

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**Μελέτη σχηματισμού βιοϋμενίου από τα παθογόνα
βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Salmonella*
enterica με ή χωρίς την παρουσία του βακτηρίου
*Streptococcus macedonicus***

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΚΑΝΔΑΡΑΚΗ Ι. ΕΙΡΗΝΗ

Επιβλέπων
Γεώργιος – Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ, 2016

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Μελέτη σχηματισμού βιοϋμενίου από τα παθογόνα βακτήρια *Staphylococcus aureus* και *Salmonella enterica* με ή χωρίς την παρουσία του βακτηρίου *Streptococcus macedonicus*

Κανδαράκη Ι. Ειρήνη

Χημικός, Τμήμα Θετικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Πατρών

M.Sc., Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων,

Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου, ΓΠΑ

Εξεταστική επιτροπή

Επιβλέπων

Γεώργιος – Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνων

Έφη Τσακαλίδου, Καθηγήτρια

Εργαστήριο Γαλακτοκομίας

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνων

Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής

Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνων

Στον πατέρα μου

Περίληψη

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα στη βιομηχανία τροφίμων είναι η ανάπτυξη βιοϋμενίων, παθογόνων και αλλοιωγόνων βακτηρίων, τα οποία επιμολύνουν τα τρόφιμα κατά την επεξεργασία τους, καθιστώντας τα πιθανή αιτία τροφिमογενών λοιμώξεων. Η κατανόηση του τρόπου με τον οποίο σχηματίζονται και αναπτύσσονται τα βιοϋμένια θα βοηθήσει σημαντικά στον περιορισμό τους και επομένως σε σαφώς ασφαλέστερα προϊόντα. Δύο από τους πιο σημαντικούς μικροοργανισμούς που σχετίζονται με τροφिमογενείς λοιμώξεις είναι οι *Staphylococcus aureus* και *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, και επομένως, η μελέτη της ικανότητας τους να δημιουργούν και να αναπτύσσονται σε βιοϋμένιο είναι μεγάλης σημασίας. Παράλληλα, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί και στη χρήση ωφέλιμων μικροοργανισμών με αντιμικροβιακή δραστηριότητα, με στόχο την εξασφάλιση ασφαλών προϊόντων. Ο *Streptococcus macedonicus* είναι ένα βακτήριο με δυνητικά μεγάλες δυνατότητες αξιοποίησης στον τομέα της βιοσυντήρησης κυρίως μέσω της παραγωγής βακτηριοσινών. Σε αυτό το πλαίσιο, αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου των παθογόνων βακτηρίων *Staph. aureus* και *S. Typhimurium*, παρουσία κυττάρων ή μεταβολικών προϊόντων του βακτηρίου *Str. macedonicus*.

Αρχικά, αξιολογήθηκε ο σχηματισμός βιοϋμενίου σε κουπόνια από ανοξείδωτο χάλυβα για τους παραπάνω μικροοργανισμούς σε μονοκαλλιέργειες, καθώς και σε μικτές καλλιέργειες του κάθε παθογόνου με τον *Str. macedonicus*. Η επώαση έλαβε χώρα στους 37 και 15°C για συνολικά 72 και 144 h, αντίστοιχα. Η αρχική προσκόλληση κυττάρων στα κουπόνια σε κάθε είδος καλλιέργειας αξιολογήθηκε στις 3 h επώασης στους 15°C σε αλατούχο διάλυμα, ενώ η βιοϋμενική ανάπτυξη μελετήθηκε σε θρεπτικό ζωμό κατά της διάρκεια της επώασης στις παραπάνω θερμοκρασίες. Δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη επίδραση του *Str. macedonicus* στην ανάπτυξη των παθογόνων. Παρόλα αυτά, η ανάπτυξη του *Str. macedonicus* φάνηκε να ευνοείται στα μικτά βιοϋμένια, ειδικά παρουσία της *S. Typhimurium*, παρά το γεγονός ότι η τελευταία αρχικά παρεμπόδιζε σε κάποιο βαθμό την προσκόλλησή του.

Παράλληλα με την ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια κάτω από τις παραπάνω συνθήκες, ελήφθησαν δείγματα-κουπόνια στις 72 h για τους 37°C και στις 144 h για τους 15°C, για μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας σε συσκευή Malthus. Η συσκευή μετρά την ηλεκτρική αγωγιμότητα, η οποία μεταβάλλεται όσο υπάρχει ανάπτυξη και επομένως αλλάζει η συγκέντρωση των μεταβολικών προϊόντων στο διάλυμα, και δίνει την τιμή χρόνου κατά την οποία αυτή σταθεροποιείται. Δυστυχώς, το πλήθος των δειγμάτων που έδωσε μετρήσιμη τιμή χρόνου εντοπισμού ήταν χαμηλό, επομένως δεν προέκυψαν συμπεράσματα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των παραπάνω παθογόνων σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας (cell-free culture supernatant, CFS) του *Str. macedonicus* σε συγκεντρώσεις 0, 20 και 40% (v/v), σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, και μέσω χρώσης κρυσταλλικού ιώδους και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (580nm). Τα αποτελέσματα φάνηκαν να συμβαδίζουν με εκείνα στην ανάπτυξη σε κουπόνια εκτός της περίπτωσης της *S. Typhimurium* στους 37°C και σε 40% CFS, που έδωσε μεγαλύτερη τιμή οπτικής πυκνότητας, υποδεικνύοντας μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου συγκριτικά με το μάρτυρα (0% CFS).

Παρομοίως, αξιολογήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των παθογόνων *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας παρουσία 0% και 40% (v/v) CFS του *Str. macedonicus*, σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα. Η επώαση έλαβε χώρα στους 37°C για 72 h και στους 15°C για 144 h. Η παρουσία του CFS δεν φάνηκε να επηρεάζει τη βιοϋμενική ανάπτυξη του *Staph. aureus*, αλλά φάνηκε να κρατά την ανάπτυξη της *S. Typhimurium* σε χαμηλότερα επίπεδα στο 40% από ότι στο 0% CFS. Ακόμη, στους 37°C, η προσκόλληση ήταν καλύτερη από ότι στους 15°C και η παρουσία του 40% CFS φάνηκε να επηρεάζει την προσκόλληση και των δύο παθογόνων σε σχέση με το μάρτυρα (0% CFS).

Τα δεδομένα της συγκεκριμένης μελέτης υποδεικνύουν ότι τα βιοϋμενία είναι δυναμικά συστήματα, και διάφοροι παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν σημαντικά την συμπεριφορά τους. Κατά συνέπεια, περαιτέρω έρευνα αναφορικά με την επίδραση διαφορετικών συνδυασμών ενδογενών και περιβαλλοντικών παραμέτρων στην ανάπτυξη βιοϋμενίου θα είχε μεγάλο ενδιαφέρον, και αναμένεται να

συμβάλλει στην καλύτερη κατανόηση των εμπλεκόμενων στη βιοϋμενική ανάπτυξη μηχανισμών αλλά και στο σχεδιασμό αποτελεσματικών τρόπων ελέγχου.

Λέξεις – κλειδιά: βιοϋμένιο, συγκαλλιέργεια, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus macedonicus*

Title

Biofilm formation study by the pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* with or without the presence of the bacterium *Streptococcus macedonicus*

Abstract

One of the biggest problems in the food industry is biofilm formation of pathogen and spoilage bacteria, which may contaminate foods during processing, rendering them potential causes of foodborne diseases. The understanding of the way in which biofilms are being formed is going to help significantly in their limitation and therefore, in the production of safer food products. Two of the most important foodborne pathogens are *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, and, hence, the study of their ability to grow in biofilms is of great significance. Alongside, the last years, an increased interest has been placed in the use of beneficial microorganisms, exhibiting antimicrobial activity, for the purpose of enhancing food safety. *Streptococcus macedonicus* is a bacterium with high exploitation potential in the field of biopreservation, mainly through bacteriocin production. In this context, the objective of this study was the evaluation of the biofilm-forming abilities of the pathogens *Staph. aureus* and *S. Typhimurium*, in the presence of cells or metabolic products of *Str. macedonicus*.

Initially, the biofilm formation behavior of the abovementioned pathogenic bacteria was assessed on stainless steel coupons, in both monospecies and mixed (i.e. dual species, suspensions of each pathogen with *Str. macedonicus*) bacterial suspensions. Cultures were incubated at 37 and 15°C for a total of 72 and 144 h, respectively. Cell attachment in each type of culture was evaluated at 3 h of incubation at 15°C in saline, while biofilm growth was assessed in broth during incubation at the above temperatures. No significant effect of *Str. macedonicus* on the biofilm growth of the studied pathogens was observed under the conditions of this study. On the other hand, the growth of *Str. macedonicus* in mixed biofilms seemed to be favored, especially in the presence of *S. Typhimurium*, despite the fact that the latter pathogen suppressed its initial attachment.

During biofilm development on coupons under the aforementioned conditions, coupons-samples were received at 72 h for 37°C and at 144 h for 15°C, for each case, for the measurement of electrical conductivity in a Malthus apparatus. The apparatus measures the electrical conductivity, which changes as long as there is growth and therefore, the concentration of metabolic products in the solution alters, and it gives the time value on which it is stabilized. Unfortunately, the volume of the samples that gave a measurable detection time was low, therefore no conclusions could be drawn.

Next, the biofilm-forming ability of the studied pathogens also was evaluated (under single culture conditions) in the presence of cell-free supernatant (CFS) of *Str. macedonicus* at concentrations 0%, 20% and 40% (v/v), in polystyrene microtiter plates, through the utilization of the crystal violet biofilm formation assay and optical density measurements (580nm). The results were consistent with those on growth on coupons, except for *S. Typhimurium* at 37°C and in the presence of 40% CFS, for which a higher optical density measurement was recorded, indicating a higher biofilm-forming ability compared to the control (0% CFS).

Likewise, the biofilm forming ability of the pathogens *Staph. aureus* and *S. Typhimurium* was evaluated in monoculture conditions in the presence of 0% and 40% (v/v) CFS of *Str. macedonicus*, on stainless steel coupons. Biofilm formation was evaluated during incubation at 37 and 15°C for a total of 72 and 144 h, respectively. The presence of CFS did not seem to affect the biofilm development of *Staph. aureus*, but it kept the growth of *S. Typhimurium* at lower levels in the presence of 40% CFS compared to its absence (0% CFS). Furthermore, at 37°C, the observed attachment (3 h of incubation) was better than that observed at 15°C, and the presence of 40% CFS seemed to affect the attachment of both pathogens compared to the control (0% CFS).

The collected data demonstrate that biofilms are dynamic systems, and that various factors may affect considerably their behavior. Hence, further research regarding the effect of different combinations of intrinsic and environmental parameters on biofilm development is warranted, and is expected to contribute to a better understanding of the underlying mechanisms as well as to the development of effective control interventions.

Keywords: biofilm, mixed culture, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus*,
Streptococcus macedonicus

Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Γεώργιο – Ιωάννη Νυχά, που μου έδωσε τη δυνατότητα να ερευνήσω μια νέα, για εμένα, επιστήμη, τη μικροβιολογία, να εργαστώ πάνω σε ένα θέμα με τεράστιο ενδιαφέρον, τα βιοϋμένια, και να διεξάγω τα πειράματά μου σε ένα εξαιρετικό εργαστήριο, το Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την κατανόηση, τη στήριξη και την ενθάρρυνσή του.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αγαπητή κ. Έφη Τσακαλίδου για την παραχώρηση του *Streptococcus macedonicus*, τις συμβουλές της και τη συνεργασία. Επιπλέον, θα ήθελα να την ευχαριστήσω για την πολύχρονη φιλία της και τη στήριξή της όλο αυτό τον καιρό.

Θα ήθελα, επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Ευστάθιο Πανάγου που δέχτηκε να διαβάσει και να κρίνει την εργασία μου, καθώς και για την πολύτιμη διδασκαλία του κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω, από καρδιάς, τη μεταδιδάκτορα Αλεξάνδρα Λιανού, για την αστείρευτη παροχή επιστημονικής γνώσης, την συνεχή υποστήριξη και ενθάρρυνσή της, την υπομονή, την βοήθεια και την καθοδήγησή της καθ'όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής αυτής της διατριβής. Θα ήθελα να την ευχαριστήσω, όπως επίσης και τη διδάκτορα Ελένη Γκάννα, για την εκμάθηση όλων των, νέων για εμένα, τεχνικών, για την εμπιστοσύνη, την ηθική και πρακτική υποστήριξή τους, για την φιλία τους.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την μεταδιδάκτορα Βασιλική Μπλάννα για τις συμβουλές της όπως και τον Αναστάσιο Σταματίου και την Σταματούλα Μπονάτσου, που με κατεύθυναν στο χώρο του εργαστηρίου, λύνοντας κάθε απορία σχετικά με τα υλικά και τον εξοπλισμό του. Οι συμβουλές τους βελτίωσαν τον τρόπο εργασίας μου. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους στο εργαστήριο, Αθηνά Αντουβά, Παναγιώτα Αγραφιώτη, Έφη Κογκάκη, Αναστασία Λύτου, Δημήτρη Παυλίδη, Αθηνά Γκρούντα, Πασχαλίτσα Τρυφινούπουλου, Παντελή Νατσκούλη και Λήδα Λάππα για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο εργασιακό περιβάλλον.

Περιεχόμενα

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
1.1	Βιοϋμένια	16
1.1.1.	Προσκόλληση κυττάρων	17
1.1.2.	Ώριμο βιοϋμένιο	19
1.1.3.	Διασπορά βιοϋμενίου	22
1.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.2.1.	Χαρακτηριστικά	24
1.2.2.	Παρουσία σε τρόφιμα	25
1.3	<i>Salmonella enterica</i>	26
1.3.1.	Χαρακτηριστικά	26
1.3.2.	Παρουσία σε τρόφιμα	28
1.4	<i>Streptococcus macedonicus</i>	29
1.4.1.	Χαρακτηριστικά	29
1.4.2.	Παρουσία σε τρόφιμα	32
1.5	Ασφάλεια	33
2.	ΣΚΟΠΟΣ	36
3.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1	Καλλιέργειες	37
3.2	Θρεπτικά υλικά	37
3.3	Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα	37
3.3.1.	Προετοιμασία εμβολίου	38
3.3.2.	Εμβολιασμός κουπονιών και ανάπτυξη βιοϋμενίου	38
3.3.3.	Δειγματοληψία και μικροβιολογικές αναλύσεις	39

3.4	Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τη συσκευή Malthus	40
3.5	Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχία (microtiter plate) πολυστυρενίου παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας <i>Str. macedonicus</i>	40
3.5.1.	Προετοιμασία εμβολίου και CFS	41
3.5.2.	Εμβολιασμός και επώαση μικροσυστοιχιών	42
3.5.3.	Χρώση κρυσταλλικού ιώδους και μέτρηση οπτικής πυκνότητας	43
3.6.	Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας <i>Str.macedonicus</i>	43
3.6.1.	Προετοιμασία εμβολίου και CFS	44
3.6.2.	Εμβολιασμός κουπονιών και ανάπτυξη βιοϋμενίου	44
3.6.3.	Δειγματοληψία και μικροβιολογικές αναλύσεις	45
3.7.	Ανάλυση δεδομένων	45
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	46
4.1	Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα	46
4.2	Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τη συσκευή Malthus	51
4.3	Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχία (microtiter plate) πολυστυρενίου παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας <i>Str.macedonicus</i>	55
4.4	Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας <i>Str.macedonicus</i>	58
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
	Βιβλιογραφία	65
6.	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	79

Ευρετήριο Πινάκων

Πίνακας 2.1	Διαλύματα αποστειρωμένου υπερκειμένου (cell-free supernatant, CFS) καλλιέργειας <i>Streptococcus macedonicus</i> στα οποία αξιολογήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των παθογόνων βακτηρίων <i>Staphylococcus aureus</i> και <i>Salmonella enterica</i> ser. Typhimurium	42
--------------------	---	----

Ευρετήριο Εικόνων

Εικόνα 1.1	Κύκλος ζωής του βιοϋμενίου: στάδιο προσκόλλησης, στάδιο σχηματισμού ώριμου βιοϋμενίου και στάδιο διασποράς των κυττάρων του (University of Leicester)	17
Εικόνα 4.1.1.	Βιοϋμένιο για μονοκαλλιέργεια <i>Staph.aureus</i> (αριστερά), για μονοκαλλιέργεια <i>Str. macedonicus</i> (μέση αριστερά), για μικτή καλλιέργεια <i>Staph.aureus</i> και <i>Str.macedonicus</i> (μέση δεξιά) και για μονοκαλλιέργεια <i>S.Typhimurium</i> (δεξιά) σε κουπόνι ανοξειδωτού χάλυβα μετά από επώαση στους 37°C για 72 h και χρώση με ακριδίνη	51

Ευρετήριο Γραφημάτων

Γράφημα 1.	Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια <i>Staph. aureus</i> και <i>Str. macedonicus</i>	47
Γράφημα 2.	Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια <i>Staph. aureus</i> και <i>Str. macedonicus</i>	48
Γράφημα 3.	Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια <i>S. Typhimurium</i> και <i>Str. macedonicus</i>	49
Γράφημα 4.	Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια <i>S. Typhimurium</i> και <i>Str. macedonicus</i>	50

Γράφημα 5.	Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 15°C σε δείγματα 144 h για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια <i>Staph. aureus</i> και <i>Str. macedonicus</i>	52
Γράφημα 6.	Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 37°C σε δείγματα 72 h για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια <i>Staph. aureus</i> και <i>Str. macedonicus</i>	53
Γράφημα 7.	Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 15°C σε δείγματα 144 h για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια <i>S. Typhimurium</i> και <i>Str. macedonicus</i>	54
Γράφημα 8.	Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 37°C σε δείγματα 72 h για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια <i>S. Typhimurium</i> και <i>Str. macedonicus</i>	55
Γράφημα 9.	ΔOD_{580nm} στους 15°C για καλλιέργεια <i>Staph. aureus</i> παρουσία 0%, 20% και 40% v/v CFS <i>Str. macedonicus</i>	56
Γράφημα 10.	ΔOD_{580nm} στους 37°C για καλλιέργεια <i>Staph. aureus</i> παρουσία 0%, 20% και 40% v/v CFS <i>Str. macedonicus</i>	56
Γράφημα 11.	ΔOD_{580nm} στους 15°C για καλλιέργεια <i>S. Typhimurium</i> παρουσία 0%, 20% και 40% v/v CFS <i>Str. macedonicus</i>	57
Γράφημα 12.	ΔOD_{580nm} στους 37°C για καλλιέργεια <i>S. Typhimurium</i> παρουσία 0%, 20% και 40% v/v CFS <i>Str. macedonicus</i>	58
Γράφημα 13.	Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log cfu/cm^2$) στους 15°C για καλλιέργειες <i>Staph. aureus</i> και <i>S. Typhimurium</i> παρουσία 0% και 40% v/v CFS <i>Str. macedonicus</i>	59
Γράφημα 14.	Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log cfu/cm^2$) στους 37°C για καλλιέργειες <i>Staph. aureus</i> και <i>S. Typhimurium</i> παρουσία 0% και 40% v/v CFS <i>Str. macedonicus</i>	60

Γράφημα 15. Συγκριτικό γράφημα του πληθυσμού βιοϋμενικών κυττάρων παθογόνου μικροοργανισμού που προσκολλήθηκαν (attachment) επί της επιφάνειας του κουπονιού ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C και 37°C για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία 0% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus* 61

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Βιοϋμένια

Για πολλά χρόνια, στην επιστήμη της μικροβιολογίας, οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονταν πάντα σε κυτταρικό επίπεδο ως πλαγκτονικά, ελεύθερα αιωρούμενα σε διάλυμα, κύτταρα και η μελέτη τους αφορούσε κυρίως στην ανάπτυξη τους και στα θρεπτικά μέσα τα οποία χρησιμοποιούσαν για να το πετύχουν. Ωστόσο, τα βιοϋμένια είναι μια άλλη μορφή που μπορούν να βρεθούν διάφοροι μικροοργανισμοί, κατά την οποία προσκολλώνται και αναπτύσσονται σε επιφάνειες, τόσο βιοτικές, όσο και αβιοτικές.

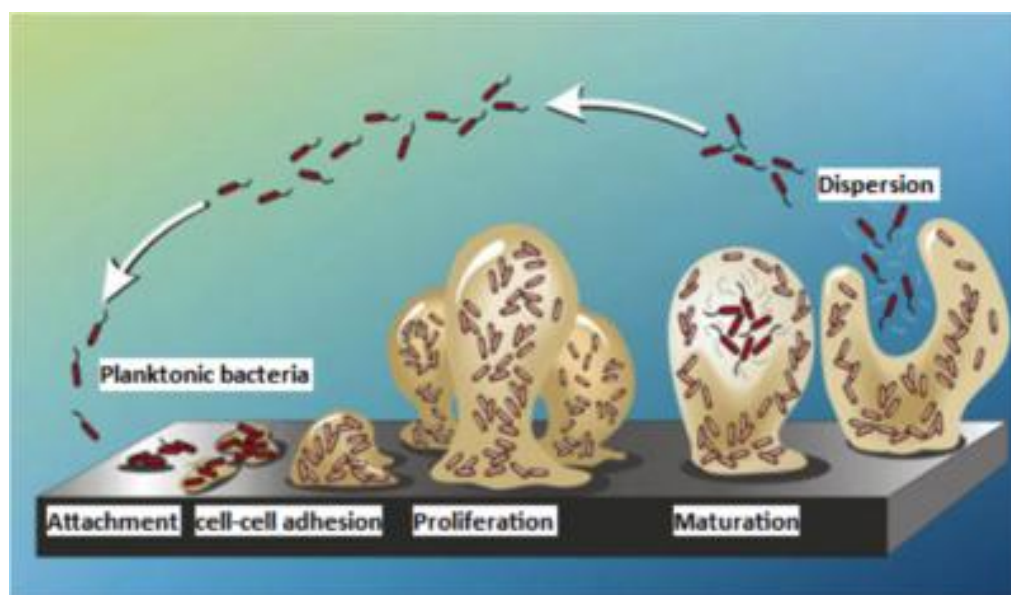
Ένα βιοϋμένιο αποτελείται από ένα σύνολο μικροβιακών κυττάρων προσκολλημένων σε μία επιφάνεια που συνήθως εσωκλείεται σε ένα, εξωκυτταρικής ουσίας, στρώμα. Οι Heukelekian και Heller (1940) μελέτησαν βιοϋμένια για θαλάσσιους μικροοργανισμούς και παρατήρησαν ότι η βακτηριακή ανάπτυξη ενισχύθηκε σημαντικά από την παρουσία της επιφάνειας και τη δυνατότητα προσκόλλησης σε αυτή.

Αργότερα, ο Zobell (1943) παρατήρησε ότι ο αριθμός των βακτηρίων σε επιφάνειες ήταν δραματικά μεγαλύτερος από τα ελεύθερα στο περιβάλλον μέσο. Στη συνέχεια, μέσω χρήσης ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, διαπιστώθηκε ότι ένα βιοϋμένιο μπορεί να αποτελείται από διαφορετικά είδη βακτηρίων και το υλικό που το περιβάλλει είναι, συνήθως, πολυσακχαριδικής φύσεως (Jones et al., 1969). Το 1973, μελετήθηκαν μικροβιακές βλέννες σε βιομηχανικά συστήματα αποβλήτων και φάνηκε ότι είναι πολύ επίμονα και ιδιαίτερα ανθεκτικά σε απολυμαντικά όπως η χλωρίνη (Characklis, 1973), ενώ το 1978 διατυπώθηκε μια θεωρία με στόχο την επεξήγηση των μηχανισμών δημιουργίας ενός βιοϋμενίου (Costerton et al., 1978).

Κατά το σχηματισμό ενός βιοϋμενίου, τα μικροβιακά κύτταρα προσκολλώνται αρχικά αντιστρεπτά και στη συνέχεια μη αντιστρεπτά (δεν απομακρύνονται με απλή έκπλυση), ενώ μέσα στη βλέννα πολυσακχαριδικής φύσεως η οποία αναπτύσσεται σε μεταγενέστερο στάδιο συνυπάρχουν και μη κυτταρικά υλικά τα οποία εξαρτώνται από την επιφάνεια πάνω στην οποία αναπτύσσεται το βιοϋμένιο.

Βιοϋμένια μπορούν να αναπτυχθούν σε μια πληθώρα βιοτικών και αβιοτικών επιφανειών συμπεριλαμβανομένων ζωντανών (φυτικών και ζωικών) ιστών, οστών,

ιατρικών συσκευών, σωληνώσεων και υδατικών συστημάτων (Donlan, 2002). Επιπλέον, φαίνεται να έχουν αναπτυχθεί συγκεκριμένοι μηχανισμοί για την αρχική προσκόλληση βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνειες, την ανάπτυξη ενός οικοσυστήματος και μια δομής «κοινότητας», όπως επίσης και για την αποκόλληση και διασπορά βιοϋμενικών κυττάρων.



Εικόνα 1.1: Κύκλος ζωής του βιοϋμενίου: στάδιο προσκόλλησης, στάδιο σχηματισμού ώριμου βιοϋμενίου και στάδιο διασποράς των κυττάρων του (University of Leicester).

<http://www2.le.ac.uk/departments/genetics/vgec/schoolscolleges/topics/microbial-genetics-1/infection/biofilms>

1.1.1. Προσκόλληση κυττάρων

Η προσκόλληση ενός μικροοργανισμού σε μία επιφάνεια είναι γενικά μια πολύπλοκη διαδικασία με πολλές μεταβλητές. Η στερεά-υγρή διεπαφή μεταξύ μιας επιφάνειας κι ενός υδατικού μέσου παρέχει ένα ιδανικό περιβάλλον για την προσκόλληση και ανάπτυξη των μικροοργανισμών, όμως παρόλα αυτά είναι πολλοί οι παράγοντες που μπορούν να την επηρεάσουν (Donlan, 2002).

Η στερεή επιφάνεια μπορεί να έχει σημαντικά χαρακτηριστικά για τη διαδικασία προσκόλλησης όπως, για παράδειγμα, το υλικό ή η τραχύτητα. Η έκταση

της αποίκησης φαίνεται να αυξάνεται καθώς αυξάνεται η τραχύτητα της επιφάνειας (Characklis et al., 1990). Επίσης, οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας έχουν μεγάλη επιρροή στο ποσοστό και την έκταση της προσκόλλησης. Έχει παρατηρηθεί ότι οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται ταχύτερα σε μη πολικές, υδροφοβικές επιφάνειες από ότι σε υδροφιλικά υλικά.

Τα συνήθη υλικά που χρησιμοποιούνται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων είναι το πλαστικό, το γυαλί, ο ανοξείδωτος χάλυβας και το ξύλο, υλικά τα οποία έχουν διάφορες ιδιότητες όπως η τραχύτητα και η υδροφοβικότητα που μπορούν να επηρεάσουν τη δύναμη της προσκόλλησης των κυττάρων (Van Houdt and Michiels, 2010). Επίσης, επιφάνειες εκτεθειμένες σε υδατικό περιβάλλον συσσωρεύουν και αναπτύσσουν στην επιφάνεια τους στρώμα οργανικών συστατικών προερχόμενο από την υδατική φάση και η μεταβολή αυτή επηρεάζει την προσκόλληση μικροβιακών κυττάρων (Loeb and Neihof, 1975). Βιοϋμένια, επίσης συναντώνται σε στρώματα πρωτεϊνικής φύσης όπως αυτά που αναπτύσσονται επάνω στα δόντια μέσα στη στοματική κοιλότητα. Άλλα χαρακτηριστικά που μπορεί να επηρεάσουν την προσκόλληση βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνειες μέσα σε υδατικά περιβάλλοντα είναι το pH, τα διαθέσιμα θρεπτικά συστατικά και η θερμοκρασία.

