



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

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

*«Εφαρμογή νανοτεχνολογίας για την απολύμανση επιφανειών βιομηχανίας
τροφίμων»*

ΧΡΙΣΤΙΝΑ Σ. ΚΑΜΑΡΙΝΟΥ

ΑΘΗΝΑ, 2018



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

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 ΝΥΧΑΣ¹

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

*«Εφαρμογή νανοτεχνολογίας για την απολύμανση επιφανειών βιομηχανίας
τροφίμων»*

ΧΡΙΣΤΙΝΑ Σ. ΚΑΜΑΡΙΝΟΥ

ΑΘΗΝΑ, 2018

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ – ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Εφαρμογή νανοτεχνολογίας για την απολύμανση επιφανειών βιομηχανίας τροφίμων»

ΧΡΙΣΤΙΝΑ Σ. ΚΑΜΑΡΙΝΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Γεώργιος-Ιωάννης Ε. Νυχάς, Καθηγητής (M.Sc., Ph.D.)
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευστάθιος Ζ. Πανάγου, Καθηγητής (M.Sc., Ph.D.)
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Αγάπη Δουλγεράκη, Ερευνήτρια (Ph.D.)
Ινστιτούτο Τεχνολογίας Αγροτικών Προϊόντων
Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός «ΔΗΜΗΤΡΑ»

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μικροοργανισμοί υπάρχουν κυρίως σε κοινότητες πολλαπλών ειδών στο φυσικό περιβάλλον. Τα περισσότερα βακτηριακά είδη μπορούν να σχηματίσουν μικροβιακές κοινότητες σε κάθε επιφάνεια με επαρκή υγρασία και θρεπτικά συστατικά που ονομάζονται βιοϋμένια. Σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, τόσο αλλοιογόνοι όσο και παθογόνοι μικροοργανισμοί προσκολλώνται στις επιφάνειες, επιβιώνουν, αναπτύσσονται και σχηματίζουν βιοϋμένια. Τα βιοϋμένια μικτών καλλιέργειών είναι συνήθως πιο σταθερά από αυτά των μονών καλλιέργειών, ενώ οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών κυττάρων έχει αποδειχθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στην αρχική προσκόλληση των κυττάρων, την ανάπτυξη, τη δομή ενός βιοϋμενίου, τη διασπορά των κυττάρων, καθώς και την αντοχή του βιοϋμενίου σε απολυμαντικές καταπονήσεις. Η ύπαρξη βιοϋμενίων αλλοιογόνων και παθογόνων μικροοργανισμών σε χώρους επεξεργασίας τροφίμων σχετίζονται με προβλήματα επιμόλυνσης των τροφίμων που οδηγούν στην μείωση της διάρκειας ζωής των προϊόντων και στη μετάδοση λοιμώξεων. Γι' αυτό κρίνεται πολύ σημαντικό να αναπτυχθούν σύγχρονες μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης και συστήματα ελέγχου σε μονάδες επεξεργασίας τροφίμων και περιβάλλοντα.

Αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η αξιολόγηση της απολυμαντικής δράσης ενός καινοτόμου απολυμαντικού με κύριο αντιμικροβιακό παράγοντα το νανοσωματίδιο TiO_2 , έναντι βιοϋμενίων. Για το σκοπό αυτό δημιουργήθηκαν βιοϋμένια από μονή και μικτή καλλιέργεια 3 τροφιμογενών παθογόνων βακτηρίων *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis και *Escherichia coli* με 10 είδη αλλοιογόνων βακτηρίων όπως *Serratia liquefaciens*, *Serratia proteomaculans*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Brochothrix thermosphacta*, *Leuconostoc* spp, *Lactobacillus sakei* και *Pseudomonas fragi* σε πλακίδια ανοξειδώτου εμβαπτισμένα σε θρεπτικό υπόστρωμα TSB για 6 ημέρες. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η ικανότητα του κάθε μικροοργανισμού να δημιουργεί βιοϋμένιο πάνω σε πλακίδια ανοξειδώτου χάλυβα, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στον σχηματισμό βιοϋμενίου (20°C και βέλτιστη θερμοκρασία ανά μικροοργανισμό) καθώς και η επίδραση που έχει η παρουσία μικτής καλλιέργειας κατά τον σχηματισμό τους. Στην συνέχεια τα βιοϋμένια διαβρέχθηκαν με απολυμαντικό και εκτέθηκαν στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2h για την κάθε πλευρά ξεχωριστά. Ως μάρτυρας αποτελεσματικότητας του απολυμαντικού χρησιμοποιήθηκε η δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας. η απαρίθμηση των βιοϋμενικών κυττάρων πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια.

Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι όλοι οι μικροοργανισμοί κατάφεραν και δημιούργησαν βιοϋμένια, και ότι η θερμοκρασία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην δημιουργία βιοϋμενίου, η έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία μείωνε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων τις περισσότερες φορές κάτω από το όριο ανίχνευσης και στις περιπτώσεις όπου δεν ήταν αποτελεσματική η δράση της, η παρουσία του απολυμαντικού ενίσχυε τη θανάτωση του βιοϋμενικού πληθυσμού. Τέλος παρατηρήθηκε ότι η παρουσία πάνω από ένα είδος μικροοργανισμών επηρεάζει τόσο την δημιουργία βιοϋμενίου όσο και τη θανάτωση των βιοϋμενικών κυττάρων κατά την έκθεση στην υπεριώδη ακτινοβολία και τη χρήση του απολυμαντικού παράγοντα.

Συμπερασματικά, η χρήση του απολυμαντικού με το φωτοκαταλυτικό παράγοντα TiO_2 ως εναλλακτικό τρόπο απολύμανσης μολυσμένων επιφανειών παρουσιάζει μια ενδιαφέρουσα περίπτωση η οποία με περαιτέρω ανάπτυξη μπορεί να προσφέρει ισχυρά μέσα απολύμανσης κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίων.

Λέξεις κλειδιά: Βιοϋμένια, παθογόνοι μικροοργανισμοί, αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί, μονοκαλλιέργεια, συγκαλλιέργεια, πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, υπεριώδη ακτινοβολία (UV), απολυμαντικό, TiO_2

ABSTRACT

Microorganisms exist in multi-species communities in the natural environment. Most bacterial species can form microbial communities on any surface with sufficient moisture and nutrients called biofilm. In food processing environments, both pathogenic and spoilage microorganisms adhere to the surfaces, survive, grow and form biofilm. Mixed species biofilm are usually more stable than mono species biofilm, whereas interactions between different cells have been shown to play an important role in the initial cell adhesion, growth, structure of a bio-cell, cell dispersion, and endurance of biofilm to disinfectant stresses. The existence of bio-contaminants of allogeneic and pathogenic microorganisms in food processing establishments is related to food contamination problems that lead to a reduction in the shelf life of products and the spread of infections. That is why it is very important to develop modern cleaning, new disinfection methods and control systems in food processing environments.

The aim of the present study was to evaluate the disinfecting action of an innovative disinfectant with the main antimicrobial factor TiO₂ nanoparticle, against biofilm. For this purpose biofilm were created from single and mixed culture of 3 food pathogenic bacteria *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica serovar. Enteritidis* and *Escherichia coli* with 10 species of spoilage bacteria such as *Serratia liquefaciens*, *Serratia proteomaculans*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Brochothrix thermophacta*, *Leuconostoc* spp, *Lactobacillus sakei* and *Pseudomonas fragi* in stainless steel troughs immersed in TSB broth for 6 days . In brief, the ability of each microorganism to form biofilm on stainless steel slides under different temperature conditions (20°C, optimum growth temperature for each microorganism), and the effect of the presence of mixed culture upon formation were studied. The biofilms were wetted with the disinfectant and exposed to ultraviolet radiation for 2h for each side separately. The effect of ultraviolet radiation on biofilm cells was used as a control of the effectiveness of the disinfectant. The biofilm cells were enumerated by the glass bead spinning method.

From the obtained results, it was showed that all micro-organisms were able to form biofilm, whereas the temperature seemed to play an important role in biofilm formation. Furthermore, the exposure to ultraviolet radiation reduced the population of biofilm cells below the limit of detection of the method in most cases, , whereas the used of the disinfectant strengthened the antimicrobial activity of UV. Finally, it was observed that the presence of more than one species affects both cell biofilm ability and their resistance to ultraviolet radiation and disinfectant.

In conclusion, the use of the disinfectant with the photocatalytic TiO₂ agent as an alternative way of disinfecting contaminated surfaces presents an interesting case which, with further development, can provide powerful disinfecting agents in the formation of biofilm.

