



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ



ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ – ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΥΧΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Αξιολόγηση της αντιβιοϋμενικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι
του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*»*

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ι. ΒΕΡΔΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2017



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ
ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ

ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ – ΙΩΑΝΝΗΣ ΝΥΧΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Αξιολόγηση της αντιβιοϋμενικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι
του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*»*

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ι. ΒΕΡΔΟΣ

ΑΘΗΝΑ, 2017

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Αξιολόγηση της αντιβιοϋμενικής δράσης του μηλειϊνικού οξέως έναντι του παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*»*

ΓΕΩΡΓΙΟΣ Ι. ΒΕΡΔΟΣ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος - Ιωάννης Νυχάς (Δρ.), Καθηγητής, Μικροβιολογία Τροφίμων, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, **Επιβλέπων**.

Ευστάθιος Πανάγου (Δρ.), Μόνιμος Επίκουρος Καθηγητής, Μικροβιολογία Τροφίμων - Ποσοτική Μικροβιολογία, Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Σχολή Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, **Μέλος**.

Νικόλαος Χωριανόπουλος (Δρ.), Εντεταλμένος Ερευνητής, Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων, Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ», **Μέλος**.

**«Αξιολόγηση της αντιβιοϋμενικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι του
παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*»**

**«Evaluation of the antibiofilm activity of maleic acid against the bacterial
pathogen *Listeria monocytogenes*»**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η προσκόλληση σε επιφάνειες, ο πολλαπλασιασμός και η ενσωμάτωση σε μια μήτρα εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών είναι μια φυσική τάση των μικροοργανισμών που τους επιτρέπει να επιβιώνουν σε εχθρικά περιβάλλοντα. Στη βιομηχανία τροφίμων τα βιοϋμένια αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών, τα οποία σχηματίζονται πάνω σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, εμπλέκονται σε προβλήματα επιμόλυνσης των τροφίμων που οδηγούν στη μείωση της διάρκειας ζωής τους ή / και στη μετάδοση τροφιμογενών λοιμώξεων. Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της αντιβιοϋμενικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι του τροφιμογενούς παθογόνου βακτηρίου *Listeria monocytogenes*. Στα πλαίσια προκαταρκτικών πειραματικών δοκιμών, αξιολογήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε διαφορετικές τιμές pH (3, 5 και 7), συγκεντρώσεις μηλεϊνικού οξέως (3, 10 και 50 mM) και θερμοκρασίες (15 και 30 °C). Ο σχηματισμός βιοϋμενίου αξιολογήθηκε σε θρεπτικό ζωμό Brain Heart Infusion (BHI) μετά από 48 h επώασης και εντός μικροσυστοιχιών πολυστυρενίου, χρησιμοποιώντας χρώση κρυσταλλικού ιώδους και η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στη διαφορά μεταξύ των μετρήσεων της οπτικής πυκνότητας (580 nm) των εξετασθέντων στελεχών και του αρνητικού (μη εμβολιασμένου) δείγματος. Τα αποτελέσματα έδειξαν πώς η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου εξαρτάται τόσο από το στέλεχος όσο και από τις δοκιμαζόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα, επιλέχθηκαν δύο στελέχη *L. monocytogenes* (B-169 και B-454) για την περαιτέρω αξιολόγηση της αντιβιοϋμενικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως. Πιο συγκεκριμένα, η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των δύο επιλεγμένων στελεχών του παθογόνου αξιολογήθηκε σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα και σε θρεπτικό ζωμό BHI, απουσία (0 Mm) και παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM), σε τιμές pH 5 και 7, στους 15 °C για συνολικά 144 h. Στις 3, 24, 72 και 144 h της επώασης τα προσκολλημένα, στα πλακίδια, κύτταρα αποκολλήθηκαν με τη μέθοδο του στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια και απαριθμήθηκαν με επίστρωση κατάλληλων διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων σε BHI άγαρ. Τα αποτελέσματα έδειξαν πώς υπήρξε σημαντική ($P < 0.05$) επίδραση του μηλεϊνικού οξέως στο σχηματισμό βιοϋμενίου του στελέχους B-169 σε pH 5, όπου παρατηρήθηκε αξιοσημείωτα μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου παρουσία του οργανικού οξέως (σε

σχέση με απουσία αυτού). Ωστόσο, αντίστοιχες παρατηρήσεις δεν έγιναν στο pH 7, όπου το στέλεχος B-169 παρουσίασε παρόμοια ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου παρουσία και απουσία μηλεϊνικού οξέως. Το στέλεχος B-454 δε φάνηκε να επηρεάζεται από το μηλεϊνικό οξύ, παρουσιάζοντας, γενικά, μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε σχέση με το πρώτο στέλεχος και στις δύο τιμές pH που εξετάστηκαν. Τέλος, αξιολογήθηκε η απολυμαντική δράση του μηλεϊνικού οξέως έναντι ώριμων βιοϋμενίων του παθογόνου *L. monocytogenes*. Για τον σκοπό αυτό, ώριμα βιοϋμενία (144 h) του παθογόνου, σχηματισθέντα σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα, παρουσία (50 mM) ή απουσία μηλεϊνικού οξέως (pH = 5), εκτέθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις του οργανικού οξέως (0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 300 και 500 mM), του οποίου η απολυμαντική δράση αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τόσο κλασικές μικροβιολογικές μεθόδους όσο και μετρήσεις αγωγιμότητας. Σύμφωνα με τα ληφθέντα αποτελέσματα, η απολυμαντική δράση του μηλεϊνικού οξέως φάνηκε να εξαρτάται από το εξεταζόμενο στέλεχος αλλά και την προηγούμενη έκθεση του σχηματισθέντος βιοϋμενίου στο οργανικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα, το βιοϋμενίο του στελέχους B-196, το οποίο σχηματίστηκε παρουσία μηλεϊνικού οξέως, παρουσίασε αυξημένη ανθεκτικότητα κατά την απολύμανση με το οργανικό οξύ σε συγκέντρωση 10 mM, σε σχέση με το βιοϋμενίο το οποίο σχηματίστηκε απουσία του οξέως. Από την άλλη πλευρά, αντίστοιχες ή παρόμοιες παρατηρήσεις δεν έγιναν για το στέλεχος B-454. Επιπρόσθετα, συγκεντρώσεις μηλεϊνικού οξέως μεγαλύτερες των 20 mM φάνηκε να είναι οι πιο αποτελεσματικές για την καταπολέμηση των βιοϋμενίων του παθογόνου. Εν κατακλείδι, το μηλεϊνικό οξύ παρουσιάζει αξιόλογο αντιβιοϋμενικό δυναμικό έναντι του παθογόνου *L. monocytogenes* τόσο σε επίπεδο σχηματισμού βιοϋμενίων όσο και απολύμανσης αυτών, με την ακριβή του δράση, ωστόσο, να εξαρτάται σημαντικά από το στέλεχος του βακτηρίου και τις συνθήκες εφαρμογής. Επιπλέον, φαινόμενα προσαρμογής και ενισχυμένης ανθεκτικότητας των κυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών κατά την έκθεσή τους στο οργανικό οξύ ενδέχεται να υπάρξουν και, ως εκ τούτου, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εφαρμογή στρατηγικών απολύμανσης με στόχο την εξάλειψη βιοϋμενίων από τον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων.

Κύρια επιστημονικά πεδία: Γεωπονικές Επιστήμες, Μικροβιολογία Τροφίμων.

Λέξεις-κλειδιά: Βιοϋμενία, *Listeria monocytogenes*, μηλεϊνικό οξύ, μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα, απολύμανση.

ABSTRACT

It is a natural tendency of microorganisms to attach to wet surfaces, to multiply and to embed themselves in a matrix composed of extracellular polymeric substances that they produce, forming a biofilm, in order to protect and survive in hostile environments. In the food industry, biofilms of both spoilage and pathogenic bacteria, formed on food-contact surfaces, are related to problems of food contamination, which lead to reduced shelf-life of products or / and foodborne disease transmission. The objective of this study was to evaluate the antibiofilm activity of maleic acid against the foodborne bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. The biofilm-forming ability of 14 *L. monocytogenes* strains was evaluated by preliminary experimental tests at different pH values (3, 5 and 7), maleic acid concentrations (0, 3, 10 and 50 mM) and temperatures (15 and 30 °C). Biofilm formation was evaluated in Brain Heart Infusion (BHI) broth after 48 h of incubation in polystyrene microtiter plates, using crystal violet staining, while its quantification was based on the differences between the optical density (580 nm) measurements of the tested strains and the negative (uninoculated) samples. The obtained results demonstrated that biofilm formation was strain-dependent and affected by all the tested environmental parameters. Base on the preliminary results, two strains of *L. monocytogenes* (B-169 and B-454) were selected for further evaluation of the antibiofilm activity of maleic acid. More specifically, the biofilm-forming ability of the two selected strains was evaluated on stainless steel coupons, in BHI broth with maleic acid (50 mM) or without maleic acid (0 mM), at pH values of 5 and 7, at 15 °C and for a total time period of 144 h. At 3, 24, 72 and 144 h of incubation, cells attached to stainless steel coupons were retrieved using the bead vortexing method and enumerated (by plating of appropriate serial decimal dilutions) on BHI agar. Results showed a significant ($P < 0.05$) effect of maleic acid on the biofilm-forming ability of strain B-169 at pH 5, where a significantly lower biofilm-forming ability was observed at 50 mM, compared to 0 mM. However, a similar observation was not made at pH 7, where strain B-169 formed similar biofilms at 0 and 50 mM of maleic acid. Strain B-454, on the other hand, did not appear to be affected by maleic acid, demonstrating an overall lower biofilm-forming ability than strain B-169 at both tested pH values. Finally, the disinfection efficacy of maleic acid against formed *L. monocytogenes* biofilms was

investigated. For this purpose, mature biofilms (144 h) of the pathogen, formed on stainless steel, in the absence (0 mM) or presence (50 mM) of maleic acid (pH = 5), were exposed to different concentrations of this organic acid (0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 300, 500 mM) and the surviving biofilms were evaluated either directly through microbiological analyses (i.e. plating of appropriate decimal dilutions on BHI agar) or indirectly using conductance measurements. According to the results, the disinfection efficacy of maleic acid appeared to depend on the tested strains, but also on the previous pathogen's exposure (i.e. during biofilm formation) to the organic acid. In particular, when the biofilm of strain B-169 was formed in the presence of maleic acid, it exhibited an enhanced resistance during subsequent exposure to 10 mM solution of the organic acid, compared to its non-adapted counterpart (i.e. biofilm formed in the absence of maleic acid). On the other hand, similar observations were not made for strain B-454. Furthermore, maleic acid concentrations higher than 20 mM appeared to be the most effective against biofilms of *L. monocytogenes*. In conclusion, based on the findings of the present study, maleic acid exhibits a remarkable antibiofilm potential against the foodborne bacterial pathogen *L. monocytogenes*, both in terms of biofilm formation and disinfection, with its exact activity, however, being considerably dependent on strain and environmental conditions. In addition, phenomena of bacterial adaptation and enhanced resistance during exposure of foodborne pathogens to weak organic acids may be encountered and should, thus, be taken into consideration when applying acidic decontamination strategies to eradicate foodborne pathogens from food processing equipments.

Main Scientific Disciplines: Agricultural Sciences, Food Microbiology.

Keywords: Biofilms, *Listeria monocytogenes*, maleic acid, microtiter plates, stainless steel coupons, disinfection.



*“Messieurs, ç’ est les microbes qui
auront le dernier mot”*

Louis Jean Pasteur (27.12.1822 - 28.09.1895)



Ένα μεγάλο, επίπονο, κοπιαστικό μια συνάμα εντυπωσιακό, ευχάριστο και βαθυστόχαστο ταξίδι στο χώρο της γνώσης και στον ναό της ελεύθερης έκφρασης των ιδεών τελειώνει με την ολοκλήρωση, εκπόνηση και παρουσίαση της παρούσας Μεταπτυχιακής - Ερευνητικής - Διπλωματικής Εργασίας μα ένα άλλο, πιο σημαντικό, αρχίζει.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που συνέβαλλαν στην προσπάθεια αυτή.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της εργασίας αυτής, Δρ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά, για την πολύτιμη βοήθειά του και τη διαρκή υποστήριξή του τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας, ο οποίος με εμπιστεύτηκε και με δέχτηκε στο εργαστήριό του, με συμβούλευσε καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών, ενώ η ευκαιρία που μου έδωσε να γνωρίσω διαφορετικές προσεγγίσεις, καθώς και έναν διαφορετικό τρόπο σκέψης και δράσεως, θεωρείται ανεκτίμητη για την μετέπειτα πορεία μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, αποτελούμενη από τους Δρ. Ευστάθιο Πανάγου και κ. Νικόλαο Χωριανόπουλο, για τις χρήσιμες συμβουλές τους και την καθοδήγησή τους σε όλα τα στάδια διεκπεραίωσης της εργασίας.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κα. Αλεξάνδρα Λιανού και τον κ. Νίκο Χωριανόπουλο για την άμεση και

ανιδιοτελή βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές τόσο κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας όσο και κατά την συγγραφή της εργασίας, ενώ η ανοχή και η αγάπη που μου έδειξαν θεωρούνται αξιοσέβαστες και αξιαγάπητες.



Επιπρόσθετα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Πασχαλίτσα Τρυφίνοπούλου για την υποστήριξή της από την πρώτη μέρα που εργάστηκα στο εργαστήριο και τον κ. Αναστάσιο Σταματίου για την διεκπεραίωση πάσης φύσεως οικονομικών και διοικητικών θεμάτων κατά την διάρκεια των σπουδών μου.

Επιπλέον, θα ήθελα να εκφράσω βαθύτατες ευχαριστίες στις συμφοιτήτριές μου, τις “εργαστηριακές” φίλες μου, Έλια Κατσάρη, Νίκη Παπαποστόλου, Σοφία Κερκέζου, Βάλια Τασούλα και Ηρώ Παντέρη για την άψογη συνύπαρξή μας στο εργαστήριο, δημιουργώντας ένα φιλικό και ευχάριστο περιβάλλον εργασίας.

Ξεχωριστές, όμως, ευχαριστίες αξίζουν οι τρεις καλές φίλες, Έλια Κατσάρη, Νίκη Παπαποστόλου και Σοφία Κερκέζου οι οποίες μου χάρισαν απλόχερα την συνεργασία τους, την ευχάριστη διάθεση, μα πάνω απ’ όλα το χαμόγελό τους. Ένα χαμόγελο, το οποίο δεν κόστισε τίποτε, όμως ήταν πολύτιμο. Διήρκησε μόνο λίγες στιγμές, αλλά η ανάμνησή του θα με συνοδεύει για πάντα. Ήταν ο πιο όμορφος τρόπος έκφρασης των βαθύτερων συναισθημάτων τους, κάτι που για μένα αξίζει όσο τίποτε άλλο στον κόσμο. Θα τις σκέφτομαι πάντα και η φιλία τους ελπίζω να με συντροφεύει για αρκετά χρόνια ακόμη.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ’ όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.




 ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VIII
 ABSTRACT	X
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1 Γενικά	16
1.2 Ορισμός βιοϋμενίων	16
1.3 Περιγραφή βιοϋμενίων	17
1.4 Σύνθεση και κύκλος ζωής	17
1.4.1 Στάδια προσκόλλησης (<i>Attachment</i>)	17
1.4.2 Ωρίμαση βιοϋμενίων (<i>Maturation</i>)	20
1.4.3 Επικοινωνία κυττάρων (<i>Quorum Sensing</i>)	21
1.4.4 Αποκόλληση και διασπορά (<i>Detachment and Dispersion</i>)	22
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση	23
1.6 Οικολογικά πλεονεκτήματα	23
1.6.1 Προστασία σε εχθρικό περιβάλλον	24
1.6.2 Μεταβολική συνεργασία	24
1.6.3 Απόκτηση νέων γενετικών συμπεριφορών	25
1.6.4 Ευεργετικές επιδράσεις των βιοϋμενίων	25
1.7 Βιοϋμένια και βιομηχανία τροφίμων	26
1.8 Στρατηγικές ελέγχου και αντιμετώπισης βιοϋμενίων	27
1.8.1 Γενικά	27
1.8.2 Απολυμαντικά	28
1.8.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών	29
1.8.4 Μηλεϊνικό οξύ (<i>Maleic acid</i>)	30

1.9 Παθογόνο βακτήριο <i>Listeria monocytogenes</i>	32
1.9.1 Χαρακτηριστικά μικροοργανισμού	32
1.9.2 Τροφιμογενείς ασθένειες - Λιστερίωση (<i>Listeriosis</i>)	33
1.9.3 Απόκριση στην όξινη καταπόνηση (<i>ATR, Acid Tolerance Resistance</i>)	34
1.10 Μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης	38
1.10.1 Γενικά	38
1.10.2 Κλασσικές μέθοδοι	39
1.10.3 Σύγχρονες μέθοδοι	40
1.11 Αντικείμενο μελέτης (<i>Objective of this study</i>)	43
1.12 Σημαντικότητα μελέτης (<i>Significance of this study</i>)	43

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών και απολυμαντικών	45
2.2 Βακτηριακά στελέχη και προετοιμασία εμβολίου	49
2.3 Σχηματισμός βιοϋμενίων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου	55
2.4 Σχηματισμός βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα	58
2.4.1 Σχηματισμός	58
2.4.2 Ποσοτικοποίηση με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (<i>Bead Vortexing</i>)	59
2.5 Απολύμανση βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> με τη χρήση μηλεϊνικού οξέως	61
2.5.1 Διαδικασία απολύμανσης	61
2.5.2 Αξιολόγηση απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> με χρήση αναλυτή μικροβιακής αύξησης (<i>Malthus microbiological growth analyser</i>)	62
2.5.3 Αξιολόγηση απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (<i>Bead Vortexing</i>)	62
2.6 Στατιστική Ανάλυση (<i>Statistical analysis</i>)	63

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	64
3.1 Σχηματισμός βιοϋμενίων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου	65
3.1.1 Σχηματισμός βιοϋμενίου σε διαφορετικά pH	65
3.1.2 Σχηματισμός βιοϋμενίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μηλεϊνικού οξέως	68
3.2 Σχηματισμός βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα	72
3.3 Αξιολόγηση της απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (<i>Bead Vortexing</i>)	76
3.4 Αξιολόγηση της απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών <i>L. monocytogenes</i> με χρήση αναλυτή μικροβιακής αύξησης (<i>Malthus microbiological growth analyser</i>)	79
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	98
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	100
6.1 Ξενόγλωσση	101
6.2 Ηλεκτρονική	115
6.3 Κοινοτική Νομοθεσία	115
 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	116



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ



1.1 Γενικά

Ένας σημαντικός στόχος της επεξεργασίας τροφίμων είναι η παροχή ασφαλών, υγιεινών και εύγεστων τροφίμων για τους καταναλωτές. Επομένως, ο έλεγχος των μικροοργανισμών είναι απαραίτητος για την επίτευξη του στόχου αυτού (Hood and Zottola, 1995). Η μόλυνση, όμως, των τροφίμων από παθογόνους μικροοργανισμούς κοστίζει εκατομμύρια δολάρια κάθε χρόνο στη βιομηχανία τροφίμων. Μεγάλο μέρος της μόλυνσης αυτής μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία βιοϋμενίων κατά την παραγωγική διαδικασία (Brooks and Flint, 2008). Γενικά, τα βακτήρια υπάρχουν στο φυσικό περιβάλλον σε δύο μορφές, την πλαγκτονική, που θεωρείται σημαντική για την γρήγορη ανάπτυξη και διάδοσή τους σε νέες περιοχές, και την προσκολλημένη μορφή, που εξυπηρετεί την διατήρηση και διαβίωσή τους σε όλα τα δυνατά περιβάλλοντα (Jiang and Pace, 2006). Σήμερα, είναι ευρέως γνωστό και διαδεδομένο πώς τα βακτήρια προτιμούν να αναπτύσσονται με τη μορφή των βιοϋμενίων, δηλαδή ως κοινότητες που αναπτύσσονται πάνω σε επιφάνειες και περιβάλλονται από εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (Sutherland, 2001 a, b). Επομένως, τα βιοϋμένια είναι ένα πρότυπο αύξησης των μικροοργανισμών για αυτοπροστασία και επιβίωση σε εχθρικά περιβάλλοντα, σε σχέση με τις πλαγκτονικές μορφές τους (Shi and Zhu, 2009; Simões *et al.*, 2010). Έχουν μεγάλο ενδιαφέρον για την υγιεινή των τροφίμων, διότι μπορεί να περιέχουν αλλοιωγόνους ή και παθογόνους μικροοργανισμούς και αυξάνουν την πιθανότητα μόλυνσης ή και τον κίνδυνο για την δημόσια υγεία (Shi and Zhu, 2009), ενώ η παρουσία οργανικών υπολειμμάτων στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων αυξάνουν την πιθανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων, με ταυτόχρονη αύξηση της πιθανότητας διασταυρούμενης επιμόλυνσης των τροφίμων (Sofos and Geornaras, 2010).

1.2 Ορισμός βιοϋμενίων

Βιοϋμένια ορίζονται ως *κοινότητα ή κοινότητες μικροοργανισμών οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι σε ένα υπόστρωμα ή μεσεπιφάνεια ή μεταξύ τους, περικλείονται από μια μήτρα εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (extracellular polymeric substance) που τα ίδια παράγουν* (Hood and Zottola, 1995; Shi and Zhu, 2009) και παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο, όσον αφορά το ρυθμό αύξησης και τη γονιδιακή τους έκφραση,

σε σχέση με τις πλαγκτονικές μορφές τους (Donlan and Costerton, 2002; Jiang and Pace, 2006; Percival *et al.*, 2011).

1.3 Περιγραφή βιοϋμενίων

Είναι γενικά αποδεκτό ότι τα βακτήρια σχηματίζουν κοινότητες, τα βιοϋμένια, που περιβάλλονται από μια μήτρα πολυσακχαρίτη. Το 15 % του όγκου αυτής της μήτρας (βιομεμβράνης) αποτελείται από τα κύτταρα των βακτηρίων και το 85 % από το εξωκυτταρικό πολυμερές (Donlan and Costerton, 2002). Το πάχος της μήτρας αυτής κυμαίνεται από μερικά μικρόμετρα (μm) έως αρκετά χιλιοστά (mm) και αποτελείται από 90 - 97 % νερό (Sutherland, 2001 a, b; Brooks and Flint, 2008). Η μεμβράνη-μήτρα αποτελείται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες (1 - 2 %, Sutherland, 2001 a, b; Simões *et al.*, 2010), φωσφολιπίδια, νουκλεϊκά οξέα (< 1 %, Sutherland, 2001 a, b), περιέχει τριχοειδή κανάλια για την πρόσληψη νερού, ενώ παρέχει διόδους για την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών, μεταβολιτών, παραπροϊόντων και οξυγόνου (Poulsen, 1999; Shi and Zhu, 2009).

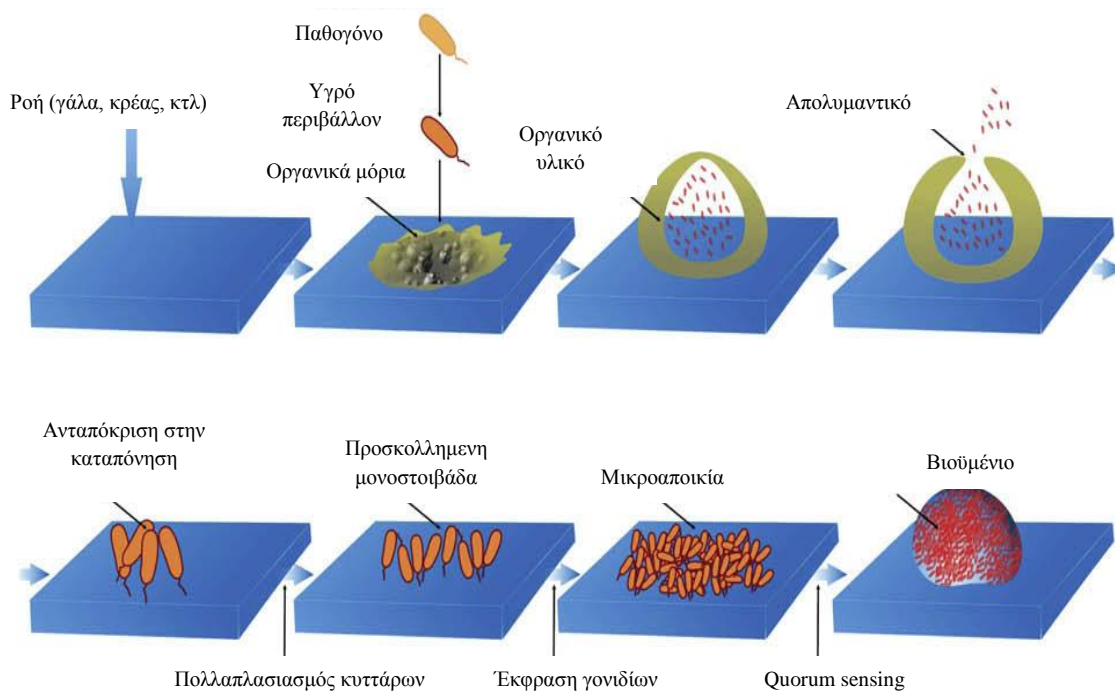
1.4 Σύνθεση και κύκλος ζωής

1.4.1 Στάδια προσκόλλησης (*Attachment*)

Σε γενικές γραμμές, ο σχηματισμός των βιοϋμενίων λαμβάνει χώρα ως εξής: Πρώτα απ' όλα, τα οργανικά μόρια (π.χ. πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, κτλ) από τα τρόφιμα αποτίθενται στις επιφάνειες του εξοπλισμού (conditioning film). Δεύτερον, βιολογικώς ενεργοί μικροοργανισμοί έλκονται στις επιφάνειες. Τρίτον, κάποιοι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται, σχηματίζεται το βιοϋμένιο και ξεκινά η έκφραση γονιδίων και η επικοινωνία των κυττάρων (Jiang and Pace, 2006; Lasa, 2006; Palmer *et al.*, 2007; Shi and Zhu, 2009; Percival *et al.*, 2011), (Σχήμα 1.4.1.1).

Οι κινητήριες δυνάμεις για τον σχηματισμό αυτόν είναι (Jiang and Pace, 2006; Brooks and Flint, 2008):

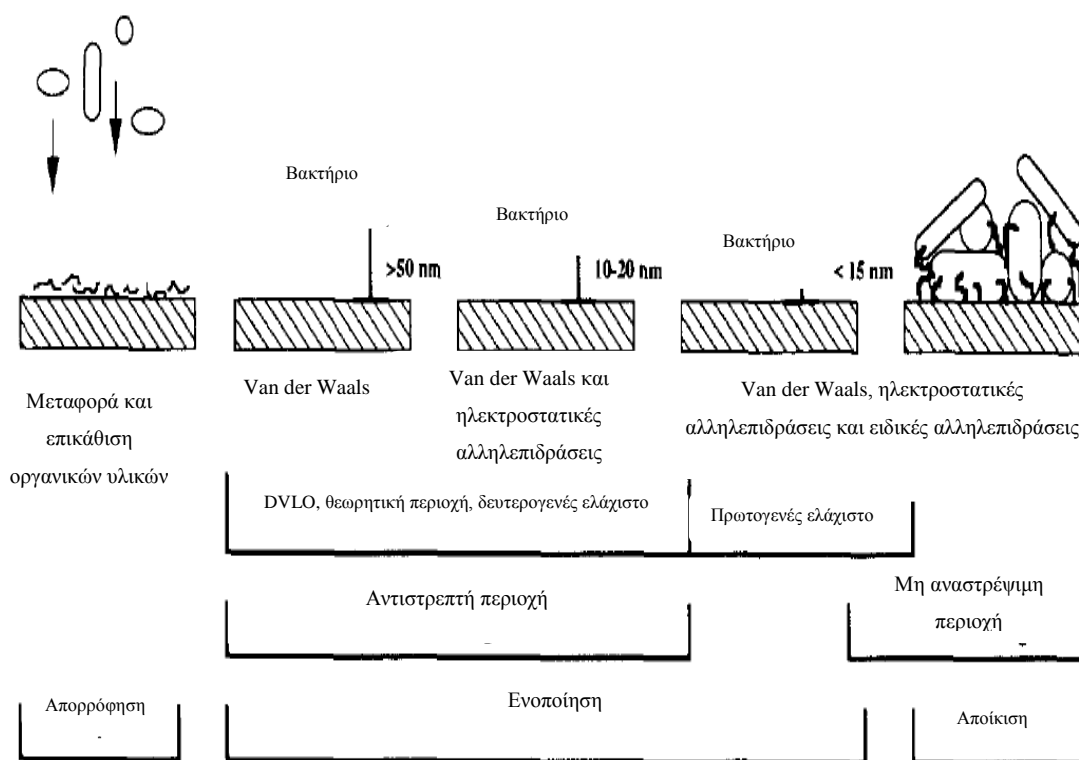
- Άμυνα σε αντίξοες συνθήκες,
- Αποικισμός ευνοϊκής θέσης,
- Χρησιμοποίηση των δυνητικών ωφελειών της κοινότητας.



Σχήμα 1.4.1.1. Αλληλουχία γεγονότων στον σχηματισμό βιοϋμενίων σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα (Τροποποιημένο από [Shi and Zhu, 2009](#)).

Έχουν προταθεί δύο μηχανισμοί σχηματισμού βιοϋμενίων. Ο ένας προτάθηκε από τους [Marshall *et al.*, \(1971\)](#) και περιλαμβάνει δύο βήματα προσκόλλησης, ενώ ο άλλος προτάθηκε από τους [Busscher and Weerkamp, \(1987\)](#) και περιλαμβάνει τρία στάδια ([Hood and Zottola, 1995](#); [Palmer *et al.*, 2007](#)). Στον μηχανισμό δύο σταδίων η προσκόλληση είναι αντιστρεπτή. Στο πρώτο βήμα, τα κύτταρα μετακινούνται με τη βοήθεια των μαστιγίων κοντά στις επιφάνειες, έτσι ώστε να μπορούν να απορροφηθούν από την επιφάνεια. Αυτό το βήμα είναι αναστρέψιμο, δηλαδή τα βακτήρια μπορούν να απομακρυνθούν με απλό πλύσιμο. Το δεύτερο βήμα εξαρτάται από τον χρόνο και περιλαμβάνει την παραγωγή εξωκυτταρικού υλικού. Στον μηχανισμό τριών σταδίων η διαδικασία εξαρτάται από την απόσταση των κυττάρων από την επιφάνεια προσκόλλησης. Έτσι, σε αποστάσεις μεγαλύτερες των 50 nm, οι δυνάμεις είναι ασθενείς και η προσκόλληση είναι αναστρέψιμη. Δηλαδή, τα κύτταρα έλκοντα από την επιφάνεια, αλλά λόγω των δυνάμεων Van der Waals, η άμεση επαφή παρεμποδίζεται ([Chmielewski and Frank, 2003](#); [Palmer *et al.*, 2007](#)). Καθώς η απόσταση διαχωρισμού μεταξύ βακτηρίων και επιφάνειας προσεγγίζει τα 10 - 20 nm, εμφανίζονται ηλεκτροστατικές δυνάμεις. Επομένως, τα κύτταρα πρέπει να

ξεπεράσουν το εμπόδιο απόθησης υψηλής ενέργειας που περιγράφεται από τη θεωρία D.L.V.O. (Derjaguin - Landau - Verwey - Overbeck). Όταν η απόσταση αυτή είναι μικρότερη των 15 nm, οι δυνάμεις και η παραγωγή πολυμερών είναι μη αναστρέψιμες. Ο βαθμός προσκόλλησης εξαρτάται από φυσικές παραμέτρους, όπως η ταχύτητα ροής του υγρού, το φορτίο, η υδροφοβικότητα και η μικρογραφία του υποστρώματος. Μια γενική αρχή είναι ότι τα βακτήρια συμπεριφέρονται ως σωματίδια και ισχύει η θεωρία των κολλοειδών, δεδομένου ότι τα βακτήρια έχουν αρνητικό φορτίο στην επιφάνειά τους και η άλλη, ότι έχουμε επιφάνειες ελεύθερης ενέργειας (Zottola and Sasahara, 1994; Hood and Zottola, 1995; Palmer *et al.*, 2007), (Σχήμα 1.4.1.2).



Σχήμα 1.4.1.2. Διαγραμματική απεικόνιση των προτεινόμενων σταδίων για τον σχηματισμό βιοϋμένιου (Γροποποιημένο από Zottola and Sasahara, 1994).

Η επιφάνεια των κυττάρων, σε ουδέτερο pH, είναι αρνητικά φορτισμένη και ποικίλει ανάλογα με τον μικροοργανισμό και το περιβάλλον ανάπτυξης. Έτσι, οι μικροοργανισμοί μπορούν να θεωρηθούν ως αρνητικά φορτισμένα σωματίδια. Η μέγιστη, λοιπόν, προσκόλληση εμφανίζεται σε έντονα φορτισμένα υποστρώματα. Η υδροφοβικότητα έχει αποδοθεί στην εξωτερική μεμβράνη των βακτηρίων και

διαδραματίζει καίριο ρόλο στην προσκόλληση (Zottola and Sasahara, 1994; Palmer *et al.*, 2007; Shi and Zhu, 2009). Επίσης, η υδροφοβικότητα ενισχύεται από την παρουσία νηματοειδών αποφύσεων και μαστιγίων τα οποία επηρεάζουν τον ρυθμό και την έκταση της προσκόλλησης (Palmer *et al.*, 2007; Shi and Zhu, 2009; Simões *et al.*, 2010). Οι αποφύσεις, οι οποίες είναι πρωτεϊνικής φύσεως, έχει αποδειχθεί πώς χρησιμεύουν στην απώθηση του αρχικού ηλεκτροστατικού φράγματος το οποίο δημιουργείται μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας προσκόλλησης (Palmer *et al.*, 2007; Simões *et al.*, 2010).

1.4.2 Επικοινωνία κυττάρων (*Quorum Sensing*)

Η κινητήρια δύναμη στην ανάπτυξη της κοινότητας του βιοϋμενίου είναι η αυτοοργάνωση και η συνεργασία των κυττάρων. Η επικοινωνία είναι ένας σημαντικός μηχανισμός που χρησιμοποιούν τα βακτήρια για να κατανοήσουν τις αλλαγές που συμβαίνουν στο περιβάλλον και κατά συνέπεια να εφαρμόσουν συγκεκριμένες στρατηγικές που θα τους επιτρέψουν να προσαρμοστούν και να επιβιώσουν στον χώρο και στο χρόνο (Skandamis and Nychas, 2012). Η επικοινωνία (*Quorum sensing*) αυτή ορίζεται ως μια ρυθμιστική διαδικασία μεταξύ των κυττάρων που αφορά την παραγωγή και ανίχνευση εξωκυτταρικών μορίων σηματοδότησης, η οποία ονομάζεται αυτεπαγωγή (Bassler, 1999). Αυτό σημαίνει ότι για να αρχίσει η παραγωγή τέτοιων ουσιών θα πρέπει να υπάρχει ικανός αριθμός βακτηριακών κυττάρων μέσα στο βιοϋμένιο (Gandhi and Chikindas, 2007; Simões *et al.*, 2010). Η επικοινωνία των κυττάρων είναι ύψιστης σημασίας, διότι περιλαμβάνει (Simões *et al.*, 2010):

- A) Βιοσύνθεση εξωκυτταρικών ενζύμων,
- B) Ανάπτυξη βιοϋμενίου,
- Γ) Βιοσύνθεση αντιμικροβιακών ουσιών,
- Δ) Παραγωγή εξωκυτταρικής πολυμερής ουσίας (EPS) και μολυσματικών παραγόντων στα Gram⁻ βακτήρια.

Στα Gram⁻ βακτήρια το μόριο σηματοδότησης είναι μια αλυσίδα ακυλίου ομοσερίνης λακτόνης (N-acyl chain Homoserine lactone, AHL) και είναι γνωστό ως αυτεπαγωγέας-1 (AI-1) (Miller and Bassler, 2001). Φαίνεται, λοιπόν, πώς η επικοινωνία πραγματοποιείται μέσω του προτύπου σηματοδότησης LuxI / LuxR (AHL / ρυθμιστής της μεταγραφής). Οι πρωτεΐνες LuxI είναι οι συνθάσες του αυτεπαγωγέα-1 και καταλύουν τον σχηματισμό ενός ειδικού μορίου ακυλίου ομοσερίνης λακτόνης. Ο αυτεπαγωγέας-1 διαχέεται ελεύθερα στην κυτταρική μεμβράνη και συσσωρεύεται σε υψηλή πυκνότητα στο κύτταρο. Σε υψηλή, λοιπόν, συγκέντρωση, οι πρωτεΐνες LuxR δευσμούν τους συγγενικούς αυτεπαγωγείς. Έτσι, το σύμπλοκο (πρωτεΐνες - LuxR αυτεπαγωγέας) προσδένεται σε υποκινητές του γονιδίου-στόχου και ρυθμίζει την μεταγραφή (Bassler, 1999; Tolken-Nielsen and Molin, 2000; Parsek and Greenberg, 2005; Waters and Bassler, 2005; Bassler and Losick, 2006; Xavier, 2006; Nadell *et al.*, 2008).

