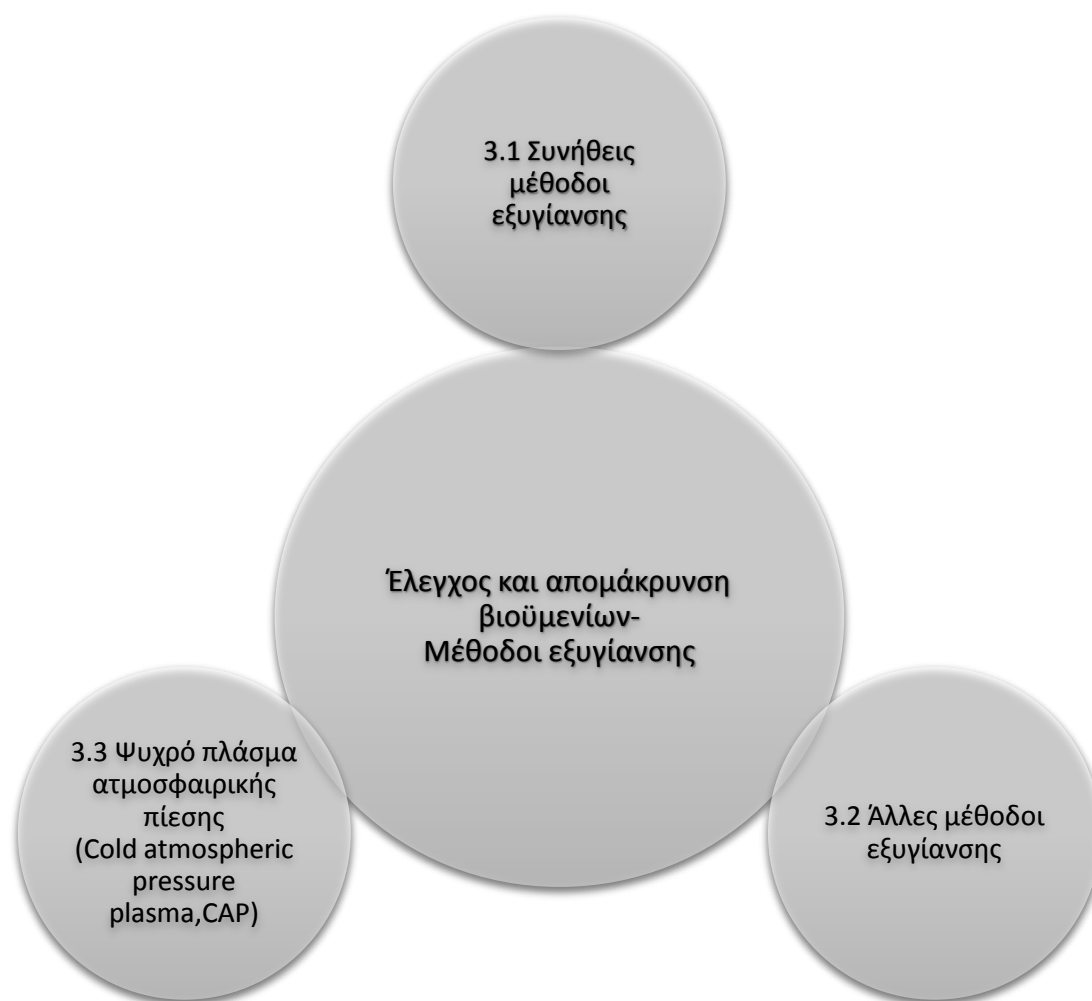
Ο ρυθμός ανάπτυξης του βιοϋμενίου καθώς και η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά υλικά όπως η πηγή άνθρακα και το οξυγόνο μπορούν να επηρεάσουν τον ρυθμό αποκόλλησης ή και να προκαλέσουν έντονα γεγονότα αποκόλλησης τμημάτων του βιοϋμενίου. Το φαινόμενο της αποκόλλησης φαίνεται να ελέγχεται σε μεγάλο βαθμό από τα ίδια τα κύτταρα. Τα κύτταρα αντιδρούν ανάλογα με τις απαιτήσεις ή τις προκλήσεις του περιβάλλοντος. Σημαντική επίδραση στο στάδιο αυτό διαδραματίζει και η ποσότητα του στρώματος EPS. Με την πάροδο του χρόνου και όταν αυτό αρχίζει να μειώνεται, οι δυνάμεις προσκόλλησης εξασθενούν με αποτέλεσμα να καθίσταται ευκολότερη η αποκόλληση των κυττάρων. Αν η παραγωγή EPS ελαττωθεί σε μεγάλο βαθμό τότε ολόκληρα τμήματα του βιοϋμενίου είναι δυνατό να αποκολληθούν.

Στη μελέτη των Takhistov και George (2004) η μέγιστη ανάπτυξη βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes* επιτεύχθηκε μέσα σε 90 ώρες επώασης και παρατηρήθηκε αποκόλληση μέρους αυτών μετά από 120 ώρες. Παρατηρήθηκε επίσης ότι τα νεκρά κύτταρα δεν απομακρύνθηκαν αλλά παρέμειναν πάνω στην επιφάνεια¹⁷¹.


Κεφάλαιο 3

Έλεγχος και απομάκρυνση βιοϋμενίων

Στο Κεφάλαιο 3 επιχειρείται μία σύντομη παρουσίαση των μεθόδων εξυγίανσης και των μέτρων ελέγχου που πρέπει να λαμβάνει μια βιομηχανία τροφίμων για την πρόληψη της εμφάνισης βιοϋμενίων στους χώρους και στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων. Προτείνονται νέες μέθοδοι εξυγίανσης και γίνεται ιδιαίτερη αναφορά στην τεχνολογία του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης που είναι και το αντικείμενο της παρούσας διπλωματικής εργασίας.



Σχήμα 8. Οι βασικοί άξονες του 3^{ου} κεφαλαίου.



3.1 Συνήθειες μέθοδοι εξυγίανσης

– Απομάκρυνση και έλεγχος βιοϋμενίων

Όπως αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 2, η παρουσία βιοϋμενίων στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων εγκυμονεί κινδύνους τόσο για τη δημόσια υγεία, όσο και για την ίδια τη βιομηχανία. Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης των προβλημάτων που δημιουργούνται από την ανάπτυξη βιοϋμενίων είναι η πρόληψη και ο έλεγχος του σχηματισμού τους. Η πρόληψη του σχηματισμού βιοϋμενίου, ελαχιστοποιώντας την πιθανότητα προσκόλλησης μικροοργανισμών σε επιφάνειες αποτελεί τη βασική στρατηγική για τη μείωση του κινδύνου μόλυνσης των παραγόμενων τροφίμων, των επιφανειών και του εξοπλισμού. Ωστόσο αν εντοπιστεί σχηματισμός βιοϋμενίου, τότε ένα πρόγραμμα καθαρισμού το οποίο επικεντρώνεται στην απομάκρυνση των βιοϋμενίων πρέπει να αναπτυχθεί και να εφαρμοστεί.

Η παρουσία βιοϋμενίων στη γραμμή επεξεργασίας τροφίμων μπορεί να αποτελέσει εστία μόλυνσης. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου σε μια αβιοτική επιφάνεια μπορεί να διαρκέσει από μερικές ημέρες έως αρκετές εβδομάδες^{172,173}.

Κύτταρα που αποκολλώνται από το βιοϋμένιο δύνανται να αποικίσουν σε μία άλλη επιφάνεια του εξοπλισμού ή να επιμολύνουν το παραγόμενο τρόφιμο. Οι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται σε βιοϋμένιο παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή σε διεργασίες απολύμανσης σε σχέση με την αντοχή των πλαγκτονικών κυττάρων. Στελέχη μικροοργανισμών απομονώνονται από εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων στις οποίες αποδεικνύεται ότι έχουν την ικανότητα να επιβιώνουν για χρόνια¹⁷⁴. Η αφαίρεση και η απομάκρυνσή τους είναι μια ιδιαίτερα δύσκολη και επίπονη διαδικασία και η εξάλειψή τους απαιτεί την υιοθέτηση ιδιαίτερων στρατηγικών. Ως εκ τούτου, έχει μεγάλη σημασία η εφαρμογή ενός αποτελεσματικού προγράμματος καθαρισμού και απολύμανσης των χώρων, του εξοπλισμού και των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα ώστε να εμποδίζεται και να προλαμβάνεται η βακτηριακή συσσώρευση καθώς και να αναστέλλεται ο σχηματισμός των βιοϋμενίων, επεμβαίνοντας στα αρχικά στάδια ανάπτυξής τους¹⁷⁵.

Γωνίες, ρωγμές, σχισμές, εσοχές, νεκρές περιοχές, βαλβίδες, μηχανές κοπής και τεμαχισμού, μάντες μεταφοράς, σωληνώσεις, εναλλάκτες θερμότητας καθώς και μηχανήματα πλήρωσης και συσκευασίας είναι περιοχές που καθαρίζονται δύσκολα. Υπολείμματα τροφίμων που παραμένουν στις περιοχές αυτές προσελκύουν και ευνοούν την ανάπτυξη βιοϋμενίων καθώς δρουν ως πηγή θρεπτικών ουσιών για τους μικροοργανισμούς.

Κατά συνέπεια, ο ορθολογικός σχεδιασμός του εξοπλισμού και των διαδικασιών επεξεργασίας και συσκευασίας τροφίμων είναι σημαντικές παράμετροι που προλαμβάνουν και ελέγχουν την εμφάνιση βιοϋμενίων και διευκολύνουν την εφαρμογή ενός αποδοτικού προγράμματος καθαρισμού και

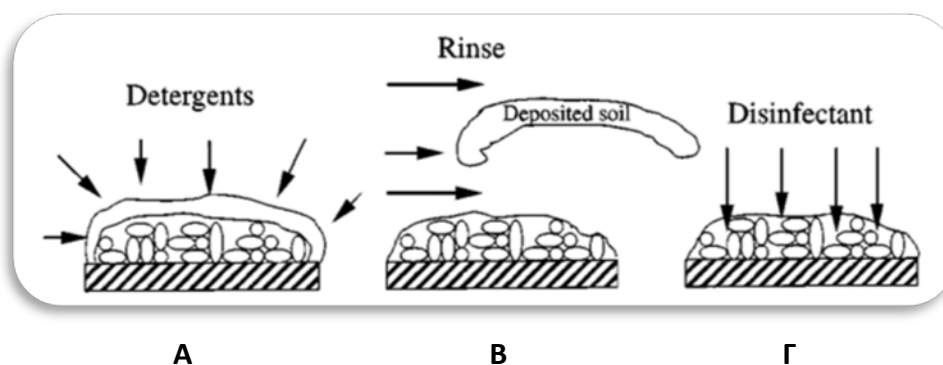
απολύμανσης^{176,177,178,179}. Επιπρόσθετα η επιλογή κατάλληλων υλικών επιφανειών, η ορθή υγιεινή και βιομηχανική πρακτική (GHP, GMP), η επιλογή ποιοτικών πρώτων υλών και η εκπαίδευση του προσωπικού είναι τα πλέον αποτελεσματικά μέτρα για τον περιορισμό της ανάπτυξης και την καταπολέμηση των βιοϋμενίων^{180,181}.

Η απομάκρυνση ή/και η καταστροφή των βιοϋμενίων μπορεί να επιτευχθεί με χημική επεξεργασία ή με συνδυασμό χημικής και φυσικής επεξεργασίας. Η διαδικασία καθαρισμού μιας επιφάνειας ή ενός μηχανήματος ξεκινά με την απορρύπανση, την απομάκρυνση δηλαδή υπολειμμάτων τροφίμων, ξένων σωμάτων, και λιπαρών ουσιών. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα απορρυπαντικά είναι χημικές ουσίες οι οποίες δε στοχεύουν στη θανάτωση των μικροοργανισμών αλλά χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση οποιουδήποτε υλικού ενδέχεται να εμπεριέχει μικροοργανισμούς ή να ευνοεί την μικροβιακή ανάπτυξη, ώστε η μετέπειτα εφαρμογή απολυμαντικών μέσων να είναι αποτελεσματική. Τα απορρυπαντικά αρχικά διαβρέχουν και αποκολλούν τους ρύπους οι οποίοι διαλύονται, διασπείρονται ή σχηματίζουν γαλακτώματα, ώστε να εμποδισθεί η εκ νέου απόθεσή τους. Σημαντική διαδικασία για την αποτελεσματική απομάκρυνση των βιοϋμενίων είναι ο καθαρισμός με μηχανικά μέσα. Κατά το φυσικό (μηχανικό) καθαρισμό χρησιμοποιούνται διάφορες βούρτσες, ξέστρα, ρεύμα ατμού και κυρίως νερό υπό πίεση. Η στροβιλώδης ροή του νερού και των απορρυπαντικών διαλυμάτων μέσα στις σωληνώσεις, ασκεί όπως και το βούρτσισμα μία μηχανική δράση. Η μηχανική καθαριότητα, η χρήση νερού και χημικών ουσιών επί των επιφανειών έχει ως στόχο τη διάσπαση και απομάκρυνση των οργανικών υλών και των λιπών που δρουν ως πηγή θρεπτικών συστατικών για τους βιοϋμενικούς πληθυσμούς.

Στην περίπτωση των βιοϋμενίων, μία αποτελεσματική μέθοδος καθαρισμού πρέπει να διασπά ή να διαλύει το στρώμα EPS ώστε στη συνέχεια οι απολυμαντικές ουσίες να μπορούν να προσεγγίσουν τα κύτταρα στο εσωτερικό του βιοϋμενίου και να τα εξουδετερώνουν (**Σχήμα 9**). Ωστόσο όπως προαναφέρθηκε οι αλκαλικές και όξινες ουσίες που χρησιμοποιούνται στο στάδιο του καθαρισμού είναι κατάλληλες μόνο για την καταστροφή του στρώματος EPS και δεν επιτυγχάνουν την εξάλειψη των ζώντων κυττάρων. Η επιπλέον εφαρμογή χημικών ουσιών που έχουν αντιμικροβιακή δράση σε μια επιφάνεια οδηγεί στην απολύμανσή της¹⁸². Υπάρχουν απολυμαντικά που δρουν με διαφορετικό τρόπο για να επιτύχουν την καταστροφή των ζώντων μικροοργανισμών. Έτσι τα απολυμαντικά μέσα μπορεί να είναι βακτηριοκτόνα, μυκητοκτόνα, σποροκτόνα ή ιοκτόνα ή συνδυασμός αυτών. Τα απολυμαντικά μέσα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων διακρίνονται σε 3 βασικές κατηγορίες:

- απολυμαντικά αλογόνων (χλώριο, ιώδιο)
- απολυμαντικά οξυγόνου (υπεροξειδίο του υδρογόνου, υπεροξικό οξύ)
- τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου

Σύμφωνα με τους Kumar και Anand (1998) αυτοί οι απολυμαντικοί παράγοντες επιτυγχάνουν τον αποπολυμερισμό του στρώματος EPS και επιτρέπουν την αποκόλληση των βιοϋμενίων¹⁸³. Η αποτελεσματικότητα της δράσης των απολυμαντικών εξαρτάται από το pH, τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση, τον χρόνο επαφής και την ύπαρξη οργανικών μορίων ή ξένων σωμάτων στην επιφάνεια. Η εφαρμογή ενός αποτελεσματικού προγράμματος καθαρισμού και απολύμανσης προϋποθέτει τη χρήση εγκεκριμένων καθαριστικών και απολυμαντικών στις κατάλληλες δοσολογίες. Τέλος, πρέπει να υπάρχει μέριμνα ώστε να μη μένουν υπολείμματα των ουσιών αυτών στις επιφάνειες.



Σχήμα 9¹⁸⁴. Στάδια καθαρισμού και απολύμανσης επιφανειών εργασίας και εξοπλισμού επιχειρήσεων τροφίμων:

A) Καθαρισμός με σκοπό την απομάκρυνση της οργανικής ύλης.

B) Έκπλυση. Χρήση νερού, απορρυπαντικού και μηχανικής δύναμης.

Γ) Απολύμανση. Το απολυμαντικό διαπερνά το στρώμα EPS και προσεγγίζει τα βιοϋμενικά κύτταρα.

– Καθαρισμός και απολύμανση για τον έλεγχο των βιοϋμενίων του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes*

Η συχνότητα με την οποία ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* εμφανίζεται στις βιομηχανίες τροφίμων και στα τελικά προϊόντα εγείρει αμφιβολίες για την αποτελεσματικότητα των μεθόδων που εφαρμόζονται για την πρόληψη και τον έλεγχο της παρουσίας του. Η πρόληψη της εμφάνισης του παθογόνου αυτού μικροοργανισμού στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων είναι ένας από τους στόχους του συστήματος HACCP. Καθώς η *L. monocytogenes* παρουσιάζει ευρεία διασπορά στο περιβάλλον, δειγματοληπτικοί έλεγχοι πρέπει να γίνονται τόσο στις επιφάνειες και στον εξοπλισμό που έρχονται σε άμεση επαφή με τα τρόφιμα, όσο και στους σωλήνες, το δάπεδο, τους τοίχους και στις αποχετεύσεις. Προκειμένου να αποφευχθεί η είσοδος του παθογόνου στους χώρους μιας βιομηχανίας τροφίμων, θα πρέπει να ελέγχεται η αποτελεσματικότητα του προγράμματος καθαρισμού και απολύμανσης σε όλα τα μέρη των εγκαταστάσεων.

Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι η ικανότητα της *L. monocytogenes* να σχηματίζει βιοϋμένια κάνει επιτακτική την ανάγκη για πρόσθετες στρατηγικές καθαρισμού και απολύμανσης με σκοπό τον συνεχή έλεγχο των στελεχών του παθογόνου αυτού στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων (Holah et al. 2004)¹⁸⁵.

Οι πιθανές πηγές μόλυνσης των χώρων επεξεργασίας τροφίμων και των παραγόμενων προϊόντων από τον παθογόνο αυτό μικροοργανισμό είναι:

- οι πρώτες ύλες και τα νωπά τρόφιμα
- οι επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, ο εξοπλισμός και τα σκεύη
- το χώμα, ο αέρας, η σκόνη
- τα έντομα, τα τρωκτικά
- το δίκτυο παροχής νερού
- το προσωπικό

Η επαφή του μικροοργανισμού με τις επιφάνειες μπορεί να γίνει με τους παρακάτω τρόπους :

- με επικάθηση λόγω βαρύτητας
- λόγω εγκλωβισμού σε διάφορα σημεία
- με επαφή λόγω κινήσεων Brown
- με πρόσφυση λόγω δεσμών υδρογόνου
- ή λόγω ηλεκτρικού φορτίου στις επιφάνειες¹⁸⁶

Η ανθεκτικότητα που παρουσιάζουν τα βιοϋμένια που σχηματίζονται από κύτταρα *L. monocytogenes* έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων καθιστούν δύσκολη την εξάλειψή τους και επιτρέπει τη μακροχρόνια παραμονή τους στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων. Ο έλεγχος την ανάπτυξης βιοϋμενίων επιτυγχάνεται με την εφαρμογή ενός αποτελεσματικού προγράμματος καθαρισμού και απολύμανσης. Ο τύπος της επιφάνειας, η παρουσία ανταγωνιστικής μικροχλωρίδας, η παρουσία υπολειμμάτων τροφίμων είναι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων και των απολυμαντικών^{187,188}.

Οι Chavant και συν. (2004) συνέκριναν την αποτελεσματικότητα μιας ποικιλίας απολυμαντικών έναντι πλαγκτονικών και βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes*. Οι πληθυσμοί των πλαγκτονικών κυττάρων παρουσίασαν μεγαλύτερη λογαριθμική μείωση σε σχέση με τη μείωση των βιοϋμενικών κυττάρων και επιπλέον οι ερευνητές διαπίστωσαν μία ευρεία διακύμανση της αποτελεσματικότητας των απολυμαντικών μέσων. Οι ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικές (>90% βακτηριακή μείωση) έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων και των βιοϋμενικών πληθυσμών που είχαν αναπτυχθεί μετά από 6 και 24 ώρες επώασης αλλά λιγότερο αποτελεσματικές (μείωση περίπου 40%) έναντι των βιοϋμενίων που είχαν αναπτυχθεί μετά από 7 ημέρες επώασης. Οι αλκαλικές χημικές ουσίες αποδείχτηκαν πιο αποτελεσματικές (> 90% βακτηριακή

μείωση) κατά των πλαγκτονικών κυττάρων και των «ώριμων» βιοϋμενίων αλλά ήταν λιγότερο αποτελεσματικές έναντι των βιοϋμενίων που είχαν αναπτυχθεί μετά από 6 ώρες επώασης. Τα όξινα καθαριστικά παρουσίασαν μικρότερη ικανότητα μείωσης των βακτηριακών πληθυσμών¹⁸⁹. Η παρουσία υπολειμμάτων τροφίμων, οργανικής ύλης ή ξένων σωμάτων μπορεί να μειώσει περαιτέρω την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών^{190,191,192}. Οι Aarnisalo και συν. (2000) διερεύνησαν την αποτελεσματικότητα 10 εμπορικά διαθέσιμων απολυμαντικών μέσων. Κύτταρα που είχαν αναπτυχθεί σε άγαρ, μεταφέρονταν σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, αφήνονταν να αναπτυχθούν και στη συνέχεια ακολουθούσε η απολύμανση αυτών. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, προέκυψε μείωση >3 log σε 30 δευτερόλεπτα. Ωστόσο σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση της απολυμαντικής δράσης παρουσία υπολειμματικής οργανικής ύλης, με εξαίρεση την περίπτωση όπου εφαρμόστηκε ισοπροπανόλη (60% w/v)¹⁹³. Οι Chmielewski και συν. (2006) παρατήρησαν ότι η παρουσία οργανικής ύλης αυξάνει την αντίσταση των βιοϋμενίων *L. monocytogenes* κατά τη θερμική απολύμανση. Σε μία άλλη μελέτη διαπιστώθηκε ότι η ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων του βακτηρίου ήταν μεγαλύτερη όταν αναπτυσσόταν σε Teflon απ' ό,τι σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα¹⁹⁴.

3.2 Άλλες μέθοδοι εξυγίανσης

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται μια αυξανόμενη προτίμηση των καταναλωτών προς την κατανάλωση φυσικών προϊόντων που έχουν υποστεί την ελάχιστη δυνατή επεξεργασία αλλά διαθέτουν τη μέγιστη διατροφική αξία, ποιότητα και ασφάλεια.

Πολλά από τα χημικά απολυμαντικά, που παρουσιάζουν μικροβιοκτόνο δράση και χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, ενδέχεται να αφήνουν κατάλοιπα στον εξοπλισμό λόγω του φαινομένου της απορρόφησης επί των επιφανειών ή λόγω ανεπαρκούς έκπλυσης ή αποστράγγισης. Η παρουσία υπολειμμάτων χημικών καθαριστικών/απολυμαντικών είναι ένδειξη αναποτελεσματικού προγράμματος καθαρισμού και εξυγίανσης. Η παρουσία τους στα τρόφιμα είναι ένδειξη χημικής επιμόλυνσης και αν δεν εντοπιστεί άμεσα, εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία.

Μια εναλλακτική μέθοδος απολύμανσης που εφαρμόζεται στη βιομηχανία τροφίμων είναι η χρήση όζοντος. Έχει αποδειχτεί ότι το μόριο του όζοντος είναι αποτελεσματικό σε ένα ευρύ φάσμα μικροοργανισμών σε σχέση με άλλα απολυμαντικά και επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την καταπολέμηση των βιοϋμενίων¹⁹⁵. Μετά την εφαρμογή του όζοντος, αυτό αποσυντίθεται χωρίς να αφήνει χημικά κατάλοιπα. Επιπλέον η μέθοδος αυτή δεν παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία ως προς τις συνθήκες pH και θερμοκρασίας καθώς η απολυμαντική ικανότητα του όζοντος παραμένει αμετάβλητη για τιμές pH 6-10 και θερμοκρασία 2-

30°C. Ωστόσο στην περίπτωση των βιοϋμενίων, περαιτέρω έρευνα κρίνεται απαραίτητη για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του όζοντος έναντι των τροφιογενών παθογόνων που προσκολλώνται σε διαφορετικά υλικά.

Οι Khadre και συν. (2001) μελέτησαν τη δραστικότητα του όζοντος έναντι αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών που είχαν απομονωθεί από μια ποικιλία τροφίμων. Παρατηρήθηκε ότι οι Gram θετικοί και οι Gram αρνητικοί βακτηριακοί πληθυσμοί που εκτέθηκαν σε συγκεντρώσεις όζοντος 0.066-1.00 mg/ml για 0.5-10 λεπτά, μειώθηκαν κατά 0.5-6 log CFU/ml¹⁹⁶. Σε ένα άλλο πείραμα, η εξυγίανση επιφανειών ανοξειδωτού χάλυβα με όζον (4 ppm για 3 λεπτά) είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes* κατά 7 log¹⁹⁷.

Το αντίκτυπο που έχει η μη ορθή χρήση (π.χ. η χρησιμοποίηση μη ενδεδειγμένων δόσεων, η εμφάνιση καταλοίπων) των χημικών απολυμαντικών, αλλά και το πρόβλημα της αυξημένης ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν τα βιοϋμένια έναντι των αντιμικροβιακών παραγόντων, θέτει σε κίνδυνο την ασφάλεια των τροφίμων και κατά συνέπεια των καταναλωτών. Οι λόγοι αυτοί οδηγούν τους υπεύθυνους επιχειρήσεων τροφίμων στην υιοθέτηση «πράσινων» στρατηγικών για τον καθαρισμό και την απολύμανση των εγκαταστάσεων επεξεργασίας τροφίμων.

Αρκετές ερευνητικές ομάδες έχουν μελετήσει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης βιολογικών μεθόδων ελέγχου με σκοπό την πρόληψη ή την εξάλειψη της ανάπτυξης βιοϋμενίων.

Το ενδιαφέρον για τα βιοαπορρυπαντικά (bio-surfactants) έχει παρουσιάσει σταθερή αύξηση τα τελευταία χρόνια λόγω της ποικιλομορφίας τους, του φιλικού προς το περιβάλλον χαρακτήρα τους, της δυνατότητας παραγωγής τους σε μεγάλη κλίμακα, της επιλεκτικότητάς τους, των επιδόσεων τους κάτω από ακραίες συνθήκες, των εφαρμογών τους στην προστασία του περιβάλλοντος. Τα βιοαπορρυπαντικά είναι επιφανειοδραστικές ουσίες που συντίθενται από ζωντανά κύτταρα κυρίως βακτηρίων, ζυμών και μυκήτων κάτω από συνθήκες τροφικού στρες. Γενικά είναι μη τοξικά και βιοδιασπώμενα μόρια. Οι κυριότερες κατηγορίες επιφανειοδραστικών βιομορίων είναι: τα γλυκολιπίδια (όπως ραμνολιπίδια, σοφορολιπίδια, τρεχαλολιπίδια), τα λιποπεπτίδια (surfactin, iturin, fengycin), τα πολυμερικά απορρυπαντικά, τα φωσφολιπίδια (π.χ. λεκιθίνη) και πρωτεΐνες (β-καζεΐνη)¹⁹⁸.

Τα ραμνολιπίδια (rhamnolipids, γλυκοπεπτίδια που παράγονται από τον μικροοργανισμό *Pseudomonas aeruginosa*) και η σερφακτίνη (surfactin, λιποπεπτίδιο που παράγεται από τον μικροοργανισμό *Bacillus subtilis*) έχουν μελετηθεί για την ικανότητά τους να αποτρέπουν την προσκόλληση των κυττάρων *L. monocytogenes* σε επιφάνειες από ανοξειδωτό χάλυβα, πολυστυρένιο και πολυπροπυλένιο^{199,200}. Οι Zezzi do Valle Gomes και Nitschke (2012) έδειξαν ότι προεπεξεργασμένες επιφάνειες με χρήση ραμνολιπιδίων και σερφακτίνης μπορούν να καθυστερήσουν την προσκόλληση των κυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών ακόμα και με μείωση της υδροφοβικότητας μιας επιφάνειας πολυστυρενίου. Οι

ίδιες ουσίες αποδείχτηκε ότι επηρέαζαν την ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίων από κύτταρα *L. monocytogenes*, με τη σερφακτίνη να είναι πιο δραστική από τα ραμνολιπίδια²⁰¹. Οι Orgaz και συν. (2011) διερεύνησαν την επίδραση της χιτοζάνης (πολυσακχαρίτης που προέρχεται από μερική ακετυλίωση της χιτίνης, με αναγνωρισμένες αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι πλαγκτονικών κυττάρων) σε σχηματισμένα βιοϋμενία. Μετά την έκθεση των βιοϋμενίων σε 1% χιτοζάνη για 60 λεπτά στους 20°C διαπιστώθηκε μείωση των προσκολλημένων κυττάρων κατά 6 log γεγονός που δηλώνει τη δυνατότητα χρησιμοποίησής της ως διάλυμα ή ως υλικό επίστρωσης επιφανειών²⁰².

Μια νέα πολλά υποσχόμενη τεχνική, που ερευνάται είναι η αντιμετώπιση των βιοϋμενίων με τη χρήση βακτηριοφάγων οι οποίοι είναι ιοί που προσβάλλουν τα κύτταρα. Σε πρόσφατη μελέτη η χρήση βακτηριοφάγου (P-100) ελάττωσε σημαντικά τους βιοϋμενικούς πληθυσμούς *L. monocytogenes* ανεξάρτητα από τον ορότυπο, τις συνθήκες ανάπτυξης και το στάδιο ανάπτυξης των βιοϋμενίων, τα οποία είχαν σχηματιστεί τόσο σε επιφάνειες-κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα, όσο και σε πλακίδια μικροτιλοδότησης πολυστυρενίου²⁰³.

Στον τομέα των «πράσινων» στρατηγικών ελέγχου του σχηματισμού βιοϋμενίων μια αξιολογη εναλλακτική λύση προτάθηκε από τους Woo και Ahn (2013) οι οποίοι μελέτησαν τη δράση προβιοτικών έναντι βιοϋμενίων. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι η συγκαλλιέργεια με *Lactobacillus paracasei* και *Lactobacillus rhamnosus* ανέστειλε αποτελεσματικά (>3 log μείωση) τον πολλαπλασιασμό των βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes* μέσω μηχανισμών ανταγωνισμού, αποκλεισμού και μετατόπισης (mechanisms of competition, exclusion and displacement), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα προβιοτικά στελέχη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εναλλακτικός τρόπος για την αποτελεσματική μείωση της ανάπτυξης βιοϋμενίων²⁰⁴.

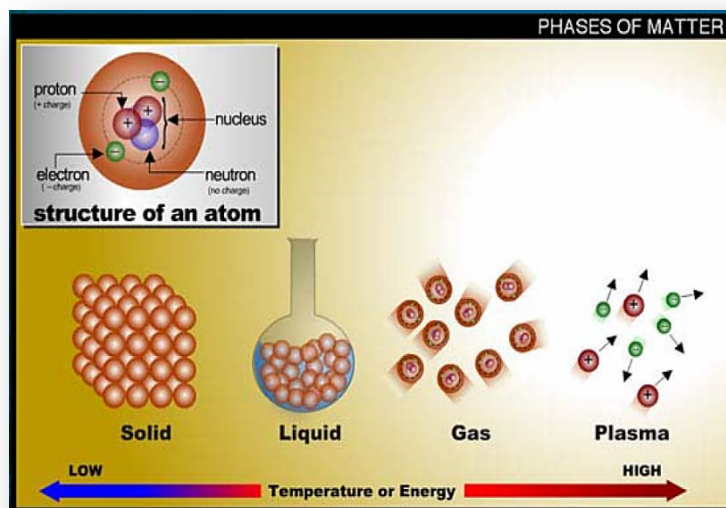
Για τον έλεγχο των βιοϋμενίων στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται επίσης φυσικές μέθοδοι οι οποίες περιλαμβάνουν την κατεργασία με υπέρηχους, τα υψηλά μαγνητικά πεδία, τα υψηλά παλμιτικά πεδία μόνα τους ή σε συνδυασμό με οργανικά οξέα και τα χαμηλά ηλεκτρικά πεδία μόνα τους ή ως ενισχυτές βιοκτόνων (amplifiers biocides)²⁰⁵. Οι φυσικές μέθοδοι έχουν μελετηθεί ως εναλλακτικές των χημικών απολυμαντικών για την εξυγίανση των επιφανειών. Η επίδραση της ιονίζουσας ακτινοβολίας μελετήθηκε από τους Niemera και Solomon (2005) οι οποίοι διαπίστωσαν ότι η μέθοδος αυτή ήταν εξίσου, ή περισσότερο αποτελεσματική κατά των βιοϋμενικών κυττάρων απ' ό,τι των πλαγκτονικών κυττάρων *Salmonella* spp., γεγονός που αποδεικνύει ότι η χρήση ιονιζουσών ακτινοβολιών μπορεί να επιδρά αποτελεσματικά στην εξυγίανση βιοϋμενίων. Οι Oulahal-Lagsir και συν. (2003) εφάρμοσαν ένα συνδυασμό τεχνικών με χρήση υπερήχων και ενζύμων συμπεραίνοντας ότι η μεθοδολογία αυτή απομάκρυνε επιτυχώς βιοϋμενία του μικροοργανισμού *E. coli* τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε φύλλα ανοξειδωτου χάλυβα με γάλα ως θρεπτικό μέσο²⁰⁶.

3.3 Ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης (CAP)

Μια διαφορετική μέθοδος καταπολέμησης των βιοϋμενίων είναι η χρήση του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης. Η τεχνολογία του πλάσματος προσφέρει μια εναλλακτική λύση έναντι των συμβατικών μεθόδων απολύμανσης καθώς περιέχει ένα μείγμα φορτισμένων σωματιδίων, χημικά δραστικών ειδών, φωτονίων UV κ.ά., το οποίο έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό στην αδρανοποίηση ή/και καταστροφή τόσο πλαγκτονικών κυττάρων όσο και βιοϋμενίων²⁰⁷.

Τι είναι το πλάσμα;

Σε αντίθεση με τις επιστήμες υγείας και τη βιολογία, στις φυσικές επιστήμες ο όρος πλάσμα αναφέρεται ως τέταρτη κατάσταση της ύλης η οποία είναι ενεργειακά ανώτερη της στερεής, της υγρής και της αέριας κατάστασης²⁰⁸. Κάθε μια από τις καταστάσεις της ύλης καθορίζεται από το ενεργειακό της περιεχόμενο. Με αύξηση ή μείωση της ενέργειας (π.χ. θέρμανση, ψύξη) είναι εφικτή η μετάβαση από τη μια κατάσταση στην άλλη. Η περαιτέρω προσφορά ενέργειας δύναται να μετατρέψει ένα μακροσκοπικά ουδέτερο αέριο σε μια ιονισμένη κατάσταση της ύλης, που καλείται πλάσμα. Πλάσμα ονομάζουμε την ιονισμένη μορφή της ύλης η οποία αποτελείται από ίσο αριθμό θετικών κι αρνητικών σωματιδίων, με αποτέλεσμα το συνολικό φορτίο του να παραμένει ουδέτερο από μακροσκοπική άποψη. Για να μετατραπεί ένα αέριο σε πλάσμα απαιτείται μεγάλη ποσότητα ενέργειας που είναι ικανή να αποσπάσει τα ηλεκτρόνια από τα άτομα του αερίου (Σχήμα 10). Αυξάνοντας αυτό το ποσό ενέργειας, ο βαθμός ιονισμού αυξάνεται και σχηματίζεται ένα νέφος μεγάλης πυκνότητας ιόντων και ηλεκτρονίων²⁰⁹.



Σχήμα 10 . Οι 4 καταστάσεις της ύλης.

Πηγή: <http://www.tappi.org/content/events/07euoplac/presentation/07euopl51.pdf>

Στο πλάσμα αναφέρθηκε για πρώτη φορά ο Βρετανός Sir William Crookes το 1879 ο οποίος χρησιμοποίησε τον όρο «ακτινοβόλουσα ύλη» για να περιγράψει τη κατάσταση αυτή της ύλης. Το 1922 ο Αμερικανός επιστήμονας Irving Langmuir πρότεινε ότι τα ηλεκτρόνια, τα ιόντα και τα ουδέτερα σωματίδια που δημιουργούνται κατά τον ιονισμό ενός αερίου, θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως μια σωματιδιακή ύλη η οποία συμπαρασύρεται σε κάποιο υγρό μέσο το οποίο ονόμασε «πλάσμα». Η μεταφορά αυτή των ουδέτερων και φορτισμένων σωματιδίων έδωσε στους Langmuir και Tonks την ιδέα της ομοιότητας με το πλάσμα του αίματος στο οποίο μεταφέρονται τα διάφορα συστατικά του αίματος. Ο όρος «πλάσμα» επίσημα εμφανίστηκε για πρώτη φορά στη διεθνή βιβλιογραφία το 1928²¹⁰.

Έκτοτε έχει υπάρξει εκτεταμένο ερευνητικό ενδιαφέρον όσον αφορά τη μελέτη και κατανόηση των ιδιοτήτων των διαφόρων ειδών πλάσματος που συναντώνται στη φύση ή που δημιουργούνται τεχνητά.

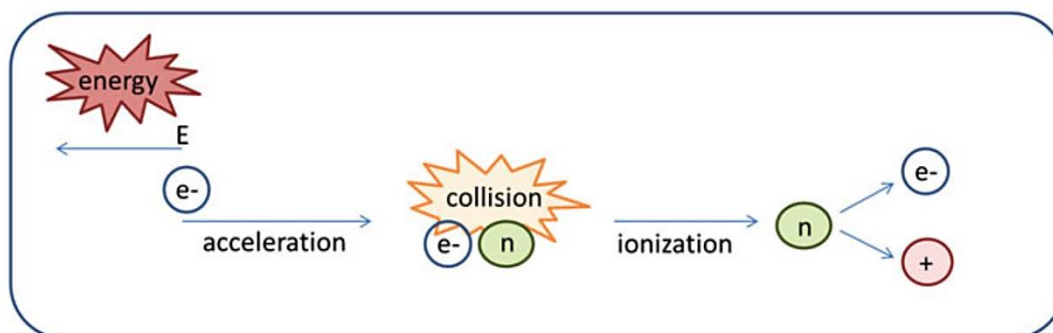
Ενώ συχνά καλείται ως η 4^η κατάσταση της ύλης, το πλάσμα εκτιμάται ότι αποτελεί το 99% της ύλης του Σύμπαντος καθώς συναντάται στον πυρήνα των άστρων, στον μεσοαστρικό χώρο και στους ηλιακούς ανέμους. Στη Γη φαινόμενα όπως το Βόρειο Σέλας και οι κεραυνοί αποτελούνται από κάποια μορφή πλάσματος. Πλάσμα είναι επίσης η ιονόσφαιρα που περιβάλλει τη Γη σε απόσταση 70-300 χιλιομέτρα από την επιφάνειά της.

Τεχνητό πλάσμα συναντάται στις οθόνες τηλεοράσεων και σε λάμπες φθορισμού. Τα τελευταία χρόνια μελετώνται εκτενώς οι βιολογικές εφαρμογές του όπως η χρήση του ως απολυμαντικό μέσο²¹¹. Επιπρόσθετα, οι μοναδικές ιδιότητες του πλάσματος σε συνδυασμό με τη φιλική προς το περιβάλλον φύση του, το έχουν καταστήσει ένα πολύτιμο εργαλείο για την επεξεργασία υλικών (π.χ. βιοσυμβατότητα, σκλήρυνση μετάλλων, υδροφοβικότητα, νανοδομές) και βιοσυστημάτων (κύτταρα, ιστοί κ.ά.)