Key words: Biofilm, pathogenic microorganisms, spoilage microorganisms, monoculture, co-culture, stainless steel, ultraviolet radiation (UV), disinfectant, TiO₂

Στην οικογένεια μου...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Αυτή η πτυχιακή εργασία αποτελεί τον επίλογο σε μία πορεία περίπου δύο ετών. Μία πορεία γεμάτη προσπάθειες, άγχη, δυσκολίες και επιτυχίες. Στην πορεία αυτή, υπήρξαν άνθρωποι που στάθηκαν δίπλα μου σε κάθε βήμα και σε κάθε προσπάθεια. Η παρουσία τους με βοήθησε κάθε στιγμή να εξελισσομαι ακόμα περισσότερο και να επιτυγχάνω κάθε στόχο μικρό ή μεγάλο, δύσκολο ή εύκολο. Οι καθηγητές, οι συμφοιτητές, οι φίλοι, αλλά και η οικογένειά μου ήταν πάντα εκεί για οτιδήποτε χρειάστηκα γι' αυτό και τους χρωστάω ένα μεγάλο ευχαριστώ.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα της μελέτης μου, και εξαιρετικό Καθηγητή, κ. Γεώργιο – Ιωάννη Νυχά, για την πολύτιμη βοήθειά του, την ευχάριστη διάθεση του και τη διαρκή υποστήριξή του, τόσο κατά τη διεξαγωγή του πειράματος όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας. Τον ευχαριστώ που μου έδωσε την ευκαιρία να ασχοληθώ με ένα θέμα που η ίδια ήθελα, καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον εξίσου εξαιρετικό Καθηγητή και μέλος της εξεταστικής μου επιτροπής κ. Ευστάθιο Ζ. Πανάγου.

Η παρούσα μελέτη εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Αγροτικών Προϊόντων (ΕΛΓΟ–ΔΗΜΗΤΡΑ), στη Λυκόβρυση Αττικής, γι' αυτό και θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τις Δρ. Χρυσούλα Τάσσου (Διευθύντρια Έρευνας), την Δρ Ανθούλα Αργύρη (Ερευνήτρια), την κα Πάτρα Σουρρή, την κα. Ελισάβετ Μητρέ και την κα. Γεωργία Χαρβούρου για την όλη τη βοήθειά τους, όσον αφορά την προμήθεια εργαστηριακού υλικού, την βοήθειά τους κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, καθώς και για τις εξαιρετικά χρήσιμες συμβουλές και την στήριξή τους.

Ένας άνθρωπος, ο οποίος στάθηκε δίπλα μου, και με βοήθησε να φτάσω στο τέλος αυτού του ταξιδιού, ήταν η ερευνήτρια Δρ Αγάπη Δουλγεράκη. Ένα μεγάλο λοιπόν ευχαριστώ στην Αγάπη, που ήταν διαθέσιμη κάθε στιγμή της μέρας, ανεξαρτήτως ωραρίων και εργασίας, έτοιμη να απαντήσει σε κάθε απορία μου και να με βοηθήσει σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα σχετικά με το πείραμά μου. Τόσο εντός, όσο και εκτός εργαστηρίου, δεν έπαψε στιγμή να με βοηθά, να με συμβουλεύει και να μου μεταδίδει όλες τις γνώσεις της, τις οποίες μπορεί κάποιες από αυτές να γνώριζα σε θεωρητικό επίπεδο, ωστόσο ήταν απαραίτητη η πρακτική εφαρμογή τους για την απόλυτη κατανόηση και κατάκτησή τους. Πρόκειται για έναν άνθρωπο, που χαρακτηρίζεται βαθιά από το όνομά του, καθώς αγαπά τόσο αυτό που κάνει, όσο και το να βοηθά όλους τους νέους, που είναι πρόθυμοι και διατεθειμένοι να μάθουν από εκείνη όσα πιο πολλά μπορούν για το αντικείμενό τους.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου, νέους και παλιούς, έχοντας πολλές φορές τις ίδιες ανησυχίες με εμένα, τόσο σε ακαδημαϊκό όσο και σε προσωπικό επίπεδο, στάθηκαν αρωγοί στην κάθε μου προσπάθεια για εύρεση λύσεων σε κάθε είδους πρόβλημα. Παρόλο που πολλές φορές η λύση έμοιαζε σαν κάτι άπιαστο, κάθε φορά η πιο ψύχραιμη πολλές φορές ματιά τους και το ειλικρινές ενδιαφέρον τους, έκανε τα πάντα να μοιάζουν πολύ απλά και πολύ εύκολα στην αντιμετώπιση. Έτσι θα ήθελα να ευχαριστήσω πολύ την παιδική μου φίλη Ιωάννα Μαρίνου για όλη την στήριξη της όλα αυτά τα χρόνια και όλους τις συμφοιτητές και πολύ καλούς φίλους που γνώρισα μέσω αυτού του μεταπτυχιακού και συγκεκριμένα τους Άσκα Ιωάννα, Δαγρέ Βαγγέλη, Κορομηλά Σωτήρη, Ουρανού Ελένη, Μάριου Μαρία, Σκαρλάτο Λεωνίδα και Σπυρέλλη Ευγενία για τις πολύ όμορφες στιγμές που περάσαμε αυτό το διάστημα.

Στην πορεία αυτή, σταθερός σύμμαχός μου ήταν, είναι και θα είναι πάντα η οικογένεια μου. Η βοήθειά τους, τόσο πρακτική όσο και ψυχολογική, αλλά και η διαρκής υποστήριξη, τόσο από τους γονείς μου, όσο και από την αδελφή μου, Αννίκα, λειτουργούν πάντα σαν εφιαλτήριο για νέες προσπάθειες και νέους στόχους, πιο δύσκολους και πιο υψηλούς. Αυτό το σημείωμα, είναι ένα ελάχιστο ευχαριστώ και μια μικρή αφιέρωση για όλα όσα μου προσφέρουν καθημερινά, μα κυρίως για την ηθική, ψυχολογική και συναισθηματική υποστήριξη, χωρίς την ύπαρξη της οποίας, μπορεί κατακτούσα τους ίδιους στόχους, αλλά με περισσότερο κόπο και με λιγότερο το αίσθημα της εκπλήρωσης και της ικανοποίησης.

Θέλω να τους ευχαριστήσω όλους θερμά, γιατί μπορεί η προσωπική επιθυμία για πρόοδο και επιτυχία να είναι μεγάλη, χωρίς όμως τη συμβολή αυτών των ανθρώπων, οι προσπάθειες μπορεί να απέβαιναν άκαρπες και δίχως ουσία. Τους ευχαριστώ, λοιπόν, και ελπίζω πολύ σύντομα, να μπορέσω να τους ανταποδώσω και να τους επιστρέψω, όσο είναι δυνατόν, ό,τι έχουν κάνει για μένα.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT.....	6
<i>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ</i>	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	20
1.1. Ιστορική ανασκόπηση	20
1.2. Ορισμός Βιοϋμενίου.....	22
1.3. Δομή Βιοϋμενίου.....	22
1.4. Κύκλος ζωής βιοϋμενίου.....	25
1.4.1. Προσκόλληση κυττάρων	25
1.4.1.1. Στάδια προσκόλλησης κυττάρων	25
1.4.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση	27
1.4.2. Σχηματισμός ώριμου βιοϋμενίου	33
1.4.3. Τελικά στάδια ανάπτυξης του βιοϋμενίου - Quorum sensing	34
1.4.4. Κατάρρευση και διασπορά του βιοϋμενίου	35
1.5. Βιοϋμένια σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων	36
1.6. Στρατηγικές ελέγχου Βιοϋμενίων	39
1.6.1. Πρόληψη σχηματισμού βιοϋμενίων.....	39
1.6.2. Καταπολέμηση βιοϋμενίων	39
1.6.2.1. Καταπολέμηση των βιοϋμενίων με χρήση νανοτεχνολογίας.....	40
1.6.2.2. Καταπολέμηση βιοϋμενίων με χρήση TiO ₂	41
1.6.2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού έναντι των βιοϋμενίων	43
2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	46
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
3.1. Βακτηριακά στελέχη	47
3.2. Σχηματισμός βιοϋμενίου σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα	48
3.2.1. Προετοιμασία εμβολίου	48
3.2.2. Επιφάνεια και συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου.....	50
3.2.3. Σχηματισμός βιοϋμενίου.....	51