Στα Gram⁺ βακτήρια το μόριο σηματοδότησης είναι ένα πρόδρομο ολιγοπεπτίδιο με περίπου 5 - 26 αμινοξέα (Miller and Bassler, 2001). Αρχικά, παράγεται ένα πρόδρομο πεπτίδιο. Αυτό το πεπτίδιο είναι τροποποιημένο και ένας ειδικός μεταφορέας (ATP-binding cassette) εκκρίνει το ώριμο ολιγοπεπτίδιο-αυτεπαγωγέα. Το ολιγοπεπτίδιο συσσωρεύεται στα κύτταρα. Σε υψηλή πυκνότητα κυττάρων ο αυτεπαγωγέας ανιχνεύεται από ένα σύστημα μεταγωγής δύο σημάτων. Συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη κινάση (αισθητήρια) αναγνωρίζει τον αυτεπαγωγέα και ακολούθως φωσφορυλιώνεται σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο ιστιδίνης. Η φωσφορυλιωμένη ομάδα μεταφέρεται σε μια συγγενή πρωτεΐνη ρύθμισης απόκρισης και αυτή με τη σειρά της φωσφορυλιώνεται σε ένα συντηρημένο κατάλοιπο ασπαρτικού οξέως. Ο φωσφορυλιωμένος ρυθμιστής απόκρισης συνδέεται με ειδικούς προαγωγούς-στόχους, ώστε να ρυθμίσει της έκφραση των γονιδίων της επικοινωνίας (Bassler, 1999; Tolken-Nielsen and Molin, 2000; Parsek and Greenberg, 2005; Waters and Bassler, 2005; Bassler and Losick, 2006; Xavier, 2006; Nadell *et al.*, 2008).

1.4.3 Ωρίμαση βιοϋμενίων (*Maturation*)

Η ωρίμαση των βιοϋμενίων περιλαμβάνει μια οργανωμένη και πολύπλοκη δομή στο χώρο η οποία μπορεί να είναι είτε επίπεδη (flat) είτε σε μορφή μανιταριού (mushroom-shaped) (Chmielewski and Frank, 2003; Jiang and Pace, 2006; Srey *et al.*,

2013). Αν και κάθε μικροβιακή κοινότητα παρουσιάζει μοναδική δομή, κάποια χαρακτηριστικά γνωρίσματα είναι κοινά (Costerton, 1995). Επίσης, υπάρχουν δίοδοι ύδατος που επιτρέπουν στο νερό και στις θρεπτικές ουσίες να διεισδύουν στα βαθύτερα στρώματα του ώριμου βιοϋμενίου, ενώ επιτρέπουν την αποβολή των μεταβολικών προϊόντων (Poulsen, 1999; Shi and Zhu, 2009; Davey and O'Toole, 2000; Jiang and Pace, 2006). Προκειμένου να επιτευχθεί η ωρίμαση του βιοϋμενίου απαιτούνται 10 έως και περισσότερες ημέρες (Srey *et al.*, 2013). Η ωρίμαση των βιοϋμενίων εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών στο περιβάλλον, τη διάχυση των θρεπτικών ουσιών στο εσωτερικό του βιοϋμενίου 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 ωρίμαση του βιοϋμενίου (Carpentier and Cerf, 1993; Costerton, 1995; Dunne, 2002; Jiang and Pace, 2006; Percival *et al.*, 2011).

1.4.4 Αποκόλληση και διασπορά (*Detachment and Dispersion*)

Ο κύκλος της ζωής του βιοϋμενίου ολοκληρώνεται με τη διασπορά. Είναι το τελευταίο στάδιο, λοιπόν, στον κύκλο ζωής και επιτρέπει στα κύτταρα να επανέλθουν στην κυτταρική-ελεύθερη μορφή τους (Stoodley *et al.*, 2002; Jiang and Pace, 2006; Srey *et al.*, 2013). Οι εξωτερικές διεργασίες της διασποράς περιλαμβάνουν εξωτερική διατάραξη, όπως αυξημένη διάτμηση υγρών, ενώ οι εσωτερικές διεργασίες περιλαμβάνουν ενδογενή ενζυμική αποικοδόμηση (π.χ. απελευθέρωση του εξωπολυσακχαρίτη ή επιφανειακών πρωτεϊνών δέσμευσης). Έτσι, η αποκόλληση και η διασπορά είναι δύο ενεργές διαδικασίες που επιτρέπουν την αποίκηση νέων οικοθέσεων (niches), ενώ η πενία (starvation) φαίνεται να είναι η πιο σημαντική αιτία διασποράς προς αναζήτηση νέων πηγών θρεπτικών (nutrient-rich environment) (Jiang and Pace, 2006; Srey *et al.*, 2013; Percival *et al.*, 2011).

Εν κατακλείδι, μπορούμε να συνοψίσουμε τον σχηματισμό των βιοϋμενίων στα παρακάτω (Simões *et al.*, 2010):

- i. Προρύθμιση της προσκόλλησης επιφανειακά ή με μακρομόρια που υπάρχουν στο υγρό,
- ii. Μεταφορά πλαγκτονικών κυττάρων από το υγρό προς την επιφάνεια,

- iii. Προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια,
- iv. Εκρόφιση της αντιστρεπτής προσρόφισης,
- v. Μη αναστρέψιμη προσκόλληση,
- vi. Παραγωγή μορίων σηματοδότησης,
- vii. Μεταφορά του υποστρώματος προς και εντός του βιοϋμενίου,
- viii. Μεταβολισμός υποστρώματος από τα κύτταρα και μεταφορά των προϊόντων εκτός του βιοϋμενίου,
- ix. Αποκόλληση κυττάρων του βιοϋμενίου και αποικισμός νέων θέσεων.

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση

Η προσκόλληση των μικροοργανισμών σε επιφάνειες εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας (υδροφοβικότητα, φορτίο, τοπογραφία), το φορτίο του κυττάρου, η επικοινωνία των κυττάρων, η παρουσία άλλων κυττάρων (mixed-species biofilms) (James *et al.*, 1995), η παρουσία κυτταρικών δομών (π.χ. τριχίδια, μαστίγια). Επίσης, πολύ σημαντικοί παράγοντες είναι η θερμοκρασία, το pH, η ενεργότητα νερού (a_w), η σύνθεση των θρεπτικών συστατικών του μέσου καλλιέργειας, η οργανική ύλη (conditioning film), η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών και η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών (EPS) (Hood and Zottola, 1995; Aarnisalo *et al.*, 2000; Chae and Schraft, 2000; Chmielewski and Frank, 2003; Møretø and Langsrud, 2004; Gram *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2010; van Houldt and Michiels, 2010; Belessi *et al.*, 2011; Percival *et al.*, 2011; Dourou *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2012; Alavi and Hansen, 2013; Abdallah *et al.*, 2014).

1.6 Οικολογικά πλεονεκτήματα βιοϋμενίων

Η ανάπτυξη των βιοϋμενίων είναι η κύρια μορφή ζωής για τα βακτήρια η οποία προσδίδει κάποια πλεονεκτήματα (Davey and O' Toole, 2000; Giaouris *et al.*, 2014 a): 1. Προστασία ενάντια σε εχθρικά περιβάλλοντα, 2. Διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και μεταβολική συνεργασία, 3. Απόκτηση νέων γενετικών χαρακτηριστικών.

1.6.1 Προστασία σε εχθρικό περιβάλλον

Τα βακτηριακά κύτταρα, όταν βρίσκονται μέσα σ' ένα βιοϋμένιο, προστατεύονται από διάφορες εξωτερικές περιβαλλοντικές μεταβολές. Έτσι, ο σχηματισμός βιοϋμένιου παρέχει προστασία ενάντια σε πολλές περιβαλλοντικές προκλήσεις (environmental challenges), όπως η έλλειψη θρεπτικών συστατικών (starvation) (Costerton, 1995), η έκθεση σε υπεριώδη-UV ακτινοβολία, η τοξικότητα μετάλλων (metal toxicity), η έκθεση σε οξέα, η αφυδάτωση, τα αντιβιοτικά (Borucki *et al.*, 2003; Di Bonaventura *et al.*, 2008; Smirnova *et al.*, 2010; da Silva and De Martinis, 2011) και ποικίλους άλλους αντιμικροβιακούς παράγοντες (Mah and O'Toole, 2001).

1.6.2 Μεταβολική συνεργασία

Οι υψηλής διαπερατότητας δίοδοι ύδατος παρέχουν ένα αποτελεσματικό μέσο ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών, αλλά και απομάκρυνσης τοξικών μεταβολικών προϊόντων (Costerton, 1995; Costerton *et al.*, 1999). Η έλλειψη O₂, όμως, οδηγεί στον σχηματισμό ανοξικών ζωνών, όπου τα ζυμωτικά βακτήρια είναι ενεργά, σχηματίζονται χαμηλού μοριακού βάρους οργανικά οξέα και CO₂, συνθήκες οι οποίες ευνοούν τα αναγωγικά θειώδη βακτήρια και με αυτόν τον τρόπο υπάρχει διάβρωση της επιφάνειας προσκόλλησης (Poulsen, 1999). Το ίδιο υλικό μπορεί, επίσης, να δρα ως πηγή άνθρακα και ενέργειας. Για παράδειγμα, κύτταρα τα οποία βρίσκονται στο κέντρο του βιοϋμένιου εμφανίζουν χαμηλές απαιτήσεις σε O₂, τα ζυμωτικά βακτήρια καταβολίζουν και παράγουν οξέα και αλκοόλες που εύκολα χρησιμοποιούν τα οξυγενή βακτήρια. Επίσης, υπό κανονικές συνθήκες, τα βακτηριακά κύτταρα δεν είναι σε θέση να χρησιμοποιήσουν το δικό τους εξωκυτταρικό πολυμερές υλικό, αλλά μέσα σε βιοϋμένια αποτελούμενα από πολλά είδη (mixed-species biofilms), μερικά βακτήρια μπορούν να χρησιμοποιήσουν τις εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες που άλλα βακτήρια παρήγαγαν, παρέχοντας έτσι ευκαιρία για διασταυρούμενη θρέψη (cross-feeding) (Costerton, 1995; James *et al.*, 1995; Sutherland, 2001 a, b).

1.6.3 Απόκτηση νέων γενετικών συμπεριφορών

Η οριζόντια μεταφορά γενετικού υλικού (horizontal gene transfer) είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για την γενετική ποικιλομορφία. Αυξάνει την μεταβολική και φυσιολογική απόδοση των βιοϋμενικών κυττάρων μέσω της μεταφοράς γονιδίων με σύζευξη (conjugation), ενώ διάφορα πλασμίδια επηρεάζουν την βακτηριακή αύξηση (Mah and O'Toole, 2001).

1.6.4 Ευεργετικές επιδράσεις των βιοϋμενίων

Δεν αποτελούν, όμως, όλα τα βακτήρια πρόβλημα για την βιομηχανία τροφίμων ή και αλλού. Για παράδειγμα, ορισμένα βακτήρια βιοαποικοδομούν (biodegrade) πολλές τοξικές ενώσεις, ελαχιστοποιούν την συσσώρευση ρύπων, εξυγαίνοντας το πόσιμο νερό (bioremediation). Δημιουργούν ρευστοποιημένες κλίνες (fluidized beds) σε συστήματα διαχείρισης βιομηχανικών αποβλήτων και επεξεργασίας λυμάτων, μειώνοντας το οργανικό φορτίο. Ακόμη, νιτροποιητικά και απονιτροποιητικά βακτήρια χρησιμοποιούνται σε βιομηχανίες επεξεργασίας λυμάτων αζωτούχων λιπασμάτων, ενώ κάποια άλλα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή προϊόντων, όπως αιθανόλης, οξικού οξέως, πολυσακχαριτών, κ.ά. Επιπλέον, οι ακινητοποιημένες αυτές μορφές των βακτηρίων χρησιμοποιούνται σε βιοαντιδραστήρες (bioreactors) για την βελτιστοποίηση και την σταθερότητα της διαδικασίας της ζύμωσης (Kumar and Anand, 1998; Tolken-Nielsen and Molin, 2000). Μια άλλη σημαντική εφαρμογή των βιοϋμενίων (τεχνολογικά βακτήρια, positive biofilms) είναι η αποτροπή εγκατάστασης παθογόνων μικροοργανισμών σε επιφάνειες. Για παράδειγμα, οι Leriche *et al.*, (1999) και Leriche and Carpentier, (2000) αναφέρουν ότι τα βακτήρια *L. lactis* και *S. sciuri* μπορούν να μειώσουν την προσκόλληση της *L. monocytogenes* σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα. Ακόμη και το γαστρεντερικό σύστημα του ανθρώπου αποικίζεται από βακτήρια (π.χ. *L. lactis*, *Bifidobacterium spp.*) που αποτελούν ένα μεγάλο μέρος της φυσικής μικροχλωρίδας και χρησιμεύουν ως προστατευτικό στρώμα ενάντια στην αποίκιση παθογόνων βακτηρίων. Τέλος, τα προβιοτικά βακτήρια (probiotics), όταν είναι παρόντα σε ικανοποιητικό αριθμό, δημιουργούν ισορροπία μεταξύ της ευεργετικής και της επιβλαβούς μικροχλωρίδας

του εντέρου, ενώ πιστεύεται ότι ευνοούν την υγεία όταν καταναλώνονται μέσω των διάφορων ζυμούμενων τροφίμων (π.χ. γιαούρτι).

1.7 Βιοϋμένια και βιομηχανία τροφίμων

Η ικανότητα των μικροοργανισμών να προσκολλώνται σε επιφάνειες είναι απαραίτητη για την επιβίωσή τους στη φύση, δεδομένου ότι τους επιτρέπει να ασκούν έλεγχο στο περιβάλλον τους και παράλληλα να προστατεύονται από περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Ωστόσο, στη βιομηχανία τροφίμων, η ιδιότητα αυτή είναι επιβλαβής και ανεπιθύμητη, επειδή προκαλεί μείωση της αποτελεσματικότητας της παραγωγής, διάβρωση, δυσάρεστες οσμές, βλάβες στον εξοπλισμό, μόλυνση, κτλ (Nguyen and Yuk, 2013). Επομένως, τα βιοϋμένια παρουσιάζουν σημαντικό κίνδυνο υγιεινής για την βιομηχανία τροφίμων, αλλά και προκαλούν οικονομικές απώλειες, αφού επιδρούν αρνητικά σε πύργους ψύξης ή / και εναλλάκτες θερμότητας (Meyer, 2003). Άρα, τα βιοϋμένια αποτελούν, για την βιομηχανία, μια μόνιμη πηγή μόλυνσης, αλλοίωσης των τροφίμων ή / και μετάδοσης ασθενειών (Shi and Zhu, 2009; van Hoodt and Michiels, 2010).

Εστίες παθογόνων ή / και αλλοιωγόνων μικροοργανισμών που σχηματίζουν βιοϋμένια και έχουν βρεθεί στη βιομηχανία τροφίμων και σχετίζονται με την παρουσία *Listeria monocytogenes* σε κρεατοσκευάσματα, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.* σε πουλερικά, *Staphylococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Pseudomonas spp.* που προκαλούν αλλοιώσεις σε φρούτα, λαχανικά και κρέας, *Bacillus spp.* σε γαλακτοκομικά προϊόντα, *Enterobacter spp.*, *Micrococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, κ.ά. (Chmielewski and Frank, 2003; Brooks and Flint, 2008; Simões *et al.*, 2010). Σύμφωνα με τους Cabo *et al.*, (2009), τα βακτήρια του γένους *Staphylococcus spp.* είναι από τα πιο κοινά τροφιμογενή παθογόνα και κατά καιρούς έχουν βρεθεί σε βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων, τα οποία μπορούν να προσκολληθούν σε επιφάνειες και να σχηματίσουν βιοϋμένια, ενώ το βακτήριο *Escherichia coli* O157:H7 παράγει τοξίνες Shiga (Shiga-toxins) και πρόσφατα έχει αναφερθεί ως υπεύθυνο για πολλαπλές μολύνσεις σε νωπό βόειο κρέας (Viazis *et al.*, 2011).

1.8 Στρατηγικές ελέγχου και αντιμετώπισης βιοϋμενίων

1.8.1 Γενικά

Για να μειωθούν ή να εξαλειφθούν οι μικροοργανισμοί από τις επιφάνειες επεξεργασίας και μεταποίησης τροφίμων έχουν αναπτυχθεί τεχνικές που περιλαμβάνουν φυσικές μεθόδους (π.χ. πλύσιμο, ιονίζουσα ακτινοβολία, όζον, κ.ά) (Hood and Zotolla, 1995; van Hoodt and Michiels, 2010), χημικές μεθόδους (π.χ. υποχλωριώδη, ενώσεις τεταρτογενούς αμμωνίου) (Hood and Zotolla, 1995; Simões *et al.*, 2010; van Hoodt and Michiels, 2010), βακτηριοφάγους (Viazis *et al.*, 2011) και πρωτεολυτικά ένζυμα (Simões *et al.*, 2010). Έτσι, η κύρια πρόληψη για την αποφυγή σχηματισμού βιοϋμενίων είναι ο έγκαιρος καθαρισμός και η απολύμανση. Ακόμη, συνίσταται η απομάκρυνση των υπολειμάτων τροφής από τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων (Simões *et al.*, 2010). Επίσης, συνίσταται καθαρισμός «*In Place*», χωρίς την αποσυναρμολόγηση των μηχανημάτων (Srey *et al.*, 2013), ενώ άλλες στρατηγικές περιλαμβάνουν το σχεδιασμό υλικών ή την τροποποίηση των φυσικών ιδιοτήτων τους, ώστε να λειτουργούν αποτρεπτικά στη δημιουργία βιοϋμενίων, δηλαδή σχεδιασμός υπερυδροφобων επιφανειών (Abdallah *et al.*, 2014).

1.8.2 Απολυμαντικά

Για να μην προσκολληθούν τα κύτταρα σε μια επιφάνεια πρέπει να υπάρξει μια στρατηγική πρόληψη. Η κύρια στρατηγική για την πρόληψη του σχηματισμού βιοϋμενίου είναι ο καθαρισμός και η απολύμανση, πριν τα βακτήρια προσκολληθούν ισχυρά στις επιφάνειες (Simões *et al.*, 2010). Επίσης, σύμφωνα με τους Hood and Zotolla, (1995), οι φυσικές και οι χημικές μέθοδοι απομακρύνουν ή αδρανοποιούν τους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στις επιφάνειες του εξοπλισμού. Πρόσφατα ευρήματα καταδεικνύουν ότι τα προσκολλημένα κύτταρα είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα πλαγκτονικά στις απολυμαντικές ουσίες, λόγω της συμπαγούς και πολύπλοκης δομής των εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών του βιοϋμενίου (Bridier *et al.*, 2011 a, b).

Τα χημικά απολυμαντικά έχουν μη επιλεκτική δράση έναντι των μικροοργανισμών, δρουν σε πολλαπλούς στόχους, δηλαδή καταστρέφουν το εξωκυτταρικό πολυμερές

και στη συνέχεια το κυτταρικό τοίχωμα των βακτηρίων ή διάφορες λειτουργικές πρωτεΐνες, όμως πολλά απ' αυτά έχουν τοξική δράση και είναι μη αποδεκτά στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων (Viazis *et al.*, 2011). Σύμφωνα με τον Maillard, (2002) τα χημικά απολυμαντικά δρουν ενάντια στο κυτταρικό τοίχωμα αλλάζοντας την υδροφοβικότητα, διαταράσσουν την κυτταρική μεμβράνη δημιουργώντας διαρροή ενδοκυτταρικών συστατικών, διαταράσσουν την κινητήρια δύναμη πρωτονίων (PMF), την σύνθεση του ATP, ενώ αλληλεπιδρούν με ένζυμα και αναστέλλουν τη σύνθεση γενετικού υλικού. Για παράδειγμα, το χλωριούχο βενζαλκόνιο (BAC) είναι ένα απολυμαντικό το οποίο χρησιμοποιείται στη βιομηχανία, ανήκει στην κατηγορία των ενώσεων τεταρτογενούς αμμωνίου, στοχεύει στην κυτταρική μεμβράνη και προκαλεί κυτταρική λύση (Giaouris *et al.*, 2013 b), όμως η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία πιέζει τη βιομηχανία για αντικατάστασή του με άλλα, περιβαλλοντικά κατάλληλα (Cabo *et al.*, 2009). Επίσης, τα παράγωγα χλωρίου έχουν οξειδωτική δράση, αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες, ένζυμα, γενετικό υλικό. Έχουν χαμηλό κόστος, όμως είναι αρκετά διαβρωτικά για τις επιφάνειες και εξαιρετικά ερεθιστικά (Maillard, 2002). Ακόμη, τα υπεροξειδία, μέσω του σχηματισμού ριζών (OH^-), οι οποίες έχουν οξειδωτικές ιδιότητες, αλληλεπιδρούν με λιπίδια του κυτταρικού τοιχώματος, με ριβοσώματα, ένζυμα, ενώ είναι βιοδασπώμενα (Maillard, 2002).

Οι Chorianopoulos *et al.*, (2008) αναφέρουν πώς τα αιθέρια έλαια έχουν πολύ ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, είναι οικολογικά και φιλικά προς το περιβάλλον, ενώ το όζον και η νισίνη θεωρούνται εναλλακτικές λύσεις, με το όζον να θεωρείται βιοκτόνο ευρέως φάσματος, διότι είναι ιδιαίτερα οξειδωτικό και ασταθές στο νερό, χαρακτηριστικά που το καθιστούν ένα ελπιδοφόρο απολυμαντικό (Cabo *et al.*, 2009). Τα πρωτεολυτικά ένζυμα θεωρούνται ως μια βιώσιμη εναλλακτική λύση απολυμαντικών, λόγω της αποδοτικής δράσης τους (Simões *et al.*, 2010). Τέλος, οι βακτηριοφάγοι είναι ιοί, υποχρεωτικά παράσιτα των βακτηριακών κυττάρων που θανατώνουν συγκεκριμένα είδη. Επειδή οι βακτηριοφάγοι χρησιμοποιούν διαφορετικές πρωτεΐνες-υποδοχείς, αυτό μειώνει την αντίσταση των βακτηρίων στους φάγους (Simões *et al.*, 2010; Viazis *et al.*, 2011).

1.8.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών

Η αντίσταση των βιοϋμενικών κυττάρων σε διάφορα απολυμαντικά είναι περισσότερο αυξημένη εν συγκρίσει με τα πλαγκτονικά κύτταρα (McDonnell and Russell, 1999; Donlan and Costerton, 2002). Πρώτα απ' όλα, η ενεργότητα των απολυμαντικών μέσω εξαρτάται από το pH, την θερμοκρασία, την συγκέντρωση, τον χρόνο έκθεσης (Nadell *et al.*, 2008; van Houdt and Michiels, 2010; Belessi *et al.*, 2011), ενώ εξαρτάται επίσης και από τον τύπο της επιφάνειας προσκόλλησης, την ηλικία του βιοϋμενίου, την κυτταρική πυκνότητα, το είδος του βακτηρίου και την παρουσία άλλων ειδών εντός του βιοϋμενίου (James *et al.*, 1995; Lerich *et al.*, 2003; Burmølle *et al.*, 2006; Nadell *et al.*, 2008; Abdallah *et al.*, 2014). Εφόσον, λοιπόν, τα βιοϋμενικά κύτταρα μπορεί να είναι έως και 1000 φορές πιο ανθεκτικά, στα απολυμαντικά, από τα πλαγκτονικά (Belessi *et al.*, 2011; Bridier *et al.*, 2011 a, b; Corterson *et al.*, 1999), θα υπάρχουν κάποιοι μηχανισμοί οι οποίοι θα επιδρούν ευεργετικά στα κύτταρα έναντι των απολυμαντικών. Μελέτες έχουν προτείνει διάφορους μηχανισμούς ανθεκτικότητας των βιοϋμενίων ως προς τα απολυμαντικά, όπως: (1) η μειωμένη διείσδυση των απολυμαντικών στο βιοϋμένιο, (2) ο φαινότυπος των βιοϋμενικών κυττάρων (π.χ. μειωμένος ρυθμός αύξησης), (3) η προσαρμογή τους στο δυσμενές περιβάλλον και (4) η παρουσία ανθεκτικών κυττάρων στα απολυμαντικά (Costerton, 1995; Mah and O' Toole, 2001; Donlan and Costerton, 2002; Belessi *et al.*, 2011; Abdallah *et al.*, 2014; Giaouris *et al.*, 2014 a).

(1) Μειωμένη διείσδυση των απολυμαντικών στο βιοϋμένιο

Όπως είναι γνωστό, τα βιοϋμενικά κύτταρα περικλείονται από ένα εξωκυτταρικό πολυμερές, γνωστό ως EPS. Αυτή η μήτρα λειτουργεί ως φραγμός στην διείσδυση του απολυμαντικού, λόγω της σύνθεσής της, του φορτίου των εξωπολυσακχαριτών και της μειωμένης διάχυσης του απολυμαντικού.

(2) Φαινότυπος των βιοϋμενικών κυττάρων

Λόγω των περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν εντός του βιοϋμενίου, τα βιοϋμενικά κύτταρα αυξάνονται με μειωμένο ρυθμό σε σχέση με τα πλαγκτονικά, ενώ η έκφραση γονιδίων κωδικοποιεί και εκκρίνει πρωτεΐνες οι οποίες βοηθούν στην απόκριση του κυττάρου στην καταπόνηση (Giaouris *et al.*, 2013 a, b; Giaouris *et al.*, 2014 a).

(3) Προσαρμογή στο δυσμενές περιβάλλον

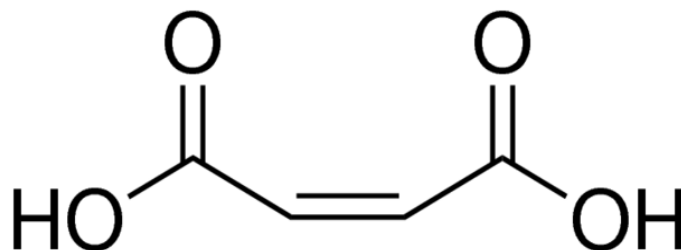
Η φυσιολογία των κυττάρων που βρίσκονται μέσα σ' ένα βιοϋμένιο παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με αυτή των πλαγκτονικών κυττάρων που βρίσκονται στη φάση στασιμότητας (stationary phase). Έτσι, μικροοργανισμοί που δεν αναπτύσσονται ή έχουν εισέλθει στη φάση στασιμότητας είναι, συνήθως, λιγότερο ευαίσθητοι στους αντιμικροβιακούς παράγοντες.

(4) Παρουσία ανθεκτικών κυττάρων στα απολυμαντικά

Η αυξημένη χρήση απολυμαντικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις έχει αυξήσει την ανθεκτικότητα των κυττάρων. Τέλος, η παρουσία μικτών βιοϋμενίων (Simões *et al.*, 2010), επίσης αυξάνει την ανθεκτικότητά τους, λόγω της φύσης της εξωκυτταρικής ουσίας (αυξημένο ιξώδες), ενώ η χωροτακτική διάταξη των κυττάρων μέσα στο μικτό βιοϋμένιο, πιθανόν να προστατεύει ορισμένα κύτταρα έναντι των απολυμαντικών (James *et al.*, 1995; Bridier *et al.*, 2011 a, b).

1.8.4 Μηλεϊνικό οξύ (Maleic acid)

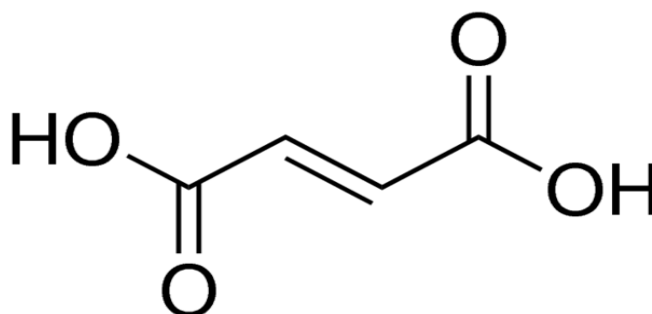
Το μηλεϊνικό οξύ (maleic acid) ή cis-βουτενεδιοϊκό οξύ (cis-butenedioic acid) είναι μια οργανική ένωση, ένα δικαρβοξυλικό, ασθενές οξύ, με χημικό τύπο $C_4H_4O_4$ ($HO_2CCH=CHCO_2H \geq 99.00 \%$, HPLC). Η κατά IUPAC ονομασία του είναι 2 Z - but - 2 - enedioic acid (Εικόνα 1.8.4.1).



Εικόνα 1.8.4.1. Αναλυτικός στερεοχημικός τύπος μηλεϊνικού οξέως.

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/m0375?lang=en®ion=GR>)

Το ισομερές του είναι το φουμαρικό οξύ (fumaric acid, trans-butenedioic acid), το οποίο είναι πρόσθετο (E297) (ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ 1333/2008/ΕΕ, ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ 231/2012/ΕΕ), απαντάται σε κρυσταλλική μορφή (**Εικόνα 1.8.4.2**), έχει φρουτώδη γεύση (fruit-like taste) και χρησιμοποιείται ως ρυθμιστής οξύτητας, ως υποκατάστατο του τρυγικού οξέως και περιστασιακά στη θέση του κιτρικού σε διάφορα τρόφιμα. Επίσης, το φουμαρικό οξύ έχει χρησιμοποιηθεί και για την απολύμανση λαχανικών και φρούτων με στόχο την λογαριθμική μείωση παθογόνων μικροοργανισμών (π.χ. *E. coli*, *L. monocytogenes*, κτλ) που πιθανόν να βρίσκονται στις επιφάνειες των συγκεκριμένων τροφίμων (Kim *et al.*, 2009 a, b; Lu *et al.*, 2013).



Εικόνα 1.8.4.1. Αναλυτικός στερεοχημικός τύπος φουμαρικού οξέως.

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/240745?lang=en®ion=GR>)

Το μηλεϊνικό οξύ είναι διαλυτό σε υδατικά διαλύματα (π.χ. νερό), έχει χαμηλό σημείο τήξης (135 °C), έχει μοριακό βάρος $M_r = 116.071 \text{ g / mole}$ και τα pK_a του είναι 1.9 και 6.07. Η τιμές αυτές είναι ένα μέτρο της ισχύος του οξέως, για μια ορισμένη θερμοκρασία, δηλαδή όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή της σταθεράς ιοντισμού του οξέως τόσο ισχυρότερο είναι το οξύ. Το συγκεκριμένο οξύ χρησιμοποιείται στην φαρμακοβιομηχανία, δηλαδή πολλά φάρμακα που περιέχουν αμίνες παρέχονται ως

άλας του μηλεϊνικού οξέως, π.χ. καρφαναζίνη (carfenazine), χλωροφαινιραμίνη (chlorpheniramine), πυριλαμίνη (pyrilamine), μεθυλεργονοβίνη (methylethylperazine), και θιαιθυλπεραζίνη (thiethylperazine), ενώ χρησιμοποιείται και στην οδοντιατρική, ως απολυμαντικό μέσω έναντι διάφορων παθογόνων που σχηματίζουν βιοϋμένια, όπως το *Enterococcus faecalis* (Ballal *et al.*, 2009; Ferrer-Luque *et al.*, 2010; Baca *et al.*, 2011).

1.9 Παθογόνο βακτήριο *Listeria monocytogenes*

1.9.1 Χαρακτηριστικά μικροοργανισμού

Το γένος *Listeria* ανήκει στον υποκλάδο *Clostridium* μαζί με τα *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* και *Brochothrix*. Αποτελείται από έξι είδη, τα *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* και *Listeria grayi*. Η *Listeria monocytogenes* είναι παθογόνο βακτήριο των ανθρώπων, ενώ η *Listeria ivanovii* των ζώων. Με βάση βιοχημικές μεθόδους, το γένος *Listeria* παράγει οξέα από την D-ξυλόζη, την L-ραμνόζη, την α-μεθυλ-D-μαννόζη και την D-μανιτόλη. Έχει υψηλό ρυθμό ετερογένειας (Montville and Matthews, 2005), ενώ με βάση φαινοτυπικές μεθόδους διαχωρίζεται σε δεκατρείς ορότυπους (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4ab, 4c, 4d, 4e και 7) και σε τρεις γενεαλογίες [Γενεαλογία I (Lineage I), Γενεαλογία II (Lineage II), Γενεαλογία III (Lineage III)]. Η Γενεαλογία I περιλαμβάνει τους ορότυπους 1/2b, 3b, 4b, 4d, 4e, η Γενεαλογία II τους 1/2a, 1/2c, 3a, 3c και η Γενεαλογία III τους 4a, 4c (Renier *et al.*, 2011). Το 95 % των θανάτων από τροφιμογενείς ασθένειες προκαλείται από τους ορότυπους 1/2a, 1/2b και 4b (Pan *et al.*, 2009).

Η *L. monocytogenes* είναι ένα Gram⁺, μη σποριογόνο, προαιρετικά αναερόβιο, ψυχρότροφο βακτήριο (Gandhi and Chikindas, 2007; Di Bonaventura *et al.*, 2008; O' Bryne and Karatzas, 2008; Kadam *et al.*, 2013; Giaouris *et al.*, 2015), το οποίο αυξάνεται από 1 έως 45 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία τους 30 - 35 °C, σε pH από 4.1 έως 9.6, με βέλτιστο 6 - 7, παρουσία NaCl έως 12 % και σε $a_w \geq 0.97$, αλλά επιβιώνει μέχρι και $a_w = 0.83$ (Lerich and Carpentier, 2000; Borucki *et al.*, 2003; Di Bonaventura *et al.*, 2008).

Βρίσκεται σε στάσιμα νερά, στο έδαφος, στον φυτικό ιστό, σε αποχετεύσεις, αλλά και σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων (Carpentier and Cerf, 2011; Kadam *et al.*, 2013). Έχει απομονωθεί από γάλα, τυρί, κρέας και λαχανικά (Rieu *et al.*, 2008), ενώ η ικανότητά της να παραμένει σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων (Gounadaki *et al.*, 2008; Poimenidou *et al.*, 2009; Renier *et al.*, 2011; Melo *et al.*, 2015) διατρέχει σοβαρό κίνδυνο σχηματισμού βιοϋμενίου (Norwood and Gilmour, 2000; Chavant *et al.*, 2002; Borucki *et al.*, 2003; Harvey *et al.*, 2007) και επακόλουθης επιμόλυνσης των τροφίμων. Τέλος, σύμφωνα με τους Djordjević *et al.*, (2002) και Kadam *et al.*, (2013), το βιοϋμένιο που σχηματίζει το συγκεκριμένο βακτήριο σχετίζεται με τον ορότυπο, την Γενεαλογία, αλλά και ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία και το θρεπτικό μέσο αύξησης. Έτσι, οι Djordjević *et al.*, (2002), Borucki *et al.*, (2003) και Harvey *et al.*, (2007) αναφέρουν πώς η Γενεαλογία I σχηματίζει περισσότερο βιοϋμένιο σε σχέση με την Γενεαλογία II, ενώ οι ορότυποι 1/2a και 1/2c (Γενεαλογία II) σχηματίζουν περισσότερο βιοϋμένιο σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα σε σχέση με τον ορότυπο 4b (Γενεαλογία I).