Η αρχική προσκόλληση σε επιφάνεια μπορεί να είναι αντιστρεπτή και οφείλεται στη μεταφορά των πλαγκτονικών κυττάρων σε εγγύτητα με μια επιφάνεια. Η βακτηριακή μεταφορά μπορεί να είναι παθητική ή ενεργητική. Η παθητική μεταφορά επιτυγχάνεται με φυσικούς μηχανισμούς όπως η κίνηση Brown, η βαρύτητα και οι υδροδυναμικές δυνάμεις του υγρού, ενώ η ενεργητική κατευθύνεται από οργανίδια της επιφάνειας όπως μαστίγια, τριχίδια, ινίδια κ.α. Μόλις το βακτηριακό κύτταρο έρθει σε κοντινή επαφή με την επιφάνεια, η προσκόλληση εξαρτάται από το άθροισμα των δυνάμεων έλξης και απώθησης μεταξύ της επιφάνειας του κυττάρου και του υποστρώματος. Αυτές οι δυνάμεις συμπεριλαμβάνουν δυνάμεις van der Waals, ηλεκτροστατικές δυνάμεις και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις (Chmielewski and Frank, 2003).

Όσο τα κύτταρα μπορούν ακόμα να αποκολληθούν και να επιστρέψουν στην πλαγκτονική φάση, λαμβάνει χώρα αντιστρεπτή προσκόλληση, η οποία παύει να υφίσταται από τη στιγμή που αρχίζει να παράγεται εξωκυτταρική ουσία. Η

εξωκυτταρική ουσία (EPS) είναι βιοσυνθετικά πολυμερή που διαφέρουν σημαντικά ως προς τη χημική τους σύνθεση ανάλογα με το είδος του βακτηρίου και μπορεί να συμπεριλαμβάνει πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, εξωκυτταρικό DNA (eDNA) και φωσφολιπίδια (Wingender et al., 1999). Εκτός από την εξωκυτταρική ουσία, διάφορα πρωτεϊνικά οργανίδια όπως τριχίδια και μαστίγια έχουν επίσης βρεθεί να συνεισφέρουν στην μόνιμη φάση προσκόλλησης (Stoodley et al., 2002).

Έχει παρατηρηθεί ότι η αύξηση στη συγκέντρωση κατιόντων ευνοεί την προσκόλληση βακτηριακών κυττάρων, μειώνοντας τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των κυττάρων και τις επιφάνειες, ενώ αντίστοιχη επίδραση έχει παρατηρηθεί και σε σχέση με τη συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών (Cowan et al, 1991).

Όσον αφορά στις ιδιότητες του κυττάρου, έχει παρατηρηθεί ότι κινητά (motile) κύτταρα προσκολλώνται πιο εύκολα και σε μεγαλύτερους αριθμούς από ότι μη κινητά κύτταρα (Korber et al, 1989). Ένας ακόμη σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την προσκόλληση των βακτηρίων σε αβιοτικές επιφάνειες είναι η θερμοκρασία. Η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τη φυσιολογία του κυττάρου όσον αφορά στη γονιδιακή έκφραση, να προκαλέσει αλλαγές στην επιφάνεια του κυττάρου και να προσδιορίσει το οικολογικό τους υπόβαθρο. Συνήθως, η θερμοκρασία μελετάται σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες, όπως το pH του θρεπτικού υλικού και οικολογικούς παράγοντες των στελεχών (Da Silva Meira et al., 2014, Dourou et al., 2011, Nascentes et al., 2012, Norwood and Gilmour, 2001, Speranza et al., 2011).

1.1.2.Ωριμο βιοϋμένιο

Οι πρώτοι αποικιστές διευκολύνουν την άφιξη και άλλων κυττάρων παρέχοντας περισσότερες και ποικίλες περιοχές προσκόλλησης και αρχίζοντας τη δημιουργία του σκελετού, που θα εξασφαλίσει τη συνοχή του βιοϋμενίου. Από τη στιγμή που θα αρχίσει η δημιουργία της αποικίας, το βιοϋμένιο αυξάνεται μέσω ενός συνδυασμού κυτταρικής διαίρεσης και συσσώρευσης μικροοργανισμών (Donlan, 2001).

Τα βιοϋμένια αποτελούνται κυρίως από μικροβιακά κύτταρα και εξωπολυσακχαρίτες. Οι τελευταίοι μπορεί να είναι ουδέτεροι, ανιονικοί (Gram-αρνητικά βακτήρια) ή κατιονικοί (Gram-θετικά βακτήρια). Το εξωκυτταρικό αυτό

στρώμα είναι επίσης ιδιαίτερα ενυδατωμένο, περικλείοντας μεγάλες ποσότητες ύδατος εντός της δομής του μέσω δεσμών υδρογόνου. Μπορεί όμως κατά περιπτώσεις να είναι και υδροφοβικό ή και τα δύο. Επίσης, μπορεί να διαφοροποιείται η διαλυτότητά του ακόμα και κατά τόπους μέσα στο ίδιο βιοϋμένιο. Ακόμη, διαφορετικοί μικροοργανισμοί παράγουν διαφορετικές ποσότητες εξωκυτταρικής ουσίας η οποία αυξάνεται όσο ωριμάζει το βιοϋμένιο και προστατεύει τα βιοϋμενικά κύτταρα από αντιμικροβιακούς και άλλους στρεσογόνους παράγοντες (Donlan, 2002).

Κάθε βακτηριακή βιοϋμενική «κοινότητα» είναι μοναδική. Παρόλα αυτά, υπάρχουν κάποια δομικά χαρακτηριστικά παρόμοια σε όλες τις περιπτώσεις (Tolker-Nielsen and Molin, 2000). Με το χρόνο, το βιοϋμένιο μετατρέπεται σε μια χαλαρότερη δομή με αποτέλεσμα να παρατηρείται κινητικότητα των κυττάρων μέσα στις μικροαποικίες. Πολλά από αυτά τα κύτταρα ξεφεύγουν από τα όρια του βιοϋμενίου οδηγώντας σε «σπάσιμο». Η δομή μπορεί επίσης να επηρεαστεί από τα συστατικά του περιβάλλοντος. Η βασική δομική μονάδα είναι η μικροαποικία, η οποία παρέχει ένα ιδανικό περιβάλλον για τη βαθμίδωση των θρεπτικών συστατικών, την ανταλλαγή γονιδίων και την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (quorum sensing), κατά την οποία τα βακτήρια χρησιμοποιούν την παραγωγή και την ανίχνευση εξωκυτταρικών χημικών ουσιών γνωστών ως «αυτεπαγωγείς» για την παρακολούθηση του πληθυσμού τους στο βιοϋμένιο (Camilli and Bassler, 2006).

Η επικοινωνία από κύτταρο σε κύτταρο φαίνεται να παίζει τεράστιο ρόλο στην προσκόλληση και αποκόλληση κυττάρων από το βιοϋμένιο. Πολλά βακτήρια μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ανάλογα με τις τρέχουσες συνθήκες και είτε να προσκολληθούν σε ένα ήδη υπάρχον βιοϋμένιο είτε να αποτρέψουν την προσκόλληση. Συγκεκριμένη έκφραση γονιδίων μπορεί να επηρεάσει και το σχηματισμό βιοϋμενίου. Από επαρκή πληθυσμό, οι ουσίες-σινιάλα μπορούν να παραχθούν σε συγκεντρώσεις ικανές να ενεργοποιήσουν γονίδια που εμπλέκονται στη διαφοροποίηση του βιοϋμενίου. Μπορούν, επομένως, με αυτό τον μηχανισμό, να επηρεαστούν διάφοροι παράγοντες όπως η προσκόλληση επιπλέον κυττάρων στο ήδη υπάρχον βιοϋμένιο, η πυκνότητα του πληθυσμού εντός του βιοϋμενίου και τυχόν ανταγωνισμός μεταξύ των κυττάρων (Guillier et al., 2008,

Leriche et al., 2000, Rao et al., 2005, Simoes et al., 2008, Tait et al., 2002) ή η αποκόλληση μέρους αυτού (Donlan, 2002).

Ανταγωνισμός μπορεί να προκύψει με εισβολή κυττάρων μικροοργανισμού διαφορετικού από αυτού που αποτελεί το βιοϋμένιο και τελικά επικράτηση του ενός ή του άλλου (James et al., 1995). Ακόμη, διαφορετικοί μικροοργανισμοί μπορούν να συνυπάρχουν ως σταθερή «κοινότητα» στο ίδιο βιοϋμένιο, με ενδεχόμενη διαφοροποίηση στην αναλογία και το ρυθμό ανάπτυξης στη μικτή καλλιέργεια σε σύγκριση με καθαρή μονοκαλλιέργεια (Stewart et al., 1997). Σε άλλες περιπτώσεις μικτού βιοϋμένιου, μπορεί να παρατηρηθεί ανάπτυξη ενός είδους ή στελεχούς ως βάση του βιοϋμένιου και ένα άλλο να δημιουργεί, τοπικά μέσα στο βιοϋμένιο ή στην εξωτερική του επιφάνεια, μικροαποικίες που ενδεχομένως να έχουν καλύτερη πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, κερδίζοντας έτσι ένα πολύ ανταγωνιστικό πλεονέκτημα (James et al., 1995).

Οι μικροοργανισμοί ανταγωνίζονται για θρεπτικά συστατικά, οξυγόνο και τον χώρο αποικισμού και παράλληλα αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων ειδών/στελεχών στο βιοϋμένιο. Προϊόντα μεταβολισμού που εκκρίνονται από κάποιο είδος μπορεί να προκαλέσουν τη θανάτωση ή την αναστολή ανάπτυξης άλλων ειδών. Από την άλλη πλευρά, σχέσεις συνεργασίας και προστασίας του ενός από το άλλο είδος επίσης μπορεί να παρατηρηθεί στα μικτά βιοϋμένια (Burmolle et al., 2006, Castonguay et al., 2006, Leriche et al., 2003, Reisner et al., 2006).

Η ωρίμανση των βιοϋμενίων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών στο περιβάλλον, τη διάχυση των θρεπτικών ουσιών στο εσωτερικό του βιοϋμένιου και την απομάκρυνση των προϊόντων μεταβολισμού. Επιπλέον, το pH, η θερμοκρασία, η διάχυση του O₂, η πηγή άνθρακα και η ωσμωτικότητα είναι σημαντικοί παράγοντες που ελέγχουν την ωρίμανση του βιοϋμένιου (Carpentier and Cerf, 1993, Costerton et al., 1995). Επίσης, η διεπιφάνεια αέρα-υγρού φαίνεται να βοηθά την αύξηση τον πληθυσμό του βιοϋμένιου (Giaouris and Nychas, 2006).

Πολλά παθογόνα φαίνονται να συσχετίζονται με βιοϋμένια, και πολλές φορές να αναπτύσσονται σε αυτά, μεταξύ αυτών και τα *Staphylococcus aureus* (Raad et al., 1992) και *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (Hood and Zottola, 1997). Αν και έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε επιφάνειες ή σε ήδη υπάρχοντα βιοϋμένια, ταυτόχρονα φαίνεται ότι κάποιες φορές δεν μπορούν να αναπτυχθούν

εκτενώς εντός του βιοϋμενίου, που μπορεί να οφείλεται στις διατροφικές τους ανάγκες ή στην ανικανότητά τους να ανταγωνιστούν τους αυτόχθονες μικροοργανισμούς (φυσική μικροχλωρίδα). Προφανώς, ανάλογα με το είδος του παθογόνου, οι μηχανισμοί αλληλεπίδρασης και ανάπτυξης διαφέρουν και μπορούν ενδεχομένως να ενισχυθούν από τη συσχέτιση και τις μεταβολικές αλληλεπιδράσεις με αυτόχθονες μικροοργανισμούς. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας ερευνητικής εργασίας, η *Salmonella Typhimurium* επιβίωσε σε ένα σύστημα – μοντέλο κατανομής, που περιείχε ετερότροφα βακτήρια από αφιλτράριστο αντίστροφης ώσμωσης σύστημα ύδατος, για περισσότερο από 50 ημέρες, γεγονός που δείχνει ότι η κανονική βιοϋμενική μικροχλωρίδα του συστήματος παρείχε συνθήκες ικανές να υποστηρίξουν την ανάπτυξη αυτού του οργανισμού (Camper et al., 1998).

1.1.3. Διασπορά βιοϋμενίου

Με το σχηματισμό του βιοϋμενίου, τα βακτήρια επιτυγχάνουν ένα πολύ αποτελεσματικό περιβάλλον προστασίας για να αναπτυχθούν με ασφάλεια. Μόλις, όμως, οι συνθήκες το επιτρέψουν ή το επιβάλλουν, με απώτερο πάντα στόχο την επιβίωση, τα βακτήρια αυτά επιχειρούν να μεταναστεύσουν για να δημιουργήσουν νέες αποικίες. Συχνά, οι συνθήκες επιβάλλουν τη μετανάστευση καθώς μπορεί να μειωθούν τα διαθέσιμα θρεπτικά και ο ανταγωνισμός να μεγαλώσει ή να υπάρξει μεγάλη συσσώρευση μεταβολικών προϊόντων. Θεωρείται λοιπόν ότι τόσο η σύνθεση, όσο και η αποικοδόμηση του βιοϋμενίου, είναι σημαντικές διαδικασίες του κύκλου των βακτηρίων στο φυσικό περιβάλλον (Gjermansen et al., 2005).

Βιοϋμενικά κύτταρα μπορούν να διασκορπιστούν με αποβολή θυγατρικών κυττάρων από ενεργά αναπτυσσόμενα κύτταρα, με αποκόλληση ως αποτέλεσμα των επιπέδων των διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών ή της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων (quorum sensing), ή με συνεχή απομάκρυνση μικρών τμημάτων του βιοϋμενίου ως αποτέλεσμα ροής κάποιου εφαπτόμενου υγρού (φυσική δύναμη/μηχανική αποκόλληση). Η αποκόλληση σχετίζεται, επίσης, με το είδος του μικροοργανισμού, επιτρέποντας τη μετάβαση από μια πολυπληθή αποικία σε άλλο σημείο με καλύτερες συνθήκες επιβίωσης και ανάπτυξης. Ο μηχανισμός αποβολής θυγατρικών κυττάρων δεν είναι πλήρως κατανοητός αλλά υπάρχουν ενδείξεις ότι

σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά υδροφοβικότητας της επιφάνειας των θυγατρικών κυττάρων (Gilbert et al., 1993). Στις περιπτώσεις μη διαθέσιμων θρεπτικών συστατικών και της επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων, ενεργοποιείται η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων και, επομένως, η παραγωγή ουσιών που διευκολύνουν την αποκόλληση μικρών τμημάτων του βιοϋμενίου. Ανάλογα τον μικροοργανισμό, αυτό μπορεί να λάβει χώρα σε διαφορετικές φάσεις της βιοϋμενικής ανάπτυξης.

Η αποκόλληση λόγω φυσικών δυνάμεων έχει μελετηθεί πολύ περισσότερο και δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην παρουσία τους. Οι βασικές διαδικασίες αποκόλλησης που σχετίζονται με εξωτερικές δυνάμεις είναι η διάβρωση, δηλαδή η συνεχής απομάκρυνση μικρών τμημάτων του βιοϋμενίου, η γρήγορη και μαζική αποκόλληση και η σταδιακή απόξεση λόγω της σύγκρουσης των σωματιδίων του ρέοντος υγρού με το σώμα του βιοϋμενίου (Donlan, 2002). Το επίπεδο διάβρωσης αυξάνεται με την αύξηση της πυκνότητας του βιοϋμενίου (Characklis, 1990). Με αύξηση της ταχύτητας ροής μειώνεται το οριακό υδροδυναμικό επίπεδο, οδηγώντας σε αναταράξεις κοντά στην επιφάνεια του βιοϋμενίου. Η απόξεση παρατηρείται κυρίως σε πιο παχιά βιοϋμένια και μπορεί επίσης να σχετιστεί με τη διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και του οξυγόνου.

Ο τρόπος αποκόλλησης αναμένεται να επηρεάσει τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά του μικροοργανισμού. Αν έχουν αποκολληθεί κομμάτια του βιοϋμενίου, είναι πολύ πιθανό να κρατήσουν χαρακτηριστικά του βιοϋμενίου, όπως αντιμικροβιακές ιδιότητες, ενώ η αποκόλληση μεμονωμένων κυττάρων μπορεί να οδηγήσει άμεσα σε πλαγκτονικό φαινότυπο των τελευταίων (Donlan, 2002).

1.2 *Staphylococcus aureus*

1.2.1. Χαρακτηριστικά

Ο όρος “staphylococci” περιγράφει μια ομάδα σφαιρικών Gram-θετικών χημειοοργανότροφων βακτηρίων, θετικών στο τεστ καταλάσης (Doyle et al., 1997). Σύμφωνα με το Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology οι σταφυλόκοκκοι ανήκουν στην οικογένεια Micrococcaceae μαζί με τα γένη *Micrococcus* και *Planococcus*. Το γένος *Staphylococcus* υποδιαιρείται σε 23 είδη και υποείδη. Αν και πολλά από αυτά τα είδη έχουν τη δυνατότητα να παράγουν εντεροτοξίνες, σχεδόν όλες οι περιπτώσεις σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης αποδίδονται στον *Staphylococcus aureus*, ο οποίος παράγει σταφυλοκοκκικές εντεροτοξίνες υπεύθυνες για τροφιμογενείς τοξινώσεις (FDA, 2012, Montville and Matthews, 2008).

Ο *Staph. aureus* είναι από τα πιο ανθεκτικά μη σπορογόνα παθογόνα, και μπορεί να επιβιώσει σε συνθήκες χαμηλής ενεργότητας ύδατος για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Γενικά, η ανάπτυξη και η επιβίωσή του εξαρτάται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών (σύσταση τροφίμου) (Doyle et al., 1997). Η θερμοκρασία ανάπτυξής του κυμαίνεται από 7 έως 48°C, με βέλτιστη τιμή τους 37°C, και μπορεί να θανατωθεί με θερμική επεξεργασία των τροφίμων όπως το μαγείρεμα ή η παστερίωση, αλλά σχετικά δύσκολα. Είναι προαιρετικά αναερόβιος και θεωρείται σχετικά θερμοανθεκτικός (Stewart, 2003).

Η τοξίνωση από σταφυλόκοκκο προκαλείται από κατανάλωση τροφίμου στο οποίο έχει ήδη παραχθεί εντεροτοξίνη (Argudin et al., 2010). Από τους διάφορους τύπους τοξινών που παράγει ο *Staph. aureus*, η εντεροτοξίνη A είναι η συνηθέστερη σε περιπτώσεις τροφιμογενών λοιμώξεων. Οι τοξίνες παράγονται κυρίως στην εκθετική φάση (Pinchuk et al., 2010) και είναι ιδιαίτερα ανθεκτικές στη θερμότητα.

Οι πληθυσμοί *Staph. aureus* που μπορούν να παράγουν ικανή ποσότητα εντεροτοξίνης ώστε να προκαλέσουν ασθένεια κυμαίνονται στα 10^5 με 10^8 cfu/g (Montville and Matthews, 2008).

Η λοίμωξη από σταφυλόκοκκο παρουσιάζει συμπτώματα μετά από 2 έως 6 ώρες από την κατανάλωση του μολυσμένου τροφίμου, και τα οποία είναι διάρροια, έμετος, ναυτία, πόνος στην κοιλιακή χώρα και, σε σοβαρότερες περιπτώσεις, μυϊκές συσπάσεις, αρρυθμία, πονοκέφαλος και μεταβολές της πίεσης. Η ανάρρωση λαμβάνει χώρα μέσα στις επόμενες μέρες από τη μόλυνση και εμφάνιση των συμπτωμάτων (Stewart, 2003) και είναι πολύ σπάνια θανατηφόρα (Montville and Matthews, 2008).

Ο *Staph. aureus* έχει αποδειχθεί ότι είναι ιδιαίτερα δύσκολο να αντιμετωπιστεί με τις συνήθεις θεραπείες με αντιβιοτικά, κυρίως λόγω του μεγάλου βαθμού φυσικής αντίστασης που διαθέτει σε αντιμικροβιακές ενώσεις. Κατά επέκταση, όταν αναπτύσσεται σε βιοϋμένιο καθίσταται ακόμη πιο ανθεκτικός σε ακόμη ισχυρότερα αντιβιοτικά (Cunningham and Cheesbrough, 1992, Isiklar et al., 1996, Raad et al., 1995, Vergeres and Blaser, 1992). Επιπλέον, τα Gram-θετικά βακτήρια, όπως ο *Staph. aureus*, παράγουν εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες όταν αναπτύσσονται σε μία επιφάνεια (O'Toole et al., 2000), κατά τρόπο, ο οποίος εξαρτάται από τη φάση που βρίσκεται ο μικροοργανισμός. Η αυξημένη παραγωγή εξωκυτταρικής ουσίας είναι ανάλογη με την ικανότητα του στελέχους να σχηματίζει βιοϋμένια σε ένα σύστημα *in vitro* (O'Toole et al., 2000).

1.2.2. Παρουσία σε τρόφιμα

Η εμφάνιση της σταφυλοκοκκικής δηλητηρίασης είναι εποχιακή και δείχνει αυξημένη συχνότητα το καλοκαίρι λόγω υψηλότερης θερμοκρασίας και ακατάλληλης αποθήκευσης των τροφίμων (Montville and Matthews, 2008). Τα υπεύθυνα για τις λοιμώξεις τρόφιμα είναι το κρέας και τα προϊόντα αυτού, τα πουλερικά, τα αυγά και τα προϊόντα αυτών, το γάλα, τα γαλακτοκομικά, οι σαλάτες και τα σάντουιτς (έτοιμα προς κατανάλωση τρόφιμα). Επίσης, επίφοβα είναι τα τρόφιμα εκείνα που απαιτούν εκτεταμένους χειρισμούς και διατηρούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για μεγάλες χρονικές περιόδους (Argudin et al., 2010, FDA, 2012).

Λόγω της εξαιρετικής ανθεκτικότητάς του *Staph. aureus*, διευκολύνεται η επιμόλυνση και ανάπτυξή του στα τρόφιμα. Ο πιο συνήθης τρόπος επιμόλυνσης τροφίμων με *Staph. aureus* είναι μέσω του δέρματος ή του αναπνευστικού

συστήματος ατόμων που χειρίζονται ή προετοιμάζουν τρόφιμα, όπως επίσης και από διάφορα επιμολυσμένα σκεύη και συσκευές που χρησιμοποιούνται κατά την προετοιμασία και την επεξεργασία τροφίμων. Παράγοντες όπως η μη ικανοποιητική ψύξη, η προετοιμασία κάποιου τροφίμου πολύ νωρίτερα από τη ώρα της κατανάλωσης, η κακή υγιεινή του χώρου και των εργαζομένων, μη επαρκές μαγείρεμα ή ζέσταμα των προς κατανάλωση τροφίμων ή παρατεταμένη αναμονή τους σε θερμαινόμενους δίσκους σερβιρίσματος, ευνοούν την αύξηση του βακτηρίου και την παραγωγή τοξινών. Ένας επίσης σημαντικός τρόπος επιμόλυνσης τροφίμων με *Staph. aureus* είναι τα ζώα φορείς που μπορούν να επιμολύνουν τα προϊόντα τους όπως το γάλα και το κρέας (Doyle et al., 1997). Είναι, ως εκ τούτου, εμφανής η αναγκαιότητα πιστής εφαρμογής ορθών πρακτικών υγιεινής (Good Hygiene Practices), επαρκών προγραμμάτων καθαρισμού και εξυγίανσης καθώς συστημάτων διασφάλισης ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων (Pui et al., 2011).

1.3 *Salmonella enterica*

1.3.1. Χαρακτηριστικά

Τα βακτήρια του γένους *Salmonella* ονομάστηκαν έτσι από τον επιστήμονα που τα ανακάλυψε, τον Dr. Daniel Salmon (Doyle et al., 1997). Η *Salmonella enterica* είναι Gram-αρνητικό παθογόνο βακτήριο που μπορεί να βρεθεί κυρίως εντός του εντερικού αυλού. Ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae, περιλαμβάνει πάνω από 2500 ορότυπους και διανέμεται ανά την υφήλιο σε όλα τα θερμοαίμα ζώα και στο περιβάλλον (Doyle et al., 1997).

Το βακτήριο *S. enterica* προκαλεί γαστρεντερίτιδα που χαρακτηρίζεται από διάρροια, πόνους στην κοιλιακή χώρα, έμετο και ναυτία. Ο χρόνος επώασης για την εκδήλωση των συμπτωμάτων είναι 12 με 72 ώρες και η διάρκεια των συμπτωμάτων είναι 2 με 7 ημέρες. Η μόλυνση γίνεται μέσω της επαφής με κάποιο ασθενή ή φορέα του βακτηρίου, αλλά πιο συχνά μέσω της κατανάλωσης κάποιου μολυσμένου τροφίμου. Παρόλα αυτά, σε ευπαθείς πληθυσμιακές ομάδες όπως νεογνά, παιδιά, ηλικιωμένοι, έγκυοι ή ανοσοκατεσταλμένα άτομα, οι μολύνσεις από *Salmonella* μπορούν να αποβούν μοιραίες αν δεν αντιμετωπιστούν έγκαιρα με τα κατάλληλα αντιβιοτικά. Για ένα υγιή ενήλικα υπολογίζεται ότι ο αριθμός των

κυττάρων που πρέπει να καταναλώσει έτσι ώστε να νοσήσει κυμαίνεται πάνω από τις 10.000 κύτταρα. Όμως, σε πολλές περιπτώσεις εκδήλωσης της νόσου υπήρξε κατανάλωση πολύ μικρότερου αριθμού κυττάρων. Συνήθως, σε αυτές τις περιπτώσεις είχαν καταναλωθεί τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη τα οποία συνέβαλαν στην επιβίωση των κυττάρων του παθογόνου στο χαμηλό pH του στομάχου (Montville and Matthews, 2010). Υπολογίζεται ότι σε παγκόσμιο επίπεδο, τα ανθρώπινα κρούσματα σαλμονέλωσης ανέρχονται ετησίως στα 93,8 εκατομμύρια, οδηγώντας σε 155.000 θανάτους, με τεράστιο κόστος για τα συστήματα Δημόσιας Υγείας (Majowicz et al., 2010, Mather et al., 2013).

Η *Salmonella* αναπτύσσεται ενεργά σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών ($\leq 54^{\circ}\text{C}$), αλλά είναι ανησυχητικό ότι μπορεί να αναπτυχθεί και σε τρόφιμα στους 2 και 4 °C. Επιπροσθέτως, αν τα κύτταρα της έχουν εκτεθεί προηγουμένως σε χαμηλές θερμοκρασίες αυξάνεται σημαντικά η δυνατότητα επιβίωσης και ανάπτυξης ακόμη και σε καταψυγμένα τρόφιμα (Doyle et al., 1997).