Πώς δημιουργείται;

Το πλάσμα δημιουργείται στα εργαστήρια (ψυχρό πλάσμα) σε κατάλληλα σχεδιασμένους αντιδραστήρες, με χρήση ποικίλων αέριων ή μειγμάτων αυτών (N₂, O₂, Ar, He, Ne, Air, CF₄, SF₆, H₂ κ.α.) σε χαμηλές ή υψηλές πιέσεις και με την προσφορά ηλεκτρικής ενέργειας σε διάφορες συχνότητες (DC, AF, RF, MW). Η δημιουργία του πλάσματος επιτυγχάνεται με τη ζεύξη ενός τροφοδοτικού υψηλής τάσης με μια στεγανή κυψέλη εντός της οποίας βρίσκεται το αέριο²¹². Συγκεκριμένα το πλάσμα σχηματίζεται όταν τα ελεύθερα ηλεκτρόνια ενός ουδέτερου αερίου (ή μείγματος αερίων) επιταχύνονται από ένα ηλεκτρικό πεδίο²¹³. Όσο αυξάνεται η προσφερόμενη ενέργεια, αυξάνεται και ο βαθμός ιονισμού του αερίου προκαλώντας μια ποικιλία αντιδράσεων που οδηγούν τελικά στο σχηματισμό ενός ετερογενούς ιονισμένου αερίου μείγματος (**Σχήμα 11**). Το πλάσμα λόγω των

ηλεκτρικά φορτισμένων σωματιδίων που το απαρτίζουν σε αντίθεση με τα αέρια, θεωρείται μια ηλεκτρικά αγώγιμη μορφή της ύλης που αντιδρά σε ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία. Ο όγκος και το σχήμα του πλάσματος δεν είναι συγκεκριμένα (όπως και στα αέρια) αλλά εξαρτάται από τα ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία από τα οποία δημιουργείται. Σε συνθήκες εργαστηρίου τόσο το σχήμα όσο και ο όγκος μπορούν να ελεγχθούν μέσω του χρησιμοποιούμενου αντιδραστήρα, εντός του οποίου το αέριο μπορεί να βρίσκεται σε ατμοσφαιρική ή όχι πίεση²¹⁴. Διατάξεις με κατάλληλη διαμόρφωση ηλεκτροδίων και με κατάλληλη ρύθμιση της παροχής ισχύος μπορούν να λειτουργούν άνευ παρουσίας αερίου, παρά μόνο με τη χρήση του ατμοσφαιρικού αέρα.



Σχήμα 11. Δημιουργία πλάσματος. Μοντέλο παραγωγής πλάσματος το οποίο περιλαμβάνει: την επιτάχυνση των ηλεκτρονίων, τη διέγερση (με εκπομπή φωτός) και τον διαχωρισμό των ατόμων μετά από σύγκρουση με επιταχυνόμενα ηλεκτρόνια. Η θέρμανση είναι ένα παραπροϊόν το οποίο δεν απεικονίζεται στο σχήμα αυτό²¹⁵.

Το πλάσμα μπορεί να παραχθεί υπό ποικίλες συνθήκες. Ανάλογα με τη διάταξη παρασκευής του πλάσματος διακρίνονται τρεις κατηγορίες:

- χαμηλής πίεσης,
- υψηλής πίεσης και
- ατμοσφαιρικής πίεσης πλάσμα²¹⁶.

Ανάλογα με τη θερμοκρασία των ιόντων και των ουδέτερων σωματιδίων το πλάσμα διακρίνεται σε:

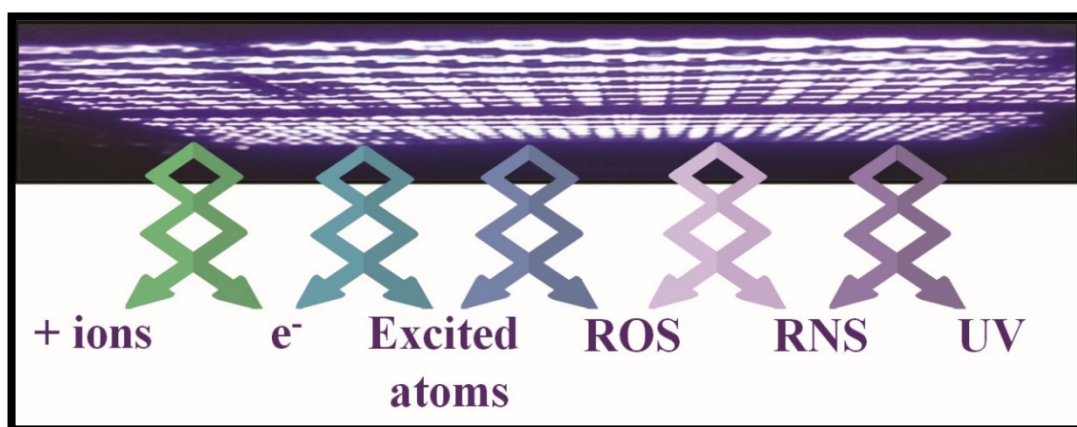
- Ψυχρό πλάσμα, όπου τα ιόντα και τα ουδέτερα σωματίδια παραμένουν σε χαμηλές θερμοκρασίες (<1000K) ενώ τα ηλεκτρόνια διατηρούν θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 20.000K έως 150.000K.
- Θερμικό πλάσμα, το οποίο χαρακτηρίζεται από θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 3000K.
- Θερμό πλάσμα, το οποίο αντιστοιχεί σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες του 1.000.000K²¹⁷.

Από τι αποτελείται το πλάσμα;

Μολονότι η σύσταση του πλάσματος εξαρτάται από τη φύση του αερίου που χρησιμοποιείται, γενικά αποτελείται από:

- Ηλεκτρόνια
- Θετικά και αρνητικά ιόντα
- Φωτόνια (ορατού και υπεριώδους φωτός)
- Διεγερμένα άτομα και ιόντα
- Μετασταθή σωματρία
- Ελεύθερες ρίζες

Τα συνήθη αέρια που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία του πλάσματος είναι το Ήλιο (He) και το Αργό (Ar) καθώς για τη διάσπαση αυτών απαιτούνται χαμηλότερες τιμές τάσεως. Άλλα αέρια όπως π.χ. το Οξυγόνο (O₂), το Άζωτο (N₂), ή μείγματα αερίων χρησιμοποιούνται προκειμένου να παράσχουν τα επιθυμητά χημικά δραστικά είδη (reactive chemical species) π.χ. δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), δραστικές μορφές αζώτου (RNS) (**Σχήμα 12**). Κατά συνέπεια, αλλάζοντας το αέριο και τη ροή του δύναται να μεταβληθεί η σύσταση του παραγόμενου πλάσματος, προσδίδοντάς του ποικίλες φυσικές και χημικές ιδιότητες. Η προκύπτουσα σύνθεση είναι εντελώς διαφορετική ανάλογα με το αέριο που χρησιμοποιείται και αυτό συμβαίνει εξαιτίας των πολλών διαφορετικών αντιδράσεων μεταξύ των ενεργών σωματιδίων κατά τη διάρκεια της δημιουργίας του πλάσματος.



Σχήμα 12. Χημικά δραστικά είδη που παράγονται κατά τη διάσπαση του αερίου.

Πηγή: <https://www.fstjournal.org/features/28-1/cold-plasma>

Ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης

Όπως προαναφέρθηκε, η θερμοκρασία του πλάσματος στην περίπτωση δημιουργίας ψυχρού πλάσματος διατηρείται σε θερμοκρασίες ελαφρώς μεγαλύτερες από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος, παρά το γεγονός ότι η θερμοκρασία των ηλεκτρονίων κυμαίνεται από 20.000 έως 150.000K. Η ικανότητα διατήρησης του αερίου που χρησιμοποιείται για την παραγωγή πλάσματος σε χαμηλές τιμές θερμοκρασίας, έχει οδηγήσει στην εκτεταμένη χρήση του ψυχρού πλάσματος σε εφαρμογές που απαιτούν χαμηλές θερμοκρασίες όπως στην επεξεργασία θερμοευαίσθητων υλικών και στη βιοϊατρική²¹⁸.

Η διάταξη παραγωγής πλάσματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία λειτουργεί σε ατμοσφαιρική πίεσης (**Παράρτημα II**) και για το λόγο αυτό οι επόμενες παράγραφοι επικεντρώνονται στα χαρακτηριστικά και στις εφαρμογές που αφορούν το ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί μια ποικιλία διατάξεων παραγωγής ψυχρού πλάσματος που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις χημικές ιδιότητες του παραγόμενου πλάσματος και ως προς τις παραμέτρους λειτουργίας τους (π.χ. διάταξη ηλεκτροδίων, ροή αερίου). Τέτοιες διατάξεις είναι οι πίδακες πλάσματος (plasma jet), το μικροπλάσμα (microplasma), οι εκκενώσεις διηλεκτρικού φράγματος (dielectric barrier discharge, DBD), η εκκένωση αίγλης (glow discharge) κ.ά.

• Ιδιότητες ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται εξέλιξη της τεχνολογίας και των εφαρμογών του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών και πλεονεκτημάτων του. Η επεξεργασία με ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης έχει τα ακόλουθα γνωρίσματα:

Παράγει ενεργά φορτισμένα σωματίδια σε ατμοσφαιρική πίεση και σε χαμηλές τιμές θερμοκρασίας. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια ποικιλία αερίων, μεμονωμένων ή μειγμάτων. Επιτρέπει την επεξεργασία ανομοιογενών υλικών και πολύπλοκων επιφανειών όπως π.χ. ίνες, συμπαγή υλικά, χαρτί, συνθετικά υλικά, κεραμικά, γυαλί, κράματα και μέταλλα. Μέσω της επεξεργασίας με ψυχρό πλάσμα επιτυγχάνεται η βελτίωση μιας σειράς ιδιοτήτων του υλικού όπως π.χ. η καθαρότητα, η στεγανότητα, η τραχύτητα, η μόνωση, η σκληρότητα, η συγκολλητική ικανότητα, η προστασία από οξείδωση και οι διηλεκτρικές ιδιότητες.

Έχει αποδειχθεί ότι το ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης μπορεί να έρθει σε άμεση επαφή με βιολογικό ιστό χωρίς να προκαλεί ανεπιθύμητες μεταβολές ή καταστροφή του ιστού^{219,220,221,222}. Επιπλέον λόγω του ότι τα επίπεδα του παραγόμενου όζοντος είναι χαμηλά, το ψυχρό πλάσμα που παράγεται υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης δεν είναι τοξικό. Η έρευνα πάνω στην

αλληλεπίδραση του πλάσματος με διάφορους τύπους βακτηρίων δείχνει την αποτελεσματικότητά του ως μέσο αποστείρωσης²²³.

Η παραγωγή του πλάσματος σε ατμοσφαιρικές συνθήκες επιτρέπει την κατασκευή διατάξεων εύκολων στη χρήση, ικανών να χρησιμοποιηθούν και από μη εξειδικευμένους χρήστες. Στην αγορά διατίθεται μια ποικιλία μεγεθών τέτοιων διατάξεων οι οποίες είναι κατασκευασμένες από ανθεκτικά υλικά και διαθέτουν αυτοματοποιημένα συστήματα ελέγχου και δεικτών (π.χ. ένδειξη θερμοκρασίας, ρύθμιση ροής αερίου κλπ.). Οι διατάξεις αυτές έχουν χαμηλό σχετικά κόστος και μειωμένη χρήση χημικών ουσιών σε αντίθεση με τις διατάξεις ψυχρού πλάσματος χαμηλής πίεσης οι οποίες είναι δαπανηρές καθώς απαιτούν θάλαμο κενού, αντλίες και συχνή συντήρηση^{224,225}.

- **Εφαρμογές ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης**

Το ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης χρησιμοποιείται πλέον σε πολλούς τομείς όπως στην επεξεργασία στερεών επιφανειών (εγχάραξη-etching, επίστρωση-coating), στον καθαρισμό υλικών²²⁶, στην επεξεργασία υγρών, στη σύνθεση νανοσωματιδίων, στον καθαρισμό υδάτων, στον έλεγχο των ατμοσφαιρικών ρύπων όπως είναι οι πτητικές οργανικές ενώσεις (VOC), στην ηλεκτροχημεία, στην επιφανειακή τροποποίηση πολυμερών²²⁷. Η αλληλεπίδραση του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης με βιολογικά συστήματα έχει δώσει νέα ώθηση στην χρησιμοποίηση της τεχνολογίας αυτής στην κλινική ιατρική με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα²²⁸. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η τεχνολογία του πλάσματος θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα νέο μέσο αντιμετώπισης μορφών καρκίνου επηρεάζοντας τη μορφολογία των καρκινικών κυττάρων^{229,230,231}. Επί του παρόντος χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό μέσο για τον καθαρισμό πληγών^{232,233}, για την πήξη του αίματος ενώ πρόσφατες μελέτες επιβεβαιώνουν τη συμβολή του ψυχρού πλάσματος και στην απολύμανση και στην αποστείρωση θερμοευαίσθητων ιατρικών οργάνων και χειρουργικών εργαλείων²³⁴.

Παρά την εκτενή μελέτη γύρω από τις εφαρμογές του πλάσματος στην ιατρική ο μηχανισμός αλληλεπίδρασής του με κύτταρα και ιστούς δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Κατά συνέπεια, αποτελεί βασική ανάγκη η συνέχιση της έρευνας με σκοπό τη διευκρίνιση αυτού του μηχανισμού.

- **Οφέλη της τεχνολογίας του πλάσματος στη βιομηχανία τροφίμων**

Το γεγονός ότι το ψυχρό πλάσμα δεν προκαλεί καταστροφή του βιολογικού ιστού επιτρέπει την άμεση επαφή του με την οργανική ύλη. Έτσι πέρα από την επεξεργασία κυττάρων και ιστών, το πλάσμα εφαρμόζεται και στην επεξεργασία τροφίμων²³⁵. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει πολλαπλασιαστεί ο αριθμός των ερευνητικών μελετών που αναδεικνύουν τις δυνατότητες της τεχνολογίας του πλάσματος στον τομέα των τροφίμων. Έχει αποδειχτεί ότι το ψυχρό πλάσμα είναι δραστικό έναντι βακτηρίων, ιών, μυκήτων και σπορίων^{236,237}. Μεγάλο μέρος της

έρευνας επικεντρώνεται στην καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίοι δύνανται να αναπτυχθούν σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα αλλά και στα ίδια τα τρόφιμα.

Επί του παρόντος η τεχνολογία του πλάσματος δε χρησιμοποιείται εκτενώς στη βιομηχανία τροφίμων ωστόσο λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του, το πλάσμα μπορεί να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για την καταπολέμηση της διαμείωσης, της μικροβιακής αλλοίωσης και της μείωσης του χρόνου ζωής των παραγόμενων τροφίμων. Το ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης προσφέρει μια σειρά πλεονεκτημάτων έναντι των υφιστάμενων τεχνολογιών για την ασφάλεια των τροφίμων, όπως²³⁸:

- Φιλικότητα προς το περιβάλλον. Οι διεργασίες ψυχρού πλάσματος όντας «ξηρές» μέθοδοι δεν παράγουν τοξικά απόβλητα.
- Εξοικονόμηση ενέργειας. Η εφαρμογή πλάσματος είναι ταχεία, απαιτούνται μικρές ποσότητες αερίων και μικρά ποσά ενέργειας.
- Ευελιξία στη χρήση. Προσαρμοστικότητα του πλάσματος σε κάθε σχήμα και μορφή υλικού, μείωση της απαιτούμενης θερμοκρασίας για την επεξεργασία σε σχέση με άλλες μεθόδους που εφαρμόζονται.
- Υψηλή ποιότητα και επαναληπτικότητα των δράσεων επεξεργασίας, απουσία παραμορφώσεων του αρχικού σχήματος και μορφής του υλικού.

Για τους παραπάνω λόγους η τεχνολογία του πλάσματος αποτελεί καινοτόμο μέθοδο που μπορεί να βρει εφαρμογή στην επεξεργασία των πρώτων υλών και των αποξηραμένων προϊόντων, στην αποστείρωση των υλικών συσκευασίας, στην απολύμανση/αποστείρωση επιφανειών τροφίμων (π.χ. έλεγχος απολύμανσης κελύφους αυγών), στον έλεγχο των βιοϋμενίων και στην εξυγίανση/απολύμανση επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα.

• Έλεγχος βιοϋμενίων και απολύμανση επιφανειών

Η τεχνολογία του πλάσματος μπορεί να αξιοποιηθεί για τη δημιουργία νέων εφαρμογών με σκοπό την καταπολέμηση βιοϋμενίων. Το πλάσμα έχει αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικό έναντι βιοϋμενίων που αναπτύσσονται σε συνθήκες *in vitro*. Ωστόσο συγκρίνοντας τη συμπεριφορά στελεχών που αναπτύσσονται σε βιοϋμένιο και σε πλαγκτονική μορφή, παρατηρείται πως απαιτούνται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα επεξεργασίας με πλάσμα για την πλήρη θανάτωση των βιοϋμενικών κυττάρων^{239,240}.

Οι Leirold και συν. (2010) μελέτησαν την αποτελεσματικότητα μια διάταξης εκκένωσης διηλεκτρικού φράγματος (DBD) που λειτουργούσε απουσία ευγενούς αερίου, με την αξιοποίηση του ατμοσφαιρικού αέρα στην απολύμανση ενός περιστρεφόμενου εργαλείου κοπής που χρησιμοποιείτο για τον τεμαχισμό των παραγόμενων προϊόντων μιας βιομηχανίας κρέατος. Ποσότητα από καλλιέργεια της *Listeria innocua* ενοφθαλμίστηκε στη λεπίδα τεμαχισμού. Η λεπίδα αυτή χρησιμοποιήθηκε ως ηλεκτρόδιο γείωσης στη συγκεκριμένη διάταξη πλάσματος.

Κατόπιν έκθεσης στην πηγή πλάσματος για 340 δευτερόλεπτα διαπιστώθηκε μείωση της τάξης των 5 λογαρίθμων στον πληθυσμό της *Listeria innocua*. Η θερμοκρασία της λεπίδας κατά την επεξεργασία με πλάσμα παρέμενε σε τιμές μικρότερες των 30°C και η λογαριθμική μείωση επιτεύχθηκε κατά τη διάρκεια λειτουργίας της κοπτικής μηχανής στη γραμμή παραγωγής προϊόντων κρέατος, γεγονός που υποδηλώνει την ικανότητα παρεμπόδισης της διαμείωσης ανάμεσα στις διαφορετικές παρτίδες κρέατος²⁴¹.

Οι Deng και συν. (2009) διαπίστωσαν ότι το ψυχρό πλάσμα έχει τη δυνατότητα να μετουσιώνει τις πρωτεΐνες που συνδέονται με τις επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα²⁴². Πλάσμα θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί και για την αφαίρεση αλλεργιογόνων από τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων²⁴³.

Σύμφωνα με τον Brown (2010) παρατηρείται μία αυξανόμενη τάση των παραγωγών τροφίμων να επενδύουν στην τεχνολογία ψυχρού πλάσματος για την καταπολέμηση των παθογόνων μικροοργανισμών που επιβιώνουν στις επιφάνειες των εγκαταστάσεων τροφίμων και στον περιβάλλοντα χώρο, συμπεριλαμβανομένου του αέρα²⁴⁴.

- **Μηχανισμοί βακτηριακής απόκρισης κατά την επεξεργασία με πλάσμα ατμοσφαιρική πίεσης**

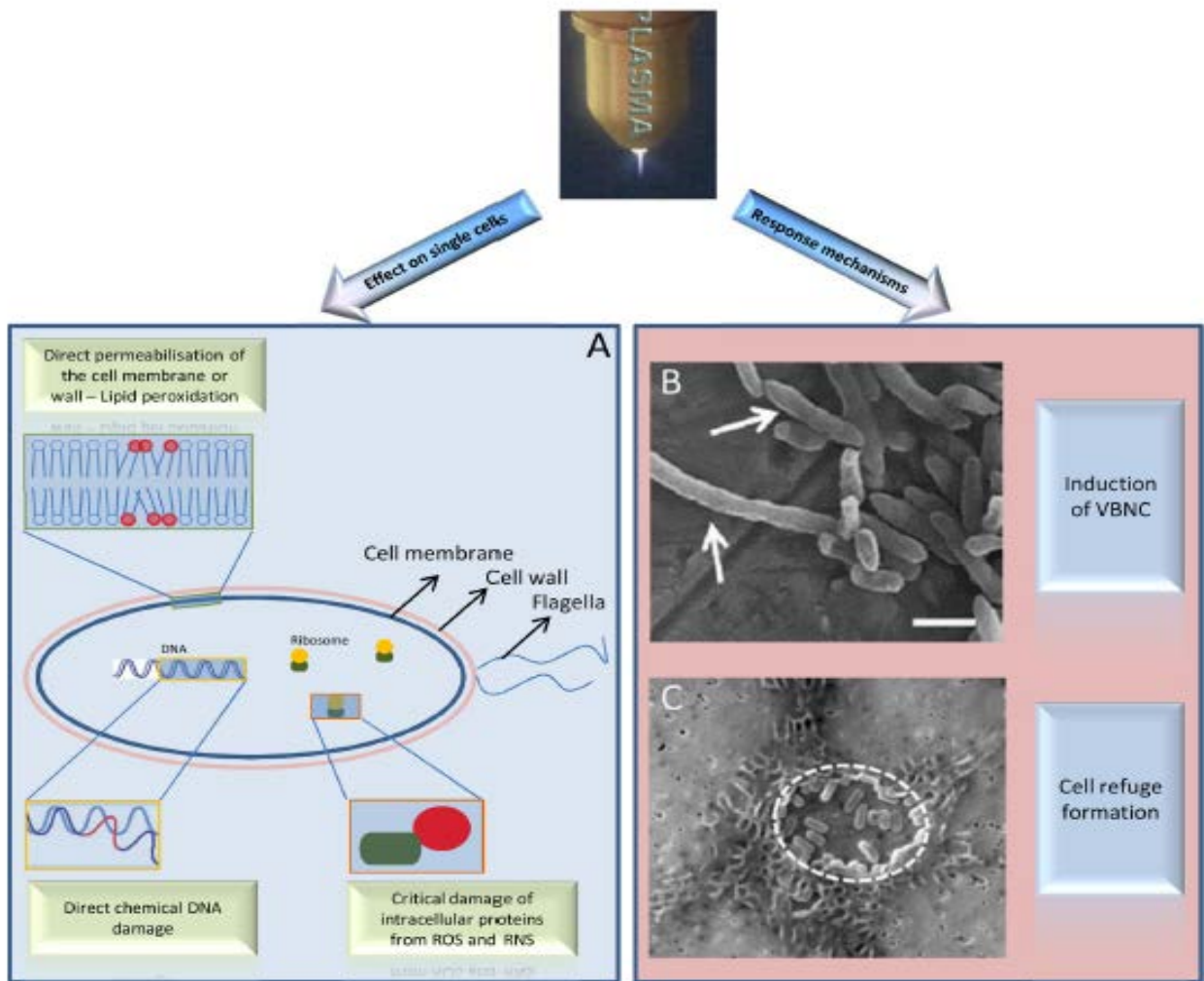
Παρά το γεγονός ότι μια ποικιλία πιθανών βιολογικών εφαρμογών του ψυχρού πλάσματος έχουν περιγραφεί, συμπεριλαμβανομένης της εξυγίανσης/απολύμανσης μολυσμένων επιφανειών στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, ο μηχανισμός με τον οποίο το πλάσμα αδρανοποιεί ή/ και καταστρέφει τους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται σε επιφάνειες δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως.

Ενώ μελέτες επιβεβαιώνουν ότι τα διαφορετικά είδη (ελεύθερες ρίζες, ιόντα, φωτόνια κλπ.) που παράγονται κατά τη δημιουργία του πλάσματος είναι υπεύθυνα για τη θανάτωση των βακτηρίων, περαιτέρω έρευνα στον τομέα αυτό αποτελεί βασική ανάγκη για την αποσαφήνιση της αλληλεπίδρασης του πλάσματος με τα κύτταρα. Ο Hashimoto ήδη από το 1993 είχε αποδείξει ότι τα Gram θετικά βακτήρια αντιδρούν διαφορετικά από τα Gram αρνητικά βακτήρια στην επεξεργασία με πλάσμα. Επίσης εκτενέστερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για τη διερεύνηση της επίδρασης του ψυχρού πλάσματος σε ευκαρυωτικά και σε προκαρυωτικά κύτταρα^{245,246}. Συμπεραίνεται ότι η συμπεριφορά των βακτηρίων μετά την έκθεση στο πλάσμα εξαρτάται από το είδος του μικροοργανισμού. Γενικά τα Gram αρνητικά βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από τα Gram θετικά. Οι Laroussi και συν. (2003) παρατήρησαν μεγαλύτερες μεταβολές στα μορφολογικά χαρακτηριστικά Gram αρνητικών μικροοργανισμών (*E. coli*) απ' ότι Gram θετικών μικροοργανισμών (*Bacillus subtilis*) κατόπιν της έκθεσης κυττάρων τους σε συνθήκες πλάσματος²⁴⁷.

Όσον αφορά τα συστατικά του πλάσματος που φαίνεται να επηρεάζουν τα κύτταρα, πρωταρχικό ρόλο κατέχει η υπεριώδης ακτινοβολία είτε μέσω της απορρόφησής της από τα κύτταρα είτε έμμεσα λόγω πρόκλησης οξειδωτικού στρες. Η δράση αυτή φαίνεται να ενισχύεται από την παρουσία ελεύθερων ριζών²⁴⁸. Τα Gram θετικά βακτήρια στερούνται εξωκυτταρικής μεμβράνης αλλά διαθέτουν πιο παχύ κυτταρικό τοίχωμα το οποίο προσδίδει αντοχή και σταθερότητα στους μικροοργανισμούς αυτούς. Ωστόσο με βάση τα αποτελέσματα των μελετών των Laroussi και συν. η εφαρμογή πλάσματος σε κύτταρα του Gram θετικού μικροοργανισμού (*Bacillus subtilis*) δεν επέφερε μεταβολές στη δομή και μορφολογία τους μολονότι η βιωσιμότητά τους μειωνόταν σημαντικά. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η λύση των κυττάρων δεν είναι ο μόνος μηχανισμός σύμφωνα με τον οποίο τα κύτταρα θανατώνονται κατόπιν της έκθεσης σε πλάσμα.

Έχει προταθεί ότι η βακτηριακή θανάτωση λαμβάνει χώρα μέσω τριών μηχανισμών²⁴⁹ οι οποίοι απεικονίζονται στο **Σχήμα 13A**. Ο χρόνος που απαιτείται για τη μείωση του βακτηριακού πληθυσμού κατά 90% (D-value) ποικίλει από 20 δευτερόλεπτα έως 10 λεπτά²⁵⁰. Επιπλέον η επαφή του πλάσματος με κύτταρα ή ιστούς αλλάζει τη σύστασή του καθώς κύτταρα ενδέχεται να αποκολληθούν από την επιφάνεια και να εισέλθουν στον κύριο όγκο του πλάσματος, αλλάζοντας τις παραμέτρους ροής και επηρεάζοντας πιθανώς και τη χημική σύσταση του πλάσματος.

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα κύτταρα μετά την έκθεσή τους στο πλάσμα βγαίνουν σε μια κατάσταση στην οποία ενώ επιβιώνουν δεν είναι ικανά να αναπτύξουν αποικίες σε θρεπτικά υποστρώματα (Viable but Nonculturable state, VBNC). Στην κατάσταση αυτή συμβαίνουν μεταβολές στη φυσιολογία και τη μορφολογία των κυττάρων. Τα κύτταρα διατηρούν την αναπνευστική τους δραστηριότητα ενώ εξακολουθεί να πραγματοποιείται μεταγραφή γονιδίων και σύνθεση πρωτεϊνών. Η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία έχει δείχτει ότι επάγει την VBNC κατάσταση^{251,252}. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι όταν κύτταρα εκτίθενται για μικρά χρονικά διαστήματα σε πλάσμα, η VBNC κατάσταση στην οποία μεταβαίνουν πιθανόν να οφείλεται στην επίδραση της υπεριώδους ακτινοβολίας.



Σχήμα 13. Α) Επίδραση του πλάσματος στα βακτηριακά κύτταρα, μηχανισμοί. Β) Μηχανισμοί βακτηριακής απόκρισης. VBNC κατάσταση. Στην εικόνα SEM τα βέλη δείχνουν τα διαιρούμενα κύτταρα του *Bacillus stratosphericus* κατόπιν της έκθεσής τους σε πλάσμα για 120 λεπτά σε υγρό περιβάλλον μέσω²⁵³. Γ) Εικόνα SEM όπου απεικονίζονται ομοιογενή κύτταρα *Listeria innocua* μετά από 45 δευτερόλεπτα επεξεργασίας με πλάσμα²⁵⁴.

1^{ος} μηχανισμός: Άμεση διάσπαση της κυτταρικής μεμβράνης ή του κυτταρικού τοιχώματος που οδηγεί σε διαρροή των κυτταρικών συστατικών συμπεριλαμβανομένων των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών.

2^{ος} μηχανισμός: Βλάβη των ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών λόγω επίδρασης δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), αζώτου (RNS).

3^{ος} μηχανισμός: Άμεση χημική βλάβη του DNA.

- **Σχηματισμός βιοϋμενίων και τρόπος απόκρισης στο ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης**

Όσον αφορά τα βιοϋμενία, η παρουσία του στρώματος εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών (EPS) επηρεάζει το αποτέλεσμα της επεξεργασίας του πλάσματος. Η απουσία ενός βασικού πρωτοκόλλου για την ανάπτυξη των κυττάρων και κατόπιν της επεξεργασίας τους με πλάσμα αποτελεί σημαντικό εμπόδιο για την αποσαφήνιση των μηχανισμών με τους οποίους το πλάσμα αδρανοποιεί τους μικροοργανισμούς. Στην περίπτωση των βιοϋμενίων είναι δύσκολο να εξαχθεί ένα σαφές συμπέρασμα για την απολυμαντική δράση του πλάσματος καθώς οι διάφοροι ερευνητές χρησιμοποιούν διαφορετικά στελέχη τα οποία αναπτύσσονται σε διαφορετικές επιφάνειες και υπό διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.

Το στρώμα EPS εμποδίζει τους αντιμικροβιακούς παράγοντες και τα απολυμαντικά να εισχωρήσουν στο εσωτερικό των βιοϋμενίων ώστε να τα εξουδετερώσουν. Το στρώμα EPS, στην περίπτωση του πλάσματος φαίνεται να δρα προστατευτικά έναντι των δραστικών μορφών π.χ. οξυγόνου (ROS), των φορτισμένων σωματιδίων και των φωτονίων, τα οποία διαθέτουν βακτηριοκτόνες ιδιότητες. Αν το στρώμα EPS διασπαστεί, τα σωματίδια αυτά δύνανται να εισχωρήσουν στο εσωτερικό του βιοϋμενίου και να επιδράσουν επί των κυττάρων. Και στην περίπτωση των βιοϋμενίων είναι πιθανό να πραγματοποιηθεί μετάβαση των κυττάρων σε μια κατάσταση VBNC²⁵⁵. Το γεγονός αυτό δηλώνει ότι η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά την επεξεργασία με πλάσμα θα πρέπει να αξιολογείται όχι μόνο με βάση την κλασική μέθοδο απαρίθμησης αποικιών. Ο προσδιορισμός του ATP σε συνδυασμό με τη μικροσκοπία ατομικής δύναμη AFM και των τεχνικών φθορισμού επιτρέπουν τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων και των μορφολογικών αλλαγών των κυττάρων μετά την επεξεργασία με πλάσμα. Για να διεισδύσουν τα σωματίδια αυτά στο εσωτερικό των βιοϋμενίων και να εκδηλώσουν την αντιμικροβιακή τους δράση απαιτούνται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα εφαρμογής πλάσματος σε σχέση με αυτά που απαιτούνται για τα πλαγκτονικά κύτταρα²⁵⁶.

Οι Vleugels και συν. (2005) μελέτησαν την αποτελεσματικότητα του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης που δημιουργείται μέσω εκκενώσεων αίγλης (glow discharge) και χρησιμοποιούσε ως ρέον αέριο μείγμα ηλίου-οξυγόνου έναντι βιοϋμενίων τα οποία είχαν αναπτυχθεί στην επιφάνεια φρέσκων τροφίμων (fresh food products). Διαπίστωσαν ότι ο ρυθμός θανάτωσης του πληθυσμού ήταν εξαρτώμενος του χρόνου έκθεσης των βιοϋμενίων στο πλάσμα²⁵⁷. Οι Kamgang και συν. (2007) διερεύνησαν την ικανότητα του πλάσματος (gliding arc discharge) να αδρανοποιεί πλαγκτονικά, προσκολλημένα και βιοϋμενικά κύτταρα του *Staphylococcus epidermidis*. Μετά από 30 λεπτά επεξεργασίας διαπιστώθηκε μείωση κατά 6 log των μη προσκολλημένων κυττάρων και μείωση 3 log των βιοϋμενικών κυττάρων²⁵⁸. Η μελέτη των Salamitou και συν. (2009) στην οποία χρησιμοποιήθηκε πλάσμα που δημιουργείται από ηλεκτρικές μετα-εκκενώσεις με

χρήση ατμοσφαιρικού αέρα, αποκάλυψε μια αυξημένη ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων *E. coli* έναντι των πλαγκτονικών κυττάρων, έπειτα από επεξεργασία σε πλάσμα για 40 λεπτά²⁵⁹.

Η τεχνολογία του πλάσματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική τεχνική των χημικών και φυσικών/θερμικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των βιοϋμενίων. Η διάχυτη φύση του πλάσματος επιτρέπει την εφαρμογή του σε επιφάνειες όπου οι κλασσικές μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης δεν είναι αποτελεσματικές ή δεν μπορούν να εφαρμοστούν.

Η χρήση του πλάσματος αποτελεί μια νέα προσέγγιση για τον έλεγχο και την αντιμετώπιση των βιοϋμενίων στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων. Το χαμηλό λειτουργικό κόστος, η ελάχιστη χρήση H₂O, η επεξεργασία σε θερμοκρασίες δωματίου και η απουσία χημικών καταλοίπων είναι μερικά από τα πλεονεκτήματα που την καθιστούν ως μία πολλά υποσχόμενη μέθοδο για την καταπολέμηση των βιοϋμενίων.

Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μελέτης ήταν η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης στην απομάκρυνση και αδρανοποίηση βιοϋμενίων τα οποία αναπτύσσονταν *in vitro* σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα.

Στη μελέτη αυτή εξετάστηκε αρχικά η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων από στελέχη *L. monocytogenes* τα οποία είχαν απομονωθεί από διαφορετικές πηγές. Κύτταρα των στελεχών αναπτύχθηκαν σε μεταλλικές επιφάνειες και αξιολογήθηκε η ανάπτυξή τους μετά από τέσσερις διαφορετικές χρονικές περιόδους επώασης. Στη συνέχεια, στελέχη με ικανοποιητικό προφίλ ανάπτυξης βιοϋμενικών πληθυσμών, επιλέχθηκαν ώστε να διερευνηθεί η ανθεκτικότητά τους κατόπιν έκθεσής τους σε συνθήκες πλάσματος.

Αναλυτικότερα η εκπόνηση της παρούσας μελέτης στόχευε στα εξής:

- Στην προσέγγιση της τεχνολογίας του πλάσματος.
- Στη διερεύνηση και κατανόηση του τρόπου δράσης του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης έναντι βιοϋμενικών πληθυσμών της *L. monocytogenes*.
- Στην αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας διαφόρων συνθηκών λειτουργίας του πλάσματος στην εξυγίανση επιφανειών.
- Στην εκμάθηση του χειρισμού μιας διάταξης ψυχρού πλάσματος που παράγει εκκενώσεις διηλεκτρικού φράγματος (Dielectric Barrier Discharge, DBD) και λειτουργεί σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

Κεφάλαιο 4

Μεθοδολογία της μελέτης

4.1 Βακτηριακά Στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας αποτελούν μέρος της Συλλογής Καλλιεργειών του Τμήματος Γεωπονικών Σπουδών του Πανεπιστημίου του Τορίνο. Τα στελέχη ανήκουν στο είδος *L. monocytogenes* και διατηρούνται σε αδρανή μορφή στους -80°C σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα Brain Heart Infusion broth (BHI; OXOID, Milan, Italy) που περιέχει 30% γλυκερόλη.

Έλεγχος καθαρότητας των στελεχών γινόταν πριν από κάθε ενοφθαλμισμό μέσω γραμμικής εξάπλωσης (streaking) σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ALOA (Harlequin™ *Listeria Chromogenic Agar*, LAB M) και επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 48 ώρες.

Στον Πίνακα 6 αναφέρονται οι ορότυποι και η πηγή προέλευσης των μελετηθέντων στελεχών.

Πίνακας 6. Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας εργασίας

Στέλεχος	Κωδικός στελέχους ⁱ	Ορότυπος	Προέλευση
EGDe	EGDe	1/2a	Στέλεχος συλλογής
NCTC 10527	NCTC	4b	Στέλεχος συλλογής (Γαλακτοκομικό προϊόν)
3	3	3c	Προϊόν κρέατος
19	19	1/2b	Προϊόν κρέατος
36	36	1/2a	Προϊόν κρέατος
18	18	3a	Γαλακτοκομικό προϊόν
70	70	1/2a	Γαλακτοκομικό προϊόν
162	162	4b	Γαλακτοκομικό προϊόν
V7	V7	Not serotyped	Απομόνωση από άνθρωπο
12(vet)	12 (vet)	Not serotyped	Γαλακτοκομικό προϊόν
Isolate 3	Box 3	1/2a	Εγκαταστάσεις βιομηχανίας παραγωγής γαλακτοκομικών προϊόντων
Isolate 17	Box 17	1/2c	Κοπτική μηχανή κρέατος σε Υπεραγορά

ⁱ Αντιστοιχεί στον κωδικό με τον οποίο είναι κατατεθειμένο το κάθε στέλεχος στη Συλλογή Καλλιεργειών του Τμήματος Γεωπονικών Σπουδών του Πανεπιστημίου του Τορίνο.

4.2 Μοριακός χαρακτηρισμός στελεχών με την τεχνική rep-PCR

Ο μοριακός χαρακτηρισμός των στελεχών έγινε με σκοπό την ανεύρεση διαφοροποιήσεων στο γενετικό τους υλικό.

4.2.1 Απομόνωση- Ποσοτικοποίηση ολικού DNA από τα βακτηριακά κύτταρα

- **Απομόνωση ολικού DNA από τα βακτηριακά κύτταρα**

Το DNA είναι η πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της μοριακής βιολογίας και η απελευθέρωσή του σε διαλυτή μορφή, μετά από ρήξη του κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης, είναι η προϋπόθεση για κάθε περαιτέρω διαδικασία. Για τη λήψη αποτυπωμάτων επαναλαμβανόμενου παλινδρομικού DNA (rep-PCR fingerprinting), η απομόνωση του DNA των υπό μελέτη στελεχών πραγματοποιήθηκε με εκχύλιση αυτού ύστερα από ενζυμική επεξεργασία με λυσοζύμη στους 37°C. Η διαδικασία που τηρήθηκε για την εκχύλιση του DNA των υπό μελέτη στελεχών περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω (**Σχήμα 14**):

Υλικά και Πειραματική πορεία

σωληνάρια erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml

αποστειρωμένα ρύγχη

0.3 g σφαιριδίων zirconia/silica διαμέτρου 0.5 mm τοποθετημένα σε φιαλίδια με βιδωτό πώμα όγκου 2 ml (screw-top microcentrifuge tubes) [με επακόλουθη αποστείρωση αυτών]

Λυσοζύμη (25 mg/mL) Lysozyme from shicken egg white, 50.000 units/mg protein, SIGMA-ALDRICH) [ζύγιση σε αναλυτικό ζυγό και αποθήκευση στους -32°C]

Breaking Buffer: 2% Triton X-100 (v/v), 1% SDS (w/v), 100 mM NaCl, 10 mM Tris, 1 Mm EDTA σε pH 8 [σε δις απεσταγμένο αποστειρωμένο H₂O και επακόλουθη αποστείρωση]

TE: 10 mM Tris pH 8, 1 Mm EDTA pH 8 [σε δις απεσταγμένο αποστειρωμένο H₂O και επακόλουθη αποστείρωση]

Φαινόλη: Χλωροφόρμιο: Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1) (Sigma, Milan, Italy) [αποθήκευση στο ψυγείο]

Αιθανόλη 99% και αιθανόλη 70%

Thermomixer compact (Eppendorf)

Φυγόκεντρος (Centrifuge 5415 R, Eppendorf)

Bead Beater (Mini -Bead Beater 8- Biospec Products, Inc., Bartlesville, Okla)

Εργασία
εκτός
απαγωγού

- **1) Διάρρηξη του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και της κυτταρικής μεμβράνης**
- Μεταφέρθηκε 1 ml υγρής καλλιέργειας σε αποστειρωμένο φιαλίδιο με βιδωτό πώμα το οποίο περιέχει 0.3g zirconia/silica σφαιρίδια διαμέτρου 0.5 mm.
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C στις 14000 rpm
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκαν 50 μl λυσοζύμης (25 mg/ml).
- Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στο Thermomixer στους 37 °C για 30 λεπτά στα μέγιστα rpm(14000 rpm).
- Προστέθηκαν 300 μl Breaking Buffer.