3.2.4. Ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (Bead Vortexing)	52
3.3. Απολύμανση βιοϋμενίων	54
3.3.1. Απολυμαντικό διάλυμα.....	54
3.3.2. Διαδικασία απολύμανσης	54
3.3.3. Ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου ύστερα από χρήση απολυμαντικού	55
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
4.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων.....	56
4.1.1. Σχηματισμός βιοϋμενίου μονής καλλιέργειας	56
4.1.2. Σχηματισμός βιοϋμενίου σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης	57
4.1.3. Σχηματισμός μικτού βιοϋμενίου	58
4.2. Αξιολόγηση της απολυμαντικής δράσης έναντι βιοϋμενίων μονής/ μικτής καλλιέργειας ..	66
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	86

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Μικροβιακά είδη που παρουσιάστηκαν υπό μορφή βιοϋμενίου σε χώρους επεξεργασίας τροφίμων.....38

Πίνακας 2: Στελέχη βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη.....47

Πίνακας 3: Συνδυασμοί και κωδικοποίηση μικτών καλλιεργείων.....50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός εμβολίου (log cfu/ml) και αρχικός μικροβιακός πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων (log cfu/cm²). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός του εμβολίου και με κόκκινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων.....56

Διάγραμμα 2: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων με επώαση των κουπονιών στη βέλτιστη θερμοκρασία και πληθυσμός βιοϋμενικών κύτταρων όταν τα κουπόνια επώαστηκαν στους 20°C. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων επωασμένα στη βέλτιστη θερμοκρασία τους και με κόκκινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων επωασμένα στους 20°C.....57

Διάγραμμα 3: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *L.monocytogenes* σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα (log cfu/cm²). Οι στήλες με μπλε χρώμα (■) απεικονίζουν το πληθυσμό της συγκαλλιέργειας των δυο στελεχών *L.monocytogenes* (strain B128 + B129) και με κόκκινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* όταν αυτό βρίσκεται σε μικτή καλλιέργεια μαζί με άλλους μικροοργανισμούς.....59

Διάγραμμα 4: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Escherichia coli* σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα (log cfu/cm²). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός της συγκαλλιέργειας των δυο στελεχών *Escherichia coli* (strain 18 + 289) και με κόκκινο (■) ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Escherichia coli* όταν αυτός βρίσκεται σε μικτό βιοϋμενίο μαζί με άλλους μικροοργανισμούς.....60

Διάγραμμα 5: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *S. Enteritidis* σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα (log cfu/cm²). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός της συγκαλλιέργειας των δυο στελεχών *S. Enteritidis* (strain B56 και B287) και με κόκκινο (■) ο πληθυσμός των βιοϋμενικών

κυττάρων του μικροοργανισμού *S. Enteritidis* όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο μαζί με άλλους μικροοργανισμούς.....61

Διάγραμμα 6: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων πάνω σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα ($\log \text{cfu/cm}^2$). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων (Ent1, Ent2, Ent3, Ent4, Ent5) όταν αυτά ανέπτυξαν βιοϋμένιο σε μονοκαλλιέργεια, με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων των Εντεροβακτηρίων όταν αυτά σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, με πράσινο (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* και με μοβ (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Salmonella enterica* ser. Enteritidis.....62

Διάγραμμα 7: Πληθυσμός γαλακτικών βιοϋμενικών κυττάρων πάνω σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα ($\log \text{cfu/cm}^2$). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των δυο Γαλακτικών βακτηρίων (*strain B233 + B226*) όταν αυτά βρίσκονται σε βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας, με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων των Γαλακτικών όταν αυτά σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, με πράσινο (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* και με μοβ (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *S. Enteritidis*.....63

Διάγραμμα 8: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) πάνω στην επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *Brochothrix thermosphacta* B432, όταν αυτά σχημάτισαν σε βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας, με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *Brochothrix thermosphacta* B432 όταν αυτά σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, με πράσινο (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* και με μοβ (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Salmonella enterica* ser. Enteritidis.....64

Διάγραμμα 9: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Pseudomonas fragi* (B209) (P) πάνω σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων σε βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας, με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *Pseudomonas fragi* όταν αυτά σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, με πράσινο (■) όταν σχημάτισαν σε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *E. coli* και με μοβ (■) όταν ανέπτυξαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Salmonella enterica* ser. Enteritidis.....65

Διάγραμμα 10: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* B128 και B129 όταν αυτά βρίσκονται σε βιοϋμένιο μονή καλλιέργειας και σε μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes* που επέζησε ύστερα από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *L.monocytogenes* που επέζησαν ύστερα από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....67

Διάγραμμα 11: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *E. coli* B18 και B289 όταν αυτά σχημάτισαν βιοϋμένιο μονή καλλιέργειας και σε μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *E.coli* πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *E.coli* που επέζησε ύστερα από την εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *E.coli* που επέζησαν ύστερα από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....68

Διάγραμμα 12: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *S. Enteritidis* B56 και B287 όταν αυτά σχημάτισαν βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *S.Enteritidis* πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *S.Enteritidis* που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *S.Enteritidis* που επέζησαν μετά από την εφαρμογή απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....69

Διάγραμμα 13: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Serratia liquefaciens* B292 όταν σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent1 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent1 που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent1

που επέζησαν ύστερα από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....70

Διάγραμμα 14: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Serratia proteomaculans* B293 όταν αυτό ανέπτυξε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent2 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent2 που επέζησε μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent2 που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....71

Διάγραμμα 15: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* B294 όταν σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent3 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent3 που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent3 που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....72

Διάγραμμα 16: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Hafnia alvei* B295 όταν σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent4 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent4 που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent4 που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....73

Διάγραμμα 17: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Proteus vulgaris* B306 όταν αυτό ανέπτυξε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent5 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent5 που επέζησε μετά από έκθεση σε

υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent5 που επέζησαν μετά από απολυμαντικού απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....75

Διάγραμμα 18: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων των μικροοργανισμών *Leuconostoc* spp (LAB1) και *Lactobacillus sakei* (LAB2) τόσο ως μονοκαλλιέργειες όσο και σε μικτές καλλιέργειες με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς, μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων LAB1 και LAB2 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων LAB1 και LAB2 που επέζησε μετά από την εφαρμογή μόνο της υπεριώδους ακτινοβολίας και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων LAB1 και LAB2 που επέζησαν μετά από τη εφαρμογή απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....76

Διάγραμμα 19: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta* B432 όταν αυτό βρίσκεται σε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και σε μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Br1* πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *Br1* που επέζησε μετά από εφαρμογή μόνο της υπεριώδους ακτινοβολίας και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Br1* που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....77

Διάγραμμα 20: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων των μικροοργανισμών *Pseudomonas fragi* (B209) (*P*) τόσο ως μονοκαλλιέργεια όσο και σε μικτή καλλιέργεια με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς, μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *P* πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *P* που επέζησε μετά από την εφαρμογή μόνο της υπεριώδους ακτινοβολίας και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *P* που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας.....78

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

- Σχήμα 1:** Απεικόνιση πειραματικής διαδικασίας προετοιμασίας εμβολίου μονής/μικτής καλλιέργειας για σχηματισμό βιοϋμενίου σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα.....49
- Σχήμα 2:** Αποικόνιση πειραματικής διαδικασίας σχηματισμού βιοϋμενίου σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα.51
- Σχήμα 3:** Αποικόνιση πειραματικής διαδικασίας ποσοτικοποίησης βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια.....53
- Σχήμα 4:** Απεικόνιση απολυμαντικής διαδικασίας των κουπονιών.....55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1:** Ο Antonie van Leeuwenhoek και το μικροσκόπιο του, μέσω του οποίου πραγματοποίησε πολλές επιστημονικές μελέτες. (Sebastian, Anton. Dates in Medicine. The Parthenon Publishing Group, New York-London, 2000, p. 27.).....20
- Εικόνα 2:** Δομή βιοϋμενίου. Copyright Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Mont. Reprinted with permission.....23
- Εικόνα 3:** Βιοϋμένιο μικτής καλλιέργειας των μικροοργανισμών *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* και *Flavobacterium* spp. που αναπτύχθηκε σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα, κατόπιν χρωματίστηκε με 4,6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (DAPI) και εξετάστηκε με μικροσκοπία επιφθορισμού. Οι μπλε περιοχές απεικονίζουν τα κανάλια ύδατος μέσω των οποίων λαμβάνει χώρα η ροή υγρών.....24
- Εικόνα 4:** Απεικόνιση δομής βιοϋμενίου με CLSM.....33
- Εικόνα 5:** Σχηματική αναπαράσταση σε 3 φάσεις της εξελικτικής πορείας ενός βιοϋμενίου.....35
- Εικόνα 6:** Σχηματική απεικόνιση ανάπτυξης ενός βιοϋμενίου και ο αντιμικροβιακός μηχανισμός των νανοσωματιδίων.....41