Η επιβίωση της *S. Typhimurium* μετά από έκθεση σε συνθήκες περιβαλλοντικής καταπόνησης είναι αποτέλεσμα των αξιολογών στρατηγικών προσαρμογής που διαθέτει, και σχετίζεται με την παθογένεια της (Audia et al., 2001). Για παράδειγμα, κύτταρα *S. Typhimurium*, τα οποία είχαν εκτεθεί σε ήπιες όξινες συνθήκες (pH 4.5–5.8) μπορούν σταδιακά να επιβιώσουν και σε ακραία όξινα περιβάλλοντα (Audia et al., 2001, Bang et al., 2002), χρησιμοποιώντας την απόκριση ανοχής οξέος (acid tolerance response, ATR) (Foster, 1995, Rychlik and Barrow, 2005), δίνοντας έτσι στα κύτταρα τη δυνατότητα να προσαρμοστούν. Η προσαρμογή με τη σειρά της σημαίνει ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει σε όξινα περιβάλλοντα (Leyer and Johnson, 1992, Leyer et al., 1995), τα οποία συχνά χρησιμοποιούνται για τη συντήρηση των τροφίμων, ενώ επίσης όξινα απολυμαντικά μπορεί να χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Επιπροσθέτως, η προσαρμογή σε όξινες συνθήκες μπορεί να επιτρέψει στη *Salmonella* να επιβιώσει της έκθεσης σε άλλα σημαντικά, σχετικά με τα τρόφιμα, στρες όπως η θερμότητα (Buchanan et al., 1999, Leyer and Johnson, 1992).

Επίσης η *Salmonella* μπορεί να προστατευθεί από την περιβαλλοντική καταπόνηση δημιουργώντας βιοϋμένιο. Λόγω της δομής του, το βιοϋμένιο προστατεύει τα κύτταρα και προσφέρει υψηλό βαθμό αντίστασης σε

αντιμικροβιακούς παράγοντες (Carpentier and Cerf, 1993, Davey and O'Toole, 2000), σε βιοκτόνα (Finlay and Callow, 1997) και απολυμαντικά (Gilbert et al., 2001). Η ανάπτυξη βιοϋμενίου μπορεί να λάβει χώρα σε μη ικανοποιητικώς απολυμασμένες επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, από κύτταρα του παθογόνου τα οποία κατάφεραν να επιβιώσουν των εφαρμοζόμενων εμπορικών απολυμαντικών (Taormina and Beuchat, 2002). Η ικανότητα δημιουργίας βιοϋμενίου είναι πολύ σημαντικός παράγοντας και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη όταν γίνεται αναφορά στην ασφάλεια των τροφίμων και την αποφυγή τροφιμογενών λοιμώξεων (Clouser et al., 1995). Η δημιουργία βιοϋμενίου επιτρέπει στη *Salmonella* να επιβιώσει σε χαμηλή διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, χαμηλή θερμοκρασία (Costerton et al., 1995), χαμηλό pH και υψηλή αλατότητα (Karfhammer et al., 2005). Η ικανότητα δημιουργίας βιοϋμενίου της *Salmonella* μπορεί να διαφέρει ανάλογα με το υλικό της επιφάνειας στην οποία προσπαθεί να προσκολληθεί (O'Leary et al., 2015). Επίσης, κύτταρα που είναι ικανά να δημιουργήσουν βιοϋμένιο σε ουδέτερο pH, ίσως επηρεαστούν από την παρουσία όξινων συνθηκών στην ικανότητά τους αυτή. Ακόμη, κύτταρα βιοϋμενίου σε εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων, μπορούν να αποκολληθούν κατά τη διάρκεια απολύμανσης με όξινη έκπλυση. Αυτά τα προσαρμοσμένα σε όξινες συνθήκες, και ως εκ τούτου πιο ανθεκτικά, κύτταρα μπορεί να κυκλοφορήσουν στο σύστημα και το περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων και να επιμολύνουν τα τρόφιμα με άμεση επαφή (Skandamis et al., 2009).

1.3.2. Παρουσία σε τρόφιμα

Τα τρόφιμα που φαίνεται να φέρουν μεγαλύτερα φορτία *Salmonella* και ενοχοποιούνται περισσότερο για την παρουσία του παθογόνου και τη μετάδοσή του στον άνθρωπο είναι τα αυγά, το κρέας πουλερικών και τα παράγωγά τους. Παρά το γεγονός ότι προϊόντα ζωικής προέλευσης (αυγά, κρέας, γάλα και τυρί) έχουν συχνά κατηγορηθεί ως φορείς *S. enterica*, τα τελευταία χρόνια, έχουν παρουσιαστεί πολλά κρούσματα σαλμονέλλωσης και από κατανάλωση φυτικών προϊόντων, όπως φρέσκα φρούτα και λαχανικά (Cumplings et al., 2001, Hedburg et al., 1999).

1.4 *Streptococcus macedonicus*

1.4.1. Χαρακτηριστικά

Μέσα στην ομάδα των οξυγαλακτικών βακτηρίων υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα ως προς τη παθογένεια που μπορούν να προκαλέσουν κάποια γένη σε σχέση με άλλα που είναι ακίνδυνα για τον άνθρωπο και τα ζώα. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται πολύ ξεκάθαρα στην περίπτωση των στρεπτόκοκκων. Οι παθογόνοι στρεπτόκοκκοι έχουν κατηγορηθεί για μια πληθώρα ασθενειών από χαμηλής επικινδυνότητας όπως η φαρυγγίτιδα έως πολύ επιθετικές και ενδεχομένως θανάσιμες (Nobbs et al., 2009). Ανάμεσα στους στρεπτόκοκκους *sensu lato* που είναι κυρίως παθογόνα βακτήρια για τον άνθρωπο και τα ζώα, ένα είδος είναι αποδεδειγμένα ασφαλές για χρήση, ο *Streptococcus thermophilus*, στελέχη του οποίου χρησιμοποιούνται κυρίως στην παρασκευή γιαούρτης και μερικών τύπων τυριού (Delcour et al., 2000). Σχετικά πρόσφατα, στην κατηγορία των ασφαλών στρεπτόκοκκων έχει προστεθεί και ο *Streptococcus macedonicus*.

Ο *Str. macedonicus* περιγράφηκε πρόσφατα και ανήκει στο σύμπλεγμα *S. bovis/S. equines*. Πρόκειται για ένα θερμόφιλο, ομοζυμωτικό στρεπτόκοκκο. Απομονώθηκε για πρώτη φορά από το φυσικά ζυμώμενο, ελληνικό τυρί Κασέρι. Τα στελέχη του είναι μετρίως οξειδωτικά και πρωτεολυτικά, και κάποια από αυτά παράγουν βακτηριοσίνες και εξωπολυσακχαρίτες. Αυτές οι φυσιολογικές και τεχνολογικές ιδιότητες τον καθιστούν πολυχρηστικό ως πιθανό επιπρόσθετο καλλιέργειας στην παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων (De Vuyst and Tsakalidou, 2008).

Τα ζυμούμενα τρόφιμα και ποτά παρασκευάζονται με τη χρήση μικροοργανισμών, είτε με back-slopping είτε με άμεση προσθήκη επιλεγμένης αρχικής καλλιέργειας (starter culture) βακτηρίων, ζυμών ή/και μυκήτων. Παγκοσμίως, τα οξυγαλακτικά βακτήρια αποτελούν την πλειονότητα σε όγκο και αξία των εμπορικών αρχικών καλλιεργειών, με το μεγαλύτερο ποσοστό να χρησιμοποιείται στη βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων (Hansen, 2002). Αρκετά είδη αυτής της ομάδας έχουν μακρά ιστορία στην ασφαλή χρήση κατά την ζύμωση τροφίμων και αυτό τα κατατάσσει στα λίγα αυτά βακτήρια που τηρούν όλες τις προδιαγραφές για την καταχώρισή τους ως «γενικά θεωρούμενα ως ασφαλή»

(GRAS) και «τεκμηριωμένα ως ασφαλή» (QPS) από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α. (FDA) και την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων (EFSA), αντίστοιχα (Donohue and Gueimonde, 2012).

Την τελευταία δεκαετία γαλακτοκομικοί, τύπου *S. thermophilus*, μικροοργανισμοί έχουν ταυτοποιηθεί, εξαιτίας του ασυνήθιστου τύπου ζύμωσης των υδατανθράκων και/ή του διαφορετικούντουσ γενότυπου, σε σύγκριση με εκείνα των στελεχών του *S. thermophilus sensu stricto* (Moschetti et al., 1998), αλλά δεν είχαν μελετηθεί εκτενώς. Ωστόσο, δύο συνώνυμα στελέχη, ο *Str. macedonicus* (Tsakalidou et al., 1998) και ο *S. waius* (Flint et al., 1999), έχουν περιγραφεί λεπτομερώς, γεγονός που έριξε φως στη μη ταξινομημένη ομάδα των μικροοργανισμών τύπου *S. thermophilus*. Οι μελέτες για τον *Str. macedonicus* που ακολούθησαν, αποκάλυψαν τις φυσιολογικές και τεχνολογικές του ιδιότητες.

Ο *Str. macedonicus* ονομάστηκε από το μέρος στο οποίο ανακαλύφθηκε, τη Μακεδονία, και απομονώθηκε κατά τη διάρκεια μίας έρευνας της οξυγαλακτικής μικροχλωρίδας του τυριού Κασέρι, από γάλα προβάτου (Tsakalidou et al., 1994, 1998). Το στέλεχος, αποδείχθηκε ότι ανήκει στην ετερογενή ομάδα *S. bovis* 16S rRNA, ενώ ο *S. thermophilus*, που μοιράζεται το ίδιο φυσικό περιβάλλον ανήκει στην ομάδα του *S. salivarius* 16S rRNA (Tsakalidou et al., 1998). Οι *Str. macedonicus* και *S. waius* περιλαμβάνονται στο σύμπλεγμα *S. bovis/S. equines* με βάση την αλληλουχία του 16S rRNA τους. Πρόσφατα, η ταξινόμηση στο σύμπλεγμα *S. bovis/S. equines* αναθεωρήθηκε, και προτάθηκε το όνομα *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* (Schlegel et al., 2003). Οι γαλακτοκομικοί στρεπτόκοκκοι, όπως ο *S. thermophilus* και ο *Str. macedonicus*, σχετίζονται επίσης με παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται από ακατέργαστο γάλα και χωρίς τη χρήση αρχικής καλλιέργειας (Mora, Ricci, Guglielmetti, Daffonchio, Fortina, 2003).

Ο *Str. macedonicus* παρουσιάζει σύνθετες διατροφικές ανάγκες: απαιτεί την προσθήκη κατάλληλων πηγών αζώτου όπως εκχύλισμα ζύμης για μεγαλώσει σε deMan Rogosa and Sharpe (MRS) θρεπτικό μέσο και να αποδώσει καλά σε θρεπτικό υπόστρωμα γάλακτος (Georgalaki et al., 2000, 2002, Van den Berghe et al., 2006). Η ανάπτυξή του λαμβάνει χώρα μεταξύ 25 και 45 °C και pH μεταξύ 5,0 και 8,5 (Van den Berghe et al., 2006). Αν και η ανάπτυξή του ακολουθεί το μεσόφιλο και θερμόφιλο φάσμα θερμοκρασίας, ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198 αναπτύσσεται

βέλτιστα στους 42,3 °C, σύμφωνα με τη μελέτη των δεδομένων ανάπτυξης κάνοντας χρήση δευτερογενούς μοντέλου (secondary modeling) (Van den Berghe et al., 2006). Το βέλτιστο pH ανάπτυξης (pH 6,4) του *Str. macedonicus* ACA-DC 198 αντιστοιχεί στο pH ακατέργαστου γάλακτος αγελάδος, υπογραμμίζοντας έτσι τον πιθανό ρόλο του στη ζύμωση του γάλακτος. Το στέλεχος αυτό δεν αναπτύσσεται κάτω από τους 10 και πάνω από τους 49 °C και κάτω από pH 4,6 και πάνω από pH 8,9 (Van den Berghe, 2005, Van den Berghe et al., 2006).

Ο *Str. macedonicus* είναι μετρίως οξειδωτικός και πρωτεολυτικός, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να οξειδώσει το γάλα ως μόνη αρχική καλλιέργεια. Όμως η συμμετοχή του στην υδρόλυση των λιπών, στην κατανάλωση του κιτρικού και στην υδρόλυση της καζεΐνης στο γάλα δείχνουν την χρησιμότητά του σαν επιπρόσθετο ή σαν συγκαλλιέργεια (Georgalaki et al., 2000). Από μελέτη σε 32 στελέχη *Str. macedonicus*, δεν βρέθηκε παραγωγός εξωπολυσακχαριτικής ουσίας (ESP) (Georgalaki et al., 2000).

Όμως, ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198 παράγει τη βακτηριοσίνη μασεδοσίνη (Georgalaki et al., 2000). Η μασεδοσίνη είναι ενεργή σε pH μεταξύ 4,0 και 9,0, αντέχει της αποστείρωσης και είναι ευαίσθητη στη ρεννίνη μόνο μετά από 24 ώρες επώασης (Georgalaki et al., 2002). Η μασεδοσίνη παράγεται μόνο όταν ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198 αναπτύσσεται στο γάλα (Georgalaki et al., 2002, Van den Berghe et al., 2006). Η βέλτιστη θερμοκρασία παραγωγής της μασεδοσίνης (20-25°C) είναι σημαντικά χαμηλότερη από την βέλτιστη ανάπτυξης του βακτηρίου (42,3°C) (Van den Berghe et al., 2006). Δεν έχει παρατηρηθεί παραγωγή μασεδοσίνης όταν ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198 μεγαλώνει σε θρεπτικό υπόστρωμα MRS ή σε αποβουτυρωμένο γάλα χωρίς συμπληρωματικές πηγές αζώτου. Παρατηρήθηκε όμως, ότι η παραγωγή δεν εξαρτάται από την παρουσία λακτόζης ή γαλακτόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα άλλα φαίνεται να διεγείρεται από την παρουσία ενός ή περισσότερων θερμοσταθερών πρωτεϊνικών συστατικών που παράγονται όταν ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198 αναπτύσσεται στο γάλα. Αυτή είναι η πρώτη φορά που αναφέρεται πως θραύσματα αποικοδόμησης πρωτεΐνης γάλακτος επάγουν την παραγωγή μιας βακτηριοσίνης (Georgalaki et al., 2010). Αργότερα, ανακαλύφθηκε ότι ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198 παράγει μια ακόμη βακτηριοσίνη, τη μασεδοβισίνη, καθώς παρατηρήθηκε μια επιπρόσθετη

αντιμικροβιακή δράση όταν ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198 αναπτύσσονται σε ζωμό M17, που δεν ευνοεί την παραγωγή μασεδοσίνης (Georgalaki et al., 2010).

Οι παραπάνω βακτηριοσίνες είναι γνωστές και ως “lantibiotics”, όρος ο οποίος περιγράφει μια τάξη βακτηριοσινών που παράγονται από οξυγαλακτικά βακτήρια και οι οποίες τροποποιούνται μετα-μεταφραστικά. Οι βακτηριοσίνες συνθέτονται ριβοσωμικά και είναι αντιβακτηριδιακά πεπτίδια που συνήθως έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες σε συναφή είδη (De Vuyst and Vandamme, 1994, Dufour et al., 2007), αλλά συχνά και ενάντια σε αλλοιογόνα και παθογόνα βακτήρια (De Vuyst and Vandamme, 1994). Επομένως, τα βακτήρια που παράγουν τέτοιες αντιμικροβιακές ουσίες, όπως ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198, έχουν δυνητικά μεγάλη χρησιμότητα στην βιοσυντήρηση των τροφίμων. Στις μέρες μας, η βιοσυντήρηση, σε αντίθεση με τα χημικά, τεχνητά συντηρητικά τροφίμων, αντικατοπτρίζει τις απαιτήσεις του καταναλωτή για ασφαλή και όσον το δυνατό λιγότερο επεξεργασμένα τρόφιμα με ικανοποιητική διάρκεια ζωής (Anastasiou et al., 2007). Στην αναζήτηση νέων βιοσυντηρητικών, ο *Str. macedonicus* ACA-DC 198 είναι ένας πολλά υποσχόμενος υποψήφιος για χρήση ως προστατευτική καλλιέργεια (Bonn, 2003), γιατί η χρήση καλλιέργειας η οποία παράγει *in situ* βακτηριοσίνη πλεονεκτεί της προσθήκης καθαρών σκευασμάτων βακτηριοσίνης.

1.4.2. Παρουσία σε τρόφιμα

Ο *Str. macedonicus*, σχετίζεται επίσης με παραδοσιακά γαλακτοκομικά προϊόντα που παράγονται από ακατέργαστο γάλα και χωρίς τη χρήση αρχικής καλλιέργειας (Mora et al., 2003) και έχει συχνά απομονωθεί από αυτά. Ανάλυση του *Str. macedonicus* ACA-DC 198 *in vitro* και *in vivo* δεν υποστήριξε ενδείξεις παθογένειας (Maragkoudakis et al., 2009). Ανάλυση του γονιδιώματός του αποκάλυψε στοιχεία που υποστηρίζουν προσαρμογή στο γάλα, συμπεριλαμβάνοντας ένα επιπλέον γονιδιακό σύμπλεγμα (gene cluster) για το μεταβολισμό της λακτόζης και της γαλακτόζης, ένα πρωτεολυτικό σύστημα για την υδρόλυση της καζεΐνης, αυξημένη ικανότητα αντίστασης σε βακτηριοφάγους και οριζόντια μεταφορά γονιδίων από τους *Lactococcus lactis* και *S. thermophilus* ως πιθανούς δότες (Paradimitriou et al., 2014).

1.5 Ασφάλεια

Ένα μεγάλο και σημαντικό ποσοστό ασθένειας και θνησιμότητας οφείλεται σε τροφιμογενείς λοιμώξεις. Τα τροφιμογενή νοσήματα αναγνωρίζονται από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (World Health Organization, WHO) ως νοσήματα που έχουν προκληθεί από την κατανάλωση κάποιου τροφίμου ή νερού, συνιστώντας ένα σημαντικό πρόβλημα δημόσιας υγείας. Το 2012, δύο μεγάλες μελέτες διεξήχθησαν στις Η.Π.Α. σε σχέση με το οικονομικό κόστος που έχουν οι τροφιμογενείς λοιμώξεις στη δημόσια υγεία (Scharff, 2012, Hoffmann et al., 2012), και έδειξαν ότι η νόσος που κοστίζει περισσότερο είναι η σαλμονέλωση. Στην Ευρώπη, 5.196 τροφιμογενείς και υδατογενείς επιδημίες καταγράφηκαν σύμφωνα με δεδομένα που συλλέχθηκαν από 32 Ευρωπαϊκές χώρες το 2013 (EFSA and ECDC, 2015). Η *Salmonella* αποτέλεσε τον πιο κοινό αιτιολογικό παράγοντα των ανωτέρω τροφιμογενών επιδημιών, ωστόσο παρουσίασε καθοδική τάση κατά 5,9 % σε σχέση με το 2012 (82.694 κρούσματα). Στην Ελλάδα, σύμφωνα με το Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ), ο αριθμός δηλωθέντων κρουσμάτων σαλμονέλωσης, εξαιρουμένων των οροτύπων Typhi/Paratyphi, το 2013 ήταν 417 περιστατικά, με συχνότερα απομονωμένους ορότυπους τους Enteritidis και Typhimurium (ΚΕΕΛΠΝΟ, 2014a). Η δηλωθείσα επίπτωση της σαλμονέλωσης μειώνεται σταθερά από το 2004 (1327 κρούσματα) κάτι που οφείλεται, εν μέρει, στα επιτυχημένα προγράμματα ελέγχου στον πρωτογενή τομέα εκτροφής πουλερικών.

Μεγάλο ποσοστό τροφιμογενών λοιμώξεων θα μπορούσε να προληφθεί, εάν ακολουθούνταν πιστά οι αρχές ασφάλειας τροφίμων από την παραγωγή έως την κατανάλωσή τους. Η ασφάλεια των τροφίμων αναφέρεται σε όλες τις αρχές που περιγράφουν το χειρισμό, την προετοιμασία και την αποθήκευση των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου της πιθανής επιμόλυνσης ή επιβίωσης παθογόνων μικροοργανισμών.

Αναφορικά με τη σημασία των βιοϋμενίων στην πρόκληση βακτηριακών λοιμώξεων στον άνθρωπο, αποκόλληση συσσωμάτων κυττάρων ή βιοϋμενίου μπορεί να οδηγήσει σε λοιμώξεις του κυκλοφορικού ή του ουροποιητικού συστήματος ή στη δημιουργία εμβολής, ενώ τα κύτταρα μπορούν, επίσης, να ανταλλάξουν πλασμίδια ανθεκτικότητας εντός του βιοϋμενίου. Η μικροβιολογική

έρευνα προοδεύει σε πολλά μέτωπα, με ιδιαίτερη έμφαση στη διαλεύκανση των γονιδίων που εκφράζονται ειδικά από οργανισμούς που σχετίζονται με βιοϋμένιο, αξιολόγηση διαφόρων στρατηγικών ελέγχου (περιλαμβάνοντας ιατρικές συσκευές στις οποίες έχουν εφαρμοστεί αντιμικροβιακοί παράγοντες) ως προς την πρόληψη ή την αποκατάσταση αποίκησης βιοϋμένιου σε ιατρικές συσκευές, και ανάπτυξη νέων μεθόδων για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας τέτοιων μεταχειρίσεων. Η έρευνα πρέπει επίσης να επικεντρωθεί στο ρόλο των βιοϋμενίων στη αντιμικροβιακή αντίσταση, στα βιοϋμένια ως δεξαμενή για παθογόνους μικροοργανισμούς και τον ρόλο τους σε χρόνιες ασθένειες. Το πεδίο της μικροβιολογίας έχει αποδεχτεί την οικουμενικότητα του βιοϋμενικού φαινότυπου, και το κλειδί της επιτυχίας μπορεί να βρίσκεται σε μία πιο ολοκληρωμένη κατανόηση του τι διαφοροποιεί τόσο πολύ τον βιοϋμενικό φαινότυπο από τον πλαγκτονικό.

Σε όλη την πορεία της επεξεργασίας των τροφίμων, υγρές βιομηχανικές επιφάνειες παρέχουν ένα σταθερό υπόστρωμα για την ανάπτυξη και επιμονή βιοϋμενίων που μπορούν να περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς. Η βακτηριακή επιμόλυνση των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα είναι κύριος παράγοντας της βακτηριακής αντοχής σε τέτοια περιβάλλοντα και μπορεί να έχει τεράστιες επιπτώσεις στη δημόσια υγεία (Bridier et al., 2015). Για να αντιμετωπιστεί αυτή η απειλή των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών, η βιομηχανία εφαρμόζει μια σειρά διαδικασιών εξυγίανσης που περιλαμβάνει καθάρισμα και απολύμανση, η οποία επαρκεί για τα πλαγκτονικά βακτήρια, αλλά απέχει πολύ από την ουσιαστική αντιμετώπιση των βιοϋμενίων, τα οποία είναι πιο ανθεκτικά σε τέτοιες μεταχειρίσεις (Bridier et al., 2011a).

Το προς συλλογή, επεξεργασία ή συσκευασία τρόφιμο εισέρχεται σε ένα αρκετά πολύπλοκο δίκτυο διεργασιών επεξεργασίας και διακίνησης, που περιλαμβάνει την παραγωγή των πρώτων υλών, την μεταφορά τους στον τόπο επεξεργασίας, την επεξεργασία τους, την μεταφορά των προϊόντων στους τόπους διανομής κι από εκεί την τελική επεξεργασία στην κουζίνα του καταναλωτή. Συνεπώς, η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί ευθύνη των παραγωγών, των επιχειρήσεων τροφίμων, των ελεγκτικών αρχών όπως και του τελικού καταναλωτή. Αν και τις τελευταίες δεκαετίες σημαντικές βελτιώσεις ως προς την προσέγγιση για

ασφαλή τρόφιμα από το στάβλο και το χωράφι στη λιανική πώληση έχουν επιτευχθεί, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το οικιακό περιβάλλον αποτελεί μια σημαντική πηγή τροφιμογενών λοιμώξεων (Neal et al., 2012), καθώς ο καταναλωτής μπορεί να μην έχει κατάλληλη γνώση του χειρισμού του τροφίμου. Αυτό μπορεί να περιλαμβάνει αποθήκευση σε μη κατάλληλες συνθήκες, ανεπαρκές μαγείρεμα, συντήρηση σε ακατάλληλη θερμοκρασία, κακή προσωπική υγιεινή, ανεπαρκή ή μη αποτελεσματικό καθαρισμό σκευών και επιφανειών και διασταυρούμενη επιμόλυνση (Medeiros, 2001). Διασταυρούμενη επιμόλυνση ορίζεται ως η μεταφορά επικίνδυνων παραγόντων (μικροβιολογικής, χημικής ή φυσικής προέλευσης) από μια μολυσμένη πηγή σε ένα μη μολυσμένο τρόφιμο με διάφορα μέσα όπως τα χέρια, επιφάνειες του εξοπλισμού, σκεύη ή κατευθείαν από μια πρώτη ύλη σε ένα έτοιμο προς κατανάλωση προϊόν.

Στην εποχή μας, που άνθρωποι και αγαθά ταξιδεύουν σε όλο τον κόσμο, η ανάγκη για επιβολή κανόνων και νόμων ασφάλειας στα τρόφιμα είναι μέγιστη. Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει σημαντικές κινήσεις προς αυτή την κατεύθυνση, με όλο και περισσότερες μονάδες να δουλεύουν στα πλαίσια της νομοθεσίας για την ασφάλεια των τροφίμων και να εφαρμόζουν κάθε δυνατή σύσταση καλής υγιεινής πρακτικής, ακόμα και να πιστοποιούνται με διάφορα πρότυπα ασφάλειας και ποιότητας. Ταυτόχρονα, η νομοθεσία αναθεωρείται συνεχώς ώστε να καλύψει κάθε νέα ανάγκη ή να συμπεριλάβει κάθε νέα επιστημονική ανακάλυψη που αφορά στο θέμα της ασφάλειας. Δεδομένης της μεγάλης της σημασίας για τις τροφιμογενείς λοιμώξεις σε παγκόσμιο επίπεδο, και ειδικότερα σε σημεία μαζικής εστίασης αλλά και οικιακά περιβάλλοντα, η διασταυρούμενη επιμόλυνση είναι απαραίτητο να λαμβάνεται υπόψη στην ανάλυση επικινδυνότητας (risk analysis), και ειδικότερα στο τμήμα αυτής που είναι γνωστό ως «προσδιορισμός μικροβιακής επικινδυνότητας» (microbial risk assessment). Ειδικότερα, τα βιοϋμένια είναι ζωτικής σημασίας για την ασφάλεια των τροφίμων, καθώς, αφού εγκατασταθούν σε μια επιφάνεια, ευθύνονται για επανειλημμένα επεισόδια διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Τέλος, εκτός από τη νομοθεσία, υπάρχει και η ανάγκη εκπαίδευσης του κοινού, όπως και όλων των εργαζομένων στον κλάδο τροφίμων έτσι ώστε να αποφεύγονται οι δυσάρεστες συνέπειες των τροφιμογενών λοιμώξεων.