Εργασία
εντός
απαγωγού

- Έπειτα, προστέθηκαν 300 μl από το διάλυμα Φαινόλη:Χλωροφόρμιο: Ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1).
- Τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν στο Bead Beater για ανάδευση για 1.5 λεπτό (3 κύκλοι των 30 δευτερολέπτων έως 4.5 m / s με 3-5 min αναμονή μεταξύ της έναρξης του κάθε κύκλου).
- Προστέθηκαν 300 μl TE.
- **2) Εκχύλιση και διαχωρισμός του DNA**
- Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C στις 14000 rpm (διαχωρισμός σε 3 φάσεις).
- Η 1^η φάση μεταφέρθηκε σε νέο αποστειρωμένο erpendorf χωρητικότητας 1.5 ml.
- **3) Κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη**
- Μετά την προσθήκη 600 μl αιθανόλης 99% και αφού ακολούθησε χειροκίνητη ανακίνηση των erpendorfs
- έγινε εκ νέου φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4°C στις 14,000 rpm.
- Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο
- Έγινε προσθήκη 250 μl αιθανόλης 70% και
- εκ νέου φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στους 4°C στις 14,000 rpm
- Αφαιρέθηκε η αιθανόλη και τα erpendorfs με τα pellets του DNA αφέθηκαν να στεγνώσουν εντός του απαγωγού για 30 λεπτά.
- Κατόπιν, προστέθηκαν 50 μl αποστειρωμένου H₂O.
- Τα erpendorfs τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για περαιτέρω επεξεργασία ή φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους -32°C.

Σχήμα 14. Πρωτόκολλο για την απομόνωση του ολικού DNA.

- Ποσοτικοποίηση του DNA

Πειραματική πορεία

Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων PCR έπρεπε να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις του DNA που είχε απομονωθεί από τα βακτηριακά στελέχη. Ο προσδιορισμός των συγκεντρώσεων του DNA έγινε φωτομετρικά με χρήση του νανοφωτόμετρου (Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

Τα απομονωμένα DNA των στελεχών εξήχθησαν από τους $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου φυλάσσονταν και τοποθετήθηκαν στον θάλαμο επώασης στους $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Αρχικά, $1\text{ }\mu\text{l}$ δις απεσταγμένο αποστειρωμένο H_2O τοποθετήθηκε στην ειδική ακίδα του μηχανήματος για τον καθαρισμό της. Πριν την έναρξη των μετρήσεων, $1\text{ }\mu\text{l}$ H_2O μεταφέρθηκε στην ακίδα για μηδενισμό (blank measurement.)

Στη συνέχεια, τοποθετήθηκε στην ακίδα $1\text{ }\mu\text{l}$ του υπό ανάλυση δείγματος και η μέτρησή του καταγράφηκε με τη βοήθεια ειδικού προγράμματος σε ηλεκτρονικό υπολογιστή (Λογισμικό ND-1000 V3.7.1) σε μήκος κύματος 260 nm . Στο τέλος της κάθε μέτρησης η ακίδα καθαριζόταν ελαφρά με απορροφητικό χαρτί και ακολουθούσε η ίδια διαδικασία για όλα τα προς ανάλυση δείγματα.

Μετά τη φωτομέτρηση τα δείγματα αραιώθηκαν, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση όλων των δειγμάτων να είναι ίση με $100\text{ ng}/\mu\text{l}$. **(Παράρτημα I)**



Σημείωση:

Καθώς σκοπός της PCR είναι η δημιουργία πολλών αντιγράφων DNA, αρχικές υψηλές συγκεντρώσεις αυτού δεν είναι κατάλληλες για την μετέπειτα εκτέλεση των αντιδράσεων PCR. Για το λόγο αυτό γίνεται αραιώση των δειγμάτων ώστε να έχουν συγκέντρωση $100\text{ ng}/\mu\text{l}$.

4.2.2 Μοριακή τεχνική rep-PCR

Διεξήχθη η PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (repetitive element PCR, rep-PCR) η οποία αποτελεί μια από τις τεχνικές PCR μοριακού αποτυπώματος (PCR fingerprinting techniques), με σκοπό τον μοριακό χαρακτηρισμό των στελεχών του παθογόνου *L. monocytogenes*.

1 μl DNA από κάθε στέλεχος υποβλήθηκε σε rep-PCR με χρησιμοποίηση του ολιγονουκλεοτιδικού εκκινητή (GTG)₅. Σύμφωνα με τους Hadjilouka και συν. (2014), η τεχνική αυτή παρείχε μεγάλη διαχωριστική ικανότητα μεταξύ απομονωθέντων στελεχών *L. monocytogenes* που ανήκαν στους ορότυπους 1/2a, 1/2b, 4a, 4c ή 4ab.²⁶⁰ Η ανίχνευση των προϊόντων της rep-PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στο τέλος το πήκτωμα τοποθετήθηκε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας για παρατήρηση.

Για την αντίδραση της rep-PCR παρασκευάστηκε Master mix. Η διαδικασία προετοιμασίας του διαλύματος Master mix έγινε σε ειδικό θάλαμο κάθετης νηματικής ροής που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία των αντιδράσεων PCR. Τα αναλώσιμα και οι πιπέτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν επίσης αποκλειστικής χρήσης για PCR. Τα χρησιμοποιηθέντα υλικά παρατίθενται αναλυτικότερα παρακάτω:

Υλικά

10x Buffer Sigma

MgCl₂ (25 mM)

dNTPs (10 mM) (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)

(GTG)₅ (10 μM)

Taq DNA Polymerase (5U/μl) (Eppendorf, Hamburg, Germany)

dH₂O (απιονισμένο)

DNA βακτηριακού στελέχους (100 ng/ μl)

Θερμικός κυκλοποιητής DNA Engine Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD)

Συσκευή κάθετης νηματικής ροής

Αυτόματος αναδευτήρας

Σωληνάρια eppendorf για PCR χωρητικότητας 0.2 ml

Αυτόματες πιπέτες 1000, 200, 100 και 10 μl

Αποστειρωμένα ρύγχη

Πειραματική πορεία

Αρχικά παρασκευάστηκε το Master mix έκαστης αντίδρασης αναμειγνύοντας σε eppendorf (χωρητικότητας 1.5 ml) ποσότητες πολλαπλάσιες του αριθμού των

δειγμάτων (συμπεριλαμβανομένου το αρνητικού μάρτυρα) από τις ποσότητες των αντιδραστηρίων που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7**.

Πίνακας 7. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή διαλύματος Master mix για την αντίδραση της *rep-PCR*.



Αντιδραστήρια	Τελική συγκέντρωση	Όγκος για κάθε δείγμα (μl)
10x Buffer Sigma	1x	2.5
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM	1.5
dNTPs (10 mM)	0.2 mM	0.5
(GTG) ₅ (10 μM)	2 μM	5
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	1.25 U	0.25
dH ₂ O		14.25
DNA (100 ng/μl)		1
Τελικός όγκος		25 μl

Ο τελικός όγκος του master mix για η αριθμό δειγμάτων υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τον όγκο του κάθε αντιδραστηρίου επί (n+c+1), όπου c=αρνητικός μάρτυρας.

Αφού αναμείχθηκαν ήπια όλα τα αντιδραστήρια (με χρήση πιπέτας ή χρήση Vortex για λίγα δευτερόλεπτα) τοποθετήθηκαν 24 μl από το Master mix σε ένα εppendorf χωρητικότητας 0.2 ml.

Έπειτα εκτός του θαλάμου νηματικής ροής, προστέθηκε σε κάθε εppendorf 1 μl από το DNA των μελετηθέντων στελεχών και κατόπιν τα δείγματα και ο αρνητικός μάρτυρας τοποθετήθηκαν εντός του θερμικού κυκλοποιητή του οποίου οι συνθήκες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 8**.

Πίνακας 8. Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή κατά την αντίδραση *rep-PCR*.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	5 min	1
Μετουσίωση	95	30 sec	30
Υβριδισμός/ Σύνδεση του primer	40	1 min	
Επιμήκυνση	65	8 min	
Τελική επιμήκυνση	65	16 min	1
Διαρκώς (Hold)	4		

4.2.3 Ανίχνευση των προϊόντων της *rep*- PCR με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για να γίνουν ορατά τα θραύσματα και ως εκ τούτου να αξιολογηθούν οι σχετικές θέσεις όπου βρίσκονται αυτά, τα προϊόντα των αντιδράσεων *rep*-PCR αναλύθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2%. Η χρώση έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο το οποίο έχει την ιδιότητα να φθορίζει με την παρουσία υπεριώδους φωτός.

Υλικά

TBE 10X (Tris-Boric Acid EDTA) (BIO-RAD), TBE 1X διάλυμα ηλεκτροφόρησης

Αγαρόζη (Certified Molecular Agarose, BIO-RAD)

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr₂) (10 mg/ml)

Διάλυμα φόρτωσης κυανό της βρωμοφαινόλης (6x DNA Gel Loading Dye, Bromophenol Blue, Xylene Cyanol FF, Thermo Scientific)

Τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους (1kbp BenchTop Ladder, Promega)

Φούρνος μικροκυμάτων

Κωνική φιάλη των 500 ml

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Καλούπι και «χτένα» στερεοποίησης πηκτής

Τροφοδοτικό τάσης (BIO-RAD)

Λάμπα UV

Αυτόματες πιπέτες, αποστειρωμένα ρύγγη, πάραφιλμ

Σύνθεση πυκνού διαλύματος TBE 10X για την παρασκευή 1L

TRIS- Trizma [®] base (Sigma-Aldrich)	180 g
Βορικό οξύ	55 g
EDTA pH=8 0,5M	40 ml
Απιονισμένο H ₂ O	Συμπλήρωση μέχρι όγκου 1L

Κατόπιν παρασκευής του 10X TBE Buffer έγινε αραιώση αυτού σε 1X.

Πειραματική πορεία

- Σε κωνική φιάλη των 500 ml αναμείχθηκαν 200 ml TBE Buffer 1X με 4 g αγαρόζης ώστε να προκύψει διάλυμα αγαρόζης 2% (w/v). Το διάλυμα αναμείχθηκε ζωηρά με κυκλική ανακίνηση της κωνικής φιάλης.
- Η αγαρόζη διαλύθηκε με θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου διαυγάσει το διάλυμα. Στη συνέχεια αφού αφέθηκε να κρυώσει ελαφρά,

- προστέθηκαν 30 μl βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,5 μg/ml και αναμείχθηκαν καλά.
- Εφαρμόστηκε κατάλληλη χτένα στο καλούπι της συσκευής ηλεκτροφόρησης για τον σχηματισμό οπών φόρτωσης του DNA και αποχύθηκε προσεκτικά το διάλυμα της αγαρόζης μέχρι να πήξει.
- Αφού στερεοποιήθηκε η αγαρόζη (έπειτα από ~ 20 λεπτά) αφαιρέθηκε η χτένα και η πηκτή εμβαπτίστηκε σε διάλυμα TBE Buffer 1X εντός της συσκευής ηλεκτροφόρησης.
- Σε κάθε οπή τοποθετήθηκε ποσότητα 20 μl απο ένα δείγμα DNA που είχε αναμειχθεί με διάλυμα 5 μl χρωστικής (κυανό της βρωμοφαινόλης).
- Προστέθηκαν ακόμα 2.5 μl μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder) με σκοπό τον προσδιορισμό του μήκους των προϊόντων της PCR.
- Εφαρμόστηκε σταθερή τάση 120 Volts για 120 λεπτά.
- Το ηλεκτροφορηθέν πήκτωμα αγαρόζης τοποθετήθηκε σε συσκευή εκπομπής υπεριώδους ακτινοβολίας ώστε να διακριθούν και να φωτογραφηθούν οι ζώνες των τμημάτων που διαχωρίστηκαν, με χρήση του λογισμικού UVI Platinum 1.1.

4.3 *In vitro* σχηματισμός βιοϋμενίων από στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα

Πειραματικός σχεδιασμός

Έπειτα από την ανακαλλιέργεια των στελεχών από την καλλιέργεια που συντηρείτο στους -80°C, την ανάπτυξη και τον έλεγχο της καθαρότητάς τους καθώς και το μοριακό διαχωρισμό σε επίπεδο στελέχους με τη μέθοδο *rep*-PCR, μελετήθηκε η ικανότητα των 12 στελεχών του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* να σχηματίζουν βιοϋμένια σε επιφάνειες από ανοξειδωτο χάλυβα.

Το χρησιμοποιούμενο μέσο ανάπτυξης ήταν το BHI broth, στο οποίο εμβαπτίζονταν οι μελετούμενες μεταλλικές επιφάνειες στους 37°C καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου επώασης. Η ανάπτυξη βιοϋμενίων αξιολογήθηκε μετά από 6, 24, 48 και 144 ώρες επώασης, χωρίς να πραγματοποιείται ανανέωση του θρεπτικού μέσου. Η επιλογή των 6 ημερών (144 ωρών) ως η τελική ημέρα μέτρησης, έγινε με σκοπό να υπάρχει αρκετός χρόνος ώστε να λάβουν χώρα αρκετοί κύκλοι προσκόλλησης-αποκόλλησης και ανάπτυξης βιοϋμενίων επάνω στις μεταλλικές επιφάνειες²⁶¹.

Η μελέτη αυτή θα μπορούσε να προσομοιάσει τον σχηματισμό βιοϋμενίων πάνω στους τοίχους μιας βιομηχανίας τροφίμων όπου μολυσμένα υπολείμματα τροφίμων παραμένουν για μεγάλη χρονική περίοδο στο ίδιο μέρος²⁶². Επιπλέον, επιλέχθηκε να μελετηθεί μονοκαλλιέργεια κάθε στελέχους ώστε να υπάρχει μία

σαφής αρχική εικόνα της ικανότητας καθενός από αυτά να αναπτύσσεται στις μεταλλικές επιφάνειες χωρίς να προστίθεται ο παράγοντας πιθανότητας κυριαρχίας άλλων στελεχών με τη χρήση πολυκαλλιέργειας.

4.3.1 Προετοιμασία κουπονιών

Το υλικό το οποίο συναντάται συχνά στις βιομηχανίες τροφίμων ως υλικό κατασκευής εξοπλισμού, είναι ο ανοξείδωτος χάλυβας. Έτσι, για το σχηματισμό βιοϋμενίων επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθούν στείρες μεταλλικές επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα διαστάσεων 7.2 cm x 2.0 cm x 0.3 cm, συνολικής επιφάνειας 34.32 cm². Οι επιφάνειες αυτές στα πειράματα που παρουσιάζονται στη συνέχεια, θα καλούνται «κουπόνια» (Γενικά στη μεταλλουργία ο όρος αυτός χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει τις μεταλλικές επιφάνειες μικρών διαστάσεων).

Αρχικά τα κουπόνια πλύθηκαν με απορρυπαντικό και εμβαπτίστηκαν σε ακετόνη, ώστε να απομακρυνθούν υπάρχοντα ρύπη, δακτυλικά αποτυπώματα και λιπαντικά ή άλλα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν κατά την παρασκευή τους. Ακολούθησε έκπλυση με νερό βρύσης και εν συνεχεία με απιονισμένο νερό. Πριν τη χρήση τους στα πειράματα, τα κουπόνια καθαρίζονταν προσεκτικά με απορρυπαντικό, ξεπλένονταν με νερό βρύσης και εν συνεχεία με απιονισμένο νερό, αφήνονταν να στεγνώσουν και περιτυλίγονταν το καθένα ξεχωριστά σε φύλλο αλουμινίου ώστε να αποστειρωθούν στο αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 121°C. Με αυτό τον τρόπο εξασφαλιζόταν η απόλυτη καθαρότητα των κουπονιών πριν από τον ενοφθαλμισμό με τον εκάστοτε μικροοργανισμό.

4.3.2 Διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων

Υπό ασηπτικές συνθήκες, έγινε ενοφθαλμισμός μίας μεμονωμένης αποικίας κάθε στελέχους από τις στερεές καλλιέργειες που φυλάσσονταν στην ψύξη στους 4°C, σε 2ml αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα BHI broth και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Για κάθε στέλεχος προετοιμάστηκαν 4 δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml (falcons). Αποστειρωμένα κουπόνια τοποθετούνταν ξεχωριστά με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας στα falcons και κατόπιν προστίθονταν 40 ml BHI broth. 400 μl από την υγρή καλλιέργεια ηλικίας 24 ωρών (συγκέντρωσης 10⁸ CFU/ml, όπως προσδιορίστηκε από προκαταρκτικά πειράματα) εμβολιάζονταν και ακολουθούσε επώαση στους 37°C χωρίς ανάδευση. Μετρήσεις πραγματοποιούνταν μετά από 6 ώρες (1^ο falcon), 24 ώρες (2^ο falcon), 48 ώρες (3^ο falcon) και 144 ώρες επώασης (4^ο falcon). Σε όλες τις περιπτώσεις οι επιφάνειες καλύπτονταν πλήρως με τα 40 ml θρεπτικού μέσο.

4.3.3 Αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων από τα κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα και προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων και βιοϋμενικών κυττάρων

Για την αποκόλληση των προσκολλημένων κυττάρων από τα κουπόνια εφαρμόστηκε η μέθοδος μηχανικής απόξεσης με γυάλινα φιαλίδια (bead vortexing method) όπως περιγράφεται από τους Giaouris και Nychas (2006)²⁶³.

Υλικά

Μεταλλικές επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα- κουπόνια, διαστάσεων 7.2 cm x 2.0 cm x 0.3 cm

Θρεπτικά υποστρώματα

- Brain Heart Infusion broth (BHI; OXOID, Milan, Italy)
- Brain Heart Infusion agar (OXOID, Milan, Italy)
- OXFORD (OXOID, Milan, Italy)
- ALOA (Harlequin™ Listeria Chromogenic Agar, LAB).

RINGER -Ρυθμιστικό διάλυμα

Δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου (falcon tubes) χωρητικότητας 50 ml

Γυάλινα σφαιρίδια (beads) που χρησιμοποιούνται για την αποκόλληση των προσκολλημένων μικροοργανισμών.

Γυάλινες πιπέτες Pasteur, αυτόματες πιπέτες, αποστειρωμένα ρύγχη, τρυβλία Petri, αποστειρωμένη λαβίδα

αποστειρωμένα ποτήρια ζέσεως, φύλλα αλουμινίου

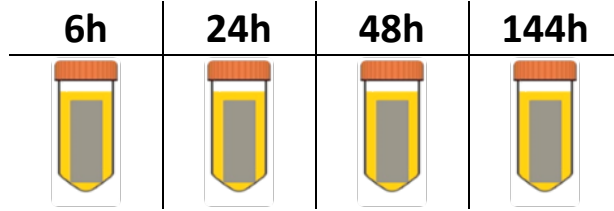
Vortex, Θάλαμος επώασης

Πειραματική πορεία

- Σε κάθε δειγματοληψία (μετά από 6, 24, 48, 144 ώρες) κάθε κουπόνι απομακρυνόταν με προσοχή από το δοκιμαστικό σωλήνα στον οποίο ήταν εμβαπτισμένο με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας.
- Εκπλενόταν 2 φορές με συνολικά 50 ml αποστειρωμένο διάλυμα Ringer με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας (25x2=50 ml) και πάντα κοντά σε φλόγα από λύχνο Bunsen, για την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων και του θρεπτικού μέσου.
- Μεταξύ των 2 εκπλύσεων, κάθε κουπόνι τοποθείτο για 5 λεπτά μέσα σε αποστειρωμένο ποτήρι ζέσεως με 5 ml διάλυμα Ringer.

-
- Μετά τη δεύτερη έκπλυση, τα κουπόνια εισάγονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 15 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και 10 γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 5 mm.
 - Οι δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν τα κουπόνια, το Ringer και τα σφαιρίδια στροβιλίζονταν σε vortex στη μέγιστη ταχύτητα για 2 λεπτά, ώστε να αποκολληθούν τα βιοϋμένια.
 - Ο προσδιορισμός του πληθυσμού των αποκολλημένων βιοϋμενικών κυττάρων που βρίσκονταν πλέον σε αιώρηση στο διάλυμα Ringer έγινε με την τεχνική της επιφανειακής εξάπλωσης (spread plate technique). Ποσότητα 100 μl από την κατάλληλη δεκαδική αραιώση επιστρωνόταν σε τρυβλία BHI agar και OXFORD.
 - Ακολουθούσε επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 24 (έως 48) ώρες και καταμέτρηση των αποικιών. Στο **Σχήμα 15** απεικονίζεται το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για τον σχηματισμό βιοϋμενίων από τα 12 στελέχη της *L. monocytogenes*.

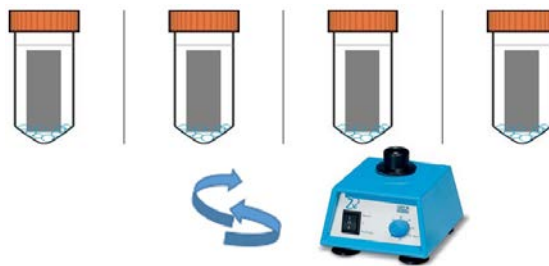
Ενοφθαλμισμός 400μl
υγρής καλλιέργειας σε
40 ml BHI broth και
επάωση στους 37°C για:



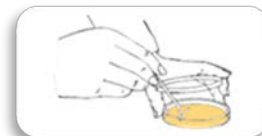
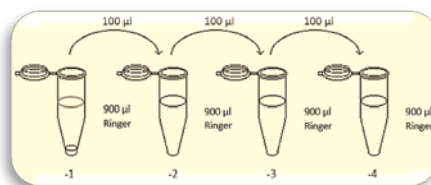
Έκπλυση κουπονιού με
50 ml Ringer (1η πλύση
με 25 ml-αναμονή 5 min-
2η πλύση με 25 ml
Ringer)



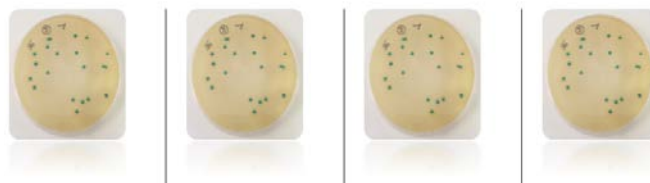
Τοποθέτηση σε falcon με
15 ml Ringer + 10
αστεριωμένα beads
και vortex για 2min



Δεκαδικές αραιώσεις και
επίστρωση σε τρυβλία
ALOA



Προσδιορισμός με την
κλασική μέθοδο
απαρίθμησης αποικιών
κατόπιν επάωσης στους
37°C για 48 ώρες



Σχήμα 15. Σχηματική απεικόνιση του πρωτοκόλλου που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη βιοϋμενίων.

4.3.4 Προσδιορισμός καλλιεργήσιμων κυττάρων

Η διαδικασία για τη μέτρηση των βακτηριακών κυττάρων αφορά κύτταρα τα οποία βρίσκονται σε εναιώρημα. Η διαδικασία αυτή, στην περίπτωση των βιοϋμενικών κυττάρων πρέπει να τροποποιηθεί ώστε ο πληθυσμός τους να αποκολληθεί από τις επιφάνειες στις οποίες αναπτύσσονται (bead vortexing method), να αραιωθεί, να διασπαρεί (streaking) έτσι ώστε τελικά να μπορεί να καταμετρηθεί. Ελήφθη υπόψιν ο αριθμός των αποικιών στα τρυβλία που κυμαινόταν από 30 έως 300 αποικίες. Ο αριθμός των αποικιών πολλαπλασιαζόταν κάθε φορά με την κατάλληλη αραιώση και τον όγκο του ενοφθαλμίσματος, έτσι προέκυπτε ο αριθμός των κυττάρων σε (CFU/ml). Οι μικροβιακοί πληθυσμοί που προέκυψαν, μετατράπηκαν σε CFU/cm² και κατόπιν σε δεκαδικούς λογαρίθμους, ώστε τα αποτελέσματα τελικά να εκφραστούν σε log₁₀ (CFU/cm²). Το όριο της ανίχνευσης ήταν <1 log₁₀ (CFU/ml) ή <0.64 log₁₀ (CFU/cm²).

4.4 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης έναντι βιοϋμενίων που αναπτύσσονται σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα

Ορισμένα στελέχη του *L. monocytogenes* είναι γνωστό ότι παραμένουν με τη μορφή βιοϋμενίων στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων για μεγάλες χρονικές περιόδους, ακόμη και για περισσότερο από 10 χρόνια^{264,265}. Τα βιοϋμενικά κύτταρα της *L. monocytogenes* έχει αποδειχθεί ότι είναι πολύ περισσότερο ανθεκτικά σε συνθήκες στρες και στα μέσα εξυγίανσης από ότι τα πλαγκτονικά κύτταρα^{266,267,268}.

Τις τελευταίες δεκαετίες η χρήση του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης επεκτείνεται σε πλήθος εφαρμογών και αυτό οφείλεται κυρίως στην ανάπτυξη των εκκενώσεων σε διηλεκτρικό φράγμα (DBD) που επιτρέπουν την παραγωγή εκκενώσεων σε ατμοσφαιρική πίεση. Πρόσφατες έρευνες επιβεβαιώνουν τη συμβολή του ψυχρού πλάσματος στην αδρανοποίηση βακτηρίων^{269,270,271,272,273}. Ωστόσο οι μελέτες αυτές έχουν αποδείξει την αποτελεσματικότητα του πλάσματος για τη θανάτωση πλαγκτονικών μικροοργανισμών ενώ οι αναφορές εφαρμογής του για την αδρανοποίηση βιοϋμενίων είναι συγκριτικά λιγότερες^{274,275,276,277}.

Έχοντας κατανοήσει τις επιπτώσεις της παρουσίας των βιοϋμενίων στις βιομηχανίες τροφίμων (βλέπε Κεφάλαιο 2) και έχοντας αντλήσει πληροφορίες μέσω βιβλιογραφικών αναφορών για την καινοτόμο τεχνολογία ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης (Cold Atmospheric Plasma, CAP) η οποία έχει αρχίσει σχετικά πρόσφατα να εφαρμόζεται στο Τομέα των Τροφίμων (π.χ. συσκευασία τροφίμων, συντήρηση τροφίμων), επιχειρείται στη μελέτη αυτή η διερεύνηση της ανθεκτικότητας των βιοϋμενίων κατόπιν της επεξεργασίας τους με πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης.

Εξετάζεται η επίδραση του πλάσματος *in vitro*, ώστε να διερευνηθεί εκτενέστερα η δράση του πλάσματος επάνω σε μεταλλικές επιφάνειες όπου δύναται να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν ζώντες μικροοργανισμοί.

Η επεξεργασία με πλάσμα πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο SaniLab του Τεχνολογικού Πάρκου “Tecno granda S.p.a.” το οποίο ειδικεύεται στην επεξεργασία συσκευασίας τροφίμων εφαρμόζοντας την καινοτόμο τεχνολογία απολύμανσης με ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης. Το εργαστήριο διαθέτει το όργανο AcXys Plasma Jet U.L. 120 του οποίου τα χαρακτηριστικά και η αρχή λειτουργίας παρουσιάζονται στο **Παράρτημα II**.

Εκτενέστερη αναφορά των γνωρισμάτων της τεχνολογίας του πλάσματος έγινε στο **Κεφαλαίο 3**.

4.4.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Η μελέτη για τη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης στην απομάκρυνση και εξουδετέρωση των βιοϋμενίων από τις επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα πραγματοποιήθηκε σε 3 πειραματικά στάδια. Κατόπιν της έκθεσης των βιοϋμενίων στο πλάσμα, τα κουπόνια μεταφέρονταν στο μικροβιολογικό εργαστήριο του Πανεπιστημίου για τις περαιτέρω πειραματικές διεργασίες.

Στη συνέχεια του κεφαλαίου θα παρουσιαστεί το κάθε ερευνητικό στάδιο χωριστά. Επιπλέον, παρατίθενται σχηματικά διαγράμματα των διαδικασιών που ακολουθήθηκαν κατά περίπτωση (**Σχήματα 16,19,20**).

4.4.2 Επιλογή βακτηριακών στελεχών

Έπειτα από την αξιολόγηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίων των 12 μελετηθέντων στελεχών, 3 από αυτά (**Πίνακας 9**) επιλέχθηκαν ώστε να χρησιμοποιηθούν στις πειραματικές διαδικασίες που θα αναλυθούν στη συνέχεια. Τα 3 αυτά στελέχη παρουσίασαν μεταξύ τους διαφορετικά προφίλ σχηματισμού βιοϋμενίου.

Πίνακας 9. Βακτηριακά στελέχη *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν στα 3 ερευνητικά στάδια.

Στέλεχος	Κωδικός στελέχους	Ορότυπος	Προέλευση
EGDe	EGDe	1/2a	Στέλεχος συλλογής
3	3	3c	Προϊόν κρέατος
36	36	1/2a	Προϊόν κρέατος

4.4.3 Ερευνητικά στάδια

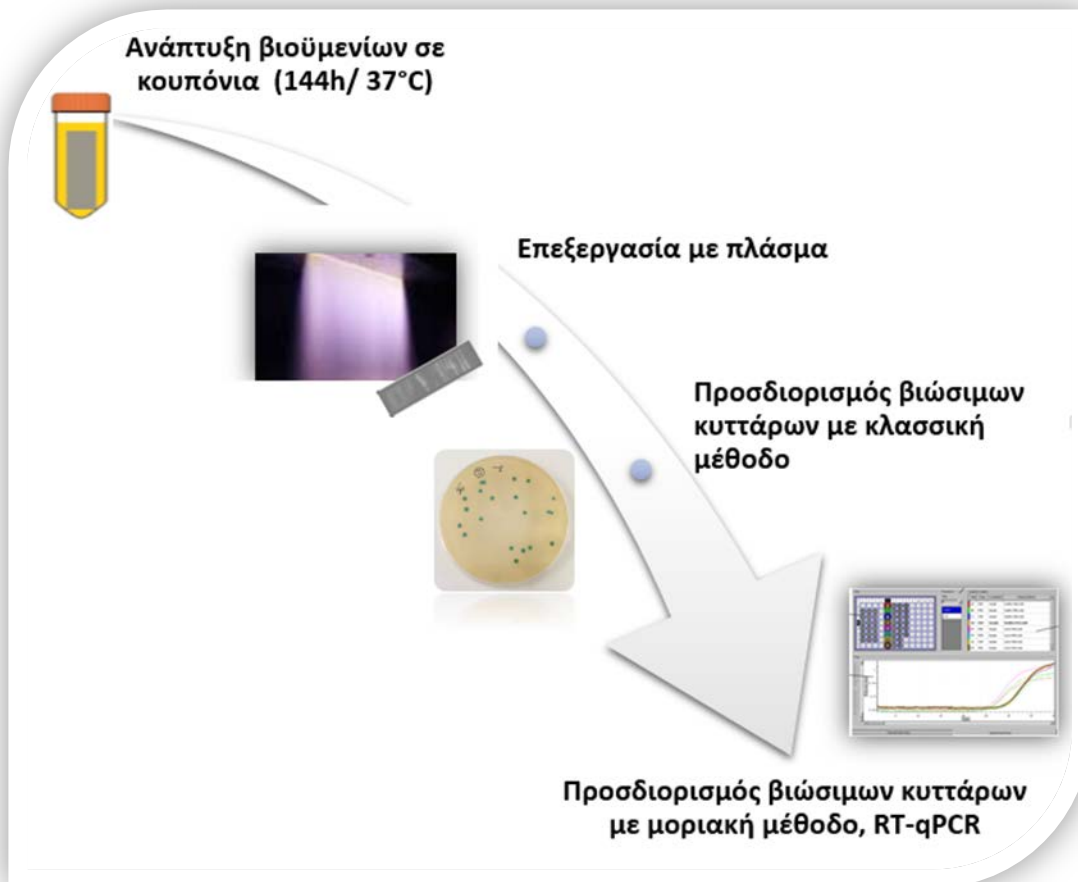
1^ο Ερευνητικό Στάδιο

Σε πρώτο στάδιο τέθηκε ως στόχος η αξιολόγηση της επίδρασης ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης που δημιουργείται από εκκενώσεις διηλεκτρικού φράγματος σε άζωτο στην αδρανοποίηση βιοϋμενίων στις επιφάνειες των κουπονιών όπου κύτταρα αφήνονταν να αναπτυχθούν για 6 ημέρες στους 37 °C.

Αρχικά, στελέχη αφέθηκαν να σχηματίσουν βιοϋμένια για 6 ημέρες και κατόπιν εκτέθηκαν σε συνθήκες ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης. Στο τέλος προσδιορίστηκε ο αριθμός των επιζώντων μικροοργανισμών τόσο με κλασική όσο και με μοριακή μέθοδο απαρίθμησης μικροοργανισμών.

Η αποτελεσματικότητα του πλάσματος ως μέσο εξάλειψης βακτηρίων έχει καθιερωθεί να προσδιορίζεται μετρώντας τις μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU) των καλλιεργειών που έχουν υποστεί επεξεργασία με πλάσμα. Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται ο αριθμός των κυττάρων που είναι ικανά να επιβιώνουν και να αναπτύσσουν αποικίες κατόπιν της επεξεργασίας τους με πλάσμα, πάνω στην επιφάνεια του θρεπτικού υποστρώματος εντός του τρυβλίου. Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτής της προσέγγισης βασίζονται σε βιώσιμα κύτταρα ικανά να αναπτύσσουν αποικίες και δεν λαμβάνονται υπόψη τα κύτταρα που θα μπορούσαν να είναι ακόμα ζωντανά, αλλά όχι ικανά να αναπτύσσουν αποικίες στο θρεπτικό υπόστρωμα των τρυβλίων (VBNC- viable but nonculturable).

Για το λόγο αυτό πέραν της κλασικής μεθόδου απαρίθμησης μικροβιακού φορτίου μέσω διαδοχικών αραιώσεων, ανιχνεύτηκε η ύπαρξη βιώσιμων κυττάρων και με τη μοριακή μέθοδο RT-qPCR (αντίστροφη μεταγραφή-αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου).



Σχήμα 16. Σχηματική απεικόνιση των πειραματικών διεργασιών που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του πλάσματος στο 1ο ερευνητικό στάδιο.

4.4.3.1 Διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων

Από στερεές καλλιέργειες υπό ασηπτικές συνθήκες, έγινε ενοφθαλμισμός μίας μεμονωμένης αποικίας κάθε στελέχους σε 2 ml αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα BHI broth και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 24 ώρες. Την επόμενη μέρα, για κάθε στέλεχος προετοιμάστηκαν 7 δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml (falcons). Τοποθετήθηκαν 7 αποστειρωμένα κουπόνια ξεχωριστά με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας στα falcons και προστέθηκαν στο καθένα 40 ml BHI broth. Έγινε ενοφθαλμισμός 400 μl από την υγρή καλλιέργεια ηλικίας 24 ωρών (συγκέντρωσης 10^8 CFU/ml) στα 40 ml BHI broth, σε κάθε ένα falcon και ακολούθησε επώαση στους 37°C χωρίς ανάδευση και χωρίς ανανέωση του θρεπτικού μέσου για 6 ημέρες.

4.4.3.2 Επεξεργασία κουπονιών με πλάσμα

Μετά την παρέλευση των 144 ωρών (6 ημέρες) τα κουπόνια μεταφέρθηκαν από τους σωλήνες προσεκτικά με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας και εκπλύθηκαν με διάλυμα Ringer ώστε να απομακρυνθούν τα ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα και το θρεπτικό μέσο στο οποίο είχαν εμβαπτιστεί. Στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε έως αυτό το σημείο και για τα 7 κουπόνια κάθε στελέχους. Κατόπιν το ένα κουπόνι χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (control coupon) στο οποίο δεν εφαρμόστηκε πλάσμα ενώ τα υπόλοιπα 6 κουπόνια υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πλάσμα σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και διαφορετικές τιμές παροχής ισχύος υπό στείρες συνθήκες. Συγκεκριμένα κάθε κουπόνι μεταφερόταν προσεκτικά (με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας) επάνω σε γυάλινο τρυβλίο Petri (**Παράρτημα IV, Εικ.9**) και κατόπιν τοποθετείτο καταλλήλως κάτω από την πηγή του πλάσματος (**Παράρτημα IV, Εικ.13**). Εφαρμόστηκαν για κάθε στέλεχος 6 διαφορετικές συνθήκες.

Κάθε κουπόνι στο οποίο ολοκληρωνόταν η επεξεργασία με πλάσμα (γινόταν επεξεργασία και στις 2 επιφάνειες του μετάλλου τηρώντας τις ίδιες ακριβώς συνθήκες στη κάθε πλευρά) απομακρυνόταν από τη συσκευή πλάσματος υπό στείρες συνθήκες και τοποθετείτο σε αποστειρωμένο falcon που περιείχε 40 ml διαλύματος Ringer (6 κουπόνια + κουπόνι μάρτυρας).

4.4.3.3 Δημιουργία και συνθήκες πλάσματος

Η «κουρτίνα» πλάσματος που παράγεται από τον αντιδραστήρα AcXys Plasma Jet U.L. 120 (**Παράρτημα II**) με ροή αζώτου 120 l/min είχε πλάτος 120 mm και πάχος 2 mm, τα δε κουπόνια τοποθετούνταν σε απόσταση 2 mm κάτω από την πηγή του πλάσματος με τη βοήθεια κατάλληλου οργάνου. (**Παράρτημα IV, Εικ. 10 και 14**). Ο χρόνος παραμονής του κάθε κουπονιού εντός του θαλάμου όπου παραγόταν το πλάσμα και οι τιμές ισχύος εισόδου του αερίου στο χώρο αυτό παρουσιάζονται στον **Πίνακα 9**.

4.4.3.4 Προσδιορισμός της θερμοκρασίας

Πριν την έναρξη της διαδικασίας, αποστειρωμένα κουπόνια εκτέθηκαν σε πλάσμα ώστε να ελεγχθεί και να σταθεροποιηθεί η θερμοκρασία που αναπτύσσεται στο θάλαμο επεξεργασίας στους 35°C. Για να αποκλειστεί η επίδραση της θερμοκρασίας στην αδρανοποίηση του βιοϋμενίου, μετρούνταν η θερμοκρασία του ιονισμένου αερίου που έφτανε στην επιφάνεια του κάθε κουπονιού. Ένα θερμόμετρο ήταν τοποθετημένο εντός του θαλάμου ώστε η θερμοκρασία να παρακολουθείται και να καταγράφεται μία φορά ανά λεπτό διασφαλίζοντας έτσι ότι ο παράγοντας θερμοκρασία δεν είναι υπεύθυνος για τη θανάτωση των βιοϋμενίων.

Πίνακας 9. Συνθήκες πλάσματος που εφαρμόστηκαν σε κάθε στέλεχος.

Δείγμα	Συνθήκες			
	Αριθμός συνθήκης	Χρόνος (min)/πλευρά κουπονιού	Ισχύς (Watt)	Συχνότητα (KHz)
Κουπόνι μάρτυρας	(δεν εφαρμόστηκε πλάσμα)			
Κουπόνι Νο 1	<u>1^η συνθήκη</u>	10	1154	142
Κουπόνι Νο 2	<u>2^η συνθήκη</u>	10	741	151
Κουπόνι Νο 3	<u>3^η συνθήκη</u>	10	431	159
Κουπόνι Νο 4	<u>4^η συνθήκη</u>	2	1154	142
Κουπόνι Νο 5	<u>5^η συνθήκη</u>	2	741	151
Κουπόνι Νο 6	<u>6^η συνθήκη</u>	2	431	159

4.4.3.5 Προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων και βιοϊμενικών κυττάρων που επιβίωσαν μετά την επεξεργασία με πλάσμα με την κλασική μέθοδο απαρίθμησης καλλιεργήσιμων κυττάρων (μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης-spread plate technique)

Μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας με πλάσμα, τα κουπόνια μεταφέρθηκαν στον χώρο του εργαστηρίου όπου πραγματοποιήθηκε η μέθοδος μηχανικής απόξεσης με γυάλινα σφαιρίδια (όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 4.3.3). Ελαιωρήματα από τις δεκαδικές αραιώσεις επιστρώθηκαν σε τρυβλία που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα ALOA για τον προσδιορισμό των βιώσιμων κυττάρων μετά από 48 ώρες επώασης στους 37°C.

4.4.3.6 Μελέτη της ικανότητας επιβίωσης των στελεχών *L.monocytogenes* στα κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα μετά από την επεξεργασία των βιοϊμενίων τους με πλάσμα όπως καθορίζεται από τη μοριακή μέθοδο Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR)

Για την εκτέλεση της RT-qPCR, 1 ml από το διάλυμα Ringer κάθε δείγματος στο οποίο βρίσκονταν εν αιωρήσει τα αποκολληθέντα κύτταρα από κάθε κουπόνι

μεταφέρθηκε σε erpendorf. Τα erpendorfs φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στους 4 °C στα μέγιστα rpm (13.200 rpm). Το υπερκείμενο διάλυμα αφαιρέθηκε και στα pellet προστέθηκαν 110 μl RNA later (Ambion) για την σταθεροποίηση και προστασία του RNA των κυττάρων μέχρις ότου αυτά χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του RNA. Τα erpendorfs αποθηκεύτηκαν στους -32 °C.