1.9.2 Τροφιμογενείς ασθένειες - Λιστερίωση (*Listeriosis*)

Η *L. monocytogenes* προκαλεί μια ασθένεια, γνωστή ως λιστερίωση (*Listeriosis*). Είναι μια σπάνια, σποραδική, αλλά βαριάς μορφής ασθένεια σε καλά προσδιορισμένες ομάδες υψηλού κινδύνου. Σε αυτές ανήκουν οι έγκυες γυναίκες, τα νεογνά, οι ανοσοκατασταλαμένοι ενήλικες με HIV / AIDS και οι ηλικιωμένοι (Pan *et al.*, 2009; Gandhi and Chikindas, 2007; Ryan *et al.*, 2008). Προκαλεί αποβολή εμβρύων, μηνιγγίτιδα, σηψαιμία, εμφανή περιγεννητική μόλυνση, εγκεφαλίτιδα, ψύχωση, μολυσματική μονοπυρήνωση. Επίσης, προκαλεί εμπύρετη γαστρεντερίτιδα, με την μολυσματική δόση να κυμαίνεται από $1.9 \times 10^5 - 10^9$ CFU / ml, με τα συμπτώματα να εμφανίζονται μετά από 18 - 27 h από την προσβολή. Τέλος, οι παράγοντες που σχετίζονται με την εμφάνιση της λιστερίωσης είναι (Montville and Matthews, 2005):

☞ Η αδρανοποίηση αλλοιωγόνων βακτηρίων που προλαμβάνουν την αύξηση της *L. monocytogenes* κάτω από συνθήκες ψύξης,

✗ Η αλλαγή στο δημογραφικό, με όλο και περισσότερους ανθρώπους να βρίσκονται σε ομάδες υψηλού κινδύνου, λόγω μεγάλης ηλικίας, ανοσοκαταστολής, μεταμόσχευσης οργάνων, κτλ,

✗ Η μεταβολή στις πρακτικές παραγωγής τροφίμων, συγκεκριμένα ο συγκεντρωτισμός και η ενοποίηση βιομηχανιών τροφίμων, αλλά και κουζινών ιδρυμάτων, γεγονός που κάνει δύσκολη την εφαρμογή ορθών πρακτικών υγιεινής (GHP),

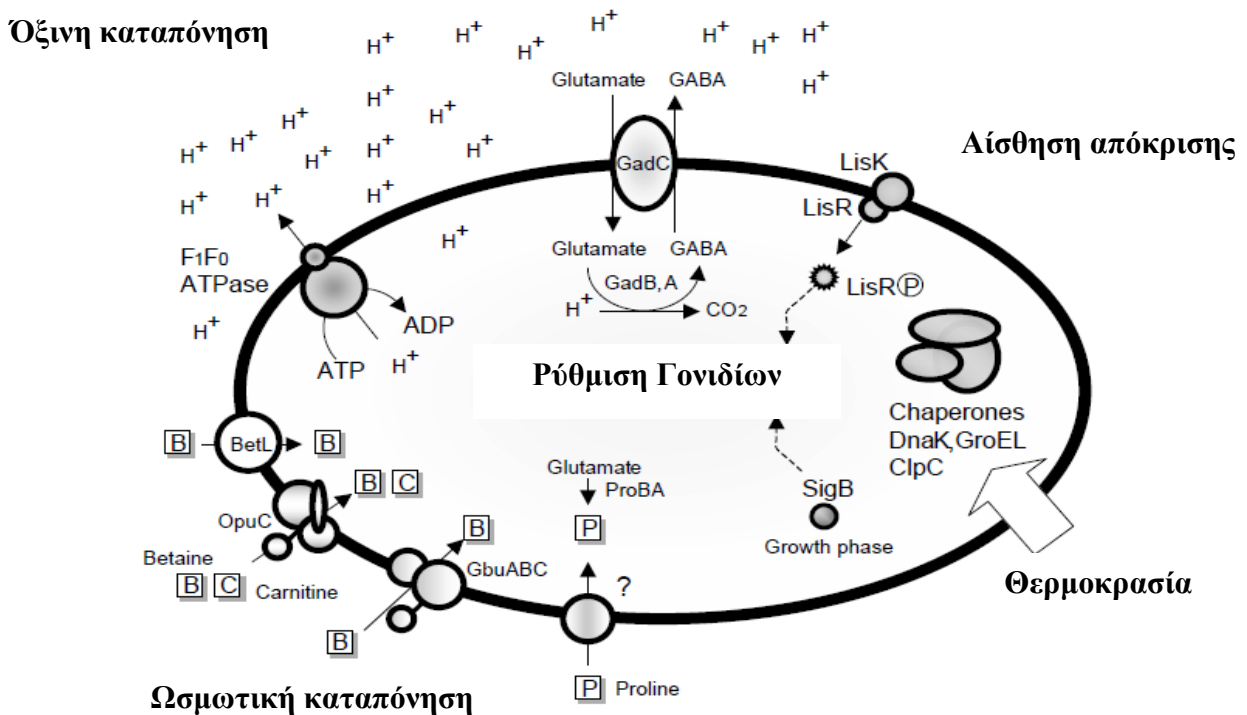
✗ Η αυξημένη χρήση του ψυγείου,

✗ Η αλλαγές στις συνήθειες του φαγητού (νωπά τρόφιμα, ελάχιστα επεξεργασμένα, φυσικά προϊόντα) που απαιτούν ελάχιστο μαγείρεμα.

1.9.3 Απόκριση στην όξινη καταπόνηση (*ATR, Acid Tolerance Resistance*)

Η προσαρμογή της *L. monocytogenes*, σε εχθρικά περιβάλλοντα, έχει αποδειχθεί ότι μεταβάλλει την κυτταρική της φυσιολογία, τον κυτταρικό μεταβολισμό, τη μορφολογία, την σύνθεση της μεμβράνης και τον βαθμό μολυσματικότητας (Beales, 2004; Giaouris *et al.*, 2014 b) και έτσι γίνεται πιο ανθεκτική σε εξωτερικές πιέσεις (Abee and Wouters, 1995; Chorianoopoulos *et al.*, 2011 b), ενώ ο πιο σημαντικός παράγοντας είναι η απόκριση στην όξινη καταπόνηση (*ATR, Acid Tolerance Resistance*) (Lou and Yusef, 1997; Chorianoopoulos *et al.*, 2011 b; Koutsoumanis *et al.*, 2003; Giaouris *et al.*, 2014 b). Η απόκριση στην όξινη καταπόνηση είναι, συνήθως, αποτέλεσμα της έκθεσης των κυττάρων σε ήπιες όξινες συνθήκες (π.χ. pH = 5 - 6) και εκτός αυτού, τα κύτταρα αποκτούν ανθεκτικότητα και σε έκθεση θανατηφόρων δόσεων οξέων (Koutsoumanis *et al.*, 2003; Koutsoumanis and Sofos, 2004; Chorianoopoulos *et al.*, 2011 b; Giaouris *et al.*, 2014 b). Το χαμηλό pH επιτυγχάνεται με την προσθήκη ασθενών οργανικών οξέων (π.χ. οξικό οξύ, γαλακτικό οξύ), τα οποία εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα, χαμηλώνοντας το εσωτερικό pH του κυττάρου, σε αντίθεση με τα ισχυρά ανόργανα οξέα, τα οποία διήστανται πλήρως στο εξωτερικό, απελευθερώνουν κατιόντα που με τη σειρά τους παρεμποδίζουν την αύξηση του κυττάρου, μέσω της μετουσίωσης κάποιων πρωτεϊνών στην επιφάνεια του κυττάρου (Beales, 2004; Giaouris *et al.*, 2014 b). Τέλος, έχει βρεθεί ότι η απόκριση στην όξινη καταπόνηση παρέχει διασταυρούμενη

προστασία (cross-protection) ενάντια στην θερμότητα, την αιθανόλη, την όξινη και ωσμωτική καταπόνηση, σε διάφορες βακτηριοσίνες (π.χ. νισίνη) και σε ιονοφόρα (O' Driscoll *et al.*, 1996; Lou and Yusef, 1997; Hill *et al.*, 2002; Koutsoumanis *et al.*, 2003; Samelis *et al.*, 2003; Skandamis *et al.*, 2008, 2009; Chorianopoulos *et al.*, 2011 b; Giaouris *et al.*, 2014 b, Melo *et al.*, 2015) (Εικόνα 1.9.3.1)

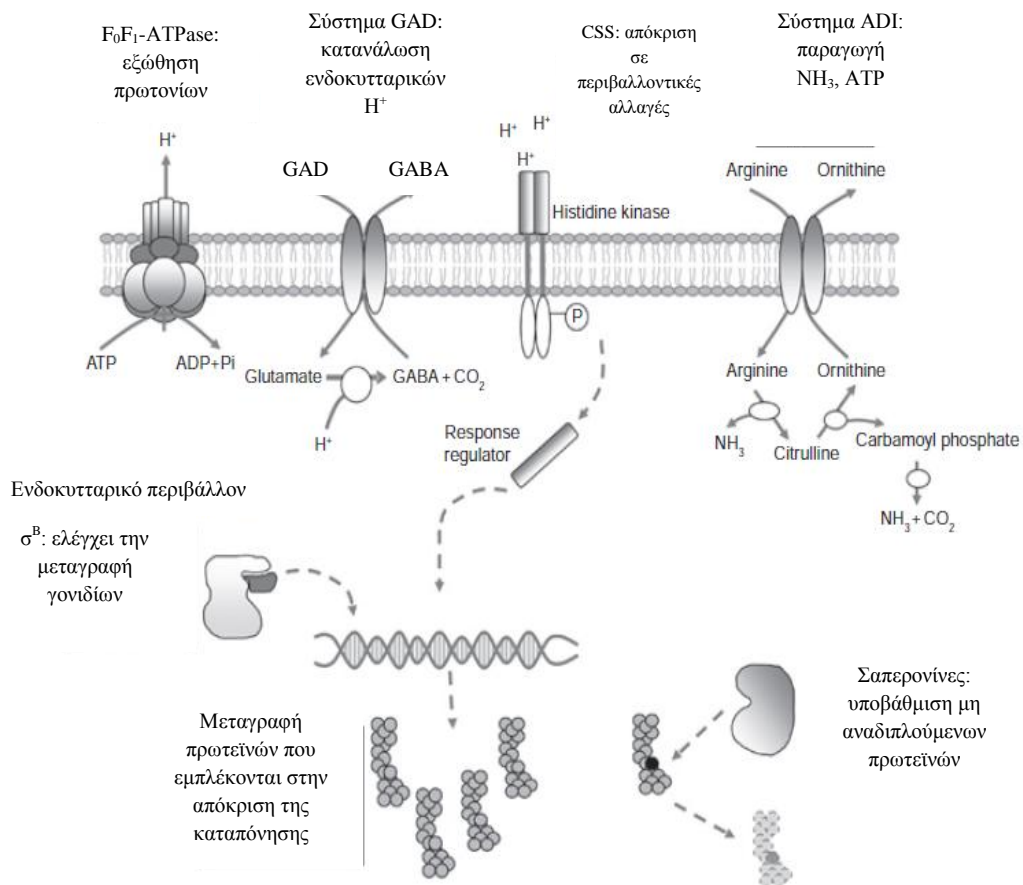


Εικόνα 1.9.1.1. Σχηματική αναπαράσταση της προστασίας και της προσαρμογής της *L. monocytogenes* ενάντια σε περιβαλλοντικές παραμέτρους (Προσαρμοσμένο από Hill *et al.*, 2002).

Σύμφωνα με τους Gandhi and Chikindas, (2007) η *L. monocytogenes* χρησιμοποιεί διάφορους μηχανισμούς, όπως το σύστημα της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης (GAD system), το σύστημα F₀F₁-ATPase, εναλλακτικούς παράγοντες σ^B (σ^B factors), το σύστημα απαμίνωσης αργινίνης και αγματίνης (Arginine and Agmatine deiminase systems), καθώς και συστήματα ρύθμισης δύο συστατικών LisRK (LisRK two-component regulatory system) (Εικόνα 1.9.3.2).

Το γλουταμινικό οξύ (glutamate) παίζει κεντρικό και σημαντικό ρόλο σε ένα ευρύ φάσμα μεταβολικών διεργασιών. Πιο σημαντικός ρόλος είναι αυτός της απόκρισης σε όξινες καταπονήσεις. Αυτό το σύστημα (σύστημα γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης, glutamate decarboxylase system - GAD system) διευκολύνει την ενδοκυτταρική

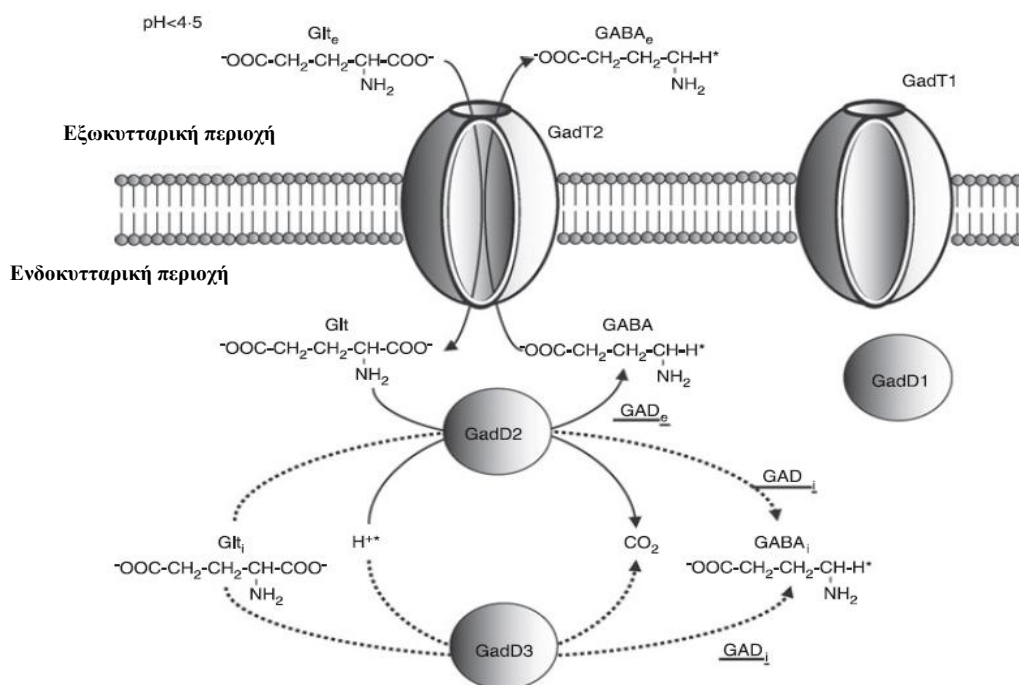
ομοίωσταση και την διατήρηση του pH του κυττάρου με κατανάλωση πρωτονίων (H^+) σε μια αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης του γλουταμινικού οξέως που παράγει γ-αμινοβουτυρικό οξύ (γ-aminobutyrate, GABA) (Shelp *et al.*, 1999; Hill *et al.*, 2002; Cotter and Hill, 2003; Gahan and Hill, 2005; Melo *et al.*, 2015; Gandhi and Chikindas, 2007; Ryan *et al.*, 2008; Karatzas *et al.*, 2010; Karatzas *et al.*, 2012; Feehily and Karatzas, 2013). Περιλαμβάνει πέντε γονίδια, τρία (gadD1, gadD2, and gadD3) από τα οποία κωδικοποιούν τις αποκαρβοξυλάσες και τα άλλα δύο (gadT1 and gadT2) τους αντιμεταφορείς, ενώ εμφανίζονται σε ζεύγη (gadD1/T1 and gadD2/T2, gadD3) (Cotter *et al.*, 2001; Gahan and Hill, 2005; Melo *et al.*, 2015).



Εικόνα 1.9.3.2. Σχηματική αναπαράσταση των συστημάτων και μηχανισμών αντίστασης της *L. monocytogenes* σε όξινα περιβάλλοντα (Προσαρμοσμένο από Ryan *et al.*, 2008).

Το γλουταμινικό οξύ είναι ένα μη απαραίτητο αμινοξύ που συμμετέχει στην σύνθεση πρωτεϊνών, αλλά και σε άλλες διεργασίες, όπως η γλυκόλυση, η γλυκονεογένεση, ο κύκλος του κιτρικού οξέως. Είναι, επίσης, ένας μεταβολίτης-κλειδί που χρησιμεύει στην σύνδεση του μεταβολισμού αζώτου και άνθρακα. Ο

καταβολισμός του γλουταμινικού οξέως λαμβάνει χώρα, κυρίως με την δράση είτε της γλουταμινικής δεϋδρογενάσης είτε της γλουταμινικής αποκαρβοξυλάσης. Το πρώτο ένζυμο είναι σημαντικό για την αφομοίωση της αμμωνίας από τα αμινοξέα, ενώ το δεύτερο για την αντίσταση των μικροοργανισμών σε διάφορες περιβαλλοντικές καταπονήσεις. Η GAD, λοιπόν, είναι ένα ένζυμο που καταλύει την αποκαρβοξυλίωση του γλουταμινικού οξέως προς γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA) (O'Byrne and Karatzas, 2008; Feehily and Karatzas, 2013). Είναι το πρώτο βήμα στο οποίο παράγεται ηλεκτρικό οξύ (succinate), κυρίως με την δράση της γ-αμινοβουτυρικής αμινοτρανσφεράσης (GABA-aminotransferase, GABA-AT) και της αφυδρογονάσης ηλεκτρικής ημιαλδεΐδης (succinic semialdehyde dehydrogenase, SSDH). Ο κύκλος της αντίδρασης ξεκινά με την εισαγωγή ενός εξωκυτταρικού μορίου γλουταμινικού οξέως (Glt_e) σε αντάλλαγμα με ένα ενδοκυτταρικό μόριο γ-αμινοβουτυρικού οξέως (GABA_i), δια μέσου του γ-αμινοβουτυρικού αντιμεταφορέα (GABA antiporter) (O'Byrne and Karatzas 2008). Στη συνέχεια, το εισαγόμενο γλουταμινικό οξύ αποκαρβοξυλιώνεται με ενσωμάτωση ενός πρωτονίου στον α -C του μορίου, προς σχηματισμό GABA (Hill *et al.*, 2002; Karatzas *et al.*, 2012; Feehily and Karatzas, 2013) (Εικόνα 1.9.3.3).



Εικόνα 1.9.3.3. Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας του εξωκυτταρικού (GAD_e) και ενδοκυτταρικό (GAD_i) συστήματος GAD της *L. monocytogenes* υπό ακραίες όξινες συνθήκες. Τα γονίδια GadD2 και GadD3 μετατρέπουν το Glt_i σε GABA_i (GAD_i). Το γονίδιο

GadD2, επίσης, επεξεργάζεται το Glt_e που εισάγεται από τον αντιμεταφορέα GadT2 (GAD_e), ο οποίος μετασχηματίζει το GABA, το οποίο, στη συνέχεια, εξάγεται από το GadT2. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα GadD1 και GadT1 δεν παίζουν κανέναν ρόλο στην αντοχή στα οξέα (GABA, γ -αμινοβουτυρικό οξύ και GAD, γλουταμινική αποκαρβοξυλάση) (Προσαρμοσμένο από Karatzas et al., 2012; Feehily and Karatzas, 2013)

Ο δεσμός αυτός είναι ισχυρά σταθερός και δεν μπορεί να ιονιστεί. Έπειτα, το μόριο GABA που φέρει το πρωτόνιο (H^+) είτε εξάγεται από τον αντιμεταφορέα είτε παραμένει στο εσωτερικό του κυττάρου (Karatzas et al., 2010; Feehily and Karatzas, 2013). Έτσι, το ένζυμο GAD είναι μια 5'- φωσφορική πυριδοξάνη (PLP) με βέλτιστο $\text{pH} = 3.8 - 4.6$, σε σχήμα εξαμερές, με κρυσταλλική δομή. Το GAD και το GABA έχουν παρόμοιο pK_a στην πλευρική καρβοξυλική αλυσίδα ($\text{pK}_a = 4.0$) και στην α -αμινομάδα ($\text{pK}_a 10$). Η μόνη διαφορά είναι ότι το GAD διαθέτει μια α -καρβοξυλική ομάδα που έχει $\text{pK}_a 2.1$. Αυτό υποδηλώνει μια πιθανή διαφορά στην ικανότητα αυτών των δύο ενώσεων να απομακρύνουν πρωτόνια (H^+) σε $\text{pH}_e < 3$ που είναι θανατηφόρο για τα περισσότερα βακτήρια. Επιπλέον, σε αντίθεση με το GABA, το GAD ενσωματώνει πρωτόνια (H^+) σε $2.0 < \text{pH} < 3.0$, λόγω της πρόσθετης α -καρβοξυλομάδας, που υποδηλώνει ότι το Glt_e είναι πιο ευεργετικό από το ισομοριακό GABA_e (Feehily and Karatzas, 2013).

1.10 Μέθοδοι μικροβιολογικής ανάλυσης

1.10.1 Γενικά

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί μια αυξανόμενη ανησυχία για τους καταναλωτές, διότι τα τελευταία χρόνια οι ασθένειες που προκαλούνται από τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια έχουν αναδειχθεί σε δημόσιο πρόβλημα υγείας σε όλο τον κόσμο, παράγοντας έτσι ένα σημαντικό ποσοστό νοσηρότητας και θνησιμότητας (Zhao et al., 2014).

Η κύρια κλασική μέθοδος απαρίθμησης του μικροβιακού φορτίου μέχρι πρόσφατα, αυτή δηλαδή της μικροβιακής απαρίθμησης με τρυβλία, παύει σήμερα να καλύπτει επαρκώς τις υπάρχουσες ανάγκες για άμεση ανάλυση δειγμάτων για την εκτίμηση της ποιότητας και την παρακολούθηση της παραγωγικής διαδικασίας. Κύρια πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι η απλότητα, η προσαρμοστικότητα

και η ευκολία στην εφαρμογή. Βασικό της, όμως, μειονέκτημα αποτελεί η ικανότητα μέτρησης μόνο εκείνων των μικροοργανισμών που έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν αποικίες, δηλαδή να πολλαπλασιάζονται. Η δυνατότητα σχηματισμού αποικιών αποτελεί χαρακτήρα μεταβαλλόμενο και επηρεαζόμενο από πολλούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα, η εκλεκτικότητα των θρεπτικών υποστρωμάτων, η θερμοκρασία επώασης αλλά και η παρουσία παρεμποδιστικών παραγόντων (π.χ. αιθέρια έλαια) που «τραυματίζουν» τα κύτταρα. Άλλα μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής είναι οι μεγάλες απαιτήσεις σε χρόνο, υλικά και εργασία. Ο χρόνος που απαιτείται για τη λήψη αποτελέσματος εξαρτάται από το είδος των μικροοργανισμών και μπορεί να φτάσει, ξεκινώντας από τις 48 - 72 ώρες, στις 7 ημέρες. Ένα άλλο βασικό μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η μη ικανοποιητική ακρίβειά της που επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες που σχετίζονται τόσο με την εκτέλεση της τεχνικής όσο και με τη φύση του δείγματος (Griffiths, 1994).

Έτσι, λοιπόν, η αναγκαιότητα ελέγχου και εκτίμησης της μικροβιακής ποιότητας, με ταυτόχρονη μείωση του κόστους ελέγχου, αύξηση της ταχύτητας λήψης των αποτελεσμάτων και δυνατότητα ελέγχου μεγάλου αριθμού δειγμάτων, οδήγησε τους επιστήμονες στον περιορισμό της χρήσης των κλασσικών μεθόδων και στην ολοένα εκτενέστερη χρησιμοποίηση των ταχέων μεθόδων (Grau *et al.*, 2001; Zhao *et al.*, 2014). Άρα, η εύρεση ταχέων, ευαίσθητων και ειδικών μεθόδων ανίχνευσης παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών είναι ζήτημα κεντρικής σημασίας για την εφαρμογή αποτελεσματικών πρακτικών που θα διασφαλίζουν την ασφάλεια των τροφίμων (Yang and Bashir, 2008).

1.10.2 Κλασσικές μέθοδοι

Οι μικροβιολογικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό της μικροβιακής σύνθεσης ενός τροφίμου (απομόνωση, ταυτοποίηση, ανίχνευση και απαρίθμηση) στηρίζονται, κυρίως, στη χρήση εκλεκτικών ή γενικής χρήσης τεχνητών υποστρωμάτων (θρεπτικά υλικά) και χαρακτηρίζονται ως *κλασσικές μέθοδοι*. Η αξιοπιστία των κλασσικών μεθόδων περιορίζεται εξαιτίας της δυνατότητας μέτρησης μόνο των κυττάρων που έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες, καθώς και από την αξιοπιστία του ίδιου του υποστρώματος. Επίσης, τα καταπονημένα ή τραυματισμένα κύτταρα δεν αναπτύσσονται σε εκλεκτικά υλικά, ενώ άλλα

παρεμποδίζονται από μικροοργανισμούς που βρίσκονται σε αφθονία (Hugenholtz *et al.*, 1998). Γενικά, οι κλασσικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται ως χρονοβόρες και καλύπτουν ποσοστό μικρότερο του 1 % των ειδών των μικροοργανισμών που απαρτίζουν τη μικροβιακή σύνθεση ενός περιβαλλοντικού δείγματος (Parlapani *et al.*, 2013). Ακόμη, άλλα μειονεκτήματα των κλασσικών μεθόδων είναι η επίπονη διαδικασία, με κόστος σε αναλώσιμα υλικά, εργατοώρες και επιπλέον, απαιτούν την παρέλευση ενός αρκετά μεγάλου χρονικού διαστήματος (24 h - 7 ημέρες) προκειμένου να δώσουν αποτέλεσμα. Η πιο κλασσική μέθοδος μικροβιολογικής ανάλυσης τροφίμων είναι η *μέθοδος τρυβλίων*:

❖ Μέθοδος τρυβλίων (*standard plate count*)

Η μέθοδος αυτή αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική για την μέτρηση των μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Ποσότητες από δείγματα τροφίμων αναδεύονται ή ομογενοποιούνται, αραιώνονται διαδοχικά με κατάλληλο αραιωτικό διάλυμα, ενσωματώνονται ή επιστρώνονται (pour ή spread plated) σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα και στη συνέχεια επωάζονται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και για ορισμένο χρονικό διάστημα. Μετά το πέρας αυτού του χρονικού διαστήματος όλες οι ορατές αποικίες καταμετρούνται. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται στην θερμοκρασία του υλικού αύξησης η οποία μπορεί να επιδράσει έμμεσα στην μείωση του αριθμού των αποικιών (η υψηλή θερμοκρασία τραυματίζει ή θανατώνει του μικροοργανισμούς) (**Εικόνα 2.4.3** και **Εικόνα 2.4.2**).

1.10.3 Σύγχρονες μέθοδοι

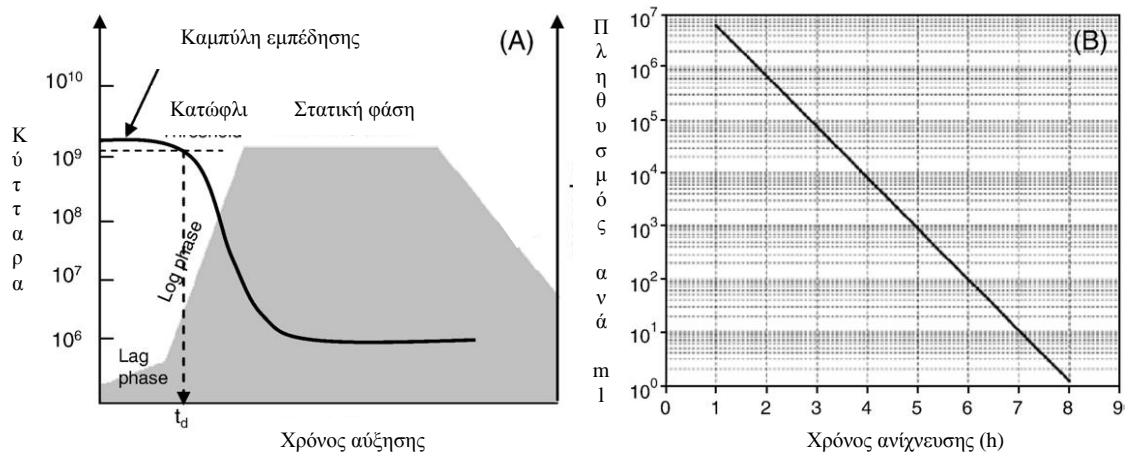
Μερικές από τις σύγχρονες μεθόδους μικροβιολογικής ανάλυσης είναι η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD), η βιοφωταύγεια (bioluminescence, προσδιορισμός, δηλαδή του ATP, όπου μετά από αντίδραση με λουσιφερίνη και λουσοφεράση εκπέμπεται φως, η ένταση του οποίου μας δίνει την ανάλογη ποσότητα ATP), η μέτρηση της καταλάσης (η καταλάση είναι ένζυμο που καταλύει τη διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου σε αέριο και νερό), η θερμοανθεκτική νουκλεάση (Thermostable Nuclease), η μέθοδος του άμεσου μεμβρανικού φίλτρου επιφθορισμού (Direct Epifluorescence Filter Technique), οι ανοσολογικές μέθοδοι (Immunological

methods, π.χ. ELISA) και οι μοριακές μέθοδοι (DNA-based methods) (Griffiths, 1995). Σε αυτή την πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν οι εξής μέθοδοι:

- Μέτρηση οπτικής πυκνότητας και
- Αναλυτής μικροβιολογικής αύξησης (Malthus microbiological growth analyser)

1. Αναλυτής μικροβιολογικής αύξησης (*Malthus microbiological growth analyser*)

Η ανάλυση αυτή ανήκει στις *ηλεκτρικές μεθόδους* (Electrical Methods) και είναι εγκεκριμένη από την AOAC (1992), όταν πρωτοχρησιμοποιήθηκε για να ανιχνεύσει βακτήρια *Salmonella spp.* σε τρόφιμα. Καθώς οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ένα θρεπτικό μέσο, διασπών τα συστατικά του τελευταίου σε μικρότερου μοριακού βάρους ουσίες με υψηλό φορτίο, με αποτέλεσμα τη μεταβολή των ηλεκτρικών ιδιοτήτων του μέσου. Πιο συγκεκριμένα, οι πρωτεΐνες μεταβολίζονται σε αμινοξέα, τα σάκχαρα σε γαλακτικό οξύ και τα λιπίδια σε οξικό οξύ. Έτσι, οι αλλαγές στην αγωγιμότητα ευθύνονται στην απελευθέρωση ιόντων από τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών ή από την ανταλλαγή ιόντων (κυρίως ιόντων K^+ και Na^+) δια μέσου της κυτταρικής μεμβράνης. Οι αλλαγές στην αγωγιμότητα του θρεπτικού μέσου καταγράφονται μέσω ηλεκτροδίων τα οποία είναι βυθισμένα στο θρεπτικό μέσο. Η μέτρηση της αγωγιμότητας μπορεί να γίνει είτε άμεσα είτε έμμεσα. Στην άμεση μέτρηση, ένα ζεύγος μεταλλικών ηλεκτροδίων είναι βυθισμένο στο μέσο. Η μεταβολές στην αντίσταση και κατ' επέκταση στην αγωγιμότητα που προκαλούνται από τα μεταβολικά προϊόντα των μικροοργανισμών, παρακολουθούνται σε σχέση με το χρόνο. Στην έμμεση μέτρηση, τα ηλεκτρόδια εμβαπίζονται σε ξεχωριστό διάλυμα, συνήθως υδροξειδίου του καλίου. Το CO_2 που παράγεται κατά τον μεταβολισμό των μικροοργανισμών απορροφάται από το διάλυμα, του οποίου η αγωγιμότητα μειώνεται (Silly and Forsythe, 1996; Yang and Bashir, 2008).



Σχήμα 1.10.3.1. (A) Γενικευμένη καμπύλη αύξησης μικροοργανισμών, (B) Γραφική αναπαράσταση συσχέτισης χρόνου ανίχνευσης και συγκέντρωσης κυττάρων (Προσαρμοσμένο από [Yang and Bashir, 2008](#)).

Για να γίνει όμως αντιληπτή η αύξηση αυτή από το όργανο πρέπει ο μικροβιακός πληθυσμός στο θρεπτικό μέσο να φτάσει στα 6 - 7 log₁₀ CFU / ml. Ο χρόνος που απαιτείται για να αναπτυχθεί αυτός ο πληθυσμός και έτσι να παρατηρήσουμε μια μετρήσιμη αλλαγή στην αγωγιμότητα λέγεται *χρόνος ανίχνευσης* (Detection Time, T_{det}). Ο χρόνος ανίχνευσης είναι αντιστρόφως ανάλογος προς τη συγκέντρωση των μικροοργανισμών στο δείγμα. Συνεπώς, όσο υψηλότερο είναι το επίπεδο των μικροοργανισμών σε ένα τρόφιμο τόσο πιο σύντομος θα είναι ο χρόνος ανίχνευσης ([Σχήμα 1.10.3.1](#)). Συνοπτικά, οι παράγοντες που επιδρούν στο χρόνο ανίχνευσης είναι οι εξής ([Silley and Forsythe, 1996](#); [Yang and Bashir, 2008](#)):

- ✓ αρχικό φορτίο μικροοργανισμών
- ✓ χρόνος διπλασιασμού του μικροοργανισμού
- ✓ ο τύπος των ηλεκτροδίων
- ✓ η συγκέντρωση των ιόντων στο θρεπτικό υπόστρωμα
- ✓ θερμοκρασία επώασης.

Με την καταγραφή των χρόνων ανίχνευσης σε δείγματα με γνωστό μικροβιακό πληθυσμό δύναται η δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης οι οποίες συσχετίζουν τον χρόνο ανίχνευσης με το μικροβιακό πληθυσμό ([Σχήμα 3.3.1.B](#)). Από τη στιγμή που οι ηλεκτρικές μέθοδοι προσδιορίζουν άμεσα την μικροβιακή δραστηριότητα, ο χρόνος ανίχνευσης μπορεί να αποτελέσει πιο κατάλληλο μέγεθος για την εκτίμηση

της αλλοίωσης σε τρόφιμα από την μέθοδο των τρυβλίων (Silley and Forsythe, 1996; Yang and Bashir, 2008).

1.11 Αντικείμενο της μελέτης (*Objective of this study*)

Όπως προκύπτει από την βιβλιογραφία, οι τροφιμογενείς λοιμώξεις που προκαλούνται από διάφορα παθογόνα και κυρίως από το βακτήριο *L. monocytogenes*, το οποίο είναι ικανό να σχηματίζει βιοϋμένιο σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων και να επιμολύνει μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης τα τρόφιμα, αποτελούν σημαντικές αιτίες νοσηρότητας και θνησιμότητας σε παγκόσμιο επίπεδο. Αδιαμφισβήτητα, η προσκόλληση της *L. monocytogenes* σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, σε συδυασμό με την ικανότητά της να προσαρμόζεται σε περιβάλλοντα με χαμηλό pH, έχουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την βιομηχανία τροφίμων, δεδομένου ότι μπορεί να δημιουργηθούν σοβαροί κινδύνοι για την ασφάλεια των τροφίμων και συνεπώς, για την υγεία των καταναλωτών. Δεδομένου ότι η *L. monocytogenes* μπορεί να αντιμετωπίσει διάφορα εμπόδια (hurdles) σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων (π.χ. οξύτητα, απολυμαντικά, κλπ) είναι προφανές ότι οποιαδήποτε πιθανή θετική επιρροή οξέων ή χαμηλού pH στην επιβίωση, και αναπόφευκτα στην διαδικασία προσκόλλησης στις συγκεκριμένες επιφάνειες, αξίζει να μελετηθεί εκτενέστερα. Κατά συνέπεια, το αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της αντιβιοϋμενικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes*.

1.12 Σημαντικότητα μελέτης (*Significance of this study*)

Ο σχηματισμός, λοιπόν, των βιοϋμενίων σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων μπορεί να προκαλέσει σημαντικές επιπτώσεις στην υγεία των καταναλωτών, μέσω διασταυρούμενης επιμόλυνσης. Τα αποτελέσματα, επομένως, αυτής της μελέτης είναι πολύ σημαντικά διότι συμβάλλουν στην καλύτερη κατανόηση του σχηματισμού βιοϋμενίων από τα στελέχη *L. monocytogenes*, ενώ μελετάται για πρώτη φορά το μηλεϊνικό οξύ κατά τον σχηματισμό, αλλά και κατά την απολύμανση των βιοϋμενίων του συγκεκριμένου παθογόνου.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1 Προετοιμασία θρεπτικών υλικών και απολυμαντικών

- Brain - Heart Infusion Broth, BHI broth (LAB049, Lab M International Diagnostics Group, Bury, Lancashire, United Kingdom)

Το BHI είναι ένα πλούσιο, ισοτονικό θρεπτικό μέσο με τρυπτόζη (μίγμα πεπτονών κρέατος και γάλακτος). Η πεπτόνη πρωτεόζης και τα εκχυλίσματα από εγκέφαλο και καρδιά βοοειδών χρησιμεύουν ως πηγή άνθρακα, αζώτου, αμινοξέων και βιταμινών. Η γλυκόζη, σε χαμηλή συγκέντρωση, χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας, το όξινο φωσφορικό δινάτριο χρησιμεύει ως ρυθμιστής του θρεπτικού μέσου και το χλωριούχο νάτριο συμβάλλει στην οσμωτική ρύθμιση των κυττάρων.

Συστατικά: g / 1000 ml

Brain - Heart infusion Mixture	17.5
Tryptose	10.0
Glucose	2.0
Sodium Chloride	5.0
Disodium Hydrogen Phosphate	2.5

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 37.0 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min. Το τελικό pH ήταν 7.4 ± 0.2 .

- Brain - Heart Infusion Agar, BHI Agar (LAB048, Lab M International Diagnostics Group, Bury, Lancashire, United Kingdom)

Είναι ένα γενικό θρεπτικό μέσο ανάπτυξης μικροοργανισμών. Το συγκεκριμένο θρεπτικό μέσο χρησιμοποιήθηκε, πρώτη φορά, για την απομόνωση παθογόνων μικροοργανισμών οδοντιατρικής φύσεως. Το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων βοηθά στην εξουδετέρωση των οξέων που παράγονται μετά τον καταβολισμό της γλυκόζης και διατηρεί τα κύτταρα βιώσιμα.

Συστατικά: g / 1000 ml

Brain - Heart infusion Mixture	17.5
Tryptose	10.0
Glucose	2.0
Sodium Chloride	5.0
Disodium Hydrogen Phosphate	2.5
Agar N° 2	12

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 49.0 g θρεπτικού υλικού σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min, αφέθηκε σε υδατόλουτρο και τελικώς πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της ενσωμάτωσης του θρεπτικού (pour plate), όπου μικρή ποσότητα (15 - 20 ml) μοιράστηκε εξίσου σε τρυβλία Petri. Το τελικό pH ήταν 7.4 ± 0.2 .