2. ΣΚΟΠΟΣ

Καθώς ο *Streptococcus macedonicus* είναι ένας μικροοργανισμός με δυνητικά μεγάλες δυνατότητες εκμετάλλευσης στον τομέα της βιοσυντήρησης των τροφίμων, και δεδομένου ότι τα περισσότερα βακτήρια σχηματίζουν μικτά βιοϋμένια, τα οποία απαρτίζονται από πολλαπλά βακτηριακά είδη, έχει μεγάλο ενδιαφέρον να μελετηθεί η ικανότητά του να δημιουργεί βιοϋμένιο, καθώς και ο τρόπος που ενδεχομένως επηρεάζει τη βιοϋμενική ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών. Ως εκ τούτου, αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου των παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Salmonella enterica*, ιδιαίτερης σημασίας για την ασφάλεια των τροφίμων και τη δημόσια υγεία, παρουσία (κυττάρων ή μεταβολικών προϊόντων) του *Str. macedonicus*. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου από τα δύο παραπάνω παθογόνα αξιολογήθηκε σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα, τόσο σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας όσο και μικτής καλλιέργειας με το βακτήριο *Str. macedonicus*. Επιπλέον, η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των παθογόνων *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* μελετήθηκε (σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας) παρουσία υπερκείμενου καλλιέργειας (απουσία κυττάρων) του *Str. macedonicus*, τόσο σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα όσο και σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Καλλιέργειες

Οι μικροοργανισμοί οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία ήταν οι *Staphylococcus aureus* (B-135) και *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (B-193) από τη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γ.Π.Α.), καθώς επίσης και ο *Streptococcus macedonicus* (ACA-DC 198) από το εργαστήριο Γαλακτοκομίας (Γ.Π.Α.).

3.2. Θρεπτικά υλικά

Στο σύνολο των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της συγκεκριμένης διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν τόσο επιλεκτικά (για κάθε μικροοργανισμό) θρεπτικά υλικά, καθώς και γενικά υποστρώματα ούτως ώστε να αξιολογηθούν συγκριτικά οι προσδιορισθέντες μικροβιακοί πληθυσμοί αλλά και να ελέγχεται η καθαρότητα των καλλιιεργειών. Ως επιλεκτικά/ειδικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν για τον *Staph. aureus* το Baird-Parker Medium Base (Lab M Limited, Lancashire, UK) με προσθήκη Egg Yolk Tellurite (Lab M Limited), για την *S. Typhimurium* το XLD agar (Biolife, Milano, Italy), και για τον *Str. macedonicus* τα υποστρώματα deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar με Tween 80 (Biolife), M17 Agar (Biolife) και MRS Broth (Lab M Limited). Ως γενικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν τα Tryptic Soy Agar (TSA, Biolife), Tryptic Soy Broth (TSB, Biolife) και Brain Heart Infusion broth (BHI broth, Lab M Limited).

3.3. Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα

Η μέθοδος ανάπτυξης βιοϋμενίου στην επιφάνεια μικρών κουπονιών από ανοξείδωτο χάλυβα (stainless steel coupons) χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και ποσοτικό προσδιορισμό των βιοϋμενικών κυττάρων σε μονοκαλλιέργειες (single culture) καθώς και μικτές (mixed culture) (*Staph. aureus*/*Str. macedonicus* και *S. Typhimurium*/*Str. macedonicus*), σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

3.3.1. Προετοιμασία εμβολίου

Η αρχική ανανέωση του κάθε βακτηριακού στελέχους πραγματοποιήθηκε με λήψη 100 ml από κατεψυγμένη καλλιέργεια (-40°C) και μεταφορά τους σε 10 ml κατάλληλου για κάθε μικροοργανισμό θρεπτικού ζωμού και επώαση στους 37°C για 24 h. Οι θρεπτικοί ζωμοί οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν ήταν το MRS broth (*Str. macedonicus*) και το TSB (*Staph. aureus* και *S. Typhimurium*). Ακολούθησε επανάληψη της διαδικασίας και ανακαλλιέργεια (100 ml) του κάθε βακτηριακού στελέχους σε «φρέσκο» θρεπτικό ζωμό, και εν συνεχεία, οι 24-h καλλιέργειες κάθε στελέχους μεταφέρθηκαν σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon και φυγοκεντρήθηκαν (4°C, 10 min, 5000xg) εντός φυγοκέντρου με δυνατότητα ρύθμισης θερμοκρασίας (Heraus Multifuge 1s-R, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Germany). Στη συνέχεια έλαβε χώρα απόρριψη του υπερκειμένου, επανασύσταση του ιζήματος σε 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer (quarter strength Ringer's solution, Lab M Limited) και επανάληψη της φυγοκέντρωσης κάτω από τις ίδιες συνθήκες («πλύσιμο» βακτηριακών κυττάρων). Μετά την τελική επανασύσταση των ιζημάτων σε διάλυμα Ringer (10 ml), οι μικτές καλλιέργειες δημιουργήθηκαν μέσω της ανάμιξης 2 ml από κάθε αντίστοιχη μονοκαλλιέργεια σε αποστειρωμένο σωλήνα Falcon, ενώ για όλες τις καλλιέργειες (μονοκαλλιέργειες και μικτές καλλιέργειες) πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε διάλυμα Ringer. Η καθαρότητα των καλλιεργειών (εμβολίων) καθώς και ο ακριβής μικροβιακός πληθυσμός προσδιορίστηκαν μέσω της επιφανειακής επίστρωσης κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία TSA και επώαση αυτών στους 37°C για 24 h.

3.3.2. Εμβολιασμός κουπονιών και ανάπτυξη βιοϋμενίου

Κουπόνια από ανοξείδωτο χάλυβα (πλακίδια διαστάσεων 3cm× 0,8cm× 0,1cm, τύπου AISi-304, Χαλυβουργική Α.Ε., Αθήνα, Ελλάδα) τοποθετήθηκαν εντός δοκιμαστικών σωλήνων, όπου και αποστειρώθηκαν εμβαπτισμένα σε 4,5 ml διαλύματος Ringer. Κάθε δοκιμαστικός σωλήνας ενοφθαλμίστηκε με 0,5 ml εμβολίου (μονοκαλλιέργειες/μικτές καλλιέργειες) ούτως ώστε η βακτηριακή συγκέντρωση να είναι κατά προσέγγιση ίση με 10⁵ CFU/ml. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στους 15°C για 3 h, εντός κλιβάνων υψηλής

ακρίβειας (MIR-153 Sanyo Electric Co., Osaka, Japan), ώστε να επιτραπεί η προσκόλληση (attachment) των βακτηριακών κυττάρων επάνω στα κουπόνια. Μετά το πέρας των 3 h (φάση προσκόλλησης), τα κουπόνια μεταφέρονταν, με τη βοήθεια λαβίδας και εντός θαλάμου νηματικής ροής, σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5ml BHI broth. Η βιοϋμενική ανάπτυξη των μονοκαλλιιεργειών και των μικτών καλλιιεργειών αξιολογήθηκε στους 37 και 15°C (MIR-153 Sanyo Electric Co.), θερμοκρασίες στις οποίες επώαστηκαν οι τελευταίοι δοκιμαστικοί σωλήνες για συνολικό χρονικό διάστημα 72 και 144 h, αντίστοιχα.

3.3.3. Δειγματοληψία και μικροβιολογικές αναλύσεις

Στις 3, 24, 48 και 72 h επώασης στους 37°C, και στις 3, 48, 96 και 144 h επώασης στους 15°C, έλαβαν χώρα δειγματοληψίες και μικροβιολογικές αναλύσεις με στόχο τον προσδιορισμό των πληθυσμών των βιοϋμενικών κυττάρων των μονοκαλλιιεργειών και μικτών καλλιιεργειών. Για τον σκοπό αυτό, τα κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα συλλέγονταν με τη βοήθεια λαβίδας από τους δοκιμαστικούς σωλήνες, ξεπλένονταν με 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer από κάθε πλευρά, για την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων, και τοποθετούνταν σε σωλήνες Falcon που περιείχαν 6 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer και 10 γυάλινα σφαιρίδια με επικάλυψη σιλικόνης (beads). Ακολουθούσε στροβιλισμός (σε αναδευτήρα στροβιλισμού vortex) για 2 min, με στόχο την αποκόλληση όλων τα βιοϋμενικών κυττάρων από την επιφάνεια των κουπονιών (μέθοδος στροβιλισμού με σφαιρίδια/bead vortexing method). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις (σε διάλυμα Ringer) του βακτηριακού ελαιωρήματος και επιφανειακή επίστρωση 100 μl κατάλληλων αραιώσεων σε τρυβλία με κατάλληλο στερεό θρεπτικό υλικό για κάθε περίπτωση. Μετά από επώαση των τρυβλίων στους 37°C για 24 h, έγινε απαρίθμηση των σχηματιζόμενων αποικιών οι οποίες τελικά εκφράστηκαν σε log CFU ανά cm² επιφάνειας κουπονιού (log CFU/cm²), εκπροσωπώντας το σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο.

Η ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα αξιολογήθηκε στα πλαίσια δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε καθένα από τα οποία και σε κάθε

χρονική στιγμή δειγματοληψίας αναλύονταν τρία δείγματα (κουπόνια σε διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες) ($n=6$).

3.4. Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τη συσκευή Malthus

Η μέθοδος μέτρησης ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τη βοήθεια της συσκευής Malthus επίσης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της μεταβολικής δραστηριότητας των βιοϋμενικών κυττάρων σε μονοκαλλιέργειες και μικτές καλλιέργειες των παραπάνω βακτηρίων, κάτω από τις ίδιες συνθήκες οι οποίες αξιολογήθηκαν και στη μέθοδο με τα κουπόνια (στους 37°C και 15°C). Πιο συγκεκριμένα, κατά την τελευταία δειγματοληψία κάθε θερμοκρασίας (72 h και 144 h στους 37 και 15°C, αντίστοιχα), λαμβάνονταν ακόμη δείγματα από κάθε θερμοκρασία για τη μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Ομοίως με πριν, τα κουπόνια λαμβάνονταν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες με τη βοήθεια λαβίδας, ξεπλένονταν με 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer από κάθε πλευρά, για την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων, και τοποθετούνταν σε φιαλίδιο Malthus που περιείχε 5 ml αποστειρωμένου θρεπτικού ζωμού BHI broth. Τα φιαλίδια στη συνέχεια τοποθετούνταν στη συνδεδεμένη με υπολογιστή συσκευή Malthus 2000 (Radiometer International, Copenhagen, Denmark), εντός της οποίας επώαστηκαν στους 37°C για 24 h. Στη συνέχεια παραλαμβάνονται οι τιμές των αποτελεσμάτων (ηλεκτρική αγωγιμότητα) προς περαιτέρω επεξεργασία.

Η μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας αξιολογήθηκε στα πλαίσια δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε καθένα από τα οποία κατά τη χρονική στιγμή δειγματοληψίας αναλύονταν πέντε δείγματα (κουπόνια σε διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες) ($n=10$).

3.5. Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχία (microtiter plate)

πολυστυρενίου παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας *Str. macedonicus*

Η μέθοδος ανάπτυξης βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχία (microtiter plate ή microplate) χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της βιοϋμενικής ανάπτυξης των παθογόνων βακτηρίων *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* (ως μονοκαλλιέργειες)

παρουσία φιλτραρισμένου υπερκειμένου (χωρίς παρουσία κυττάρων, cell-free supernatant, CFS) καλλιέργειας *Str. macedonicus*. Στοχεύοντας στην εκτίμηση της επίδρασης (εφόσον υπάρχει) των μεταβολικών προϊόντων του *Str. macedonicus* στο σχηματισμό βιοϋμενίου από τα δύο παραπάνω παθογόνα, χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις CFS: 0%, 20% και 40% (v/v).

3.5.1. Προετοιμασία εμβολίου και CFS

Τα βακτήρια *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* ανανεώθηκαν από καταψυγμένη (-40°C) καλλιέργεια (100 μl) και ανακαλλιεργήθηκαν (100 μl) σε 10 ml TSB, με την επώαση των καλλιεργειών να πραγματοποιείται και στις δύο περιπτώσεις στους 37°C για 24 h. Το βακτήριο *Str. macedonicus* ανανεώθηκε μεταφέροντας 100 μl καταψυγμένης καλλιέργειας σε 10 ml BHI broth, και μετά από επώαση στους 37°C για 20 h, μεταφέρθηκε 1 ml καλλιέργειας σε 100 ml BHI broth. Ακολούθησε επώαση στους 37°C για 20 h υπό ήπια ανάδευση στα 160 rpm, και χρήση της προκύπτουσας καλλιέργειας για την προετοιμασία του CFS.

Στη συνέχεια, κάθε καλλιέργεια (2^η ανανέωση) μεταφέρθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες σε αποστειρωμένο σωλήνα Falcon και φυγοκεντρήθηκε (4°C, 10 min, 5000× g). Για τα βακτήρια *Staph. aureus* και *S. Typhimurium*, ακολούθησε αποχύση του υπερκειμένου και προσθήκη 10 ml αποστειρωμένου διαλύματος Ringer, στροβιλισμός σε συσκευή Vortex μέχρι πλήρους επαναδιαλυτοποίησης του ιζήματος και επανάληψη της διαδικασίας ακόμη μία φορά. Παράλληλα, από το κάθε ένα από τα αρχικά Falcon πραγματοποιήθηκαν δεκαδικές αραιώσεις για τον προσδιορισμό του πληθυσμού του εμβολίου. Για τον *Str. macedonicus*, μετά την πρώτη φυγοκέντρηση, συλλέχθηκε το υπερκείμενο σε άδεια αποστειρωμένη φιάλη Duran, και στη συνέχεια αποστειρώθηκε με φίλτρο διαμέτρου πόρων 0,2 μm (Whatman, Inc., Clifton, NJ, USA). Κατόπιν, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα CFS τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια των συγκεκριμένων πειραματικών δοκιμών, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2.1

Διαλύματα αποστειρωμένου υπερκειμένου (cell-free supernatant, CFS) καλλιέργειας *Streptococcus macedonicus* στα οποία αξιολογήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των παθογόνων βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και *Salmonella enterica* ser. Typhimurium.

Συγκέντρωση CFS (% v/v)	Όγκος CFS (ml)	Όγκος BHI broth (ml)	Όγκος double strength BHI broth (ml)
0	0	100	0
20	20	60	20
40	40	20	40

Το pH των παραπάνω θρεπτικών ζωμών (BHI broth και double strength BHI broth) είχε προσαρμοστεί στην τιμή 6,5 (πριν την αποστείρωση και ελέγχθηκε η σταθερότητά του μετά το πέρας αυτής), ούτως ώστε να έχουν παρόμοιο pH με το CFS και, κατά συνέπεια, τα παραπάνω διαλύματα CFS (0, 20 και 40%) να μη διαφέρουν ως προς αυτό το χαρακτηριστικό. Η ρύθμιση του pH στην παραπάνω τιμή πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια 10 N HCl και χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό pHμετρο (RL150, Russell pH, Cork, Ireland) με γυάλινο ηλεκτρόδιο (Metro hmAG, Herisau, Switzerland).

3.5.2. Εμβολιασμός και επώαση μικροσυστοιχιών

Εντός βοθρίων μικροσυστοιχιών κατασκευασμένων από πολυστυρένιο (MicrotestPlate 96-Well, F Starstät, Germany), μοιράστηκαν όγκοι 180 μl από καθένα από τα τρία παραπάνω διαλύματα (0, 20 και 40% CFS), οι οποίοι και εμβολιάστηκαν με 20 μl καλλιεργείων *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* (ως μονοκαλλιέργειες). Στη συνέχεια ακολούθησε επώαση των μικροσυστοιχιών στους 37 και 15°C (μια μικροσυστοιχία σε κάθε θερμοκρασία) για 48 h. Σε κάθε θερμοκρασία επώασης και για καθένα από τα δύο παθογόνα και τα τρία διαλύματα CFS, εμβολιάστηκαν 12 βοθρία μικροσυστοιχίας (replicate wells), ενώ επίσης έλαβε

χώρα διαμοιρασμός 200 μl από κάθε διάλυμα σε οχτώ βοθρία ανά διάλυμα χωρίς εμβολιασμό με παθογόνο (αρνητικοί μάρτυρες).

3.5.3. Χρώση κρυσταλλικού ιώδους και μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Η ποσοτικοποίηση του σχηματισμού βιοϋμενίου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μια χρωματομετρική μέθοδο η οποία στηρίζεται στη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας της μάζας του βιοϋμενίου μετά από χρώση κρυσταλλικού ιώδους, και η οποία έχει χρησιμοποιηθεί συχνά (σε διάφορες εκδοχές της) για την αξιολόγηση της βιοϋμενικής ανάπτυξης (Agarwal et al., 2011; Lianou and Koutsoumanis, 2012; Stepanović et al., 2004). Μετά την επώαση των μικροσυστοιχιών στις παραπάνω θερμοκρασίες για 48 h, το περιεχόμενο των βοθρίων απομακρύνθηκε με τη βοήθεια πολυπιπέτας, και ακολούθησε προσθήκη 200 μl αποστειρωμένου διαλύματος Ringer σε κάθε βοθρίο και τοποθέτηση των μικροσυστοιχιών σε συσκευή ήπιας ανάδευσης (320 mot) για 5 min. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε εκ νέου άδειασμα των βοθρίων και προσθήκη 200 μl μεθανόλης ανά βοθρίο. Μετά από 15 min, η μεθανόλη απομακρύνθηκε και ακολούθησε στέγνωμα των μικροσυστοιχιών στον αέρα για 20 min. Κατόπιν, 200 μl κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) προστέθηκαν σε κάθε βοθρίο, παρέμειναν για 5 min, και εν συνεχεία απομακρύνθηκαν προσεκτικά με πιπέτα, ενώ τα βοθρία των μικροσυστοιχιών εκπλύθηκαν τρεις φορές με απεσταγμένο ύδωρ και αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα για 1 h. Τέλος, σε κάθε βοθρίο τοποθετήθηκαν 200 μl αιθανόλης (100%) προκειμένου να επαναδιαλυτοποιηθεί το δεσμευμένο στο σχηματισμένο βιοϋμένιο κρυσταλλικό ιώδες, και ακολούθησε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος (580 nm, 25°C) χρησιμοποιώντας το σπεκτροφωτόμετρο Synergy HT multi-mode microplate reader (Biotek, Winooski, VT, USA) .

3.6. Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας *Str.macedonicus*

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και τον ποσοτικό προσδιορισμό των βιοϋμενικών κυττάρων στην επιφάνεια κουπονιών ανοξειδωτού χάλυβα από

μονοκαλλιέργειες των *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία φιλτραρισμένου υπερκειμένου (CFS) καλλιέργειας *Str. macedonicus*, σε συγκεντρώσεις 0% και 40% και σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (37°C και 15°C).

3.6.1. Προετοιμασία εμβολίου και CFS

Οι ανανεώσεις και οι ανακαλλιέργειες των βακτηρίων, τόσο των παθογόνων *Staph. aureus* και *S. Typhimurium*, όσο και του *Str. macedonicus*, πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις διαδικασίες οι οποίες περιγράφηκαν στην ενότητα 2.5.1. Η μόνη διαφορά ήταν ότι στη δεύτερη ανανέωση του *Str. macedonicus*, ελήφθησαν 2 ml και τοποθετήθηκαν σε 200 ml BHI broth. Η φυγοκέντριση των καλλιεργειών και η προετοιμασία των εμβολίων των δύο παθογόνων βακτηρίων έλαβε χώρα όπως και παραπάνω, ενώ η παρασκευή του διαλύματος 40% CFS πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στον Πίνακα 2.1. Ομοίως με πριν, το pH των θρεπτικών ζωμών (BHI broth και double strength BHI broth) είχε προσαρμοστεί με 10N HCl στην τιμή 6,5 (πριν την αποστείρωση και ελέγχθηκε η σταθερότητά του μετά το πέρας αυτής), ούτως ώστε να έχουν παρόμοιο pH με το CFS και, κατά συνέπεια, το διάλυμα 40% CFS να μη διαφέρει ως προς αυτό το χαρακτηριστικό από το διάλυμα 0% CFS. Όγκοι 5 ml ζωμού BHI (0% CFS) ή διαλύματος 40% CFS μοιράστηκαν εντός αποστειρωμένων δοκιμαστικών σωλήνων οι οποίοι περιείχαν τα κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα, υπό ασηπτικές συνθήκες και εντός θαλάμου νηματικής ροής.

3.6.2. Εμβολιασμός κουπονιών και ανάπτυξη βιοϋμενίου

Σε κάθε μία από τις καλλιέργειες των *S. aureus* και *S. Typhimurium* έγινε μία δεκαδική αραίωση για να προκύψει το εμβόλιο, και στη συνέχεια προστέθηκαν 100 μl εμβολίου στους δοκιμαστικούς σωλήνες με τα κουπόνια και τα CFS διαλύματα (0 και 40%). Στη συνέχεια, ισάριθμοι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε κλιβάνους ρυθμισμένους να λειτουργούν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες: 37°C και 15°C.

3.6.3. Δειγματοληψία και μικροβιολογικές αναλύσεις

Ομοίως με την ανάπτυξη βιοϋμενίου μονοκαλλιεργειών και μικτών καλλιεργειών σε κουπόνια, και κάνοντας χρήση των μεθοδολογιών και διαδικασιών οι οποίες περιγράφονται στην ενότητα 2.3.3, δειγματοληψίες και μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στις 3, 24, 48 και 72 h για τους 37°C, και στις 3, 48, 96 και 144 h για τους 15°C.

Η ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα παρουσία CFS από τον *Str. macedonicus* αξιολογήθηκε στα πλαίσια δύο ανεξάρτητων πειραμάτων, σε καθένα από τα οποία και σε κάθε χρονική στιγμή δειγματοληψίας αναλύονταν τρία δείγματα (κουπόνια σε διαφορετικούς δοκιμαστικούς σωλήνες) ($n=6$).

3.7. Ανάλυση δεδομένων

Κατά την επεξεργασία των δεδομένων για το πείραμα ανάπτυξης βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχία πολυστυρενίου παρουσία CFS από το βακτήριο *Str. macedonicus*, αφαιρέθηκε ο μέσος όρος των μετρήσεων για τα ανεμβολίαστα βοθρία (αρνητικοί μάρτυρες) από κάθε μία από τις μετρήσεις των δειγμάτων και η διαφορά αυτή, που αναφέρεται ως ΔOD_{580nm} , χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου των υπό εξέταση μικροοργανισμών (Lianou and Koutsoumanis, 2012).

Τα δεδομένα τα οποία συλλέχθηκαν από τα πειράματα ανάπτυξης βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα (3.3), και κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα/μικροσυστοιχία πολυστυρενίου παρουσία φιλτραρισμένου υπερκειμένου καλλιέργειας (CFS) *Str. macedonicus* (3.5 και 3.6), υποβλήθηκαν σε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) χρησιμοποιώντας τη διαδικασία γενικού γραμμικού μοντέλου (general linear model procedure) του λογισμικού IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Οι μέσες τιμές των μετρούμενων παραμέτρων (πληθυσμοί βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα/τιμές οπτικής πυκνότητας σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου) διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας το τεστ Tukey's HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$.

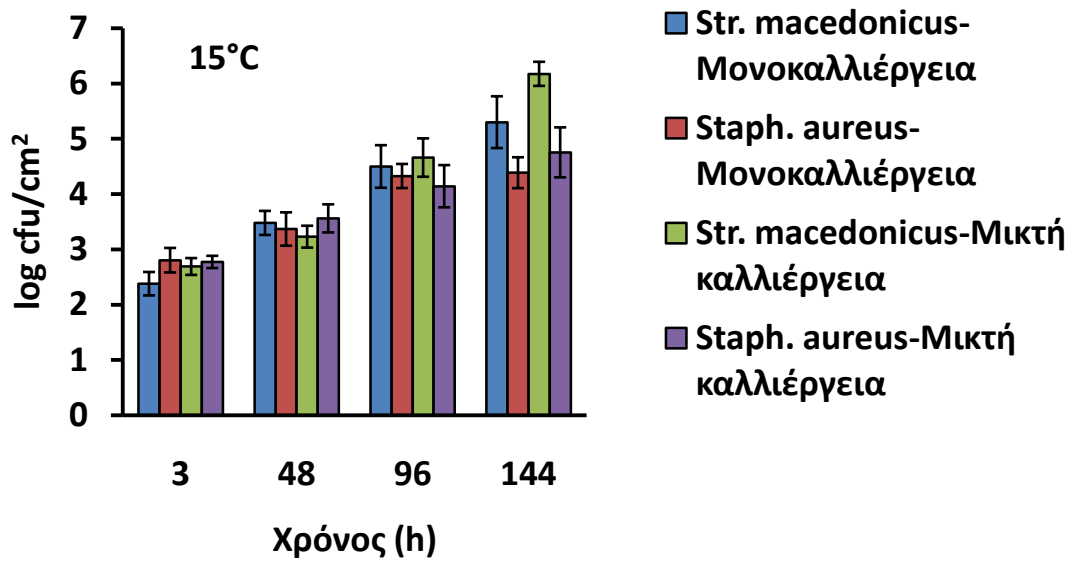
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται παρακάτω αφορούν στην ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο επιλεκτικό τους θρεπτικό μέσο, Baird-Parker για τον *Staph. aureus* και XLD για την *S. Typhimurium*. Για τον *Str. macedonicus* χρησιμοποιήθηκε το γενικό υπόστρωμα TSA λόγω έλλειψης του επιλεκτικού M17. Πάραυτα, έλαβαν χώρα μετρήσεις και σε M17 σε διάφορες φάσεις του πειράματος, με αποτελέσματα παρόμοια με εκείνα στο TSA. Στα παρακάτω γραφήματα φαίνεται η ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια για μονοκαλλιέργειες και μικτές καλλιέργειες.

Η προσκόλληση του *Str. macedonicus* έλαβε χώρα σε επίπεδο παρόμοιο με τον *Staph. aureus* ($P \geq 0,05$) και για μονοκαλλιέργεια και για μικτή καλλιέργεια όπως φαίνεται στα Γραφήματα 1 και 2.

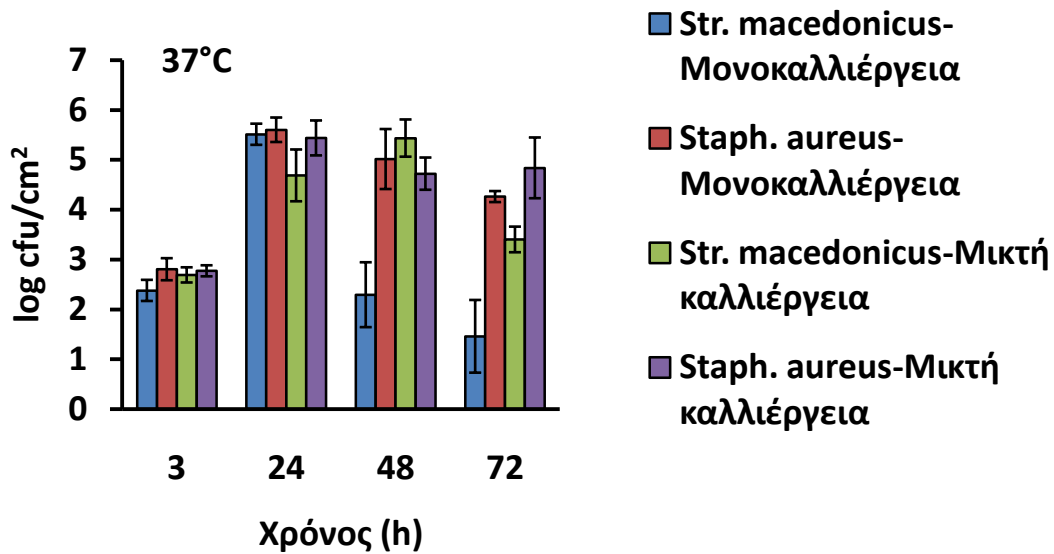
Στους 15°C, με την πάροδο του χρόνου, τα βιοϋμένια συνέχισαν να αναπτύσσονται, με πιο έντονη ανάπτυξη αυτή του *Str. macedonicus* είτε σε μικτή είτε σε μονοκαλλιέργεια. Τόσο σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας όσο και στη μικτή καλλιέργεια, ο βιοϋμενικός πληθυσμός του *Str. macedonicus* ήταν σημαντικά ($P < 0,05$) μεγαλύτερος αυτού του *Staph. aureus* στις 144 h επώασης (Γράφημα 1).