I. Προετοιμασία για την RT-qPCR

• Απομόνωση Ολικού RNA

Υλικά

Λυσοζύμη (50 mg/ml) Lysozyme from shicken egg white, 50.000 units/mg protein, SIGMA-ALDRICH)

Πρωτεΐνάση K (50 mg/ml, Sigma, MILAN, Italy)

MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre Madison, WI, USA)

DNase Buffer Turbo- DNase (Ambion, Foster City, CA, USA)

πιπέτες και ρύγχι πιπετών με υδρόφοβο φίλτρο

Φυγόκεντρος (Centrifuge 5415 R, Eppendorf)

Thermomixer compact (Eppendorf)

Vortex

Ισοπροπανόλη

Αιθανόλη 70%

Οι συνθήκες κάτω από τις οποίες γινόταν η απομόνωση του RNA, ήταν τέτοιες που ελαχιστοποιούσαν τον κίνδυνο επιμόλυνσης με εξωγενές RNA. Τα αναλώσιμα και οι πιπέτες ήταν αποκλειστικής χρήσης για RT και qPCR.

Πειραματική πορεία

Για την απομόνωση του RNA χρησιμοποιήθηκε το MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit (Epicentre Madison, WI, USA) ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή, με ορισμένες τροποποιήσεις. Για την ελαχιστοποίηση της ύπαρξης προσμίξεων ποσοτήτων DNA που θα παρεμπόδιζαν την επακόλουθη αντίστροφη μεταγραφή (RT-PCR) χρησιμοποιήθηκε κατά την επεξεργασία του τελικού προϊόντος η Turbo- DNase της Ambion (Foster City, CA, USA). Η παρουσία εναπομείναντος DNA στο τελικό προϊόν εκχύλισης (RNA) εκτιμήθηκε με qPCR. Σε

περίπτωση θετικών σημάτων, μια δεύτερη κατεργασία διεξαγόταν με προσθήκη επιπλέον ποσότητας Turbo- DNase.

Συνοπτικά τα βήματα που ακολουθήθηκαν βάσει πρωτόκολλου για την απομόνωση του RNA είναι τα εξής (**Σχήμα 17**).

• **1) Αφαίρεση του διαλύματος RNA later**

• Τα pellets με το RNA later εξήχθησαν από την κατάψυξη, αφέθηκαν να ξεπαγώσουν, φυγοκεντρήθηκαν για 5 λεπτά στους 4°C στα μέγιστα rpm (13.200 rpm) και κατόπιν απομακρύνθηκε το υπερκείμενο με χρήση πιπέτας.

• **2) Διαδικασία εκχύλισης του RNA**

• Προστέθηκαν 50 μl λυσοζύμης (50 mg/ml) και έγινε ανάδευση σε vortex για μερικά δευτερόλεπτα.

• Τα σωληνάρια errendorf τοποθετήθηκαν στη συνέχεια στο Thermomixer για 30 λεπτά στους 37 °C στα 1400 rpm.

• Κατόπιν προστέθηκαν 300 μl από το “Tissue cells and lysis solution” και 20 μl πρωτεΐνης K (50 mg/ml) και αναδεύτηκαν σε vortex για λίγα δευτερόλεπτα.

• Τα σωληνάρια αφού τοποθετήθηκαν στο Thermomixer για 15 λεπτά στους 65 °C στα 1400 rpm, μεταφέρθηκαν σε πάγο για 5 λεπτά.

• Προστέθηκαν έπειτα 150 μl “MPC Protein” και έγινε ανάδευση.

• Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα μέγιστα rpm.

• Το υπερκείμενο εισήχθη σε νέο αποστειρωμένο errendorf στο οποίο προστέθηκαν 500 μl ισοπροπανόλης. Έγινε ανάμειξη χειροκίνητα (40 φορές ήπια αναστροφή) και

• φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στους 4 °C στα μέγιστα rpm.

• Η ισοπροπανόλη αφαιρέθηκε και ακολούθησε έκπλυση 2 φορές με 100 μl αιθανόλης 70%, με ήπια χειροκίνητη ανάμειξη (2 φορές ήπια αναστροφή) προσέχοντας να μην αποκολληθεί το pellet. Αφού απορρίφθηκε η αιθανόλη,

• τα σωληνάρια φυγοκεντρήθηκαν για 2 λεπτά στα μέγιστα rpm ώστε στη συνέχεια να αφαιρεθεί η μικροποσότητα αιθανόλης που είχε παραμείνει με τη χρήση πιπέτας και χωρίς να έρθει το ρύγχος σε επαφή με το pellet.

• Τα σωληνάρια αφέθηκαν ανοιχτά.

• Σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 35 μl διαλύματος DNase I που περιείχε 3.5 μl DNase Buffer, 3 μl Turbo-DNase και 28,5 H₂O (δισ απεσταγμένο).

• Τα δείγματα επώαστηκαν για 3 ώρες στο Thermomixer στους 37°C στα 300 rpm.

Σχήμα 17. Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA.

- **Έλεγχος καθαρότητας RNA**

Έλεγχος καθαρότητας του RNA πραγματοποιείται με qPCR με ανάλυση της ακολουθίας της περιοχής του 16S rRNA γονιδίου για κάθε δείγμα. Σε περίπτωση θετικών σημάτων, μια δεύτερη κατεργασία διεξαγόταν με προσθήκη επιπλέον ποσότητας Turbo-DNAse και επανέλεγχο με εκτέλεση qPCR.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών, η σύνθεση του μείγματος (Master mix) και οι συνθήκες της αντίδρασης παρουσιάζονται στην παράγραφο § Χρήση ζεύγους ειδικών εκκινητών IGS 1/ IGS 2 (specific primers for *Listeria monocytogenes*.

- **Ποσοτικοποίηση του RNA**

Πριν την πραγματοποίηση των αντιδράσεων Αντίστροφης Μεταγραφής, RT-PCR, προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του RNA που είχε απομονωθεί από τα δείγματα φωτομετρικά με χρήση του νανοφωτόμετρου (Nanodrop, Spectrophotometer ND-1000), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 4.2.1. (Παράρτημα III).

II. Ποσοτική PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR) (Reverse Transcription-real time Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR)ⁱⁱ για την ανίχνευση του 16S ριβοσωμικού RNA

Εφαρμόστηκε η μοριακή τεχνική RT-qPCR που αποτελεί συνδυαστική τεχνική PCR αντίστροφης μεταγραφής και PCR πραγματικού χρόνου. Η αντίδραση έλαβε χώρα σε δύο βήματα. Η αντίστροφη μεταγραφή και η qPCR πραγματοποιήθηκαν σε ξεχωριστά σωληνάρια σε διαφορετικές συνθήκες, με διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα και διαφορετικούς εκκινητές.

Γενικά η RT-PCR είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης για την ενίσχυση τμήματος RNA. Ωστόσο επειδή οι θερμοάντοχες πολυμεράσες που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της βασικής PCR απαιτούν ένα εκμαγείο DNA, τα δείγματα RNA μεταγράφηκαν αρχικά στα συμπληρωματικά τους DNA (cDNA) μέσω του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση, με βάση το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στη συνέχεια.

Όλα τα διαλύματα των αντιδράσεων PCR παρασκευάστηκαν στο θάλαμο κάθετης νηματικής ροής. Τα αναλώσιμα και οι πιπέτες ήταν αποκλειστικής χρήσης

ⁱⁱ **RT-qPCR:** Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription-real time Polymerase Chain Reaction), συνδυαστική τεχνική RT-PCR και qPCR.

RT-PCR: Αντίστροφη μεταγραφή-Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Reverse transcription polymerase chain reaction)

qPCR: Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real-time polymerase chain reaction)

για RT και qPCR. Το πρωτόκολλο για τη σύνθεση του cDNA παρουσιάζεται στο **Σχήμα 18**.

1^ο Βήμα: Αντίστροφη Μεταγραφή (Σύνθεση cDNA)

Εντός του
θαλάμου
κάθετης
νηματικής ροής

• Προετοιμασία

- Σε μικρά σωληνάρια (PCR tubes, χωρητικότητας 0.2 ml) προστέθηκε από 1 μl Random Primers 10X (AB).
- Σε erpendorf (χωρητικότητας 1.5 ml) παρασκευάστηκε το Reverse Transcription Master Mix (**Πίνακας 10**) για (n+1) αντιδράσεις, όπου n= ο αριθμός των δειγμάτων RNA και τοποθετήθηκε στον πάγο.

Εκτός του
θαλάμου
κάθετης
νηματικής ροής

- 9 μl RNA μεταγράφηκαν αντίστροφα σε τελικό όγκο αντίδρασης 25 μl. Συγκεκριμένα:
- **1)Σύνθεση της πρώτης αλυσίδας του cDNA με αντίστροφη μεταγραφή**
 - Για κάθε δείγμα ποσότητα 9 μl RNA προστέθηκαν σε σωληνάριο (χωρητικότητας 0.2 ml) το οποίο περιείχε 1 μl Random Primers 10X (AB).(ελαφρύ χτύπημα με το δάχτυλο).
 - Το μείγμα επώαστηκε στους 72°C για 5 λεπτά (εντός θερμικού κυκλοποιητή) και αμέσως μετά το σωληνάριο τοποθετήθηκε απευθείας σε πάγο όπου και παρέμεινε για 5 λεπτά.
- **2)Σύνθεση δεύτερης αλυσίδας του cDNA**
 - 15 μl από το Reverse Transcription Master Mix προστέθηκαν σε κάθε σωληνάριο, έγινε ήπια ανάδευση και ακολούθησε επώαση σε θερμικό κυκλοποιητή για την ολοκλήρωση της αντίδρασης (**Πίνακας 11**).
 - Μετά την επώαση, τα δείγματα cDNA αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους - 32°C μέχρι να χρησιμοποιηθούν για την αντίδραση qPCR.

Σχήμα 18. Σύνθεση cDNA.

Πίνακας 10. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή του Reverse Transcription Master mix

Αντιδραστήρια	Όγκος για κάθε δείγμα (μl)
M-MLV RT 5X Buffer (Promega, Milan, Italy)	5
dNTPs (10 mM από κάθε νουκλεοτίδιο dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	5
RNAse Inhibitor (40 U/μl)	0.6
M-MLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1
H ₂ O (for PCR, Nuclease-free)	3.4
<u>Όγκος</u>	<u>15 μl</u>
Random Primers 10X	+ 1 μl
Δείγμα RNA	+ 9 μl
<u>Τελικός όγκος</u>	<u>= 25 μl</u>

Πίνακας 11. Οι συνθήκες στο θερμικό κυκλοποιητή κατά την αντίδραση RT-PCR για παραλαβή του τελικού προϊόντος cDNA.

Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
25	10 min
42	50 min
4	Διαρκώς (Hold)

Το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση χρησιμοποίησε το απομονωμένο RNA ως υπόστρωμα για να συνθέσει το cDNA. Παρήχθησαν έτσι υβριδικά μόρια cDNA-RNA και στη συνέχεια καταστράφηκε η αλυσίδα RNA. Το γονίδιο-στόχος εντοπίζεται πλέον στο cDNA. Τα cDNA δείγματα, χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (qPCR).

2^ο Βήμα: qPCR – Ενίσχυση του cDNA

Για την ποσοτικοποίηση του πληθυσμού των βιώσιμων κυττάρων μελετήθηκαν οι περιοχές IGS και 16S όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια.

- Χρήση ζεύγους ειδικών εκκινητών IGS 1/ IGS 2 (specific primers for *Listeria monocytogenes*)

Εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο που προτείνουν οι Rantsiou και συν. (2007)²⁷⁸ με σκοπό την ανίχνευση, την ποσοτικοποίηση και τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων των τριών στελεχών *L. monocytogenes* κατόπιν της επεξεργασίας των κουπονιών στα οποία είχαν αναπτυχθεί βιοϋμένια 6 ημερών με πλάσμα.

Εκκινητές

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές IGS 1 (5'-GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA-3') και IGS 2 (5'-GCTGAGCTAAGGCCCCCGTAAA -3') που στόχευαν στη 16S-23S διαγονιδιακή περιοχή.


Σχεδιασμός και προετοιμασία της αντίδρασης

Ο τελικός όγκος της αντίδρασης που έλαβε χώρα στο Chromo4 Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD, Milan, Italy) ήταν 20 μl.

- Αφού αποψύχθηκαν το SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix και οι 2 εκκινητές, παρασκευάστηκε Master mix εντός του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής για (n+3) αντιδράσεις καθώς πέραν των δειγμάτων n, χρησιμοποιήθηκαν και 2 μάρτυρες (θετικός μάρτυρας: cDNA γνωστού στελέχους και αρνητικός μάρτυρας: περιείχε ποσότητα Master mix, χωρίς τη προσθήκη cDNA) (**Πίνακας 12**).

Πίνακας 12. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή του Master Mix για την qPCR με χρήση ειδικών εκκινητών.

Αντιδραστήρια	Όγκος για κάθε δείγμα (μl)
SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix	10
IGS 1 (forward)	1
IGS2 (reverse)	1
H ₂ O (for PCR, Nuclease-free)	7
Δείγμα cDNA	1
Τελικός όγκος	20 μl



• Σε

ερpendorf χωρητικότητας 1,5 ml προστέθηκαν όλα τα συστατικά εκτός του δείγματος cDNA (μήτρα της αντίδρασης).

- Έγινε ανάμειξη ώστε να διασφαλιστεί η ομοιογένεια του μείγματος και κατόπιν αυτό διανεμήθηκε σε ίσες ποσότητες των 19 μl στα PCR σωληνάρια.
- Εκτός του θαλάμου κάθετης νηματικής ροής προστέθηκαν τα δείγματα cDNA και τα pcr tubes σφραγίστηκαν με επίπεδα πώματα. Έγινε φυγοκέντρηση για λίγα δευτερόλεπτα (με φυγόκεντρο πάγκου με στροφέα για σωληνάρια αντίδρασης 0,2 ml/0,5 ml, με δυνατότητα επίτευξης 10.000 rpm) για να εξασφαλιστεί η πλήρης ανάμειξη των συστατικών της αντίδρασης και η συλλογή του μείγματος της αντίδρασης στο κάτω μέρος των σωλήνων.
- Τα PCR tubes τοποθετήθηκαν στη συσκευή η οποία είχε συγχρονιστεί με το λογισμικό Opticon Monitor 3. Το πρωτόκολλο θερμοκρασιών παρουσιάζεται στον **Πίνακα 13**.

Πίνακας13. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης qRT-PCR.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	1 min	1
Ενίσχυση	95	5 sec	40
	56	30 sec	
Ανάλυση καμπύλης τήξης	Από 65°C στους 95°C με ανάγνωση κάθε 0.5°C/sec		
Διαρκώς (Hold)	4	5 sec	

- **Χρήση μη ειδικών εκκινητών 338f/ 518r για την περιοχή V3 του γονιδίου 16S rRNA (non specific primers)**

Η αντίδραση qPCR επαναλήφθηκε με χρησιμοποίηση μη ειδικών εκκινητών σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες εντός του θερμικού κυκλοποιητή. Οι εκκινητές 338f (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') και 518r (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3') στόχευαν στην ενίσχυση της περιοχής V3 του γονιδίου 16S rRNA.

Πίνακας 14. Βασικές ποσότητες αντιδραστηρίων για την παρασκευή του Master Mix για την qPCR με χρήση μη ειδικών εκκινήτων.

Αντιδραστήρια	Όγκος για κάθε δείγμα (μl)
SsoAdvanced universal SYBR Green Supermix	10
338f (forward)	1
518r (reverse)	1
H ₂ O (for PCR, Nuclease-free)	7
Δείγμα cDNA	1
Τελικός όγκος	<u>20 μl</u>

} 19μl

Πίνακας 15. Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης qRT-PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95	1 min	1
Ενίσχυση	95	5 sec	40
	62	30 sec	
Ανάλυση καμπύλης τήξης	Από 65°C στους 95°C με ανάγνωση κάθε 0.5°C/sec		
Διαρκώς (Hold)	4	5 sec	

4.4.3.6.1 Ανάλυση των αποτελεσμάτων

Το λογισμικό Qrticon Monitor 3 παρέχει τις γραφικές παραστάσεις πολλαπλασιασμού (amplification plot) καθώς και τις τιμές C_t για το σύνολο των δειγμάτων. Η γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού είναι η συνάρτηση του φθορισμού σε σχέση με τον αριθμό των κύκλων PCR. Οι τιμές του C_t καθορίζονται από τον κλασματικό αριθμό των PCR κύκλων, κατά τους οποίους το σήμα της χρωστικής είναι μεγαλύτερο από ένα ελάχιστο επίπεδο ανίχνευσης. Στη συνέχεια οι τιμές C_t των διαφόρων δειγμάτων χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της σχετικής ποσότητας του κάθε δείγματος.

4.4.3.6.2 Κατασκευή Πρότυπης καμπύλης

Για την ποσοτικοποίηση της βιωσιμότητας των στελεχών κατόπιν της επεξεργασίας τους με πλάσμα κατασκευάστηκε πρότυπη καμπύλη που υπολογίστηκε για το στέλεχος EGD_e με βάση 6 πρότυπα αραιωμένα διαλύματα.

Από καλλιέργεια ηλικίας 24 ωρών του στελέχους EGD_e σε BHI broth στους 37°C, μεταφέρθηκε από 1 ml σε 2 αποστειρωμένα erpendorf τα οποία φυγοκεντρήθηκαν για 10 λεπτά στα μέγιστα rpm και αφαιρέθηκε από αυτά το υπερκείμενο. Και στα δύο pellet προστέθηκε από 1 ml Ringer και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις με σκοπό:

- Από το 1^ο pellet: την επίστρωση σε τρυβλία και τον προσδιορισμό του πληθυσμού με την κλασσική μέθοδο (CFU)
- Από το 2^ο pellet: την απομάκρυνση του υπερκείμενου και την έναρξη της διαδικασίας απομόνωσης του RNA (και από τις 6 αραιώσεις) προκειμένου να πραγματοποιηθεί RT-qPCR.

Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης τα σήματα που παρήχθησαν (κατώφλι κύκλου, C_t) από τις διαδοχικές αραιώσεις του στελέχους EDG_e σε Ringer παρίστανται γραφικώς συναρτήσει του log₁₀ (CFU/ml). (βλέπε Κεφάλαιο 5. Αποτελέσματα)

2^ο Ερευνητικό Στάδιο

Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιήθηκαν κουπόνια τα οποία εκτέθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες πλάσματος αζώτου με σκοπό να διερευνηθεί αν οι ιδιότητες των επιφανειών των προεπεξεργασμένων κουπονιών δρουν ανασταλτικά στην προσκόλληση και την ανάπτυξη βιοϋμενίων. Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος 36. Στη διαδικασία συμπεριελήφθη ένα αποστειρωμένο κουπόνι-μάρτυρας το οποίο δεν είχε επεξεργαστεί με πλάσμα.

4.4.3.7 Επεξεργασία κουπονιών με πλάσμα

- **Προετοιμασία κουπονιών**

Αρχικά 6 κουπόνια πλύθηκαν σχολαστικά με απορρυπαντικό, ξεπλύθηκαν με νερό βρύσης και εν συνεχεία με απιονισμένο νερό, αφέθηκαν να στεγνώσουν και τυλίχθηκαν το καθένα ξεχωριστά σε φύλλο αλουμινίου ώστε να αποστειρωθούν στο αυτόκαυστο για 15 λεπτά στους 121°C. Κατόπιν τα κουπόνια μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο SaniLab για να εκτεθούν στην πηγή πλάσματος.

- **Συνθήκες πλάσματος**

Υπό ασηπτικές συνθήκες και με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας κάθε ένα κουπόνι παρέμεινε κάτω από την πηγή πλάσματος για ορισμένο χρονικό διάστημα και ορισμένη τιμή ισχύος. Οι συνθήκες παρουσιάζονται στον **Πίνακα 16**.

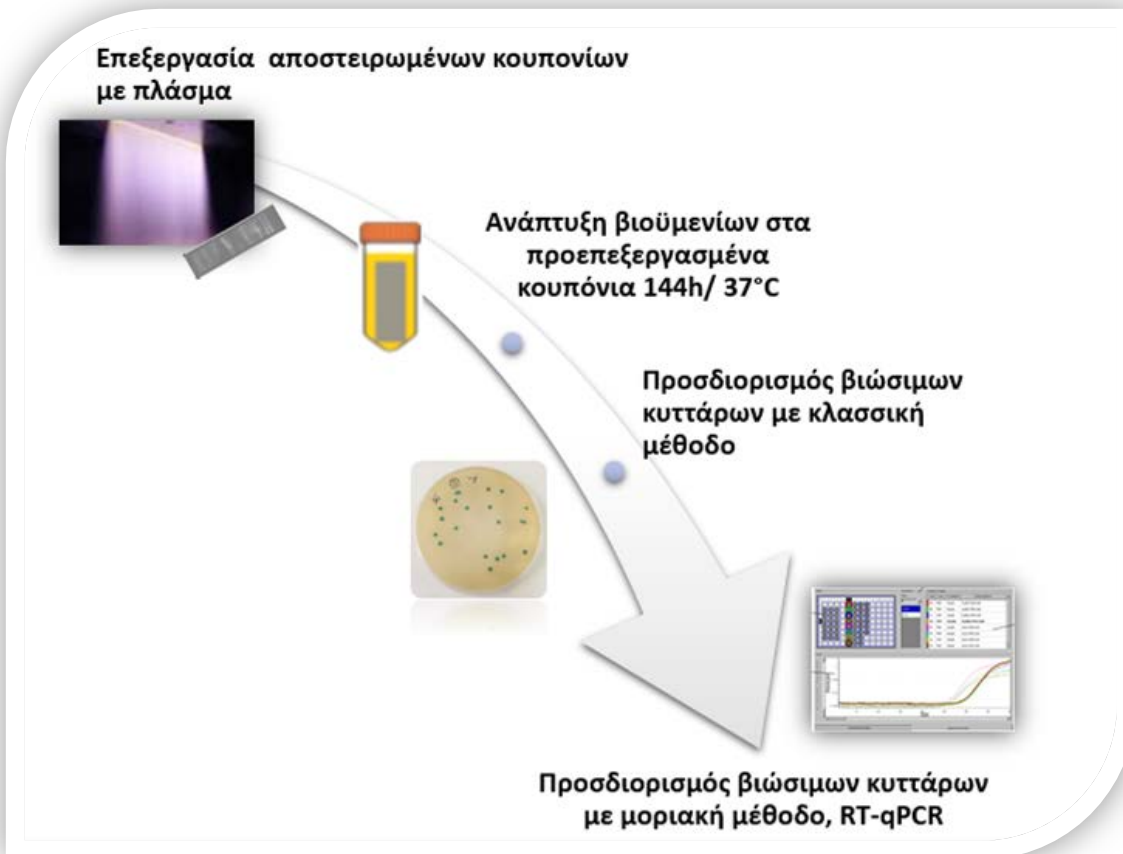
Πίνακας 16. Συνθήκες πλάσματος που εφαρμόστηκαν στα αποστειρωμένα κουπόνια.

Δείγμα	Συνθήκες			
	Χρόνος (min)/πλευρά κουπονιού	Ισχύς (Watt)	Συχνότητα (KHz)	T _{max} (°C)
Κουπόνι μάρτυρας	(δεν εφαρμόστηκε πλάσμα)			
Κουπόνι Νο 1	10	700	151	42
Κουπόνι Νο 2	5	705	151	42
Κουπόνι Νο 3	20	705	151	42
Κουπόνι Νο 4	5	431	159	30
Κουπόνι Νο 5	5	741	151	37
Κουπόνι Νο 6	5	1154	142	37

4.4.3.8 Διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων

Τα προεπεξεργασμένα κουπόνια τοποθετήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες και με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 40 ml BHI broth. Έγινε ενοφθαλμισμός με 400 μl υγρής καλλιέργειας ηλικίας 24 ωρών του στελέχους 36 και στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν στον επωαστικό θάλαμο στους 37°C για 6 ημέρες (144 ώρες).

Κατόπιν τα βήματα για τη μηχανική απόξεση (bead vortexing) και ο προσδιορισμός των βιοϋμενικών πληθυσμών πραγματοποιήθηκαν όπως περιγράφονται στο 1^ο ερευνητικό στάδιο.



Σχήμα 19. Σχηματική απεικόνιση των πειραματικών διεργασιών που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του πλάσματος στο 2^ο ερευνητικό στάδιο.

3^ο Ερευνητικό Στάδιο

Στο στάδιο αυτό μελετήθηκε η συμπεριφορά των πληθυσμών *L. monocytogenes* μετά την εφαρμογή πλάσματος επί των κουπονιών στα οποία είχαν αναπτυχθεί. Διερευνήθηκε αν βακτηριακοί πληθυσμοί οι οποίοι εκτέθηκαν και επιβίωσαν μετά την επεξεργασία με πλάσμα είναι ικανοί να «επανακάμψουν» και να πολλαπλασιαστούν ως βιοϋμενικοί πληθυσμοί ή στην πλαγκτονική τους μορφή.

4.4.3.9 Διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων

Στο πειραματικό αυτό στάδιο μελετήθηκαν τα στελέχη EGDc και 36. Η διαδικασία ανάπτυξης βιοϋμενίων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 4.3.2. Για κάθε στέλεχος προετοιμάστηκαν 5 δοκιμαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου των 50 ml (falcons). Τοποθετήθηκαν 5 αποστειρωμένα κουπόνια ξεχωριστά με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας στα falcons και προστέθηκαν στο καθένα 40 ml BHI broth. Έγινε ενοφθαλμισμός 400 μl από υγρή καλλιέργεια ηλικίας 24 ωρών (συγκέντρωσης 10^8 CFU/ml) στα 40 ml BHI broth και ακολούθησε επώαση στους 37°C χωρίς ανάδευση και χωρίς ανανέωση του θρεπτικού μέσου για 6 ημέρες.

4.4.3.10 Επεξεργασία κουπονιών με πλάσμα και συνθήκες πλάσματος

Μετά την παρέλευση των 144 ωρών (6 ημέρες) τα κουπόνια μεταφέρθηκαν από τα falcons προσεκτικά με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας και εκπλύθηκαν με διάλυμα Ringer ώστε να απομακρυνθούν τα ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα και το θρεπτικό μέσο στο οποίο είχαν εμβαιπιστεί. Στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιήθηκε έως αυτό το σημείο και για τα 5 κουπόνια κάθε στελέχους. Κατόπιν το ένα κουπόνι χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας (control coupon) στο οποίο δεν εφαρμόστηκε πλάσμα ενώ τα υπόλοιπα 4 κουπόνια υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με πλάσμα. Ο χρόνος παραμονής κάθε κουπονιού κάτω από την πηγή πλάσματος ήταν 10 λεπτά (για κάθε πλευρά του κουπονιού). Στα 2 κουπόνια εφαρμόστηκε πλάσμα χαμηλής ισχύος (431 Watt) ενώ στα άλλα δύο εφαρμόστηκε πλάσμα υψηλής ισχύος (1154 Watt). Η θερμοκρασία εντός του θαλάμου επεξεργασίας με πλάσμα καταγράφεται όπως περιγράφεται στη παράγραφο 4.4.3.4.

Τα κουπόνια 1, 2 και το 4 μετά την έκθεσή τους στο πλάσμα, τοποθετήθηκαν σε 40 ml Ringer και μεταφέρθηκαν στο μικροβιολογικό εργαστήριο για την περαιτέρω ανάλυση. Το κουπόνια 3 και 5 τοποθετήθηκαν σε επωαστικό κλίβανο και μετά την παρέλευση των 6 ημερών επώασης προσδιορίστηκε ο αριθμός των βιώσιμων κυττάρων με τη μέθοδο bead vortexing. Σε κάθε περίπτωση μετά τη μέθοδο bead vortexing, εναιωρήματα από τις δεκαδικές αραιώσεις επιστρώνονταν σε τρυβλία που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα ALOA για τον προσδιορισμό των βιώσιμων κυττάρων μετά απο 48 ώρες επώασης στους 37°C.

Στη συνέχεια, παρουσιάζεται η διαδικασία που εφαρμόστηκε για κάθε στέλεχος και οι συνθήκες πλάσματος που εφαρμόστηκαν σε κάθε κουπόνι:

1^ο κουπόνι:



**κουπόνι μάρτυρας
(control)**

Δεν εφαρμόστηκε καμία συνθήκη πλάσματος στο κουπόνι αυτό. Κατόπιν της έκπλυσης με Ringer τοποθετήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε 40 ml Ringer και μεταφέρθηκε στο μικροβιολογικό εργαστήριο για να ακολουθήσει η μέθοδος bead vortexing και ο προσδιορισμός των βιώσιμων κυττάρων μετρώντας τα CFU κατόπιν δεκαδικών αραιώσεων και επώασης στους 37°C για 48 ώρες.

2^ο κουπόνι:



Κατόπιν της έκπλυσης με Ringer, εφαρμόστηκε πλάσμα χαμηλής ισχύος (431 Watt/159 KHz) για 10 λεπτά σε κάθε πλευρά του κουπονιού. Κατόπιν το κουπόνι τοποθετήθηκε σε 40 ml Ringer και μεταφέρθηκε στο μικροβιολογικό εργαστήριο για την περαιτέρω επεξεργασία με bead vortexing και δεκαδικές αραιώσεις.

3^ο κουπόνι:



Εφαρμόστηκε ακριβώς η ίδια συνθήκη πλάσματος με αυτή του 2^{ου} κουπονιού, ωστόσο στη συνέχεια το κουπόνι αυτό τοποθετήθηκε (πάντα υπό ασηπτικές συνθήκες) σε falcon που περιείχε 40 ml BHI broth και μεταφέρθηκε στη συνέχεια στο μικροβιολογικό εργαστήριο όπου τοποθετήθηκε στο κλίβανο επώασης για 6 ημέρες στους 37°C.

Εφαρμόζοντας στο 3^ο κουπόνι ακριβώς τις ίδιες συνθήκες με αυτές που εφαρμόστηκαν στο 2^ο κουπόνι, στόχος ήταν να διαπιστωθεί αν κατόπιν της επεξεργασίας με πλάσμα υπήρχαν κύτταρα ικανά να αναπτύξουν ξανά βιοϋμενικούς πληθυσμούς μετά από 6 ημέρες επώασης, παρέχοντάς τους θρεπτικά συστατικά.

4^ο κουπόνι:



και

5^ο κουπόνι:

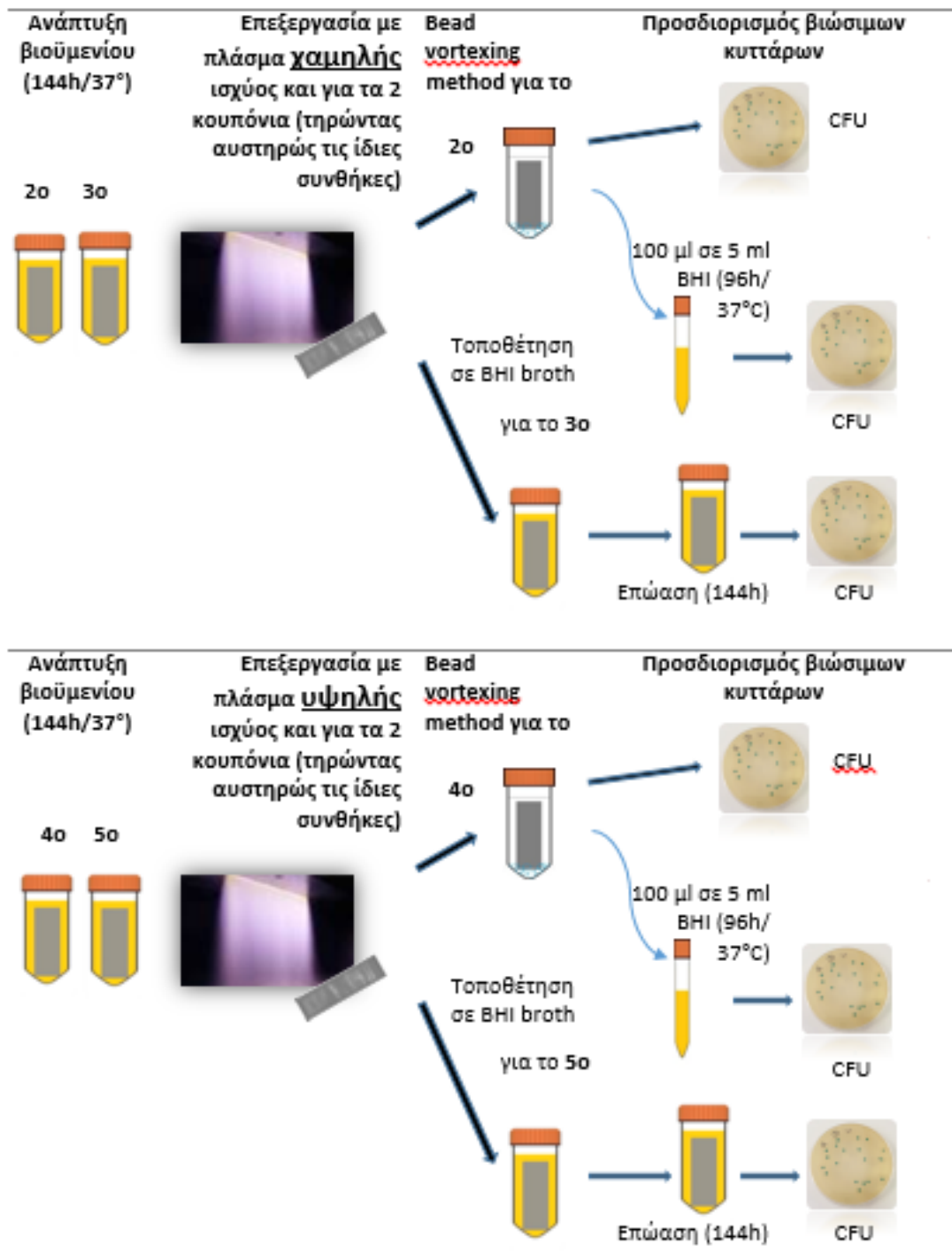


Η ίδια μεθοδολογία που τηρήθηκε για τα κουπόνια 2 και 3, εφαρμόστηκε και στην περίπτωση των κουπονιών 4 και 5 αλλά αυτή τη φορά επιλέχθηκε η επεξεργασία με πλάσμα υψηλής ισχύος (1154 Watt/142KHz) για 10 λεπτά στην κάθε πλευρά του κουπονιού. Στη συνέχεια το 4^ο κουπόνι τοποθετήθηκε σε 40 ml Ringer, ενώ το 5^ο κουπόνι τοποθετήθηκε σε 40 ml BHI broth.

Από το 1^ο, το 2^ο και το 4^ο κουπόνι κατόπιν της μηχανικής απόξεσης (bead vortexing) και πέραν των δεκαδικών αραιώσεων που πραγματοποιήθηκαν, λήφθηκαν επιπλέον 100 μl από τα 15 ml διαλύματος Ringer στο οποίο βρίσκονταν πιθανώς εναιωρήσει βιώσιμα αποκολληθέντα κύτταρα και τοποθετήθηκαν σε 5 ml BHI broth. Ακολούθησε επώαση για 96 ώρες (4 ημέρες) στους 37°C. Στη συνέχεια ακολούθησε η μέθοδος των δεκαδικών αραιώσεων, έγινε επίστρωση σε τρυβλία ALOA και επώαση στους 37°C για 48 ώρες. Σκοπός αυτής της διαδικασίας

ήταν να διερευνηθεί η ικανότητα καταπονηθέντων κυττάρων που πιθανόν έχουν επιζήσει κατόπιν της επεξεργασίας με πλάσμα, να αναπτύσσονται στην πλαγκτονική τους πλέον μορφή και να επιβιώνουν σε θρεπτικό υλικό.

Η πειραματική πορεία που περιγράφηκε, απεικονίζεται στο **Σχήμα 20**.



Σχήμα 20. Σχηματική απεικόνιση των πειραματικών διεργασιών που πραγματοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας του πλάσματος στο 3ο ερευνητικό στάδιο.

4.5 Στατιστική Ανάλυση

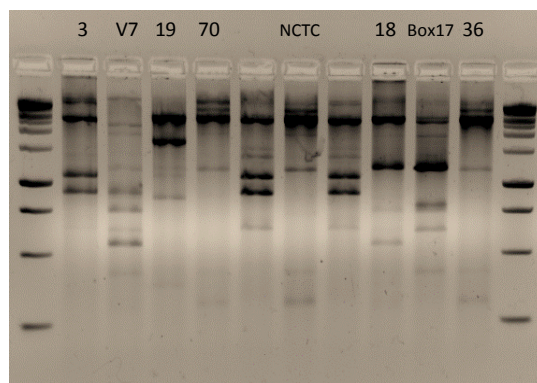
Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) κατά έναν παράγοντα και έλεγχο t (t-test) με χρήση του προγράμματος Microsoft Office Excel (Έκδοση 2013).

Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα και Συζήτηση

5.1 Αποτελέσματα της *ger*-PCR

Τα αποτελέσματα της *ger*-PCR παρουσιάζονται σε πηκτή αγαρόζης συγκέντρωσης 2 % w/v. Με την εκτέλεση της τεχνικής *ger*-PCR επιδιώχθηκε η αποτύπωση της γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ στελεχών *L. monocytogenes*, το οποίο και επιτεύχθηκε καθώς τα στελέχη σαφώς διαφοροποιήθηκαν (**Εικ.2**).



Εικόνα 2. Πηκτή αγαρόζης που απεικονίζει τα προϊόντα της *ger*-PCR. Στο πήκτωμα εμφανίζονται οκτώ από τα δώδεκα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν (Στελέχη: 3, V7, 19, 70, NCTC, 18, Box 17, 36). Οι υπόλοιπες ζώνες απεικονίζουν θραύσματα DNA άλλων στελεχών που δεν επιλέχθηκαν να μελετηθούν στην παρούσα εργασία, καθώς παρουσίασαν μη ικανοποιητική διαφοροποίηση μεταξύ τους. Στην πρώτη ζώνη απεικονίζεται ο μάρτυρας μοριακού βάρους 1kbp BenchTop Ladder.

5.2 *In vitro* σχηματισμός βιοϋμενίων από στελέχη του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα

Για τη διεξαγωγή των πειραματικών σταδίων που αποσκοπούσαν στη διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του πλάσματος έναντι βιοϋμενικών πληθυσμών *L. monocytogenes* ήταν απαραίτητη η διαπίστωση της ικανότητας των 12 μελετούμενων στελεχών να σχηματίζουν βιοϋμένια σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα. Από τα αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι όλα τα στελέχη έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται στις επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα, ενώ παρατηρήθηκε μεταβλητότητα ανάμεσα στα στελέχη όσον αφορά την ικανότητά τους να αναπτύσσουν βιοϋμενικούς πλυθυσμούς.

Μετά από 6 ώρες επώασης των μικροοργανισμών προς τον σχηματισμό βιοϋμενίων, παρατηρήθηκε πως όλα τα στελέχη είχαν αναπτύξει βιοϋμενικούς πληθυσμούς. Ανάμεσα στα στελέχη υπήρχε διακύμανση του πληθυσμού των βιοϋμενικών κυττάρων η οποία κυμαινόταν από 2.89 log₁₀ (CFU/cm²) (στέλεχος

EGDe) έως $5.86 \log_{10}$ (CFU/cm²) (στέλεχος V7) και κατά μέσο όρο ήταν ίση με $4.27 \log_{10}$ (CFU/cm²).

Στην περίπτωση των 24 ωρών επώασης υπήρχε επίσης διακύμανση των προσκολλημένων κυττάρων η οποία κυμαινόταν από $3.82 \log_{10}$ (CFU/cm²) (στέλεχος EGDe) έως $6.64 \log_{10}$ (CFU/cm²) (στέλεχος V7) και ήταν κατά μέσο όρο ίση με $5.07 \log_{10}$ (CFU/cm²). Οκτώ εκ των 12 στελεχών (στελέχη 19, 12vet, 18, Box 17, EGDe, V7, 3, 36) παρουσίασαν αύξηση των προσκολληθέντων κυττάρων μετά από 24 ώρες επώασης σε σχέση με τις 6 ώρες επώασης. Στα στελέχη 70 και Box 3, ο αριθμός των προσκολληθέντων κυττάρων παρέμενε πρακτικά σταθερός σε σχέση με τους αντίστοιχους πληθυσμούς που προέκυψαν μετά από 6 ώρες επώασης. Παρατηρήθηκε δηλαδή μόνο βακτηριακή προσκόλληση και όχι αύξηση των βιοϋμενικών πληθυσμών για τα 2 αυτά στελέχη.