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ιστορική ανασκόπηση

Για το μεγαλύτερο μέρος της ιστορίας της μικροβιολογίας, οι μικροοργανισμοί χαρακτηρίζονταν πρωτίστως ως πλαγκτονικά, ελεύθερα αιωρούμενα κύτταρα και περιγράφονταν με βάση τα χαρακτηριστικά ανάπτυξης τους σε πλούσια θρεπτικά μέσα καλλιέργειας. Ο πρώτος που ανακάλυψε και περιέγραψε το μικροβιολογικό φαινόμενο κατά το οποίο, οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται και αναπτύσσονται σε εκτεθειμένες επιφάνειες και σχηματίζουν τα βιοϋμένια ήταν ο Antonie van Leeuwenhoek (1632–1723) από το Ντελφτ της Ολλανδίας κατά την περίοδο 1683-1708, όταν με την βοήθεια του μικροσκοπίου του, παρατήρησε και περιέγραψε συσσωματώματα κυττάρων στην επιφάνεια των δοντιών του και της γλώσσας του (Dobell, 1960). Για τον υπόλοιπο περίπου αιώνα η ανακάλυψη αυτή δεν απασχόλησε ιδιαίτερα τους επιστήμονες εκείνης της εποχής, με την ιατρική να εστιάζει στην παθογένεια αλλά και στις άλλες ιδιότητες των μικροοργανισμών που αναπτύσσονταν πλαγκτονικά (planktonically).



Εικόνα 1: Ο Antonie van Leeuwenhoek και το μικροσκόπιο του, μέσω του οποίου πραγματοποίησε πολλές επιστημονικές μελέτες. (Sebastian, Anton. *Dates in Medicine*. The Parthenon Publishing Group, New York-London, 2000, p. 27.)

Ο όρος «υμένιο» (film), ο οποίος αναφέρεται στη βακτηριακή προσκόλληση, την συσσωμάτωση και τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων στις επιφάνειες, εμφανίστηκε για πρώτη φορά την περίοδο 1933-1935 στη θαλάσσια μικροβιολογία, για να διακρίνει τα προσκολλημένα βακτήρια των επιφανειών από τους «πλαγκτονικούς» οργανισμούς που βρίσκονται ελεύθεροι στο νερό (Henrici 1933, ZoBell & Allen, 1935). Αναλυτικότερα, το 1933 ο Henrici χρησιμοποίησε την άμεση μικροσκοπία (direct microscopy) και παρατήρησε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηρίων που βρίσκονται στο νερό αναπτύσσονται προσκολλημένα σε βυθισμένες επιφάνειες απ' ότι ελεύθερα στο νερό (Henrici, 1933). Ενώ το 1935 οι ερευνητές ZoBell & Allen (1935) μελέτησαν την προσκόλληση και την ανάπτυξη βακτηρίων σε γυάλινες διαφάνειες οι οποίες ήταν βυθισμένες σε

θαλασσινό νερό. Διαπίστωσαν ότι ο αριθμός των βακτηρίων που μετρήθηκε στην επιφάνεια των πλακιδίων ήταν υψηλότερος από εκείνον των μεμονωμένων βακτηριακών πλαγκτονικών κυττάρων.

Το 1969, αρκετά χρόνια αργότερα ο Jones και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης και μετάδοσης και με μία συγκεκριμένη χρωστική πολυσακχαρίτη που ονομάζεται κόκκινο Ruthenium σε συνδυασμό με σταθεροποιητή τετροξειδίου του οσμίου και απέδειξαν ότι το υλικό της μήτρας που περιβάλλει τα κύτταρα σε ένα βιοϋμένιο είναι πολυσακχαρίτης. Τέλος το 1978 ο Costerton και οι συνεργάτες του με βάση τις παρατηρήσεις της οδοντικής πλάκας και των βιοϋμενίων σε χείμαρρους, εξήγησαν θεωρητικά τους μηχανισμούς με τους οποίους οι μικροοργανισμοί προσκολλώνται σε ζωντανά και μη βιώσιμα υλικά και τα οφέλη που προκύπτουν από οικολογικής άποψης.

Από τότε, οι μελέτες των βιοϋμενίων σε βιομηχανικά και οικολογικά περιβάλλοντα άλλα και σε περιβάλλοντα που σχετίζονται άμεσα με τη δημόσια υγεία ουσιαστικά διεξάγονται παράλληλα. Πολλές από τις έρευνες που έγιναν τις τελευταίες 2 δεκαετίες για την περιγραφή των βιοϋμενίων βασίστηκαν σε εργαλεία όπως η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) ή στις συνήθεις τεχνικές μικροβιολογικής ανάλυσης. Μάλιστα την τελευταία δεκαετία δύο σημαντικές ωθήσεις επηρέασαν δραματικά την κατανόησή μας για τα βιοϋμένια: η χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου σάρωσης με λέιζερ για την πλήρη περιγραφή της δομής του βιοϋμενίου και η διερεύνηση των γονιδίων που εμπλέκονται στην κυτταρική προσκόλληση και τον σχηματισμό βιοϋμενίων.

1.2. Ορισμός Βιοϋμενίου

Πρόκειται για μια μικροβιακή κοινότητα που χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυττάρων που είναι συνδεδεμένα σ' ένα υπόστρωμα ή μεσεπιφάνεια ή μεταξύ τους, περικλείονται σ' ένα υλικό εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών που τα ίδια παράγουν, και παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο όσον αφορά το ρυθμό αύξησης και τη γονιδιακή έκφραση (Donlan and Costerton, 2002).

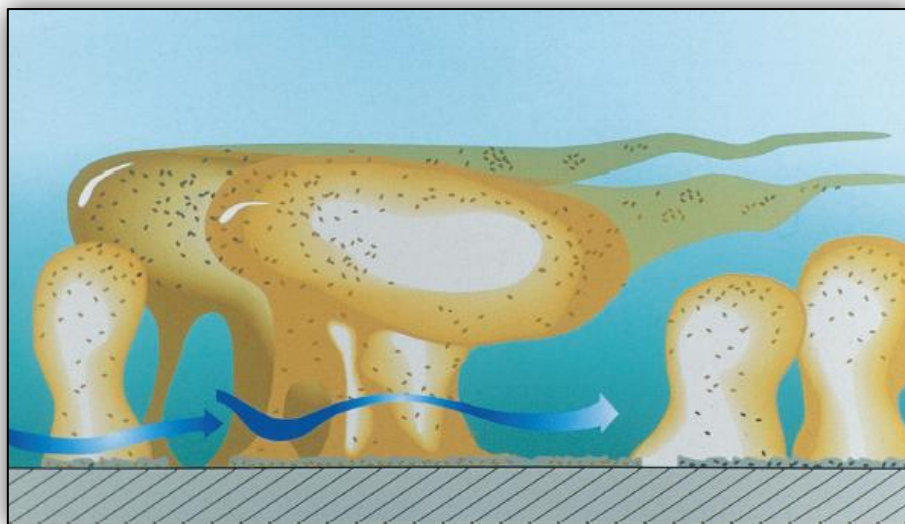
Τα βιοϋμένια μπορούν να σχηματιστούν σε μια ευρεία ποικιλία επιφανειών, συμπεριλαμβανομένων των ζωντανών ιστών, των ιατρικών συσκευών, των σωληνώσεων του βιομηχανικού ή του πόσιμου νερού ή των επιφανειών επεξεργασίας τροφίμων. (Donlan, 2002)

1.3. Δομή Βιοϋμενίου

Την πρώτη δεκαετία (1978-1990) μετά την ανακάλυψη της σπουδαιότητας των βιοϋμενίων, λόγω των ελαττωματικών τεχνικών που χρησιμοποιούσαν για την παρατήρηση τους, οι επιστήμονες θεωρούσαν ότι αυτές οι μορφές βακτηριακών κυττάρων είναι απλές «πλάκες» (slabs) οργανικού υλικού, μέσα στις οποίες βρίσκονται τυχαία ενσωματωμένα τα ακινητοποιημένα βακτήρια (sessile bacteria). Το συνεστιακό μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) εφευρέθηκε τη δεκαετία του 1950, αλλά χρησιμοποιήθηκε αρχικά μόνο για παρατήρηση πλαγκτονικών κυττάρων. Όταν, το 1987 έγινε η πρώτη εξέταση ζωντανού βιοϋμενίου με χρήση CLSM ακολούθησε μια ολόκληρη σειρά ευρημάτων που αποτελούν τη βάση των σημερινών εννοιών γύρω από τα βιοϋμένια.