Γράφημα 1. Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log\text{cfu}/\text{cm}^2$) στους 15°C για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *Staph. aureus* και *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη αριθμητικά δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 10 του Παραρτήματος.

Στους 37°C , η συμπεριφορά των βιοϋμενίων ήταν διαφορετική (Γράφημα 2). Παρατηρήθηκε μέγιστη ανάπτυξη βιοϋμενίου στις 24 h για όλες τις καλλιέργειες εκτός του *Str. macedonicus* σε μικτή που εμφάνισε μέγιστο στις 48 h. Στις 72 h επώασης της μικτής καλλιέργειας, ο πληθυσμός βιοϋμενίου του *Str. macedonicus* ήταν σημαντικά ($P < 0,05$) μειωμένος σε σχέση με τον αντίστοιχο πληθυσμό στις 48 h, ενώ κάτι αντίστοιχο δεν παρατηρήθηκε για τον *Staph. aureus* του οποίου το σχηματιζόμενο βιοϋμένιο δεν διαφοροποιήθηκε ιδιαίτερα μεταξύ 48 και 72 h. Συνολικά, με εξαίρεση τις 48 h επώασης, στη μικτή καλλιέργεια στους 37°C φάνηκε να επικρατεί το παθογόνο βακτήριο *Staph. aureus*, σε αντίθεση με τα όσα παρατηρήθηκαν στους 15°C .



Γράφημα 2. Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log_{10} \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *Staph. aureus* και *Str. macedonicus*.

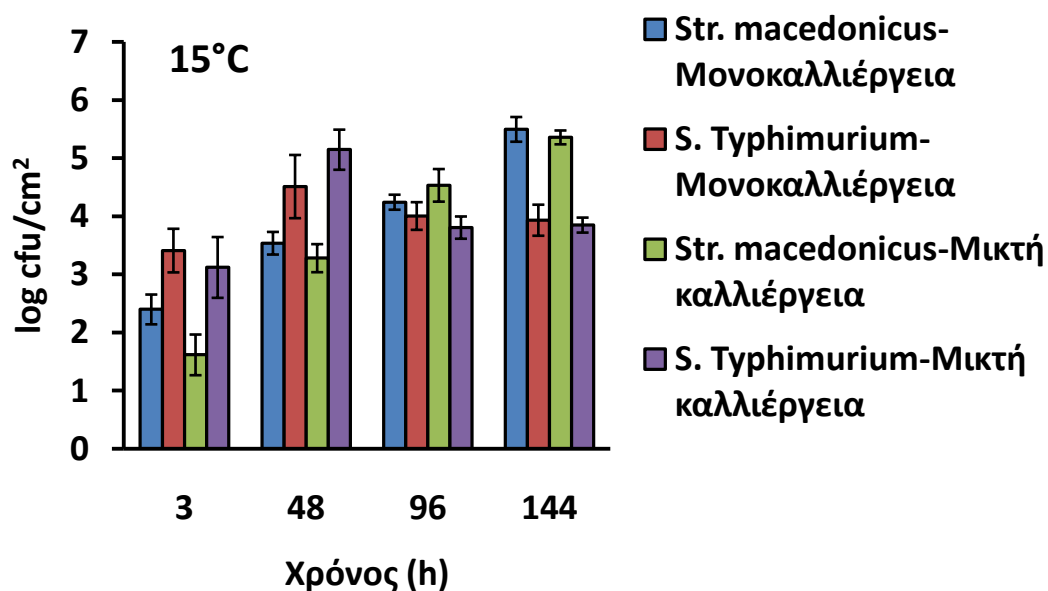
Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 11 του Παραρτήματος.

Συγκρίνοντας τα δύο παραπάνω γραφήματα, γίνεται αντιληπτός ο σημαντικός ρόλος της θερμοκρασίας στην συμπεριφορά και ανάπτυξη των βιοϋμενίων, όπως και στη σύστασή τους όταν πρόκειται για μικτά βιοϋμένια, δηλαδή βιοϋμένια αποτελούμενα από περισσότερα του ενός μικροβιακά είδη.

Περνώντας στα πειράματα με την *S. Typhimurium*, παρατηρούμε ότι η προσκόλληση του *Str. macedonicus* ήταν σημαντικά ($P < 0,05$) μικρότερη από αυτή του παθογόνου βακτηρίου, τόσο για μονοκαλλιέργεια όσο και για μικτή καλλιέργεια (Γράφηματα 3 και 4). Επιπλέον, σε σημαντικά ($P < 0,05$) μικρότερους πληθυσμούς προσκολλήθηκε ο *Str. macedonicus* σε συνθήκες μικτής καλλιέργειας με τη *S. Typhimurium* σε σχέση με την προσκόλλησή του ως μονοκαλλιέργεια, υποδεικνύοντας ότι η παρουσία του παθογόνου ενδεχομένως παρεμποδίζει την αρχική του προσκόλληση σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα.

Κατά τη διάρκεια της επώασης στους 15°C, τόσο υπό συνθήκες μικτής καλλιέργειας όσο και μονοκαλλιέργειας, τα βιοϋμένια του *Str. macedonicus* συνέχισαν να αναπτύσσονται προοδευτικά με συνεχή αύξηση ($P < 0,05$) του πληθυσμού τους ως τις 144 h, ενώ αντίθετα εκείνα της *S. Typhimurium*

παρουσίασαν μέγιστη ανάπτυξη στις 48 h και στη συνέχεια μια μικρή μείωση και μη σημαντική διαφοροποίηση για το υπόλοιπο χρονικό διάστημα της επώασης (Γράφημα 3).



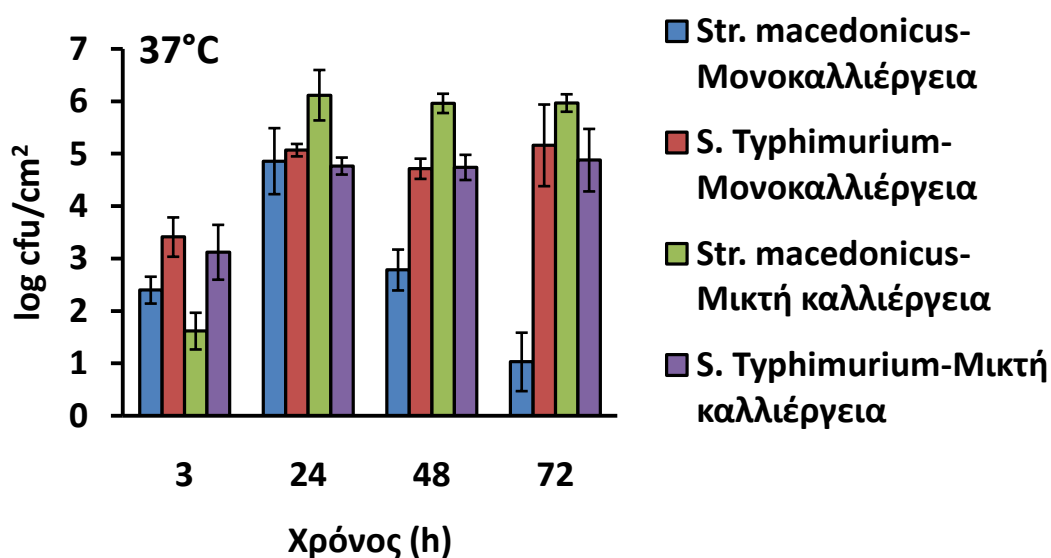
Γράφημα 3. Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *S. Typhimurium* και *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 20 του Παραρτήματος.

Συγκρίνοντας με το Γράφημα 1, φαίνεται ότι η *S. Typhimurium* επικράτησε του *Str. macedonicus* τις πρώτες 48 h, ενώ ο *Staph. aureus* βρισκόταν στα ίδια επίπεδα. Μετά τις 48 h, ο πληθυσμός του *Str. macedonicus* υπερίσχυσε σημαντικά ($P < 0,05$) και των δύο παθογόνων, με τον *Staph. aureus*, ωστόσο, να συνεχίζει να αναπτύσσεται σε αντίθεση με τη *S. Typhimurium* που εμφάνισε πτώση.

Στους 37°C και σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας, ο *Str. macedonicus* αναπτύχθηκε έως τις 24 h και μετά επέδειξε σαφή πτωτική πορεία (Γράφημα 4), με στατιστικώς σημαντικές ($P < 0,05$) πληθυσμιακές μειώσεις του σχηματιζόμενου βιοϋμενίου στις 48 και 72 h. Στη μικτή καλλιέργεια με τη *S. Typhimurium*, ο βιοϋμενικός πληθυσμός του πήρε τη μέγιστη τιμή του στις 24 h, παρουσιάζοντας αξιοσημείωτη αύξηση ($P < 0,05$) σε σχέση με το αρχικό επίπεδο προσκόλλησης, άλλα παρέμεινε σε

παρόμοια επίπεδα μέχρι το πέρας των 72 h. Η *S. Typhimurium*, έδειξε επίσης τη μεγαλύτερη βιοϋμενική της ανάπτυξη στις 24 h, και για μικτή και για μονοκαλλιέργεια, και συνέχισε να κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα μέχρι τις 72 h.



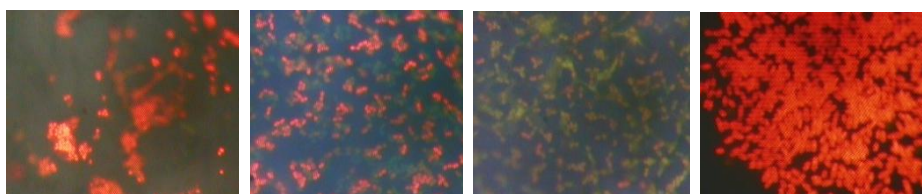
Γράφημα 4. Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu}/\text{cm}^2$) στους 37°C για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *S. Typhimurium* και *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 21 του Παραρτήματος.

Η συμπεριφορά του *Str. macedonicus* σε μικτή καλλιέργεια με τη *S. Typhimurium* στους 37°C διαφέρει σε κάποια βαθμό από εκείνη σε συγκαλλιέργεια με τον *Staph. aureus* (Γραφήματα 2 και 4). Παρουσία της *S. Typhimurium* έφτασε τη μέγιστη βιοϋμενική του ανάπτυξη στις 24 h οπότε και έμεινε στα ίδια επίπεδα για το υπόλοιπο της επώασης, ενώ παρουσία του *Staph. aureus* προσέγγισε τη μέγιστη ανάπτυξή του στις 48 h, και ακολούθως ο βιοϋμενικός του πληθυσμός μειώθηκε αξιοσημείωτα. Επίσης, παρουσία της *S. Typhimurium*, ο πληθυσμός του *Str. macedonicus* ήταν μεγαλύτερος από ότι παρουσία του *Staph. aureus* και υπερίσχυσε σημαντικά ($P < 0,05$) στη μικτή καλλιέργεια. Γενικά, στους 37°C , η ικανότητα δημιουργίας βιοϋμενίου του *Str. macedonicus* φαίνεται να αυξάνεται

σημαντικά στη μικτή καλλιέργεια και με τα δύο παθογόνα που μελετήθηκαν σε σχέση με τη μονοκαλλιέργεια.

Παράλληλα, στους 37°C, ελήφθησαν δείγματα κουπονιών στα οποία παρατηρήθηκε το σχηματισμένο βιοϋμένιο μετά από χρώση με ακριδίνη σε μικροσκόπιο (Εικόνα 4.1.1). Ο *Staph. aureus* σε μονοκαλλιέργεια δημιούργησε βιοϋμένιο ανά τόπους στο κουπόνι και οι αποικίες είχαν μορφή «τσαμπιού σταφυλιού». Ο *Str. macedonicus* σε μονοκαλλιέργεια δημιούργησε βιοϋμένιο σε όλη την επιφάνεια του κουπονιού και μάλιστα παρέσυρε τον *Staph. aureus* σε παρόμοια συμπεριφορά στο μικτό βιοϋμένιο. Η *S. Typhimurium* σε μονοκαλλιέργεια δημιούργησε έντονο βιοϋμένιο σε όλη την επιφάνεια του κουπονιού.



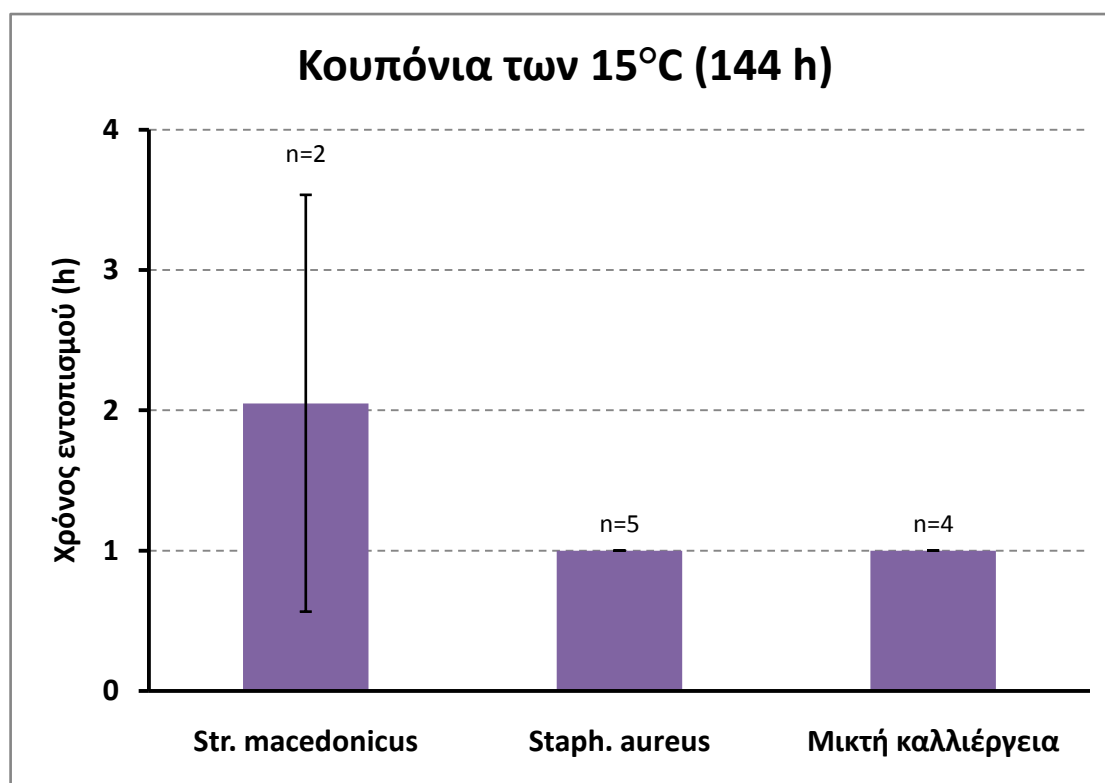
Εικόνα 4.1.1. Βιοϋμένιο για μονοκαλλιέργεια *Staph. aureus* (αριστερά), για μονοκαλλιέργεια *Str. macedonicus* (μέση αριστερά), για μικτή καλλιέργεια *Staph. aureus* και *Str. macedonicus* (μέση δεξιά) και για μονοκαλλιέργεια *S. Typhimurium* (δεξιά) σε κουπόνι ανοξείδωτου χάλυβα μετά από επώαση στους 37°C για 72 h και χρώση με ακριδίνη.

4.2. Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τη συσκευή Malthus

Η συσκευή Malthus μετρά την ηλεκτρική αγωγιμότητα στο διάλυμα που βρίσκεται εμβαπτισμένο το κουπόνι και δίνει μέτρηση χρόνου του εντοπισμού της σταθεροποίησης της. Για όσο διάστημα ο πληθυσμός αναπτύσσεται, η ηλεκτρική αγωγιμότητα αλλάζει. Δηλαδή πρόκειται για ένα δείκτη της κατάστασης του βιοϋμενίου και του κατά πόσο υποστηρίζει αύξηση. Επομένως, όσο μικρότερος ο χρόνος εντοπισμού (detection time), τόσο πιο γρήγορη η ανάπτυξη. Λόγω μη επαρκούς επαναληψιμότητας σε ότι αφορά στο πλήθος των δειγμάτων ανά μεταχείριση για τα οποία προέκυψε μια μετρήσιμη τιμή χρόνου εντοπισμού, τα συγκεκριμένα αποτελέσματα δεν υποβλήθηκαν σε στατιστική ανάλυση.

Στα παρακάτω γραφήματα φαίνεται ο χρόνος εντοπισμού κατά τη μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας σε συσκευή Malthus για μονοκαλλιέργειες και μικτές καλλιέργειες.

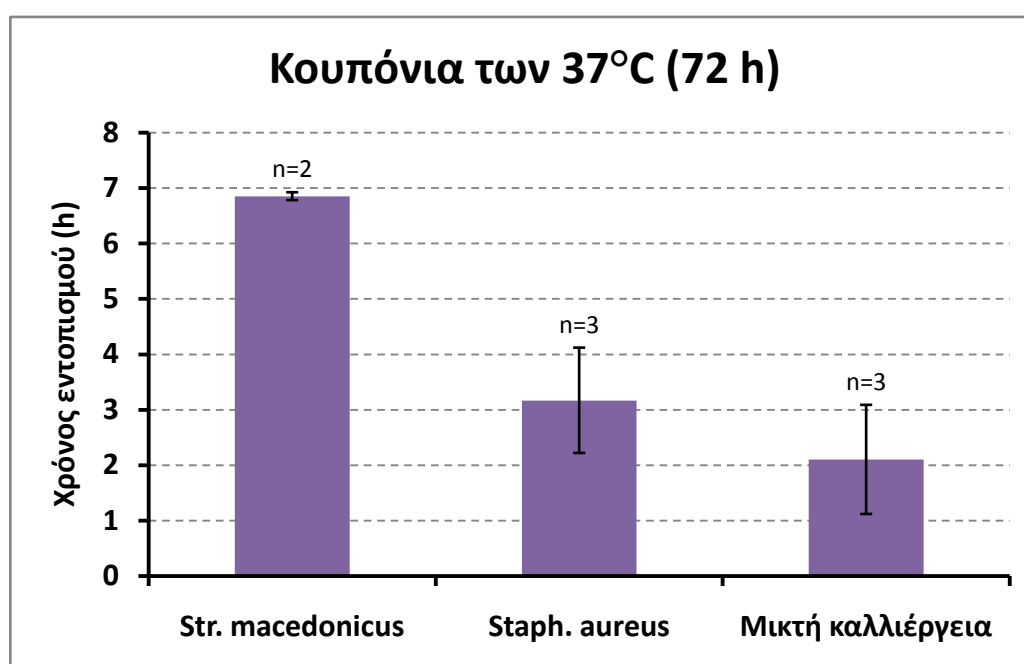
Ο χρόνος εντοπισμού σταθεροποιημένης ηλεκτρικής αγωγιμότητας για κουπόνια των 144 h στους 15°C (Γράφημα 5), ήταν ίδιος για μονοκαλλιέργεια *Staph. aureus* και για μικτή *Staph. aureus* /*Str. macedonicus* και σημαντικά μεγαλύτερος για μονοκαλλιέργεια *Str. macedonicus*. Παρόλα αυτά, ο περιορισμένος αριθμός δειγμάτων μονοκαλλιέργειας *Str. macedonicus* ($n=2$) και η υψηλή τιμή τυπικής απόκλισης των μετρούμενων χρόνων εντοπισμού δεν επιτρέπει την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.



Γράφημα 5. Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 15°C σε δείγματα 144 h για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *Staph. aureus* και *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 22 του Παραρτήματος.

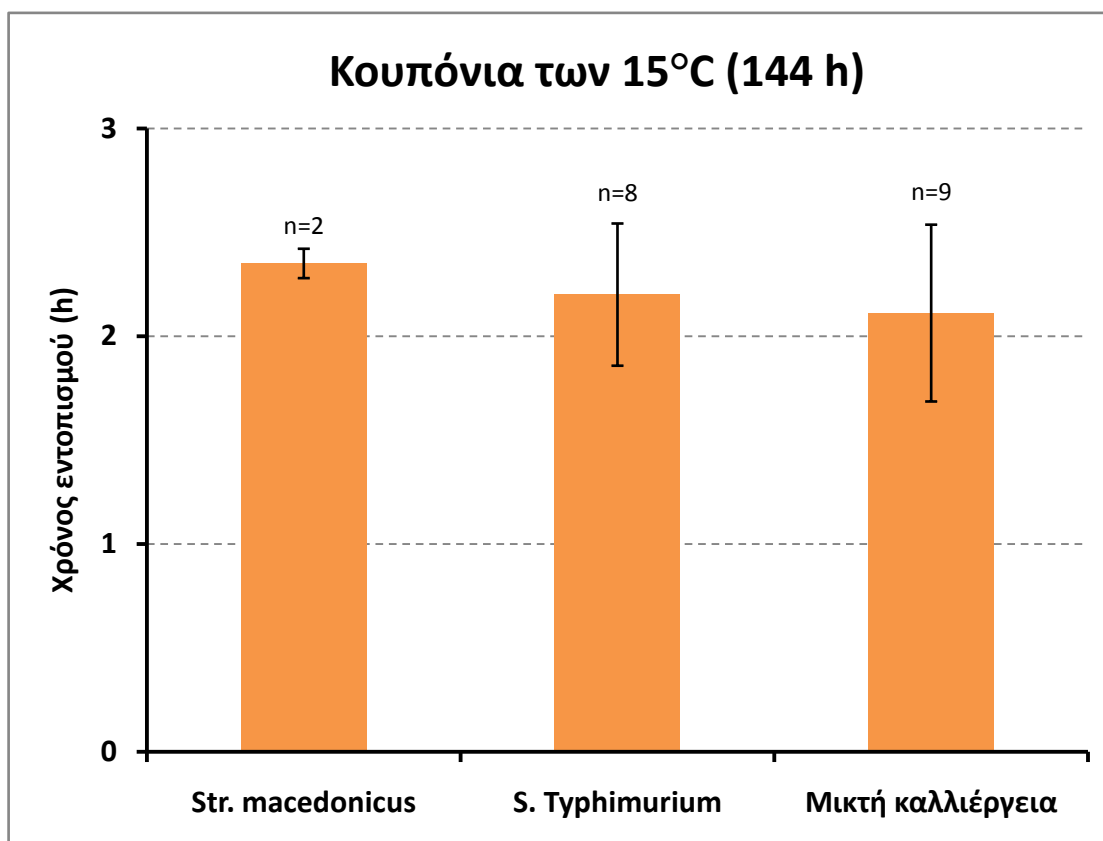
Ο χρόνος εντοπισμού σταθεροποιημένης ηλεκτρικής αγωγιμότητας για κουπόνια των 72 h στους 37°C (Γράφημα 6), ήταν διαφορετικός για κάθε περίπτωση. Ο μέσος χρόνος εντοπισμού του *Str. macedonicus* σε μονοκαλλιέργεια ήταν σημαντικά μεγαλύτερος, σχεδόν διπλάσιος, του μέσου χρόνου εντοπισμού του *Staph. aureus* σε μονοκαλλιέργεια και της μικτής καλλιέργειας, με τους δύο τελευταίους χρόνους να μη διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Σημαντικός περιορισμός όμως, και σε αυτήν την περίπτωση, ήταν ο περιορισμένος αριθμός δειγμάτων με μετρήσιμο αποτέλεσμα.



Γράφημα 6. Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 37°C σε δείγματα 72 h για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *Staph. aureus* και *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 23 του Παραρτήματος.

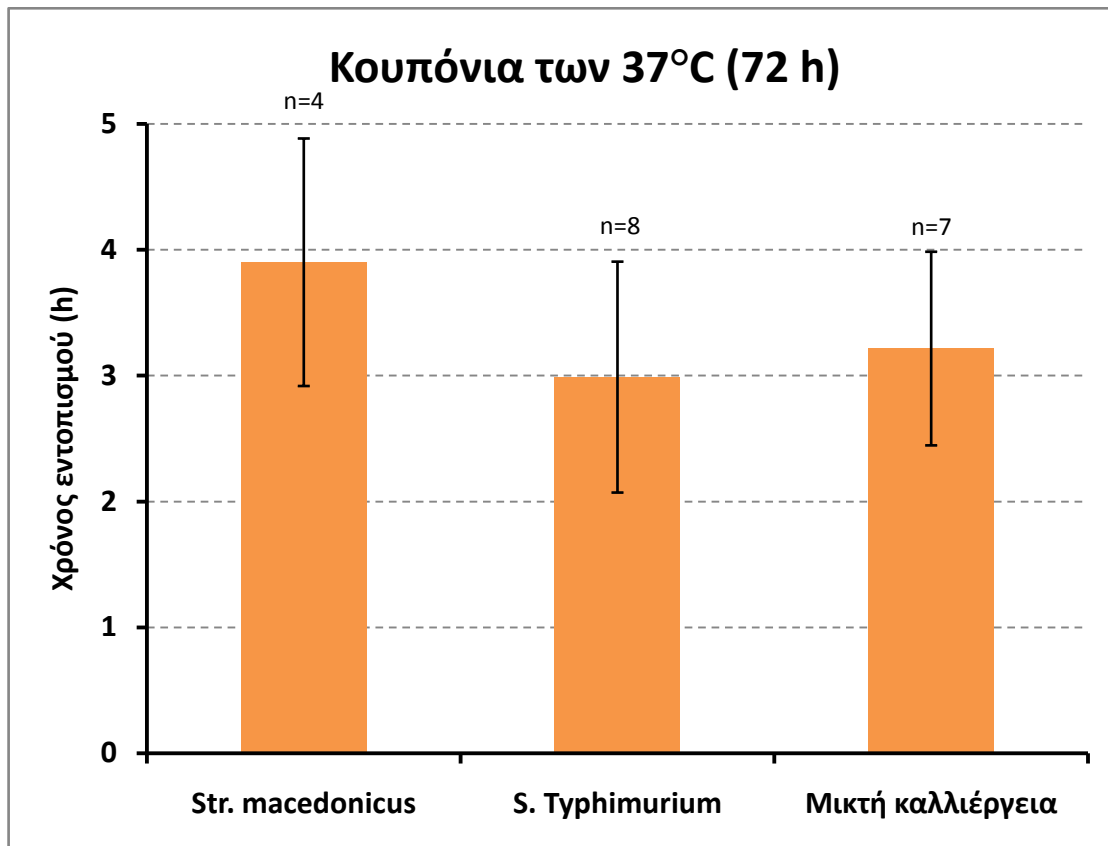
Ο χρόνος εντοπισμού σταθεροποιημένης ηλεκτρικής αγωγιμότητας για κουπόνια των 144 h στους 15°C (Γράφημα 7), ήταν παρόμοιος σε όλες τις περιπτώσεις, με μεγαλύτερο εκείνο του *Str. macedonicus* και μικρότερο εκείνο της μικτής καλλιέργειας. Σε σύγκριση με το Γράφημα 5, ο χρόνος ήταν μεγαλύτερος για όλες τις περιπτώσεις και είναι ξεκάθαρη η διαφορά στη μονοκαλλιέργεια του *Staph. aureus* και της *S. Typhimurium* και τη μικτή με τον *Str. macedonicus*.