Μετά από 48 ώρες επώασης διαπιστώνεται μείωση της ικανότητας των περισσότερων στελεχών να αναπτύσσουν βιοϋμένια. Το σύστημα στο οποίο μελετήθηκαν τα στελέχη ήταν ένα στατικό σύστημα μονοκαλλιέργειας στο οποίο δεν πραγματοποιείτο παροδική ανανέωση του θρεπτικού μέσου. Επιλέχθηκε στην παρούσα εργασία η μελέτη μονοκαλλιέργειας, καθώς είχε τεθεί ως στόχος η αξιολόγηση έκαστου στελέχους να προσκολλάται σε μια αβιοτική επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα. Η μείωση του πληθυσμού μετά από 48 ώρες επώασης πιθανόν να οφείλεται στη στατική φύση του συστήματος, δηλαδή στη μη συνεχή τροφοδοσία των μικροοργανισμών. Η εξάντληση των θρεπτικών υλικών και η απουσία αέρα πιθανόν να περιόρισαν τη δυνατότητα των στελεχών να πολλαπλασιαστούν περαιτέρω. Ο αριθμός των προσκολληθέντων κυττάρων του στελέχους 36 παρέμεινε στα ίδια επίπεδα μεταξύ των 24 και των 48 ωρών επώασης. Αύξηση κατά περίπου 2 λογάριθμους παρουσίασε το στέλεχος EGDe μεταξύ των 6 και 48 ωρών. Αυξημένη προσκόλληση παρατηρήθηκε και για τα στελέχη 3 και NCTC 10527.

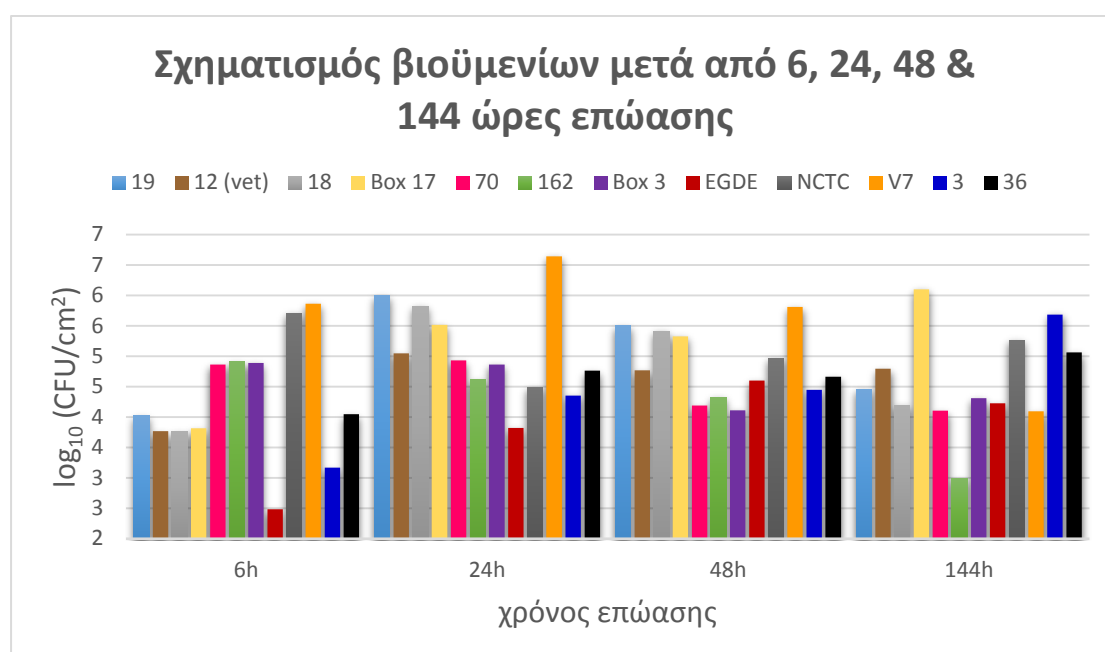
Μετά από 144 ώρες επώασης, αυξητική τάση ανάπτυξης βιοϋμενίου είχαν τα στελέχη 70, Box 3, NCTC 10527, 3, 36. Η διαστελεχιακή διακύμανση των προσκολληθέντων κυττάρων κυμαινόταν από $2.98 \log_{10}$ (CFU/cm²) (στέλεχος 162) έως $5.69 \log_{10}$ (CFU/cm²) (στέλεχος 3) με μέσο όρο $4.61 \log_{10}$ (CFU/cm²).

Για το στέλεχος 3 παρατηρήθηκε συνολικά μια αυξανόμενη τάση σχηματισμού βιοϋμενίων. Το στέλεχος EGDe παρουσίασε απότομη αύξηση των βιοϋμενικών πληθυσμών. Ενώ αρχικά, μετά από 6 ώρες επώασης η ανάπτυξη ήταν $2.49 \log_{10}$ (CFU/cm²) (η μικρότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα στελέχη), ο αριθμός των προσκολλημένων κυττάρων αυξήθηκε σταδιακά με πληθυσμό $4.60 \log_{10}$ (CFU/cm²) μετά από 48 ώρες επώασης.

Τα πειραματικά αυτά αποτελέσματα εξήχθησαν χρησιμοποιώντας καθαρές καλλιέργειες των μικροοργανισμών. Σύμφωνα με τους Bremer και συν. (2001), στελέχη της *L. monocytogenes* παρουσιάζουν μεγαλύτερη ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενικών πληθυσμών όταν καλλιεργούνται σε μεικτές καλλιέργειες²⁷⁹.

Επιπρόσθετα η μείωση που παρατηρείται είναι πιθανό να οφείλεται στον τύπο επιφάνειας που χρησιμοποιείται καθώς και στον τραυματισμό των κυττάρων κατά τη διαδικασία μηχανικής απόξεσης των βιοϋμενικών κυττάρων από τις επιφάνειες.

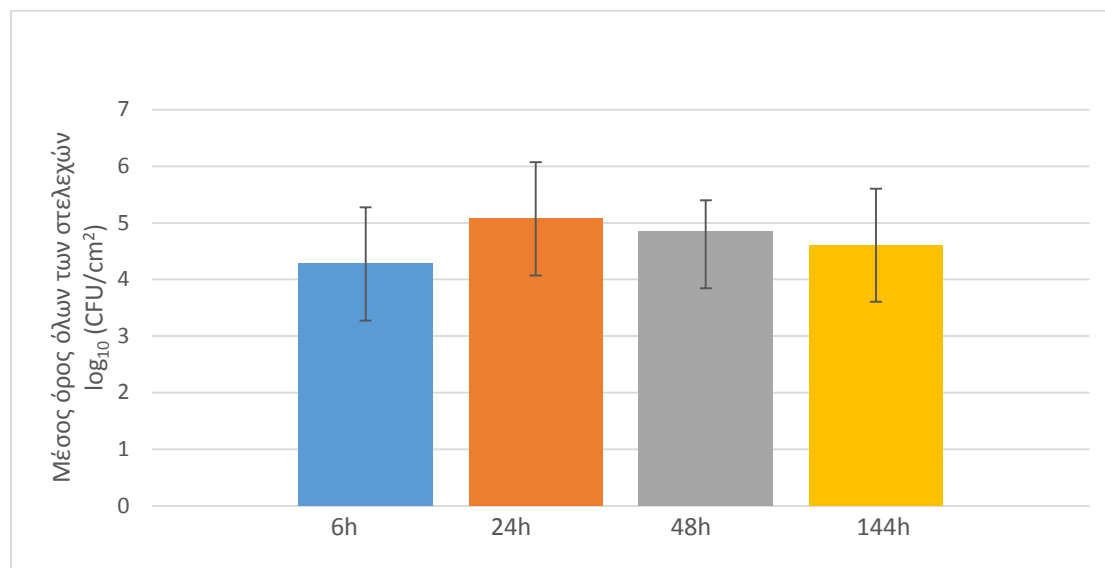
Είναι απαραίτητο να γίνουν περαιτέρω δοκιμές, ώστε να επιβεβαιωθεί η συμπεριφορά των στελεχών στον σχηματισμό βιοϋμενίων καθώς και η επίδραση της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων στην ικανότητα πολλαπλασιασμού τους. Σκοπός της μελέτης ήταν η δημιουργία ενός πρωτοκόλλου για τη διαπίστωση της ικανότητας των στελεχών διαφορετικής προέλευσης που διαθέτει το εργαστήριο να αναπτύσσονται σε βιοϋμένια. Το πρωτόκολλο αυτό, στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων που επεξεργάζονταν με πλάσμα. Η διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον σχηματισμό βιοϋμενίων από τα 12 αυτά στελέχη δεν αποτέλεσε στόχο της παρούσας μελέτης.



Γράφημα 1. Σύγκριση της ικανότητας ανάπτυξης βιοϋμενικών κυττάρων από τα 12 εξεταζόμενα στελέχη *L. monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα.

Έγινε ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του χρόνου στην ανάπτυξη των βιοϋμενίων. Δοκιμάστηκε η υπόθεση ότι οι μέσες τιμές των πληθυσμών των στελεχών είναι ίσες. Κατά συνέπεια, το αποτέλεσμα που προέκυψε από την ανάλυση αφορά τον συνολικό πληθυσμό *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα υπολογίστηκε ο μέσος όρος των λογαρίθμων όλων των στελεχών μετά τις 6, τις 24, τις 48 και τις 144 ώρες επώασης με σκοπό να διαπιστωθεί αν ο παράγοντας χρόνος επηρεάζει σημαντικά την ανάπτυξη των βιοϋμενικών πληθυσμών.

Σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης, δεν υπήρχε σημαντική επίδραση του χρόνου στην ανάπτυξη των βιοϋμενικών πληθυσμών στον συνολικό πληθυσμό *L. monocytogenes*. Μετά από 6 ώρες επώασης, παρατηρήθηκε μια αρχική προσκόλληση της τάξης των $4.3 \pm 1 \log_{10}$ (CFU/cm²). Στη συνέχεια μετά από 24, 48, 144 ώρες δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των βιοϋμενικών πληθυσμών (p -value= 0.11 > 0.05).



Γράφημα 2. Επίδραση του χρόνου στην ανάπτυξη βιοϋμενίων.

5.3 Διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης έναντι βιοϋμενίων που αναπτύσσονται σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα

Κατόπιν της αξιολόγησης της διαφορετικής συμπεριφοράς των στελεχών ως προς την ικανότητά τους να αναπτύξουν βιοϋμένια, επιλέχθηκαν για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης τα στελέχη EGDe, 3, 36. Τα στελέχη 3 και 36 παρουσίασαν μια αυξανόμενη ικανότητα προσκόλλησης με την πάροδο του χρόνου (6, 24, 48 και 144 ώρες επώασης) (**Γράφημα 1**), ενώ το στέλεχος EGDe επιλέχθηκε καθώς είναι από τα πλέον μελετημένα στελέχη. Για τα 3 αυτά στελέχη έγινε επιβεβαίωση της ικανότητας προσκόλλησης κάνοντας επανάληψη του πειράματος δύο φορές (όπως παρουσιάστηκε στην παράγραφο 4.3).

1^ο Ερευνητικό Στάδιο

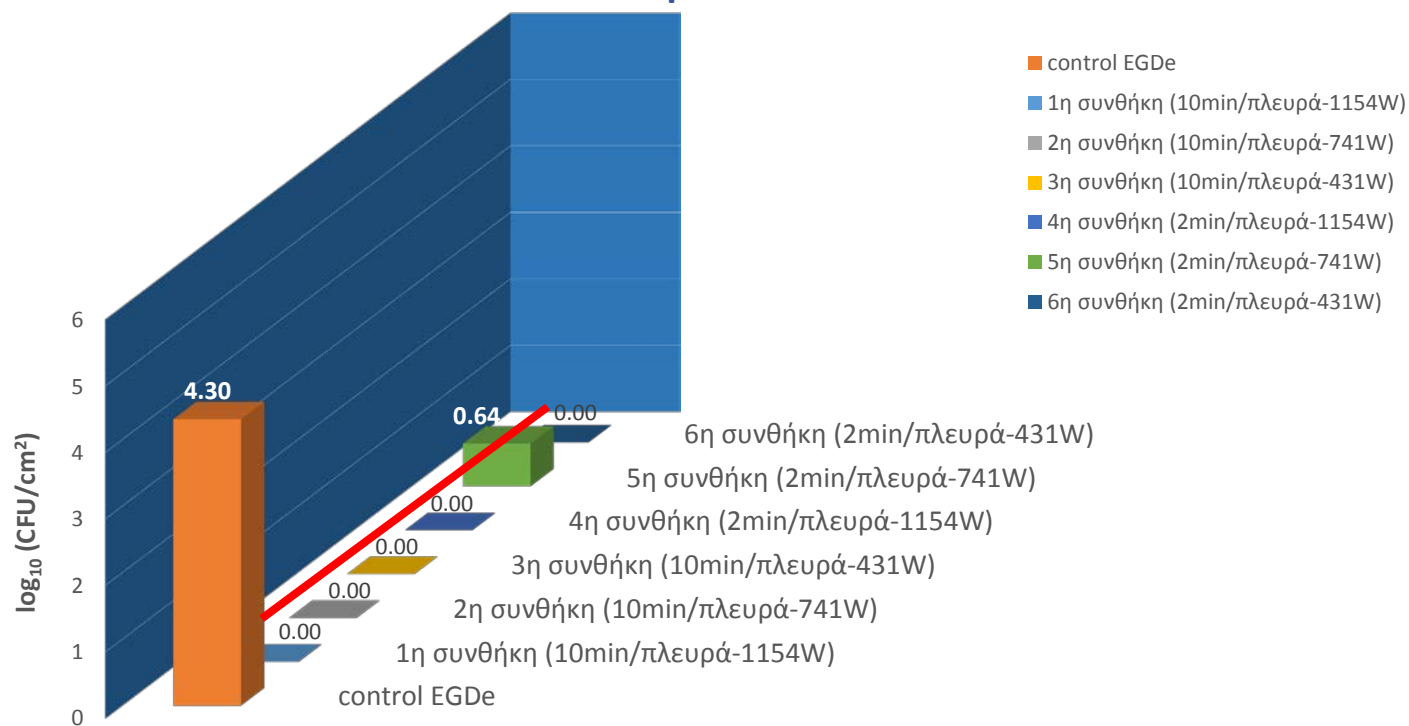
Για την αξιολόγηση της επίδρασης του πλάσματος επί των σχηματισθέντων βιοϋμενίων εξετάστηκαν 6 διαφορετικές συνθήκες ηλεκτρικής εκκένωσης N₂ (μεταβάλλοντας κάθε φορά την ισχύ και τη διάρκεια παραμονής του κουπονιού κάτω από την πηγή πλάσματος). Η μελέτη αυτή είχε ως στόχο να διερευνηθεί η επίδραση έκαστης συνθήκης και να εκτιμηθεί η πιο αποτελεσματική συνθήκη λειτουργίας του αντιδραστήρα πλάσματος έναντι των βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes*. Προκειμένου να ελεγχθεί ο βαθμός εξυγίανσης των κουπονιών στα οποία είχαν αναπτυχθεί βιοϋμένια, έγινε ποσοτικοποίηση των βιοϋμενικών πληθυσμών τόσο με την κλασσική μέθοδο των δεκαδικών αραιώσεων όσο και με τη μοριακή μέθοδο RT-qPCR.

5.3.1 Προσδιορισμός του πληθυσμού των προσκολλημένων και βιοϋμενικών κυττάρων που επιβίωσαν μετά την επεξεργασία με πλάσμα με την κλασσική μέθοδο απαρίθμησης καλλιεργήσιμων κυττάρων (μέθοδος επιφανειακής εξάπλωσης-spread plate technique)

Η εφαρμογή ψυχρού πλάσματος N₂ ατμοσφαιρική πίεσης επί των κουπονιών στα οποία είχαν αναπτυχθεί βιοϋμένια ηλικίας 6 ημερών, επέφερε συντριπτική μείωση των βιοϋμενικών πληθυσμών.

Για το στέλεχος EGDe: Σε όλες τις περιπτώσεις, ο πληθυσμός των βιοϋμενίων αυτού του στελέχους, ήταν σε επίπεδα χαμηλότερα του ορίου ανίχνευσης της μεθόδου καταμέτρησης των κυττάρων στα τρυβλία ALOA [$<1 \log_{10}$ (CFU/ml) ή $<0.64 \log_{10}$ (CFU/cm²)], με εξαίρεση την 5^η συνθήκη (2min-741W) όπου ο πληθυσμός βρέθηκε ίσος με το επίπεδο ανίχνευσης [$0.64 \log_{10}$ (CFU/cm²)].

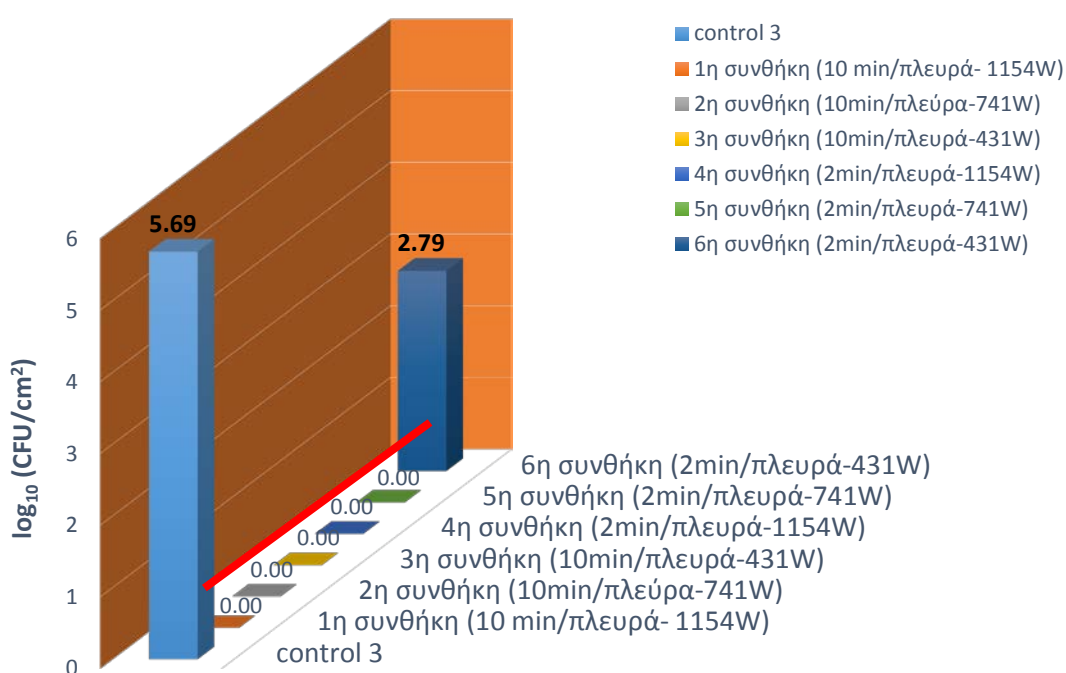
Πληθυσμοί του στελέχους EGDe κατόπιν επεξεργασίας των κουπονιών με ψυχρό πλάσμα



Γράφημα 3. Πληθυσμοί του στελέχους EGDe κατόπιν επεξεργασίας με πλάσμα.
Η κόκκινη γραμμή δηλώνει το όριο ανίχνευσης [0.64 log₁₀ (CFU/cm²)]

Για το στέλεχος 3: Σε όλες τις περιπτώσεις, ο πληθυσμός των βιοϋμενίων, ήταν σε επίπεδα χαμηλότερα του ορίου ανίχνευσης [$<1 \log_{10}$ (CFU/ml) ή $<0.64 \log_{10}$ (CFU/cm²)], με εξαίρεση την 6^η συνθήκη (2min-431W) όπου ο πληθυσμός βρέθηκε ίσος με το $2.79 \log_{10}$ (CFU/cm²). Έτσι συμπεραίνεται ότι οι πιο ήπιες συνθήκες πλάσματος (μικρότερος χρόνος παραμονής και μικρότερη ισχύς) δεν ήταν αποτελεσματικές ώστε να θανατώσουν τους βιοϋμενικούς πληθυσμούς.

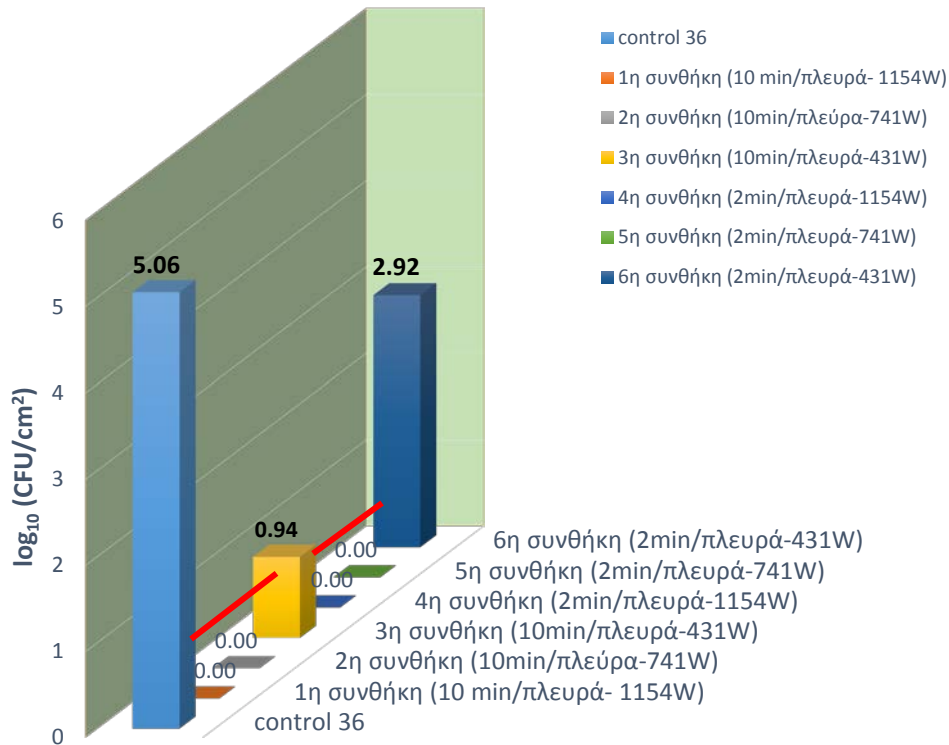
Πληθυσμοί του στελέχους 3 κατόπιν επεξεργασίας των κουπονιών με ψυχρό πλάσμα



Γράφημα 4. Πληθυσμοί του στελέχους 3 κατόπιν επεξεργασίας με πλάσμα. Η κόκκινη γραμμή δηλώνει το όριο ανίχνευσης ($0.64 \log_{10}$ (CFU/cm²)).

Για το στέλεχος 36: Η 3^η και η 6^η συνθήκη αποδείχτηκαν λιγότερο αποτελεσματικές στη θανάτωση των βιοϋμενίων του στελέχους αυτού, καθώς και στις δύο αυτές περιπτώσεις προέκυψαν αποικίες στα τρυβλία ALOA. Στην 3^η συνθήκη ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων ήταν λίγο μεγαλύτερος [$0.94 \log_{10}$ (CFU/cm²)] από το όριο ανίχνευσης $0.64 \log_{10}$ (CFU/cm²). Στις υπόλοιπες περιπτώσεις ο πληθυσμός των βιοϋμενίων, ήταν σε επίπεδα χαμηλότερα του ορίου ανίχνευσης [$<1 \log_{10}$ (CFU/ml) ή $<0.64 \log_{10}$ (CFU/cm²)].

Πληθυσμοί του στελέχους 36 κατόπιν επεξεργασίας των κουπονιών με ψυχρό πλάσμα



Γράφημα 5. Πληθυσμοί του στελέχους 36 κατόπιν επεξεργασίας με πλάσμα. Η κόκκινη γραμμή δηλώνει το όριο ανίχνευσης (0.64 log₁₀ (CFU/cm²)).

5.3.2 Μελέτη της ικανότητας επιβίωσης των στελεχών *L.monocytogenes* στα κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα μετά από την επεξεργασία των βιοϋμενίων τους με πλάσμα όπως καθορίζεται από τη μοριακή μέθοδο Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-qPCR)

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία που σχετίζεται με το πλάσμα και την καταπολέμηση των βιοϋμενίων, ένα από τα μειονεκτήματα της τεχνολογίας του πλάσματος που παρατηρείται είναι το γεγονός ότι μέχρι πρότινος η ικανότητα του πλάσματος ως βακτηριακός παράγοντας θανάτωσης εκτιμάτο με την κλασική μέθοδο απαρίθμησης αποικιών που σχηματίζονταν κατόπιν της επεξεργασίας των κουπονιών με πλάσμα. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται μόνο στην παρουσία των καλλιεργήσιμων κυττάρων και δε λαμβάνει υπόψιν το γεγονός ότι ορισμένα κύτταρα μπορεί να είναι ζωντανά αλλά μη ικανά να αναπτύξουν αποικίες σε τρυβλία κατόπιν της έκθεσής τους σε συνθήκες πλάσματος. Πρακτικά, κάτι τέτοιο

μπορεί να έχει καταστροφικές συνέπειες καθώς μικροοργανισμοί που θεωρούνται μη βιώσιμοι, στην περίπτωση που είναι παθογόνοι, μπορούν να διατηρήσουν τη μολυσματική ικανότητά τους ακόμη και όταν δεν είναι καλλιεργήσιμοι²⁸⁰. Μια ορθή αξιολόγηση θα πρέπει να περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας του βακτηριακού πληθυσμού.

Σύμφωνα πάλι με τη βιβλιογραφία, η αδρανοποίηση των βακτηριακών κυττάρων τα οποία έχουν εκτεθεί σε πλάσμα μπορεί να προβεί μέσα από ένα 1^ο στάδιο κατά το οποίο τα βακτηριακά κύτταρα εισέρχονται σε μια κατάσταση βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη (VBNC). Τα βακτήρια στην κατάσταση αυτή βρίσκονται σε «λήθαργο» λόγω ύπαρξης δυσμενών συνθηκών και χάνουν την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε στερεά θρεπτικά μέσα.

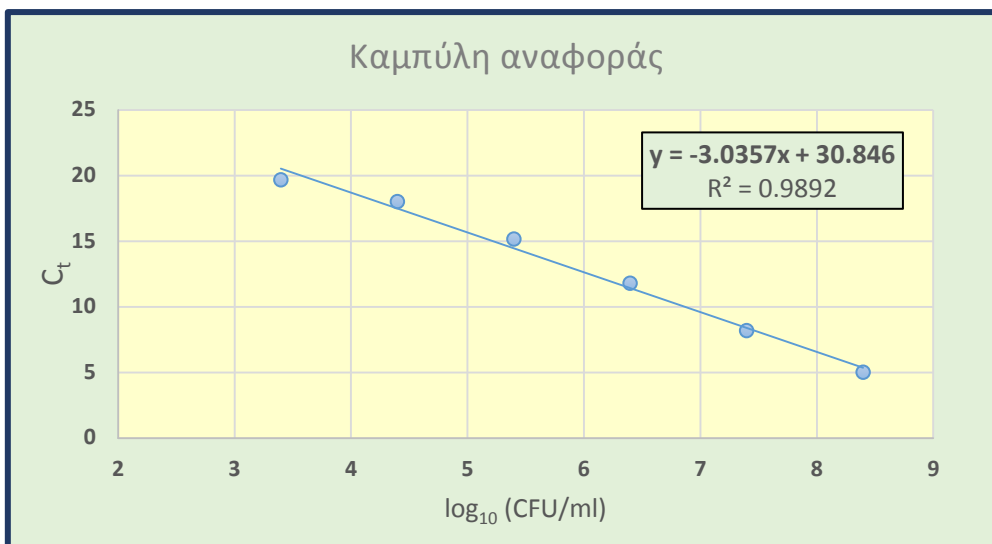
Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω, στην παρούσα μελέτη εκτιμήθηκε και ποσοτικοποιήθηκε η βιωσιμότητα του πληθυσμού των τριών στελεχών *L. monocytogenes*, μετά από την επεξεργασία με πλάσμα, με βάση τη μοριακή μέθοδο RT-qPCR.

Πρότυπη καμπύλη

Στον **Πίνακα 17** παρουσιάζονται οι δεκαδικοί λογάριθμοι του πληθυσμού του στελέχους EGDe κατόπιν 6 δεκαδικών αραιώσεων και οι αντίστοιχες τιμές C_t όπως προέκυψαν κατόπιν της αντίδρασης RT-qPCR.

Πίνακας 17. Δεδομένα για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς

<i>Αραίωση</i>	<i>log₁₀ (CFU/ml)</i>	<i>C_t</i>
-1	8.39794	4.97
-2	7.39794	8.16
-3	6.39794	11.76
-4	5.39794	15.12
-5	4.39794	17.99
-6	3.39794	19.65



Γράφημα 6. Καμπύλη αναφοράς (standard curve) που σχηματίστηκε από 6 διαδοχικές αραιώσεις του στελέχους EGDe.

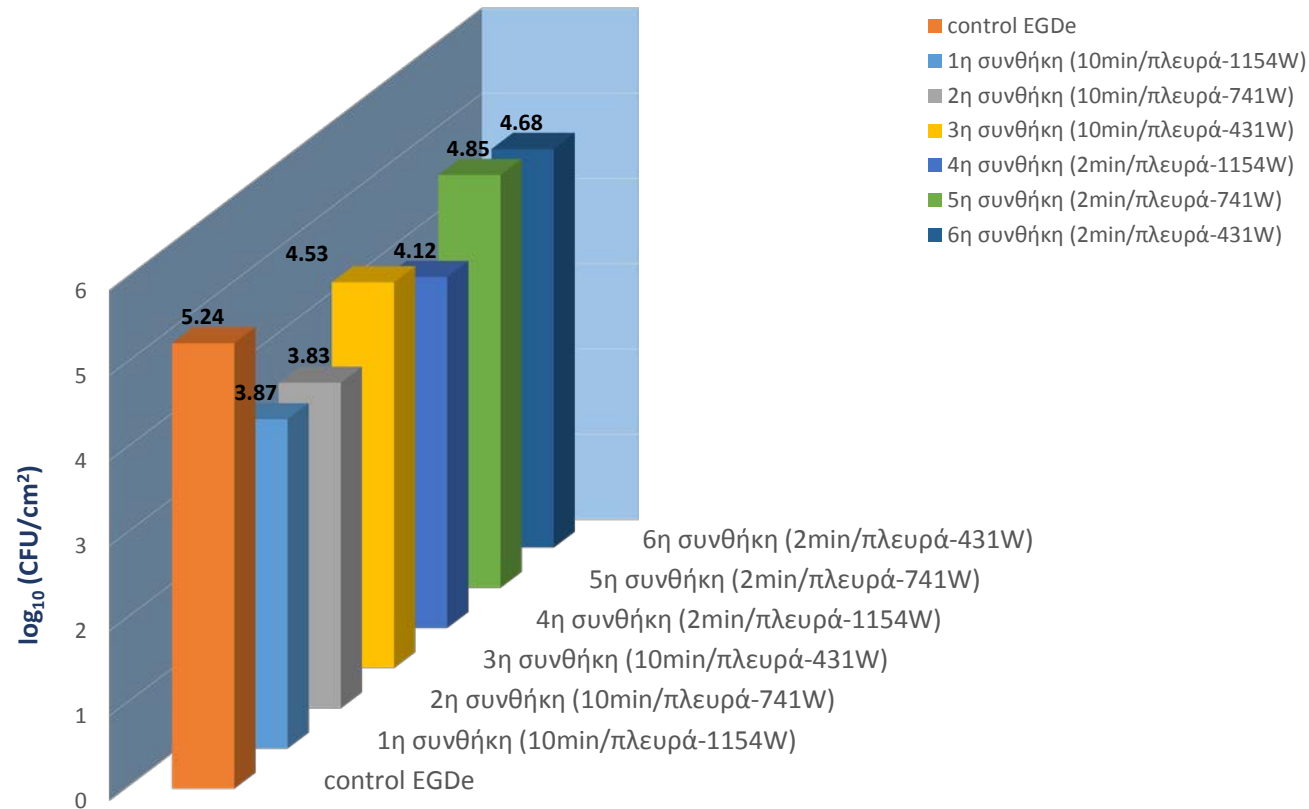
Καθώς οι πληθυσμοί είναι 10πλάσιες αραιώσεις, η θεωρητική κλίση της καμπύλης είναι $-3,32$. Μια κλίση μεταξύ $-3,0$ και $-3,9$ είναι αποδεκτή εφόσον το R^2 είναι $>0,95$. Ωστόσο μια τιμή για $R^2 >0,98$ είναι επιθυμητή για ακριβή αποτελέσματα²⁸¹. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας cDNA στο κάθε δείγμα, τόσο μικρότερη είναι η τιμή C_t του δείγματος και κατά συνέπεια τόσο νωρίτερα εμφανίζεται η τιμή αυτή στο λογισμικό Opticon Monitor 3²⁸².

Στην περίπτωση της πρότυπης καμπύλης για το IGS η τιμή R^2 βρέθηκε <0.98 για το λόγο αυτό η ποσοτικοποίηση του πληθυσμού υπολογίστηκε με βάση την πρότυπη καμπύλη του **Γραφήματος 6** για τη περιοχή V3.

Έγινε σύγκριση των τιμών C_t των πειραματικών δειγμάτων με αυτές της καμπύλης αναφοράς έτσι ώστε να ποσοτικοποιηθούν οι πληθυσμοί των άγνωστων δειγμάτων. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε $\log_{10}(\text{CFU/cm}^2)$.

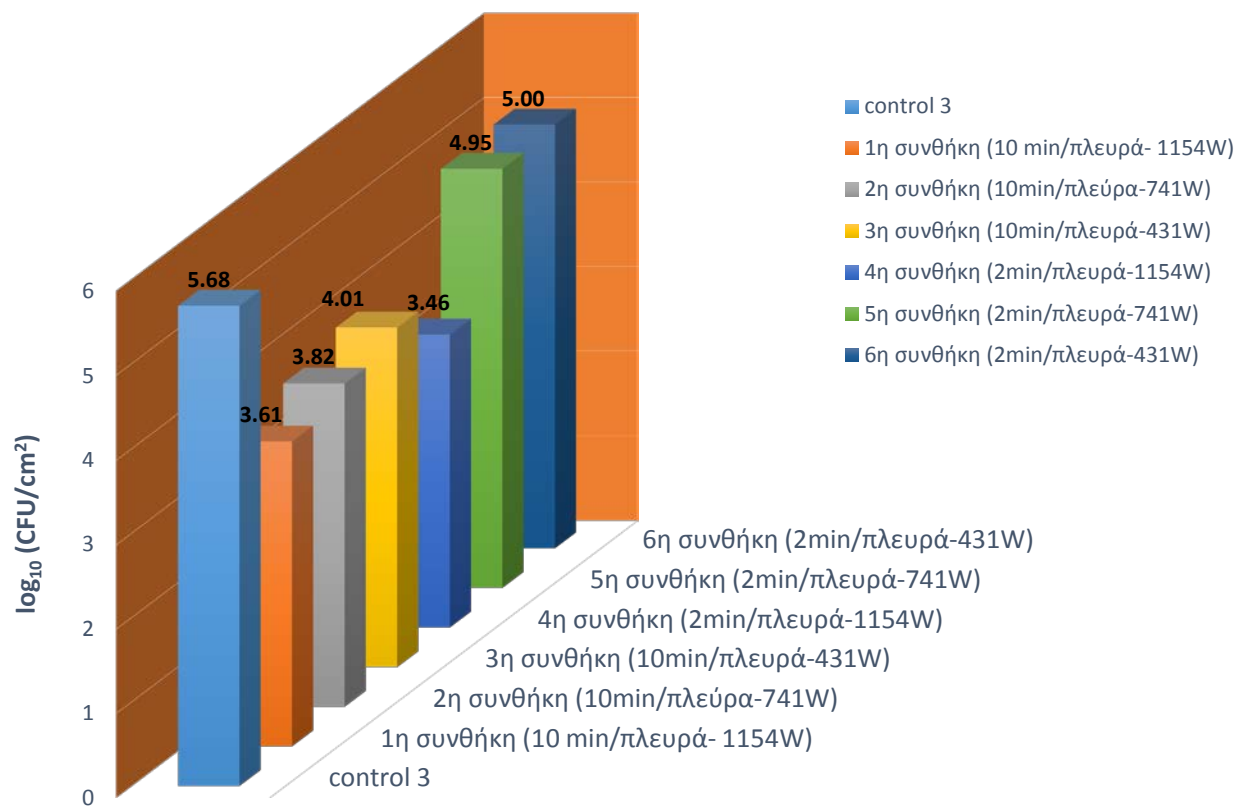
Στα Γραφήματα που ακολουθούν απεικονίζονται οι ποσοτικοποιημένοι πληθυσμοί όπως υπολογίστηκαν, σύμφωνα με την πρότυπη καμπύλη.

Στέλεχος EGDe: Πληθυσμός βιώσιμων κυττάρων κατόπιν επεξεργασίας των κουπονιών με ψυχρό πλάσμα



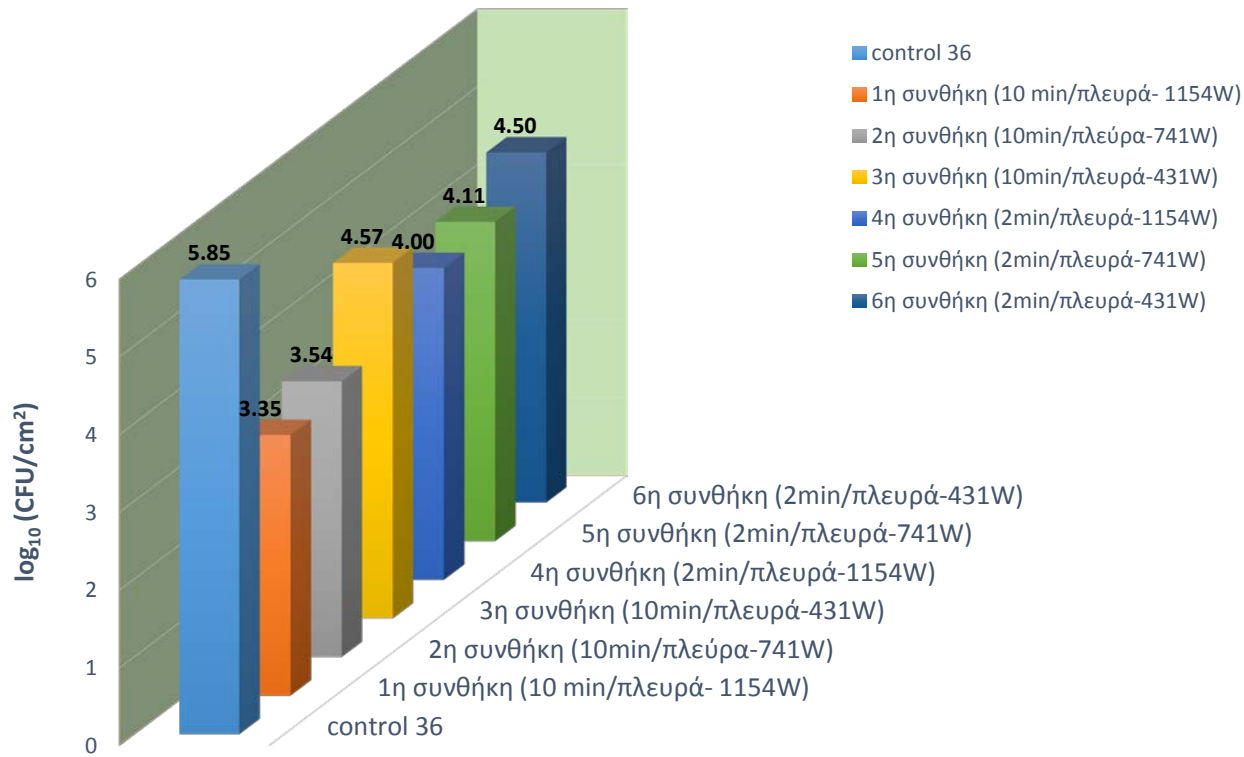
Γράφημα 7. Βιώσιμοι πληθυσμοί του στελέχους EGDe κατόπιν επεξεργασίας με πλάσμα.

Στέλεχος 3: Πληθυσμός βιώσιμων κυττάρων κατόπιν επεξεργασίας των κουπονιών με ψυχρό πλάσμα



Γράφημα 8. Βιώσιμοι πληθυσμοί του στελέχους 3 κατόπιν επεξεργασίας με πλάσμα.

Στέλεχος 36: Πληθυσμός βιώσιμων κυττάρων κατόπιν επεξεργασίας των κουπονιών με ψυχρό πλάσμα



Γράφημα 9. Βιώσιμοι πληθυσμοί του στελέχους 36 κατόπιν επεξεργασίας με πλάσμα.