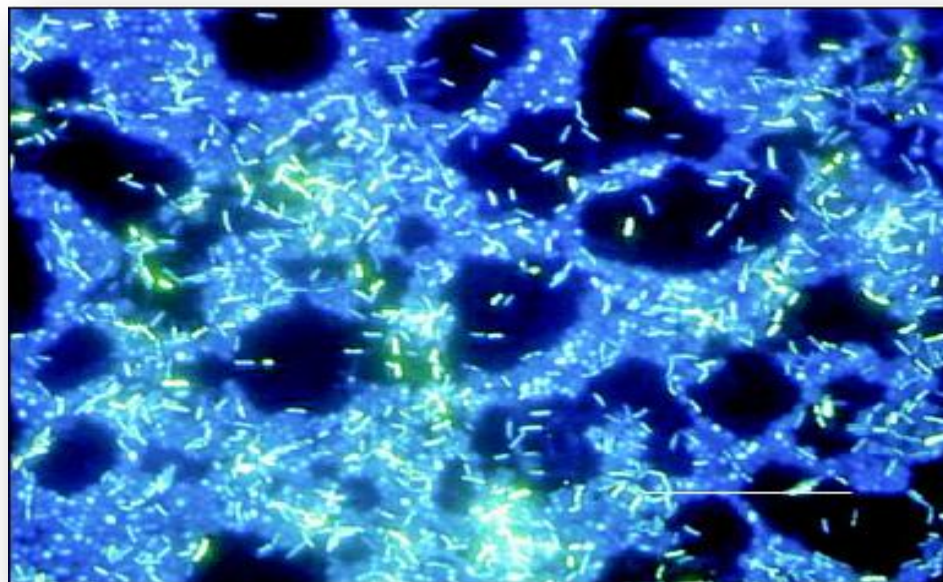
Αρχικά ένα πλήρες αναπτυγμένο βιοϋμένιο δεν αποτελείται από ομοιογενείς μονοστοιβάδες μικροβιακών κυττάρων προσκολλημένες πάνω σε μια επιφάνεια. Αντίθετα, τα βιοϋμένια παρουσιάζουν ετερογένεια τόσο στον χρόνο όσο και στον χώρο (Lewandowski, 2000). Η βασική δομική μονάδα ενός βιοϋμενίου είναι η μικροαποικία (*microcolony*) και η κατανόηση των φυσιολογικών αλληλεπιδράσεων αυτών των μικροαποικιών μέσα σε ένα ανεπτυγμένο βιοϋμένιο μπορεί να διαλευκάνει τη δράση των διεργασιών που λαμβάνουν χώρα μέσα σε ένα βιοϋμένιο, όπως η αίσθηση της απαρτίας, η αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και η αποκόλληση.

Οι μικροαποικίες αυτές αποτελούνται από κύτταρα ενός ή πολλών ειδών τα οποία εσωκλείονται μέσα σε μία μήτρα. Τα βακτηριακά κύτταρα εντός της μήτρας χαρακτηρίζονται από την έλλειψη κίνησης Brownian και η δομή πολλών μικροαποικιών συχνά μοιάζει με δομή μανιταριού (Εικόνα 2) (Costerton, 1999). Τα κύτταρα μέσα σε μία μικροαποικία αποτελούν το 10-25% και το υλικό της μήτρας αποτελεί περίπου το 75-90% του όγκου της. Οι δομές αυτές χωρίζονται μεταξύ τους με κανάλια ύδατος. Τα κανάλια ύδατος παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και την ωρίμαση του βιοϋμενίου, επιτρέποντας τη διάχυση θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου ακόμη και αντιμικροβιακών παραγόντων.



Εικόνα 2: Δομή βιοϋμενίου. Copyright Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Mont. Reprinted with permission.

Στην εικόνα 3, απεικονίζεται ένα βιοϋμένιο των μικροοργανισμών *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* και *Flavobacterium* spp. το οποίο έχει αναπτυχθεί σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα. Αυτή η εικόνα απεικονίζει με σαφήνεια τα κανάλια ύδατος και την ετερογένεια που χαρακτηρίζει ένα ώριμο βιοϋμένιο.



Εικόνα 3: Βιοϋμένιο μικτής καλλιέργειας των μικροοργανισμών *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* και *Flavobacterium* spp. που αναπτύχθηκε σε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα, κατόπιν χρωματίστηκε με 4,6-διαμιδινο-2-φαινυλινδόλη (DAPI) και εξετάστηκε με μικροσκοπία επιφθορισμού. Οι μπλε περιοχές απεικονίζουν τα κανάλια ύδατος μέσω των οποίων λαμβάνει χώρα η ροή υγρών.

Οι οργανισμοί που συνθέτουν βιοϋμένια μπορεί επίσης να έχουν σημαντική επίδραση στη δομή του βιοϋμενίου. Για παράδειγμα, οι James et al. (1995) έδειξαν ότι το πάχος του βιοϋμενίου θα μπορούσε να επηρεαστεί από τον αριθμό των διαφορετικών μικροοργανισμών από το οποίο αποτελείται. Αποτελέσματα του πειράματος τους έδειξαν ότι οι καθαρές καλλιέργειες των βιοϋμενίων *K. pneumoniae* ή *P. aeruginosa* σε έναν εργαστηριακό αντιδραστήρα ήταν λεπτότερες (15 μm και 30 μm αντίστοιχα) από ένα βιοϋμένιο που περιείχε και τα δύο είδη εμφανίζοντας πάχος 40 μm . Οι Jones et al. (1969) σημείωσαν ότι αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι το ένα είδος ενίσχυσε τη σταθερότητα του άλλου.

1.4. Κύκλος ζωής βιοϋμενίου

1.4.1. Προσκόλληση κυττάρων

Η ανάπτυξη του βιοϋμενίου διέπεται από μια σειρά φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών. Η σύνδεση ενός κυττάρου σε ένα υπόστρωμα ονομάζεται προσκόλληση και η σύνδεση μεταξύ κυττάρων ονομάζεται συνοχή (*cohesion*). Οι μηχανισμοί πίσω από αυτές τις μορφές προσκόλλησης, καθορίζουν τελικά τις συγκολλητικές και συνεκτικές ιδιότητες που θα παρουσιάσει ένα βιοϋμένιο πάνω σε μια επιφάνεια.

Ο Fletcher (1980) περιγράφει αυτή τη συσσώρευση των μικροοργανισμών σε μια επιφάνεια, ως μια διαδικασία τριών σταδίων: Πρώτο στάδιο είναι η προσρόφηση ή η συσσώρευση ενός μικροοργανισμού στην επιλεγμένη επιφάνεια. Δεύτερο στάδιο αποτελεί η προσάρτηση ή σταθεροποίηση της σύνδεσης μεταξύ ενός μικροοργανισμού και μιας επιφάνειας, που συχνά περιλαμβάνει το σχηματισμό πολυμερικών γεφυρών μεταξύ του μικροοργανισμού και της επιφάνειας. Και τρίτο στάδιο είναι αυτό της ανάπτυξης και της διαίρεσης των μικροοργανισμών στην επιλεγμένη επιφάνεια.

Η περιγραφή αυτή παρόλο που είναι χρήσιμη ως γενική εικόνα της ανάπτυξης ενός βιοϋμενίου, είναι περιορισμένη όταν εξετάζονται οι διεργασίες αλληλεπίδρασης κυττάρου-υπόστρώματος / κυττάρου-κυττάρου. Οι Characklis και Marshal (1990) περιέγραψαν αργότερα μια διαδικασία οκτώ σταδίων η οποία περιελάμβανε τον σχηματισμό ενός αρχικού στρώματος με αναστρέψιμη και μη αναστρέψιμη προσκόλληση βακτηρίων και την ενδεχόμενη απόσπαση κυττάρων από ένα ώριμο βιοϋμένιο με επακόλουθο σχηματισμό νεών αποικιών.