- Διάλυμα ¼ strength Ringer (Ringer's tablets; LAB100Z, Lab M International Diagnostics Group, Bury, Lancashire, United Kingdom)

Το διάλυμα ¼ strength Ringer είναι ένα ισοτονικό, ωσμωρυθμιστικό διάλυμα παρασκευής δεκαδικών διαδοχικών αραιώσεων, το οποίο χρησιμοποιείται για την μικροβιολογική ανάλυση τροφίμων.

Συστατικά: 2.5 g / 1000 ml

Sodium Chloride	2.25
Potassium Chloride	0.105
Calcium Chloride	0.12
Sodium Bicarbonate	0.05

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 2 δισκία σε 1000 ml απιονισμένου νερού. Το υλικό ανακινήθηκε σε επαγωγική εστία μέχρι να ομογενοποιηθεί και στη συνέχεια αποστειρώθηκε σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min.

- Διαλύματα μηλεϊνικού οξέως για τον σχηματισμό βιοϋμενίων σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου (Maleic acid; Sigma-Aldrich, Life Science Chemilab SA, Athens, Greece)

Παρασκευάστηκαν τρεις συγκεντρώσεις διαλυμάτων μηλεϊνικού οξέως: $C_1 = 3$ mM, $C_2 = 10$ mM και $C_3 = 50$ mM.

Στα 1000 ml διαλύματος ζωμού BHI ζυγίσθηκαν και προστέθηκαν 0.350 g, 1.161 g και 5.804 g λευκής σκόνης μηλεϊνικού οξέως και οι φιάλες αποστειρώθηκαν σε αυτόκαυστο στους 121 °C για 15 min. Σε κάθε περίπτωση το pH του θρεπτικού μέσου ρυθμιζόταν είτε με 10 N HCl είτε με 10 N NaOH.

- Διαλύματα μηλεϊνικού οξέως για την απολύμανση βιοϋμενίων (Maleic acid; Sigma-Aldrich, Life Science Chemilab SA, Athens, Greece)

Παρασκευάστηκαν δέκα συγκεντρώσεις μηλεϊνικού οξέως για την δοκιμασία της απολύμανσης των ώριμων βιοϋμενίων των επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes*. Κάθε συγκέντρωση απολυμαντικού παρασκευάστηκε προσθέτοντας σε μια φιάλη την αντίστοιχη μάζα λευκής σκόνης μηλεϊνικού οξέως σε 1000 ml απιονισμένου νερού, οι οποίες αφέθηκαν να διαλυτοποιηθούν με ανάδευση, μετρήθηκε το pH (pH Russell RL 150 [Fife, Scotland]) και τέλος αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 min. Ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε ήταν διάλυμα ¼ strength Ringer (**Πίνακας 2.1.1**).

Πίνακας 2.1.1. Συγκεντρώσεις μηλεϊνικού οξέως που χρησιμοποιήθηκαν για την απολύμανση των βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes*.

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (mM)	g / 1000 ml ΑΠΙΟΝΙΣΜΕΝΟΥ ΝΕΡΟΥ	pH
500	58.036	1.20
300	34.822	1.51
100	11.607	1.79
70	8.125	1.89
50	5.804	2.01
40	5.642	2.04
30	3.482	2.14
20	2.321	2.26
10	1.161	2.42
0 (control, ¼ strength Ringer)	-	6.80 - 7.10

- Dey - Engley Neutralizing Broth (Sigma-Aldrich, Life Science Chemilab SA, Athens, Greece)

Ο συγκεκριμένος ζωμός χρησιμοποιείται σε δοκιμασίες απολύμανσης, όπου η εξουδετέρωση αντισηπτικών και απολυμαντικών ουσιών είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της βακτηριοκτόνου δράσεώς τους. Εξουδετερώνει ένα ευρύ φάσμα απολυμαντικών ουσιών, συμπεριλαμβανομένων των ενώσεων τεταρτογενούς αμμωνίου, των φαινολικών, των ιωδιούχων, του χλωρίου, των υδραργυρικών, της φορμαλδεΰδης, της γλουταραλδεΰδης, κá. Το θειογλυκολικό νάτριο, το θειοθειικό νάτριο, το όξινο θειώδες νάτριο, η λεκιθίνη σόγιας και το πολυσορβικό 80 δρουν ως εξουδετερωτικά συστατικά

Συστατικά: g / 1000 ml

Casein Enzymic Hydrolysate	5.0
Yeast Extract	2.5
Dextrose	10.0
Sodium Thiosulphate	6.0
Sodium Thioglycollate	1.0
Sodium Bisulphite	2.5
Lecithin	7.0
Polysorbate 80	5.0
Bromo Cresol Purple	0.02

Διαδικασία παρασκευής:

Σε μια φιάλη ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 39 g Dey - Engley Neutralizing Broth σε 1000 ml απιονισμένου νερού, πραγματοποιήθηκε ανάδευση με θέρμανση, έτσι ώστε το υλικό να ομογενοποιηθεί, μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου και αποστειρώθηκε στους 121 °C για 15 min.

2.2 Βακτηριακά στελέχη και προετοιμασία εμβολίου

Πριν από τη χρήση, όλοι οι μικροοργανισμοί φυλάσσονταν υπό συνθήκες κατάψυξης (- 80 °C και - 20 °C), σε φιαλίδια σφαιριδίων (Protect; Technical Service Consultants, Ltd, Heywood, Lancashire, United Kingdom) και σε φιαλίδια που περιείχαν ζωμό BHI + 25 % γλυκερόλη, αντίστοιχα, ενώ για την αναγέννησή τους 100 μl από κάθε στέλεχος προστέθηκαν σε 10 ml θρεπτικού ζωμού BHI και επωάστηκαν στους 30 °C για 24 h, ενώ πραγματοποιήθηκε και δεύτερη ανανέωση με προσθήκη 100 μl εμβολίου σε 10 ml θρεπτικού ζωμού BHI και τα δείγματα επωάστηκαν για 18 - 24 h.

Στη συνέχεια, τα κύτταρα από την δεύτερη ανανέωση συλλέχθηκαν με τη μέθοδο της φυγοκέντρισης (5000 g / 10 min / 4 °C), εκπλύθηκαν εις διπλούν με διάλυμα ¼ strength Ringer και τελικά επαναωρήθηκαν ως καθαρές καλλιέργειες σε 10 ml του ίδιου διαλύματος (10^8 - 10^9 CFU / ml). Έπειτα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις των καλλιεργειών σε αποστειρωμένο διάλυμα ¼ strength Ringer, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως εμβόλιο (10^5 - 10^6 CFU / ml) για τις δοκιμασίες ανάπτυξης των βιοϋμενίων σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα.

Τα βακτηριακά στελέχη *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη αυτή παρατίθενται στον **Πίνακα 2.2.1**. Τα συγκεκριμένα στελέχη προμηθεύτηκαν από την Τράπεζα Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, της Σχολής Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας και Ανάπτυξης, του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 2.2.1. Βακτηριακά στελέχη *L. monocytogenes* που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια της μελέτης.

Συλλογή	Καλλιιεργειών	Μικροβιολογίας	Τροφίμων	(FMCC)	Περιγραφή	(Description)	Προσδιορισμός	(Designation)	Άλλες	συλλογές	(Other	collections)	Ιστορικό	(History)	Απομόνωση	(Isolation)	Ορότυπος	(Genotype)	Αναφορές	(References)	
B-124	<i>Listeria monocytogenes</i>	(Murray <i>et al.</i>)	Pirie	NCTC 10527	[1071/53, LMG	21264, ATCC	13932]	-	E. Drosinos	Νωτιαίο υγρό	παιδιού με	μηνιγγίτιδα,	Γερμανία	(spinal fluid of	child with	meningitis,	Germany)	serotype 4b	Microbiology of food and animal feeding stuffs--Guidelines on preparation and production of culture media-- Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media.. Geneva (Switzerland):International Organization for Standardization/ANSI;ISO ISO 11133-2:2003.	Microbiology of food and animal feeding stuffs --- Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i> --- Part 1: Detection method, Annex B [BS 5763-18:1997]. London, UK:British Standards Institution;British Standard BS EN ISO 11290-1:1997.	Microbiology of food and animal feeding stuffs --- Guidelines on preparation and production of culture media -- - Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media - Annex B: Recommended test microorganisms for commonly used culture media. London, UK:British Standards Institution;British Standard DD CEN ISO/TS 11133:2003

B-125	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i>) Pirie	Scott A	-	E. Smid, ATO-DLO, The Netherlands	Κλινικά, Άνθρωπος, Επιδερμικό στέλεχος (Clinical, human isolation, epidermic strain)	serotype 4b	Chorianopoulos <i>et al.</i>, (2008) . Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of <i>Satureja thymbra</i> and comparison with standard acid-base sanitizers. Journal of Applied Microbiology 104. 1586-1596
B-126	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i>) Pirie	FMCC B-126	-	-	-	-	-
B-127	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i>) Pirie	21075	-	Συλλογή κρήτης (Cretan collection)	Σαλάτα κοτόπουλο (chicken salad)	-	-
B-129	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i>) Pirie	21350	-	Συλλογή κρήτης (Cretan collection)	Έτοιμος προς κατανάλωση κατεψυγμένος κιμάς (RTE frozen meal, mince meat based)	-	-

B-130	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i>) Pirie	21373	-	Συλλογή κρήτης (Cretan collection)	Έτοιμο προς κατανάλωση γεύμα, τυρί (RTE frozen meal, cheese)	-	-
B-133	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i>) Pirie	21736	-	Συλλογή κρήτης (Cretan collection)	Μαλακό τυρί (soft cheese)	-	-
B-157	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i>) Pirie	23 UD	DSA, Italy	L. Cocolin	Βιομηχανικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Food processing plant)	-	Cocolin <i>et al.</i>, (2005) . Analysis of PCR-based methods for characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> strains isolated from different sources. International Journal of Food Microbiology103. 167 – 178.
B-164	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray <i>et al.</i>) Pirie	8 UD	DSA, Italy	L. Cocolin	- -	-	Cocolin <i>et al.</i>, (2005) . Analysis of PCR-based methods for characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> strains isolated from different sources. International Journal of Food Microbiology103. 167 – 178.

B-165	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray et al.) Pirie	7 UD	DSA, Italy	L. Cocolin	- -	-	Cocolin et al., (2005) . Analysis of PCR-based methods for characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> strains isolated from different sources. International Journal of Food Microbiology103. 167 – 178.
B-166	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray et al.) Pirie	6 UD	DSA, Italy	L. Cocolin	- -	-	Cocolin et al., (2005) . Analysis of PCR-based methods for characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> strains isolated from different sources. International Journal of Food Microbiology103. 167 – 178.
B-169	<i>Listeria monocytogenes</i> (Murray et al.) Pirie	2 UD	DSA, Italy	L. Cocolin	- -	-	Cocolin et al., (2005) . Analysis of PCR-based methods for characterization of <i>Listeria monocytogenes</i> strains isolated from different sources. International Journal of Food Microbiology103. 167 – 178.

B-411	<i>Listeria monocytogenes</i>	H 7550	-	S. Kathariou	1998 – 1999 Περιστατικό με hot – dog, γονικό στέλεχος (hot – dog outbreak, parental strain)	-	-
B-454	<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 13932	-	NAGREF - ITAP	-	-	-

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

FMCC : Food Microbiology Culture Collection of the Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Agricultural University of Athens, Greece.

NCTC : National Collection of Type Cultures

ATCC : American Type Culture Collection

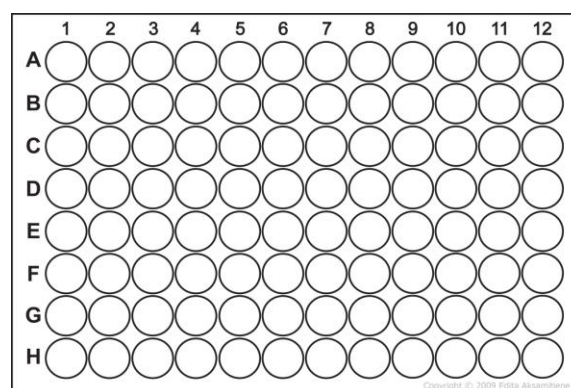
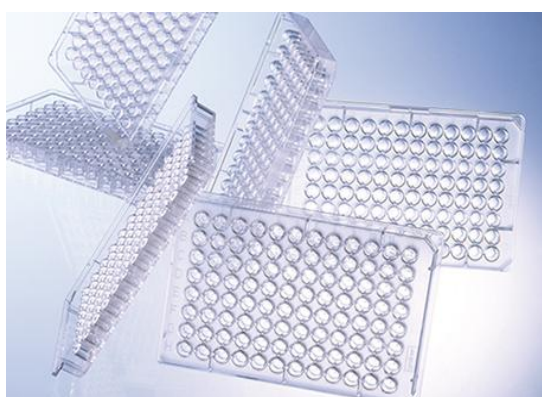
ATO-DLO : Agrotechnological Research Institute, Wageningen, Netherlands

DSA : Collection of the Dipartimento di Scienze Degli Alimenti, Università, Degli Studi di Udine, Italy

2.3 Σχηματισμός βιοϋμενίων στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου 14 στελεχών *L. monocytogenes* (Πίνακας 2.2.1), ως μονοκαλλιέργειες, μελετήθηκε σε θρεπτικό ζωμό BHI με τιμές pH 3, 5 και 7 (ρύθμιση με 10 N HCl, pH Russell RL 150 [Fife, Scotland]), εντός μικροσυστοιχιών πολυστυρενίου, χρησιμοποιώντας μέθοδο η οποία έχει περιγραφεί και χρησιμοποιηθεί εκτενώς στην επιστημονική βιβλιογραφία (Agarwal *et al.*, 2011; Lianou and Koutsoumanis, 2012; Stepanović *et al.*, 2000, 2004, 2007), με μερικές τροποποιήσεις.

Πιο συγκεκριμένα, 180 μl θρεπτικού ζωμού BHI με pH 3, 5 και 7 (ρύθμιση με 10 N HCl) μεταφέρθηκαν ασηπτικά στα βοθρία αποστειρωμένων μικροσυστοιχιών 96 θέσεων (96-well polystyrene microtiter plates, N° 655180, Greiner, Bio-One, CELLSTAR, BioLine Scientific, Athens, Greece) (Εικόνα 2.3.1) και στη συνέχεια προστέθηκαν 20 μl βακτηριακών εναιωρημάτων των στελεχών του παθογόνου (10^8 - 10^9 CFU / ml), μετά από καλλιέργεια σε θρεπτικό ζωμό BHI και οι μικροσυστοιχίες αφήθηκαν για επώαση στους 15 και 30 °C για 48 h. Κάθε στέλεχος εξετάστηκε σε 4 επαναλήψεις (n = 4) επαναλήψεις, ενώ στο πείραμα περιλαμβάνονταν και τα δείγματα-μάρτυρες που περιείχαν μόνο θρεπτικό μέσο στα αντίστοιχα pH.



Εικόνα 2.3.1. Μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου 96 θέσεων.

(<https://shop.gbo.com/en/row/products/bioscience/microplates/96-well-microplates/>)

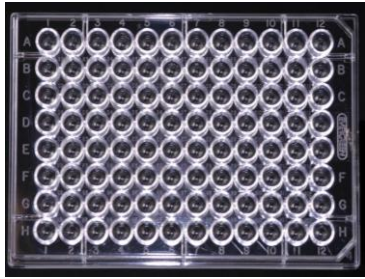
Μετά την επώαση και υπό ασηπτικές συνθήκες το θρεπτικό μέσο απομακρύνθηκε με τη βοήθεια πολυκάναλης πιπέτας και στη συνέχεια προστέθηκαν 200 µl αποστειρωμένου διαλύματος $\frac{1}{4}$ strength Ringer και οι μικροσυστοιχίες τοποθετήθηκαν σε συσκευή ήπιας ανάδευσης (IKA KS 30 basic shaker, Sigma-Aldrich, Life Science Chemilab SA, Athens, Greece, www.ika.com) για 5 min στα 320 mot, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα.

Στη συνέχεια, το ισοτονικό διάλυμα απομακρύνθηκε και προστέθηκαν 200 µl μεθανόλης CH₃OH 99.9 % (Sigma-Aldrich, Life Science Chemilab SA, Athens, Greece) και οι μικροσυστοιχίες αφέθηκαν σε ηρεμία για 15 min, έτσι ώστε να θανατωθούν τα εναπομείναντα πλαγκτονικά κύτταρα (προσήλωση βακτηριακών κυττάρων). Έπειτα, η μεθανόλη απομακρύνθηκε και οι μικροσυστοιχίες αφέθηκαν για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εξατμισθεί η περίσσεια της αλκοόλης.

Κατόπιν, προστέθηκαν 200 µl διαλύματος κρυσταλλικού ιώδους (C₂₅H₃₀Cl N₃, Tris [4 - {dimethylamino} phenyl] methylumchloride, Merck, Darmstadt, Germany) \geq 90.0 % (1 % w/v) και οι μικροσυστοιχίες αφέθηκαν σε ηρεμία για 45 min σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την αφαίρεση της χρωστικής, πραγματοποιήθηκε έκπλυση, εις τριπλούν, με απιονισμένο νερό και οι μικροσυστοιχίες αφέθηκαν σε ηρεμία για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να εξατμισθεί η περίσσεια του νερού.

Τέλος, προστέθηκαν 200 µl αιθανόλης CH₃CH₂OH 100 % (Merck, Darmstadt, Germany) και πραγματοποιήθηκε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας στα 580 nm, μετά από ήπια ανάδευση για 10 sec σε συσκευή Multi Detection microplate Reader Synergy HT (BioTek, Highland Park, Winoosky, Vermont, USA) (**Εικόνα 2.3.2**).

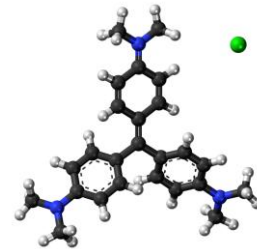
Η παραπάνω μεθοδολογία χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί, επίσης, και η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων μηλεϊνικού οξέως: 3, 10 και 50 mM. Το pH του ζωμού, σε αυτήν την περίπτωση, προσαρμόστηκε στις τιμές 5 και 7, χρησιμοποιώντας, ανάλογα με τη συγκέντρωση του οργανικού οξέως, είτε διάλυμα HCl (10 N) ή διάλυμα NaOH (10 N).



Μικροσυστοιχίες 96 θέσεων



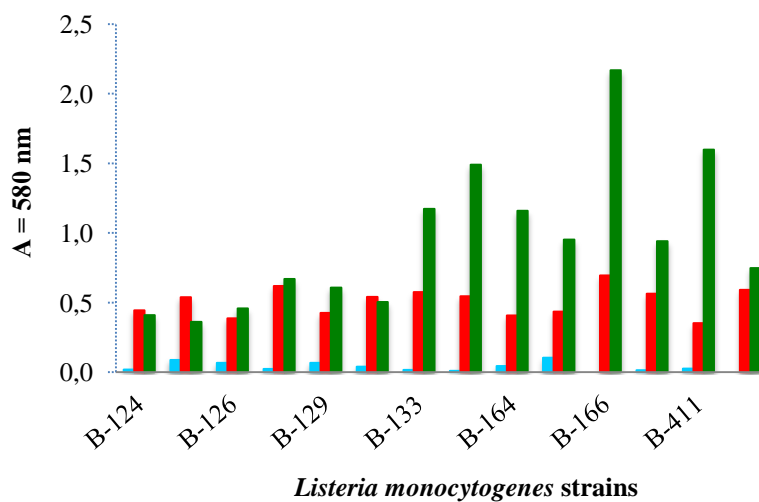
Προσθήκη θρεπτικού μέσου και ενοφθαλμισμός
βακτηριακών εναιωρημάτων



Χρώση με διάλυμα
κρυσταλλικού ιώδους



Μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD)



Εικόνα 2.3.2. Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας σχηματισμού βιοϋμενίων και ποσοτικού προσδιορισμού αυτών σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου.

2.4 Σχηματισμός βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξειδώτου χάλυβα

2.4.1 Σχηματισμός

Πλακίδια ανοξειδώτου χάλυβα (Stainless steel coupons, AISI-304; Halyvourgiki, Inc., Athens, Greece), διαστάσεων $3 \times 0.8 \times 0.1$ cm ($E = 5.56$ cm²) και γυάλινα σφαιρίδια (glass beads) διαμέτρου $d = 3$ mm, εμβαπτίσθηκαν σε εμπορικό απορρυπαντικό RBS 35 (2 % v/v) (Fluka, Life Science Chemilab SA, Athens, Greece) για 24 h, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν ακαθαρσίες. Έπειτα, εκπλύθηκαν με άφθονο τρεχούμενο νερό και στη συνέχεια με απιονισμένο, ενώ εμβαπτίσθηκαν και σε ακετόνη για επιπλέον καθαρισμό. Αργότερα, και αφού εκπλύθηκαν καλά με τρεχούμενο νερό και στη συνέχεια με απιονισμένο, τοποθετήθηκαν στον ξηραντήρα για να απομακρυνθεί η περίσσεια υγρασίας. Τέλος, τα πλακίδια τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 5 ml ζωμού BHI (pH 5, 7 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0, 50 mM) (η ρύθμιση του pH πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας διαλύματα 10 N HCl ή 10 N NaOH) και τα γυάλινα σφαιρίδια σε δοκιμαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου με 6 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ strength Ringer και αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 min.

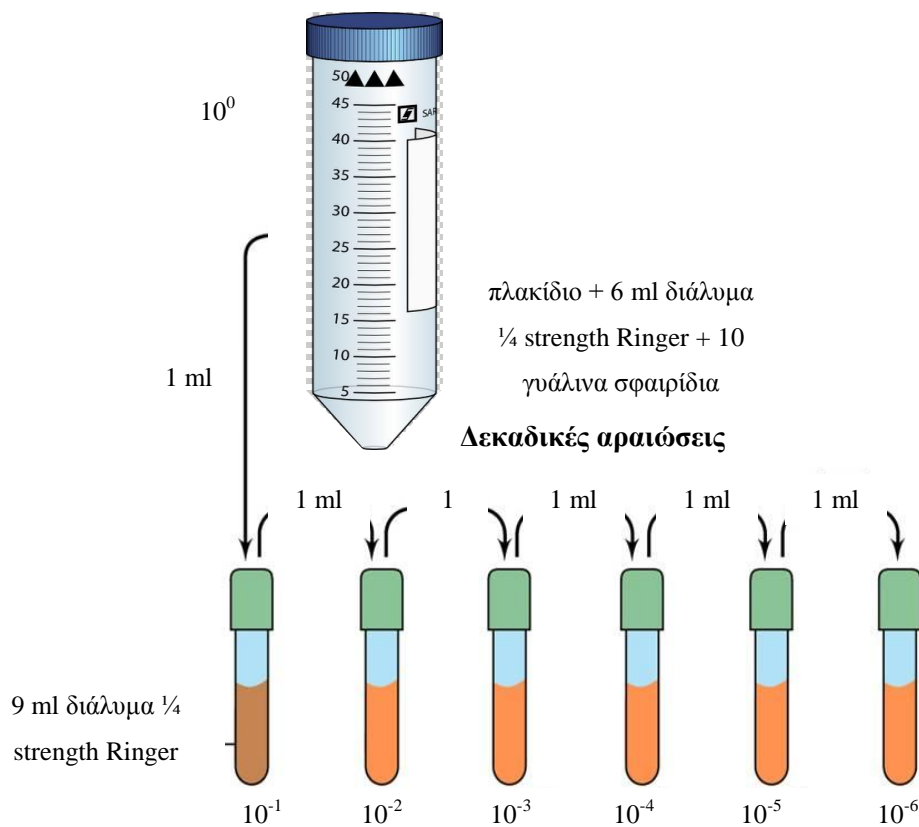
Αρχικά, παραλήφθηκαν καθαρές καλλιέργειες των επιλεγμένων στελεχών (B-169 και B-454) *L. monocytogenes* μετά από φυγοκέντριση των κυττάρων, με τη μέθοδο που περιγράφεται στην Ενότητα 2.1.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε εμβολιασμός των δοκιμαστικών σωλήνων που περιείχαν 5 ml αποστειρωμένου ζωμού BHI και ένα πλακίδιο (pH 5, 7 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0, 50 mM) με 0.1 ml βακτηριακών εναιωρημάτων ($10^5 - 10^6$ CFU / ml) και τα δείγματα επωάστηκαν για 144 h στους 15 °C (Ο ζωμός BHI ανανεωνόταν κάθε 48 h, μετά από έκπλυση των επιφανειών των πλακιδίων με 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος $\frac{1}{4}$ strength Ringer σε κάθε πλευρά).

2.4.2 Ποσοτικοποίηση με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (*Bead Vortexing*)

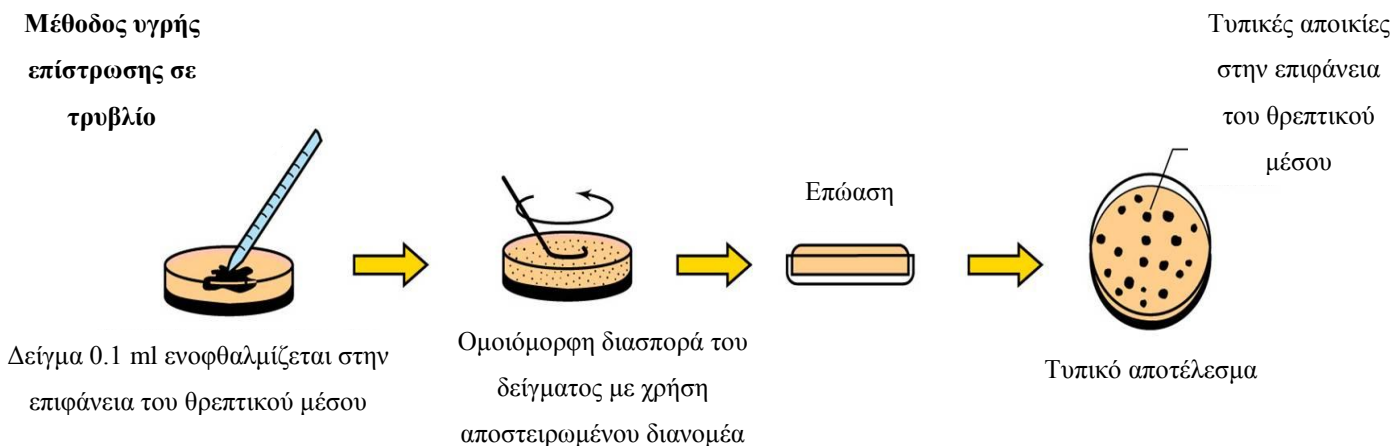
Για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί στην επιφάνεια των πλακιδίων, μετά από 3 h, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία (n = 6), σύμφωνα με τους [Giaouris and Nychas, \(2006\)](#). Αρχικά, έγινε παραλαβή των πλακιδίων από τον ζωμό BHI με αποστειρωμένη λαβίδα τα οποία, αφού εκπλύθηκαν με 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος ¼ strength Ringer σε κάθε πλευρά έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα, τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου που περιείχαν 6 ml αποστειρωμένου διαλύματος ¼ strength Ringer και 10 γυάλινα σφαιρίδια. Έπειτα, ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή Vortex για 2 min με σκοπό να αποκολληθούν τα προσκολλημένα κύτταρα, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις ([Εικόνα 2.4.2](#)) και ακολούθησε ενοφθαλμισμός 0.1 ml βακτηριακού εναιωρήματος κατάλληλης διαδοχικής δεκαδικής αραιώσης και επιφανειακή εξάπλωση σε θρεπτικό μέσο BHI άγαρ ([Εικόνα 2.4.3](#)).

Η παραπάνω διαδικασία (Ενότητα 2.4.2) επαναλήφθηκε μετά από 24, 72 και 144 h επώασης.



Εικόνα 2.4.2. Διαδικασία μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας των βακτηρίων με την εφαρμογή σειράς διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων του δείγματος (Προσαρμοσμένο από Madigan *et al.*, 2007).

Οι βιοϋμενικοί πληθυσμοί των επιλεγμένων στελεχών (B-169 και B-454) *L. monocytogenes* απαριθμήθηκαν και προσδιορίστηκαν μετά από επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για 48 h (**Εικόνα 2.4.3**).



Εικόνα 2.4.3. Μέθοδος μέτρησης του δείκτη βιωσιμότητας βακτηρίων με καταμέτρηση αποικιών επί τρυβλίου (Προσαρμοσμένο από [Madigan et al., 2007](#)).

2.5 Απολύμανση βιοϋμενίων με τη χρήση μηλεϊνικού οξέως

2.5.1 Διαδικασία απολύμανσης

Μετά από 144 h και αφού τα βιοϋμένια είχαν σχηματισθεί πλήρως (ώριμα βιοϋμένια), ακολούθησε η απολύμανση με μηλεϊνικό οξύ ([Giaouris and Nychas, 2006](#)).

Αρχικά, έγινε παραλαβή των πλακιδίων από τον ζωμό BHI με αποστειρωμένη λαβίδα, εκπλύθηκαν με 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος $\frac{1}{4}$ strength Ringer σε κάθε πλευρά, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα, και έπειτα τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου που περιείχαν 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος μηλεϊνικού οξέως, συγκεντρώσεων 500, 300, 100, 70, 50, 40, 30, 20, 10 και 0 mM. Μετά την πάροδο 5 min, τα πλακίδια αφαιρέθηκαν από το απολυμαντικό και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου που περιείχαν 6 ml αποστειρωμένου Dey - Engley Neutralizing Broth για να σταματήσει η δράση του απολυμαντικού.

2.5.2 Αξιολόγηση απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* με χρήση αναλυτή μικροβιολογικής αύξησης (*Malthus microbiological growth analyser*)

Αρχικά, έγινε παραλαβή των πλακιδίων από το Dey - Engley Neutralizing Broth, ακολούθησε έκπλυση με 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος ¼ strength Ringer σε κάθε πλευρά και ακολούθως τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια Malthus (+ δύο πλατινένια ηλεκτρόδια) που περιείχαν 5 ml αποστειρωμένου ζωμού BHI. Στη συνέχεια, τα φιαλίδια τοποθετήθηκαν σε κατάλληλα διαμορφωμένες θέσεις του μηχανήματος (Malthus 2000 instrument, Radiometer International, Copenhagen, Denmark), οι οποίες βρίσκονταν σε υδατόλουτρο, για επώαση στους 30 °C για 48 h. Οι μετρήσεις αγωγιμότητας λαμβάνονταν αυτόματα κάθε 6 min και αφορούσαν τις αλλαγές στην αγωγιμότητα του θρεπτικού μέσου, οι οποίες προκαλούνταν από τη βακτηριακή μεταβολική δραστηριότητα (π.χ. παραγωγή μεταβολικών ιόντων). Επίσης, κατά την μικροβιακή αύξηση, μη φορτισμένα ή ασθενώς φορτισμένα μεταβολικά προϊόντα, όπως πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, μετατρέπονται (μεταβολίζονται) σε ισχυρά φορτισμένα τελικά προϊόντα (π.χ. αμινοξέα, κτλ) τα οποία αυξάνουν την αγωγιμότητα του θρεπτικού μέσου (Silley and Forsythe, 1996). Μετά το πέρας των 48 h, λήφθηκαν τα δεδομένα, δηλαδή ο χρόνος ανίχνευσης [Detection Time (h)] και η αγωγιμότητα [Conductance (μS)]. Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα (n = 5) για τις συγκεντρώσεις 500, 300, 100, 50, 10, 0 mM και ένα ανεξάρτητο πείραμα (n = 6) για τις συγκεντρώσεις 70, 50, 30, 0 mM.

2.5.3 Αξιολόγηση απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (*Bead Vortexing*)

Μετά την πάροδο 5 min, τα πλακίδια αφαιρέθηκαν από το απολυμαντικό (συγκεντρώσεων 40, 30, 20, 10 και 0 mM), τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες φυγοκέντρου που περιείχαν 6 ml αποστειρωμένου Dey - Engley Neutralizing Broth και 10 γυάλινα σφαιρίδια για να σταματήσει η δράση του απολυμαντικού και ακολούθησε ανάδευση σε συσκευή Vortex για 2 min με σκοπό να αποκολληθούν τα εναπομείναντα προσκολλημένα κύτταρα του βιοϋμενίου. Έπειτα,

πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις, όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.4.2 (Εικόνα 2.4.2) και ακολούθησε ενοφθαλμισμός και επιφανειακή επίστρωση 0.1 ml βακτηριακού εναιωρήματος σε θρεπτικό μέσο BHI άγαρ (Εικόνα 2.4.3) (Giaouris and Nychas, 2006).

Η απαρίθμηση των επιβιώσαντων βιοϋμενικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε μετά από επώαση των τρυβλίων στους 30 °C για συνολικά 72 h (Εικόνα 2.4.3).

2.6 Στατιστική Ανάλυση (*Statistical analysis*)

Πραγματοποιήθηκαν δύο ανεξάρτητα πειράματα σχηματισμού με τρεις επαναλήψεις ($n = 6$) και ένα πείραμα απολύμανσης με τέσσερις επαναλήψεις ($n = 4$). Οι μικροβιολογικές απαριθμήσεις, τόσο για τον σχηματισμό των βιοϋμενίων όσο και για την απολύμανση αυτών, μετατράπηκαν σε λογάριθμους πριν υπολογισθούν οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις. Όλα τα δεδομένα αναλύθηκαν με την ανάλυση διακύμανσης, παραλλακτικότητας ή διασποράς (ANOVA), ως παραγοντικά πειράματα, χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα JMP Statistics and Graphics Guide, Release 7, Copyright © 2007 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Για να γίνει σύγκριση μέσων όρων χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή πολλαπλής εμβέλειας (Tukey's test), ενώ όλες οι διαφορές αναφέρονται σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha = 0.05$.



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



3.1 Σχηματισμός βιοϋμενίων στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου

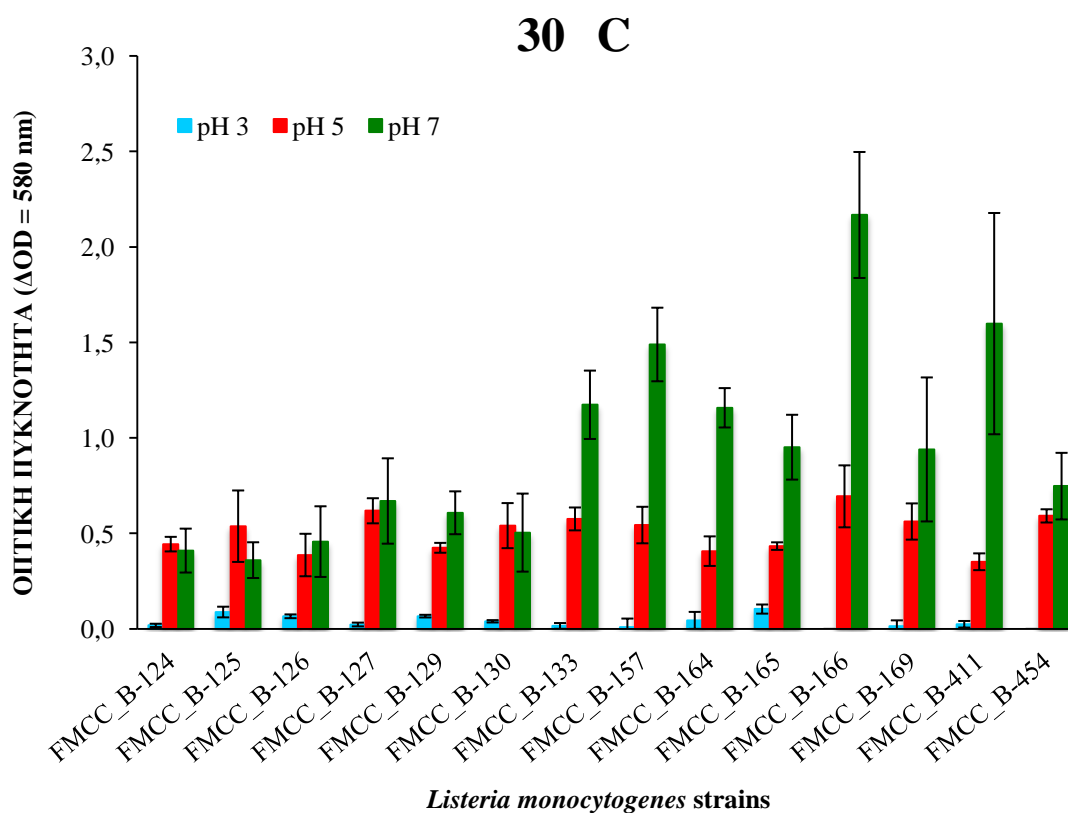
Η δοκιμασία μέτρησης της οπτικής πυκνότητας, μέσω της χρώσης με κρυσταλλικό ιώδες, είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος με αναπαραγώγιμα αποτελέσματα που επιτρέπει τη μελέτη μεγάλου αριθμού στελεχών βακτηρίων σε διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίων. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε μια δοκιμασία ελέγχου (screening) για να διαπιστωθεί η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων παρουσία διαφόρων περιβαλλοντικών παραμέτρων, όπως το pH, η θερμοκρασία, καθώς και η παρουσία ή η απουσία μηλεϊνικού οξέως. Η δοκιμασία αυτή πραγματοποιήθηκε, αφενώς για να διερευνηθεί η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων στις συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες και αφετέρου, για να επιλεγούν τα κατάλληλα στελέχη του μικροοργανισμού για τις πειραματικές δικιμές οι οποίες ακολούθησαν.