Συγκρίνοντας τους πληθυσμούς που προέκυψαν μετά την ποσοτικοποίηση με βάση την καμπύλη αναφοράς και τους πληθυσμούς που προσδιορίστηκαν μέσω της κλασσικής μεθόδου (CFU) είναι εμφανές πως στην 1^η περίπτωση οι πληθυσμοί (εκφρασμένοι σε \log_{10} (CFU/cm²)) είναι μεγαλύτεροι σε σχέση με τους πληθυσμούς που προσδιορίστηκαν με την κλασσική μέθοδο. Στις περισσότερες συνθήκες πλάσματος που εφαρμόστηκαν οι πληθυσμοί που επιβίωσαν σύμφωνα με την κλασσική μέθοδο ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Αντίθετα οι τιμές C_t που εξήχθησαν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης qPCR δηλώνουν την παρουσία βιώσιμων πληθυσμών στις συνθήκες αυτές.

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα που ελήφθησαν μετά από την αντίδραση RT-qPCR με χρήση των εκκινητών 338f/ 518r που στόχευαν στην περιοχή V3 του γονιδίου 16S rRNA, μελετήθηκε η επίδραση των συνθηκών του πλάσματος στη μείωση των βιοϋμενικών πληθυσμών κάνοντας έλεγχο t δύο δειγμάτων με υποτιθέμενες άνισες διακυμάνσεις (t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances).

Συγκρίνοντας τους μέσους όρους των πληθυσμών που προέρχονται από τα κουπόνια-μάρτυρες των 3 μελετούμενων στελεχών με τους αντίστοιχους μέσους όρους των πληθυσμών που προέκυψαν εκτελώντας κάθε συνθήκη πλάσματος, παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές (P <0.05). Συμπεραίνεται έτσι ότι όλες οι συνθήκες πλάσματος που εφαρμόστηκαν επέφεραν μείωση των πληθυσμών σε σχέση με τους πληθυσμούς των κουπονιών που δεν εκτέθηκαν σε κάποια συνθήκη πλάσματος (κουπόνια μάρτυρες). Η λογαριθμική μείωση και οι τιμές P όπως προέκυψαν από τον έλεγχο t παρατίθενται στον **Πίνακα 18**.

Πίνακας 18. Λογαριθμική μείωση που παρατηρείται σε έκαστη συνθήκη.

	\log_{10} (CFU/cm ²)	P(T<=t) one-tail
<i>Κουπόνι μάρτυρας-1^η συνθήκη 10 min/πλευρά-1154 Watt</i>	-1.976	0.001
<i>Κουπόνι μάρτυρας-2^η συνθήκη 10 min/πλευρά-741 Watt</i>	-1.857	0.001
<i>Κουπόνι μάρτυρας-3^η συνθήκη 10 min/πλευρά-431 Watt</i>	-1.216	0.004
<i>Κουπόνι μάρτυρας-4^η συνθήκη 2 min/πλευρά 1154 Watt</i>	-1.725	0.002
<i>Κουπόνι μάρτυρας-5^η συνθήκη 2min/πλευρά-741 Watt</i>	-0.953	0.021
<i>Κουπόνι μάρτυρας-6^η συνθήκη 2min/πλευρά-431 Watt</i>	-0.860	0.011

Στη συνέχεια έγινε σύγκριση των συνθηκών μεταξύ τους. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι:

Οι μέσοι όροι των πληθυσμών που επιβίωσαν μετά την έκθεσή τους στη 1^η συνθήκη του πλάσματος (επεξεργασία του κουπονιού για 10 min/πλευρά με ισχύ 1154 Watt) δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά (**P=0.28>0.05**) από τους μέσους όρους των πληθυσμών που εκτέθηκαν στη 2^η συνθήκη πλάσματος (10 min/πλευρά με ισχύ 741 Watt). Σύμφωνα με το αποτέλεσμα αυτό συμπεραίνεται ότι οι διαφορετικές τιμές ισχύος (1154W και 741W) είχαν την ίδια επίδραση στη μείωση του πληθυσμού. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι η εφαρμογή πλάσματος για 10 λεπτά σε μεσαία ισχύ (741W) μπορεί να επιφέρει την ίδια μείωση πληθυσμού σε σχέση με την εφαρμογή πλάσματος για 10 λεπτά/πλευρά στην υψηλότερη ισχύ (1154W).

Μεταξύ της 1^{ης} και της 4^{ης} συνθήκης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές (**P= 0.19 >0.05**), συνεπώς παρατηρείται η ίδια επίδραση μεταξύ των δύο αυτών συνθηκών. Πρακτικά αυτό σημαίνει ότι είτε εφαρμοστεί πλάσμα για 10 λεπτά είτε για 2 λεπτά στη μέγιστη ισχύ 1154 Watt, η επίδραση στη μείωση του πληθυσμού είναι η ίδια. Ίδια επίδραση παρατηρείται και μεταξύ της 2^{ης} και 4^{ης} συνθήκης (**P=0.30 >0.05**)

Όσον αφορά την 3^η συνθήκη πλάσματος (10 λεπτά/πλευρά κουπονιού στην ελάχιστη ισχύ 431 Watt) φαίνεται ότι είναι η λιγότερο αποτελεσματική καθώς έχει την ίδια επίδραση με την 4^η (**P=0.07 >0.05**), την 5^η (**P=0.23 >0.05**) και την 6^η (**P=0.10 >0.05**) συνθήκη. Στις τρεις αυτές συνθήκες τα κουπόνια εκτέθηκαν για 2 λεπτά σε πλάσμα υψηλής, μεσαίας και χαμηλής συχνότητας αντίστοιχα και είχαν την ίδια επίδραση στους βιοϋμενικούς πληθυσμούς με αυτή που επέφερε η έκθεση των βιοϋμενίων για 10 λεπτά στη χαμηλότερη ισχύ.

Η 5^η και 6^η συνθήκη είχαν την ίδια επίδραση στη μείωση των πληθυσμών (**P= 0.39 >0.05**) γεγονός που δηλώνει πως ο παράγοντας ισχύς (μεσαίας και χαμηλής) στην περίπτωση εφαρμογής πλάσματος για 2 λεπτά/ ανά πλευρά κουπονιού δεν είχε μεγάλη επίδραση.

Τέλος, παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες του πλάσματος είχαν επίδραση στα βιοϋμένια στο σύνολο των εξεταζόμενων στελεχών *L. monocytogenes*, η αποτελεσματικότητα της κάθε συνθήκης διέφερε από στέλεχος σε στέλεχος.

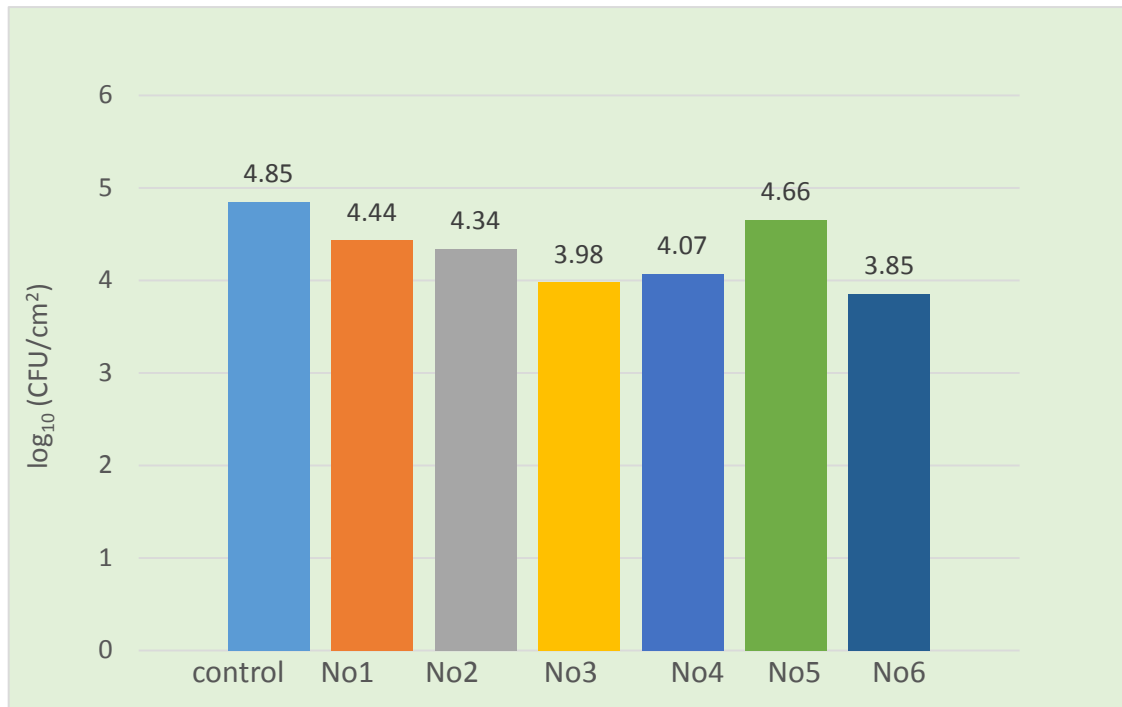
2^ο Ερευνητικό Στάδιο

5.4 Διερεύνηση της ανασταλτικής δράσης προεπεξεργασμένων κουπονιών με ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης στην προσκόλληση και ανάπτυξη βιοϋμενίων

Στο στάδιο αυτό, μετά από επώαση των δειγμάτων τους στελέχους 36 της *L. monocytogenes* στους 37° C για 48 ώρες προέκυψαν οι πληθυσμοί που παρουσιάζονται στον Πίνακα 19 και απεικονίζονται στο Γράφημα 10.

Πίνακας 19. Πληθυσμοί στελέχους 36 που προσκολλήθηκαν στα προεπεξεργασμένα κουπόνια.

Στέλεχος 36 <i>L. monocytogenes</i>	$\log_{10}(\text{cfu}/\text{cm}^2)$	Συνθήκες			
		Χρόνος (min)/πλευρά κουπονιού	Ισχύς (Watt)	Συχνότητα (KHz)	Tmax (°C)
<i>Κουπόνι μάρτυρας-</i>	<u>4.85</u>	(δεν εφαρμόστηκε πλάσμα)			
<i>Κουπόνι Νο 1</i>	<u>4.44</u>	10	700	151	42
<i>Κουπόνι Νο 2</i>	<u>4.34</u>	5	705	151	42
<i>Κουπόνι Νο 3</i>	<u>3.98</u>	20	705	151	42
<i>Κουπόνι Νο 4</i>	<u>4.07</u>	5	431	159	30
<i>Κουπόνι Νο 5</i>	<u>4.66</u>	5	741	151	37
<i>Κουπόνι Νο 6</i>	<u>3.85</u>	5	1154	142	37



Γράφημα 10. Επίδραση των συνθηκών των προεπεξεργασμένων κουπονιών στην προσκόλληση και ανάπτυξη βιοϋμενίου από κύτταρα του στελέχους 36.

Παρατηρήθηκε ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων σε όλες τις περιπτώσεις προεπεξεργασμένων κουπονιών. Συμπεραίνεται ότι καμία από τις συνθήκες που εφαρμόστηκαν σε αρχικά αποστειρωμένες επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα δεν ήταν ικανές να αποτρέψουν την προσκόλληση κυττάρων. Ωστόσο σε σχέση με το κουπόνι μάρτυρα το οποίο δεν εκτέθηκε σε πλάσμα, παρατηρήθηκε μια σχετικά μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενικών κυττάρων στα κουπόνια 3 και 6.

Το επόμενο στάδιο της μελέτης αυτής η οποία βρίσκεται όπως προαναφέρθηκε σε εξέλιξη, είναι η διερεύνηση της δράσης του πλάσματος σε ειδικές λεπίδες-μαχαίρια οι οποίες θα χρησιμοποιηθούν σε 3 βιομηχανίες κρέατος. Συγκεκριμένα θα δοθούν δύο λεπίδες-μαχαίρια του ίδιου τύπου σε κάθε βιομηχανία εκ των οποίων η μία θα έχει



προεπεξεργαστεί με πλάσμα ενώ η δεύτερη θα χρησιμοποιηθεί χωρίς να έχει εκτεθεί σε κάποια συνθήκη πλάσματος.

Εικόνα 3. Τύπος μαχαριού που θα επεξεργαστεί με πλάσμα.

Μοριακές αναλύσεις θα διεξαχθούν και στην περίπτωση αυτή σε επίπεδο RNA ώστε να αξιολογηθεί η ικανότητα παρεμπόδισης της προσκόλλησης κυττάρων στις επιφάνειες αυτές.

Για την επίτευξη του στόχου αυτού διαφορετικές συνθήκες πλάσματος από αυτές που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

3^ο Ερευνητικό Στάδιο

5.5 Διερεύνηση της ικανότητας πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών που έχουν επιβιώσει στις μεταλλικές επιφάνειες μετά την επεξεργασία τους με πλάσμα

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, τα βακτήρια που αναπτύσσονται σχηματίζοντας βιοϋμένιο είναι πολύ πιο δύσκολο να θανατωθούν ή να απομακρυνθούν από τις επιφάνειες σε σχέση με τα πλαγκτονικά κύτταρα, καθώς καθίστανται ανθεκτικότερα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Όταν αναπτύσσονται βιοϋμένια στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων είναι δύσκολο να απομακρυνθούν ειδικά όταν σχηματίζονται σε σημεία με υψηλή υγρασία ή σε σημεία όπου οι διαδικασίες καθαρισμού είναι ανεπαρκείς, αυξάνοντας έτσι το ενδεχόμενο διαμείωσης των παραγόμενων τροφίμων. Πολλοί ερευνητές έχουν παρατηρήσει ότι βιοϋμένια δύνανται να επανασχηματιστούν αμέσως μετά την εφαρμογή κάποιου απολυμαντικού παράγοντα. Σύμφωνα με τον Characklis, η επαναδημιουργία βιοϋμένιου οφείλεται σε έναν ή σε περισσότερους από τους παρακάτω λόγους²⁸³:

- Μετά την απολύμανση, το εναπομείνον βιοϋμένιο περιέχει βιώσιμα κύτταρα τα οποία χωρίς να περάσουν στη λανθάνουσα φάση, αναπτύσσονται πολύ γρηγορότερα κατόπιν του σταδίου της απολύμανσης απ' ότι κατά την αρχική προσκόλλησή τους (stress adaptation).
- Το βιοϋμένιο που απομένει στην επιφάνεια μετά την ολοκλήρωση της απολύμανσης, καθιστά την επιφάνεια περισσότερο τραχεία σε σχέση με μια καθαρή επιφάνεια και διευκολύνει την αρχική συσσώρευση μικροοργανισμών.
- Οι μικροοργανισμοί που επιβιώνουν μετά την απολύμανση παράγουν περισσότερους εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (EPS), ως αντίδραση προστασίας στο ερέθισμα που δέχτηκαν από το βακτηριοκτόνο παράγοντα.

Με βάση τα παραπάνω, πρώτο βήμα του σταδίου αυτού ήταν η αξιολόγηση της δυνατότητας αφαίρεσης των βιοϋμενικών πληθυσμών από τις επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα με χρήση πλάσματος και η διερεύνηση της ικανότητας επανάνπτυξής τους στις επιφάνειες αυτές.

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 20** παρατηρήθηκε επιβίωση και ικανότητα επανανάπτυξης βιοϋμενικών κυττάρων του στελέχους EGDe κατόπιν επεξεργασίας

με πλάσμα χαμηλής συχνότητας. Ο προσδιορισμός των βιώσιμων κυττάρων στο 3^ο κουπόνι έγινε με την κλασσική μέθοδο η οποία δε λαμβάνει υπόψιν κύτταρα βιώσιμα αλλά μη καλλιεργήσιμα. Κατά συνέπεια, είναι πιθανό ο πληθυσμός αυτός να είναι μεγαλύτερος αν μελετηθεί με τη μοριακή μέθοδο RT- qPCR.

Μεγαλύτερη ικανότητα επανανάπτυξης βιοϋμενίων στη μεταλλική επιφάνεια παρουσίασε το στέλεχος 36 γεγονός που δηλώνει ότι πιθανόν το στέλεχος αυτό ήταν περισσότερο ανθεκτικό έναντι αυτής της συνθήκης του πλάσματος (**Πίνακας 21**). Στην περίπτωση όπου εφαρμόστηκε πλάσμα υψηλής ισχύος (5^ο κουπόνι) και στα 2 στελέχη οι πληθυσμοί ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Πίνακας 20. Συμπεριφορά στελέχους EGDe μετά από 6 ημέρες επώασης.

Στέλεχος EGDe	T0	Μετά από 6 ημέρες επώασης
1^ο κουπόνι μάρτυρας	1.19E+04	
3^ο κουπόνι χαμηλή ισχύς για 10 λεπτά ανά πλευρά και κατόπιν επώαση σε BHI broth για 6 ημέρες στους 37°C		1.00E+01
5^ο κουπόνι υψηλή ισχύς για 10 λεπτά ανά πλευρά και κατόπιν επώαση σε BHI broth για 6 ημέρες στους 37°C		<10

Πίνακας 21. Συμπεριφορά στελέχους 36 μετά από 6 ημέρες επώασης.

Στέλεχος 36	T0	Μετά από 6 ημέρες επώασης
1^ο κουπόνι μάρτυρας	3.10E+03	
3^ο κουπόνι χαμηλή ισχύς για 10 λεπτά ανά πλευρά και κατόπιν επώασης σε BHI broth για 6 ημέρες στους 37°C		2.00E+04
5^ο κουπόνι υψηλή ισχύς για 10 λεπτά ανά πλευρά και κατόπιν επώαση σε BHI broth για 6 ημέρες στους 37°C		<10

Το 2^ο και 4^ο κουπόνι έκαστου στελέχους καθώς και τα κουπόνια μάρτυρες μεταφέρθηκαν μετά την ολοκλήρωση της επεξεργασίας με πλάσμα στο

μικροβιολογικό εργαστήριο όπου ακολούθησε απευθείας μηχανική απόξεση και επίστρωση σε τρυβλία (**Πίνακας 22, Πίνακας 23, στήλη T0**). Και στα 2 στελέχη οι πληθυσμοί που προέρχονταν από το 2^ο και το 4^ο κουπόνι ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Ωστόσο μετά από τη μηχανική απόξεση, πέραν των 100 μl διαλύματος Ringer που χρησιμοποιήθηκαν για τις δεκαδικές αραιώσεις και στο οποίο υπήρχαν πιθανόν εναιωρήσει κύτταρα τα οποία είχαν επιβιώσει από τις συνθήκες πλάσματος, επιπλέον 100 μl από το διάλυμα Ringer μεταφέρθηκαν σε 5 ml BHI broth προκειμένου να διαπιστωθεί αν παρέχοντας ευνοϊκές θρεπτικές συνθήκες, πιθανώς καταπονημένα κύτταρα είναι δυνατό να επανακάμψουν και να πολλαπλασιαστούν.

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 22** οι πληθυσμοί του στελέχους EGDe ήταν κάτω του επιπέδου ανίχνευσης σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ ανάπτυξη παρουσίασε μόνο το κουπόνι μάρτυρας. Συμπεραίνεται πως και οι δύο συνθήκες που εφαρμόστηκαν (χαμηλή ισχύς για 10 λεπτά-υψηλή ισχύς για 10 λεπτά) ήταν ικανές να αδρανοποιήσουν το στέλεχος EGDe και να μην επιτρέψουν την επανανάπτυξή του σε πλαγκτονική μορφή παρουσία ευνοϊκών περιβαλλοντικών συνθηκών.

Όσον αφορά το στέλεχος 36, ενώ στο 2^ο και 4^ο κουπόνι σε χρόνο T0 δεν παρατηρήθηκαν αποικίες, κατόπιν επώασης σε θρεπτικό υλικό για 4 ημέρες οι μικροοργανισμοί που προέρχονταν από το 2^ο κουπόνι εξήλθαν από τη βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη κατάσταση (VBNC state) αναπτύσσοντας πλέον αποικίες σε τρυβλία ALOA (**Πίνακας 23**).

Πίνακας 22. Συμπεριφορά στελέχους EGDe μετά από 4 ημέρες επώασης.

Στέλεχος EGDe	T0: 100μl και δεκαδικές αραιώσεις	100μl σε BHI broth από 4 ημέρες επώασης
1^ο κουπόνι μάρτυρας	1.19E+04	6.00E+08
2^ο κουπόνι χαμηλή ισχύς για 10 λεπτά ανά πλευρά και κατόπιν επώαση σε BHI broth για 6 ημέρες στους 37°C	<10	<10
4^ο κουπόνι υψηλή ισχύς για 10 λεπτά ανά πλευρά και κατόπιν επώαση σε BHI broth για 6 ημέρες στους 37°C	<10	<10

Πίνακας 23. Συμπεριφορά στελέχους 36 μετά από 4 ημέρες επώασης.

Στέλεχος 36	T0: 100μl και δεκαδικές αραιώσεις	100μl σε BHI broth από 4 ημέρες επώασης
1^ο κουπόνι μάρτυρας	3.10E+03	4.90E+08
2^ο κουπόνι χαμηλή ισχύς για 10 λεπτά ανά πλευρά και κατόπιν επώαση σε BHI broth για 6 ημέρες στους 37°C	<10	2.95E+08
4^ο κουπόνι υψηλή ισχύς για 10 λεπτά ανά πλευρά και κατόπιν επώαση σε BHI broth για 6 ημέρες στους 37°C	<10	<10

Πίνακας 24. Συγκεντρωτικός πίνακας για τα στελέχη EGDe και 36.

Δείγμα	T0	100μl σε BHI broth από 4 ημέρες επώασης	Μετά από 6 ημέρες επώασης
<i>EGDe- 1^ο κουπόνι</i>	1.19E+04	6.00E+08	
<i>EGDe- 2^ο κουπόνι</i>	<10	<10	
<i>EGDe- 3^ο κουπόνι</i>			1.00E+01
<i>EGDe- 4^ο κουπόνι</i>	<10	<10	
<i>EGDe- 5^ο κουπόνι</i>			<10

Δείγμα	T0	100μl σε BHI broth από 4 ημέρες επώασης	Μετά από 6 ημέρες επώασης
<i>36- 1^ο κουπόνι</i>	3.10E+03	4.90E+08	
<i>36- 2^ο κουπόνι</i>	<10	2.95E+08	
<i>36- 3^ο κουπόνι</i>			2.00E+04
<i>36- 4^ο κουπόνι</i>	<10	<10	
<i>36- 5^ο κουπόνι</i>			<10

Κεφάλαιο 6

Συμπεράσματα

Στο Κεφάλαιο 6 παρουσιάζονται τα βασικά πορίσματα της παρούσας μελέτης κατόπιν αξιολόγησης των αποτελεσμάτων που παρουσιάστηκαν στο Κεφάλαιο 5.

Με τη διεξαγωγή αντίδρασης PCR επαναλαμβανόμενων στοιχείων (rep-PCR) επιτεύχθηκε σαφής διαφοροποίηση των 12 μελετούμενων στελεχών *L. monocytogenes*. Σύμφωνα με τους Hadjilouka και συν. (2014), η rep-PCR με ολιγονουκλεοτιδικό εκκινητή τον (GTG)₅ αποτελεί μία από τις πιο αποτελεσματικές τεχνικές στη διαφοροποίηση στελεχών *L. monocytogenes* σε σχέση με τη μοριακή τεχνική RAPD-PCR²⁸⁴. Ωστόσο στην παρούσα μελέτη, πιθανή εμφάνιση ίδιων προφίλ στο πήκτωμα αγαρόζης δεν υποδηλώνει ότι τα στελέχη είναι ίδια. Απαιτείται η εκτέλεση επιπλέον μοριακών τεχνικών (π.χ. RAPD-PCR, ERIC-PCR) για τον ικανοποιητικό διαχωρισμό και τη λήψη μεγαλύτερου αριθμού μοναδικών προφίλ στελεχών *L. monocytogenes*.

Προϋπόθεση για τη μελέτη της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος έναντι των βιοϋμενίων *L. monocytogenes* ήταν η γνώση της ικανότητας των μελετούμενων στελεχών να αναπτύσσουν βιοϋμένια.

Εφαρμόζοντας το πρωτόκολλο που παρουσιάστηκε για τον σχηματισμό βιοϋμενίων στις μεταλλικές επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα διαπιστώθηκε ότι όλα τα στελέχη ήταν ικανά να σχηματίζουν βιοϋμένια. Εντούτοις παρατηρήθηκε διαστελεχιακή παραλλακτικότητα, γεγονός που επιβεβαιώνεται από ερευνητές όπως οι Borucki και συν. (2003), Folsom και συν. (2006), Tresse και συν. (2007)^{285,286,287}.

Η μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των βιοϋμενίων που παρατηρήθηκε μετά από 48 ώρες επώασης πιθανόν να οφείλεται στην εξάντληση των θρεπτικών συστατικών καθώς το σύστημα για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων ήταν στατικό και δεν πραγματοποιείτο ανανέωση του θρεπτικού μέσου. Ενδεχομένως η μείωση αυτή να οφείλεται στον τύπο της χρησιμοποιούμενης επιφάνειας ή σε καταπόνηση των βιοϋμενικών κυττάρων λόγω της μηχανικής απόξεσης. Καθώς η διερεύνηση των παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη και τον σχηματισμό βιοϋμενίων των 12 στελεχών δεν αποτέλεσε στόχο της παρούσας μελέτης, επιπλέον δοκιμές είναι απαραίτητο να διεξαχθούν ώστε να επιβεβαιωθεί η συμπεριφορά των στελεχών στον σχηματισμό βιοϋμενίων. Σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης, δεν υπήρξε σημαντική επίδραση του χρόνου στην ανάπτυξη των βιοϋμενικών πληθυσμών στο συνολικό πληθυσμό *L. monocytogenes*. Μετά από 6 ώρες επώασης, παρατηρήθηκε μια αρχική προσκόλληση της τάξης των $4.3 \pm 1 \log_{10}(\text{CFU}/\text{cm}^2)$ ενώ στη συνέχεια μετά από 24, 48, 144 ώρες δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των βιοϋμενικών πληθυσμών ($p\text{-value} = 0.11 > 0.05$).

Λαμβάνοντας υπόψιν δημοσιευμένα αποτελέσματα ερευνητών που ασχολούνται με το ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης και την μελέτη της επίδρασής του σε βιοϋμενικούς πληθυσμούς και παράλληλα αξιολογώντας τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας, εξάγονται τα παρακάτω συμπεράσματα για τα τρία ερευνητικά στάδια στα οποία μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα του πλάσματος.

Συγκρίνοντας τους πληθυσμούς που προέκυψαν μέσω ποσοτικοποίησης με βάση την καμπύλη αναφοράς και τους πληθυσμούς που προσδιορίστηκαν με την κλασική μέθοδο απαρίθμησης αποικιών (CFU) επιβεβαιώνεται η «αδυναμία» της κλασικής μεθόδου να προσδιορίζει πληθυσμούς που είναι ζωντανοί αλλά μη ικανοί να αναπτύσσουν αποικίες σε θρεπτικά υποστρώματα. Στις περισσότερες συνθήκες πλάσματος που εφαρμόστηκαν, οι πληθυσμοί που επιβίωσαν σύμφωνα με την κλασική μέθοδο ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Αντίθετα οι τιμές C_t που εξήχθησαν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης qPCR δηλώνουν την παρουσία βιώσιμων πληθυσμών στις συνθήκες αυτές. Πρακτικά αυτό σημαίνει πως η αξιολόγηση της βιωσιμότητας των πληθυσμών κατόπιν της έκθεσής τους σε πλάσμα μόνο με την κλασική μέθοδο ενδέχεται να οδηγήσει στην εξαγωγή εσφαλμένων συμπερασμάτων καθώς δε λαμβάνεται υπόψιν η καταπόνηση που μπορεί να υφίστανται τα κύτταρα όταν σε αυτά εφαρμόζεται πλάσμα. Μικροοργανισμοί που θεωρούνται μη βιώσιμοι, στην περίπτωση που είναι παθογόνοι, μπορούν να διατηρήσουν τη μολυσματική ικανότητά τους ακόμη και όταν δεν είναι καλλιεργήσιμοι²⁸⁸. Το πρόβλημα της βιωσιμότητας, πρέπει να εξετάζεται πριν να εξάγονται πορίσματα για την αποτελεσματικότητα της τεχνολογίας του πλάσματος.

Ένα αποτελεσματικό πρόγραμμα ελέγχου για την πρόληψη και την αντιμετώπιση βιοϋμενίων πρέπει να βασίζεται σε κατάλληλα συστήματα ανίχνευσης. Μια ορθή αξιολόγηση θα πρέπει να περιλαμβάνει τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας του βακτηριακού πληθυσμού με χρήση άλλων τεχνικών πέραν της κλασικής μεθόδου απαρίθμησης αποικιών.

Ο προσδιορισμός του ATP σε συνδυασμό με μικροσκοπικές τεχνικές (οπτική μικροσκοπία, SEM, TEM, AFM) και τεχνικές φθορισμού επιτρέπουν τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των κυττάρων και των μορφολογικών αλλαγών των κυττάρων μετά την επεξεργασία με πλάσμα. Κάθε μια από τις τεχνικές αυτές παρουσιάζει πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα. Ο κατάλληλος συνδυασμός των μεθόδων ανίχνευσης εξασφαλίζει μεγαλύτερη επιτυχία στον εντοπισμό και την πρόληψη της ανάπτυξης βιοϋμενίων²⁸⁹. Σημειώνεται ότι η διερεύνηση της αποτελεσματικότητας του ψυχρού πλάσματος με χρήση μικροσκοπίου SEM για τα μελετούμενα στελέχη της παρούσας εργασίας βρίσκεται σε εξέλιξη.

Στη μελέτη αυτή η ποσοτικοποίηση των βιώσιμων πληθυσμών με βάση τη μοριακή μέθοδο RT-qPCR αποτελεί μια εναλλακτική πρόταση για την εκτίμηση της βιωσιμότητας βιοϋμενικών πληθυσμών κατόπιν της επεξεργασίας με πλάσμα.

Οι μοριακές τεχνικές τείνουν παγκοσμίως να αντικαταστήσουν τις κλασικές μεθόδους της Μικροβιολογίας. Είναι γεγονός ότι το κόστος αυτών των τεχνικών σήμερα δεν είναι αμελητέο παρ' όλα αυτά η υψηλή τους ευαισθησία, η εξειδίκευση και η ταχύτητα, τις καθιστούν σημαντικά «εργαλεία» για την αποτελεσματική ανίχνευση και τον εντοπισμό βιοϋμενίων.

Συγκρίνοντας τους μέσους όρους των πληθυσμών που προέρχονταν από τα κουπόνια-μάρτυρες των 3 μελετούμενων στελεχών με τους αντίστοιχους μέσους όρους των πληθυσμών που προέκυψαν εκτελώντας κάθε συνθήκη πλάσματος, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P < 0.05$). Συμπεραίνεται έτσι ότι όλες οι συνθήκες πλάσματος που εφαρμόστηκαν επέφεραν μείωση των πληθυσμών

σε σχέση με τους πληθυσμούς των κουπονιών που δεν εκτέθηκαν σε κάποια συνθήκη πλάσματος (κουπόνια μάρτυρες).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία για να διεισδύσουν τα ενεργά σωματίδια του πλάσματος στο εσωτερικό των βιοϋμενίων και να εκδηλώσουν την αντιμικροβιακή τους δράση απαιτούνται μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα εφαρμογής πλάσματος σε σχέση με αυτά που απαιτούνται για τα πλαγκτονικά κύτταρα. Επιπλέον με βάση τα αποτελέσματα του 1^{ου} σταδίου της παρούσας μελέτης, διαπιστώνεται ότι μεγαλύτερη λογαριθμική μείωση των βιοϋμενικών πληθυσμών επέρχεται όταν αυτοί εκτίθενται σε πλάσμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (10 λεπτά) και στη μεγαλύτερη ισχύ (1154 Watt).

Παρά το γεγονός ότι οι συνθήκες του πλάσματος είχαν επίδραση στα βιοϋμένια στο σύνολο των εξεταζόμενων στελεχών *L. monocytogenes*, η αποτελεσματικότητα της κάθε συνθήκης διέφερε από στέλεχος σε στέλεχος.

Με βάση τα αποτελέσματα του 2^{ου} σταδίου αυτής της μελέτης συμπεραίνεται ότι καμία από τις συνθήκες πλάσματος που εφαρμόστηκαν σε αρχικά αποστειρωμένες επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα δεν ήταν ικανές να αποτρέψουν την προσκόλληση κυττάρων. Ωστόσο σε σχέση με το κουπόνι μάρτυρα το οποίο δεν εκτέθηκε σε πλάσμα, παρατηρήθηκε μια σχετικά μειωμένη ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενικών κυττάρων στο κουπόνι 3 το οποίο εκτέθηκε για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε πλάσμα (20 λεπτά με 705 Watt) σε σχέση με τα άλλα κουπόνια και στο κουπόνι 6 το οποίο εκτέθηκε σε ψυχρό πλάσμα ατμοσφαιρικής πίεσης υψηλότερης ισχύος (1154 Watt) για μικρό χρονικό διάστημα (5 min).

Τέλος στο 3^ο στάδιο, αξιολογήθηκε η ικανότητα επανανάπτυξης των κυττάρων που είχαν επιβιώσει μετά από επεξεργασία με πλάσμα σε βιοϋμένιο. Στη περίπτωση όπου εφαρμόστηκε πλάσμα υψηλής ισχύος (1154 Watt για 10 λεπτά) και στα 2 στελέχη που μελετήθηκαν, οι πληθυσμοί ήταν κάτω από το όριο ανίχνευσης. Σε πλάσμα χαμηλής ισχύος (431 Watt για 10 λεπτά) διαπιστώθηκε ότι τα 2 στελέχη ήταν ικανά να αναπτύξουν βιοϋμενικούς πληθυσμούς κατόπιν της έκθεσης τους στις συνθήκες αυτές. Τα αποτελέσματα αυτού του πειραματικού σταδίου επιβεβαιώνουν τη διαπίστωση ότι εντονότερες συνθήκες πλάσματος (μεγαλύτερος χρόνος έκθεσης και μεγαλύτερη ισχύς) δεν επιτρέπουν σε πιθανόν υπάρχοντα κύτταρα να επανααναπτυχθούν. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά το πλάσμα φαίνεται να είναι ικανό για την αδρανοποίηση των βιοϋμενίων που έχουν αναπτυχθεί σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα.

Λαμβάνοντας υπόψιν τα παραπάνω είναι πιθανή η μελλοντική χρήση του ψυχρού πλάσματος στην εξυγίανση των επιφανειών και του εξοπλισμού των βιομηχανιών τροφίμων.

Συμπεραίνεται ότι η χρήση της τεχνολογίας του πλάσματος σε συνδυασμό με την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των μικροοργανισμών με μοριακές μεθόδους μπορεί να αποτελέσει στο μέλλον εναλλακτική τεχνική των χημικών και φυσικών/θερμικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των βιοϋμενίων που αναπτύσσονται στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων. Το κόστος εφαρμογής της τεχνολογίας αυτής σε βιομηχανική κλίμακα είναι ακόμα πολύ υψηλό σε σχέση με τις ήδη χρησιμοποιούμενες μεθόδους εξυγίανσης. Παρόλα αυτά το

Ψυχρό πλάσμα αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη τεχνολογία για την αδρανοποίηση και απομάκρυνση των βιοϋμενίων από τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Όπως συμβαίνει με κάθε νέα τεχνολογία, πολλά βήματα πρέπει να γίνουν ώστε να εδραιωθεί και να αποδειχτεί ότι τα αποτελέσματα που επιφέρει η μέθοδος αυτή πληρούν τις απαιτήσεις της ισχύουσας νομοθεσίας για τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα.

Παραρτήματα

Παράρτημα I

§ 4.2.1 Ποσοτικοποίηση του DNA

Υπολογισμός συγκεντρώσεων απομονωμένων DNA

Η μέτρηση πραγματοποιήθηκε προκειμένου να καθοριστεί η συγκέντρωση του απομονωμένου DNA από τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν.

Στον **Πίνακα 25** παρουσιάζονται οι συγκεντρώσεις DNA (σε ng/μl) των 12 στελεχών όπως εξήχθησαν βάσει του λογισμικού ND-1000 V3.7.1. καθώς και οι απαιτούμενες αραιώσεις που έγιναν προκειμένου τα δείγματα DNA να χρησιμοποιηθούν στη μετέπειτα αντίδραση PCR. Με βάση τις αρχικές συγκεντρώσεις των απομονωθέντων DNA τα δείγματα αραιώθηκαν μέχρι τα 100 ng/μl σε τελικό όγκο $V_2 = 30 \mu\text{l}$.

Πίνακας 25. Συγκεντρώσεις και απαιτούμενες αραιώσεις DNA σε ng/μl.

Sample	ng/μl	100ng/μl	
		DNA	H ₂ O
EGDe	376.18	7.97	22.03
NCTC	120.53		
3	41.19		
19	826.54	3.63	26.37
36	1121.39	2.68	27.32
18	1366.4	2.20	27.80
70	649.45	4.62	25.38
162	830.43	3.61	26.38
V7	1510.92	1.99	28.01
12 (vet)	1480.35	2.03	27.97
Box 3	377.85	7.94	22.06
Box 17	284.90		

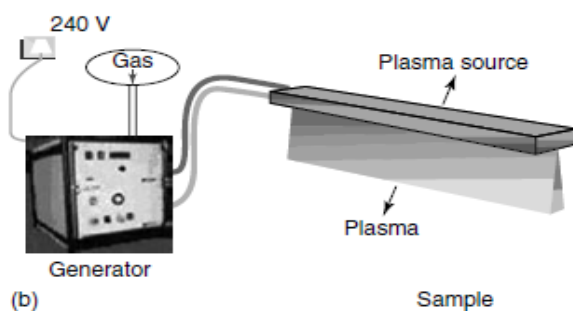
Παράρτημα II

Διάταξη ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης (cold atmospheric pressure plasma, CAP)

Αρχή λειτουργίας και τεχνικά χαρακτηριστικά του οργάνου AcXys Plasma Jet U.L. 120

Στη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ένας βιομηχανικός αντιδραστήρας DBD της εταιρείας «AcXys Technologies» ο οποίος λειτουργεί υπό αυξημένη ροή αερίου. Το αέριο το οποίο είναι κυρίως άζωτο εγχέεται εντός του αντιδραστήρα. Τα ουδέτερα ενεργά σωματίδια που δημιουργούνται κατά την εκκένωση δημιουργούν το πλάσμα το οποίο «γεννάται» γύρω από τα ηλεκτρόδια και στη συνέχεια διαχέεται έξω από την πηγή πλάσματος (αντιδραστήρας) μέσω μια σχισμής. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι ο σχηματισμός μιας χωρικής μετα-εκκένωσης.

Η τεχνολογία αυτή καλείται «Plasma Jet» στη διεθνή βιβλιογραφία, ή «Πίδακας Πλάσματος» στα Ελληνικά. Ο αντιδραστήρας αυτός αναφέρεται επίσης και ως «λεπίδα πλάσματος» καθώς στη συγκεκριμένη διάταξη ο πίδακας είναι επεκτεταμένος με αποτέλεσμα να σχηματίζεται μία «κουρτίνα» πλάσματος όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 21**.



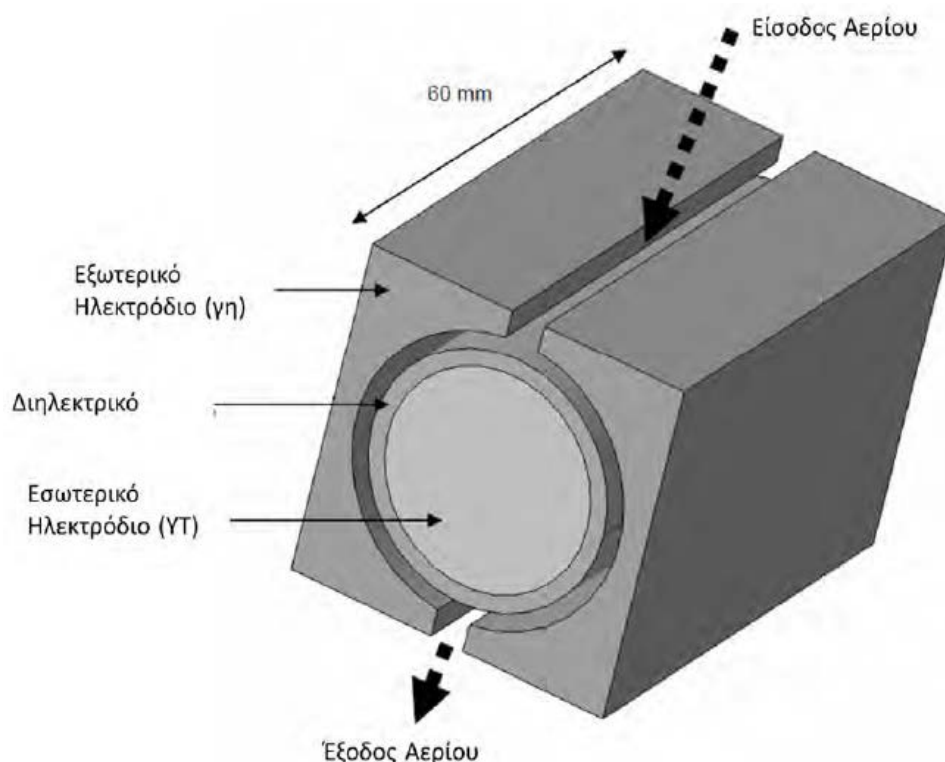
Σχήμα 21. Η γενική αρχή του πίδακα πλάσματος που παρέχεται στην αγορά από την AcXys Technologies.