1.4.1.1. Στάδια προσκόλλησης κυττάρων

- Σχηματισμός *conditioning layer*

Το *conditioning layer* είναι το θεμέλιο πάνω στο οποίο αναπτύσσεται ένα βιοϋμένιο και αποτελείται από πολλά οργανικά ή ανόργανα σωματίδια. Οτιδήποτε μπορεί να υπάρχει μέσα σε ένα υγρό μπορεί μέσω βαρυτικής δύναμης ή κινητικής ροής να καθιζάνει σε ένα υπόστρωμα και να γίνει

έτσι μέρος ενός conditioning layer. Αυτή η λεπτή στρώση τροποποιεί τα υποστρώματα διευκολύνοντας έτσι την προσβασιμότητα των βακτηρίων σε αυτά. Η επιφανειακή φόρτιση, το δυναμικό και οι τάσεις μπορούν να μεταβληθούν ευνοϊκά από τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του conditioning layer και του υποστρώματος. Το υπόστρωμα παρέχει σταθερότητα και θρεπτικά συστατικά που αυξάνουν την ανάπτυξη της βακτηριακής ζωής.

- **Αναστρέψιμη προσκόλληση**

Αρχικά, πλαγκτονικά κύτταρα μικροοργανισμών μεταφέρονται στην επιφάνεια είτε με φυσικές δυνάμεις είτε με αυτοκινησία που πραγματοποιείται λόγω των βλεφαρίδων ή των μαστιγίων που διαθέτουν. Ένα ποσοστό των κυττάρων που φθάνουν στην επιφάνεια προσροφώνται αναστρέψιμα, δηλαδή μπορούν εύκολα να ξεαναγυρίσουν στην πλαγκτονική τους μορφή. Παράγοντες όπως η διαθέσιμη ενέργεια, η λειτουργικότητα της επιφάνειας, ο βακτηριακός προσανατολισμός, οι συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης, είναι περιβαλλοντικές μεταβλητές που συμβάλλουν στην προσκόλληση των βακτηρίων. Αν οι αποθητικές δυνάμεις είναι μεγαλύτερες από τις ελκτικές δυνάμεις, τα βακτήρια θα αποκολληθούν από την επιφάνεια. Αυτό το φαινόμενο είναι πιθανότερο να συμβεί πριν από την δημιουργία του υποστρώματος. Η ενέργεια ενεργοποίησης για την αποκόλληση των βακτηρίων είναι χαμηλή και έτσι είναι πιθανό να συμβεί, δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση και στην αδυναμία των δεσμών.

- **Μη αναστρέψιμη προσκόλληση**

Στη πραγματικότητα, ορισμένα από τα αναστρέψιμα προσροφημένα κύτταρα παραμένουν ακινητοποιημένα και απορροφώνται μη αναστρέψιμα. Έχει παρατηρηθεί ότι οι μηχανισμοί αυτοκινησίας των βακτηρίων (μαστίγια, ινίδια και τριχίδια) ξεπερνούν τις φυσικές αποθητικές δυνάμεις του ηλεκτρικού διπλού στρώματος (De Weger LA, van der Vlugt C, Wijffjes AHM, et al., 1987). Ακολούθως, τα οργανίδια αυτά, έρχονται σε επαφή με το πλέγμα της στιβάδας προετοιμασίας και διεγείρουν τις χημικές αντιδράσεις όπως την οξειδωση και την ενυδάτωση, (Ganesh, Anand , 1998) καθώς και την εδραίωση του βακτηριακού-επιφανειακού δεσμού. Έρευνες έχουν δείξει ότι η προσκόλληση μικροβίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις υδρόφοβες-υδρόφιλες ιδιότητες των αλληλεπιδρώντων επιφανειών (Liu, Yang, Xu, et al., 2004).

Γενικά οι φυσικές δυνάμεις που συνδέονται με τη βακτηριακή προσκόλληση περιλαμβάνουν τις δυνάμεις van der Waals, τις στερικές αλληλεπιδράσεις (*steric interactions*) και την ηλεκτροστατική (διπλή στρώση) αλληλεπίδραση είναι γνωστές ως δυνάμεις DVLO (Derjaguin, Verwey, Landau και Overbeek) (Rutter. & Vincent, 1980) και λόγω της μεγάλης εμβέλειας που είναι γνωστές και ως φυσικές αλληλεπιδράσεις.

Η θεωρία DVLO χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρου και επίπεδης επιφάνειας ως μια ισορροπία μεταξύ δυο πρόσθετων παραγόντων, των αλληλεπιδράσεων που οφείλονται στις δυνάμεις van der Waals (ελκυστικές) και των αλληλεπιδράσεων απομάκρυνσης από την επικάλυψη, μεταξύ του ηλεκτρικού διπλού στρώματος του κυττάρου και του υποστρώματος (απόρριψη λόγω αρνητικών φορτίων των κυττάρων) (Hermansson, 1999). Μια εκτεταμένη θεωρία DVLO λαμβάνει υπόψη υδρόφοβες / υδρόφιλες και οσμωτικές αλληλεπιδράσεις (Chang & Chang, 2002) και έχει επίσης περιγραφεί με όρους θερμοδυναμικής αλληλεπίδρασης (Gallardo-Moreno, Gonzalez-Martin, Perez-Giraldo, et al., 2002).

1.4.1.2. Παράγοντες που επηρεάζουν την προσκόλληση

Η ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται και να σχηματίζουν βιοϋμένια σε μία επιφάνεια εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της επιφάνειας πρόσδεσης, της παρουσίας άλλων βακτηρίων, της θερμοκρασίας, της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών, του pH και της παρουσίας μικτής καλλιέργειας. (Chmielewski and Frank 2003 Herrera et al., 2007 Rivas et al., 2007 Rode et al., 2007, Van Houdt and Michiels 2010).

- **Τύπος Επιφάνειας πρόσδεσης**

Είναι γνωστό ότι οποιαδήποτε επιφάνεια στην οποία υπάρχουν μικροοργανισμοί μπορεί να υποστηρίξει την ανάπτυξη βιοϋμενίου (Kumar and Anand 1998). Ωστόσο, οι ιδιότητες της επιφάνειας πρόσδεσης και της επιφάνειας των βακτηριακών κυττάρων, επηρεάζουν τον χρόνο που απαιτείται για την προσκόλληση και την αντοχή του σχηματιζόμενου βιοϋμενίου (Kumar and Anand 1998, Poulsen 1999, Van Houdt and Michiels 2010).

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται συχνά στο περιβάλλον των τροφίμων είναι το πλαστικό, το καουτσούκ, το γυαλί, το τσιμέντο και ο ανοξείδωτος χάλυβας και οι ιδιότητες όπως τραχύτητα, καθαριότητα, απολυμαντικότητα και ικανότητα διαβροχής καθορίζονται από την υδροφοβικότητα η οποία με τη σειρά της επηρεάζει σημαντικά την προσκόλληση των κυττάρων (Van Houdt and Michiels 2010). Η βακτηριακή προσκόλληση γενικά, διευκολύνεται από την υψηλή ελεύθερη ενέργεια και τις υγρές επιφάνειες. Ο ανοξείδωτος χάλυβας και το γυαλί γενικά προάγουν τη βακτηριακή σύνδεση λόγω της υψηλής ελεύθερης ενέργειας και της υδρόφιλης φύσης τους, αντίθετα με το Teflon, το νάιλον, το καουτσούκ, buna-N rubber και τα φθοριωμένα πολυμερή, τα οποία θεωρούνται υδρόφοβα (Chmielewski and Frank 2003, Shi and Zhu 2009). Ένα σύνολο 25 διαφορετικών στελεχών *Salmonella* spp. δοκιμάστηκαν για τις ικανότητες πρόσφυσης σε τέσσερα διαφορετικά είδη επιφανειών και τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλότερη βακτηριακή προσκόλληση σε επιφάνειες πιο θετικές σε ενδιάμεσες ελεύθερες ενέργειες (Chia et al., 2009).

Μελετώντας την επίδραση που έχουν 8 διαφορετικά ήδη επιφανειών, στην ικανότητα προσκόλλησης 10 απομονωμένων στελεχών *L. monocytogenes*, οι Silva et al. (2008) παρατήρησαν ότι η καλύτερη προσκόλληση επιτεύχθηκε μεταξύ υδροφοβίας και υδροφιλίας.