3.1.1 Σχηματισμός βιοϋμενίου σε διαφορετικά Ph

Οι μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις της οπτικής πυκνότητας ($\Delta OD = 580 \text{ nm}$) για κάθε στέλεχος *L. monocytogenes* και για κάθε περιβαλλοντική συνθήκη παρουσιάζονται στα **Σχήματα 3.1.1.1** και **3.1.1.2 (Πίνακας Α)**.

Ξεκινώντας από τα αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν στους $30 \text{ }^\circ\text{C}$, το εύρος της οπτικής πυκνότητας, για το pH 3, ήταν από 0.00 έως 0.10 ± 0.02 . Παρατηρούμε ότι στο συγκεκριμένο pH κανένα από τα εξεταζόμενα στελέχη δεν επέδειξε σημαντική ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Για το pH 5, το εύρος της οπτικής πυκνότητας κυμάνθηκε από 0.35 ± 0.04 έως 0.69 ± 0.16 , ενώ όλα τα εξεταζόμενα στελέχη σχημάτισαν μέτριο βιοϋμένιο. Τέλος, για το pH 7, το εύρος της οπτικής πυκνότητας κυμάνθηκε από 0.36 ± 0.09 έως 2.17 ± 0.33 . Σε αυτή την περίπτωση, όλα τα στελέχη σχημάτισαν το υψηλότερο βιοϋμένιο, ειδικά τα στελέχη B-166 και B-411. Επίσης, είναι σημαντικό να αναφέρουμε, ότι η επίδραση του pH στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου φάνηκε να είναι εξαρτώμενη στελεχούς. Ενδεικτικά, αναφέρουμε ότι το

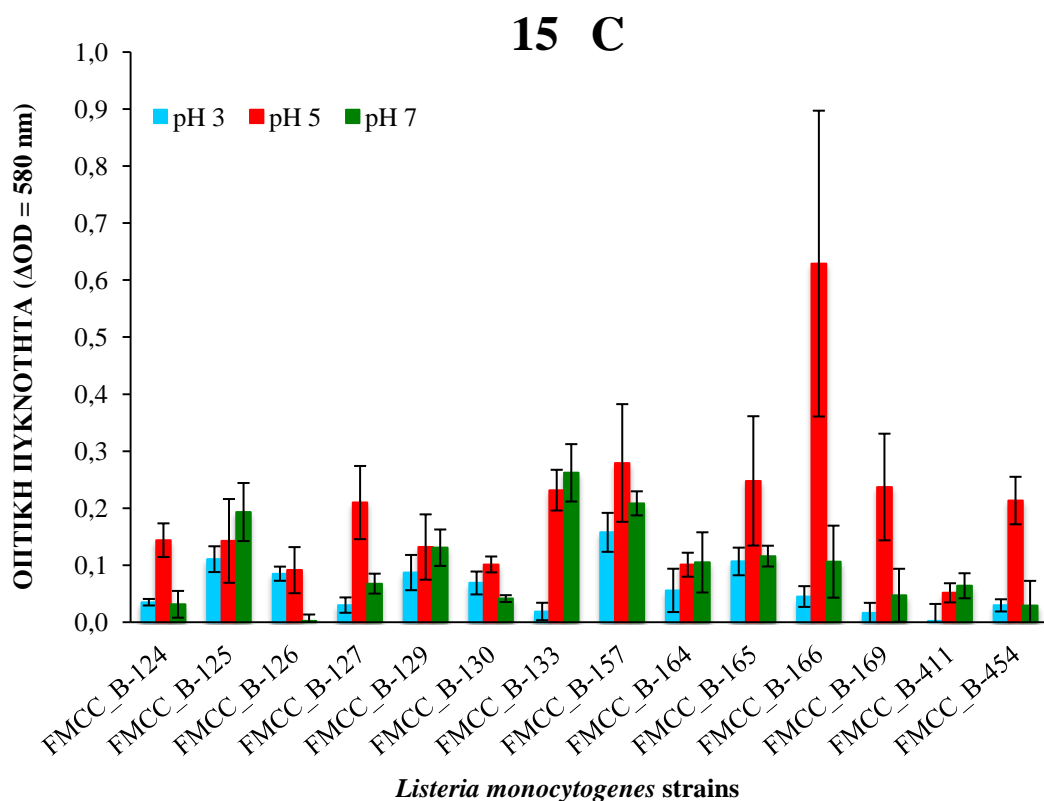
στέλεχος B-125 επέδειξε μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου στο pH 5 σε σχέση με το pH 7.



Σχήμα 3.1.1.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου σε pH 3, 5 και 7, στους 30 °C. Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 4).

Περνώντας στα αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν στους 15 °C, το εύρος της οπτικής πυκνότητας, για το pH 3, ήταν από 0.00 έως 0.16 ± 0.03 . Και σε αυτή την περίπτωση, τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα στελέχη φάνηκε να έχουν αμελητέα ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε αυτή την χαμηλή τιμή pH, με εξαίρεση τα στελέχη B-125, B-129 και B-165, τα οποία σχημάτισαν βιοϋμένιο σε μικρή έκταση, ενώ το στέλεχος B-157 παρουσίασε τη μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου στο συγκεκριμένο pH. Για το pH 5, το εύρος της οπτικής πυκνότητας κυμάνθηκε από 0.05 ± 0.02 έως 0.63 ± 0.27 . Τη μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου επέδειξαν τα στελέχη B-157 και B-166. Τέλος, για το pH 7, το εύρος της οπτικής πυκνότητας κυμάνθηκε από 0.00 έως 0.26 ± 0.05 . Σε αντίθεση με τις παρατηρήσεις που είχαν γίνει στους 30 °C, στη χαμηλότερη (και περισσότερο

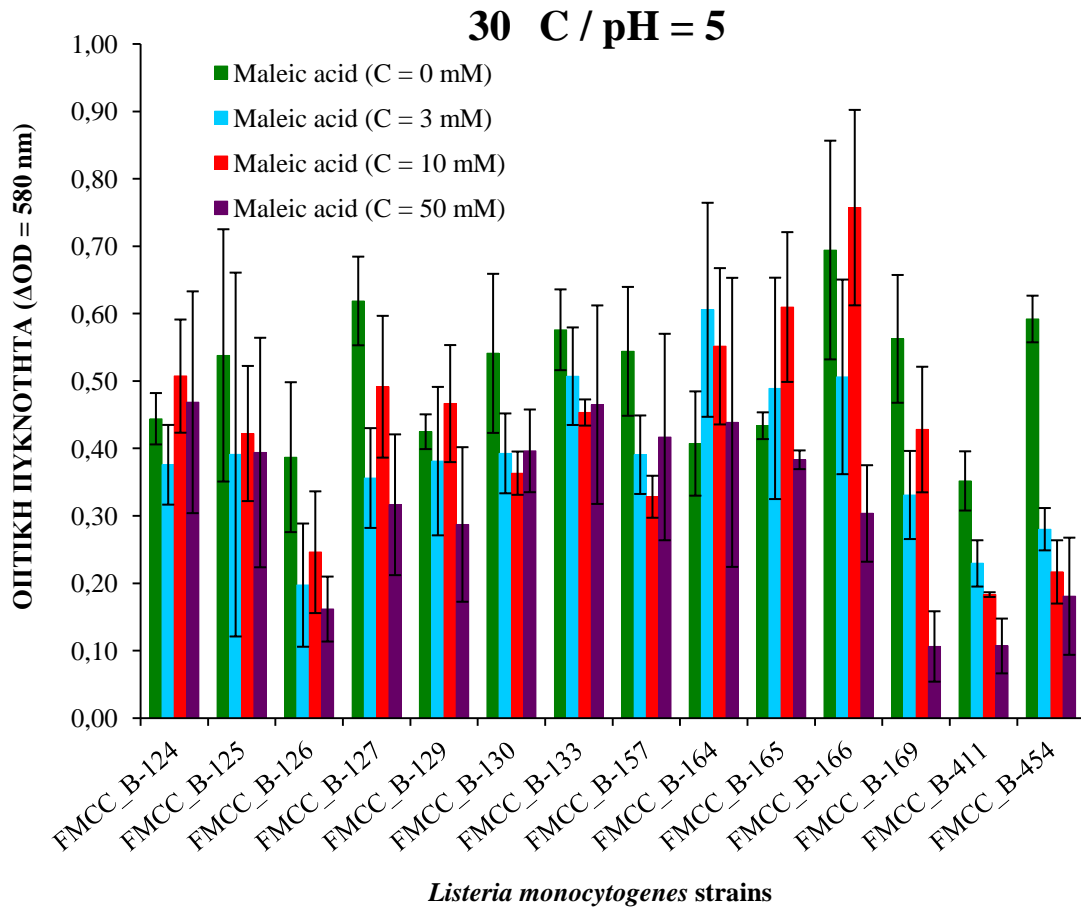
πραγματική) θερμοκρασία των 15 °C και στο συγκεκριμένο pH, η πλειοψηφία των εξεταζόμενων στελεχών παρουσίασαν περιορισμένη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, ενώ η μεγαλύτερη ικανότητα επιδείχθηκε από τα στελέχη B-125, B-133 και B-157.



Σχήμα 3.1.1.2. Σχηματισμός βιοϋμενίων 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου σε pH 3, 5 και 7, στους 15 °C. Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 4).

Συμπερασματικά, στους 30 °C, μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου παρατηρήθηκε στο pH 7, ενώ στους 15 °C στο pH 5, πάντα με κάποιες εξαιρέσεις στελεχών, ενώ στο pH 3 το σύνολο των εξεταζόμενων στελεχών σχημάτισαν ελάχιστο έως καθόλου βιοϋμένιο.

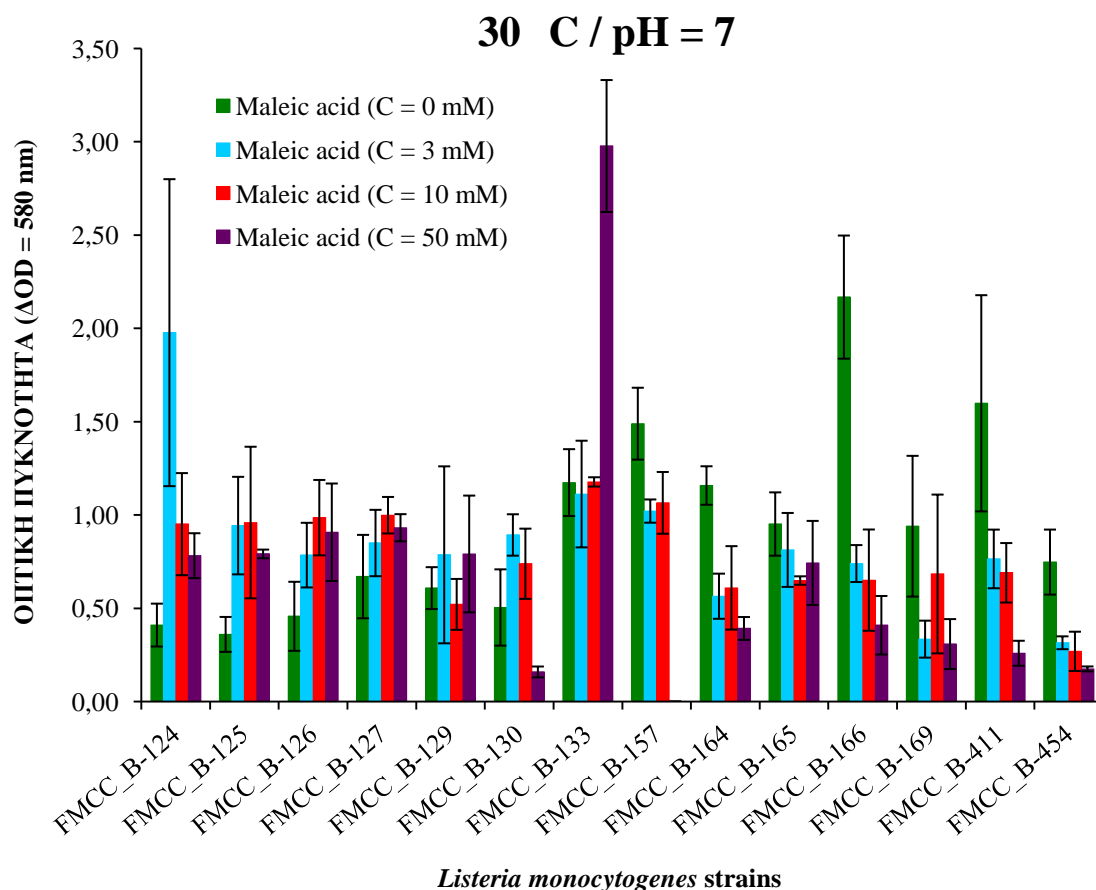
3.1.2. Σχηματισμός βιοϋμενίου σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μηλεϊνικού οξέως



Σχήμα 3.1.2.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου σε pH 5 και παρουσία μηλεϊνικού οξέως 0, 3, 10 και 50 mM, στους 30 °C. Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 4).

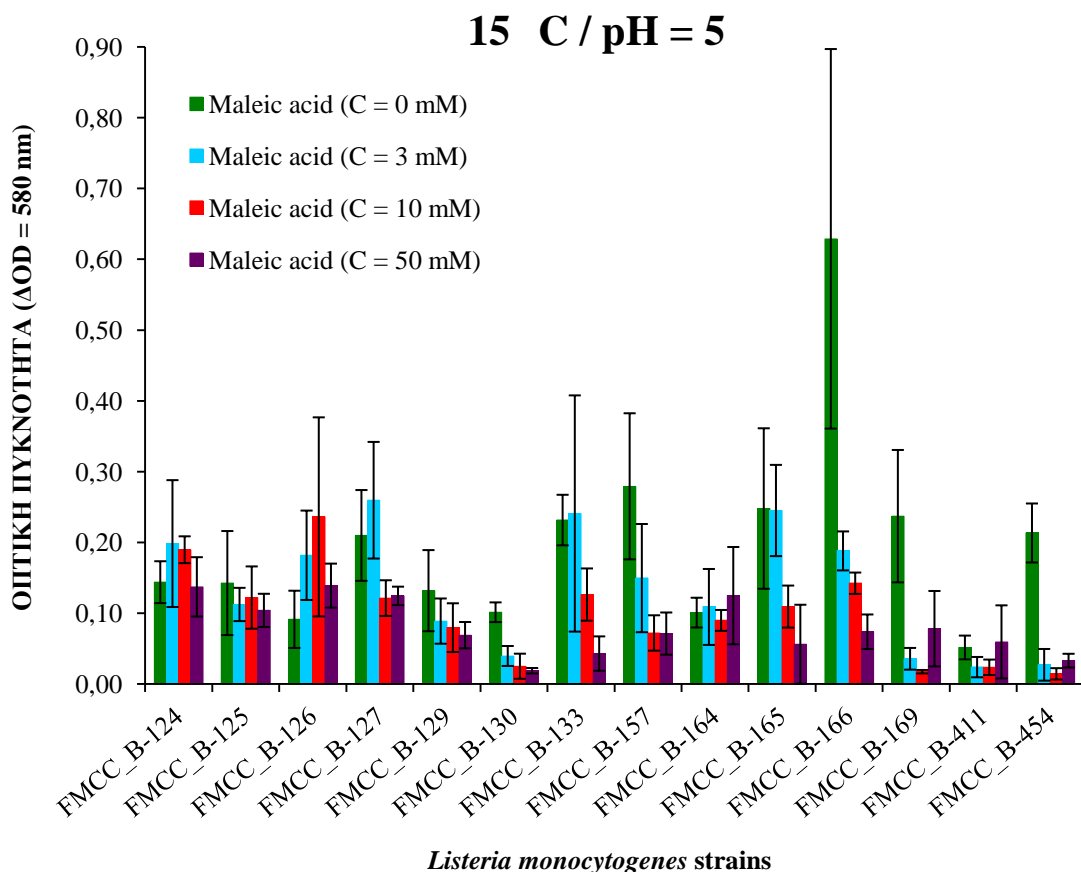
Ξεκινώντας από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν στους 30 °C και σε pH 5, στη συγκέντρωση 0 mM το εύρος της οπτικής πυκνότητας ήταν από 0.35 ± 0.04 έως 0.69 ± 0.16 , στη συγκέντρωση 3 mM από 0.20 ± 0.09 έως 0.61 ± 0.16 , στη συγκέντρωση 10 mM από 0.18 ± 0.004 έως 0.76 ± 0.15 και στη συγκέντρωση 50 mM από 0.11 ± 0.04 έως 0.47 ± 0.15 . Ο σχηματισμός του βιοϋμενίου εξαρτήθηκε από το εξεταζόμενο στέλεχος και την εφαρμοζόμενη περιβαλλοντική συνθήκη (θερμοκρασία, pH, μηλεϊνικό οξύ), ενώ το πιο ενδιαφέρον ήταν το στέλεχος B-411, το οποίο αυξανόμενη της συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως, σχημάτισε σημαντικά λιγότερο

βιοϋμένιο, επομένως, υπήρχε σημαντική επίδραση του οξέως στο σχηματισμό βιοϋμένιου στις συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες (Σχήμα 3.1.2.1, Πίνακας Β).



Σχήμα 3.1.2.2. Σχηματισμός βιοϋμένιων 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου σε pH 7 και παρουσία μηλεϊνικού οξέως 0, 3, 10 και 50 mM, στους 30 °C. Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 4).

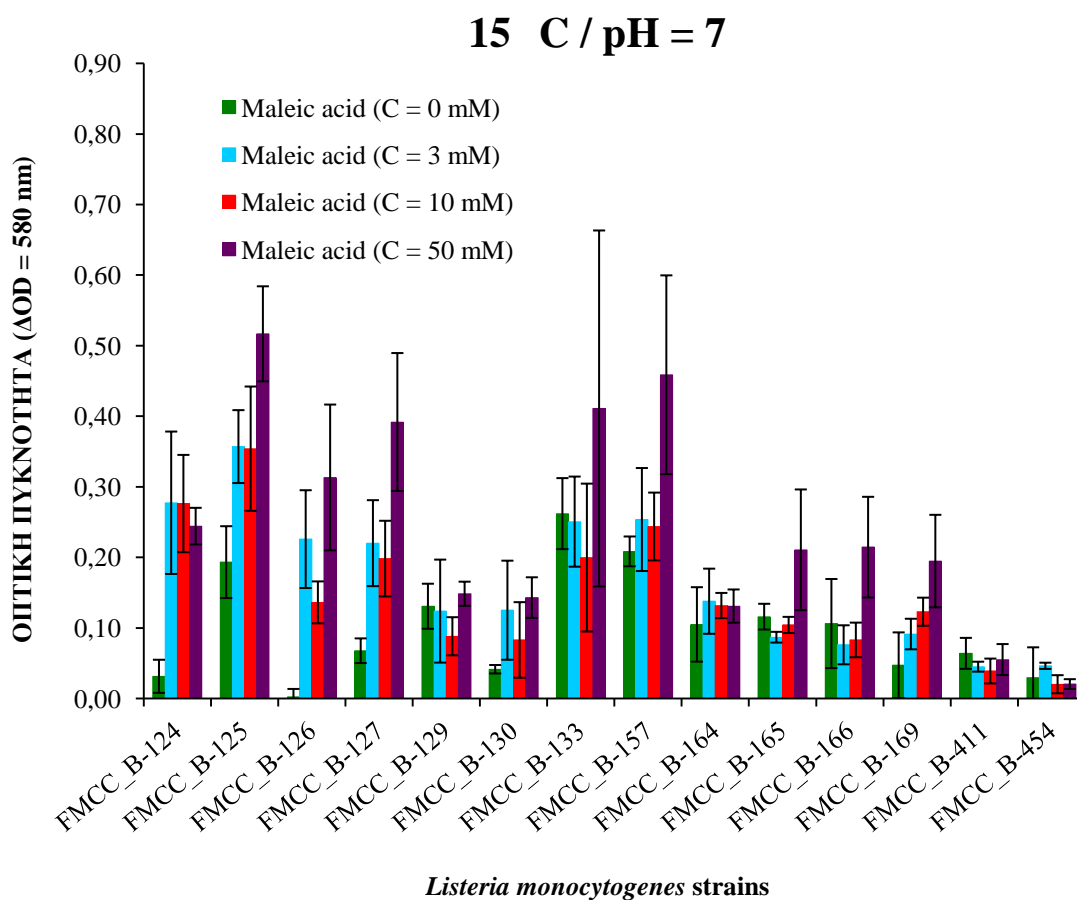
Αναφορικά με τα αποτελέσματα στους 30 °C και σε pH 7, απουσία μηλεϊνικού οξέως (συγκέντρωση 0 mM), το εύρος της οπτικής πυκνότητας ήταν από 0.36 ± 0.69 έως 2.17 ± 0.33 , στη συγκέντρωση 3 mM από 0.32 ± 0.03 έως 1.98 ± 0.82 , στη συγκέντρωση 10 mM από 0.27 ± 0.11 έως 1.18 ± 0.03 και στη συγκέντρωση 50 mM από 0.18 ± 0.01 έως 2.98 ± 0.35 . Ο σχηματισμός του βιοϋμένιου εξαρτήθηκε από το εξεταζόμενο στέλεχος και τις εφαρμοζόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Το στέλεχος B-124 φάνηκε να σχηματίζει περισσότερο βιοϋμένιο σε συγκέντρωση 3 mM, ενώ το B-133 σε συγκέντρωση 50 mM (Σχήμα 3.1.2.2, Πίνακας Β).



Σχήμα 3.1.2.3. Σχηματισμός βιοϋμενίων 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου σε pH 5 και παρουσία μηλεϊνικού οξέως 0, 3, 10 και 50 mM, στους 15 °C. Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 4).

Αναφορικά με τα αποτελέσματα στους 15 °C και σε pH 5, απουσία μηλεϊνικού οξέως (συγκέντρωση 0 mM), το εύρος της οπτικής πυκνότητας ήταν από 0.05 ± 0.02 έως 0.63 ± 0.27 , στη συγκέντρωση 3 mM από 0.02 ± 0.01 έως 0.26 ± 0.08 , στη συγκέντρωση 10 mM από 0.01 ± 0.01 έως 0.24 ± 0.14 και στη συγκέντρωση 50 mM από 0.03 ± 0.01 έως 0.14 ± 0.04 . Ομοίως με παραπάνω, ο σχηματισμός βιοϋμενίου ήταν εξαρτώμενος στελέχους, ενώ επίσης επηρεάστηκε από τις συνθήκες pH και θερμοκρασίας, με την μετρούμενη οπτική πυκνότητα να είναι χαμηλότερη σε σχέση με τους 30 °C και σε pH 5. Επίσης, το στέλεχος B-166, αυξανόμενης της συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως, σχημάτισε σημαντικά λιγότερο βιοϋμένιο, επομένως, υπάρχει επίδραση του οξέως, στις συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, στον σχηματισμό βιοϋμενίου. Αντίθετα, το στέλεχος B-411 δεν φάνηκε να

έχει σημαντική ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε καμία από τις εφαρμοζόμενες συνθήκες, σε σχέση με τους 30 °C (Σχήμα 3.1.2.3, Πίνακας Β).



Εικόνα 3.1.2.4. Σχηματισμός βιοϋμενίων 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου σε pH 7 και παρουσία μηλεϊνικού οξέως 0, 3, 10 και 50 mM, στους 15 °C. Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 4).

Αναφορικά με τα αποτελέσματα στους 15 °C και σε pH 7, απουσία μηλεϊνικού οξέως (συγκέντρωση 0 mM) η οπτική πυκνότητα κυμάνθηκε από 0.03 ± 0.02 έως 0.26 ± 0.05 , στη συγκέντρωση 3 mM από 0.05 ± 0.00 έως 0.36 ± 0.05 , στη συγκέντρωση 10 mM από 0.02 ± 0.01 έως 0.35 ± 0.09 και στη συγκέντρωση 50 mM από 0.02 ± 0.01 έως 0.52 ± 0.07 . Ομοίως με τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, ο σχηματισμός βιοϋμενίου εξαρτήθηκε τόσο από το στέλεχος όσο και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Για παράδειγμα, τα στελέχη B-125, B-126, B-127, B-133, B-157, B-165, B-166 και B-169 φάνηκε να σχηματίζουν περισσότερο βιοϋμένιο σε συγκέντρωση οξέως 50 mM, ενώ το τελευταίο, φάνηκε πώς αυξανόμενης της

συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως, σχημάτισε σημαντικά υψηλότερο βιοϋμένιο, ενώ τα B-411 και B-454 φάνηκε να μην σχηματίζουν ικανό βιοϋμένιο σε σχέση με τους 30 °C και δεν υπήρχε σημαντική μείωση ή αύξηση του βιοϋμενίου, αυξανόμενης της συγκέντρωσης του οξέως, όπως συνέβη στην περίπτωση των 30 °C (**Σχήμα 3.1.2.4, Πίνακας Β**).

3.2 Σχηματισμός βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα

Με βάση τα προκαταρκτικά αποτελέσματα τα οποία ελήφθησαν από τον σχηματισμό βιοϋμενίων 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, επιλέχθηκαν δύο στελέχη, τα B-169 και B-454, για τη δοκιμασία σχηματισμού βιοϋμενίων σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, απουσία (0 mM) και παρουσία (50 mM) μηλεϊνικού οξέως, σε pH 5, 7 και στους 15 °C για συνολικά 144 h.

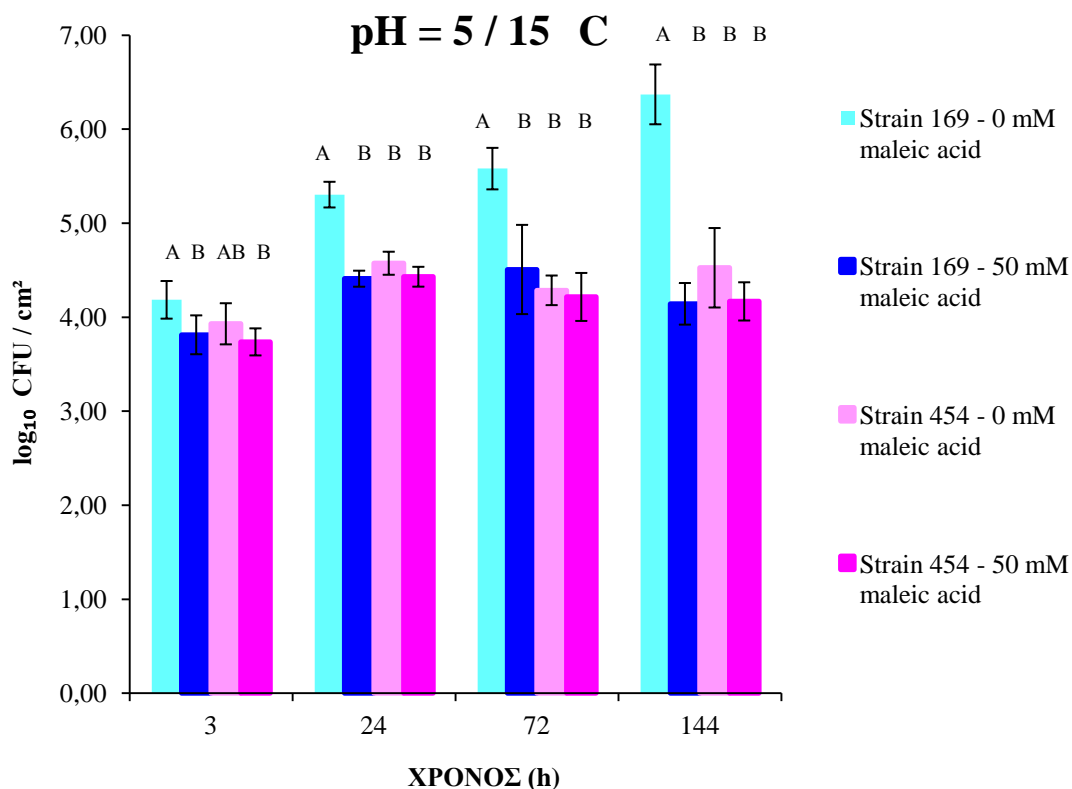
Τα αποτελέσματα του σχηματισμού βιοϋμενίων από τα επιλεγμένα στελέχη (B-169 και B-454) *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα σε pH 5 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0 ή 50 mM, στους 15°C, παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3.2.1 (Πίνακας Γ)**. Το στέλεχος B-169, απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM) στις 3 h (προσκόλληση) προσέγγισε τους $4.18 \pm 0.20 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$, ενώ παρουσία του οξέως σε συγκέντρωση 50 mM τους $3.81 \pm 0.21 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$. Όσον αφορά το στέλεχος B-454, απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM) στις 3 h (προσκόλληση), ο βακτηριακός πληθυσμός προσέγγισε τους $3.93 \pm 0.22 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$, ενώ παρουσία του οξέως, σε συγκέντρωση 50 mM, τους $3.74 \pm 0.14 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$. Φαίνεται, λοιπόν, ότι υπήρχε σημαντική ($P \text{ value} < 0.05$) επίδραση του στελέχους και της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως στην διαδικασία της προσκόλλησης των κυττάρων στα πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, ενώ δεν υπήρχε σημαντική ($P \text{ value} \geq 0.05$) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως στις 3 h.

Μετά από 24 h φαίνεται ξεκάθαρα ότι το στέλεχος B-169 σχημάτισε περισσότερο βιοϋμένιο, φτάνοντας τους $5.30 \pm 0.14 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$ απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), ενώ το στέλεχος B-454 άγγιξε μόλις τους $4.57 \pm 0.12 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$. Παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM), το στέλεχος B-169 άγγιξε τους $4.41 \pm 0.09 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$, ενώ το στέλεχος B-454 τους $4.43 \pm 0.11 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$. Έτσι,

λοιπόν, υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) επίδραση του στελέχους και της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως μετά από 24 h σχηματισμού, ενώ υπήρχε και σημαντική (P value < 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως.

Μετά από 72 h φαίνεται ακόμη πιο ξεκάθαρα ότι το στέλεχος B-169 σχημάτισε περισσότερο βιοϋμένιο, φτάνοντας τους $5.58 \pm 0.22 \log_{10}$ CFU / cm² απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), ενώ το στέλεχος B-454 άγγιξε μόλις τους $4.29 \pm 0.16 \log_{10}$ CFU / cm². Παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM), το στέλεχος B-169 άγγιξε τους $4.51 \pm 0.47 \log_{10}$ CFU / cm², ενώ το στέλεχος B-454 τους $4.22 \pm 0.25 \log_{10}$ CFU / cm². Επίσης, υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) επίδραση του στελέχους και της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως μετά από 72 h σχηματισμού, ενώ υπήρχε και σημαντική (P value < 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως.

Τέλος, μετά από 144 h, το στέλεχος B-169 έφτασε τους $6.37 \pm 0.32 \log_{10}$ CFU / cm² απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), ενώ το στέλεχος B-454 άγγιξε μόλις τους $4.53 \pm 0.42 \log_{10}$ CFU / cm². Παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM), το στέλεχος B-169 μειώθηκε κατά 2 λογάριθμους περίπου, φτάνοντας τους $4.14 \pm 0.22 \log_{10}$ CFU / cm². Ακόμη, παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM), το στέλεχος B-454 άγγιξε μόλις τους $4.17 \pm 0.20 \log_{10}$ CFU / cm². Επιπρόσθετα, υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) επίδραση του στελέχους και της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως μετά από 144 h σχηματισμού, ενώ υπήρχε και σημαντική (P value < 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως, μόνο για το στέλεχος B-169.



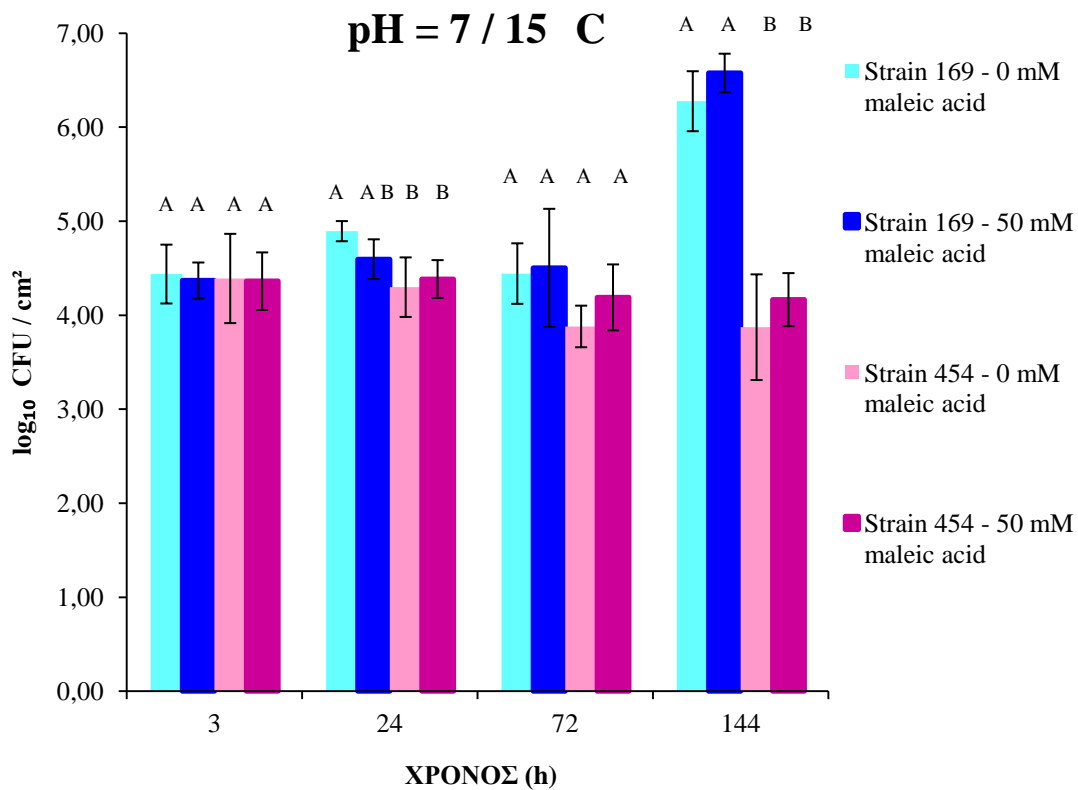
Σχήμα 3.2.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων στελεχών (B-169 και B-454) *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξείωτου γάλβου σε pH 5 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0, 50 mM, στους 15 °C. Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 6). Οι μέσες τιμές που μοιράζονται ένα τουλάχιστον κοινό γράμμα, ανά ώρα, που φαίνεται πάνω από τις στήλες, δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P value < 0.05.

Τα αποτελέσματα του σχηματισμού βιοϋμενίων από τα επιλεγμένα στελέχη (B-169 και B-454) *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξείωτου γάλβου σε pH 7 και σε συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0 και 50 mM, στους 15 °C, παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3.2.2 (Πίνακας Γ)**. Το στέλεχος B-169 απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM) στις 3 h (προσκόλληση) άγγιξε τους $4.44 \pm 0.31 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$, ενώ παρουσία συγκέντρωσης 50 mM τους $4.37 \pm 0.19 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$. Όσον αφορά το στέλεχος B-454, απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM) στις 3 h (προσκόλληση) άγγιξε τους $4.39 \pm 0.47 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$, ενώ παρουσία συγκέντρωσης 50 mM τους $4.36 \pm 0.31 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$. Φαίνεται, λοιπόν, ότι δεν υπήρχε σημαντική (P value ≥ 0.05) επίδραση του στελέχους και της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως στην διαδικασία της προσκόλλησης των κυττάρων στα πλακίδια ανοξείωτου γάλβου, ενώ δεν υπήρχε σημαντική (P value ≥ 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως στις 3 h.

Μετά από 24 h, το στέλεχος B-169 έφτασε τους $4.89 \pm 0.11 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), ενώ το στέλεχος B-454 άγγιξε μόλις τους $4.30 \pm 0.32 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$. Παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) το στέλεχος B-169 άγγιξε τους $4.60 \pm 0.21 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$, ενώ το στέλεχος B-454 τους $4.38 \pm 0.20 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$. Έτσι, λοιπόν, υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) επίδραση του στελέχους, δεν υπήρχε σημαντική (P value \geq 0.05) επίδραση της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως, ενώ υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως.