Λεπτομέρειες διάταξης:

Η καρδιά του αντιδραστήρα (plasma source) (**Εικ. 4**) αποτελείται από δύο ομόκεντρα κυλινδρικά ηλεκτρόδια, μεταξύ των οποίων διατηρείται η εκκένωση του πλάσματος (περιοχή διέγερσης). Η κυλινδρική γεωμετρία του αντιδραστήρα, με επικάλυψη διηλεκτρικού επί του εσωτερικού ηλεκτροδίου, επιτρέπει τη ροή του αερίου μέσα στο διάκενο και την οδηγεί με ομογενή και ομαλό τρόπο έξω από τον εσω-ηλεκτροδιακό χώρο επί την προς επεξεργασία επιφάνεια. Επί του ηλεκτροδίου

αυτού επιβάλλεται το σήμα εναλασσόμενης υψηλής τάσης (ΥΤ), ενώ το εξωτερικό ηλεκτρόδιο (από ανοξείδωτο ατσάλι) είναι γειωμένο. Το εξωτερικό ηλεκτρόδιο έχει ένα στόμιο εισόδου για την εισαγωγή του αερίου και μία έξοδο, με τη μορφή μιας σχισμής, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, μέσω της οποίας επιτρέπεται στο διεγερμένο ή / και ασταθές αέριο να αφήσει την περιοχή διέγερσης.

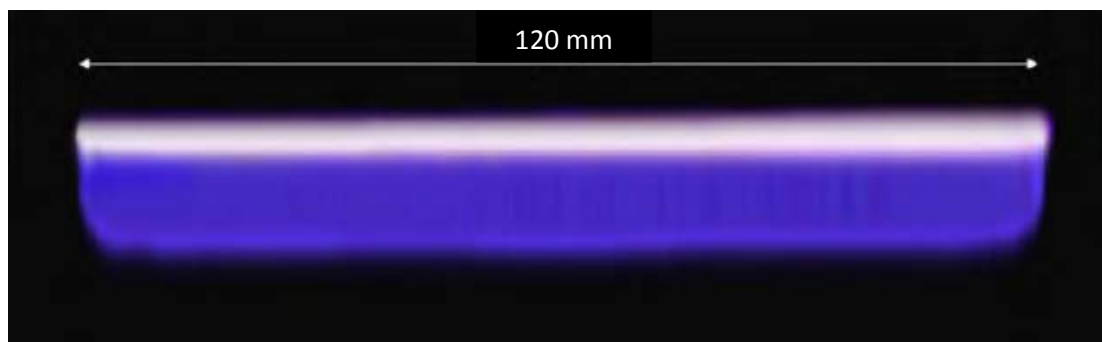
Η ροή του αερίου όπως δείχνουν τα βέλη στην **Εικόνα 4** είναι εγκάρσια: το αέριο εισέρχεται από τη σχισμή εισόδου με ροή 120 l/min, ρέει γύρω από το εσωτερικό ηλεκτρόδιο και εξέρχεται από τη σχισμή εξόδου πλάτους 120 mm. Η πίεση λειτουργίας του αερίου μέσα στον αντιδραστήρα είναι ατμοσφαιρική. Με την εφαρμογή της τάσης τα λίγα ελεύθερα ηλεκτρόνια που βρίσκονται σχεδόν σε κάθε αέριο κερδίζουν ενέργεια από το εφαρμοζόμενο ηλεκτρικό πεδίο και ξεκινούν μια διαδικασία επιτάχυνσης και πολλαπλασιασμού μέσω ιονιστικών κρούσεων με τα μόρια του αερίου. Ο πολλαπλασιασμός των ηλεκτρονίων είναι γρήγορος και κάθε ηλεκτρόνιο που συμμετέχει σε μια σύγκρουση ιονισμού παράγει ακόμα ένα ηλεκτρόνιο που με τη σειρά του θα συμμετάσχει σε άλλες διαδοχικές συγκρούσεις. Η διεργασία αυτή αποκτά χαρακτήρα μόνιμης κατάστασης, όταν ο ρυθμός παραγωγής ηλεκτρονίων μέσω ιονισμού ισούται με τον ρυθμό των ηλεκτρονίων που χάνονται στις επιφάνειες συν τον ρυθμό ηλεκτρονίων που επανασυνδέονται μέσω δευτερογενών αντιδράσεων.



Εικόνα 4. Απεικόνιση του αντιδραστήρα S120 της AcXys Technologies²⁹⁰.

Τέτοιοι πίδακες πλάσματος διατίθενται σε διαφορετικά μήκη που κυμαίνονται 60 έως 500 mm. Για την έκδοση των 120 mm που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη, η ισχύς της γεννήτριας μπορεί να φτάσει έως τα 2000 W, κάτι το οποίο απαιτεί ψύξη και ροή αερίου που φτάνει έως και μερικές δεκάδες λίτρα ανά λεπτό. Στα δύο άκρα του εξωτερικού ηλεκτροδίου βρίσκονται στερεωμένοι δύο ανεμιστήρες οι οποίοι βοηθούν στην ψύξη του αντιδραστήρα (δεν παρουσιάζονται στην Εικ.4 για λόγους ευκρίνειας). Τέλος, πέρα από τη χρήση αζώτου, η εκκένωση μπορεί να εκτελείται και με τον ατμοσφαιρικό αέρα ή με τη χρήση άλλων αερίων (οξυγόνο ή υδρογόνο) ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή τροποποίηση των χημικών ιδιοτήτων διαφόρων επιφανειών.

Η **Εικόνα 5** δείχνει την μετα-εκκένωση που προκύπτει από τον αντιδραστήρα αυτό. Η μετα-εκκένωση δημιουργεί μια φωτεινή «κουρτίνα» πλάτους 120 mm, πάχους 2 mm και μήκους μερικών cm. Το μήκος αυτό είναι συνάρτηση των λοιπών παραμέτρων της διάταξης καθώς και του περιβάλλοντος στο εξωτερικό του αντιδραστήρα. Το μέγιστο μήκος που μπορεί να φτάσει είναι τα 10 cm.

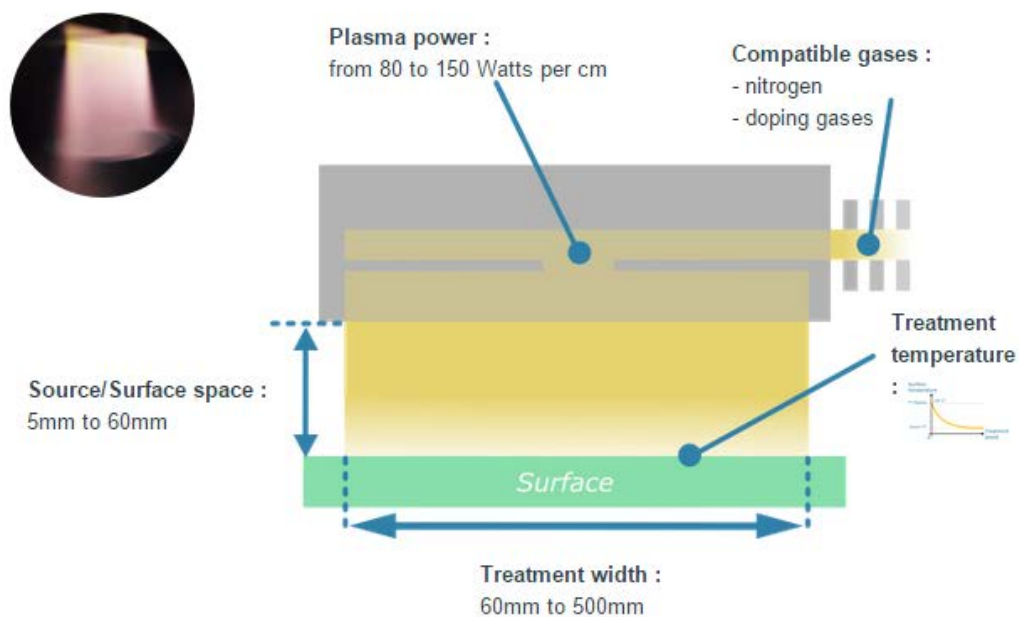


Εικόνα 5. Φωτεινή μετα-εκκένωση του αντιδραστήρα Acxys

Πηγή:[http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/5618/3/Nimertis_Panousis\(ele\).pdf](http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/5618/3/Nimertis_Panousis(ele).pdf)

Πίνακας 26. Τεχνικά χαρακτηριστικά της έκδοσης ULD-120.

Όνομασία μοντέλου	ULD-120
Πλάτος πλάσματος	120 mm
Τύπος γεννήτριας	Single-phase
Μέγεθος γεννήτριας	Μήκος: 540 mm Πλάτος: 440 mm Ύψος: 560 mm
Μήκος καλωδίου (αγωγού)	3 m
Βάρος γεννήτριας	40 kg
Τροφοδοτικό (Παροχή ρεύματος)	2 kW
Ροή αερίου	120 l/min
Προτεινόμενη ροή εξαγωγής	100 m ³ /min



Πηγή: <http://www.acxys.fr/plasma-modules/uld-plasma-curtain.html>

Παράρτημα III

4.4.3.6 Ποσοτικοποίηση του RNA

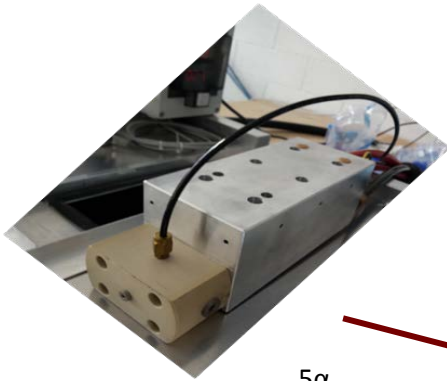
Πίνακας 27. Υπολογισμός συγκεντρώσεων απομονωμένων RNA.

Sample	ng/μl
EGDe control	11.28
EGDe-1	11.59
EGDe-2	11.85
EGDe-3	12.68
EGDe-4	13.86
EGDe-5	14.87
EGDe-6	15.99
3 control	14.77
3-1	15.98
3-2	19.25
3-3	9.42
3-4	11.33
3-5	11.44
3-6	11.28
36 control	20.22
36-1	16.30
36-2	13.37
36-3	10.35
36-4	10.37
36-5	11.88
36-6	9.95

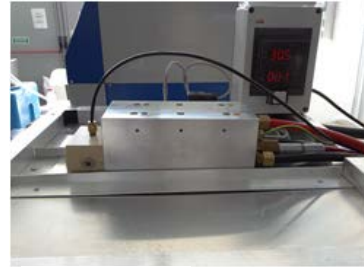
Κανένα από τα απομονωμένα δείγματα RNA δεν αραιώθηκε, καθώς οι μετρούμενες συγκεντρώσεις ήταν αρχικά πολύ χαμηλές.

Παράρτημα IV

Φωτογραφικό υλικό



Εικόνα 5α,5β.
Πηγή πλάσματος

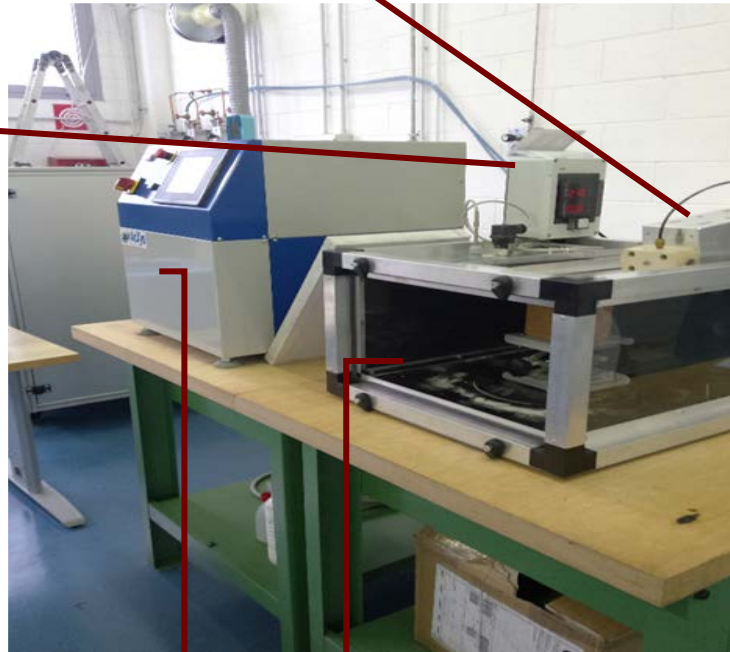


5β

5α



Εικόνα 6. Θερμόμετρο μέτρησης θερμοκρασίας στην επιφάνεια του κουπονιού.



Εικόνα 7.
Τροφοδοτικό.



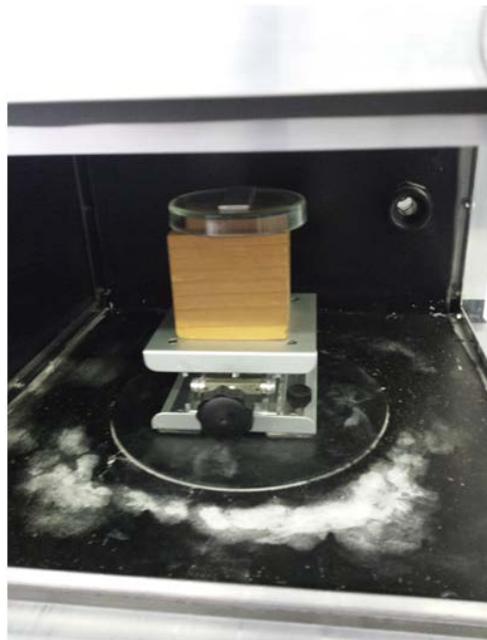
Εικόνα 8. Θάλαμος επεξεργασίας με πλάσμα.



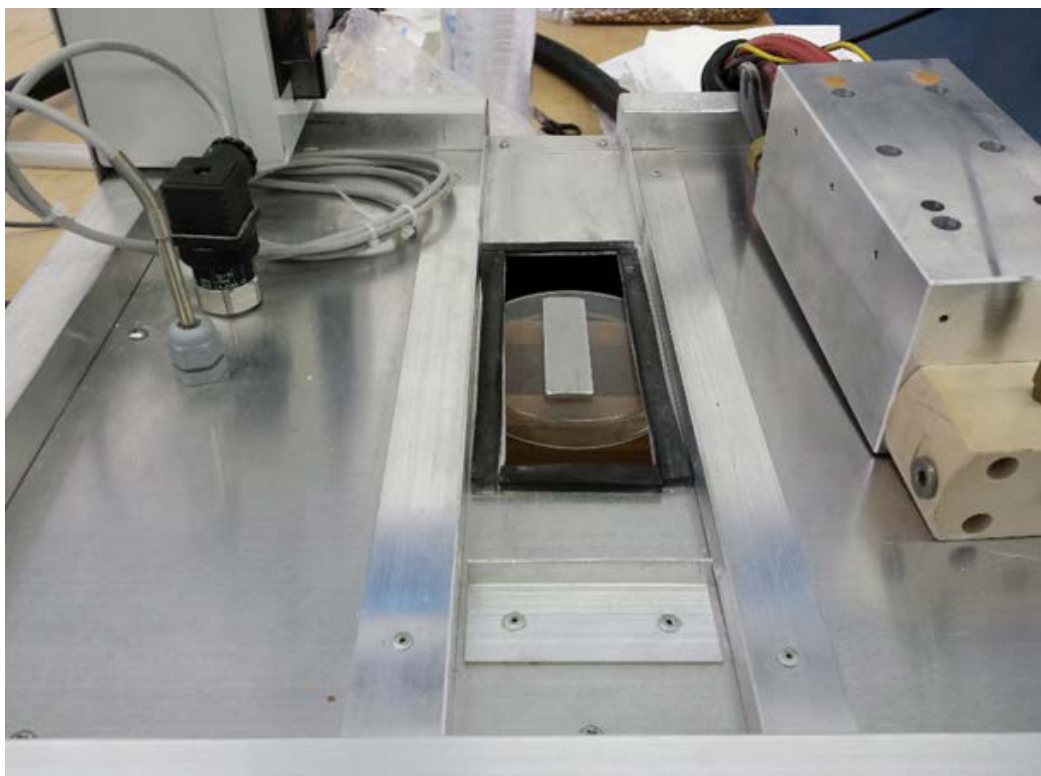
Εικόνα 9. Γυάλινο τρυβλίο Petri.



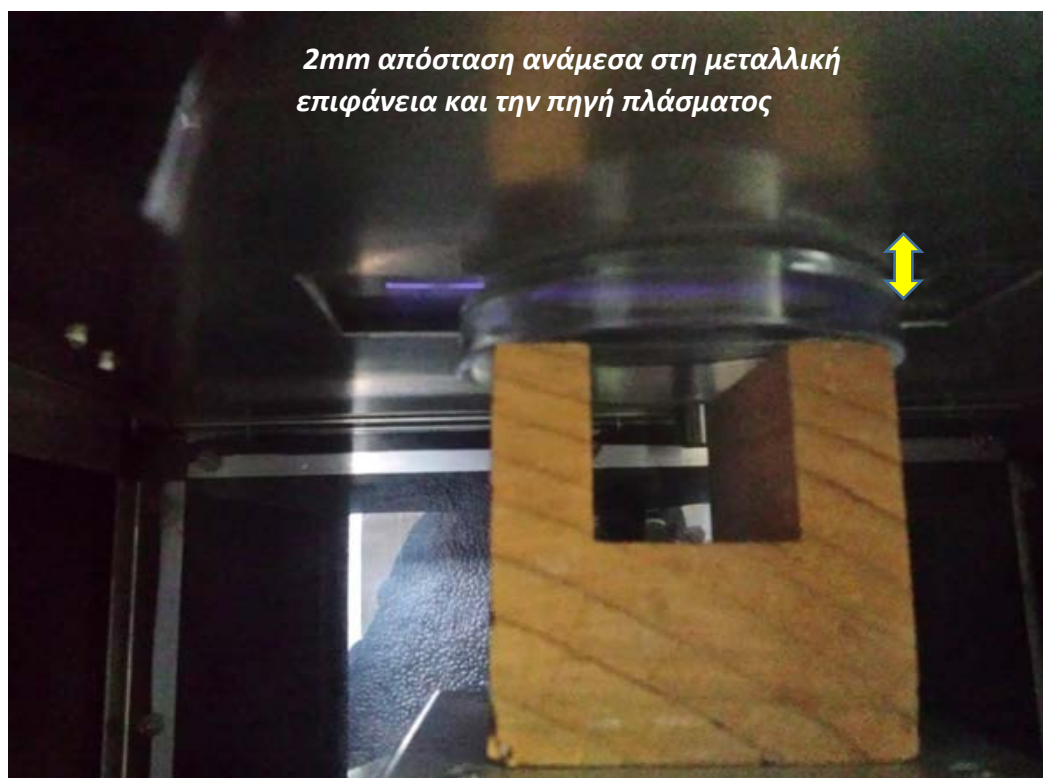
Εικόνα 10. Όργανο στήριξης.



Εικόνα 12. Τοποθέτηση δείγματος στον θάλαμο επεξεργασίας.



Εικόνα 13. Τοποθέτηση μεταλλικής επιφάνειας πριν την εφαρμογή.



Εικόνα 14. Φωτογραφική λήψη κατά την επεξεργασία της μεταλλικής επιφάνειας με πλάσμα.

Το μωβ χρώμα οφείλεται στο αέριο άζωτο που χρησιμοποιείται.

Βιβλιογραφία

-
- ¹ Dongyou Liu (ed). 2008. *Handbook of Listeria monocytogenes*. CRC Press.
- ² Rocourt J., & Buchrieser C. 2007. «The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification». Στο: E. T Ryser & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (3rd edn., pp. 1-20). Boca Raton, FL: CRC Press.
- ³ Collins M.D, Wallbanks S., Lane D.L., Shah J., Nietupskin R., Smida J., Dorsch M., Stackebrandt E. 1991. «Phylogenetic Analysis of the Genus *Listeria* Based on Reverse Transcriptase Sequencing of 16S rRNA». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 41(2):240–246.
- ⁴ Bertsch D., Rau J., Eugster M.R., Haug M.C., Lawson P.A., Lacroix C. & Meile L. 2012. «*Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese». *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 63:526-532.
- ⁵ Vázquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J. & Kreft J. 2001. «*Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants». *Clinical Microbiology Reviews* 14:584-640.
- ⁶ Swaminathan B., Cabanes D., Zhang W. & Cossart P. 2007. «*Listeria Monocytogenes*» Στο: Doyle M.P., and Beuchat L.R., *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. (Eds). 3rd Ed. ASM Press. Washington D.C., pp. 457-491.
- ⁷ Pan Y., Breidt F.Jr. & Kathariou S. 2009. «Competition of *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains in Mixed-Culture Biofilms». *Applied Environmental Microbiology* 75(18): 5846-5852.
- ⁸ Peel M., Donachie W. & Shaw A. 1988. «Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting». *Journal of General Microbiology* 143:2171-2178.
- ⁹ Swaminathan B. & Gerner-Smidt P. 2007. «The epidemiology of human listeriosis». *Microbial Infections* 9(10):1236-1243.
- ¹⁰ Food Safety Authority of Ireland. 2005. «The Control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food». Διαθέσιμο στο: <https://www.fsai.ie/assets/0/86/204/369a4f13-13e6-489a-bfa4-868bd4da7b2e.pdf> [ημ. ανάκτησης 24/05/2015]
- ¹¹ Farber J.M. & Peterkin P.I. 1991. «*Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen». *Microbiological Reviews* 55:476–511.

¹² Food Safety Authority of Ireland. 2007. «*Listeria monocytogenes*».

¹³ Food Safety Authority of Ireland. 2005. «The Control and Management of *Listeria monocytogenes* Contamination of Food». Διαθέσιμο στο: <https://www.fsai.ie/assets/0/86/204/369a4f13-13e6-489a-bfa4868bd4da7b2e.pdf> [ημ.ανάκτησης 24/05/2015].

¹⁴ Απόστολος Σ. Αγγελίδης. «*Listeria monocytogenes*: Η σημασία του παθογόνου για την ασφάλεια των Έτοιμων προς Κατανάλωση Τροφίμων και τη Δημόσια Υγεία», Κτηνιατρική Σχολή Α.Π.Θ, Εργαστήριο Γαλακτοκομίας. Διαθέσιμο στο: www.keelpno.gr [ημ.ανάκτησης 24/05/2015].

¹⁵ ΕΓΓΡΑΦΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΕΓΓΡΑΦΟ ΚΑΤΕΥΘΥΝΤΗΡΙΩΝ ΓΡΑΜΜΩΝ σχετικά με τις μελέτες διάρκειας διατήρησης για τη *Listeria monocytogenes* στα έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα, (ΕΚ) αριθ. 2073/2005, 15ης Νοεμβρίου 2005, περί μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα. Διαθέσιμο στο: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/translation_guidance_lm_el.pdf [ημ.ανάκτησης 24/05/2015]

¹⁶ Κυριακίδης Γ. 2011. «*Listeria monocytogenes* στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Ο ρόλος των Κτηνιατρικών Υπηρεσιών». Σεμινάριο Γ.Κ.Χ. Διαθέσιμο στο: [http://www.moh.gov.cy/MOH/SGL/sgl.nsf/B5AE1B6E18E5DE74C2257B8A0036BD12/\\$file/listeria%20ngl.final.pdf](http://www.moh.gov.cy/MOH/SGL/sgl.nsf/B5AE1B6E18E5DE74C2257B8A0036BD12/$file/listeria%20ngl.final.pdf) [ημ.ανάκτησης 25/05/2015]

¹⁷ LouY. & Yousef A.E. 1999. «Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors». Στο: Ryser, E.T. & Marth, E.H. (eds.), *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. Marcel Dekker, Inc., New York, United States. pp. 131-224.

¹⁸ Γουγούλη Μαρία. 2006. Μελέτη και μαθηματική περιγραφή της ανάπτυξης/επιβίωσης της *Listeria monocytogenes* σε μίγμα παγωτού σε στατικές και δυναμικές συνθήκες ψύξης-κατάψυξης. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Γεωπονίας, Τομέας Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων. Θεσσαλονίκη.

¹⁹ ΕΓΓΡΑΦΟ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΩΝ ΥΠΗΡΕΣΙΩΝ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ 2005. Διαθέσιμο στο: http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/translation_guidance_lm_el.pdf [ημ.ανάκτησης 27/05/2015]

²⁰ Norrung B. 2000. «Microbiological criteria for *L. monocytogenes* in food under special consideration of risk assessment approaches». *International Journal of Food Microbiology* 62:217-221.

²¹ Ποταμίτη Κόμη Μ., Μέλλου, Κ. 2012. Ενημερωτικό Δελτίο Κεελπνο ,Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων Αγράφων, Αρ. 21, Νοέμβριος / Έτος 2ο ISSN 1792-9016

Διαθέσιμο

στο:

<http://www.keelpno.gr/Portals/0/Newsletter/2012/%CE%B5%CE%BD%CE%B7%CE%BC%CE%B5%CF%81%CF%89%CF%84%CE%B9%CE%BA%CF%8C%CE%B4%CE%B5%CE%BB%CF%84%CE%AF%CE%BF%CE%9A%CE%95%CE%95%CE%9B%CE%A0%CE%9D%CE%9F%CE%9D%CE%BF%CE%AD%CE%BC%CE%B2%CF%81%CE%B9%CE%BF%CF%82%2012-2.pdf> [ημ. ανάκτησης 25/05/2015]

²² Severino P., Dussurget O., Vencio R.Z.N., Dumas E., Garrido P., Padilla G., Piveteau P., Lemaitre J., Kunst F., Glaser P., Buchrieser C. 2007. «Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response». *Applied and Environmental Microbiology* 73(19):6078–6088.

²³ Food Safety Authority of Ireland. 2005. «The control and management of *Listeria monocytogenes*, contamination of food»

Διαθέσιμο στο: <http://www.fsai.ie/assets/0/86/204/369a4f13-13e6-489a-bfa4-868bd4da7b2e.pdf> [ημ. ανάκτησης 28/05/2015]

²⁴ Hitchins A.D. 1996. «Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*». *International Journal of Food Microbiology* 30:71-85.

²⁵ McLauchlin J. 1996. «The relationship between *Listeria* and listeriosis». *Food Control* 7:187-193.

²⁶ Sim J., Hood D., Finnie L., Wilson M., Graham C., Brett M., Hudson J.A. 2002. «Series of incidents of *Listeria monocytogenes* non-invasive febrile gastroenteritis involving ready-to-eat meats». *Letters in Applied Microbiology* 35:409–413.

²⁷ Μπάτσος. Α. 2009. Συμπεριφορά παθογόνων μικροοργανισμών σε συνθήκες οξύτητας και αλατότητας περιβάλλοντος ζυμούμενων προϊόντων, Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογία τροφίμων.

²⁸ Μπαλατσούρας Γ. 2006. *Μικροβιολογία Τροφίμων*, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα. pp 75-80, 82-91, 162-164, 514-518.

²⁹ Liu D. (ed), 2008. *Handbook of Listeria monocytogenes*. Taylor & Francis group CRC press.

³⁰ Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.).

Διαθέσιμο στο:

http://www.keelpno.gr/Portals/0?Αρχεία/Τροφιμογενή/Λιστερίωση/Λιστερίωση_2004-2011.pdf [ημ. ανάκτησης 28/05/2015]

³¹ Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων. Τμήμα Επιδημιολογικής Επιτήρησης και Παρέμβασης. 2011. «Λιστερίωση. Περιγραφή Νοσήματος» Διαθέσιμο στο:

http://www.keelpno.gr/Portals/0/%CE%91%CF%81%CF%87%CE%B5%CE%AF%CE%B1/%CE%A4%CF%81%CE%BF%CF%86%CE%B9%CE%BC%CE%BF%CE%B3%CE%B5%CE%BD%CE%AE/%CE%9B%CE%B9%CF%83%CF%84%CE%B5%CF%81%CE%AF%CF%89%CF%83%CE%B7/listeriosi_perigrifi_%CF%84%CE%B5%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CE%BF.pdf [ημ. ανάκτησης 28/05/2015]

³² Bille J., Blanc D.S., Schmid H., Boubaker K., Baumgartner A., Siegrist H.H., Tritten M.L., Lienhard R., Berner D., Anderau R., Treboux M., Ducommun J.M., Malinverni R., Genné D., Erard P.H. & Waespi U. 2006. «Outbreak of human listeriosis associated with tomme cheese in northwest Switzerland, 2005». *Euro Surveill.* 11(6):91-93.

³³ Vit M., Olejnik R., Dlhý J., Karpísková R., Cástková J., Príkazský V., Príkazsk M., Benes C., Petrás P. 2007. «Outbreak of listeriosis in the Czech Republic». *Euro Surveill.* 12(2).

³⁴ Koch J., Dworak R., Prager R., Becker B., Brockmann S., Wicke A., Wichmann-Schauer H., Hof H., Werber D., Stark K. 2010. «Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007». *Foodborne Pathogens and Disease* 7(12):1581-1584.

³⁵ Fretz R., Sagel U., Ruppitsch W., Pietzka A. T., Stöger A., Huhulescu S., Heuberger S., Pichler J., Much P., Pfaff G., Stark K., Prager R., Flieger A., Feenstra O., Allerberger F. 2010. «Austria Germany cheese». *Rapid communications*
Διαθέσιμο στο: www.eurosurveillance.org [ημ. ανάκτησης 30/05/2015].

³⁶ European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control, 2013. 2015. «The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013». *EFSA Journal*

13(1):3991. Διαθέσιμο στο: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3991.pdf> [ημ. ανάκτησης 28/05/2015]

³⁷ Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Listeriosis. Διαθέσιμο στο: <http://www.cdc.gov/listeria/diagnosis.html> [ημ. ανάκτησης 28/05/2015]

³⁸ Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕ.ΕΛ.Π.ΝΟ.). Επιδημιολογικά δεδομένα για τη λιστερίωση στην Ελλάδα 2004 – 2013. Διαθέσιμο στο: http://www.keelpno.gr/Portals?0?Αρχεία/Τροφιμογενή/Λιστερίωση/Λιστερίωση_2004-2013.pdf [ημ. ανάκτησης 28/05/2015]

³⁹ World Health Organization. «Resolution WHA 53.15 on food safety». 53rd World Health Assembly, Geneva, Switzerland. Διαθέσιμο στο: http://www.who.int/wha-1998/EB_WHA/PDF/WHA53/I5.pdf.

⁴⁰ Scallan E., Hoekstra R.M., Angulo F.J., Tauxe R.V., Widdowson M., Roy S.L., Jones J.L., Griffin P.M. 2011. «Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens». *Emerging Infectious Diseases journal* 17:7-15.

⁴¹ Ghannoum M. & O'toole G.A. 2004. «Microbial biofilms». ASM Press, USA.

⁴² Donlan R.M. 2002. «Biofilms: microbial life on surfaces». *Emerging infectious diseases* 8:881.

⁴³ Shi X. & Zhu X. 2009. «Biofilm formation and food safety in food industries». *Trends in Food Science & Technology* 20:407-413.

⁴⁴ Donlan R.M. & Costerton J.W. 2002. «Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms». *Clinical Microbiology Reviews* 15:167-193.

⁴⁵ Karunakaran E., Mukherjee J., Ramalingam B. & Biggs C.A. 2011. «"Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms». *Applied Microbiology and Biotechnology* 90:1869-1881.

⁴⁶ Hideyuki K. & Dana M.B. 2015. *Biofilm and Materials Science Switzerland*. Springer International Publishing.

⁴⁷ Carpentier B. & Cerf O. 1993. «Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry». *Journal of Applied Bacteriology* 75:499-511

⁴⁸ Wimpenny J.W.T., Kinniment S.L. & Scourfield M.A. 1993. «The physiology and biochemistry of biofilm», *In Denyer, S. P., Gorman S. P, and Sussman, M. (ed.), Microbial biofilms: formation and control.* Blackwell Scientific Publ., London. p. 51-94.

⁴⁹ Brooks J.D. & Flint S.H. 2008. «Biofilms in the food industry: problems and potential solutions». *International Journal of Food Science & Technology* 43:2163-2176

⁵⁰ Costerton J.W. & Irvin R.T. 1981. «The bacterial glycocalyx in nature and Disease». *Annual Review of Microbiology* 83:299-324

⁵¹ Sutherland I. W. 1983. «Microbial exopolysaccharides- Their role in microbial adhesion in aqueous systems». *Critical Reviews in Microbiology* 10

⁵² Αυγέρη Μ. 2009. «Καταγραφή των ιστολογικών ευρημάτων μετά αμυγδαλεκτομή-αδενοειδεκτομή σε παιδιά την τελευταία πενταετία: Συσχέτιση με τα κλινικά δεδομένα». Μεταπτυχιακή εργασία. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Τμήμα Ιατρικής, Θεσσαλονίκη. Διαθέσιμο στο: <http://invenio.lib.auth.gr/record/114876/files/AVGERIS.pdf?version=1>

[ημ.ανάκτησης 30/05/2015]

⁵³ Σκανδάμης Π. 2013. *Σημειώσεις Υγιεινής Εγκαταστάσεων Βιομηχανιών Τροφίμων.*

⁵⁴ Carpentier B., & O. Cerf. 1993. «Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry». *Journal of Applied Bacteriology* 75:499-511.

⁵⁵ Hall-Stoodley L., Costerton J.W. & Stoodley P. 2004. «Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases». *Nature Reviews. Microbiology* 2:95-108.

⁵⁶ Nilsson R.E., Ross T. & Bowman J.P. 2011. «Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions». *International Journal of Food Microbiology* 150:14-24.

⁵⁷ Smirnova T.A., Didenko L.V., Azizbekyan R.R. & Romanova Y.M. 2010. «Structural and functional characteristics of bacterial biofilms». *Microbiology* 79:413-423.

⁵⁸ Van Houdt R. & Michiels C.W. 2010. «Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface». *Journal of Applied Microbiology* 109:1117-1131.

⁵⁹ Gilbert P., McBain A.J. & Rickard A.H. 2003. «Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control». *International Biodeterioration & Biodegradation* 51:245-248.

⁶⁰ Hall-Stoodley L., Costerton J.W. & Stoodley P. 2004. «Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases». *Nature Reviews. Microbiology* 2:95-108.

⁶¹ Zbigniew L. & Haluk B. 2014. *Fundamentals of BIOFILM RESEARCH*, 2nd Edition, CRC Press.

⁶² Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. 2004. «Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases». *Nature Microbiology Reviews* 2:95-108.

⁶³ Morton L.H.G., Greenway D.L.A., Gaylarde C.C. & Surman 1998. «Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides». *International Biodeterioration and Biodegradation* 41:247-259.

⁶⁴ Holah J.T., Bloomfield S.F., Walker A.J., Spenceley H. 1994. «Control of biofilms in the food industry». Στο: Wimpenny J.T., Nichols W.W., Stickler D., Lappin-Scott H.M. (eds), *Bacterial Biofilms and their Control in Medicine and Industry*. Bioline Press, Cardiff, UK, pp. 163–168.

⁶⁵ Gibson H., Taylor J.H., Hall K.E. & Holah J.T. 1999. «Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms». *Journal of Applied Microbiology* 87(1): 41–48.

⁶⁶ Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. & Lappin-Scott H. M. 1995. «Microbial biofilms». *Annual Reviews of Microbiology* 49:711-745.

⁶⁷ Palmer J., Flint S. & Brooks J. 2007. «Bacterial cell attachment, the beginning of a Biofilm». *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34:577-588.

-
- ⁶⁸ Kumar C.G. & Anand S.K. 1998. «Significance of microbial biofilms in food industry: a review». *International Journal of Food Microbiology* 42:9-27.
- ⁶⁹ Simões M., Simões L.C. & Vieira M.J. 2010. «A review of current and emergent biofilm control strategies». *LWT - Food Science and Technology* 43:573-583.
- ⁷⁰ Dunne W.M. Jr. 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilm lately? *Clinical Microbiology Reviews* 15:155–166.
- ⁷¹ Chmielewski R.A.N. & Frank J.F. 2003. «Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2:22-32.
- ⁷² Bower, C. K., J. McGuire, and M. A. Daeschel. 1996. «The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces». *Trends in Food Science and Technology* 7.
- ⁷³ Richards R. 1999. «Efficacy of sanitizers on *Listeria monocytogenes* biofilms». *Food Austral* 51:624-625.
- ⁷⁴ Sinde E. & Carballo J. 2000. «Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers». *Food Microbiology* 17:439-447.
- ⁷⁵ McLean R.J.C., Whiteley M., Stickler D. & Fuqua W.C. 1997. «Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms». *FEMS Microbiology Letters* 154:259-263.
- ⁷⁶ Pesci E.C., Milbank J.B.J., Pearson J.P., McKnight S., Kende A.S., Greenberg E.P., & Iglewski B.H. 1999. «Quinolone signaling in the cell-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*». *Proceedings of the National Academy of Sciences, PNAS* 96:11229-11234.
- ⁷⁷ Ophir T., Gutnick D.L. 1994. «A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation». *Applied and Environmental Microbiology* 147:195–202.
- ⁷⁸ Van Houdt R. & Michiels C.W. 2005. «Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation». *Research in Microbiology* 156:626-633.

-
- ⁷⁹ Telgmann U., Horn H., Morgenroth E. 2004. «Influence of growth history on sloughing and erosion from biofilms». *Water Research* 38:3671-3684.
- ⁸⁰ Potera, Carol 1996. «Biofilms Invade Microbiology». *Science* 273:1795-1797.
- ⁸¹ Chmielewski R.A.N. & Frank, J., 2003. «Biofilm formation and control in food processing facilities». *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 2:22-32.
- ⁸² Lewandowski Z. 2000. «Structure and Function of Biofilms». Στο: *Biofilms: recent advances in their study and control*. Evans L.V. (ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp. 1-17.
- ⁸³ Chmielewski, R. A. N. & Frank, J., 2003. «Biofilm formation and control in food processing facilities». *Comp. Rev. Food Sci. Food Safety* 2:22-32.
- ⁸⁴ Chae M.S., Schraft H. 2000. «Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains». *International Journal of Food Microbiology* 62(1-2):103-111.
- ⁸⁵ Daniels R., Vanderleyden J. & Michiels J. 2004. «Quorum sensing and swarming migration in bacteria». *FEMS Microbiology Reviews* 28:261-289.
- ⁸⁶ Parsek M.R. & Greenberg E.P. 2005. «Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms». *Trends in Microbiology* 13:27-33.
- ⁸⁷ Bassler B.L. & Losick R. 2006. «Bacterially speaking». *Cell* 125:237-246.
- ⁸⁸ Chen X., Schauder S., Potier N., Van Dorsselaer A., Pelczar I., Bassler B.L. et al. 2002. «Structural identification of a bacterial quorum- sensing signal containing boron». *Nature* 415:545-549.
- ⁸⁹ Μελαμπιανάκη Ζ., Βελονάκης Ε., Βατόπουλος Α. 2007. *Αρχεία Ιατρικής* 24(5):411-431.
- ⁹⁰ Schachter B. 2003. «Slimy business—the biotechnology of biofilms». *Nature Biotechnology* 21:361-365.
- ⁹¹ Bassler B.L. & Losick R. 2006. «Bacterially speaking». *Cell* 125:237-246.