Γράφημα 7. Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 15°C σε δείγματα 144 h για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *S. Typhimurium* και *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 24 του Παραρτήματος.

Ο χρόνος εντοπισμού σταθεροποιημένης ηλεκτρικής αγωγιμότητας για κουπόνια των 72 h στους 37°C (Γράφημα 8), ήταν μεγαλύτερος για τον *Str. macedonicus* σε μονοκαλλιέργεια και παρόμοιος για τις άλλες δύο περιπτώσεις.



Γράφημα 8. Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 37°C σε δείγματα 72 h για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *S. Typhimurium* και *Str. macedonicus*.

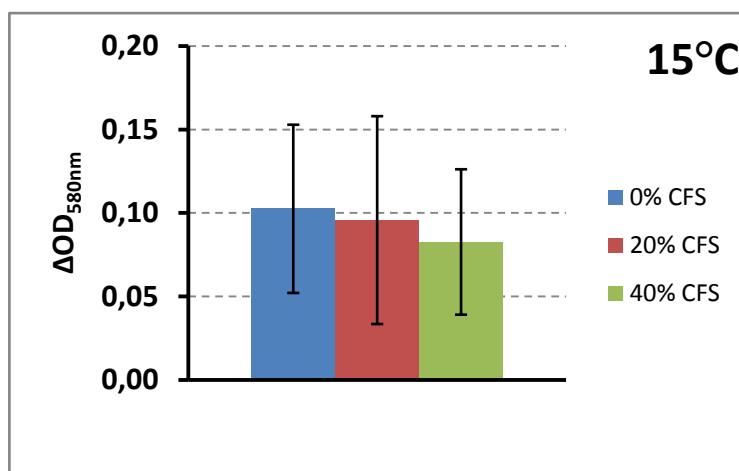
Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 25 του Παραρτήματος.

4.3. Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχία (microtiter plate) πολυστυρενίου παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας *Str. macedonicus*

Στα παρακάτω γραφήματα φαίνεται ο δείκτης σχηματισμού βιοϋμενίου (διαφορά οπτικής πυκνότητας, ΔOD_{580nm}) κατά τη μέτρηση σε σπεκτροφωτόμετρο στα 580nm για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία διαφόρων ποσοστών CFS του *Str. macedonicus*.

Στους 15°C, παρουσία του CFS *Str. macedonicus* (σε συγκέντρωση 20 και 40% v/v), η ΔOD_{580nm} για καλλιέργεια *Staph. aureus* μειώθηκε ελαφρώς και βαθμιδωτά σε σχέση με το 0% (Γράφημα 9). Παρόλα αυτά, οι παρατηρούμενες διαφορές δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές ($P \geq 0,05$) ώστε να μπορέσει μετά βεβαιότητας να

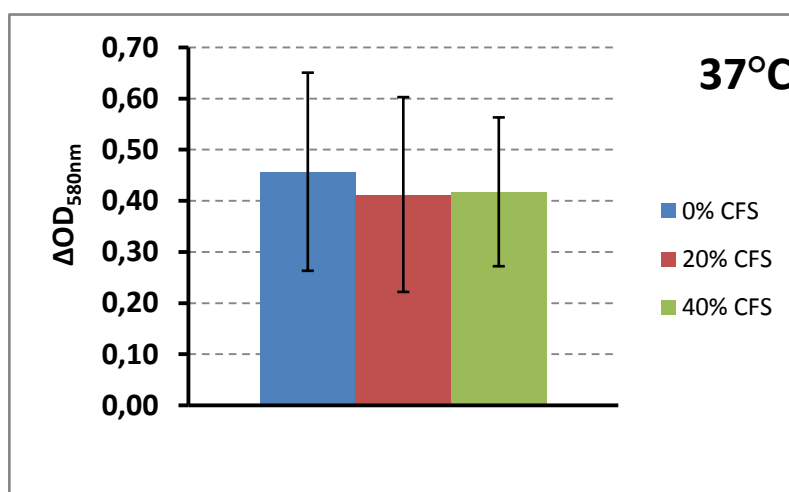
θεωρηθεί ως σημαντική επίδραση του CFS στον σχηματισμό βιοϋμένιου από αυτό το παθογόνο βακτήριο.



Γράφημα 9. ΔOD_{580nm} στους 15°C για καλλιέργεια *Staph. aureus* παρουσία 0%, 20% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 26 του Παραρτήματος.

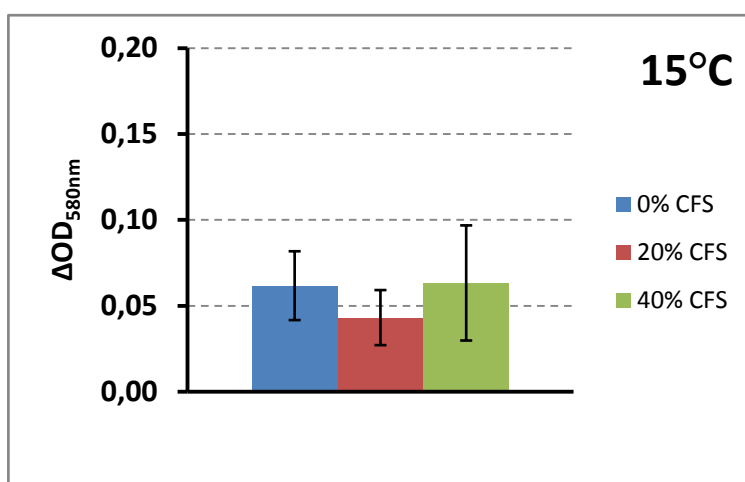
Στους 37°C, για καλλιέργεια *Staph. aureus* παρουσία του CFS *Str. macedonicus* (σε συγκέντρωση 20 και 40% v/v), η ΔOD_{580nm} ήταν σχετικά χαμηλότερη, όχι όμως σημαντικά ($P \geq 0,05$), από ότι χωρίς παρουσία CFS (Γράφημα 10).



Γράφημα 10. ΔOD_{580nm} στους 37°C για καλλιέργεια *Staph. aureus* παρουσία 0%, 20% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 27 του Παραρτήματος.

Για καλλιέργεια *S. Typhimurium*, στους 15°C, η μέτρηση της ΔOD_{580nm} για 0% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*, ήταν παρόμοια, ενώ για παρουσία του CFS σε συγκέντρωση 20% η ΔOD_{580nm} ήταν μικρότερη (γράφημα 11), παρόλα αυτά όχι στατιστικώς σημαντικά ($P \geq 0,05$).

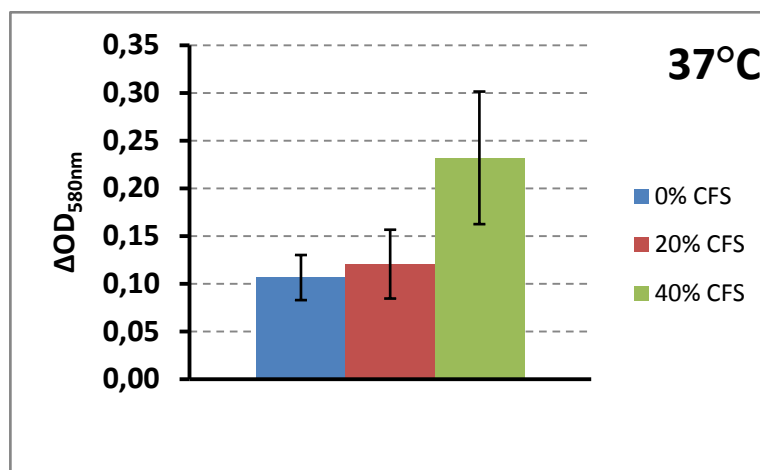


Γράφημα 11. ΔOD_{580nm} στους 15°C για καλλιέργεια *S. Typhimurium* παρουσία 0%, 20% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 28 του Παραρτήματος.

Συγκρίνοντας με το Γράφημα 9, φαίνεται ότι η ΔOD_{580nm} για την *S. Typhimurium* ήταν γενικότερα μικρότερη από ότι για τον *Staph. aureus*.

Στους 37°C, στην καλλιέργεια της *S. Typhimurium*, φάνηκε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση CFS *Str. macedonicus* αυξάνεται και η ΔOD_{580nm} , και μάλιστα για 40% CFS ήταν σχεδόν διπλάσια (Γράφημα 12) ($P < 0,05$). Άρα παρουσία 40% CFS, το συγκεκριμένο παθογόνο βακτήριο φάνηκε να κάνει περισσότερο βιοϋμένιο κάτω από τις συνθήκες που μελετήθηκαν στα πλαίσια του συγκεκριμένου πειράματος.



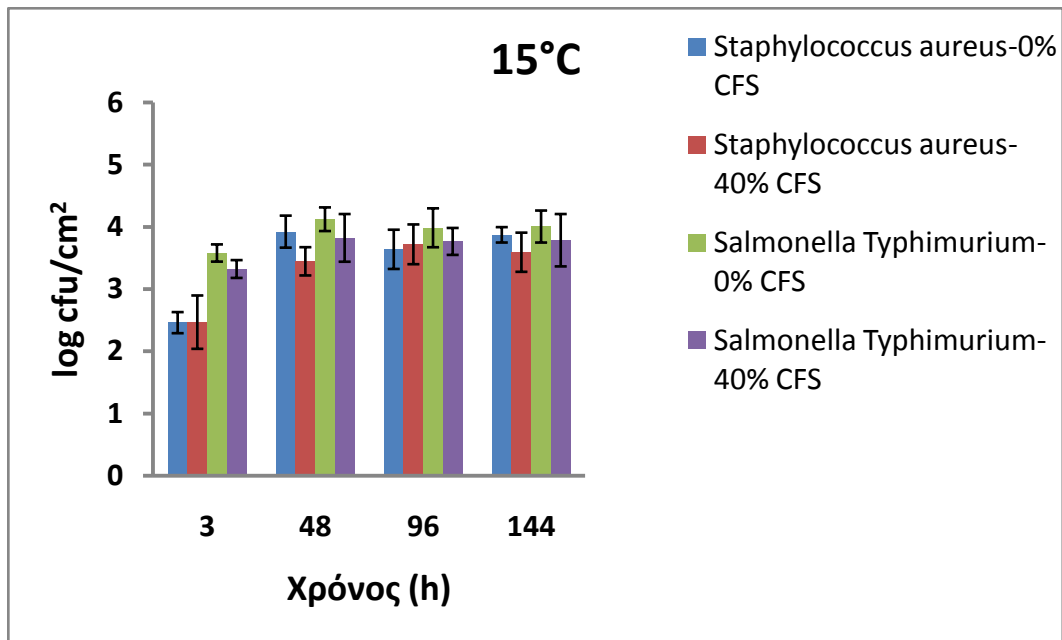
Γράφημα 12. ΔOD_{580nm} στους 37°C για καλλιέργεια *S. Typhimurium* παρουσία 0%, 20% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 29 του Παραρτήματος.

4.4. Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας *Str. macedonicus*

Στα παρακάτω γραφήματα φαίνεται η ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία 0% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*. Η συγκέντρωση 20% δεν χρησιμοποιήθηκε καθώς δεν είχε δώσει κάποιο αξιολογικό εύρημα κατά την ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου.

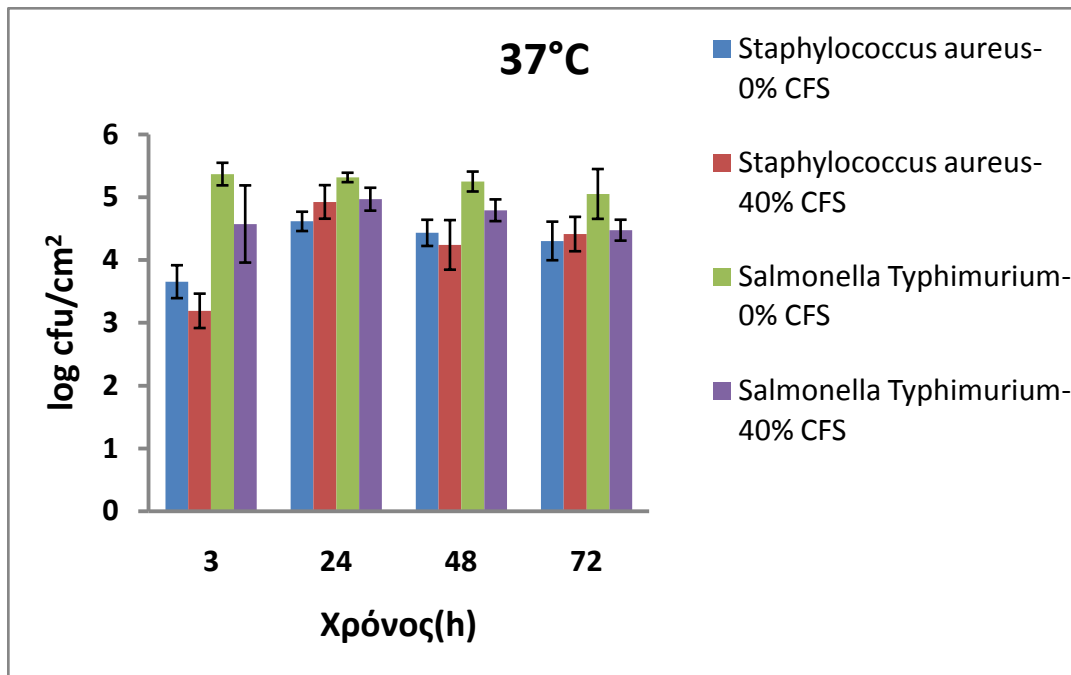
Στους 15°C, στις 3 και στις 96 h, ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του *Staph. aureus* ήταν σχεδόν ίδιος για τις δύο μεταχειρίσεις (συγκεντρώσεις CFS *Str. macedonicus* 0% και 40% v/v) (Γράφημα 13). Στις 48 και 144 h, ωστόσο, ο βιοϋμενικός πληθυσμός του παθογόνου ήταν μειωμένος παρουσία 40% CFS, και μάλιστα στις 48 h επώασης η διαφορά σε σχέση με τη μεταχείριση 0% CFS ήταν στατιστικώς σημαντική ($P < 0,05$). Αναφορικά με τις καλλιέργειες της *S. Typhimurium*, ο βιοϋμενικός πληθυσμός του παθογόνου ήταν μεγαλύτερος στο 0% από ότι στο 40% καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος, χωρίς ωστόσο οι παρατηρούμενες διαφορές να είναι σημαντικές ($P \geq 0,05$). Και οι δύο μικροοργανισμοί έδειξαν ανάπτυξη μέχρι τις 48 h και αργότερα τυπικά σταθεροποίηση του πληθυσμού τους.



Γράφημα 13. Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log\text{cfu}/\text{cm}^2$) στους 15°C για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία 0% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 38 του Παραρτήματος.

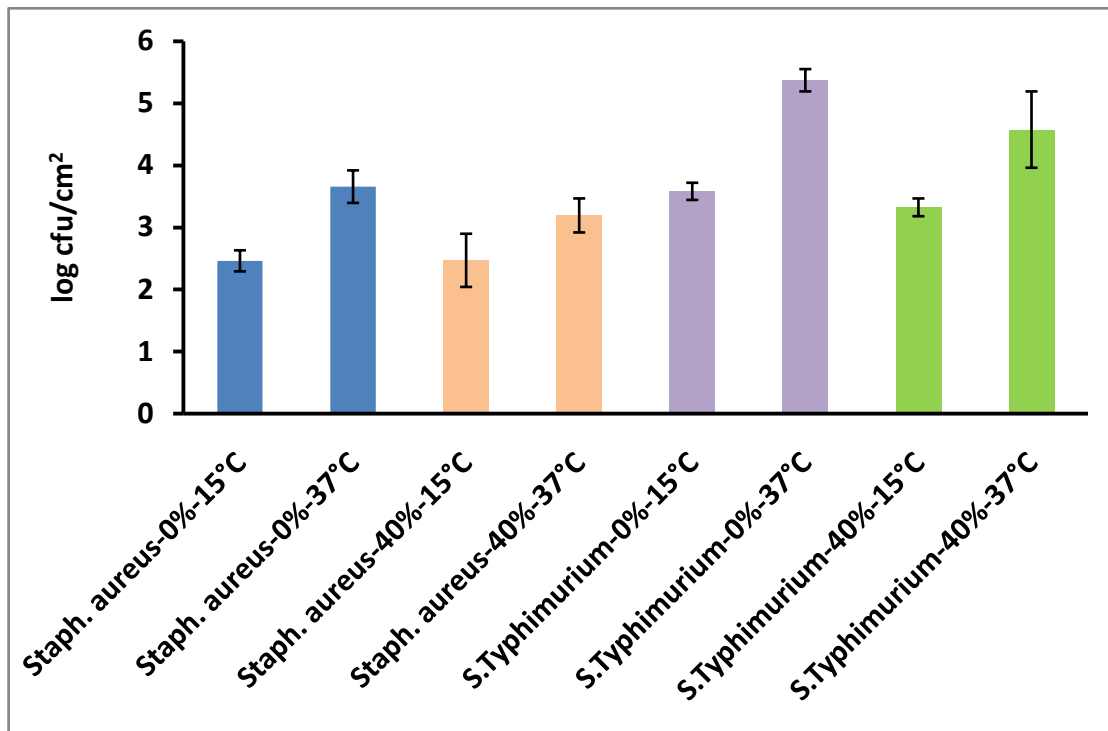
Στους 37°C , στις 3 και στις 48 h, ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του *Staph. aureus* παρουσία 40% CFS *Str. macedonicus* ήταν μικρότερος συγκριτικά με το 0%, ενώ συνέβη το αντίθετο στις 24 και στις 72 h (Γράφημα 14). Παρόλα αυτά, οι προαναφερθείσες διαφορές, με εξαίρεση αυτή που παρατηρήθηκε στις 3 h, δεν ήταν στατιστικώς σημαντικές ($P \geq 0,05$). Αντίθετα, για την *S. Typhimurium*, ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων ήταν σημαντικά μικρότερος ($P < 0,05$) παρουσία 40% CFS συγκριτικά με την απουσία αυτού (0% CFS) σε όλες τα χρονικά σημεία δειγματοληψίας, με τη μεγαλύτερη διαφορά να παρατηρείται στις 3 h επώασης.



Γράφημα 14. Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log\text{cfu}/\text{cm}^2$) στους 37°C για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία 0% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*.

Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 39 του Παραρτήματος.

Συνολικά, παρατηρήθηκε η μεγάλη επιρροή της θερμοκρασίας στην ικανότητα προσκόλλησης των κυττάρων (δεδομένα 3 h), και για τα δύο παθογόνα, με καλύτερη προσκόλληση στην υψηλή θερμοκρασία (37°C) (Γράφημα 15), ενώ η παρουσία των μεταβολικών προϊόντων του *Str. macedonicus* (40% CFS) φάνηκε να επηρεάζει μόνο το παθογόνο *S. Typhimurium* και ιδιαίτερα στους 37°C .



Γράφημα 15. Συγκριτικό γράφημα του πληθυσμού βιοϋμενικών κυττάρων παθογόνου μικροοργανισμού που προσκολλήθηκαν (attachment) επί της επιφάνειας του κουπονιού (log cfu/cm²) στους 15°C και 37°C για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία 0% και 40% v/v CFS *Str. macedonicus*. Τα πλήρη δεδομένα φαίνονται στον Πίνακα 40 του Παραρτήματος.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά την ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα, στους 15°C, η προσκόλληση του *Str. macedonicus* έγινε σε παρόμοιο επίπεδο με τον *Staph. aureus* και για μονοκαλλιέργεια και για μικτή καλλιέργεια. Στη συνέχεια, ο *Str. macedonicus* φάνηκε να αναπτύσσεται καλύτερα και για μονοκαλλιέργεια και για μικτή καλλιέργεια και τελικά να επικρατεί του *Staph. aureus* στη μικτή καλλιέργεια. Αντίθετα, η *S. Typhimurium* προσκολλήθηκε πολύ καλύτερα και γρηγορότερα από τον *Str. macedonicus* και μάλιστα φάνηκε να παρεμποδίζει την προσκόλλησή του στο κουπόνι. Καθώς η *S. Typhimurium* είναι Gram-αρνητικό βακτήριο (Doyle et al., 1997) άρα και υδροφοβικό όπως είναι και η επιφάνεια του κουπονιού (Donlan, 2002), έχει την τάση να προσκολλάται ευκολότερα και πιο γρήγορα από τον Gram-θετικό *Str. macedonicus*. Αντιθέτως, ο *Staph. aureus* που είναι Gram-θετικός (Doyle et al., 1997) εμφανίζει παρόμοια συμπεριφορά κατά την προσκόλληση με τον *Str. macedonicus*. Μετά τη φάση της προσκόλλησης, ο *Str. macedonicus* άρχισε να αναπτύσσεται σημαντικά και ιδιαίτερα σε μικτή καλλιέργεια. Στα πλαίσια του ανταγωνισμού εντός ενός μικτού βιοϋμενίου μπορεί ο ένας μικροοργανισμός να μεγαλώνει ως βάση του βιοϋμενίου (James et al., 1995), όπως η *S. Typhimurium*, και ένας άλλος να αναπτύσσεται επάνω σε αυτή τη βάση, όπως ο *Str. macedonicus*, βρίσκοντας έτσι καλύτερο περιβάλλον επιβίωσης και ανάπτυξης.

Στους 37°C, η προσκόλληση του *Str. macedonicus* και του *Staph. aureus*, όπως στους 15°C, ήταν παρόμοια, επομένως ο *Staph. aureus*, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας, δεν φάνηκε να παρεμποδίζει την προσκόλληση του *Str. macedonicus* όπως συνέβη με την *S. Typhimurium*. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι είναι και τα δύο Gram-θετικά βακτήρια, ή στο γεγονός ότι ο *Staph. aureus* σχηματίζει βιοϋμένια ανά τόπους με μορφή «τσαμπιού σταφυλιού», ενώ ο *Str. macedonicus* εξαπλώνεται ομοιόμορφα στο κουπόνι, όπως και η *S. Typhimurium* (Εικόνα 4.1.1). Αν και ο *Str. macedonicus* δείχνει να αναπτύσσεται καλύτερα παρουσία και των δύο παθογόνων, και ειδικά σε μικτή καλλιέργεια με την *S. Typhimurium*, από ότι σε μονοκαλλιέργεια, εντούτοις τα παθογόνα δεν φάνηκαν να ωφελούνται ή να παρεμποδίζονται από την παρουσία του *Str. macedonicus*. Τα παθογόνα με τη σειρά τους αναπτύσσονται

γρήγορα και στη συνέχεια εμφανίζουν σταθεροποίηση του πληθυσμού ή και πτώση. Πολλά παθογόνα βακτήρια, μεταξύ αυτών και τα *Staph. aureus* (Raad et al., 1992) και *S. Typhimurium* (Hood and Zottola, 1997), αν και έχουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε επιφάνειες ή σε ήδη υπάρχοντα βιοϋμένια, ταυτόχρονα φαίνεται να μην μπορούν να αναπτυχθούν εκτενώς εντός του βιοϋμενίου, ίσως λόγω των διατροφικών τους αναγκών, της ανικανότητά τους να ανταγωνιστούν τους υπόλοιπους μικροοργανισμούς ή τη συσσώρευση των μεταβολικών τους προϊόντων.

Για την ίδια θερμοκρασία (37°C), η *S. Typhimurium* προσκολλήθηκε γρήγορα και παρεμπόδισε την προσκόλληση του *Str. macedonicus*, όπως έγινε και για τους 15°C. Στη συνέχεια, ο *Str. macedonicus* άρχισε να αναπτύσσεται και τελικά επικράτησε σημαντικά της *S. Typhimurium* σε μικτή καλλιέργεια. Η *S. Typhimurium*, σχηματίζει πολύ γρήγορα βιοϋμένιο, αλλά παρόλα αυτά, φαίνεται να εξαντλείται γρήγορα όσον αφορά την ανάπτυξη. Σε αντίθεση, ο *Str. macedonicus* αργεί να σχηματίσει το βιοϋμένιο του αλλά δείχνει πιο ανθεκτικός και συνεχίζει να αναπτύσσεται με το πέρασμα του χρόνου είτε σε μονοκαλλιέργεια είτε όταν βρίσκεται σε μικτή καλλιέργεια, επικρατώντας τελικά σε πληθυσμό σε σχέση με το παθογόνο.

Αναφορικά με την ανάπτυξη βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχία πολυστυρενίου παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας του *Str. macedonicus*, στους 15°C, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επιρροή του CFS στο σχηματισμό βιοϋμενίου των δύο παθογόνων. Στους 37°C, ωστόσο, παρότι στις καλλιέργειες *Staph. aureus* δεν παρατηρήθηκε επιρροή, σε αυτές της *S. Typhimurium* η παρουσία του 40% v/v CFS διπλασίασε την οπτική πυκνότητα. Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται σε μεγαλύτερη βιοϋμενική ανάπτυξη (κύτταρα ή εξωκυτταρική ουσία), σε μεγάλο αριθμό μεταβολικών προϊόντων της *S. Typhimurium*, είτε ακόμη και σε απενεργοποιημένα ή νεκρά κύτταρα.

Κατά την ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα παρουσία υπερκειμένου καλλιέργειας του *Str. macedonicus*, στους 15°C, τα αποτελέσματα ήταν αντίστοιχα με εκείνα της ανάπτυξης βιοϋμενίου σε κουπόνια χωρίς CFS. Γενικά δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη επιρροή του CFS στη συνολική βιοϋμενική ανάπτυξη των παθογόνων κάτω από τις πειραματικές συνθήκες που μελετήθηκαν στην

παρούσα διατριβή. Στους 37°C, η παρουσία του 40% v/v CFS φάνηκε να επηρεάζει την προσκόλληση και των δύο παθογόνων σε σχέση με το 0%. Στη συνέχεια, η παρουσία του CFS δεν φάνηκε να επηρεάζει τη βιοϋμενική ανάπτυξη του *Staph. aureus*, αλλά φάνηκε να κρατά την ανάπτυξη της *S. Typhimurium* σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι στο 0% CFS. Ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη CFS, η θερμοκρασία έπαιξε μεγάλο ρόλο κατά τη διάρκεια της προσκόλλησης, με σημαντικά μεγαλύτερους πληθυσμούς να προσκολλώνται στα κουπόνια στους 37°C από ότι στους 15°C, και για τα δύο παθογόνα.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, φαίνεται ξεκάθαρα πως ένα μικτό βιοϋμένιο είναι ένα δυναμικό σύστημα, με πολλές μικροβιακές αλληλεπιδράσεις να λαμβάνουν χώρα. Τέτοιου είδους αλληλεπιδράσεις είναι δυνατόν να επηρεάζονται τόσο από βιοτικούς παράγοντες, όπως το είδος των βακτηρίων του βιοϋμενίου, όσο και από αβιοτικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία ή η επιφάνεια στην οποία είναι προσκολλημένο το βιοϋμένιο.