Μετά από 72 h, το στέλεχος B-169 άγγιξε τους $4.44 \pm 0.32 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), ενώ το στέλεχος B-454 άγγιξε μόλις τους $3.88 \pm 0.22 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$. Παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) το στέλεχος B-169 άγγιξε τους $4.50 \pm 0.63 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$, ενώ το στέλεχος B-454 τους $4.19 \pm 0.35 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$. Επίσης, υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) επίδραση του στελέχους, δεν υπήρχε σημαντική (P value \geq 0.05) επίδραση όσον αφορά της συγκεντρώσεις του μηλεϊνικού οξέως, ενώ δεν υπήρχε σημαντική (P value \geq 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως.

Τέλος, μετά από 144 h και αφού έχει σχηματισθεί πλήρως ώριμο βιοϋμένιο, το στέλεχος B-169 έφτασε τους $6.28 \pm 0.32 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), ενώ το στέλεχος B-454 άγγιξε μόλις τους $3.87 \pm 0.56 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$. Παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) το στέλεχος B-169 αυξήθηκε κατά 2 περίπου λογάριθμους, σε σχέση με το pH 5, φτάνοντας τους $6.58 \pm 0.21 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$. Ακόμη, παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) το στέλεχος B-454 άγγιξε μόλις τους $4.17 \pm 0.28 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$. Επιπρόσθετα, υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) επίδραση του στελέχους, ενώ δεν υπήρχε σημαντική (P value \geq 0.05) επίδραση της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως. Ακόμη, δεν υπήρχε σημαντική (P value \geq 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως.

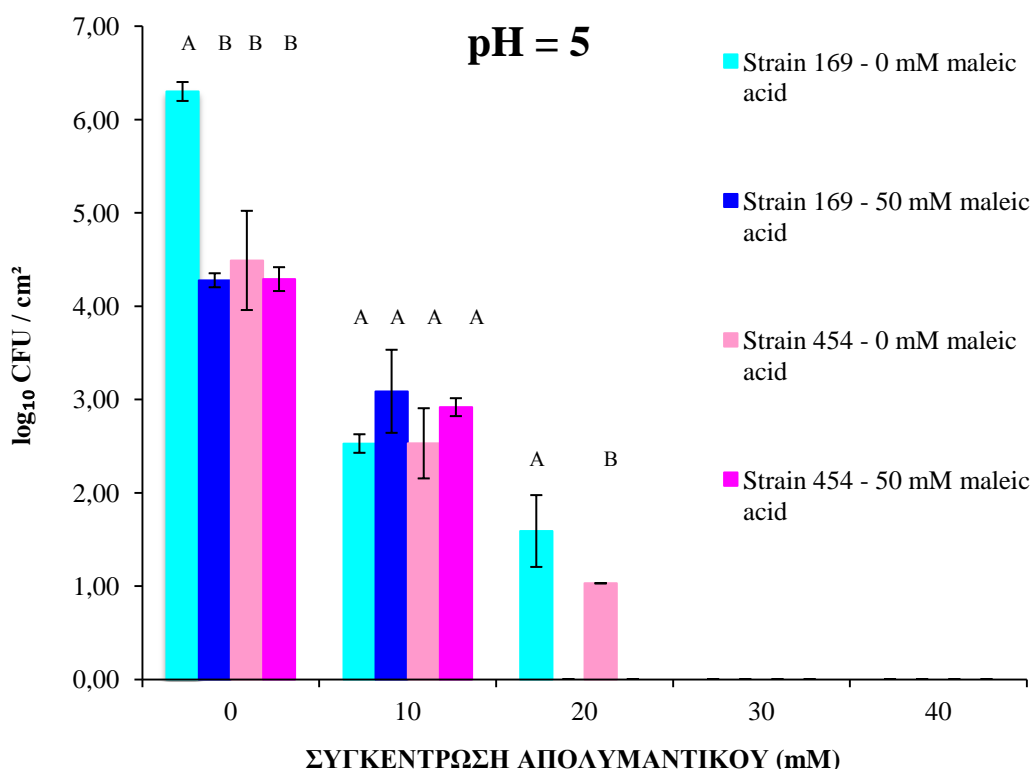


Σχήμα 3.2.2. Σχηματισμός βιοϋμενίων στελεχών (B-169 και B-454) *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξείωτου γάλαβα σε pH 7 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0, 50 mM, στους 15 °C. Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους ± τυπικές αποκλίσεις (n = 6). Οι μέσες τιμές που μοιράζονται ένα τουλάχιστον κοινό γράμμα, ανά ώρα, που φαίνεται πάνω από τις στήλες, δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P value < 0.05.

3.3 Αξιολόγηση της απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (*Bead Vortexing*)

Η απολύμανση με χρήση μηλεϊνικού οξέως πραγματοποιήθηκε για να διαπιστωθεί η αποτελεσματικότητα του συγκεκριμένου οξέως (δηλαδή, λογαριθμική μείωση των βακτηρίων), αλλά και να εξακριβωθεί εάν η έκθεση των στελεχών *L. monocytogenes* στο οξύ, κατά την διαδικασία του σχηματισμού βιοϋμενίου, θα είχε κάποια επίδραση (θετική ή αρνητική) στην απόκρισή τους στην όξινη καταπόνηση που θα υφίσταντο κατά τη μετέπειτα διαδικασία της απολύμανσης.

Τα αποτελέσματα της απολύμανσης των ώριμων βιοϋμενίων από τα στελέχη (B-169 και B-454) *L. monocytogenes*, τα οποία σχηματίστηκαν σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα σε pH 5 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0, 50 mM, στους 15 °C (144 h), μετά από έκθεσή τους σε διάφορες συγκεντρώσεις απολυμαντικού μέσου, παρουσιάζονται στο **Σχήμα 3.3.1** (Πίνακας Δ).



Σχήμα 3.3.1. Λογαριθμική μείωση (\log_{10} CFU / cm^2) των ώριμων βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών (B-169 και B-454) *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα, σε pH 5 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0, 50 mM (κατά τη διάρκεια σχηματισμού βιοϋμενίου), στους 15 °C, μετά από έκθεσή τους σε διάφορες συγκεντρώσεις οργανικού οξέως (μηλεϊνικό οξύ). Οι στήλες παρουσιάζουν τους μέσους όρους \pm τυπικές αποκλίσεις ($n = 4$). Οι μέσες τιμές που μοιράζονται ένα τουλάχιστον κοινό γράμμα, ανά ώρα, που φαίνεται πάνω από τις στήλες, δεν διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P value < 0.05.

Μετά από έκθεση των σχηματισθέντων βιοϋμενίων (144 h) σε 0 mM ($\frac{1}{4}$ Ringer's solution) απολυμαντικού, οι πληθυσμοί δεν παρουσίασαν καμιά μεταβολή. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος B-169, το οποίο σχηματίστηκε απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), προσέγγισε τους $6.30 \pm 0.10 \log_{10}$ CFU / cm^2 , ενώ παρουσία του οξέως (σε συγκέντρωση 50 mM) τους $4.28 \pm 0.08 \log_{10}$ CFU / cm^2 . Όσον αφορά το στέλεχος B-

454, το οποίο σχηματίστηκε απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), ο πληθυσμός του ήταν $4.49 \pm 0.53 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$, ενώ παρουσία του οξέως (σε συγκέντρωση 50 mM) ήταν $4.29 \pm 0.13 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$. Φαίνεται, λοιπόν, ότι υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) επίδραση του στελέχους και της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού οξέως, ενώ υπήρχε και σημαντική (P value < 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελεχών και συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως.

Μετά από έκθεση των σχηματισθέντων βιοϋμενίων (144 h) σε 10 mM απολυμαντικού, ο πληθυσμός του στελέχους B-169, το οποίο σχηματίστηκε απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), μειώθηκε στους $2.53 \pm 0.10 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ (- 59.90 %), ενώ παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) μειώθηκε στους $3.09 \pm 0.45 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ (- 27.80 %). Το στέλεχος B-454, το οποίο σχηματίστηκε απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), μειώθηκε στους $2.53 \pm 0.38 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ (- 43.70 %), ενώ παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) μειώθηκε στους $2.92 \pm 0.10 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ (- 32.00 %). Επίσης, δεν υπήρχε σημαντική (P value \geq 0.05) επίδραση του στελέχους στην απολύμανση με 10 mM μηλεϊνικού οξέως, υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) επίδραση του οξέως, ενώ δεν υπήρχε σημαντική (P value \geq 0.05) αλληλεπίδραση μεταξύ στελέχους και μηλεϊνικού οξέως. Με βάση τα αποτελέσματα, φάνηκε πώς έκθεση των στελεχών σε μηλεϊνικό οξύ κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, είχε επίδραση στην ανθεκτικότητα των στελεχών κατά την ακόλουθη απολύμανση με 10 mM μηλεϊνικού οξέως.

Μετά από έκθεση των σχηματισθέντων βιοϋμενίων (144 h) σε 20 mM απολυμαντικού, ο πληθυσμός του στελέχους B-169, το οποίο σχηματίστηκε απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), μειώθηκε στους $1.59 \pm 0.39 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ (- 74.80 %), ενώ παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) σχεδόν εξαλείφθηκε (- 100.00 %). Το στέλεχος B-454, το οποίο σχηματίστηκε απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM), μειώθηκε στους $1.03 \pm 0.00 \log_{10} \text{ CFU} / \text{cm}^2$ (- 77.10 %), ενώ παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) σχεδόν εξαλείφθηκε (- 100.00 %). Στη συγκεκριμένη περίπτωση, υπήρχε σημαντική (P value < 0.05) διαφορά μεταξύ των στελεχών που σχημάτισαν βιοϋμένιο απουσία μηλεϊνικού οξέως, ενώ η έκθεση των στελεχών σε μηλεϊνικό οξύ, κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου, δεν είχε καμιά επίδραση στην ανθεκτικότητα των στελεχών κατά την απολύμανση με 20 mM μηλεϊνικού οξέως.

Τέλος, μετά από έκθεση των σχηματισθέντων βιοϋμενίων (144 h) σε 30 και 40 mM απολυμαντικού, οι πληθυσμοί και των δύο στελεχών, τα οποία σχηματίστηκαν τόσο

απουσία (0 mM) όσο και παρουσία (50 mM) μηλεϊνικού οξέως, δεν ανιχνεύθηκαν καθόλου, συνεπώς πρόκειται για πλήρη εξάλειψη αυτών (- 100.00 %), κάτι που υποδηλώνει πώς οι συγκεκριμένες συγκεντρώσεις απολυμαντικού ήταν πολύ ισχυρές και καταπολέμησαν αποτελεσματικά τα σχηματισθέντα βιοϋμένια και για τα δύο στελέχη.

Συμπερασματικά, συγκεντρώσεις μηλεϊνικού οξέως μεγαλύτερες των 20 mM φαίνεται να είναι απολύτως αποτελεσματικές για τον σκοπό της απολύμανσης των βιοϋμενίων του παθογόνου *L. monocytogenes*.

3.4 Αξιολόγηση της απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι των βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* με χρήση αναλυτή μικροβιολογικής αύξησης (*Malthus microbiological growth analyser*)

Η μέτρηση της αγωγιμότητας, επίσης, χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογηθεί, με έμμεσο τρόπο, η απολυμαντική δράση του μηλεϊνικού οξέως κατά των ώριμων βιοϋμενίων των επιλεγμένων στελεχών (B-169 και B-454) *L. monocytogenes*. Ομοίως με τα παραπάνω, τα βιοϋμένια των προαναφερθέντων στελεχών σχηματίστηκαν σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα σε pH 5, παρουσία (50 mM) και απουσία (0 mM) μηλεϊνικού οξέως, στους 15 °C για 144 h και στη συνέχεια απολυμάνθηκαν με συγκεντρώσεις 500, 300, 100, 70, 50, 30, 10 και 0 mM μηλεϊνικού οξέως. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Malthus 2000 instrument (Radiometer International, Copenhagen, Denmark), μέσω της διαδικασίας που περιγράφεται στην Ενότητα 2.5.2. Στον **Πίνακα 3.4.1** παρουσιάζονται οι χρόνοι ανίχνευσης (Detection Times, h) που κατέγραψε το όργανο για κάθε συγκέντρωση μηλεϊνικού που χρησιμοποιήθηκε.

Πίνακας 3.4.1. Χρόνοι ανίχνευσης (DTs, h) της αγωγιμότητας του θεραπευτικού μέσου από τα εναπομείναντα βιοϋμένια μετά την έκθεσή τους σε διάφορες συγκεντρώσεις απολυμαντικού μέσου (μηλεϊνικό οξύ). Πραγματοποιήθηκαν 2 ανεξάρτητα πειράματα (n = 5) για τις συγκεντρώσεις 500, 300, 100, 50, 10 και 0 mM και ένα ανεξάρτητο πείραμα (n = 6) για τις συγκεντρώσεις 70, 50, 30, 10 και 0 mM μηλεϊνικού οξέως.

ΠΕΙΡΑΜΑ 1

ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-169 - 0 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ		ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-169 - 50 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ	
Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)	Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)
500	0	500	0
300	0	300	0
100	0	100	0
50	0	50	0
10	9.2 ± 1.58	10	9.7 ± 0.70
0 (control)	3.5 ± 0.66	0 (control)	5.2 ± 0.58

ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-454 - 0 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ		ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-454 - 50 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ	
Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)	Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)
500	0	500	0
300	0	300	0
100	0	100	0
50	0	50	0
10	10.0 ± 3.67	10	9.9 ± 1.38
0 (control)	5.5 ± 0.97	0 (control)	8.0 ± 1.53

ΠΕΙΡΑΜΑ 2

ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-169 - 0 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ		ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-169 - 50 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ	
Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)	Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)
500	0	500	0
300	0	300	0
100	0	100	0
50	0	50	0
10	10.8 ± 4.36	10	8.86 ± 3.74
0 (control)	3.5 ± 0.70	0 (control)	4.8 ± 1.66

ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-454 - 0 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ		ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-454 - 50 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ	
Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)	Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)
500	0	500	0
300	0	300	0
100	0	100	0
50	0	50	0
10	11.0 ± 3.07	10	14.1 ± 3.94
0 (control)	6.2 ± 1.60	0 (control)	8.5 ± 4.02

ΠΕΙΡΑΜΑ 3

ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-169 - 0 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ		ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-169 - 50 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ	
Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)	Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)
70	0	70	0
50	0	50	0
30	0	30	0
0 (control)	4.5 ± 2.12	0 (control)	6.4 ± 2.93

ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-454 - 0 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ		ΣΤΕΛΕΧΟΣ B-454 - 50 mM ΜΗΛΕΪΝΙΚΟ ΟΞΥ	
Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)	Συγκέντρωση απολυμαντικού (mM)	Χρόνος Ανίχνευσης (DT, h)
70	0	70	0
50	0	50	0
30	0	30	0
0 (control)	6.8 ± 1.51	0 (control)	9.1 ± 0.90

Οι αλλαγές στην αγωγιμότητα του θρεπτικού μέσου καταγράφονται μέσω ηλεκτροδίων, τα οποία είναι βυθισμένα στο θρεπτικό μέσο. Ο χρόνος που απαιτείται για να αναπτυχθεί ο πληθυσμός των βακτηρίων και έτσι να παρατηρήσουμε μια μετρήσιμη αλλαγή στην αγωγιμότητα, λέγεται χρόνος ανίχνευσης (Detection Time, h). Μεγάλος χρόνος ανίχνευσης σημαίνει και μεγάλη λογαριθμική μείωση του πληθυσμού των βιοϋμενίων μετά την δράση του απολυμαντικού.

Για παράδειγμα, για το στέλεχος B-169 που αφέθηκε να σχηματίσει βιοϋμένιο απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM) και απολυμάνθηκε με ισοτονικό διάλυμα, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν 3.5 ± 0.66 h στο Πείραμα 1, 3.5 ± 0.70 h στο Πείραμα 2 και 4.5 ± 2.12 h στο Πείραμα 3. Οι χρόνοι αυτοί ήταν σχετικά μικροί, δεδομένου ότι το

σχηματισθέν βιοϋμένιο άγγιξε τους $6.30 \pm 0.10 \log_{10} \text{CFU} / \text{cm}^2$, πληθυσμός ικανός να μεταβολίσει θρεπτικά συστατικά και να γίνει αντιληπτή η αύξηση αυτή από το όργανο. Επίσης, μετά από απολύμανση με μηλεϊνικό οξύ συγκέντρωσης 10 mM στις συγκεκριμένες συνθήκες σχηματισμού, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν υψηλοί, 9.2 ± 1.58 h στο Πείραμα 1 και 10.8 ± 4.36 h στο Πείραμα 2, δεδομένου ότι ο πληθυσμός μειώθηκε, επομένως τα εναπομείναντα κύτταρα χρειάστηκαν αρκετό χρόνο έτσι ώστε να πολλαπλασιαστούν ξανά, να φτάσουν στο κατώφλι που απαιτείται για να παραχθούν μεταβολικά προϊόντα και τελικά το όργανο να τα ανιχνεύσει και να καταγράψει τον χρόνο. Ακόμη, για το στέλεχος B-169 που αφέθηκε να σχηματίσει βιοϋμένιο παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) και απολυμάνθηκε με ισοτονικό διάλυμα, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν 5.2 ± 0.58 h στο Πείραμα 1, 4.8 ± 3.74 h στο Πείραμα 2 και 6.4 ± 2.93 h στο Πείραμα 3. Οι χρόνοι αυτοί ήταν σχετικά υψηλοί, διότι υπήρχε σημαντική μείωση στο σχηματισθέν βιοϋμένιο παρουσία (50 mM) μηλεϊνικού οξέως, επομένως τα κύτταρα ήταν αρκετά καταπονημένα. Τέλος, μετά την απολύμανση με μηλεϊνικό οξύ συγκέντρωσης 10 mM στις συγκεκριμένες συνθήκες σχηματισμού, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν 9.7 ± 0.70 h στο Πείραμα 1 και 8.88 ± 3.74 h στο Πείραμα 2, χρόνοι αρκετά λογικοί δεδομένου ότι ο πληθυσμός μειώθηκε σημαντικά και σε αυτή την περίπτωση.

Για το στέλεχος B-454 που αφέθηκε να σχηματίσει βιοϋμένιο απουσία μηλεϊνικού οξέως (0 mM) και απολυμάνθηκε με ισοτονικό διάλυμα, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν 5.5 ± 3.67 h στο Πείραμα 1, 6.2 ± 1.60 h στο Πείραμα 2 και 6.8 ± 1.51 h στο Πείραμα 3, δεδομένου ότι το συγκεκριμένο στέλεχος σχημάτισε χαμηλότερο βιοϋμένιο σε αυτές τις συνθήκες. Επίσης, μετά από απολύμανση με μηλεϊνικό οξύ συγκέντρωσης 10 mM στις συγκεκριμένες συνθήκες σχηματισμού, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν 10.0 ± 3.67 h στο Πείραμα 1 και 11.0 ± 3.07 h στο Πείραμα 2. Και σε αυτή την περίπτωση, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν αρκετά υψηλοί, λόγω της μείωσης του βιοϋμενίου μετά την απολύμανση. Ακόμη, για το στέλεχος B-454 που αφέθηκε να σχηματίσει βιοϋμένιο παρουσία μηλεϊνικού οξέως (50 mM) και απολυμάνθηκε με ισοτονικό διάλυμα, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν 8.0 ± 1.53 h στο Πείραμα 1, 8.5 ± 4.02 h στο Πείραμα 2 και 9.1 ± 0.90 h στο Πείραμα 3. Οι συγκεκριμένοι χρόνοι ανίχνευσης ήταν πολύ κοντά με τους αντίστοιχους απουσία (0 mM) μηλεϊνικού οξέως, διότι το στέλεχος αυτό σχημάτισε παρόμοιο βιοϋμένιο και στις δύο περιπτώσεις. Τέλος, μετά την απολύμανση με μηλεϊνικό οξύ συγκέντρωσης 10 mM στις συγκεκριμένες

συνθήκες σχηματισμού, οι χρόνοι ανίχνευσης ήταν 9.9 ± 1.38 h στο Πείραμα 1 και 14.1 ± 3.94 h στο Πείραμα 2, χρόνοι αρκετά λογικοί, δεδομένου ότι ο πληθυσμός μειώθηκε και σε αυτή την περίπτωση.

Εν κατακλείδι, ο χρόνος ανίχνευσης των μεταβολικών προϊόντων που παράγονται είναι πιθανόν να εξαρτάται από τα εναπομείναντα κύτταρα τα οποία είναι προσκολλημένα στις επιφάνειες των πλακιδίων ανοξειδωτού χάλυβα, αλλά και από τις κινητικές παραμέτρους των βακτηρίων (φάση προσαρμογής - lag phase, μέγιστος ειδικός ρυθμός αύξησης - μ_{\max}), καθώς, επίσης και από την απόκριση των κυττάρων στην καταπόνηση που υπέστησαν, τόσο κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου παρουσία μηλεϊνικού οξέως και σε διαφορετικές τιμές pH, όσο και κατά την διαδικασία της απολύμανσης.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ



Ο σχηματισμός των βιοϋμενίων είναι ένα φυσικό φαινόμενο που συμβαίνει όταν μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε αβιοτικές επιφάνειες όπου υπάρχουν υπολλείματα οργανικών ουσιών (π.χ. βιομηχανία τροφίμων) (Carpentier and Cerf, 1993; Hood and Zottola, 1995). Τα βιοϋμένια αποτελούνται από παθογόνους και αλλοιωγόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή μόλυνσης των επιφανειών επεξεργασίας τροφίμων και συνεπώς, διασταυρούμενη επιμόλυνση αυτών με επακόλουθη εκδήλωση τροφιμογενών λοιμώξεων στον πληθυσμό, ιδιαίτερα σε ευπαθείς ομάδες (Donlan and Costerton, 2002).

Αρχικά, μελετήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων 14 στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, σε διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους (θερμοκρασία, pH, παρουσία και απουσία μηλεϊνικού οξέως). Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα έδειξαν πώς ο σχηματισμός του βιοϋμενίου εξαρτάται τόσο από το στέλεχος του βακτηρίου όσο και από τις δοκιμαζόμενες περιβαλλοντικές παραμέτρους, αποτελέσματα τα οποία έρχονται σε συμφωνία με την μελέτη των Lianou and Koutsoumanis, (2012) οι οποίοι μελέτησαν τον σχηματισμό βιοϋμενίου από 60 στελέχη *S. enterica*, σε pH = 3.8 - 7.0, θερμοκρασία από 4 έως 37 °C και NaCl = 0.5 - 8.0 % wt/v. Πράγματι, στους 15 °C, η πλειοψηφία των στελεχών σχημάτισε υψηλότερο βιοϋμένιο στο pH 5, ενώ στους 30 °C στο pH 7. Στο pH 3 και στις δύο θερμοκρασίες κανένα στέλεχος δεν ήταν ικανό να σχηματίσει βιοϋμένιο. Οι Tresse *et al.*, (2006), μετά από μελέτη σχηματισμού βιοϋμενίων *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου στους 20 °C, αναφέρουν πώς η προσκόλληση ήταν σημαντικά μειωμένη στο pH 5, σε αντίθεση με το pH 7. Επομένως, τα στελέχη της *L. monocytogenes* παρουσιάζουν διακύμανση στον σχηματισμό (Djordjević *et al.*, 2002; Borucki *et al.*, 2003). Πιο συγκεκριμένα, οι Djordjević *et al.*, (2002) χρησιμοποίησαν τροποποιημένο ζωμό Welshimer, εμβολίασαν με 31 στελέχη *L. monocytogenes* και επώασαν τα δείγματα για 20 και 40 h στους 32 °C. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν πώς τα είδη της Γενεαλογίας I σχημάτισαν σημαντικά υψηλότερο βιοϋμένιο (Romanova *et al.*, 2007) από τα είδη των Γενεαλογιών II και III, ενώ βρέθηκε πώς τα στελέχη σχημάτισαν υψηλότερο βιοϋμένιο σε θρεπτικό MWB παρά σε TSB. Επομένως, οι μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μια ταχεία και απλή μέθοδος για τη δοκιμασία ελέγχου σχηματισμού βιοϋμενίων μεταξύ στελεχών ή συνθηκών ανάπτυξης. Όμως, οι Borucki *et al.*, (2003) αναφέρουν ότι αυξημένος σχηματισμός βιοϋμενίων παρατηρήθηκε στα είδη της Γενεαλογίας II

(ορότυποι 1/2a και 1/2c) τα οποία, συνήθως, δεν συνδέονται με τροφιμογενή περιστατικά. Έτσι, ο σχηματισμός σχετίζεται με την φυλογενετική διαίρεση και όχι με τον ορότυπο. Επιπλέον, οι [Stepanović et al., \(2004\)](#) μελέτησαν τον σχηματισμό 122 στελεχών *Salmonella spp.* και 48 στελεχών *L. monocytogenes* για 24 h στους 35 °C. Τα θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν ήταν BHI, TSB, ζωμός κρέατος (MB) και αραιωμένο TSB (1/20 TSB). Όλα τα στελέχη σχημάτισαν βιοϋμένιο, στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο όμως. Τα σχηματισθέντα βιοϋμένια των στελεχών *L. monocytogenes* ήταν χαμηλότερα από αυτά των στελεχών της *Salmonella spp.* Το θρεπτικό μέσο και η σύστασή του επηρέασαν σημαντικά τον σχηματισμό, με το 1/20 TSB να είναι το καταλληλότερο και το πιο αποτελεσματικό για την *Salmonella spp.*, ενώ η *L. monocytogenes* σχημάτισε καλύτερο βιοϋμένιο στο BHI. Καταλήγοντας, η *Salmonella spp.* σχηματίζει καλύτερο βιοϋμένιο σε πτωχά θρεπτικά υποστρώματα ενώ η *L. monocytogenes* το αντίθετο. Επίσης, οι [Pan et al., \(2010\)](#) αξιολόγησαν τον σχηματισμό βιοϋμενίων από 18 στελέχη *L. monocytogenes* σε θρεπτικό TSB (γλυκόζη 0.25 - 10.0 % wt/v, NaCl 0.5 - 7.0 % wt/v, αιθανόλη 1.0 - 5 % v/v), στους 22.5, 30 και 37 °C. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι τα είδη της Γενεαλογίας II (ορότυπος 1/2a) σχημάτισαν υψηλότερο βιοϋμένιο από τα είδη της Γενεαλογίας I (ορότυπος 4b), τα οποία συμφωνούν και με προηγούμενες μελέτες ([Djordjević et al., 2002](#)). Ακόμη, οι [Harvey et al., \(2007\)](#) αξιολόγησαν τον σχηματισμό βιοϋμενίου στελεχών *L. monocytogenes* σε θρεπτικό TSB για 48 h στους 20 °C. Αναφέρουν πώς από τα 138 εξετασθέντα είδη, τα 127 (92 %) σχημάτισαν ασθενές βιοϋμένιο, τα 9 (6.5 %) μέτριο και τα 2 (1.5 %) ισχυρό. Στελέχη από διαφορετικές απομονώσεις (κλινικές απομονώσεις, απομονώσεις από ζώα και βιομηχανία τροφίμων) σχημάτισαν παρόμοιο βιοϋμένιο, ενώ τα είδη της Γενεαλογίας II (ορότυπος 1/2a) σχημάτισαν μεγαλύτερο βιοϋμένιο, όμως τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με τους [Borucki et al., \(2003\)](#) και σε αντίθεση με τους [Djordjević et al., \(2002\)](#). Επίσης, η υδροφοβικότητα δεν φαίνεται να επηρεάζει την προσκόλληση της *L. monocytogenes* σε γυαλί, ενώ σχετίζεται με την προσκόλληση σε πολυστυρένιο ([Chae et al., 2006](#)) και μεταβάλλεται με την ηλικία του βιοϋμενίου και την θερμοκρασία επώασης. Μια άλλη μελέτη με 7 στελέχη *L. monocytogenes* που είχαν εμπλακεί σε τροφικές δηλητηριάσεις (επιδημικά στελέχη) και ακόμη 14 σποραδικά στελέχη του ίδιου βακτηρίου δεν φανέρωσε την ύπαρξη κάποιας σχέσης ανάμεσα στην επιφανειακή υδροφοβικότητα και την αρχική προσκόλληση στο γυαλί, καθώς και τον μετέπειτα

σηματισμό βιοϋμενίου. Τα επιδημικά στελέχη, όμως, βρέθηκαν να προσκολλώνται καλύτερα, ενώ εκείνα που παρήγαγαν εξωκυτταρικά πολυσακχαρίδια, βρέθηκε να σχηματίζουν περισσότερο βιοϋμένιο (Chae *et al.*, 2006). Γενικά, υψηλές θερμοκρασίες επώασης των βιοϋμενίων αυξάνουν την υδροφοβικότητα, ενώ οι μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες μεταβάλλουν την σύνθεση της επιφάνειας των κυττάρων, με αποτέλεσμα να ανταποκρίνονται διαφορετικά σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα με επακόλουθη συνέπεια τον επηρεασμό της προσκόλλησης (Chavant *et al.*, 2002). Επιπρόσθετα, οι Kadam *et al.*, (2013) μελέτησαν 143 στελέχη *L. monocytogenes* σε τέσσερις θερμοκρασίες (12, 20, 30, 37 °C) και σε πλούσιο, μέτριο και πτωχό θρεπτικό υπόστρωμα (BHI, TSB, Nutrient Broth, HTM). Τα αποτελέσματα έδειξαν πώς ο σχηματισμός βιοϋμενίου μειώθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας, η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος σχετίστηκε άμεσα με τον ορότυπο (π.χ. ο σχηματισμός βιοϋμενίου των ορότυπων 1/2b και 1/2a ήταν αυξημένος σε σχέση με τον ορότυπο 4b σε πλούσιο θρεπτικό υπόστρωμα), αλλά η προέλευση των στελεχών (ζωικής, βιομηχανία γάλακτος ή ανθρώπινη) δεν επηρέασε το σχηματισμό. Οι Agarwal *et al.*, (2011) μελέτησαν την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου διαφόρων στελεχών *Salmonella spp.* σε ζωμό Luria-Bertani για 48 h και αναφέρουν ότι η πλειοψηφία των στελεχών (87, 57.61 %) βρέθηκε να σχηματίζει μέτριο βιοϋμένιο, ενώ τα 34 (22.52 %) και 29 (19.21 %) στελέχη, ασθενές και ισχυρό, αντίστοιχα. Εν κατακλείδι, όλα τα στελέχη της *L. monocytogenes* είναι ικανά να σχηματίσουν βιοϋμένιο, ενώ υπάρχει υψηλή διαστελεχιακή (inter-strain) μεταβλητότητα σε επίπεδο σχηματισμού το οποίο συνάδει και με άλλα ευρήματα (Borucki *et al.*, 2003; Di Bonaventura *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2007; Pan *et al.*, 2009). Επιπλέον, η θερμοκρασία επώασης φαίνεται είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τον σχηματισμό του βιοϋμενίου, καθώς επίσης και το θρεπτικό υπόστρωμα και ο ορότυπος των στελεχών (Di Bonaventura *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2009).

Επίσης, επιλέχθηκαν δύο στελέχη *L. monocytogenes*, τα B-169 και B-454, έτσι ώστε να σχηματίσουν βιοϋμένιο σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα παρουσία (50 mM) και απουσία (0 mM) μηλεϊνικού οξέως και σε pH 5 και 7, στους 15 °C. Στο pH 5, παρουσία μηλεϊνικού οξέως, το στέλεχος B-169 επέδειξε σημαντικά μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε σχέση με απουσία αυτού. Ωστόσο, αντίστοιχες παρατηρήσεις δεν έγιναν στο pH 7, όπου το στέλεχος B-169 παρουσίασε παρόμοια

ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου παρουσία και απουσία μηλεϊνικού οξέως. Το στέλεχος B-454 δεν φάνηκε να επηρεάζεται από το οργανικό οξύ, παρουσιάζοντας, γενικά, μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, σε σχέση με το πρώτο στέλεχος και στις δύο τιμές pH που εξετάστηκαν. Οι [Giaouris et al., \(2014 a\)](#) αξιολόγησαν την προσαρμογή της *L. monocytogenes* σε οξέα (προσαρμογή με HCl και γαλακτικό οξύ), όσον αφορά τον σχηματισμό σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, στους 5 και 30 °C για 15 ημέρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα προσκολλημένα κύτταρα είχαν παρόμοιο πληθυσμό είτε ήταν προσαρμοσμένα είτε μη προσαρμοσμένα, δηλαδή δεν υπήρχε σημαντική επίδραση στην προσκόλληση και στις δύο θερμοκρασίες, ενώ την 5^η και 10^η ημέρα τα μη προσαρμοσμένα κύτταρα είχαν ελάχιστα περισσότερο προσκολλημένο πληθυσμό από τα προσαρμοσμένα, στους 30 °C σε σχέση με τους 5 °C. Επιπλέον, προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα κύτταρα *L. monocytogenes* σε pH 4.5 και 7.4 αφέθηκαν να σχηματίσουν βιοϋμένιο σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα στα συγκεκριμένα pH, παρουσία 0.5 και 5.5 % wt/v NaCl, στους 16 °C για 15 ημέρες. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι η απόκριση στην όξινη καταπόνηση (ATR) επηρέασε σημαντικά την προσκόλληση των κυττάρων στο pH 4.5, σε 0.5 και 5.5 % wt/v NaCl, με τα προσαρμοσμένα κύτταρα να σχηματίζουν περισσότερο βιοϋμένιο σε σχέση με τα μη προσαρμοσμένα ([Chorianopoulos et al., 2011 a](#)). Ωστόσο, αξίζει να σημειωθεί ότι η αντίσταση της *L. monocytogenes* στα οξέα είναι εξαρτώμενη από την φάση αύξησης, η οποία εκφράζεται κατά την είσοδο του βακτηρίου στην ακίνητη φάση (σχηματισμός βιοϋμενίου), ανεξάρτητα από τις συνθήκες pH που επικρατούν (γενική απόκριση στην καταπόνηση, General Stress Response, GSR) ([Davis et al., 1996](#)). Είναι γνωστό, πώς η εμφάνιση αντοχής, μετά την προσαρμογή σε οξέα, εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της φάσης αύξησης, τον τύπο, την συχνότητα της καταπόνησης, κτλ ([Koutsoumanis et al., 2003](#); [Lou and Yousef, 1997](#)), ενώ πλαγκτονικές ή στατικές συνθήκες αύξησης, επίσης φαίνεται να επηρεάζουν την απόκριση στην όξινη καταπόνηση των στελεχών *L. monocytogenes* ([Skandamis et al., 2012](#)). Επιπλέον, η γενική απόκριση στην καταπόνηση οφείλεται, εν μέρει, στην έκφραση γονιδίων που ελέγχεται από τον εναλλακτικό παράγοντα σ^B (alternative σ^B factor) ([Abram et al., 2008](#)). Οι [Koutsoumanis et al., \(2003\)](#) αναφέρουν πώς η *L. monocytogenes* που καλλιεργήθηκε σε στατική φάση και παρουσία γλυκόζης 1 % wt/v ήταν περισσότερο ανεκτική σε pH 3.5 σε σχέση με τα μη προσαρμοσμένα

κύτταρα. Είναι ενδιαφέρον ότι κύτταρα τα οποία είχαν προσαρμοστεί σε οξύ φαίνεται να διατηρούν την ανοχή τους στο οξύ ακόμα και μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης στους 4 °C (Phan-Thanh and Montagne, 1998). Ακόμη, ο σχηματισμός των βακτηρίων σε αβιοτικές επιφάνειες επηρεάζεται και από την παρουσία άλλων μικροοργανισμών, αλλά και από περιβαλλοντικούς παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία. Για παράδειγμα, οι Giaouris *et al.*, (2005) αναφέρουν πώς η *S. enterica* Enteritidis PT4, η οποία αφέθηκε να σχηματίσει βιοϋμένιο σε θερμοκρασίες 5, 20, 37 °C, pH 4.5, 5.5, 6.5, 7.5 και NaCl 0.5, 1.5, 5.5 και 10.5 % wt/v, σχημάτισε υψηλό βιοϋμένιο ($6 \log_{10}$ CFU / cm²) στους 20 °C, στις πιο ουδέτερες τιμές pH του θρεπτικού ζωμού BHI και σε χαμηλές τιμές ωσμωτικής πυκνότητας. Επιπλέον, η *L. monocytogenes* EGD-e αφέθηκε να σχηματίσει βιοϋμένιο, σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, στους 25 °C για 96 και 240 h παρουσία *S. aureus*. Ο πληθυσμός της, σε μικτή καλλιέργεια, δεν επηρεάστηκε από την παρουσία του *S. aureus*, ενώ ο *S. aureus* είτε αυξήθηκε είτε μειώθηκε παρουσία της *L. monocytogenes*, υποδηλώνοντας πώς ο σχηματισμός του εξαρτάται από το στέλεχος (Rieu *et al.*, 2008). Πράγματι, παρουσία βακτηρίων, όπως *Flavobacterium spp.* και *Staphylococcus spp.* δεν έχουν καμία επίδραση ή μειώνουν την προσκόλληση και την αύξηση βιοϋμενίων παθογόνων μικροοργανισμών σε επιφάνειες (Carpentier and Chassaing, 2004), λόγω της παραγωγής ανασταλτικών ουσιών και λόγω ανταγωνισμού για θέσεις προσκόλλησης και διατροφικές πηγές. Επιπλέον, η διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών, η οικοθέση και η έλλειψη ανταγωνισμού φυσικών βακτηριακών πληθυσμών μπορεί να ενισχύσει την προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών (Leriche and Carpentier, 2000). Επίσης, οι Norwood and Gilmour, (2000) αναφέρουν ότι παρουσία *P. fragi* και *S. xylosus*, η *L. monocytogenes* σχημάτισε βιοϋμένιο κατά 1.5 %, ενώ τα *P. fragi* και *S. xylosus* ήταν οι κυρίαρχοι μικροοργανισμοί κατά 59 και 39.5 %, αντίστοιχα. Επίσης, μελετήθηκε η προσκόλληση της *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξειδώτου χάλυβα, σε μικτό βιοϋμένιο με κοινά αλλοιογόνα βακτήρια, όπως τα *P. fluorescens*, *Serratia proteamaculans* και *Shewanella baltica*, σε στατικές συνθήκες (100 % RH, 15 °C, 48 - 72 h), καθώς και η επιβίωσή της σε συνθήκες ξήρανσης (43 % RH, 15 °C, 21 ημέρες). Τα Gram⁻ βακτήρια μείωσαν τον μέγιστο πληθυσμό της *L. monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο, ενώ αύξησαν την αδρανοποίησή της κατά τη διάρκεια των συνθηκών ξήρανσης. Ωστόσο, λόγω μεγαλύτερης αντοχής της *L. monocytogenes* στις συνθήκες ξήρανσης, το συγκεκριμένο βακτήριο επιβίωσε σε μεγαλύτερους τελικούς

πληθυσμούς σε σχέση με τα *P. fluorescens* και *S. baltica*. Αντίθετα, το βακτήριο *S. proteamaculans* παρουσίασε καλύτερο ποσοστό επιβίωσης στις συνθήκες ξήρανσης την 21^η ημέρα σε σχέση με την *L. monocytogenes* (Alavi and Hansen, 2013). Επιπλέον, οι Kostaki *et al.*, (2012), μελετώντας την *L. monocytogenes* και την *S. enterica* σε μικτό βιοϋμένιο στους 15 °C για 144 h, διαπίστωσαν πώς τα δύο είδη σχημάτισαν παρόμοιο βιοϋμένιο ($5 \log_{10}$ CFU / cm²), ενώ δεν υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ των στελεχών στο μικτό βιοϋμένιο. Τέλος, οι Dourou *et al.*, (2011) αναφέρουν ότι η σημασία της επίστρωσης μιας επιφάνειας, με θρεπτικά υλικά, έχει επίδραση στην προσκόλληση του *E. coli* O157:H7. Πιο συγκεκριμένα, το βακτήριο εμφάνισε μεγαλύτερη προσκόλληση, με φθίνουσα σειρά, σε αλεσμένο βόειο κρέας (στερεό), λίπος άπαχου κρέατος (υγρό) και TSB και στις δύο θερμοκρασίες που μελετήθηκαν (4, 15 °C), ενώ παρατηρήθηκε μειωμένη προσκόλληση της *L. monocytogenes* σε επιφάνειες επιστρωμένες με γιαούρτι, ενδεχομένως λόγω του χαμηλού pH (Poimenidou *et al.*, 2009). Ακόμη, η προσκόλληση της *L. monocytogenes* επηρεάζεται και από την θερμοκρασία, επομένως η προσκόλληση σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα ήταν υψηλότερη στους 20 °C σε σχέση με τους 5 °C (Poimenidou *et al.*, 2009). Τελικώς, θα μπορούσαμε να πούμε ότι η προσεκτική επιλογή του υλικού των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα μειώνει το ενδεχόμενο προσκόλλησης παθογόνων βακτηρίων, καθώς και τον κίνδυνο διασταυρούμενης επιμόλυνσης των τροφίμων σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων (Wilks *et al.*, 2006).