-
- ⁹² Huber B., Riedel K., Hentzer M., Heydorn A., Gotschlich A., Givskov M., Molin S., Eberl L. 2001. «The cep quorum-sensing system of *Burkholderia cepacia* H111 controls biofilm formation and swarming motility». *Microbiology* 147:2517-2528.
- ⁹³ Piper K.R., Beck von Bodman S., Farrand S.K. 1993. «Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction». *Nature* 362:448-450.
- ⁹⁴ Schauder S. & Bassler B.L. 2001. «The languages of bacteria». *Genes & Development* 15:1468-1480.
- ⁹⁵ Simões M., Simões L.C. & Vieira M.J. 2010. «A review of current and emergent biofilm control strategies». *LWT - Food Science and Technology* 43:573-583.
- ⁹⁶ Van Houdt R. & Michiels C.W. 2010. «Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface». *Journal of Applied Microbiology* 109:1117-1131.
- ⁹⁷ Steidle A., Allesen-Holm M., Riedel K., Berg G., Givskov M., Molin S., Eberl L. 2002. «Identification and characterization of an N-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF». *Applied and Environmental Microbiology* 68:6371-6382.
- ⁹⁸ Dubern J.F., Lugtenberg B.J.J., Bloemberg G.V. 2006. «The ppul-ppuR quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of cyclic lipopeptides putisolvins I and II». *Journal of Bacteriology* 188:2898-2906.
- ⁹⁹ Wei H.L., Zhang L.Q. 2006. «Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24». *Antony Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 89:267-280.
- ¹⁰⁰ Allison D.G., Ruiz B., SanJose C., Jaspe A., Gilbert P. 1998. «Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms». *FEMS Microbiology Letters* 167:179-184.
- ¹⁰¹ Dubern J.F., Lugtenberg B.J.J., Bloemberg G.V. 2006. «The ppul-ppuR quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by

controlling biosynthesis of cyclic lipopeptides putisolvins I and II». *Journal of Bacteriology* 188:2898-2906.

¹⁰² Σγούντζος Ι. 2007. Μελετη της κινητικής ανάπτυξης Μικροοργανισμών κατά τη βιοαποδομηση τοξικών ρυπων σε πορώδη μέσα, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημικών Μηχανικών Πανεπιστημίου Πατρών.

¹⁰³ Bassler B.L. 1999. «How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum-sensing». *Current Opinion in Microbiology* 2:582–587.

¹⁰⁴ Whitehead N.A., Barnard A.M.L., Slater H., Simpson N.J.L., Salmond G.P.C. 2001. «Quorum sensing in Gram-negative bacteria» *FEMS Microbiology Reviews* 25:365-404.

¹⁰⁵ Irie Y., Mattoo S., Yuk M.H. 2004. «The Bvg virulence control system regulates biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*». *Journal of Bacteriology* 186:5692–5698.

¹⁰⁶ Chaturongkasumrit Y., Takahashi H., Keeratipibul S., Kuda T. & Kimura B. 2011. «The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency». *Food Control* 22(12): 1893–1899.

¹⁰⁷ Truelstrup Hansen, L. & Vogel B. F. 2011. «Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: Survival and transfer to salmon products». *International Journal of Food Microbiology* 146(1):88–93.

¹⁰⁸ Anonymous . 2008. *Listeria monocytogenes* outbreak Διαθέσιμο στο: http://www.phac-aspc.gc.ca/alert-alerte/listeria/listeria_2008-eng.php Public Health Agency of Canada. [ημ. ανάκτησης 01/05/2015]

¹⁰⁹ Wong S., Street D., Delgado S.I. & Klontz K.C. 2002. «Recalls of foods and cosmetics due to microbial contamination reported to the US Food and Drug Administration». *Journal of Food Protection* 63(8):1113–1116.

¹¹⁰ Truelstrup Hansen, L. and Vogel, B. F. 2011. «Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: Survival and transfer to salmon products». *International Journal of Food Microbiology* 146(1): 88–93.

¹¹¹ Tompkin R. B. 2002. «Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment». *Journal of Food Protection* 65(4):709–725.

-
- ¹¹² Wirtanen G., Langsrud S., Salo S., Olofson U., Alnae S.H., Neuman M., Homeid J.P. & Mattila-Sandholm T. 2002. «Evaluation of Sanitation Procedures for Use in Dairies». VTT Publication 481, Espoo, Otamedia Oy.
- ¹¹³ Lundean J. 2004. «Persistent *Listeria monocytogenes* Contamination in Food Processing Plants» Helsinki, *Yliopistopaino*
- ¹¹⁴ Wirtanen G. & Salo S. 2004. «DairyNET - Hygiene Control in Nordic Dairies». VTT Publication 545, Espoo, Otamedia Oy.
- ¹¹⁵ Jones C.E., Shama G., Jones D., Roberts I.S. and Andrew P.W. 1997. «Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*». *Journal of Applied Microbiology* 83:31-35.
- ¹¹⁶ Nilsson R.E., Ross T. & Bowman J.P. 2011. «Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions». *International Journal of Food Microbiology* 150(1):14–24.
- ¹¹⁷ Moretro T. & Langsrud S. 2004. «*Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments». *Biofilms* 1:107–127.
- ¹¹⁸ Mafu A.A., Roy D., Goulet J. & Magny P. 1990a. «Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times». *Journal of Food Protection* 53:742-746.
- ¹¹⁹ Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F. & Call D. R. 2003. «Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*». *Applied Environmental Microbiology* 69:7336-7342.
- ¹²⁰ Donlan R.M. Costerton, J.W. 2002. «Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms» *Clin. Microbiol Rev.* 15(2), 167-93.
- ¹²¹ Takhistov P., George B. 2004. «Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26(4):259–270.
- ¹²² Beresford M.R., Andrew P.W., Shama G. 2001. «*Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments». *J Appl Microbiol* 90(6):1000–1005.

-
- ¹²³ Van Houdt R. & Michiels C.W. 2010. «Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface». *Journal of Applied Microbiology* 109:1117-1131.
- ¹²⁴ Mai, T. L. & Conner, D. E. 2007. «Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel». *International Journal of Food Microbiology* 120:282-286.
- ¹²⁵ Kadam S.R. και συν., 2013. «Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin». *International Journal of Food Microbiology* 165:259-264.
- ¹²⁶ Djordjevic D., Wiedmann A. & Mclandsborough I.A. 2002. «Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation». *Applied Environmental Microbiology* 68(6):2950–2958.
- ¹²⁷ Moltz A.G. and Martin S.E. 2005. «Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions». *Journal of Food Protection* 68(1):92–97.
- ¹²⁸ Jaradat Z.W. & Bhunia A.K. 2002. «Glucose and nutrient concentrations affect the expression of a 104-kilodalton *Listeria* adhesion protein in *Listeria monocytogenes*». *Applied Environmental Microbiology* 68(10):4876-83.
- ¹²⁹ Stepanovic S., Cirkovic I., Ranin L., Svabic-Vlahovic M. 2004. «Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface». *Letters in Applied Microbiology* 38(5):428–432.
- ¹³⁰ Beresford MR, Andrew PW, Shama G. 2001. «*Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food-processing environments». *Journal of Applied Microbiology* 90(6):1000–1005.
- ¹³¹ Meylheuc T., Van Oss C.J., Bellon-Fontaine M.N. 2001. «Adsorption of biosurfactant on solid surfaces and consequences regarding the bioadhesion of *Listeria monocytogenes* LO28». *Journal of Applied Microbiology* 91(5):822–832.
- ¹³² Smoot L. & Pierson M., 1998. «Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to buna-rN Rubber and stainless steel». *Journal of Food Protection* 61:1286–1292.

-
- ¹³³ Ronner A.B., Wong A.C.L. 1993. «Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-n rubber». *Journal of Food Protection* 56(9):750–758.
- ¹³⁴ Helke D.M., Wong A.C.L. 1994. «Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber». *Journal of Food Protection* 57(11):963–968.
- ¹³⁵ Blackman I.C., Frank J.F. 1996. «Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food processing surfaces». *Journal of Food Protection* 59(8):827–831.
- ¹³⁶ Herald P.J., Zottola E.A. 1988. «Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values». *Journal of Food Science* 53(5):1549–1552.
- ¹³⁷ Smoot L.M., Pierson M.D. 1998. «Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to Buna-N rubber and stainless steel». *Journal of Food Protection* 61(10):1286–1292.
- ¹³⁸ Mai T.L. & Conner D.E. 2007. «Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel». *International Journal of Food Microbiology* 120:282-286.
- ¹³⁹ Poimenidou S., Belessi C.A., Giaouris E.D., Gounadaki A.S., Nychas G.J., Skandamis P.N. 2009. «*Listeria monocytogenes* attachment to and detachment from stainless steel surfaces in a simulated dairy processing environment». *Applied Environmental Microbiology* 75(22):7182-8.
- ¹⁴⁰ Jones C.E., Shama G., Jones D., Roberts I.S. and Andrew, P.W. 1997. «Physiological and biochemical studies on psychrotolerance in *Listeria monocytogenes*». *Journal of Applied Microbiology* 83:31-35.
- ¹⁴¹ Norwood D. E. & Gilmour A. 2001. «The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature». *Letters in Applied Microbiology* 33:320–324.
- ¹⁴² Smoot L. & Pierson, M. 1998. «Influence of environmental stress on the kinetics and strength of attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to buna-rN Rubber and stainless steel». *Journal of Food Protection* 61:1286–1292.

-
- ¹⁴³ Herald P.J., Zottola E.A. 1988. «Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values». *Journal of Food Science* 53(5):1549–1552.
- ¹⁴⁴ Moltz A.G., Martin S.E. 2005. «Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions». *J Food Prot* 68(1):92–97.
- ¹⁴⁵ Lemon K. P., Higgins D. E. & Kolter R. 2007. «Flagellar Motility Is Critical for *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation». *Journal of Bacteriology* 189:4418–4424.
- ¹⁴⁶ Norwood D.E., Gilmour A. 2001. «The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature». *Letters of Applied Microbiology* 33(4):320–324.
- ¹⁴⁷ Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Magny P. 1990a. «Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times». *J Food Prot* 53(9):742–746.
- ¹⁴⁸ Helke D.M., Wong A.C.L. 1994. «Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber». *J Food Prot* 57(11):963–968.
- ¹⁴⁹ Poimenidou, S. και συν. 2009. «*Listeria monocytogenes* Attachment to and Detachment from Stainless Steel Surfaces in a Simulated Dairy Processing Environment». *Applied and Environmental Microbiology* 75:7182–7188.
- ¹⁵⁰ Parker S.G., Flint S.H., Palmer J.S. & Brooks J.D. 2001. «Factors influencing attachment of Thermophilic Bacilli to stainless steel». *Journal of Applied Microbiology* 90:901–908.
- ¹⁵¹ Palmer J., Flint S. & Brooks J. 2007. «Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm». *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 34(9):577–588.
- ¹⁵² Verran J., Rowe D.L., Boyd R.D. 2001. «The effect of nanometer dimension topographical features on the hygienic status of stainless steel». *Journal of Food Protection* 64:1183–1187.
- ¹⁵³ Vatanyoopaisarn, S. A., Nazli, C. E. R., Dodd, C. E. D., Rees and Waites, W. M. 2000. «Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel». *Applied and Environmental Microbiology* 66:860-863.

-
- ¹⁵⁴ Takhistov P., George B. 2004. «Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth». *Bioprocess and Biosystems Engineering* 26(4):259–270.
- ¹⁵⁵ Marsh E.J., Luo H., Wang H. 2003. «A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities». *FEMS Microbiology Letters* 228(2):1969–1973.
- ¹⁵⁶ Kim K.Y. & Frank J.F. 1995. «Effect of growth nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel». *Journal of Food Protection* 58(1):24–28.
- ¹⁵⁷ Rodrigues D.A., Almeida M.A., Teixeira P.A., Oliveira R.T., Azeredo J.C. 2009. «Effect of Batch and Fed-Batch Growth Modes on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* at Different Temperatures». *Current Microbiology* 59:457–462.
- ¹⁵⁸ Flemming H.C., Wingender J., Griebe T. and Mayer C. 2000. «Physico-chemical properties of biofilms». Στο: *Biofilms: recent advances in their study and control*. Evans L.V. (ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, pp. 19-34.
- ¹⁵⁹ Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Savoie L., Roy R. 1990b. «Efficacy of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces». *Journal of Dairy Science* 73(12):3428–3432.
- ¹⁶⁰ Marsh E.J., Luo H., Wang H. 2003. «A three-tiered approach to differentiate *Listeria monocytogenes* biofilm-forming abilities». *FEMS Microbiology Letters* 228(2):1969–1973.
- ¹⁶¹ Flemming H.C., Wingender J., Griebe T. and Mayer C. 2000. «Physico-chemical properties of biofilms». In: *Biofilms: recent advances in their study and control*. Evans L.V. (ed). Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 19-34.
- ¹⁶² Kalmokoff M.L., Austin J.W., Wan X.D., Sanders G., Banerjee S. and Farber J.M. 2001. «Adsorption, attachment and biofilm formation among isolates of *Listeria monocytogenes* using model conditions». *Journal of Applied Microbiology* 91(4):725–734.
- ¹⁶³ Hefford M.A., D'aoust S., Cyr T.D., Austin J.W., Sanders G., Kheradpir E. & Kalmokoff M.L. 2005. «Proteomic and microscopic analysis of biofilms formed by *Listeria monocytogenes* 568». *Canadian Journal of Microbiology* 51(3):197–208.

-
- ¹⁶⁴ Moltz A.G. & Martin S.E. (2005). «Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions». *Journal of Food Protection* 68(1): 92–97.
- ¹⁶⁵ Folsom J. P. & Frank J.F. 2006. «Chlorine resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms and relationship to subtype, cell density, and planktonic cell chlorine resistance». *Journal of Food Protection* 69(6):1292–1296.
- ¹⁶⁶ Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F. & Call D. R. 2003. «Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*». *Applied Environmental Microbiology* 69:7336-7342.
- ¹⁶⁷ Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F. & Call D. R. 2003. «Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*». *Applied Environmental Microbiology* 69:7336-7342.
- ¹⁶⁸ Chae M.S., Schraft H., Hansen L.T. & Mackereth R. 2006. «Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass». *Food Microbiology* 23(3):250–259.
- ¹⁶⁹ Nunez M.E., Martin M.O., Chan P.H., Duong L.K., Sindhurakar A.R. & Spain E.M. 2005. «Atomic force microscopy of bacterial communities». *Environmental Microbiology Method Enzyme* 397:256–268.
- ¹⁷⁰ Rodriguez A., Autio W. & Mclandsborough I. 2008. «Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation». *Journal of Food Protection* 71(1):170–175.
- ¹⁷¹ Takhistov P., George B. 2004. «Linearized kinetic model of *Listeria monocytogenes* biofilm growth». *Bioprocess Biosyst Eng* 26(4):259–270.
- ¹⁷² Zottola E.A. & Sasahara K.C. 1994. «Microbial biofilms in the food processing industry: Should they be a concern?». *International Journal of Food Microbiology* 23:125-148.
- ¹⁷³ Genegeorgis C. 1995. «Biofilm: Their significance to cleaning in the meat sector». Στο: BURT, S. A. AND BAUER, F. (Eds), *New Challenges in Meat Hygiene: Specific problems in cleaning and disinfection, Ecceamst, European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology*, pp. 29-47.
- ¹⁷⁴ Kathariou S. 2002. «*Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective». *Journal of Food Protection* 65:1811-1829.

-
- ¹⁷⁵ Genegeorgis C. 1995. «Biofilm: Their significance to cleaning in the meat sector». Στο: BURT, S. A. AND BAUER, F. (Eds), *New Challenges in Meat Hygiene: Specific problems in cleaning and disinfection, Ecceamst, European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology*, pp. 29-47.
- ¹⁷⁶ McBain A., Allison D., Branding M., Rickard A., Verran J. & Walker J. 2003. «Biofilm Communities: Order from Chaos?» *Cardiff, BioLine*.
- ¹⁷⁷ Maukonen J., Mae Ttoe J., Wirtanen G., Raaska L., MAattila-Sandholm T. & Saarela M. 2003. «Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review» *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 30:327-356.
- ¹⁷⁸ Lundean J. 2004. «Persistent *Listeria monocytogenes* Contamination in Food Processing Plants» *Helsinki, Yliopistopaino*.
- ¹⁷⁹ Wirtanen G. & Salo S. 2004. «DairyNET- hygiene control in Nordic dairies» VTT Publication 545, Espoo, Otamedia Oy.
- ¹⁸⁰ Alakomi H.-L., Kujanpaeae K., Partanen L., Suihko M.L., Salo S., Siika-Aho M., Saarela M., Mattila-Sandholm T. & Raaska L. 2002. «Microbiological problems in paper machine environments». *VTT Research Notes 2152, Espoo, Otamedia Oy*.
- ¹⁸¹ Wirtanen G. & Salo S. 2004. «DairyNET- hygiene control in Nordic dairies» VTT Publication 545, Espoo, Otamedia Oy.
- ¹⁸² Γδοντέλης Ν. «Καθαρισμός και απολύμανση επιφανειών εργασίας και εξοπλισμού επιχειρήσεων τροφίμων» Διαθέσιμο στο: <https://agadvent.files.wordpress.com/2009/08/gdonteliscleaningdisinfectiontp.pdf> [ημ. ανάκτησης 05/05/2015]
- ¹⁸³ Kumar C.G., Anand S.K. 1998. «Significance of microbial biofilms in food industry: a review». *International Journal of Food Microbiology* 42:9-27.
- ¹⁸⁴ Wiss L. 1999. «Microbial Biofilm in Food Processing Department of Biotechnology» 32:321-326, Academic Press.

¹⁸⁵ Holah J.T., Bird J. & Hall K.E. 2004. «The microbial ecology of high-risk, chilled food factories; evidence for persistent *Listeria* spp. and *Escherichia coli* strains». *Journal of Applied Microbiology* 97(1):68-77.

¹⁸⁶ Διαθέσιμο στο: <http://www.patris.gr/archive/2000/1/4/3rd.html> [ημ. ανάκτησης 08/05/2015].

¹⁸⁷ Somers E.B. & Wong A.C.L 2004. «Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue». *Journal of Food Protection* 67(10):2218–2229.

¹⁸⁸ Chmielewski R. A. N. & Frank J.F. 2006. «A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber.» *LWT – Food Science and Technology* 39:11–19.

¹⁸⁹ Chavant P., Gaillard-Martine B. & Hebraud M. 2004. «Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase». *FEMS Microbiology Letters*, 236(2): 241–248.

¹⁹⁰ Somers E.B. & Wong A.C.L 2004. «Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue». *Journal of Food Protection* 67(10):2218–2229.

¹⁹¹ Chmielewski R. A. N. & Frank J.F. 2006. «A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber.» *LWT – Food Science and Technology* 39:11–19.

¹⁹² Gram L., Bagge-Ravn D., Ng Y.Y, Gyomoese P. & Vogel B.F. 2007. «Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*». *Food Control* 18(10): 1165–1171.

¹⁹³ Aarnisalo K., Salo S., Miettinen H., Suihko M.L., Wirtanen G., Autio T., Lunden J., Korkeala H. & Sjoberg A.M. 2000. «Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces». *Journal of Food Safety* 20(4): 237–250.

-
- ¹⁹⁴ Pan Y., Breidt F. & Kathariou S. 2006. «Resistant of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment». *Applied Environmental Microbiology* 72:7711-7717.
- ¹⁹⁵ Guzel-Seydim Z.B., Greene A.K. and Seydim A.C. 2004. «Use of ozone in the food Industry». *LWT - Food Science and Technology* 37:453-460.
- ¹⁹⁶ Khadre M.A., Yousef A.E., Kim J.-G. 2001. «Microbiological aspects of ozone applications in foods: A review». *Journal of Food Science* 66:1242–1252.
- ¹⁹⁷ Robbins J.B., Fisher C.W., Moltz A.G., Martin S.E. 2005. «Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine, and hydrogen peroxide». *Journal of Food Protection* 86:494–498.
- ¹⁹⁸ Πανταζάκη Α. & Σίμου Ο. 2012. «ΒΙΟΑΠΟΙΚΟΔΟΜΗΣΙΜΑ ΒΙΟΑΠΟΡΡΥΠΑΝΤΙΚΑ» *Chemica Chronica*, Association of Greek Chemists.
- ¹⁹⁹ Nitschke M., Araújo V., Costa SGVAO, Pires R.C., Zeraik A.E., Fernandes ACLB et al. 2009. «Surfactin reduces the adhesion of foodborne pathogenic bacteria to solid surface». *Letters in Applied Microbiology* 49:241-247.
- ²⁰⁰ Araújo L.V., Lins U.C., Santa Anna L.M.M., Nitschke M. & Freire D.M.G. 2011 «Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion». *Food Research International* 44:481-488.
- ²⁰¹ Zezzi do Valle Gomes M. & Nitschke M. 2012. «Evaluation of rhamnolipid and surfactin to reduce the adhesion and remove biofilms of individual and mixed cultures of food pathogenic bacteria». *Food Control* 25:441-447.
- ²⁰² Orgaz B., Lobete M.M., Puga C.H. & San Jose C. 2011. «Effectiveness of chitosan against mature biofilms formed by food related bacteria». *International Journal of Molecular Science* 12:817-828.
- ²⁰³ Soni K.A. & Nannapaneni R. 2010. «Removal of *Listeria monocytogenes* Biofilms with Bacteriophage P100». *Journal of Food Protection* 73:1519–1524.
- ²⁰⁴ Woo J. & Ahn J. 2013. «Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens». *Letters of Applied Microbiology* 56(4):307-313.

²⁰⁵ Kumar C.G. & Anand S.K. 1998. «Significance of microbial biofilms in food industry: a review». *International Journal of Food Microbiology* 42: 9-27.

²⁰⁶ Oulahal-Lagsir O., Martial-Gros A., Bonneau M. & Blum L.J. 2003. Escherichia coli-milk biofilm removal from stainless steel surfaces: synergism between ultrasonic waves and enzymes». *Biofouling* 19:159–168.

²⁰⁷ Vleugels M., Shama G., Deng X.T., Greenacre E., Brocklehurst T. & Kong M.G. 2004. «Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control». Στο: 31st IEEE International Conference on Plasma Science (ICOPS 2004). pp. 824–828. Baltimore, MD: IEEEInst Electrical Electronics Engineers Inc.

²⁰⁸ Ματραλή Σ.Σ. 2014. Τα λιποσώματα ως μοντέλα για την μελέτη της επίδρασης ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης σε κύτταρα. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής. Πάτρα.

²⁰⁹ Γεωργοπούλου Σ. 2012. Επίδραση ψυχρού πλάσματος πάνω σε βιοϋλικά και βιοσυστήματα. Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Τεχνολογίας Υπολογιστών, Τομέας Συστημάτων και Ηλεκτρικής Ενέργειας, Πάτρα.

²¹⁰ Langmuir I. 1971. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 14:628.

²¹¹ Moreau M., Orange N. Feuilleley. 2008. « Non- thermal plasma technologies: New tools for bio-decontamination». *Biotechnology Advances* 26:610-617.

²¹² Τζανέτης Γ. 2009. Μελέτη του ψυχρού πλάσματος που παράγεται σε ανομοιογενές πεδίο σε χαμηλή πίεση αερίου. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Τεχνολογίας Υπολογιστών, Τομέας Συστημάτων και Ηλεκτρικής Ενέργειας, Πάτρα.

²¹³ Δαρδαμάνης Κ. 2012. Μελέτη του ρόλου των μακροσκοπικών συντελεστών στη δημιουργία και διάδοση κυμάτων ιονισμού στο ψυχρό πλάσμα», Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Τεχνολογίας Υπολογιστών, Τομέας Συστημάτων και Ηλεκτρικής Ενέργειας, Πάτρα.

²¹⁴ Essam N. 1971. «Fundamentals of Gaseous Ionization and Plasma Electronics». *Wiley-Interscience*.

-
- ²¹⁵ Köritzer J. 2014. Biophysical Effects of Cold Atmospheric Plasma on Glial Tumor Cells. Doctoral Thesis, Ludwig Maximilian University of Munich, Germany Springer International Publishing, Switzerland.
- ²¹⁶ Ματραλή Σ.Σ. 2014. Τα λιποσώματα ως μοντέλα για την μελέτη της επίδρασης ψυχρού πλάσματος ατμοσφαιρικής πίεσης σε κύτταρα. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Φαρμακευτικής, Πάτρα.
- ²¹⁷ Ναναδάκης Σ.2011. «Μελέτη της επίδρασης της γεωμετρικής μορφής της ανόδου στην παραγωγή εκκενώσεων αίγλης» Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Τεχνολογίας Υπολογιστών, Τομέας Συστημάτων και Ηλεκτρικής Ενέργειας, Πάτρα.
- ²¹⁸ Laroussi M., Tendero C., Lu X., Alla S., Hynes W.L. 2006. «Inactivation of Bacteria by the Plasma Pencil *Plasma Processes and Polymers* 6:470-473
- ²¹⁹ Fridman G., Friedman G., Gutsol A., Shekhter A.B., Vasilets V.N., Fridman A. 2008. «Applied Plasma Medicine» *Plasma Processes and Polymers* 5.
- ²²⁰ Fridman G., Brooks A.D., Balasubramanian M., Fridman A., Gutsol A., Vasilets V.M., Ayan H., Friedman G. 2007. «Comparison of Direct and Indirect Effects of Non-Thermal Atmospheric-Pressure Plasma on Bacteria» *Plasma Processes and Polymers* 4:370-375.
- ²²¹ Jiang C., Chen M.T., Gundersen M.A. 2009. «Polarity-induced asymmetric effects of nanosecond pulsed plasma jets» *Journal of Physics D: Applied Physics* 4:2232002-2009.
- ²²² Kolb J.F., Mohamed A.H., Price R.O., Swanson R.J., Bowman A., Chiavarini R.L., Stacey M., Schoenbach K.H. 2008. Cold atmospheric pressure air plasma jet for medical applications. *Applied Physics Letters* 92:241501.
- ²²³ Heinlin J., Isbary G., Stolz W., Morfill G., Landthaler M., Shimizu T., Steffes B., Nosenko T., Zimmermann J.L., Karrer S. 2011. «Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology» *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 25(1):1-11.
- ²²⁴ Jiang N., Ji A., Cao Z. 2009. «Atmospheric pressure plasma jet: Effect of electrode configuration, discharge behavior, and its formation mechanism» *Journal of Applied Physics* 106:13308.

²²⁵ Laroussi M. 2005. «Low Temperature Plasma-Based Sterilization: Overview and State-of-the-Art Plasma» *Processes and Polymers* 2:391-400.

²²⁶ Förster S., Mohr C., Viöl W 2005. «Investigations of an atmospheric pressure plasma jet by optical emission spectroscopy» *Surface & Coatings Technology* 200:827-830.

²²⁷ Pankaj Attri, Bharti Arora, Eun Ha Choi. 2013. «Utility of plasma: a new road from physics to chemistry». *RSC Advanced later articles, The Royal Society of Chemistry* 31.

²²⁸ Fridman G., Shereshevsky A., Peddinghaus M., Gutsol A., Vasilets V., Brooks A., Balasubramanian M., Friedman G., Fridman A. 2006. «Bio-Medical Applications of Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma». *37th AIAA, Plasmadynamics and Lasers Conference, San Francisco, California*.

²²⁹ Garon E.B., Sawcer D., Vernier P.T., Tang T., Sun Y., Marcu L., Gundersen M.A., Koeffler H.P. 2007. «In vitro and in vivo evaluation and a case report of intense nanosecond pulsed electric field as a local therapy for human malignancies». *International Journal of Cancer* 121:675-682.

²³⁰ Kim G.C., Kim G.J., Park S.R., Jeon S.M., Seo H.J., Iza F., Lee J.K. 2009. «Air plasma coupled with antibody-conjugated nanoparticles: a new weapon against cancer». *Journal of Physics D: Applied Physics* 42:32005.

²³¹ Lee H.J., Shon C.H., Kim Y.S., Kim S., Kim G.C., Kong M.G. 2009. «Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma». *New Journal of Physics* 11:115026.

²³² Fridman G., Peddinghaus M., Ayan H., Fridman A., Balasubramanian M., Gutsol A., Brooks A., Friedman G. 2006. «Blood Coagulation and Living Tissue Sterilization by Floating-Electrode Dielectric Barrier Discharge in Air». *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 26:425-442.

²³³ Fridman G., Friedman G., Barbee K. 2008. «Direct Plasma Interaction with Living Tissue» 134.

²³⁴ Γεωργοπούλου Σ. 2012. Επίδραση ψυχρού πλάσματος πάνω σε βιοϋλικά και βιοσυστήματα. Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών, Πολυτεχνική Σχολή,

Τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Τεχνολογίας Υπολογιστών, Τομέας Συστημάτων και Ηλεκτρικής Ενέργειας, Πάτρα.

²³⁵ Jiang N., Ji A., Cao Z. 2009. «Atmospheric pressure plasma jet: Effect of electrode configuration, discharge behavior, and its formation mechanism». *Journal of Applied Physics* 106:13308.

²³⁶ Basaran P., Basaran-Akgul N., Oksuz L. 2008. «Elimination of *Aspergillus parasiticus* from nut surface with low pressure cold plasma (LPCP) treatment». *Food Microbiology* 25(4):626-632.

²³⁷ Vleugels M., Shama G., Deng X.T., Greenacre E., Brocklehurst T., Kong M.G. (2005. «Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control». *Plasma Science, IEEE Transactions on* 33(2):824-828.

²³⁸ Τζανέτης Γ. 2009. Μελέτη του ψυχρού πλάσματος που παράγεται σε ανομοιογενές πεδίο σε χαμηλή πίεση αερίου. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Πατρών Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Τεχνολογίας Υπολογιστών, Τομέας Συστημάτων και Ηλεκτρικής Ενέργειας, Πάτρα.

²³⁹ Joaquin J.C., Kwan C. Abramzon N., Vandervoort K., Brelles-Marino G. 2009. « Is gas- discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation?». *Microbiology* 155:724-732.

²⁴⁰ Xu L., Tu Y., Tan M., Li J., Chen H. 2011. « Augmented survival of *Neisseria gorrhoeae* with biofilms: exposure to atmospheric pressure non-thermal plasmas». *European Journal of Clinical Microbiological Infectious Diseases* 30:25-31.

²⁴¹ Leipold F., Kusano Y., Hansen F., Jacobsen T. 2010. «Decontamination of a rotating cutting tool during operation by means of atmospheric pressure plasmas». *Food Control* 21:1194-1198.

²⁴² Deng X., Shi J., Kong M. 2009. «Protein destruction by a helium atmospheric pressure glow discharge: Capability and mechanisms». *Journal of Applied Physics* 101(7):074701.

²⁴³ Shama G., Bayliss D., Perni S., Kong M.G. 2009. «Applications of cold atmospheric gas plasmas for microbial decontamination in the food industry». Άρθρο που παρουσιάστηκε στο BFE 2009: Proceedings of the International Conference on Bio and Food Electrotechnologies, Compiègne, France.

-
- ²⁴⁴ Brown H. 2010. «Get in for the pathogen kill with cold plasma technology». Διαθέσιμο στο: <http://www.foodqualitynews.com/Innovation/Get-in-for-the-pathogen-killwith-cold-plasma-technology?nocount>. [ημ. ανάκτησης 7/07/2015].
- ²⁴⁵ Kieft I.E., Slaaf D.W., Kroesen G.M.W. 2005. «Plasma needle: exploring biomedical applications of non-thermal plasmas» 153.
- ²⁴⁶ Kieft I.E., Darios D., Roks A.J.M., Stoffels E. 2005. «Plasma Treatment of Mammalian Vascular Cells: A Quantitative Description» *IEEE Transaction on Plasma Science* 33: 771-775.
- ²⁴⁷ Laroussi M, Mendis DA, Rosenberg M. Plasma interaction with microbes. *New J Phys* 2003;5:41.
- ²⁴⁸ Mi H.L., Bong Joo P., Soo Chang J., Dohyun K., Inho H., Jungsung K., Soon OH., Kie-Hyung C. & Jong-Chul P. 2009. «Removal and sterilization of biofilms and planktonic bacteria by microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure». *New J. Phys.* 11: 115022.
- ²⁴⁹ Vatansever F., de Melo W.C., Avci P., Vecchio D., Sadasivam M., Gupta A., et al. 2013. «Antimicrobial strategies centered around reactive oxygen species—bactericidal antibiotics, photodynamic therapy, and beyond». *FEMS Microbiology Reviews* 37:955–89.
- ²⁵⁰ Montie T.C., Kelly-Wintenberg K., Roth J.R. 2000. «An overview of research using the one atmosphere uniform glow discharge plasma (OAUGDP) for sterilization of surfaces and materials». *IEEE Transactions of Plasma Science* 28:41–50.
- ²⁵¹ Ben Said M., Masahiro O., Hassen A. 2010. «Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Qbeta phage». *Ann Microbiol* 60:121–127.
- ²⁵² Oliver J.D. 2005. «The viable but nonculturable state in bacteria». *J Microbiol* 43:93–100.
- ²⁵³ Cooper M., Fridman G., Fridman A., Joshi S.G.. 2010. «Biological responses of *Bacillus stratosphericus* to floating electrode-dielectric barrier discharge plasma treatment». *Journal of Applied Microbiology* 109:2039–48.

-
- ²⁵⁴ Bayliss D.L., Walsh J.L., Iza F., Shama G., Holah J., Kong M.G. 2012. «Complex responses of microorganisms as a community to a flowing atmospheric plasma». *Plasma Processes and Polymers* 9:597–611.
- ²⁵⁵ Abramzon N., Joaquin J.C., Bray J., Brelles-Marino G. 2006. «Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet». *IEEE Trans Plasma Sci* 34:1304–1309.
- ²⁵⁶ Joaquin J.C., Kwan C. Abramzon N., Vandervoort K., Brelles-Marino G. 2009. «Is gas-discharge plasma a new solution to the old problem of biofilm inactivation?». *Microbiology* 155:724-732.
- ²⁵⁷ Vleugels M., Shama G., Deng X.T., Greenacre E., Brocklehurst T. & Kong M.G. 2005. «Atmospheric plasma inactivation of biofilm-forming bacteria for food safety control». *IEEE Trans Plasma Sci* 33: 824–889.
- ²⁵⁸ Kamgang J.O., Briandet R., Herry J.M., Brisset J.L. & Natali M. 2007. «Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* using a gliding discharge in humid air». *J Appl Microbiol* 103:621–628.
- ²⁵⁹ Salamiou S., Kirkpatrick M.J., Ly H.M., Leblon G., Odic E. & DuBow M.S. 2009. «Augmented survival of bacteria within biofilms to exposure to an atmospheric pressure non-thermal plasma source». *Biotechnologi* 8:228–234.
- ²⁶⁰ Hadjilouka A., Andritsos N.D., Paramithiotis S., Mataragas M., Drosinos E.H. 2014. «*Listeria monocytogenes* Serotype Prevalence and Biodiversity in Diverse Food Products». *Journal of Food Protection* 77(12):2115–2120.
- ²⁶¹ Todhanakasem, T., and G.M. Young, 2008. «Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms». *Journal of Bacteriology* 190:6030-6034.
- ²⁶² Γκιαούρης Ε. & Νυχάς Γ.Ι. 2006 Προσκόλληση σε ανοξείδωτο χάλυβα από τη *Salmonella enteritidis* κατά την ανάπτυξη της σε διαφορετικά πρότυπα συστήματα επεξεργασίας τροφίμων: σημασία της μεσεπιφάνειας υγρού-αέρα και της διαθεσιμότητας των θρεπτικών στοιχείων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθήνας, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων.
- ²⁶³ Giaouris E.D., Nychas G.-J.E. 2006. «The adherence of *Salmonella Enteritidis* PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability». *Food Microbiology* 23:747–752.

-
- ²⁶⁴ Kathariou S. 2002. «*Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective». *Journal of Food Protection* 65:1811–1829.
- ²⁶⁵ Tompkin R.B. 2002. «Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment». *Journal of Food Protection* 65:709–725.
- ²⁶⁶ Blackman I.C., & Frank J.F. 1996. «Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces». *Journal of Food Protection* 59:827–83.
- ²⁶⁷ Chavant P., B. Gaillard-Martinie & M. Hebraud. 2004. «Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase». *FEMS Microbiology Letters* 236:241–248.
- ²⁶⁸ Holah J.T., Taylor J.H., Dawson D.J. & Hall K.E. 2002. «Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*». *Journal of Applied Microbiology* 92:111S–120S.
- ²⁶⁹ Boudam M.K., Moisan M., Saoudi B., Popovici C., Gherardi N., Massines F. 2006. «Bacterial spore inactivation by atmospheric-pressure plasmas in the presence or absence of UV photons as obtained with the same gas mixture». *Journal of Physics D: Applied Physics* 39:3494-3507.
- ²⁷⁰ Brandenburg R., Ehlbeck J. , Stieber M., Woedtke T.V., Zeymer J., Schlüter O., Weltmann K.D. 2007. «Antimicrobial Treatment of Heat Sensitive Materials by Means of Atmospheric Pressure Rf-Driven Plasma Jet Contribution». *Plasma Physics* 47:1-2.
- ²⁷¹ Ekem N., Akan T., Akgun Y., Kiremitci A., Pat S., Musa G. 2006. «Sterilization of *Staphylococcus aureus* by atmospheric pressure pulsed plasma». *Surface & Coatings Technology* 201:993-997
- ²⁷² Laroussi M., Leipold F. 2004. «Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure» *International Journal of Mass Spectrometry* 233:81-86.
- ²⁷³ Laroussi M., Minayeva O., Dobbs F.C., Woods J. 2006. «Spores Survivability after Exposure to Low-Temperature Plasmas» *IEEE Transaction on Plasma Science* 34:1253-1256.
- ²⁷⁴ Akishev Y.S., Grushin M.E., Karal'nik V.B., Monich A.E., Pan'kin M.V., Trushkin N.I., Kholodenko V.P., Chugunov V.A., Zhirkova N.A. 2005. «Sterilization/decontamination

of physiological solution and dry surface by non-thermal plasma created in bubbles and jet». Στο: *Proceedings of the 2nd International Workshop on Cold Atmospheric Pressure Plasmas*, pp.69–72.

²⁷⁵ Brelles-Marino G., Joaquin J.C., Bray J. & Abramzon N. 2009. «Is gas discharge plasma as a novel tool for biofilm destruction». *Microbiology* 155: (724–732).

²⁷⁶ Abramzon N., Joaquin J.C., Bray J. & Brelles-Marino, G. 2006. «Biofilm destruction by RF high-pressure cold plasma jet». *IEEE Transactions on Plasma Science IEEE Nuclear Plasma Sciences Society* 34:1304–1309.

²⁷⁷ Kamgang J.O., Briandet R., Herry J.M., Brisset J.L. & Naitali M. 2007. «Destruction of planktonic, adherent and biofilm cells of *Staphylococcus epidermidis* using a gliding discharge in humid air». *Journal of Applied Microbiology* 103:621–628.

²⁷⁸ Rantsiou K., Alessandria V., Urso R., Dolci P., Cocolin L. 2008. «Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR». *International Journal of Food Microbiology* 121:99-105.

²⁷⁹ Bremer J.P., Ian M. & Osborne M.C., 2001. «Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp.» *Journal of Food Protection* 64(9):1369-1376.

²⁸⁰ Du M., Chen J., Zhang X., Li A., Li Y., et al. 2007. «Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate». *Applied Environmental Microbiology* 73:1349-1354.

²⁸¹ Branford S. et al. 2006. «Rationale for the recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts in patients with chronic myeloid leukaemia». *Leukemia* 20:1925.

²⁸² Wong M.L. & Medrano J.F. 2005. «Real Time PCR for m-RNA quantitation» *Biotechniques*.

²⁸³ Characklis W.G., Marshall K.C. 1990. «Biofilms». *John Wiley & Sons Inc*, New York.

²⁸⁴ Hadilouka A., Andritsos N.D., Paramithiotis S., Mataragas M., Drosinos E.H. 2014. «*Listeria monocytogenes* Serotype Prevalence and Biodiversity in Diverse Food Products». *Journal of Food Protection* 77(12):2115–2120.

²⁸⁵ Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge, F., Call D.R., 2003. «Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*». *Applied Environmental Microbiology* 69:7336–7342.

²⁸⁶ Folsom J.P., Siragusa G.R. & Frank J.F., 2006. «Formation of biofilm at different nutrient levels by various genotypes of *Listeria monocytogenes*». *Journal of Food Protection* 69(4):826-834.

²⁸⁷ Tresse O., Shannon K., Pinon A., Malle P., Vialette M., Midelet-Bourdin G. 2007. «Variable adhesion of *Listeria monocytogenes* isolates from food-processing facilities and clinical cases to inert surfaces». *Journal of Food Protection* 70: 1569-1578.

²⁸⁸ Du M., Chen J., Zhang X., Li A., Li Y., et al. 2007. «Retention of Virulence in a Viable but Nonculturable *Edwardsiella tarda* Isolate». *Applied Environmental Microbiology* 73:1349-1354.

²⁸⁹ Van Houdt R., Michiels C.W. 2010. «Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface». *Journal of Applied Microbiology* 109(4):1117-31.

²⁹⁰ Πανούσης Ε. 2012. «Πραγματοποίηση και βελτιστοποίηση ενός αντιδραστήρα ψυχρού πλάσματος παραγόμενου σε ηλεκτρική εκκένωση διηλεκτρικού φράγματος σε ατμοσφαιρική πίεση : εφαρμογή στην επεξεργασία επιφανειών» Πανεπιστήμιο Πατρών. Τμήμα Ηλεκτρολόγων. Μηχανικών. και Τεχνολόγων. Υπολογιστών, Πάτρα.