Βιβλιογραφία

- Agarwal R.K., Singh S., Bhilegaonkar K.N., Singh V.P., 2011. "Optimization of microtiter plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes". *International Food Research Journal* 18, 1493–1498.
- Anastasiou R., Georgalaki M., Manolopoulou E., Kandarakis I., De Vuyst L., Tsakalidou E., 2007. "The performance of *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 as starter culture in Kasser cheese production". *International Dairy Journal*, 17: 208–217.
- Argudin M. A., Mendoza M. C., Rodicio M. R., 2010. "Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins". *Toxins*, 2:1751–1773.
- Audia J.P., Webb C.C., Foster J.W., 2001. "Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria". *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 97–106.
- Bang I.S., Audia J.P., Park Y.K., Foster J.W., 2002. "Autoinduction of the ompR response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response". *Mol. Microbiol.* 44, 1235–1250.
- Bonn D., 2003. "New bacteriocin from Greek cheese". *Lancet Infect. Dis.* 3:61.
- Bridier A., Briandet R., Thomas V., Dubois-Brissonnet F., 2011a. «Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review». *Biofouling* 27, 1017e1032.
- Bridier A., Sanchez-Vizuet P., Guilbaud M., Piard J.-C., Naïtali M., Briandet R., 2015. "Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens". *Food Microbiology* 45, 167e178.

Buchanan R.L., Edelson S.G., Boyd G., 1999. "Effects of pH and acid resistance on the radiation resistance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*". J. Food Prot. 62, 219–228.

Burmølle M., et al., 2006. "Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms". Appl. Environ. Microbiol, 72:3916–3923.

Camilli A., Bassler B.L., 2006. "Bacterial small-molecule signaling pathways". Science, 311:1113–1116.

Camper A.K., Warnecke M., Jones W.L. and McFeters G.A., 1998. "Pathogens in model distribution system biofilms". Denver, American Water Works Association Research Foundation.

Carpentier B., Cerf O., 1993. "Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry". Journal of Applied Bacteriology, 75:499-511.

Castonguay M.H., et al., 2006. "Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria". Res. Microbiol., 157:471–478.

Characklis W.G., 1973. "Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes". Water Res 7:1249–58.

Characklis W.G., 1990. "Biofilm processes". In: Characklis W.G., Marshall K.C., editors. Biofilms. New York: John Wiley & Sons; p. 195–231.

Characklis W.G., McFeters G.A. and Marshall K.C., 1990. "Physiological ecology in biofilm systems". In: Characklis W.G., Marshall K.C., editors. Biofilms. New York: John Wiley & Sons; p. 341–94.

Chmielewski R., Frank J., 2003. "Biofilm formation and control in food processing facilities", *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:22-32.

Clouser C.S., Knabel S.J., Mast M.G., Doores S., 1995. "Effect of type of defeathering system on *Salmonella* cross-contamination during commercial processing". *Poult. Sci.* 74, 732–741.

Costerton J.W., Geesey G.G., Cheng K-J, 1978. "How bacteria stick". *Sci Am*;238:86–95.

Costerton J.W., 1995. "Overview of microbial biofilms". *Journal of Industrial Microbiology*, 15:137-140.

Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R., Lappin-Scott H.M., 1995. "Microbial biofilms". *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 711–745.

Cowan M.M., Warren T.M., Fletcher M., 1991. "Mixed species colonization of solid surfaces in laboratory biofilms". *Biofouling*; 3:23–34.

Cummings K., Barrett E., Mohle-Boetani J.C., Brooks J.T., Farrar J., Hunt T., Fiore A., Komatsu K., Werner B., Slutsker L., 2001. "A multi-state outbreak of *Salmonella enterica* serotype baidon associated with domestic raw tomatoes". *Emerging Infectious Diseases*, 7:1046-1048.

Cunningham R., Cheesbrough J., 1992. "Comparative activity of glycopeptide antibiotics against coagulase-negative staphylococci embedded in fibrin clots". *J. Antimicrob. Chemother.* 30:321–26

Da Silva Meira Q., De Medeiros Barbosa I., Alves Aguiar Athayde A., de Siqueira-Junior J., de Souza E., 2012. "Influence of temperature and surface kind on biofilm

formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces and sensitivity to sanitizers". *Food Control*, 25:469-475.

Davey M.E., O'Toole G.A., 2000. "Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics". *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64, 847–867.

Delcour J., Ferain T., Hols P., 2000. "Advances in the genetics of thermophilic lactic acid bacteria". *Current Opinion in Biotechnology*, 11, 497–504.

De Vuyst L., Vandamme E.J., 1994. "Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics, and applications". London, UK: Blackie Academic & Professional.

De Vuyst L., Vandamme E.J., 1994. "Antimicrobial potential of lactic acid bacteria". In L. De Vuyst, & E.J. Vandamme (Eds.), *Microbiology, genetics and applications*, (pp. 91–142). London, UK: Blackie Academic and Professional.

De Vuyst L., Tsakalidou E., 2008. "*Streptococcus macedonicus*, a multi-functional and promising species for dairy fermentations". *International Dairy Journal*, 18 , p: 476–485.

Donlan R.M., 2001. "Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process". *Clinical Infectious Diseases*, 33:1387-1392.

Donlan R.M., 2002. "Biofilms: microbial life on surfaces". *Emerging Infectious Diseases*, Vol 8, No 9, p. 881-888.

Donohue D.C., Gueimonde M., 2012. "Some Considerations for the Safety of Novel Probiotic Bacteria". In: *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 4th edition. Edited by Lahtinen S, Salminen S, von Wright A, Ouwehand AC. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group.

Dourou D., Beauchamp C.S., Yoon Y., Geornaras I., Belk K. E., Smith G.C., Nychas G.J., Sofos J.N., 2011. "Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157: H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing". *International Journal of Food Microbiology*, 149: 262–268.

Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., 1997. "*Salmonella* species ","*Staphylococcus aureus*". In: *Food Microbiology, fundamentals and frontiers*. ASM Press, Washington D.C., American Society for Microbiology.

Dufour A., Hindre´ T., Haras D., Le Pennec J.-P., 2007. "The biology of lantibiotics from the lactacin 481 group is coming of age". *FEMS Microbiology Reviews*, 31, 134–167.

FDA, 2012. "Bad bug book: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook", 2nd ed. US Food and Drug Administration, Silver Spring, p. 87–92. <http://www.fda.gov/Food/FoodbornellnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm2006773.htm>. Accessed 27 March 2013.

Finlay J.A., Callow M.E., 1997. "The toxicity of alkyl amines: the effects of pH". *Biofouling* 11, 19–30.

Flint S.H., Ward L.J.H., Brooks J.D., 1999. "*Streptococcus waius* sp. nov., a thermophilic streptococcus from a biofilm". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 759–767.

Foster J.W., 1995. "Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium". *Crit. Rev. Microbiol.* 21, 215–237.

Georgalaki M.D., Sarantinopoulos P., Ferreira E.S., De Vuyst L., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., 2000. "Biochemical properties of *Streptococcus macedonicus* strains isolated from Greek Kasser cheese". *Journal of Applied Microbiology*, 88, 817–825.

Georgalaki M.D., Van den Berghe E., Kritikos D., Devreese B., Van Beeumen J., Kalantzopoulos G., et al., 2002. "Macedocin, a foodgrade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198". *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5891–5903.

Georgalaki M., Papadelli M., Chassioti E., Anastasiou R., Aktypis A., De Vuyst L., Van Driessche G., Devreese B., Tsakalidou E., 2010. «Milk protein fragments induce the biosynthesis of macedocin, the lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198». *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1143e1151.

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.

Gilbert P., Evans D.J., Brown M.R.W, 1993. "Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ". *J Appl Bacteriol Symposium Supplement*; 74:67S–78S.

Gilbert P., Das J.R., Jones M.V., Allison D.G., 2001. "Assessment of resistance towards biocides following the attachment of micro-organisms to, and growth on, surfaces". *J. Appl. Microbiol.* 91, 248–254.

Gjermansen M., Ragaw P., Sternberg C., Molin S., Tolker-Nielsen T., 2005. "Characterization of starvation induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms". *Enviromental Microbiology*, 7:894-904.

Guillier L, Stahl V, Hezard B, Notz E, Briandet R., 2008. "Modelling the competitive growth between *Listeria monocytogenes* and biofilm micro- flora of smear cheese wooden shelves". *International Journal of Food Microbiology*, 128:51–57.

Hansen E.B., 2002. "Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future". *International Journal of Food Microbiology*, 78, 119–131.

Hedburg C.W., Angulo F.J., White K.E., Langkop C.W., Schell W.L., Stobierski M.G., Schutat A., Besser J.M., Dietrich S., Helsen L., Griffin P.M., McFarland J.W., Osterholm M.T. & the Investigation Team., 1999. "Outbreaks of salmonellosis associated with eating uncooked tomatoes: Implications for public health". *Epidemiology and Infection*, 122:135-393.

Heukelekian H., Heller A., 1940. "Relation between food concentration and surface for bacterial growth". *J Bacteriol*; 40:547–58.

Hoffmann S., Batz M., Morris J.G., 2012. "Annual Cost of Illness and Quality Adjusted Life Year Losses in the United States Due to 14 Foodborne Pathogens". *Journal of Food Protection* 75(7): 1291-1302.

Hood S.K., Zottola E.A., 1997. "Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems". *Int J Food Microbiol*; 37:145–53.

Isiklar Z.A., Darouiche R.O., Landon G.C., Beck T., 1996. "Efficacy of antibiotics alone for orthopaedic device related infections". *Clin. Orthop. Relat. Res.* 332:184–89.

James G.A., Beaudette L., Costerton J.W., 1995. "Interspecies bacterial interactions in biofilms". *Journal of Industrial Microbiology*; 15:257–62.

Jones H.C., Roth I.L., Saunders W.M. III, 1969. "Electron microscopic study of a slime layer". *J Bacteriol*; 99:316–25.

Kapfhammer D., Karatan E., Pflughoeft K.J., Watnick P.I., 2005. "Role for glycine betaine transport in *Vibrio cholerae* osmoadaptation and biofilm formation within microbial communities". *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3840–3847.

Korber D.R., Lawrence J.R., Sutton B., Caldwell D.E., 1989. "Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot+ and Mot-

Pseudomonas fluorescens". Microb Ecol; 18:1–19.

Leriche V., Carpentier B., 2000. "Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms". Journal of Applied Microbiology, 88:594-605.

Leriche V., Briandet R., Carpentier B., 2003. "Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another". Environmental Microbiology, 5:64–71.

Leyer G.J., Johnson E.A., 1992. "Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. In cheese". Appl. Environ. Microbiol. 58, 2075–2080.

Leyer G.J., Wang L.L., Johnson E.A., 1995. "Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods". Appl. Environ. Microbiol. 61, 3752–3755.

Lianou A., Koutsoumanis K.P., 2012. "Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions". International Journal of Food Microbiology, 160. 171-178.

Loeb G.I., Neihof R.A., 1975. "Marine conditioning films". Advances in Chemistry; 145:319–35.

Majowicz S.E., Musto J., Scallan E., et al., 2010. "The Global Burden of Nontyphoidal *Salmonella* Gastroenteritis". Clinical Infectious Diseases, 50:882-889.

Maragkoudakis P.A., Papadelli M., Georgalaki M., Panayotopoulou E.G., Martinez-Gonzalez B., Mentis A.F., Petraki K., Sgouras D.N., Tsakalidou E., 2009. "In vitro and in vivo safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198". Int J Food Microbiol, 133(1–2):141–147.

Mather A.E., et al., 2013. “Distinguishable epidemics within different hosts of the multidrug resistant zoonotic pathogen *Salmonella* Typhimurium DT 104”. *Science*, 341:1514-1517.

Medeiros L.C., Kendall P., Hillers V., Chen G., Dimascola S., 2001. “Identification and classification of consumer food- handling behaviors for food safety education”. *Journal of the American Dietetic Association*, 101, 1326–1339.

Montville T.J., Matthews K.R., 2008. “Food microbiology: An introduction”. 2nd edition, ASM Press, Washington D.C.

Montville T.J., Matthews K.R., 2010. “Μικροβιολογία Τροφίμων”. Εκδ. Ιων, Αθήνα.

Mora D., Ricci G., Guglielmetti S., Daffonchio D., Fortina M.G., 2003. “16S-23S rRNA intergenic spacer region sequence variation in *Streptococcus thermophilus* and related dairy streptococci and development of a multiplex ITS-SSCP analysis for their identification”. *Microbiology*, 149, 807–813

Moschetti G., Blaiotta G., Aponte I., Catzeddu P., Villani F., Coppola S., 1998. “Random amplified polymorphic DNA and amplified ribosomal DNA spacer polymorphism—Powerful methods to differentiate *Streptococcus thermophilus* strains”. *Journal of Applied Microbiology*, 85, 25–36.

Nascentes N., Chiarini E., Teresa M., de Aguiar M., Augusto L., 2010. “PFGE characterization and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities”. *Meat science*, 92:635-643.

Neal J. A., Binkley M., Henroid D., 2012. “Assessing factors contributing to food safety culture in retail food establishments”. *Food Protection Trends*, 32:468–476.

Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F., 2009. “*Streptococcus* adherence and

Colonization". *Microbiol Mol Biol*, 73(3):407–450.

Norwood D., 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.

O'Leary D., McCabe E.M., McCusker M.P., Martins M., Fanning S., Duffy G., 2015. "Acid environments affect biofilm formation and gene expression in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104". *International Journal of Food Microbiology* 206: 7–16.

O'Toole G., Kaplan H.B., Kolter R., 2000. "Biofilm formation as microbial development". *Annu. Rev. Microbiol.* 54:49–79.

Papadimitriou K., Anastasiou R., Mavrogonatou E., Blom J., Papandreou N.C., Hamodrakas S., Ferreira S., Renault P., Supply P., Pot B., Tsakalidou E., 2014. "Comparative genomics of the dairy isolate *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 against related members of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex". *BMC Genomics*, 15:272.

Pinchuk I.V., Beswick E.J., Reyes V.E., 2010. "Staphylococcal enterotoxins". *Toxins* 2:2177–2197.

Pui C.F., Wong W.C., Chai L.-C., Tunung R., Jeyaletchum, P., Noor, Hidayah M.S., Ubong A., Farinazleen M.G., Cheah Y.K., Son R., 2011. "Review Article *Salmonella*: A foodborne pathogen". *International Food Research Journal*, 18:465-473.

Raad I., Darouiche R., Hachem R., Sacilowski M., Bodey G.P., 1995. "Antibiotics and prevention of microbial colonization of catheters". *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(11):2397–400.

Raad I.I., Sabbagh M.F., Rand K.H., Sherertz R.J., 1992. "Quantitative tip culture

methods and the diagnosis of central venous catheter-related infections”.

Diagn Microbiol Infect Dis; 15:13–20.

.

Rao D., Webb J.S., Kjelleberg S., 2005. “Competitive interactions in mixed- species biofilms containing the marine bacterium *Pseudoalteromonas tunicate*”. Applied and Environmental Microbiology, 71:1729–1736.

Reisner A., Holler B.M., Molin S., Zechner E.L., 2006. “Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion”. Journal of Bacteriology, 188:3582-3588.

Rychlik I., Barrow P.A., 2005. “*Salmonella* stress management and its relevance to behaviour during intestinal colonisation and infection”. FEMS Microbiol. Rev. 29, 1021–1040.

Scharff R., 2012. “Economic Burden from Health Losses Due to Foodborne Illness in the United States”. Journal of Food Protection 75: 123-31.

Schlegel L., Grimont F., Ageron E., Grimont P.A.D., Bouvet A., 2003. “Reappraisal of the taxonomy of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex and related species: Description of *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* subsp. nov., *S. gallolyticus* subsp. *macedonicus* subsp. nov. and *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* subsp. nov”. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 631–645.

Simões M., Simões L.C., Pereira M.O., Vieira M.J., 2008. “Antagonism between *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* in planktonic systems and in biofilms”. Biofouling, 24:339-349.

Skandamis P.N., Stopforth J.D., Ashton L.V., Geornaras I., Kendall P.A., Sofos J.N., 2009. “*Escherichia coli* O157:H7 survival, biofilm formation and acid tolerance under simulated slaughter plant moist and dry conditions”. Food Microbiol. 26, 112–119.

Speranza B., Corbo M., Sinigaglia M., 2011. "Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* spp. biofilm formation". *Journal of Food Science* 76:M12-M16.

Stepanović S., Ćirković I., Mijac V., Švabić-Vlahović M., 2003. "Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp". *Food Microbiology*, 20:339-343.

Stepanović S., Ćirković I., Ranin L., Švabić-Vlahović M., 2004. "Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface". *Letters in Applied Microbiology* 38, 428–432.

Stewart P.S., Camper A.K., Handran S.D., Huang C-T., Warnecke M., 1997. "Spatial distribution and coexistence of *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms". *Microb Ecol*; 33:2–10.

Stewart C.M., 2003. "*Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins". Ch 12 In: Hocking AD (ed) *Foodborne microorganisms of public health significance*. 6th ed, Australian Institute of Food Science and Technology (NSW Branch), Sydney, 359–380.

Stoodley P., Sauer K., Davies D.G., Costerton J.W., 2002. "Biofilms as complex differentiated communities", *Annual Review of Microbiology*, 56:187-209.

Tait K., Sutherland I.W., 2002. "Antagonistic interactions amongst bacteriocin-producing enteric bacteria in dual species biofilms". *Journal of Applied Microbiology*, 93:345–352.

Taormina P.J., Beuchat L.R., 2002. "Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial foodprocessing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat". *J. Appl. Microbiol.* 92, 71–80.

Tolker-Nielsen T, Molin S., 2000. "Spatial organization of microbial biofilm

Communities". *Microb Ecol*; 40:75–84.

Tsakalidou E., Manolopoulou E., Kabaraki E., Zoidou E., Pot B., Kersters K., et al., 1994. "The combined use of whole-cell protein extracts for the identification (SDS-PAGE) and enzyme activity screening of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek dairy products". *Systematic and Applied Microbiology*, 17, 444–458.

Tsakalidou E., Zoidou E., Pot B., Wassill L., Ludwig W., Devriese L. A., et al., 1998. "Identification of streptococci from Greek Kasser cheese and description of *Streptococcus macedonicus* sp. nov". *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 519–527.

Van den Berghe E., 2005. "Purification and production kinetics of the foodgrade lantibiotic macedocin and the class IIa bacteriocin enterocin A". Ph.D. thesis, Vrije Universiteit Brussel, Brussels, Belgium.

Van den Berghe E., Skourtas G., Tsakalidou E., De Vuyst L., 2006. "*Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 produces the lantibiotic, macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture". *International Journal of Food Microbiology*, 107, 138–147.

Van Houdt R., Michiels A., 2010. "Biofilm formation and the food industry- A focus on the bacterial outer surface", *Journal of Applied Microbiology*, 109:117-1131.

Vergeres P., Blaser J.. 1992. "Amikacin, ceftazidime, and flucloxacillin against suspended and adherent *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* in an in vitro model of infection". *J. Infect. Dis.* 165:281–89.

Wingender J., Neu T.R., Flemming , 1999. "What are bacterial extracellular polymeric substances?", In: Wingender J., Neu T.R., Flemming (Eds). *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, Springer, pp.1-19.

Zobell C.E., 1943. "The effect of solid surfaces on bacterial activity". J Bacteriol; 46:39–56.

Κέντρο Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων, ΚΕΕΛΠΝΟ, 2014α. "Επιδημιολογικά δεδομένα της λοίμωξης για τη σαλμονέλλωση (μη τύφο – παρατυφική) στην Ελλάδα 2004-2013" (Σύστημα Υποχρεωτικής δήλωσης).

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Αποτελέσματα

6.1.1. *Staph. aureus/Str. macedonicus* μέθοδος με κουπόνια

Πίνακας 6.1: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Str.macedonicus* σε TSA.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,967575	4,967575	5,0108	2,355296	2,601278	2,179204	3,68	1,43
48	3,732046	3,498459	3,074469	3,564555	3,508748	3,489442	3,48	0,22
96	4,654253		4,480234	3,992118	5,033076	4,334106	4,50	0,39
144	4,967575	4,967575	5,0108	5,271123	5,398564	6,185365	5,30	0,47

Πίνακας 6.2: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες του *Str.macedonicus* για μικτή καλλιέργεια με *Staph.aureus* σε TSA.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	6,069705	5,996864	5,985384	2,859151	2,64586	2,564555	4,35	1,83
48	3,124743	3,097534	2,952155	3,413288	3,431016	3,355296	3,23	0,20
96	4,523035	4,46444	4,297894	5,302589	4,705174	4,666545	4,66	0,35
144	6,069705	5,996864	5,985384	6,43275		6,387185	6,17	0,22

Πίνακας 6.3: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Staph.aureus* σε BP.

<i>Staphylococcus aureus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (BP)								
	log cfu/cm²							
Χρόνος (h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,365515	4,589379	4,723273	3,001559	2,84599	2,564555	3,68	0,98
48	3,160181	3,878174	3,122982	3,446376	3,104958	3,492469	3,37	0,30
96	4,394804	4,028712	4,31183	4,55159	4,55159	4,119436	4,33	0,22
144	4,365515	4,589379	4,723273	4,268605	4,449717	3,919567	4,39	0,28

Πίνακας 6.4: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες του *Staph.aureus* για μικτή καλλιέργεια με *Str.macedonicus* σε BP.

<i>Staphylococcus aureus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (BP)								
	log cfu/cm²							
Χρόνος (h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,695834	4,258386	4,977559	2,818406	2,85262	2,64586	3,71	1,05
48	3,859151	3,74908	3,577145	3,369536	3,166615	3,640531	3,56	0,25
96	4,389102	4,386223	4,237196	3,996864	4,411474	3,431016	4,14	0,38
144	4,695834	4,297894	4,977559	5,285929	4,160181	5,108623	4,75	0,45

Πίνακας 6.5: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Str.macedonicus* σε TSA.

<i>Streptococcus macedonicus</i>- ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,967575	4,967575	5,0108	2,355296	2,601278	2,179204	3,68	1,43
24	5,552904		5,28105	5,818406	5,564555	5,342707	5,51	0,21
48		3,033076			1,811228	2,033076	2,29	0,65
72	1,033076	2,803928	1,033076	1,811228	1,033076	1,033076	1,46	0,73

Πίνακας 6.6: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες του *Str.macedonicus* για μικτή καλλιέργεια με *Staph.aureus* σε TSA.

<i>Streptococcus macedonicus</i>- ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	6,069705	5,996864	5,985384	2,859151	2,64586	2,564555	4,35	1,83
24	4,55159	4,074469	4,936166	4,237196	5,510198	4,811228	4,69	0,52
48	5,64586	5,878174	5,577145	5,495474	5,189928	4,825468	5,44	0,37
72	3,510198	3,510198		2,94689	3,577145	3,461211	3,40	0,26

Πίνακας 6.7: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Staph.aureus* σε BP.

<i>Staphylococcus aureus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (BP)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος (h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,365515	4,589379	4,723273	3,001559	2,84599	2,564555	3,68	0,98
24	5,890409	5,564555	5,740647	5,564555	5,686289	5,166615	5,60	0,25
48	5,237196	5,601278	5,635136	4,394804	4,209168	5,0108	5,01	0,60
72	4,461211	4,182296	4,271123	4,283496	4,14702	4,223408	4,26	0,11

Πίνακας 6.8: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες του *Staph.aureus* για μικτή καλλιέργεια με *Str.macedonicus* σε BP.

<i>Staphylococcus aureus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (BP)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,695834	4,258386	4,977559	2,818406	2,85262	2,64586	3,71	1,05
24	5,431016	4,796504	5,818406	5,470827	5,437054	5,676529	5,44	0,35
48	5,179204	4,818406	4,919567	4,31183	4,686289	4,413288	4,72	0,32
72	4,394804	4,263525	4,237196	5,288349	5,212053	5,630772	4,84	0,61

Συνολικά:

Πίνακας 6.9: Συνολικά δεδομένα σχηματιζόμενου επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμενίου ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για καλλιέργειες *Staph.aureus* και *Str.macedonicus*.

Χρόνος (h)	<i>Streptococcus macedonicus</i> - Μονοκαλλιέργεια		<i>Streptococcus macedonicus</i> -Μικτή καλλιέργεια	
	Mean	sd	Mean	sd
3	2,378593	0,21199909	2,689856	0,152145904
48	3,477953	0,217422864	3,229005	0,197746937
96	4,498758	0,385296095	4,659946	0,347312045
144	5,300167	0,468843046	6,174378	0,218076246
Χρόνος (h)	<i>Staphylococcus aureus</i> - Μονοκαλλιέργεια		<i>Staphylococcus aureus</i> -Μικτή καλλιέργεια	
	Mean	sd	Mean	sd
3	2,804035	0,221502357	2,772296	0,110824523
48	3,367523	0,301438391	3,560343	0,254184629
96	4,326327	0,218066577	4,141979	0,381823305
144	4,386009	0,279619898	4,754337	0,452265659

Πίνακας 6.10: Συνολικά δεδομένα σχηματιζόμενου επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμενίου ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για καλλιέργειες *Staph.aureus* και *Str.macedonicus*.

Χρόνος (h)	<i>Streptococcus macedonicus</i> - Μονοκαλλιέργεια		<i>Streptococcus macedonicus</i> -Μικτή καλλιέργεια	
	<i>Mean</i>	<i>sd</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>
3	2,378593	0,211999	2,689856	0,152145904
24	5,511924	0,21232	4,686808	0,519812225
48	2,29246	0,650914	5,435342	0,373179961
72	1,45791	0,729182	3,401128	0,257252837
Χρόνος (h)	<i>Staphylococcus aureus</i> - Μονοκαλλιέργεια		<i>Staphylococcus aureus</i> -Μικτή καλλιέργεια	
	<i>Mean</i>	<i>sd</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>
3	2,804035	0,221502	2,772296	0,110824523
24	5,602178	0,245712	5,43839	0,350499073
48	5,014731	0,601945	4,721431	0,323165256
72	4,261426	0,110717	4,837783	0,609692574

6.1.2. *S. Typhimurium/Str. macedonicus* μέθοδος με κουπόνια

Πίνακας 6.11: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96, 144 και 192 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Str.macedonicus* σε TSA.

<i>Streptococcus macedonicus</i>- ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	2,538226	2,14702	2,796504	2,129986	2,477121	2,307234	2,40	0,26
48	3,714318	3,510198	3,304918	3,796504	3,55159	3,349047	3,54	0,19
96	4,169797	4,200394	4,369536	4,041677	4,316378	4,361456	4,24	0,13
144	5,697718	5,353223	5,739794	5,466846	5,176091	5,541606	5,50	0,21
192				6,342707	6,179204	6,564555	6,36	0,19

Πίνακας 6.12: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96, 144 και 192 ώρες του *Str.macedonicus* για μικτή καλλιέργεια με *S.Typhimurium* σε TSA.

<i>Streptococcus macedonicus</i>- ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	1,811228	1,510198	1,510198	2,033076	1,811228	1,033076	1,62	0,35
48	3,188412	3,361456	3,714318	3,019848	3,260963	3,140286	3,28	0,24
96	4,263525	4,656326	4,263525	4,334106	4,803928	4,878174	4,53	0,28
144	5,179204	5,263525	5,480234	5,411474	5,467645	5,34483	5,36	0,12
192	6,54496	6,24792	6,546294	6,349047	6,285929	6,001559	6,33	0,20

Πίνακας 6.13: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96, 144 και 192 ώρες για μονοκαλλιέργεια *S.Typhimurium* σε XLD.

<i>Salmonella Typhimurium</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (XLD)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,0665	3,033076	3,316378	4,001559	3,695834	3,355296	3,41	0,38
48	4,577145	5,156928	4,972596	4,601278	3,732046	4,033076	4,51	0,54
96	3,61286	4,288349	4,200394	4,05011	3,925171	3,957356	4,01	0,24
144	3,773439	4,015348	4,024303	4,318634	3,94689	3,524438	3,93	0,27
192	4,133447	4,371533	4,28105	4,336273	4,457958	4,31183	4,32	0,11

Πίνακας 6.14: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96, 144 και 192 ώρες του *S.Typhimurium* για μικτή καλλιέργεια με *Str.macedonicus* σε XLD.