Όσον αφορά την σύγκριση των δύο μεθόδων σχηματισμού (μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου και πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα), θα μπορούσαμε να πούμε ότι η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων από τα στελέχη B-169 και B-454, σε pH 5 και 7, σε συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0 και 50 mM, στους 15 °C, διαφέρει. Για παράδειγμα, στο pH 5, στις μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου και τα δύο στελέχη σχημάτισαν μέτριο και ασθενές βιοϋμένιο στις συγκεντρώσεις 0 και 50 mM μηλεϊνικού οξέως, αντίστοιχα, ενώ στα πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα τα αποτελέσματα ήταν τελείως αντίθετα, με το στέλεχος B-169 να σχηματίζει ισχυρότατο βιοϋμένιο απουσία μηλεϊνικού οξέως, ενώ παρουσία του οξέως, να έχει σημαντική μείωση στον πληθυσμό, ενώ το στέλεχος B-454 σχημάτισε και αυτό παρόμοιο, βιοϋμένιο, σε χαμηλότερα επίπεδα όμως και στις δύο συγκεντρώσεις μηλεϊνικού οξέως. Επίσης, στο pH 7, στις μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, το στέλεχος B-169 σχημάτισε σημαντικά υψηλότερο βιοϋμένιο αυξανόμενης της

συγκέντρωσης μηλεϊνικού οξέως, ενώ το στέλεχος B-454 σχημάτισε ασθενές και στις δύο συγκεντρώσεις. Αντιθέτως, στα πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, και τα δύο στελέχη δεν φάνηκε να επηρεάζονται από το μηλεϊνικό οξύ, με το στέλεχος B-454 να παρουσιάζει, γενικά, μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, σε σχέση με το πρώτο στέλεχος. Γενικότερα, όσον αφορά τις μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, τα στελέχη με υψηλότερη προσκόλληση έχουν πιο έντονη χρώση και αυτό συμβαίνει διότι η χρώση με κρυσταλλικό ιώδες επηρεάζεται και από το εξωκυτταρικό πολυμερές της μήτρας των βιοϋμενίων (Pan *et al.*, 2010), γεγονός που μπορεί να επηρεάσει το τελικό αποτέλεσμα και να δώσει λανθασμένα αποτελέσματα. Επιπλέον, το πρόβλημα μέτρησης της οπτικής πυκνότητας είναι ότι στοχεύει και λαμβάνει μέτρηση από το κέντρο του βοθρίου, όπου το πάχος του βιοϋμενίου διαφέρει αρκετά σε σχέση με το υπόλοιπο βοθρίο, με αποτέλεσμα η μέτρηση να μην είναι ακριβής (Stepanović *et al.*, 2007). Όμως, είναι μια καλή και αξιόπιστη μέθοδος για δοκιμασίες ελέγχου που επιτρέπει την μελέτη μεγάλου αριθμού στελεχών ως προς τον σχηματισμό βιοϋμενίου σε διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους (da Silva and De Martinis, 2011), ενώ οι Stepanović *et al.*, (2003) αναφέρουν πώς χρώση με 0.5 % κρυσταλλικού ιώδους έχει καλύτερα αποτελέσματα σε σύγκριση με το 1.0 %. Τελικά, οι διαφορές στον σχηματισμό βιοϋμενίου που υπάρχουν σε σχέση με τις διαφορετικές μεθόδους, οφείλεται και στην υδροφοβικότητα των υλικών, αλλά και της επιφάνειας των κυττάρων η οποία διαδραματίζει καίριο ρόλο στην προσκόλληση (Zottola and Sasahara, 1994; Palmer *et al.*, 2007; Shi and Zhu, 2009), ενώ ενισχύεται από την παρουσία νηματοειδών αποφύσεων και μαστιγίων, τα οποία επηρεάζουν τον ρυθμό και την έκταση της προσκόλλησης (Palmer *et al.*, 2007; Shi and Zhu, 2009; Simões *et al.*, 2010).

Επιπλέον, για την όσο το δυνατόν πιο αξιόπιστη αξιολόγηση της απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι των ώριμων (144 h) βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes*, υπό κάθε πειραματική συνθήκη (θερμοκρασία, pH, παρουσία ή απουσία μηλεϊνικού οξέως), χρησιμοποιήθηκαν ταυτόχρονα δύο μέθοδοι: η πρώτη βασίζονταν στην κλασική μέθοδο αποκόλλησης των κυττάρων από τις επιφάνειες του ανοξειδωτού χάλυβα μέσω στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortexing method) και επακόλουθης καλλιέργειας των ανακτώμενων κυττάρων σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα BHI για την απαρίθμηση των αποικιών (plate counting), ενώ η δεύτερη βασίζονταν σε μετρήσεις αγωγιμότητας (conductance measurements).

Πιο συγκεκριμένα, αρχικά καταμετρήθηκαν οι εναπομείναντες πληθυσμοί με την χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια. Η επίδραση του μέσου απολύμανσης στα βακτήρια εκφράστηκε με την λογαριθμική μείωση του πληθυσμού τους. Σύμφωνα με τα ληφθέντα αποτελέσματα, η απολυμαντική δράση του μηλεϊνικού οξέως φάνηκε να εξαρτάται από το εξεταζόμενο στέλεχος αλλά και την προηγούμενη έκθεση του σχηματισθέντος βιοϋμενίου στο οργανικό οξύ. Πιο συγκεκριμένα, το βιοϋμένιο του στελέχους B-196, το οποίο σχηματίστηκε παρουσία μηλεϊνικού οξέως, παρουσίασε αυξημένη ανθεκτικότητα (- 27.80 %) κατά την απολύμανση με το οργανικό οξύ σε συγκέντρωση 10 mM, σε σχέση με το βιοϋμένιο το οποίο σχηματίστηκε απουσία του οξέως (- 59.90 %). Από την άλλη πλευρά, αντίστοιχες ή παρόμοιες παρατηρήσεις δεν έγιναν για το στέλεχος B-454 (- 32.00 και - 43.70 %, αντίστοιχα). Όμως, εφαρμογή συγκέντρωσης 20 mM μηλεϊνικού οξέως σχεδόν εξάλειψε (- 100 %) τα προσαρμοσμένα, στο οξύ, κύτταρα και των δύο στελεχών, ενώ τα μη προσαρμοσμένα μειώθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης των 2 log₁₀ CFU / cm², με το στέλεχος B-169 να έχει σημαντικά υψηλότερο πληθυσμό σε σχέση με το B-454. Επιπρόσθετα, εφαρμογή συγκεντρώσεων μεγαλύτερων των 20 mM είχαν απόλυτη αποτελεσματικότητα, μειώνοντας τελείως τους πληθυσμούς και των δύο στελεχών (προσαρμοσμένων και μη προσαρμοσμένων, στο οξύ, κυττάρων). Έρευνες αναφέρουν πώς υπήρχε σημαντική αύξηση στην δυστροφία των μη προσαρμοσμένων κυττάρων *L. monocytogenes*, για όλες τις θεραπείες με οξέα (HCl ή γαλακτικό οξύ για 6 min), για όλες τις θερμοκρασίες επώασης (5 ή 30 °C) και για όλες τις ημέρες δειγματοληψίας (15 ημέρες). Παράλληλα, μετά από 60 min απολύμανσης με τα συγκεκριμένα οξέα, ανεξάρτητα από την προσαρμογή, το ασθενές οργανικό γαλακτικό οξύ εμφάνισε σημαντικά ισχυρότερη αντιμικροβιακή δράση, σε σύγκριση με το ισχυρό ανόργανο υδροχλωρικό οξύ (σε pH 2). Επομένως, η προσαρμογή της *L. monocytogenes* σε οξέα, κατά τη διάρκεια της πλαγκτονικής αύξησης, διατηρείται ακόμη και μετά από 15 ημέρες επώασης σε χαμηλές και μέτριες συνθήκες θερμοκρασίας και έχει ως αποτέλεσμα την αυξημένη δυστροφία των βιοϋμενικών κυττάρων σε θανατηφόρες συγκεντρώσεις απολυμαντικών (Giaouris *et al.*, 2014 a). Επίσης, σχηματισθέντα βιοϋμένια *L. monocytogenes* στους 5, 16 και 30 °C για 10 ημέρες (προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα κύτταρα σε HCl και γαλακτικό οξύ), παρουσίασαν θετική επίδραση (προσαρμοσμένα κύτταρα) και αντοχή στην απολύμανση με τα συγκεκριμένα οξέα, ενώ 1 % v/v αιθέριο έλαιο *Satureja*

thymbra, καθώς και 100 % v/v υδροκολλοειδές αυτού, είχαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι των συγκεκριμένων βιοϋμενίων (Giaouris *et al.*, 2014 c). Το ίδιο αιθέριο έλαιο χρησιμοποίησαν και οι Chorianopoulos *et al.*, (2008), καθώς και HCl (pH 3), γαλακτικό οξύ (pH 3) και NaOH (pH 11), έναντι μικτών βιοϋμενίων *S. simulans*, *L. fermentum*, *P. putida*, *S. enterica* και *L. monocytogenes*, τα οποία σχηματίστηκαν για 5 ημέρες στους 16 °C σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα. Οι απολυμάνσεις εφαρμόστηκαν για 60 και 180 min. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη, δηλαδή τα αιθέρια έλαια παρουσίασαν ισχυρότατη αντιμικροβιακή δράση και προκάλεσαν μέγιστη λογαριθμική μείωση, ενώ τα χημικά απολυμαντικά δεν είχαν ικανοποιητική δράση, ακόμη και μετά από εφαρμογή 180 min. Ακόμη, οι de Oliveira *et al.*, (2012) χρησιμοποίησαν αιθέρια έλαια κανέλλας έναντι βιοϋμενίων (μικτών και μονοκαλλιέργειας) *E. coli* (EPEC) και *L. monocytogenes*, σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, σε TSB, στους 37 °C για 48 h. Χρησιμοποιήθηκαν συγκεντρώσεις 0.00 - 1.00 % v/v αιθέριου ελαίου κανέλλας και 0.00 - 0.80 % v/v κινναμολδεϋδης για 1 - 21 min. Τα αιθέρια έλαια αποδείχθηκαν ισχυρά ως προς την καταπολέμηση των βιοϋμενίων, με ισοδύναμη ή / και ανώτερη αποτελεσματικότητα με τα εμπορικά χημικά απολυμαντικά. Επιπλέον, οι Nostro *et al.*, (2010) αξιολόγησαν το αιθέριο έλαιο ρίγανης, την καρβακρόλη και τη θυμόλη, έναντι βιοϋμενίων *S. aureus* και *S. epidermidis* σε επιφάνειες πολυστυρένιου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα αιθέρια έλαια θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια αποτελεσματική εναλλακτική και οικολογικά φιλική λύση για απολύμανση βιοϋμενίων (Chorianopoulos *et al.*, 2008; de Oliveira *et al.*, 2012). Οι Vaid *et al.*, (2010) χρησιμοποίησαν αέριο διοξείδιο του χλωρίου (CD), υδατικό διοξείδιο του χλωρίου (CD) και υδατικό υποχλωριώδες νάτριο (SHC) για να αδρανοποιήσουν βιοϋμένια πολυκαλλιέργειας πέντε στελεχών *L. monocytogenes*. Βιοϋμένιο 4 ημερών, το οποίο είχε σχηματισθεί σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, σε 100 % RH, στους 22 °C, απολυμάνθηκε με 0.3 mg / l αέριο διοξείδιο του χλωρίου, 7 mg / l υδατικό διοξείδιο του χλωρίου και 50 mg / l υποχλωριώδες νάτριο (σε 75 % RH). Τα αποτελέσματα έδειξαν πώς δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην μείωση των πληθυσμών μετά από 10 min εφαρμογής και πώς χαμηλά επίπεδα διοξειδίου του χλωρίου είχαν παρόμοιο αποτέλεσμα με εφαρμογή υψηλών συγκεντρώσεων υποχλωριώδους νατρίου. Η χρήση 50 ppm χλωριούχου βενζαλκονίου (BAC) έναντι πολυκαλλιέργειας *L. monocytogenes* και *P. putida*, σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα,

δεν αδρανοποίησε αποτελεσματικά την *L. monocytogenes* σε μονοκαλλιέργεια, ενώ η παρουσία της αύξησε της αντίσταση του *P. putida*. Ακόμη, το χλωριούχου βενζαλκόνιου θανάτωσε, κυρίως, την *L. monocytogenes* στην πολυκαλλιέργεια, παρά το γεγονός ότι το βιοϋμένιο αποτελούνταν κατά 90 % από *P. putida* (Giaouris *et al.*, 2013 b). Επίσης, οι Belessi *et al.*, (2011) χρησιμοποίησαν υπεροξυοξικό οξύ (2 % PAA) για 1, 2, 3, 6 και 20 min. Ο πληθυσμός της *L. monocytogenes* δεν ανιχνεύθηκε μετά από 6 min εφαρμογής υπεροξυοξικού οξέως, ενώ τα βιοϋμένια που σχηματίστηκαν στους 20 °C ήταν πιο ανθεκτικά στο απολυμαντικό από εκείνα που σχηματίστηκαν στους 5 °C. Επίσης, η παρουσία NaCl, στο θρεπτικό μέσο αύξησης, δεν επηρέασε την αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού. Ακόμη, προσαρμοσμένα και μη προσαρμοσμένα κύτταρα σε οξέα, τα οποία σχημάτισαν βιοϋμένιο σε TSBYE με pH 5 και 7 στους 4 °C, απολυμάνθηκαν με χλωρίνη (0.465 % Cl⁻), τεταρτογενές αμμώνιο (1 % QAC) και υπεροξυοξικό οξύ (2 % PAA). Η αντίσταση των κυττάρων ακολούθησε την εξής σειρά: AA-5.0 > NA-7.0 ≥ AA-7.0 > NA-5.0 (όπου AA: προσαρμοσμένα κύτταρα και NA: μη προσαρμοσμένα κύτταρα). Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό ήταν το τεταρτογενές αμμώνιο, ακολουθούμενο από το υπεροξυοξικό οξύ και την χλωρίνη. Ακόμη, οι Park *et al.*, (2012) εφάρμοσαν αερόλυμα απολυμαντικών ενάντια σε βιοϋμένια *E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* και *L. monocytogenes*, τα οποία είχαν σχηματισθεί σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα και πλακίδια πολυβινυλοχλωριδίου (PVC). Βιοϋμένιο 6 ημερών, σχηματισθέν στους 25 °C, απολυμάνθηκε με υποχλωριώδες νατρίου (SHC, 100 ppm) και υπεροξικό οξύ (PA, 100, 200, και 400 ppm) για 5, 10, 30 και 50 min. Η απολύμανση με υπεροξικό οξύ (100 ppm) ήταν η πιο αποτελεσματική σε σύγκριση με το υποχλωριώδες νάτριο, σε υψηλό χρόνο εφαρμογής. Έκθεση σε 100 ppm υποχλωριώδους νατρίου και υπεροξικού οξέως μείωσε σημαντικά τους πληθυσμούς και των τριών παθογόνων, ενώ οι πληθυσμοί μειώθηκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης μετά από 10 και 30 min έκθεσης. Επιπρόσθετα, έρευνα αναφέρει πώς νανοδομή TiO₂ πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα και γυαλί είναι μια εναλλακτική μέθοδος απολύμανσης βιοϋμενίων *L. monocytogenes* (σχηματισμός στους 16 °C για 10 ημέρες), διότι ο πληθυσμός της, σε γυαλί, μειώθηκε κατά 3 log₁₀ CFU / cm² μετά την ενεργοποίηση της νανοδομής με υπεριώδη ακτινοβολία (UVA, 315 - 400 nm) (Chorianopoulos *et al.*, 2011 b). Επίσης, οι Sharma *et al.*, (2005) πραγματοποίησαν μελέτη με στόχο την αδρανοποίηση του *E.*

coli O157:H7, σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα, με τη βοήθεια αλκαλικών καθαριστικών και βακτηριοφάγων. Τα κύτταρα ($10^7 - 10^8$ CFU / τεμάχιο) προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια και επώαστηκαν στους 22 °C για 96 h. Υποβλήθηκαν σε θεραπεία με 25 και 100 % συγκέντρωση εμπορικού αλκαλικού διαλύματος, ελεύθερο χλωρίου, στους 4 °C για 1 - 3 min. Η θεραπεία με 100 % συγκέντρωση εμπορικού αλκαλικού διαλύματος μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό κατά 5 - 6 \log_{10} CFU / τεμάχιο, σε σύγκριση με το δείγμα-μάρτυρα. Τα πλαγκτονικά κύτταρα μειώθηκαν με θεραπεία βακτηριοφάγου KH1, αλλά τα κύτταρα του βιοϋμενίου δεν μειώθηκαν δραματικά, δείχνοντας πώς ο βακτηριοφάγος δεν παρέχει αποτελεσματική λυτική ή ενζυμική δράση στα βιοϋμενικά κύτταρα, στους 4 °C. Οι [Cabo et al., \(2009\)](#) συνέκριναν τα αποτελέσματα της επίδρασης του όζοντος, της νισίνης και του χλωριούχου βενζαλκονίου για την εξάλειψη πλαγκτονικών κυττάρων, καθώς και βιοϋμενίων του *S. aureus*, σε επιφάνειες πολυπροπυλενίου. Η μέγιστη επίδραση των απολυμαντικών προσδιορίστηκε συνδυάζοντας τον χρόνο έκθεσης στο κάθε απολυμαντικό στον οποίο παρατηρήθηκε η μέγιστη θνησιμότητα (LD₉₀ : δόση που προκαλεί 90 % θνησιμότητα). Το χλωριούχο βενζαλκόνιο και το όζον ήταν τα πιο αποτελεσματικά έναντι των βιοϋμενίων, ενώ η εφαρμογή 250 IU / ml νισίνης ή 1 μg / g ιονισμένου νερού είχε ως αποτέλεσμα την θνησιμότητα κατά 99 % μετά από 2 min έκθεσης. Συμπερασματικά, η νισίνη και το όζον θα μπορούσαν να αποτελέσουν μια εναλλακτική λύση απολυμαντικών για την πρόληψη της δημιουργίας βιοϋμενίων, ενώ το όζον θα μπορούσε να είναι κατάλληλο για την βιομηχανία, λόγω του μεγάλου φάσματος βιοκτόνου δράσης και της υψηλής τιμής απόσβεσης. Σε άλλη μελέτη, οι [Viazis et al., \(2011\)](#) προσδιόρισαν την επίδραση ενός μίγματος βακτηριοφάγων (BEC8, Οικογένεια Caudovirales) έναντι των βιοϋμενίων *E. coli* O157:H7 (EHEC) σε ανοξειδωτο χάλυβα, κεραμικά πλακίδια και υψηλής πυκνότητας πολυεθυλένιο. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το μίγμα βακτηριοφάγων ήταν αποτελεσματικό μετά από 1 h δράσης έναντι χαμηλών επιπέδων *E. coli* O157:H7 (κύτταρα-υποδοχείς), σε θερμοκρασίες δωματίου και για τις τρεις επιφάνειες. Τέλος, οι [Nguyen and Yuk, \(2013\)](#) μελέτησαν την δράση διάφορων απολυμαντικών έναντι βιοϋμενίων του *S. Typhimurium*, συμπεριλαμβανομένης και της αύξησης σε επιφάνειες, όπως ο ανοξειδωτός χάλυβας και το ακρυλικό, σε διαφορετικές συνθήκες (pH = 6 - 7, T = 28, 27, 42 °C). Τα απολυμαντικά που δοκιμάστηκαν ήταν οι ενώσεις τεταρτογενούς αμμωνίου (QAC, 200 ppm), η μίξη υπεροξικού / οργανικού οξέως (PAO, 0.1 %) και

το υποχλωριώδες νάτριο (χλώριο, 50 ppm). Το χλώριο ήταν το πιο αποτελεσματικό απολυμαντικό, ακολουθούμενο από το τεταρτογενές αμμώνιο και τη μίξη υπεροξικού / οργανικού οξέως. Ακόμη, οι [Baca et al., \(2009\)](#), [Ballal et al., \(2009\)](#) και [Ferrer-Lugue et al., \(2010\)](#) αναφέρουν πώς συγκέντρωση 7 % μηλεϊνικού οξέως είναι η πιο αποτελεσματική για την καταπολέμηση των βιοϋμενίων του βακτηρίου *Enterococcus faecalis* από την οδοντίνη και τον ριζικό σωλήνα, την ανατομική περιοχή, δηλαδή, μέσα στη ρίζα του δοντιού (οδοντιατρική χρήση). Συμπερασματικά, η απολύμανση είναι μια ουσιαστική διαδικασία για την βιομηχανία τροφίμων, διότι προλαμβάνει την προσκόλληση παθογόνων μικροοργανισμών στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων ή / και εξαλείφει διάφορους μικροοργανισμούς (παθογόνους ή αλλοιωγόνους), ενώ ανεπαρκής καθαρισμός και απολύμανση επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, ανεπαρκής χρόνος δράσης ή / και περιορισμένη προσβασιμότητα των απολυμαντικών σε ορισμένες περιοχές ([Pan et al., 2006](#), [Skandamis et al., 2009](#)), μπορεί να οδηγήσουν στην συσσώρευση βακτηριακών κυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών, όπως η *L. monocytogenes* και συνεπώς να αυξήσουν την δυσκολία πλήρους απομάκρυνσής τους ([Shi and Zhu, 2009](#)).

Όσον αφορά τις μετρήσεις αγωγιμότητας, ο χρόνος ανίχνευσης ορίζεται ως το χρονικό διάστημα μεταξύ της έναρξης της παρακολούθησης της αγωγιμότητας (από το όργανο Malthus) και την αρχή της φάσης επιτάχυνσης των τιμών της. Η διάρκεια αυτού του χρόνου σχετίζεται με την αρχική βακτηριακή συγκέντρωση στους δοκιμαστικούς σωλήνες Malthus, την κινητική αύξησης του μικροοργανισμού και τις ιδιότητες του μέσου αγωγιμότητας ([Silley and Forsythe, 1996](#); [Chorianopoulos et al., 2008](#); [2010](#), [2011 b](#); [Giaouris et al., 2014 c](#)). Στην παρούσα μελέτη, δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις 500, 300, 100, 70, 50, 30, 10 και 0 mM μηλεϊνικού οξέως, ως απολυμαντικό. Οι χρόνοι ανίχνευσης για τις συγκεντρώσεις 500, 300, 100, 70, 50 και 30 mM ήταν μηδενικοί, γεγονός που υποδηλώνει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων. Προφανώς, οι χρόνοι ανίχνευσης είναι συνάρτηση του εναπομείναντος πληθυσμού που είναι προσκολλημένος στα πλακίδια του ανοξειδωτού χάλυβα, όμως για να δώσει το όργανο καταγραφής χρόνο ανίχνευσης, τα κύτταρα πρέπει να κυμαίνονται από 10^6 - 10^7 CFU / ml ([Silley and Forsythe, 1996](#); [Yang and Bashir, 2008](#)). Επομένως, υπάρχει μια αρνητική γραμμική συσχέτιση μεταξύ του πληθυσμού των βακτηρίων και του χρόνου ανίχνευσης, δηλαδή υψηλός πληθυσμός συνεπάγεται μικρό χρόνο ανίχνευσης, αποτελέσματα τα οποία συμφωνούν

και με άλλες παρόμοιες μελέτες, οι οποίες χρησιμοποίησαν αντιμικροβιακούς παράγοντες, όπως αιθέρια έλαια και φαινολικές ουσίες για τον προσδιορισμό της αναστολής βακτηρίων ή διάφορα θρεπτικά υποστρώματα για ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για προσδιορισμό θερμοάντοχων βακτηρίων streptococci σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα (Bütler and Reuter, 1984; Deak and Beuchat, 1993; Deak and Beuchat, 1994; Tassou *et al.*, 1994; Tassou *et al.*, 1995; Flint *et al.*, 1997; Flint *et al.*, 1999; Chorianopoulos *et al.*, 2008; 2010, 2011 b).

Τέλος, αναφορικά με τη σύγκριση των δύο μεθόδων αξιολόγησης της απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι των επιλεγμένων στελεχών του παθογόνου, η μέθοδος του στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια στηρίζεται στη διάσπαση του βιοϋμενίου προκειμένου να απελευθερωθούν τα κύτταρα για να απαριθμηθούν. Όμως, το μεγάλο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δεν αποκολλά τελείως το σχηματισμένο βιοϋμένιο από τα πλακίδια του ανοξειδωτου χάλυβα, με αποτέλεσμα να μην καταμετράται πλήρως ο βιοϋμενικός πληθυσμός των βακτηρίων (Giaouris *et al.*, 2005). Οι μέθοδοι αγωγιμότητας μετρούν την παραγωγή ιοντικών ενώσεων στο μέσο αύξησης (π.χ. BHI), σαν μια ένδειξη της μεταβολικής δραστηριότητας των αναπτυσσόμενων μικροοργανισμών (Silley and Forsythe, 1996). Η συγκεκριμένη μέθοδος μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για την έμμεση ποσοτικοποίηση των εναπομείναντων βιοϋμενικών κυττάρων των στελεχών της *L. monocytogenes* μετά την απολύμανσή τους με μηλεϊνικό οξύ. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η ικανότητά της να ανιχνεύει βιοϋμενικά κύτταρα που δεν μπορούν να ανακτηθούν μέσω της μεθόδου του στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια, παρέχοντας έτσι έναν πιο απλό, γρήγορο και αξιόπιστο τρόπο (Giaouris *et al.*, 2005) αξιολόγησης της απολυμαντικής δράσης του μηλεϊνικού οξέως έναντι σχηματισθέντων βιοϋμενίων στελεχών *L. monocytogenes*.



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ



Τα παθογόνα βακτήρια είναι η κύρια πηγή επιμόλυνσης των τροφίμων και ο βασικός παράγοντας κρουσμάτων τροφιμογενών λοιμώξεων με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Ο σχηματισμός των βιοϋμενίων δεν εξαρτάται μόνο από τη γενετική βάση και ρύθμιση, αλλά και από τις ιδιότητες του υποστρώματος προσκόλλησης, τα βακτηριακά στελέχη, το περιβάλλον (π.χ. pH, θερμοκρασία), κτλ. Πράγματι, η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου από το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* εξαρτάται τόσο από το στέλεχος όσο και από τις δοκιμαζόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, παρουσία ή απουσία μηλεϊνικού οξέως), αλλά και από τις ιδιότητες της επιφάνειας προσκόλλησης. Όμως, η έρευνα δείχνει ότι τα βακτήρια είναι δύσκολο να εξαλειφθούν από τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα και ενέχουν κίνδυνο διασταυρούμενης επιμόλυνσης αυτών τόσο κατά την παραγωγική διαδικασία όσο και κατά μήκος της εφοδιαστικής αλυσίδας. Ωστόσο, η τακτική καθαριότητα και η απολύμανση θεωρούνται ο καλύτερος τρόπος πρόληψης. Έτσι, λοιπόν, η απολυμαντική δράση του μηλεϊνικού οξέως φαίνεται να εξαρτάται από το εξεταζόμενο στέλεχος αλλά και την προηγούμενη έκθεση του σχηματισθέντος βιοϋμενίου στο οργανικό οξύ. Συμπερασματικά, το μηλεϊνικό οξύ παρουσιάζει αξιόλογο αντιβιοϋμενικό δυναμικό έναντι του παθογόνου βακτηρίου *L. monocytogenes* τόσο σε επίπεδο σχηματισμού βιοϋμενίων όσο και απολύμανσης αυτών, με την ακριβή του δράση, ωστόσο, να εξαρτάται σημαντικά από το στέλεχος του βακτηρίου και τις συνθήκες εφαρμογής, ενώ μπορεί να αποτελέσει ένα εναλλακτικό απολυμαντικό μέσο για την βιομηχανία τροφίμων. Συνοψίζοντας, τα αποκτηθέντα αποτελέσματα τονίζουν το ρόλο των περιβαλλοντικών συνθηκών στον φυσιολογικό μηχανισμό σχηματισμού βιοϋμενίου από την *L. monocytogenes*, ο οποίος φαίνεται πως είναι αρκετά ευμετάβλητος. Άρα, φαινόμενα προσαρμογής και ενισχυμένης ανθεκτικότητας των κυττάρων παθογόνων μικροοργανισμών κατά την έκθεσή τους στο οργανικό οξύ ενδέχεται να υπάρξουν και, ως εκ τούτου, θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την εφαρμογή στρατηγικών απολύμανσης του εξοπλισμού επεξεργασίας τροφίμων. Επομένως, λαμβάνοντας υπόψη την αντίσταση των βιοϋμενίων στις διάφορες αντιμικροβιακές θεραπείες, επιβάλλονται διάφορες προληπτικές στρατηγικές, όπως η Ορθή Υγιεινή Πρακτική (GHP), η κατάλληλη επιλογή των υλικών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα και η σωστή επιλογή και χρήση απολυμαντικών με στόχο την μείωση της πιθανότητας δημιουργίας αυτών σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων.



6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ



6.1 Ξενόγλωσση

Aarnisalo, K., Salo, S., Miettinen, H., Suihko, M. L., Wirtanen, G., Autio, T., Lundén, J., Korkeala, H., Sjöberg, A. M. (2000). Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. *Journal of Food Safety* 20. 237 - 250.

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., Chihib, N. E. (2014). Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 196. 453 - 472.

Abee, T. and Wouters, J. A. (1999). Microbial stress response in minimal processing. *International Journal of Food Microbiology* 50. 65 - 91.

Abram, F., Karatzas, K. A. G., Matlawska-Wasowska, K., Boyd, A., Wiedmann, M., Boor, K. J., Connally, D., O'Bryne, C. P. (2008). Identification of Components of the Sigma B Regulon in *Listeria monocytogenes* That Contribute to Acid and Salt Tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 74. N° 22. 6848 - 6858.

Agarwal, R. K., Singh, S., Bhilegaonkar, K. n., Singh, V. P. (2011). Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal* 18 (4): 1493 - 1498.

Alavi, H. E. D. and Hansen, L. T. (2013). Kinetics of biofilm formation and desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in single and dual species biofilms with *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia proteamaculans* or *Shewanella baltica* on food-grade stainless steel surfaces. *Biofouling*. Vol. 29. N° 10. 1253 - 1268.

Baca, p., Junco, P., Arias-Moliz, M. T., González-Rodríguez, M. P., Ferrer-Luque, C. M. (2011). Residual and Antimicrobial Activity of Final Irrigation Protocols on *Enterococcus Faecalis* Biofilm in Dentin. *Basic Research-Technology*. JOE. Vol. 37. N° 3.

Ballal, N. V., Kandian, S., Mala, K., Bbat, K. S., Acbarya, S. (2009). Comparison of the Efficacy of Maleic Acid and Ethylenediaminetetraacetic Acid in Smear Layer Removal from Instrumented Human Root Canal: A Scanning Electron Microscopic Study. *Basic Research-Technology*. JOE. Vol. 35. N° 11.

Bassler, B. L. (1999). How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology* 2. 582 - 587.

Bassler, B. L. and Losick, R. (2006). Bacterially Speaking. *Review*. Cell 125.

- Beales, (2004).** Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH, and Osmotic Stress: A Review. Vol. 3.
- Belessi, C. E. A., Gounadaki, A. S., Psomas, A. N., Skandamis, P. N. (2011).** Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. International Journal of Food Microbiology 145. 46 - 52.
- Borucki, M. K., Peppin, J. D., White, D., Loge, F., Call, D. R. (2003).** Variation in Biofilm Formation among Strains of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. Vol 69. N° 12. 7336 - 7342.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. (2011 b).** Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. Biofouling. Vol. 27. N° 9. 1017 - 1032.
- Bridier, A., Briandet, R., Thomas, V., Dubois-Brissonnet, F. (2011 a).** Comparative biocidal activity of peracetic acid, benzalkonium chloride and ortho-phthalaldehyde on 77 bacterial strains. Journal of Hospital Infection 78. 208 - 213.
- Brooks, J. D. And Flint, S. H. (2008).** Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. International Journal of Food Science and Technology 43. 2163 - 2176.
- Bucher, H. J. and Weerkamp, A. H. (1987).** Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. FEMS Microbiology Reviews 46. 165 - 173.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., Kjelleberg, S. (2006).** Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 72. N° 6. 3916 - 3923.
- Bütler, M. and Reuter, G. (1984).** Impedance measurement as a rapid method for the determination of the microbial contamination of meat surfaces, testing two different instruments. International Journal of Food Microbiology 1. 113 - 125.
- Cabo, M. L., Herrera, J. J., Crespo, M. D., Pastoriza, L. (2009).** Comparison among the effectiveness of ozone, nisin and benzalkonium chloride for the elimination of planktonic cells and biofilms of *Staphylococcus aureus* CECT4459 on polypropylene. Food Control 20. 521 - 525.
- Carpentier, B. and Cerf, O. (2011).** Review - Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. International Journal of Food Microbiology 145. 1 - 8.

Carpentier, B. and Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology* 97. 111 - 122.

Chae, M. S. and Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology* 62. 103 - 111.

Chae, M. S., Schraft, H., Hansen, L. T., Mackereth, R. (2006). Effects of physicochemical surface characteristics of *Listeria monocytogenes* strains on attachment to glass. *Food Microbiology* 23. 250 - 259.

Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M. N., Hebraud, M. (2002). *Listeria monocytogenes* LO28: Surface Physicochemical Properties and Ability To Form Biofilms at Different Temperatures and Growth Phases. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68. N° 2. 728 - 737.

Chmielewski, R. A. N and Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*. Vol. 2.

Chorianopoulos, N., Giaouris, E., Grigoraki, I., Skandamis, P. N., Nychas, G. J. E. (2011 b). Effect of acid tolerance response (ATR) on attachment of *Listeria monocytogenes* Scott A to stainless steel under extended exposure to acid or / and salt stress and resistance of sessile cells to subsequent strong acid challenge. *International Journal of Food Microbiology* 145. 400 - 406.

Chorianopoulos, N., Giaouris, E., Kourkoutas, Y., Nychas, G. J. E. (2010). Inhibition of the Early Stage of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Biofilm Development on Stainless Steel by Cell-Free Supernatant of a *Hafnia alvei* Culture. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 76. N°6. 2018 - 2022.

Chorianopoulos, N., Giaouris, E., Skandamis, P. N., Haroutounian, S. A., Nychas, G. J. E. (2008). Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. *The Society for Applied Microbiology. Journal of Applied Microbiology* 104. 1586 - 1596.

Chorianopoulos, N., Tsoukleris, D. S., Panagou, E. Z., Falaras, P., Nychas, G. J. E. (2011 a). Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for

Listeria monocytogenes biofilm disinfection in food processing. Food Microbiology 28. 164 - 170.

Cocolin, L., Stella, S., Nappi, R., Bozzetta, E., Cantoni, C., Comi, G. (2005). Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. International Journal of Food Microbiology 103. 167 - 178.

Costerton, J. W. (1995). Overview of microbial biofilms. Journal of Industrial Microbiology 15. 137 - 140.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. Vol. 284. www.sciencemag.org.

Cotter, P. D. and Hill, C. (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram⁺ Bacteria to Low pH. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. 67. N° 3. 429 - 453.

Cotter, P. D., Gahan, C. G. M., Hill, C. (2001). A glutamate decarboxylase system protects *Listeria monocytogenes* in gastric fluids. Molecular Microbiology 40 (2). 465 - 475.

da Silva, E. P. and De Martinis, E. C. P. (2011). Current knowledge and perspectives on biofilm formation: the case of *Listeria monocytogenes*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97. 957 - 968.

Davey, M. E. and O'Toole, G. E. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiology and Molecular Biology reviews. 847 - 867.

Davis, M. J., Coote, P. J., O'Bryne, C. P. (1996). Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. Microbiology 142. 2975 - 2982.

de Oliveira, M. M., Brugnera, D. F., do Nascimento, J. A., Batista, N. N., Piccoli, R. H. (2012). Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. Eur. Food Res. Technol. 234 821 - 832.

Deak, T. and Beuchat, L. R. (1993). Use of indirect conductimetry for predicting growth of food spoilage yeasts under various environmental conditions. Journal of Industrial Microbiology. 12. 301 - 308.

Deak, T. and Beuchat, L. R. (1994). Use of indirect conductimetry to predict the growth of spoilage yeasts, with special consideration of *Zygosaccharomyces bailii*. International Journal of Food Microbiology 23. 405 - 417.

- Di Bonaventura, G., Piccolomini, R., Paludi, D., D’Orio, V., Vergara, A., Conter, M., Ianieri, A. (2008).** Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. The Society for Applied Microbiology. Journal of Applied Microbiology 104. 1552 - 1561.
- Djordjević, D., Wiedmann, M., McLandsborough, L. A. (2002).** Microtiter Plate Assay for Assessment of *Listeria monocytogenes* Biofilm Formation. Applied and environmental Microbiology. Vol. 68. N° 6. 2950 - 2958.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002).** Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clinical Microbiology Reviews. 167 - 193.
- Dourou, D., Beauchamp, C. S., Yoon, Y., Geornas, I., Belk, K. E., Smith, G. C., Nychas, G. J. E., 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.
- Dunne Jr, W. M. (2002).** Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? Focus. Clinical Microbiology Reviews. 155 - 166.
- Feehily, C. and Karatzas, K. A. G. (2013).** Role of glutamate metabolism in bacterial responses towards acid and other stresses: Review. Journal of Applied Microbiology 114. 11 - 24.
- Ferrer-Luque, C. M., Arias-Moliz, M. T., González-Rodríguez, M. P., Baca, P. (2010).** Antimicrobial Activity of Maleic Acid and Combinations of Cetrimide with Chelating Agents against *Enterococcus Faecalis* Biofilm. Basic Research-Technology. JOE. Vol. 36. N° 10.
- Flint, S. H., Brooks, J. D., Bremer, P. J. (1997).** Use of Malthus conductance growth analyser to determine numbers of thermophilic streptococci on stainless steel. Journal of Applied Microbiology 83. 335 - 339.
- Flint, S. H., van der Elzen, H., Brooks, J. D., Bremer, P. J. (1999).** Removal and inactivation of thermo-resistant streptococci colonising stainless steel. International Dairy Journal 9. 429 - 436.
- Gahan, C. G. M. and Hill, C. (2005).** Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection: Review. Journal of Applied Microbiology 98. 1345 - 1353.

- Gandhi, M. and Chikindas, M. L. (2007).** Review: *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology 113. 1 - 15.
- Giaouris, E. and Nychas, G. J. E. (2005).** The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability. Food Microbiology 23. 747 - 752.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Doulgeraki, A., Nychas, G. J. E. (2013 b).** Co - Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. Vol. 8. Issue 10. www.plosone.org.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E. (2005).** Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. Journal of Food Protection, Vol. 68. N° 10. 2149 - 2154.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E. (2014 a).** Impact of acid adaptation on attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel during long-term incubation under low or moderate temperature conditions and on subsequent recalcitrance of attached cells to lethal acid treatments. International Journal of Food Microbiology 171. 1 - 7.
- Giaouris, E., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E. (2014 c).** Acquired acid adaptation of *Listeria monocytogenes* during its planktonic growth enhances subsequent survival of its sessile population to disinfection with natural organic compounds. Food Research International 64. 896 - 900.
- Giaouris, E., Heir, E., Desvaux, M., Hébraud, M., Møretø, T., Langsrud, S., Doulgeraki, A., Nychas, G. J. E., Kačaniová, M., Czaczyk, K., Ölmez, H., Simões, M. (2015).** Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens: Review. Frontiers in Microbiology. Vol. 6. Article 841. www.frontiersin.org.
- Giaouris, E., Heir, E., Hébraud, M., Chorianopoulos, N., Langsrud, S., Møretø, T., Habimana, O., Desvaux, M., Renier, S., Nychas, G. J. E. (2014 b).** Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. Meat Science 97. 298 - 309.

- Gounadaki, A. S., Skandamis, P. N., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. (2008).** Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiology* 25. 313 - 323.
- Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y. Y., Gymoese, P., Vogel, B. F. (2007).** Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. *Food Control* 18. 1165 - 1171.
- Grau, R., Sánchez, A. J., Girón, G., Iborra, E., Fuentes, A., Barat, J. M. (2011).** Nondestructive assessment of freshness in packaged sliced chicken breasts using SW-NIR spectroscopy. *Food Research International*. 44. 331 – 337.
- Griffiths, M. W. (1994).** Rapid methods for assessing microbiological quality of foods. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*. 3. 291 - 308.
- Harvey, J., Keeman, K. P., Gilmour, A. (2007).** Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology* 24. 380 - 392.
- Hill, C., Cotter, P. D., Sleator, R. D., Gahan, C. G. M. (2002).** Bacterial stress response in *Listeria monocytogenes*: jumping the hurdles imposed by minimal processing. *International Dairy Journal* 12. 273 - 283.
- Hood, S. K. and Zottola E. A. (1995).** Biofilms in food processing: Review. *Food Control*. Vol. 6. N° 1. 9 - 18.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M., Pace, N. R. (1998).** Impact of Culture-Independent Studies on the Emerging Phylogenetic View of Bacterial Diversity. *Journal of Bacteriology*. Vol. 180, No 18. 5765 - 4774.
- James, G. A., Beaudette, L., Costerton, J. W. (1995).** Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 15. 257 - 262.
- Kadam, S. R., der Besten, H. M. W., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., Abee, T. (2013).** Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology* 165. 259 - 264.
- Karatzas, K. A. G., Brennan, O., Heavin, S., Morrissey, J., O’Byrne, C. P. (2010).** Intracellular Accumulation of High Levels of γ -Aminobutyrate by *Listeria monocytogenes* 10403S in Response to Low pH: Uncoupling of γ -Aminobutyrate Synthesis from Efflux in a Chemically Defined Medium. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 76. N° 11. 3529 - 3537.

- Karatzas, K. A. G., Suur, L., O’Byrne, C. P. (2012).** Characterization of the Intracellular Glutamate Decarboxylase System: Analysis of Its Function, Transcription, and Role in the Acid Resistance of Various Strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 3571 - 3579.
- Kim, Y. J., Kim, M. H., Song, K. B. (2009 a).** Efficacy of aqueous chlorine dioxide and fumaric acid for inactivating pre-existing microorganisms and *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* on broccoli sprouts. *Food Control* 20. 1002 - 1005.
- Kim, Y. J., Kim, M. H., Song, K. B. (2009 b).** Combined treatment of fumaric acid with aqueous chlorine dioxide or UV-C irradiation to inactivate *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, and *Listeria monocytogenes* inoculated on alfalfa and clover sprouts. *LWT - Food Science and Technology* 42. 1654 - 1658.
- Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Brahou, E., Nychas, G. J. E., Giaouris, E. (2012).** Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2586 - 2595.
- Koutsoumanis, K. P. and Sofos, J. N. (2004).** Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology* 38. 321 - 326.
- Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., Sofos, J. N. (2003).** Effect of Food Processing-Related Stresses on Acid Tolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 69. N^o 12. 7514 - 7516.
- Kumar, C. G. and Anand, S. K. (1998).** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* 42. 9 - 27.
- Lasa, I. (2006).** Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development: Research Review. *International Microbiology* 9. 21 - 28.
- Laskin, A. I., Sariasiani, S., Gadd, G. M. (2008).** Advances in Applied Microbiology. Vol. 65. Chapter 3: **Ryan, S., Hill, C., Gahan, C. G. (2008).** Acid Stress Responses in *Listeria monocytogenes*. 67 - 91. Chapter 5: **O’Byrne, C. P. and Karatzas, K. A. (2008).** The Role of Sigma B (σ^B) in the Stress Adaptations of

Listeria monocytogenes: Overlaps Between Stress Adaptation and Virulence. 116 - 140.

Lerich, V. and 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.

Lerich, 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 (1). 64 - 71.

Lerich, V., Chassaing, D., Carpentier, B. (1999). Behaviour of *Listeria monocytogenes* in an artificially made biofilm of a nicin-producing strain of *Lactococcus lactis*. International Journal of Food Microbiology 51. 169 - 182.

Lianou, A. and 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.

Lou, Y. and Yousef, A. E. (1997). Adaptation to Sublethal Environmental Stresses Protects *Listeria monocytogenes* against Lethal Preservation Factors. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 63. N° 4. 1252 - 1255.

Lu, H. J., Breidt, F., Pérez-Díaz, I. (2013). Development of an Effective Treatment for a 5-Log Reduction of *Escherichia coli* in Refrigerated Pickle Products. Journal of Food Science. Vol. 78. N° 2.

Madigan, M., T., Martinko, J., M., Parker, J. (2007). Βιολογία των μικροοργανισμών. Κεφάλαιο 6: Μικροβιακή Αύξηση. σελ. 168-169. Τόμος Ι. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Mah, T. F. C. and O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology. Vol 9. N° 1.

Maillard, J. Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement 92. 16 - 27.

Marshall, K. C., Stout, R., Mitchell, R. (1971). Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria on surfaces. Journal of General Microbiology. 337 - 348.

McDonnell, G. and Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. Clinical Microbiology Reviews. Vol. 12. N° 1. 147 - 179.

- Melo, J., Andrew, P. W., Faleiro, M. L. (2015).** *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Research International* 67. 75 - 90.
- Meyer, B. (2003).** Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International Biodeterioration and Biodegradation* 51. 249 - 253.
- Miller, M. B. and Bassler, B. L. (2001).** Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55. 165 - 99.
- Montville, J. T. and Matthews, K. R. (2010).** Μικροβιολογία Τροφίμων. Μέρος III. Gram⁺ Παθογόνα Βακτήρια που Δημιουργούνται στα Τρόφιμα. Κεφάλαιο 13. *Listeria monocytogenes*. 191 - 209.
- Møreth, T. and Langsrud, S. (2004).** *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments: Review Article. *Biofilms* 1. 107 - 121.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., Foster, K. R. (2008).** The sociobiology of biofilms: Review Article. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiol. Rev.* 33. 206 - 224.
- Nguyen, H. D. N. and Yuk, H. G. (2013).** Changes in resistance of *Salmonella Typhimurium* biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control* 29. 236 - 240.
- Norwood, D. E. and Gilmour, A. (2000).** The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *Journal of Applied Microbiology* 88. 512 - 520.
- Nostro, A., Roccaro, A. S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M. A., Pizzimenti, F. C., Cioni, P. L., Procopio, F., Blanco, R. (2010).** Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Journal of Medical Microbiology* 56. 519 - 523.
- O'Driscoll, B., Gahan, C. G. M., Hill, C. (1996).** Adaptive Acid Tolerance Response in *Listeria monocytogenes*: Isolation of an Acid-Tolerant Mutant Which Demonstrates Increased Virulence. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62. N° 5. 1693 - 1698.
- Pace, J. L., Rupp, M. E., Finch, R. G. (2006).** Biofilms, Infection, and Antimicrobial Therapy. Section I: Biofilms: Background, Significance, and Roles of Catheters and Indwelling Devices. Chapter 1: **Jiang, X. and Pace, J. L. (2006).** *Microbial Biofilms*. 3 - 19.

- Palmer, J., Flint, S., Brooks, J. (2007).** Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34. 577 - 588.
- Pan, Y., Breidt Jr., F. Kathariou, S. (2006).** Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 72. N° 12. 7711 - 7717.
- Pan, Y., Breidt Jr., F. Kathariou, S. (2009).** Competition of *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains in Mixed-Culture Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 75. N° 18. 5846 - 5852.
- Pan, Y., Breidt Jr., F., Gorski, L. (2010).** Synergistic Effects of Sodium Chloride, Glucose, and Temperature on Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Serotype 1/2a and 4b Strains. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 76. N° 5. 1433 - 1441.
- Park, S. H., Cheon, H. L., Park, K. H., Chung, M. S., Choi, S. H., Ryu, S., Kang, D. H. (2012).** Inactivation of biofilm cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. *International Journal of Food Microbiology* 154. 130 - 134.
- Parlapani F. F., Meziti A., Kormas K. Ar., Boziaris I. S. (2013).** Indigenous and spoilage microbiota of farmed sea bream stored in ice identified by phenotypic and 16S rRNA gene analysis. *Food Microbiology.* 33. 85 - 89.
- Parsek, M. R. and Greenberg, E. P. (2005).** Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology.* Vol 13. N° 1.
- Percival, S. L., Knottenbelt, D. C., Cochrane, C. A. (2011).** Biofilms and Veterinary Medicine. **Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H., Williams, D. W. (2011).** Introduction to Biofilms. 41 - 68. Series Editor: Costerton, J. W.
- Phan-Thanh, L. and Montagne, A. (1998).** Physiological and biochemical aspects of the acid survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44. 183 - 191.
- Poimenidou, S., Belessi, C., Giaouris, E., Gounadaki, A. S., Nychas, G. J. E., Skandamis, P. N. (2009).** *Listeria monocytogenes* Attachment to and Detachment from Stainless Steel Surfaces in a Simulated Dairy Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology.* Vol. 75. N° 22. 7182 - 7188.
- Poulsen, L. V. (1999).** Microbial Biofilm in Food Processing. Review. *Lebensm.-Wiss. u. - Technol.* 32. 321 - 326.

- Renier, S., Hébraud, M., Desvaux, M. (2011).** Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet of an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen: Minireview. *Environmental Microbiology* 13 (4). 835 - 850.
- Rieu, A., Lemaître, J. P., Guzzo, J., Piveteau, P. (2008).** Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology* 126. 76 - 82.
- Romanova, N. A., Gawande, P. V., Brovko, L. Y., Griffiths, M. W. (2007).** Rapid methods to assess sanitizing efficacy of benzalkonium chloride to *Listeria monocytogenes* biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 71. 231 - 237.
- Samelis, J., Ikeda, J. S., Sofos, J. N. (2003).** Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1 % glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 295. 563 - 575.
- Sharma, M., Ryu, J. H., Beuchat, L. R. (2005).** Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology* 99. 449 - 459.
- Shelp, B. J., Bown, A. W., McLean, M. D. (1999).** Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science Reviews*. Vol. 4. N° 11.
- Shi, X. and Zhu, X. (2009).** Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology* 20. 407 - 413.
- Silley, P. and Forsythe, S. (1996).** Impedance microbiology - a rapid change for microbiologists. *Journal of Applied Bacteriology*. 80. 233 - 243.
- Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2010).** A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology* 43. 573 - 583.
- Skandamis, P. N. and Nychas, G. J. E. (2012).** Quorum Sensing in the Context of Food Microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 78. N° 16. 5473 - 5482.
- Skandamis, P. N., Gounadaki, A. S., Geornas, I., Fofos, J. N. (2012).** Adaptive acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* strains under planktonic and immobilized growth conditions. *International Journal of Food Microbiology* 159. 160 - 166.

- Skandamis, P. N., Stopforth, J. D., Yoon, Y., Kendall, P. A., Sofos, J. N. (2009).** Heat and Acid Tolerance Responses of *Listeria monocytogenes* as Affected by Sequential Exposure to Hurdles during Growth. *Journal of Food Protection*, Vol. 72. N° 7. 1412 -1418.
- Skandamis, P. N., Yoon, Y., Stopforth, J. D., Kendall, P. A., Sofos, J. N. (2008).** Heat and acid tolerance of *Listeria monocytogenes* after exposure to single and multiple sublethal stresses. *Food Microbiology* 25. 294 - 303.
- Smirnova, T. A., Didenko, L. V., Azizbekyan, R. R., Romanova, Y. M. (2010).** Structural and Functional Characteristics of Bacterial Biofilms: Review. *Microbiology*. Vol. 79. N° 4. 413 - 423.
- Sofos, J. N. and Geornaras, I. (2010).** Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in nonintact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science* 86. 2 - 14.
- Srey, S., Jahid, I. K., Ha, S. D. (2013).** Biofilm formation in food industries: A food safety concern: Review. *Food Control* 31. 572 - 585.
- Stepanović, S., Ćirković, I., Švabić-Vlahović, M. (2004).** Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology* 38. 428 - 432.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. (2000).** A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods* 40. 175 - 179.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., Ruzicka, F. (2007).** Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115. 891 - 899.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S., Klapper, I. (2002).** Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 29. 361 - 367.
- Sutherland, I. W. (2001 a).** The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology*. Vol. 9. N° 5.
- Sutherland, I. W. (2001 b).** Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147. 3 - 9.

- Tassou, C. C. and Nychas, G. J. E. (1994).** Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Olive Phenolics in Broth and in a Model Food System. *Journal of Food Protection*. Vol. 57. N° 2. 120 - 124.
- Tassou, C. C., Drosinos, E. H., Nychas, G. J. E. (1995).** Effects of essential oil from mint (*Mentha piperita*) on *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* in model food systems at 4 and 10 °C. *Journal of Applied Bacteriology* 78. 593 - 600.
- Tolker-Nielsen, T. and Molin, S. (2000).** Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microbial Ecology* 40. 75 - 84.
- Tresse, O., Leuret, V., Benezech, T., Faille, C. (2006).** Comparative evaluation of adhesion, surface properties, and surface protein composition of *Listeria monocytogenes* strains after cultivation at constant pH of 5 and 7. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* 101. 53 - 62.
- Vaid, R., Linton, R. H., Morgan, M. T. (2010).** Comparison of inactivation of *Listeria monocytogenes* within a biofilm matrix using chlorine dioxide gas, aqueous chlorine dioxide and sodium hypochlorite treatments. *Food Microbiology* 27. 979 - 984.
- van Houdt, R. and Michiels, C. W. (2010).** Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface: Review Article. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* 109. 1117 - 1131.
- Viazis, S., Akhtar, M., Feirtag, J., Diez-Gonzalez, F. (2011).** Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. *International Journal of Food Microbiology* 145. 37 - 42.
- Waters, C. M. and Bassler, B. L. (2005).** Quorum Sensing: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21. 319 - 46.
- Wilks, S. A., Michels, H. T., Keevil, C. W. (2006).** Survival of *Listeria monocytogenes* Scott A on metal surfaces: Implications for cross-contamination. *International Journal of Food Microbiology* 111. 93 - 98.
- Xavier, J. B. (2016).** Sociomicrobiology and Pathogenic Bacteria. <http://www.asmscience.org/MicrobiolSpectrum>.
- Yang, L. and Bashir, R. (2008).** Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances*. 26. 135 - 150.
- Zhao, X., Lin, C. W., Wang, J., Oh, D. H. (2014).** Advances in Rapid Detection Methods for Foodborne Pathogens. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24. (3). 297 - 312.

Zottola, E. A. and Sasahara, K. C. (1994). Microbial biofilms in the food industry - Sould they be a concerns?. International Journal of Food Microbiology 23. 125 - 148.

6.2 Ηλεκτρονική

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/m0375?lang=en®ion=GR>

(Ημερομηνία Πρόσβασης: 18.04.2017)

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/240745?lang=en®ion=GR>

(Ημερομηνία Πρόσβασης: 18.04.2017)

<https://shop.gbo.com/en/row/products/bioscience/microplates/96-well-microplates/>

(Ημερομηνία Πρόσβασης: 18.04.2017)

www.ika.com (Ημερομηνία Πρόσβασης: 18.04.2017)

6.3 Κοινοτική Νομοθεσία

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 16^{ης} Δεκεμβρίου 2008 που αφορά τα πρόσθετα τροφίμων.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 231/2012 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 9ης Μαρτίου 2012 σχετικά με τη θέσπιση προδιαγραφών για τα πρόσθετα τροφίμων που αναφέρονται στα παραρτήματα II και III του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ



Πίνακας Α. Σχηματισμός βιοϋμενίων στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου σε pH 3, 5 και 7 στους 15 και 30 °C. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις της οπτικής πυκνότητας (ΔOD = 580 nm) (n = 4).

30 °C	pH = 3		pH = 5		pH = 7	
	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
Strain						
FMCC_B-124	0.02	0.009	0.44	0.038	0.41	0.115
FMCC_B-125	0.09	0.028	0.54	0.187	0.36	0.094
FMCC_B-126	0.07	0.010	0.39	0.111	0.46	0.185
FMCC_B-127	0.02	0.010	0.62	0.066	0.67	0.224
FMCC_B-129	0.07	0.007	0.42	0.026	0.61	0.112
FMCC_B-130	0.04	0.006	0.54	0.118	0.50	0.204
FMCC_B-133	0.02	0.015	0.58	0.060	1.17	0.179
FMCC_B-157	0.01	0.045	0.54	0.096	1.49	0.193
FMCC_B-164	0.04	0.045	0.41	0.077	1.16	0.103
FMCC_B-165	0.10	0.024	0.43	0.020	0.95	0.170
FMCC_B-166	0.00	0.000	0.69	0.162	2.17	0.330
FMCC_B-169	0.01	0.031	0.56	0.095	0.94	0.377
FMCC_B-411	0.02	0.017	0.35	0.044	1.60	0.579
FMCC_B-454	0.00	0.000	0.59	0.035	0.75	0.174

15 °C	pH = 3		pH = 5		pH = 7	
	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
Strain						
FMCC_B-124	0.04	0.006	0.14	0.030	0.03	0.023
FMCC_B-125	0.11	0.023	0.14	0.073	0.19	0.051
FMCC_B-126	0.09	0.012	0.09	0.040	0.00	0.011
FMCC_B-127	0.03	0.013	0.21	0.064	0.07	0.017
FMCC_B-129	0.09	0.031	0.13	0.057	0.13	0.032
FMCC_B-130	0.07	0.020	0.10	0.014	0.04	0.006
FMCC_B-133	0.02	0.015	0.23	0.036	0.26	0.050
FMCC_B-157	0.16	0.034	0.28	0.103	0.21	0.021
FMCC_B-164	0.06	0.038	0.10	0.021	0.11	0.053
FMCC_B-165	0.11	0.024	0.25	0.113	0.12	0.018
FMCC_B-166	0.05	0.018	0.63	0.268	0.11	0.063
FMCC_B-169	0.02	0.018	0.24	0.094	0.05	0.046
FMCC_B-411	0.00	0.030	0.05	0.017	0.06	0.022
FMCC_B-454	0.03	0.011	0.21	0.042	0.03	0.043

Πίνακας Β. Σχηματισμός βιοϋμενίων στελεχών *L. monocytogenes* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου σε pH 5, 7 και παρουσία μηλεϊνικού οξέως 0, 3, 10 και 50 mM στους 15 και 30 °C. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις της οπτικής πυκνότητας ($\Delta OD = 580 \text{ nm}$) ($n = 4$).

30 °C		pH = 5							
		0mM		3mM		10mM		50mM	
Strain #	Code	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
1	FMCC_B-124	0.44	0.038	0.38	0.059	0.51	0.084	0.47	0.165
2	FMCC_B-125	0.54	0.187	0.39	0.270	0.42	0.100	0.39	0.170
3	FMCC_B-126	0.39	0.111	0.20	0.091	0.25	0.090	0.16	0.048
4	FMCC_B-127	0.62	0.066	0.36	0.074	0.49	0.105	0.32	0.104
5	FMCC_B-129	0.42	0.026	0.38	0.110	0.47	0.087	0.29	0.115
6	FMCC_B-130	0.54	0.118	0.39	0.059	0.36	0.032	0.40	0.061
7	FMCC_B-133	0.58	0.060	0.51	0.072	0.45	0.019	0.47	0.147
8	FMCC_B-157	0.54	0.096	0.39	0.058	0.33	0.031	0.42	0.153
9	FMCC_B-164	0.41	0.077	0.61	0.159	0.55	0.116	0.44	0.214
10	FMCC_B-165	0.43	0.020	0.49	0.164	0.61	0.111	0.38	0.014
11	FMCC_B-166	0.69	0.162	0.51	0.144	0.76	0.145	0.30	0.072
12	FMCC_B-169	0.56	0.095	0.33	0.065	0.43	0.093	0.11	0.052
13	FMCC_B-411	0.35	0.044	0.23	0.034	0.18	0.004	0.11	0.041
14	FMCC_B-454	0.59	0.035	0.28	0.031	0.22	0.047	0.18	0.087

30 °C		pH = 7							
		0mM		3mM		10mM		50mM	
Strain #	Code	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
1	FMCC_B-124	0.41	0.115	1.98	0.822	0.95	0.274	0.78	0.120
2	FMCC_B-125	0.36	0.094	0.94	0.261	0.96	0.406	0.79	0.023
3	FMCC_B-126	0.46	0.185	0.79	0.173	0.99	0.202	0.91	0.261
4	FMCC_B-127	0.67	0.224	0.85	0.178	1.00	0.098	0.93	0.073
5	FMCC_B-129	0.61	0.112	0.79	0.474	0.52	0.136	0.79	0.313
6	FMCC_B-130	0.50	0.204	0.89	0.111	0.74	0.188	0.16	0.029
7	FMCC_B-133	1.17	0.179	1.11	0.286	1.18	0.025	2.98	0.353
8	FMCC_B-157	1.49	0.193	1.02	0.062	1.07	0.166	#TIMH!	#TIMH!
9	FMCC_B-164	1.16	0.103	0.57	0.121	0.61	0.224	0.39	0.061
10	FMCC_B-165	0.95	0.170	0.81	0.198	0.65	0.023	0.74	0.225
11	FMCC_B-166	2.17	0.330	0.74	0.099	0.65	0.271	0.41	0.157
12	FMCC_B-169	0.94	0.377	0.34	0.099	0.68	0.426	0.31	0.134
13	FMCC_B-411	1.60	0.579	0.76	0.157	0.69	0.159	0.26	0.067
14	FMCC_B-454	0.75	0.174	0.32	0.034	0.27	0.105	0.18	0.013

15 °C		pH = 5							
		0mM		3mM		10mM		50mM	
Strain #	Code	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
1	FMCC_B-124	0.14	0.030	0.20	0.090	0.19	0.019	0.14	0.042
2	FMCC_B-125	0.14	0.073	0.11	0.024	0.12	0.044	0.10	0.023
3	FMCC_B-126	0.09	0.040	0.18	0.063	0.24	0.141	0.14	0.031
4	FMCC_B-127	0.21	0.064	0.26	0.082	0.12	0.025	0.12	0.013
5	FMCC_B-129	0.13	0.057	0.09	0.032	0.08	0.034	0.07	0.019
6	FMCC_B-130	0.10	0.014	0.04	0.014	0.03	0.018	0.02	0.004
7	FMCC_B-133	0.23	0.036	0.24	0.167	0.13	0.037	0.04	0.024
8	FMCC_B-157	0.28	0.103	0.15	0.076	0.07	0.025	0.07	0.030
9	FMCC_B-164	0.10	0.021	0.11	0.054	0.09	0.015	0.12	0.069
10	FMCC_B-165	0.25	0.113	0.25	0.064	0.11	0.030	0.06	0.056
11	FMCC_B-166	0.63	0.268	0.19	0.028	0.14	0.015	0.07	0.024
12	FMCC_B-169	0.24	0.094	0.04	0.015	0.02	0.002	0.08	0.053
13	FMCC_B-411	0.05	0.017	0.02	0.014	0.02	0.011	0.06	0.052
14	FMCC_B-454	0.21	0.042	0.03	0.022	0.01	0.008	0.03	0.010

15 °C		pH = 7							
		0mM		3mM		10mM		50mM	
Strain #	Code	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD	MEAN	SD
1	FMCC_B-124	0.03	0.023	0.28	0.101	0.28	0.069	0.24	0.026
2	FMCC_B-125	0.19	0.051	0.36	0.052	0.35	0.088	0.52	0.067
3	FMCC_B-126	0.00	0.011	0.23	0.069	0.14	0.030	0.31	0.103
4	FMCC_B-127	0.07	0.017	0.22	0.061	0.20	0.054	0.39	0.098
5	FMCC_B-129	0.13	0.032	0.12	0.073	0.09	0.027	0.15	0.017
6	FMCC_B-130	0.04	0.006	0.13	0.070	0.08	0.054	0.14	0.029
7	FMCC_B-133	0.26	0.050	0.25	0.064	0.20	0.105	0.41	0.252
8	FMCC_B-157	0.21	0.021	0.25	0.073	0.24	0.048	0.46	0.141
9	FMCC_B-164	0.11	0.053	0.14	0.046	0.13	0.018	0.13	0.024
10	FMCC_B-165	0.12	0.018	0.09	0.008	0.10	0.011	0.21	0.086
11	FMCC_B-166	0.11	0.063	0.08	0.028	0.08	0.025	0.21	0.071
12	FMCC_B-169	0.05	0.046	0.09	0.022	0.12	0.020	0.19	0.066
13	FMCC_B-411	0.06	0.022	0.05	0.007	0.04	0.018	0.06	0.022
14	FMCC_B-454	0.03	0.043	0.05	0.004	0.02	0.013	0.02	0.007

Πίνακας Γ. Σχηματισμός βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα σε pH 5, 7 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0, 50 mM, στους 15 °C. Παρουσιάζονται οι μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις του πληθυσμού (\log_{10} CFU / cm²) (n = 6).

pH = 5

B-169 (12)

Time (h)	Rep1			Rep2			0 mM		Rep1			Rep2			50 mM	
	a	b	c	a	b	c	MEAN	SD	a	b	c	a	b	c	MEAN	SD
3	4.35	4.06	4.46	3.90	4.21	4.13	4.18	0.200	4.13	3.95	3.87	3.71	3.67	3.56	3.81	0.207
24	5.44	5.08	5.26	5.46	5.29	5.30	5.30	0.136	4.43	4.51	4.44	4.27	4.35	4.45	4.41	0.085
72	5.84	5.74	5.67	5.25	5.59	5.39	5.58	0.221	4.97	4.86	4.96	4.17	3.91	4.17	4.51	0.474
144	6.36	6.80	6.69	6.01	6.30	6.07	6.37	0.318	4.17	4.11	4.52	4.19	3.99	3.87	4.14	0.221

pH = 5

B-454 (14)

Time (h)	Rep1			Rep2			0 mM		Rep1			Rep2			50 mM	
	a	b	c	a	b	c	MEAN	SD	a	b	c	a	b	c	MEAN	SD
3	3.62	3.89	4.11	3.72	4.10	4.13	3.93	0.219	3.99	3.70	3.73	3.60	3.61	3.79	3.74	0.144
24	4.62	4.68	4.45	4.39	4.69	4.61	4.57	0.123	4.55	4.49	4.26	4.46	4.47	4.34	4.43	0.106
72	4.24	4.38	4.39	4.03	4.21	4.46	4.29	0.157	4.32	4.39	4.50	4.16	4.14	3.77	4.22	0.255
144	3.73	4.52	4.50	4.66	4.92	4.83	4.53	0.423	4.29	4.42	4.30	3.93	3.94	4.13	4.17	0.203

pH = 7

B-169 (12)

<i>Time (h)</i>	<i>Rep1</i>			<i>Rep2</i>			0 mM		<i>Rep1</i>			<i>Rep2</i>			50 mM	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	MEAN	SD	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	MEAN	SD
3	4.80	4.75	4.51	3.99	4.21	4.37	4.44	0.313	4.68	4.39	4.46	4.16	4.19	4.33	4.37	0.191
24	4.88	4.84	4.98	4.72	5.02	4.91	4.89	0.107	4.68	4.84	4.29	4.64	4.74	4.39	4.60	0.211
72	4.39	4.98	4.36	4.29	4.60	4.03	4.44	0.322	3.71	3.85	4.36	4.89	5.07	5.14	4.50	0.627
144	6.62	5.97	-	6.50	5.91	6.38	6.28	0.319	6.97	6.52	6.47	6.60	6.50	6.39	6.58	0.206

pH = 7

B-454 (14)

<i>Time (h)</i>	<i>Rep1</i>			<i>Rep2</i>			0 mM		<i>Rep1</i>			<i>Rep2</i>			50 mM	
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	MEAN	SD	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	MEAN	SD
3	3.60	4.92	4.61	4.65	4.07	4.49	4.39	0.475	4.52	4.77	3.95	4.51	4.33	4.07	4.36	0.306
24	4.44	4.80	4.43	4.00	4.09	4.02	4.30	0.317	4.45	4.11	4.71	4.32	4.45	4.27	4.38	0.201
72	4.15	3.81	-	4.07	3.73	3.64	3.88	0.221	4.41	3.49	4.20	4.37	4.33	4.34	4.19	0.351
144	2.90	4.00	4.28	4.51	4.21	4.33	3.87	0.562	3.70	4.03	4.49	4.12	4.30	4.36	4.17	0.282

Πίνακας Δ. Λογαριθμική μείωση (\log_{10} CFU / cm^2) των ώριμων βιοϋμενίων επιλεγμένων στελεχών *L. monocytogenes* σε πλακίδια ανοξείωτου χάλυβα, σε pH 5 και συγκέντρωση μηλεϊνικού οξέως 0, 50 mM (κατά τη διάρκεια σχηματισμού βιοϋμενίου), στους 15 °C, μετά από έκθεσή τους σε διάφορες συγκεντρώσεις οργανικού οξέως (μηλεϊνικό οξύ). Οι τιμές παρουσιάζουν τους μέσους όρους \pm τυπικές αποκλίσεις (n = 4).

pH = 5									
B-169 (12)					B-454 (14)				
0 mM		50 mM			0 mM		50 mM		
<i>Disinfectant (mM)</i>	<i>MEAN</i>	<i>SD</i>	<i>MEAN</i>	<i>SD</i>	<i>Disinfectant (mM)</i>	<i>MEAN</i>	<i>SD</i>	<i>MEAN</i>	<i>SD</i>
0	6.30	0.101	4.28	0.075	0	4.49	0.531	4.29	0.128
10	2.53	0.099	3.09	0.445	10	2.53	0.376	2.92	0.096
20	1.59	0.385	0.00	0.000	20	1.03	0.000	0.00	0.000
30	0.00	0.000	0.00	0.000	30	0.00	0.000	0.00	0.000
40	0.00	0.000	0.00	0.000	40	0.00	0.000	0.00	0.000

B-169 (12)			B-454 (14)		
0 mM	50 mM		0 mM	50 mM	
<i>Disinfectant (mM)</i>	<i>% reduction</i>	<i>% reduction</i>	<i>Disinfectant (mM)</i>	<i>% reduction</i>	<i>% reduction</i>
10	59.9%	27.8%	10	43.7%	32.0%
20	74.8%	100.0%	20	77.1%	100.0%
30	100.0%	100.0%	30	100.0%	100.0%
40	100.0%	100.0%	40	100.0%	100.0%