Επιπλέον, η τραχιά εμφάνιση επιφανειών όπως αυτή του ανοξείδωτου χάλυβα είναι ικανή να παγιδεύει βακτήρια, συμβάλλοντας έτσι στην εξάπλωση του βιοϋμενίου. Οι επιφάνειες αλουμινίου έχουν μεγαλύτερες ρωγμές και σπογγώδη εμφάνιση, σε αντίθεση με τη λεία επιφάνεια του νάιλον και του τεφλόν (Kumar and Anand 1998). Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα, είναι πολύ σημαντική η επιλογή των υλικών που χρησιμοποιούνται στην επεξεργασία των τροφίμων ώστε να προάγουν την ασφάλεια και τη διατήρηση της υγιεινής των τροφίμων (Pérez-Rodríguez et al., 2011, Van Houdt και Michiels 2010).

- **Μικροβιακό στέλεχος**

Μερικά από τα βακτηριακά επιφανειακά αποθέματα, που είναι γνωστά για τη συμβολή τους στο σχηματισμό των βιοϋμενίων, είναι τα μαστίγια, ίνες και τριχίδια. Ο ρόλος που παίζουν στο σχηματισμό των βιοϋμενίων περιγράφεται αναλυτικότερα παρακάτω.

Τα μαστίγια είναι ελικοειδείς δομές που εκτείνονται από το βακτηριακό κυτταρόπλασμα μέσω του κυτταρικού τοιχώματος. Είναι νημάτια πρωτεΐνης που είναι ικανά να αλληλεπιδρούν μεταξύ των

κυττάρων κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των βιοϋμενίων. Τα μαστίγια είναι υπεύθυνα για τη βακτηριακή κινητικότητα, συμβάλλοντας έτσι στην ανάπτυξη και την εξάπλωση των βιοϋμενίων κατά μήκος των επιφανειών. Η αρχική προσκόλληση και η ωρίμανση βιοϋμενίων *Pseudomonas fluorescens*, *L. monocytogenes*, *E. coli* και *Y. enterocolitica* έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζεται από την παρουσία αυτών των δομών (Simões et al., 2010, Van Houdt and Michiels 2010) ενώ στη περίπτωση βιοϋμενίου *Salmonella* δεν έχει παρατηρηθεί καμία επίδραση (Giaouris et al., 2012).

Οι ίνες είναι επιφανειακές δομές αρνητικών κατά Gram βακτηρίων. Οι προσδέσεις νηματοειδούς πρωτεΐνης έχουν ευθεία μορφή δεν συνεισφέρουν στην κινητικότητα και εμπλέκονται κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίου των μικροοργανισμών όπως *E. coli*, και των στελεχών αυτού που παράγουν την τοξίνη Shiga, *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas* spp. και *Vibrio* spp. (Simões et al., 2010, Van Houdt and Michiels 2010).

Οι κροσσοί (*curli fimbriae*) είναι αμυλοειδείς κυτταρικές επιφανειακές πρωτεΐνες και μαζί με την κυτταρίνη αποτελούν τα δύο κύρια συστατικά μήτρας των βιοϋμενίων του μικροοργανισμού *Salmonella* (Giaouris et al., 2012). Ο μεταγραφικός ενεργοποιητής CsgD ρυθμίζει την συν-έκφραση της κυτταρίνης που κωδικοποιεί το *csgA* και της κυτταρίνης που κωδικοποιεί την *bcsA* και οδηγεί στο σχηματισμό ενός υδρόφοβου δικτύου με σφραγισμένα κύτταρα (Goulter-Thorsen κ.ά., 2011, Jain and Chen 2007). Δεδομένου ότι ένα ευρύ φάσμα συνθηκών περιβαλλοντικής καταπόνησης επηρεάζει τη μεταγραφή CsgD, είναι προφανές ότι οι μικροοργανισμοί *Salmonella* και *E. coli* (EHEC και EPEC) ενέχουν τον κίνδυνο μετάδοσης της παθογένειας λόγω της πιθανής ανθεκτικότητας σε απολυμαντικούς παράγοντες (Jain and Chen 2007 · Saldaña et al., 2009).

Ένα συζευκτικό πλασμίδιο κωδικοποιεί δομές παρόμοιες με κροσσούς, οι οποίες αναφέρονται ως τριχίδια. Αυτά τα εξαρτήματα εμπλέκονται σε οριζόντια γονιδιακή μεταφορά, γνωστή ως σύζευξη, και διεγείρουν την ανάπτυξη βιοϋμενίων καθώς και τη διασπορά του πλασμιδίου από το βιοϋμένιο υψηλής πυκνότητας μέσω της σύζευξης. Δεδομένου ότι το μεταφερόμενο πλασμίδιο περιέχει συχνά γονίδια αντοχής, η μετάδοση λοιμώξεων έχει μεγάλη σημασία για την ασφάλεια των τροφίμων όταν οι μικροοργανισμοί που παράγουν βακτήρια εναποτίθενται σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα (Van Houdt and Michiels 2010).

Οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες (EPS) είναι ένας άλλος παράγοντας, που παράγεται από βακτήρια, που συμβάλλει στη δημιουργία βιοϋμενίου δεσμεύοντας τα κύτταρα και άλλα συγκεκριμένα υλικά μαζί στην επιφάνεια (Van Houdt and Michiels 2010). Καλά συνδεδεμένοι στην επιφάνεια και παραγόμενοι από τον μικροοργανισμό, αυτές οι πολυανιονικές εξωκυτταρικές ουσίες

περιέχουν πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, τεϊκοειδή και νουκλεϊνικά οξέα και άλλες πολυμερείς ουσίες ενυδατωμένες σε 85% -95% νερό (Chmielewski and Frank 2003). Ο ρόλος του είναι κρίσιμος και εξαρτάται από τον προσκολλημένο μικροοργανισμό, καθώς μπορεί να χρησιμεύσει ως φιλμ προετοιμασίας, με συγκολλητικές ή αντι-συγκολλητικές ιδιότητες και καθορίζει τη δομή του αναπτυγμένου βιοϋμενίου.

Οι Ryu και Beuchat (2005) μελέτησαν τη συμβολή των EPS και της παραγωγής curli στον σχηματισμό βιοϋμενίου από το *E. coli* O157: H7 σε ανοξείδωτο χάλυβα. Οι EPS βρέθηκε ότι αναστέλλουν την αρχική πρόσδεση των παθογόνων κυττάρων σε κουπόνια από ανοξείδωτο χάλυβα, ενώ η παραγωγή curli δεν είχε καμία επίδραση στην ικανότητα πρόσδεσης των κυττάρων. Ωστόσο, η καμπύλη διευκόλυνε την ανάπτυξη του βιοϋμενίου και η αντοχή των παθογόνων κυττάρων στο χλώριο αυξήθηκε όταν τα κύτταρα παρήγαγαν βιοϋμένια, υποδηλώνοντας τον προστατευμένο ρόλο των EPS (Bremer et al., 2001, Habimana et al., Nakamura et al., 2013, Norwood and Gilmour 2001, Beuchat 2005).

- ***Επίδραση θερμοκρασίας***

Η θερμοκρασία αποτελεί βασικό παράγοντα για την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε αβιοτικές επιφάνειες, καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στην προσαρμογή των μικροοργανισμών, καθορίζει το οικολογικό τους υπόβαθρο, επηρεάζει την επαγωγή της έκφρασης των κρίσιμων μεταγραφικών ρυθμιστών και μπορεί να προκαλέσει και αλλοιώσεις της κυτταρικής επιφάνειας. Εντούτοις, η θερμοκρασία συνήθως μελετάται σε συνδυασμό με άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η μεμβράνη προετοιμασίας στις επιφάνειες πρόσδεσης, το pH, οι συνθήκες όσμωσης και οι οικολογικές παράμετροι των σχετικών στελεχών (Da Silva Meira et al., 2012, Dourou et al., 2011, Nascentes et al., Norwood και Gilmour 2001, Speranza et al. 2011). Είναι γνωστό ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για έναν μικροοργανισμό συσχετίζεται με αύξηση της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών που οδηγεί σε γρήγορο σχηματισμό βιοϋμενίων (Stepanovic, Cirkovic, Mijac, et al., 2003). Ο μεταβολισμός των θρεπτικών συστατικών συνδέεται άμεσα και εξαρτάται από την παρουσία ενζύμων. Έτσι μπορούμε να πούμε ότι ο σχηματισμός ενός βιοϋμενίου εξαρτάται από την παρουσία και τα ποσοστά αντίδρασης των ενζύμων, τα οποία ελέγχουν την ανάπτυξη πολλών φυσικών και βιοχημικών συστημάτων των βακτηρίων. Η θερμοκρασία συσχετίζεται με τον ρυθμό αντίδρασης των ενζύμων και επομένως επηρεάζει την ανάπτυξη των

κυττάρων. Οι βέλτιστες θερμοκρασίες έχουν ως αποτέλεσμα την υγιή ανάπτυξη των βακτηριακών πληθυσμών ενώ, οι θερμοκρασίες μακριά από το βέλτιστο μειώνουν την απόδοση της βακτηριακής ανάπτυξης. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη μείωση των ρυθμών αντίδρασης των βακτηριακών ενζύμων.