<i>Salmonella Typhimurium</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (XLD)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,635136	3,413288	3,635136	2,996864	2,413288	2,635136	3,12	0,52
48	5,361456	5,377469	5,603619	4,796504	4,796504	4,941561	5,15	0,35
96	3,839256	3,589379	3,825468	4,140286	3,656326	3,788951	3,81	0,19
144	4,041677	3,676529	3,908138	3,757352	3,902308	3,811228	3,85	0,13
192	4,61286	4,495474	4,695834	3,839256	4,122982	4,327543	4,35	0,32

Πίνακας 6.15: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Str.macedonicus* σε TSA.

<i>Streptococcus macedonicus</i>- ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	2,538226	2,14702	2,796504	2,129986	2,477121	2,307234	2,40	0,26
24	4,323111	4,133447	5,346944	5,588171		4,902308	4,86	0,63
48	3,086155	3,06246	3,231734	2,31183	2,577145	2,431016	2,78	0,39
72	1,811228	1,033076	1,033076	0,510198	0,334106	1,46444	1,03	0,56

Πίνακας 6.16: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες του *Str.macedonicus* για μικτή καλλιέργεια με *S.Typhimurium* σε TSA.

<i>Streptococcus macedonicus</i>- ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	1,811228	1,510198	1,510198	2,033076	1,811228	1,033076	1,62	0,35
24	6,307234	6,579619	6,577145	6,160181	5,431016	5,64586	6,12	0,48
48	5,796504	6,028712	5,825468	5,781264	6,13688	6,197429	5,96	0,18
72	6,217768		5,936166	5,796504	5,85262	6,037398	5,97	0,17

Πίνακας 6,17: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για μονοκαλλιέργεια *S.Typhimurium* σε XLD.

<i>Salmonella Typhimurium</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (XLD)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,0665	3,033076	3,316378	4,001559	3,695834	3,355296	3,41	0,38
24	5,268605	5,0665	4,941561	5,033076	4,972596	5,129986	5,07	0,12
48	4,695834	4,962495	4,865585	4,413288	4,61286	4,732046	4,71	0,19
72	5,033076	5,434477	5,383324	6,371533	4,666545	4,074469	5,16	0,78

Πίνακας 6.18: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες της *S.Typhimurium* για μικτή καλλιέργεια με *Str.macedonicus* σε XLD.

<i>Salmonella Typhimurium</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (XLD)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,635136	3,413288	3,635136	2,996864	2,413288	2,635136	3,12	0,52
24	4,865585	5,0108	4,811228	4,577145	4,624141	4,705174	4,77	0,16
48	4,732046	5,054266	4,996864	4,656326	4,502898	4,495474	4,74	0,24
72	5,108623	5,316378	5,268605	5,28105	4,413288	3,878174	4,88	0,60

Συνολικά:

Πίνακας 6.19: Συνολικά δεδομένα σχηματιζόμενου επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμενίου (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96, 144 και 192 ώρες για καλλιέργειες *S.Typhimurium* και *Str.macedonicus*.

Χρόνος(h)	<i>Streptococcus macedonicus</i> - Μονοκαλλιέργεια		<i>Streptococcus macedonicus</i> -Μικτή καλλιέργεια	
	<i>Mean</i>	<i>sd</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>
3	2,399349	0,256039	1,618167	0,349954
48	3,537763	0,194371	3,280881	0,241335
96	4,243206	0,128944	4,533264	0,280196
144	5,49588	0,212501	5,357819	0,119071
192	6,362155	0,19341	6,329285	0,204892
Χρόνος(h)	<i>Salmonella Typhimurium</i> - Μονοκαλλιέργεια		<i>Salmonella Typhimurium</i> -Μικτή καλλιέργεια	
	<i>Mean</i>	<i>sd</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>
3	3,411441	0,375087	3,121475	0,522768
48	4,512178	0,543689	5,146186	0,34511
96	4,005707	0,237871	3,806611	0,191232
144	3,933842	0,266984	3,849539	0,128867
192	4,315348	0,107897	4,348992	0,323343

Πίνακας 6.20: Συνολικά δεδομένα σχηματιζόμενου επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμενίου ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για καλλιέργειες *S. Typhimurium* και *Str. macedonicus*.

Χρόνος(h)	<i>Streptococcus macedonicus</i> - Μονοκαλλιέργεια		<i>Streptococcus macedonicus</i> -Μικτή καλλιέργεια	
	Mean	sd	Mean	sd
3	2,399349	0,256039	1,618167	0,349954
24	4,858796	0,629535	6,116843	0,480905
48	2,78339	0,389777	5,961043	0,183929
72	1,031021	0,55741	5,968091	0,166536
Χρόνος(h)	<i>Salmonella Typhimurium</i> - Μονοκαλλιέργεια		<i>Salmonella Typhimurium</i> -Μικτή καλλιέργεια	
	Mean	sd	Mean	sd
3	3,411441	0,375087	3,121475	0,522768
24	5,068721	0,118653	4,765679	0,162098
48	4,713685	0,192894	4,739646	0,239923
72	5,160571	0,778589	4,877686	0,595985

6.2. Μέθοδος μέτρησης ηλεκτρικής αγωγιμότητας με συσκευή Malthus

Πίνακας 6.21: Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 15°C σε δείγματα 144 ωρών για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *Staph. aureus* και *Str. macedonicus*.

Καλλιέργεια	Μέσος όρος	STDEV
<i>Str. macedonicus</i>	2,05	1,48492424
<i>Staph. aureus</i>	1	0
Μικτή καλλιέργεια	1	0

Πίνακας 6.22: Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 37°C σε δείγματα 72 ωρών για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *Staph. aureus* και *Str. macedonicus*.

Καλλιέργεια	Μέσος όρος	STDEV
<i>Str. macedonicus</i>	6,85	0,070711
<i>Staph. aureus</i>	3,166667	0,950438
Μικτή καλλιέργεια	2,1	0,984886

Πίνακας 6.23: Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 15°C σε δείγματα 144 ωρών για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *S. Typhimurium* και *Str. macedonicus*.

Καλλιέργεια	Μέσος όρος	STDEV
<i>St. macedonicus</i>	2,35	0,07071068
<i>S. Typhimurium</i>	2,2	0,34226139
Μικτή καλλιέργεια	2,1111111	0,42557151

Πίνακας 6.24: Χρόνος εντοπισμού της σταθεροποίησης της ηλεκτρικής αγωγιμότητας στους 37°C σε δείγματα 72 ωρών για μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια *S. Typhimurium* και *Str. macedonicus*.

Καλλιέργεια	Μέσος όρος	STDEV
<i>Str. macedonicus</i>	3,9	0,983192
<i>S. Typhimurium</i>	2,9875	0,917197
Μικτή καλλιέργεια	3,214286	0,769044

6.3. Μέθοδος ανάπτυξης βιοϋμενίου σε microplate

Πίνακας 6.25: Δείκτης οπτικής πυκνότητας στα 580nm στους 15°C για καλλιέργεια *Staph.aureus* παρουσία 0%, 20% και 40% CFS *Str.macedonicus*.

<i>Staphylococcus aureus</i> 15°C			
	0% CFS	20% CFS	40% CFS
	0,084375	0,192875	0,021125
	0,107375	0,072875	0,031125
	0,064375	0,057875	0,057125
	0,126375	0,041875	0,071125
	0,059375	0,063875	0,055125
	0,171375	0,104875	0,116125
	0,107375	0,205875	0,144125
	0,202375	0,086875	0,129125
	0,128375	0,176875	0,082125
	0,070375	0,063875	0,084125
	0,018375	0,014875	0,049125
	0,089375	0,065875	0,151125
MEAN	0,102458	0,095708	0,082625
SD	0,050388	0,062253	0,043544

Πίνακας 6.26: Δείκτης οπτικής πυκνότητας στα 580nm στους 37°C για καλλιέργεια *Staph. aureus* παρουσία 0%, 20% και 40% CFS *Str. macedonicus*.

<i>Staphylococcus aureus</i> 37°C			
	0% CFS	20% CFS	40% CFS
	0,587125	0,560875	0,461875
	0,470125	0,473875	0,333875
	0,446125	0,387875	0,620875
	0,264125	0,240875	0,440875
	0,370125	0,308875	0,714875
	0,276125	0,329875	0,345875
	0,248125	0,781875	0,281875
	0,290125	0,202875	0,243875
	0,581125	0,222875	0,363875
	0,367125	0,239875	0,306875
	0,794125	0,527875	
	0,788125	0,669875	0,478875
MEAN	0,456875	0,412292	0,417602
SD	0,193753	0,190478	0,145551

Πίνακας 6.27: Δείκτης οπτικής πυκνότητας στα 580nm στους 15°C για καλλιέργεια

S. Typhimurium παρουσία 0%, 20% και 40% CFS *Str. macedonicus*.

<i>Salmonella Typhimurium</i> 15°C			
	0% CFS	20% CFS	40% CFS
	0,054375	0,030875	0,034125
	0,044375	0,028875	0,029125
	0,057375	0,031875	0,061125
	0,088375	0,062875	0,055125
	0,044375	0,038875	0,060125
	0,075375	0,056875	0,075125
	0,077375	0,056875	0,154125
	0,055375	0,069875	0,061125
	0,071375	0,032875	0,073125
	0,049375	0,040875	0,071125
	0,027375	0,016875	0,022125
	0,095375	0,049875	0,063125
MEAN	0,061708	0,043125	0,063292
SD	0,020033	0,016029	0,033504

Πίνακας 6.28: Δείκτης οπτικής πυκνότητας στα 580nm στους 37°C για καλλιέργεια

S. Typhimurium παρουσία 0%, 20% και 40% CFS *Str. macedonicus*.

<i>Salmonella Typhimurium</i> 37°C			
	0% CFS	20% CFS	40% CFS
	0,149125	0,164875	0,201875
	0,098125	0,109875	0,128875
	0,089125	0,091875	0,177875
	0,094125	0,091875	0,192875
	0,119125	0,121875	0,199875
	0,083125	0,157875	0,243875
	0,115125	0,116875	0,246875
	0,152125	0,093875	0,229875
	0,083125	0,099875	0,186875
	0,087125	0,083875	0,279875
	0,103125	0,110875	0,396875
	0,103125	0,201875	0,296875
MEAN	0,106375	0,120458	0,231875
SD	0,023642	0,036084	0,069493

6.4. Μέθοδος ανάπτυξης βιοϋμενίου σε κουπόνια παρουσία CFS *Str.macedonicus*

Πίνακας 6.29: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για καλλιέργεια *Staph. aureus* παρουσία 0% CFS *Str. macedonicus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>-0% CFS								
	log cfu/cm²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	2,436197	2,325333	2,740647	2,253185	2,498459	2,505833	2,46	0,17
48	4,070503	4,288349	3,972596	3,76547	3,538226	3,902308	3,92	0,26
96	3,538226	3,237196	4,086155	3,85262	3,375499	3,740647	3,64	0,32
144	4,097534	3,908138	3,825468	3,74908	3,788951	3,859151	3,87	0,12

Πίνακας 6.30: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για καλλιέργεια *Staph. aureus* παρουσία 40% CFS *Str. macedonicus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>-40% CFS								
	log cfu/cm²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	2,524438	2,803928	1,695834	2,589379	2,878174	2,316378	2,47	0,43
48	3,425773	3,483326	3,84599	3,237196	3,46444	3,217768	3,45	0,23
96	3,962495	3,967575	3,865585	3,179204	3,480234	3,859151	3,72	0,32
144	3,84599	3,493974	3,908138	3,169797	3,832417	3,300248	3,59	0,31

Πίνακας 6.31: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για καλλιέργεια *Staph. aureus* παρουσία 0% CFS *Str. macedonicus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>-0% CFS								
	$\log \text{cfu/cm}^2$							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,15365	3,740647	3,669564	3,656326	3,818406	3,896399	3,66	0,26
24	4,908138	4,495474	4,577145	4,577145	4,495474	4,64586	4,62	0,15
48	4,538226	4,160181	4,420466	4,723273	4,524438	4,234474	4,43	0,21
72	4,093774	4,355296	4,266073	3,962495	4,293148	4,859151	4,30	0,31

Πίνακας 6.32: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για καλλιέργεια *Staph. aureus* παρουσία 40% CFS *Str. macedonicus*.

<i>Staphylococcus aureus</i>-40% CFS								
	$\log \text{cfu/cm}^2$							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	2,962495	3,420466	2,76547	3,375499	3,425773	3,200394	3,19	0,27
24	5,258386	5,086155	5,033076	4,487921	4,896399	4,796504	4,93	0,27
48	3,757352	4,037398	3,896399	4,46444	4,695834	4,601278	4,24	0,40
72	4,383324	4,101262	4,325333	4,197429	4,676529	4,803928	4,41	0,27

Πίνακας 6.33: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για καλλιέργεια *S.Typhimurium* παρουσία 0% CFS *Str.macedonicus*.

Salmonella Typhimurium-0% CFS								
	$\log \text{cfu/cm}^2$							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,757352	3,564555	3,686289	3,375499	3,61286	3,480234	3,58	0,14
48	4,28105	4,191439	4,383324	3,936166	3,936166	4,006204	4,12	0,19
96	4,304918	4,160181	4,212053	3,803928	3,962495	3,46444	3,98	0,31
144	4,486395	3,902308	4,0665	3,967575	3,832417	3,773439	4,00	0,26

Πίνακας 6.34: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για καλλιέργεια *S.Typhimurium* παρουσία 40% CFS *Str.macedonicus*.

Salmonella Typhimurium-40% CFS								
	$\log \text{cfu/cm}^2$							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,334106	3,394804	3,495474		3,112258	3,273626	3,32	0,14
48	4,082294	4,019848	3,76547	4,045914	3,074469	3,94689	3,82	0,38
96	3,839256	4,037398	3,84599	3,413288	3,624141	3,832417	3,77	0,22
144	4,126498	4,156928	4,0665	3,074469	3,695834	3,589379	3,78	0,42

Πίνακας 6.35: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για καλλιέργεια *S.Typhimurium* παρουσία 0% CFS *Str.macedonicus*.

Salmonella Typhimurium-0% CFS								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	5,45468	5,561993	5,495474	5,383324	5,25056	5,074469	5,37	0,18
24	5,273626	5,212053	5,288349	5,392912	5,409653	5,320878	5,32	0,07
48	5,462829	5,179204	4,996864	5,266073	5,355296	5,24792	5,25	0,16
72	5,677515	4,695834	5,209168		4,84599	4,839256	5,05	0,40

Πίνακας 6.36: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για καλλιέργεια *S.Typhimurium* παρουσία 40% CFS *Str.macedonicus*.

Salmonella Typhimurium-40% CFS								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	5,176091	4,459588	5,415094	4,288349	3,74908	4,361456	4,57	0,61
24	5,108623	4,825468	5,253185	4,957356	4,908138	4,76547	4,97	0,18
48	4,666545	4,930704	4,714318	4,865585	4,564555	5,019848	4,79	0,17
72	4,402292	4,757352	4,490958	4,375499	4,28105	4,55159	4,48	0,17

Συνολικά:

Πίνακας 6.37: Συνολικά δεδομένα σχηματιζόμενου επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμενίου ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία 0% και 40% CFS *Str.macedonicus*.

Χρόνος (h)	<i>Staphylococcus aureus</i> - 0% CFS		<i>Staphylococcus aureus</i> -40% CFS	
	<i>Mean</i>	<i>sd</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>
3	2,459942	0,169598	2,468022	0,428541
48	3,922909	0,25729	3,445749	0,227078
96	3,638391	0,31526	3,719041	0,319561
144	3,871387	0,123698	3,591761	0,314718
Χρόνος (h)	<i>Salmonella Typhimurium</i> -0% CFS		<i>Salmonella Typhimurium</i> - 40% CFS	
	<i>Mean</i>	<i>sd</i>	<i>Mean</i>	<i>sd</i>
3	3,579465	0,13845	3,322054	0,143067
48	4,122392	0,190203	3,822481	0,383309
96	3,984669	0,312687	3,765415	0,2165
144	4,004772	0,257245	3,784935	0,420777

Πίνακας 6.38: Συνολικά δεδομένα σχηματιζόμενου επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμενίου ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία 0% και 40% CFS *Str.macedonicus*.

Χρόνος(h)	<i>Staphylococcus aureus</i> - 0% CFS		<i>Staphylococcus aureus</i> -40% CFS	
	Mean	sd	Mean	sd
3	3,655832	0,262249	3,191683	0,27393
24	4,616539	0,153822	4,926407	0,267265
48	4,43351	0,208658	4,242117	0,395148
72	4,30499	0,307634	4,414634	0,273669
Χρόνος(h)	<i>Salmonella Typhimurium</i> - 0% CFS		<i>Salmonella Typhimurium</i> - 40% CFS	
	Mean	sd	Mean	sd
3	5,370084	0,179754	4,574943	0,614866
24	5,316245	0,074933	4,969707	0,182273
48	5,251364	0,158571	4,793593	0,173238
72	5,053553	0,397024	4,476457	0,166514

Πίνακας 6.39: Συγκριτικός πίνακας των δεδομένων του πληθυσμού κυττάρων παθογόνου μικροοργανισμού που προσκολλήθηκαν (attachment) επί της επιφάνειας του κουπονιού ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C και 37°C για καλλιέργειες *Staph. aureus* και *S. Typhimurium* παρουσία 0% και 40% CFS *Str. macedonicus*.

Κατηγορία	<i>Mean</i>	<i>sd</i>
<i>Staph. aureus</i> -0%-15°C	2,459942152	0,169597659
<i>Staph. aureus</i> -0%-37°C	3,655832124	0,262248641
<i>Staph. aureus</i> -40%-15°C	2,46802201	0,428541335
<i>Staph. aureus</i> -40%-37°C	3,191683039	0,27393016
<i>S. Typhimurium</i> -0%-15°C	3,57946506	0,13844967
<i>S. Typhimurium</i> -0%-37°C	5,370083671	0,179754157
<i>S. Typhimurium</i> -40%-15°C	3,322053724	0,143066686
<i>S. Typhimurium</i> -40%-37°C	4,574942885	0,614866127

Λοιπά δεδομένα

6.5.1. *Staph. aureus/Str. macedonicus* μέθοδος με κουπόνια

Πίνακας 6.40: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Str. macedonicus* σε MRS.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MRS)								
	$\log \text{cfu/cm}^2$							
Χρόνος(h)	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα3	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Mean	sd
3	5,24792	4,890409	5,54496	3,089981	2,865585	2,31183	3,991781	1,392952
48	3,357359	3,446376	3,237196	3,589379	3,436197	3,462829	3,421556	0,11731
96	3,329742			4,05011	4,896399	4,209168	4,121355	0,642944
144	5,24792	4,890409	5,54496	5,379429	5,486395	6,074469	5,437264	0,389433

Πίνακας 6.41: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες του *Str. macedonicus* για μικτή καλλιέργεια με *Staph. aureus* σε MRS.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MRS)								
	$\log \text{cfu/cm}^2$							
Χρόνος(h)	Δείγμα 1	Δείγμα 2	Δείγμα3	Δείγμα 4	Δείγμα 5	Δείγμα 6	Mean	sd
3	6,0665	6,179204	5,929603	2,803928	2,757352	2,624141	4,393455	1,826561
48	2,902308	2,839256	3,119436	3,228976	3,420466	3,203338	3,118964	0,216934
96				5,327543	5,05011	4,359412	4,912355	0,498549
144	6,0665	6,179204	5,929603	6,31411	6,290755	5,825468	6,10094	0,196989

Πίνακας 6.42: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Str. macedonicus* σε M17.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (M17)					
	$\log \text{cfu/cm}^2$				
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα3</i>	Mean	sd
3	3,234474	2,925171	2,375499	2,845048	0,435056
48	3,803928	3,46444	3,355296	3,541221	0,233964
96	4,320878		4,570896	4,445887	0,176789
144	5,45468	5,680459	5,791988	5,642376	0,171849

Πίνακας 6.43: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες του *Str. macedonicus* για μικτή καλλιέργεια με *Staph. aureus* σε M17.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (M17)					
	$\log \text{cfu/cm}^2$				
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα3</i>	Mean	sd
3	2,896399	2,788951	2,732046	2,805799	0,083462
48	3,43791	3,504368	3,796504	3,579594	0,190766
96	5,398564	5,041677	4,85262	5,09762	0,277238
144	6,400432	6,43791	6,375499	6,404614	0,031415

Πίνακας 6.44: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Staph. aureus* σε TSA.

<i>Staphylococcus aureus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	$\log \text{cfu/cm}^2$							
Χρόνος (h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,355296	4,811228	4,695834	2,796504	2,61286	2,288349	3,59	1,15
48	2,564555	3,268605	2,64586	3,444696	3,097534	3,481783	3,08	0,40
96	4,285929	3,919567	4,497715	4,46444	4,695834	4,006204	4,31	0,30
144	4,46444	4,811228	4,695834	4,239902	4,425773	3,952155	4,43	0,31

Πίνακας 6.45: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 15°C ανά 3, 48, 96 και 144 ώρες του *Staph. aureus* για μικτή καλλιέργεια με *Str. macedonicus* σε TSA.

<i>Staphylococcus aureus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	$\log \text{cfu/cm}^2$							
Χρόνος (h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,64586	4,074469	5,06246	2,773439	2,740647	2,44805	3,62	1,11
48	3,61286	3,538226	3,431016	3,140286	3,058382	3,340572	3,35	0,22
96	4,273626	4,31183	4,150348	4,024303	4,564555	3,375499	4,12	0,41
144	4,64586	4,074469	5,06246	5,355296		5,179204	4,86	0,51

Πίνακας 6.46: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Str. macedonicus* σε MRS.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MRS)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	5,24792	4,890409	5,54496	3,089981	2,865585	2,31183	3,991781	1,392952
24	3,176091	4,451378	3,037398	3,234474	2,288349	3,104958	3,215441	0,697547
48	1,987319	1,033076	2,112258		1,811228	2,033076	1,795391	0,440202
72	1,033076	1,31183	0,811228	0,635136	0,033076		0,764869	0,481041

Πίνακας 6.47: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες του *Str. macedonicus* για μικτή καλλιέργεια με *Staph. aureus* σε MRS.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (MRS)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	6,0665	6,179204	5,929603	2,803928	2,757352	2,624141	4,393455	1,826561
24	3,176091	2,431016	3,179204	3,289554	3,242591	3,276115	3,099095	0,330719
48	2,31183	2,495474	3,05011	2,987319	3,082294		2,785406	0,35613
72	2,825468	2,839256	2,413288	2,242591	2,255793	2,788951	2,560891	0,288335

Πίνακας 6.48: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Str. macedonicus* σε M17.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (M17)					
	$\log \text{cfu/cm}^2$				
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα3</i>	Mean	sd
3	3,234474	2,925171	2,375499	2,845048	0,435056
24	5,129986	4,908138	4,896399	4,978175	0,131604
48			3,033076	3,033076	
72	1,635136			1,635136	

Πίνακας 6.49: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο ($\log \text{cfu/cm}^2$) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες του *Str. macedonicus* για μικτή καλλιέργεια με *Staph. aureus* σε M17.

<i>Streptococcus macedonicus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (M17)					
	$\log \text{cfu/cm}^2$				
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα3</i>	Mean	sd
3	2,896399	2,788951	2,732046	2,805799	0,083462
24	3,263525	5,346944	4,231734	4,280734	1,042573
48	4,245264	2,987319	3,865585	3,699389	0,64523
72	2,94689	3,577145	3,461211	3,328415	0,335457

Πίνακας 6.50: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για μονοκαλλιέργεια *Staph. aureus* σε TSA.

<i>Staphylococcus aureus</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος (h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,355296	4,811228	4,695834	2,796504	2,61286	2,288349	3,59	1,15
24	5,635136	5,490958	5,55159	5,564555	5,589379	5,086155	5,49	0,20
48	5,495474	5,44805	5,431016			4,818406	5,30	0,32
72	4,46444	4,686289	4,288349		4,239902	4,195939	4,37	0,20

Πίνακας 6.51: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες του *Staph. aureus* για μικτή καλλιέργεια με *Str. macedonicus* σε TSA.

<i>Staphylococcus aureus</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	4,64586	4,074469	5,06246	2,773439	2,740647	2,44805	3,62	1,11
24	5,197429	5,489442	5,510198	5,405988	5,288349	5,577145	5,41	0,14
48	4,94689	4,723273	4,878174	4,209168	4,564555	4,263525	4,60	0,31
72	4,394804	3,732046	3,510198	5,176091	5,33193	5,461211	4,60	0,85

6.5.2. *S. Typhimurium/Str. macedonicus* μέθοδος με κουπόνια

Πίνακας 6.52: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96, 144 και 192 ώρες για μονοκαλλιέργεια *S.*

Typhimurium σε TSA.

<i>Salmonella Typhimurium</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,85262	3,919567	3,495474	4,349047	4,024303	4,160181	3,97	0,29
48	5,402292	5,307234	5,126498	4,839256		4,31183	5,00	0,44
96	4,082294	4,355296	4,405988	4,217768	4,160181	4,517376	4,29	0,16
144	4,058382	4,160181	4,307234		4,431016	4,166615	4,22	0,15
192	4,278589			4,55159	4,76547	4,55159	4,54	0,20

Πίνακας 6.53: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 15°C ανά 3, 48, 96, 144 και 192 ώρες του *S. Typhimurium* για μικτή καλλιέργεια με *Str. macedonicus* σε TSA.

<i>Salmonella Typhimurium</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,803928	3,355296	3,469239		2,94689	3,334106	3,38	0,31
48	5,475556	5,373521	5,712504	5,188412	5,143666	5,381381	5,38	0,21
96	4,06246	4,126498	4,295528	4,14702	4,624141	4,44805	4,28	0,22
144	4,033076	4,723273	4,263525	4,31183	4,480234	4,209168	4,34	0,24
192	4,76547	4,656326	5,129986	4,796504	4,757352	4,825468	4,82	0,16

Πίνακας 6.54: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες για μονοκαλλιέργεια *S. Typhimurium* σε TSA.

<i>Salmonella Typhimurium</i>-ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,85262	3,919567	3,495474	4,349047	4,024303	4,160181	3,97	0,29
24	5,444696	5,295528	4,871926	5,045914	5,0665	5,325333	5,17	0,21
48	5,089981	5,119436	5,093774	4,76547	4,91389	5,179204	5,03	0,16
72	5,325333	5,713412	5,604785	6,06246	4,666545	4,14702	5,25	0,72

Πίνακας 6.55: Σχηματιζόμενο επί της επιφάνειας του κουπονιού βιοϋμένιο (log cfu/cm²) στους 37°C ανά 3, 24, 48 και 72 ώρες του *S. Typhimurium* για μικτή καλλιέργεια με *Str. macedonicus* σε TSA.

<i>Salmonella Typhimurium</i>-ΜΙΚΤΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ (TSA)								
	log cfu/cm ²							
Χρόνος(h)	<i>Δείγμα 1</i>	<i>Δείγμα 2</i>	<i>Δείγμα 3</i>	<i>Δείγμα 4</i>	<i>Δείγμα 5</i>	<i>Δείγμα 6</i>	Mean	sd
3	3,803928	3,355296	3,469239		2,94689	3,334106	3,38	0,31
24	5,037398	4,76547	4,723273	4,85262	4,85262	4,967575	4,87	0,12
48	5,61286	5,033076	5,413288	4,957356	4,714318	4,919567	5,11	0,34
72	5,480234		5,61286	5,825468	4,85262	4,871926	5,33	0,44