Η θερμοκρασία έχει αποδειχθεί από πολλές έρευνες ότι επηρεάζει τη διαδικασία σχηματισμού βιοϋμενίου. Οι Mai και Conner (2007) αξιολόγησαν την προσκόλληση του *L. monocytogenes* σε ανοξειδωτο χάλυβα κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες (4°C, 20°C, 30°C, 37°C και 42°C) και αποδείχθηκε ότι ο σχηματισμός βιοϋμενίου μειώθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας και αυξήθηκε με την αύξηση της.

- ***Surface Conditioning***

Οι περισσότερες στερεές επιφάνειες λαμβάνουν ένα καθαρό αρνητικό φορτίο όταν βυθίζονται στο νερό και έτσι συσσωρεύουν θρεπτικά συστατικά τραβώντας οργανικά υλικά και ιόντα πάνω σε αυτό, και δημιουργείται το conditioning surface (Poulsen 1999, Zottola και Sasahara 1994). Αυτή η επιφάνεια, μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της αδρανούς επιφάνειας, επηρεάζοντας την επακόλουθη δραστηριότητα σύνδεσης (Kumar and Anand 1998). Επιπλέον, έχει ανακαλυφθεί ότι η βακτηριακή προσκόλληση συμβαίνει ευκολότερα στις επιφάνειες που είναι επικαλυμμένες με αυτό το φιλμ (Jullien et al., 2008, Simões et al., 2010) και αυτό μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι στην περιοχή προετοιμασίας η συσσώρευση των μορίων οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών σε σύγκριση με την υγρή φάση (Kumar and Anand 1998).

Δεκαεπτά στελέχη του *L. monocytogenes*, με παρόμοιες μορφές ανάπτυξης σε διαφορετικές θερμοκρασίες και αλατότητες, συγκρίθηκαν για τις ικανότητές προσκόλλησης τους με ή χωρίς την προσθήκη 2% -5% NaCl. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική αύξηση στην προσκόλληση όλων των στελεχών όταν προστέθηκε NaCl, με τη θερμοκρασία 37°C να εμφανίζει τη μεγαλύτερη ενίσχυση σε σύγκριση με 5°C ή 15°C. Επιπλέον, η προσθήκη NaCl οδήγησε στο σχηματισμό συσσωματωμένων κυττάρων που συνδέονται στενά με την πλαστική επιφάνεια, γεγονός που θα μπορούσε να αποτελέσει παράγοντα αυξημένου κινδύνου στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Jensen et al., 2007).

- ***Επίδραση του pH***

Οι μεταβολές στο pH μπορούν να έχουν αξιοσημείωτη επίδραση στην βακτηριακή ανάπτυξη και γι' αυτό συχνά χρησιμοποιούνται στην παραγωγή απορρυπαντικών και απολυμαντικών που προορίζονται για τη θανάτωση βακτηρίων. Τα βακτήρια διαθέτουν αντλίες πρωτονίων που συνδέονται με τη μεμβράνη, οι οποίες εξάγουν πρωτόνια από το κυτταρόπλασμα για να δημιουργήσουν διαμεμβρανική ηλεκτροχημική διαβάθμιση (Rowland, 2003). Η παθητική εισροή πρωτονίων σε απόκριση της κινητήριας δύναμης του πρωτονίου μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για τα κύτταρα που επιχειρούν να ρυθμίσουν το κυτταροπλασματικό τους pH (Booth, 1985). Μεγάλες μεταβολές στο εξωτερικό pH μπορούν να συντρίψουν τέτοιους μηχανισμούς και να έχουν βιοκτόνο δράση στους μικροοργανισμούς.

Τα βακτήρια ανταποκρίνονται σε αλλαγές στο εσωτερικό και το εξωτερικό pH ρυθμίζοντας τη δραστηριότητα και τη σύνθεση πρωτεϊνών που σχετίζονται με πολλές διαφορετικές κυτταρικές διεργασίες (Olsen, 1993). Μελέτες έχουν δείξει ότι μια βαθμιαία αύξηση της οξύτητας αυξάνει τις πιθανότητες επιβίωσης των κυττάρων σε σύγκριση με μια ξαφνική αύξηση με την ταχεία προσθήκη HCl (Li, 2001). Αυτό δείχνει ότι τα βακτήρια παρέχουν μηχανισμούς που επιτρέπουν στον πληθυσμό βακτηρίων να προσαρμοστεί στις μικρές περιβαλλοντικές μεταβολές του pH. Ωστόσο, υπάρχουν κυτταρικές διεργασίες που δεν προσαρμόζονται στις διακυμάνσεις του pH τόσο εύκολα. Μία τέτοια διαδικασία είναι η απέκκριση εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (πολυσακχαρίτες). Το βέλτιστο pH για την παραγωγή πολυσακχαριτών εξαρτάται από τα μεμονωμένα είδη (Oliveira, Melo, Oliveira, et al., 2004).

- ***Παρουσία μικτής καλλιέργειας***

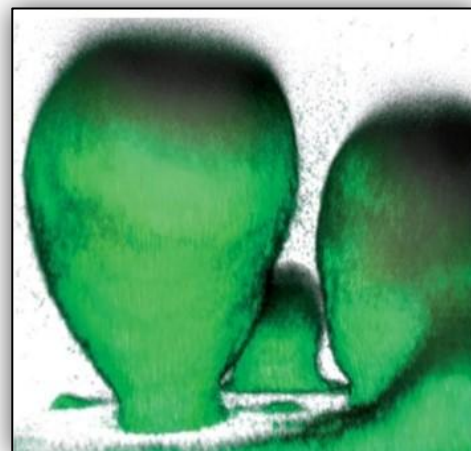
Σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, οι μικροοργανισμοί πιθανόν να υπάρχουν ως μικτές καλλιέργειες, όπου οι χωροταξικές και μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών οδηγούν στην ανάπτυξη βιοϋμενίων σύνθετων κοινοτήτων (Giaouris et al., 2012). Ανάλογα με τα δευτερογενή είδη, τα κύτταρα του βιοϋμενίου ενός παθογόνου μικροοργανισμού μπορεί να αυξηθούν, να μειωθούν ή να παραμείνουν ανεπηρέαστα συγκριτικά με βιοϋμένια ενός είδους (Bremer et al., 2001, Habimana et al., 2009, van der Veen και Abee 2011). Η σύνθεση του

θρεπτικού μέσου έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει και αυτό στη συμβολή κάθε είδους στα μεικτά βιοϋμένια. Το πιο σημαντικό είναι ότι η ανθεκτικότητα σε απολυμαντικά όπως το υπεροξικό οξύ και το χλωριούχο βενζαλκόνιο ήταν υψηλότερη από εκείνη που εκδηλώνεται από τα αντίστοιχα βιοϋμένια μονής καλλιέργειας (van der Veen και Abee 2011).

Η εναπόθεση βακτηρίων σε επιφάνειες και η ικανότητά τους να αντιστέκονται στην απολύμανση είναι από τα κυριότερα αίτια της επανεμφάνισης τους σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Η επιμονή αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικά κύτταρα λόγω στρες, τα οποία επιλέγονται λόγω συγκεκριμένων συνθηκών καταπόνησης που σχετίζονται με τα τρόφιμα και έτσι είναι δύσκολο να εξαλειφθούν από τα συγκεκριμένα περιβάλλοντα επεξεργασίας.

1.4.2. Σχηματισμός ώριμου βιοϋμενίου

Καθώς τα ακινητοποιημένα κύτταρα διαιρούνται (δυναδική διαίρεση), τα θυγατρικά κύτταρα εξαπλώνονται προς τα έξω και προς τα πάνω από το σημείο πρόσδεσης για να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα (Hall-Stoodley L, Stoodley, 2002). Τυπικά, αυτές οι αλληλεπιδράσεις και η ανάπτυξη τους εντός του αναπτυσσόμενου βιοϋμενίου σχηματίζουν μια δομή που μοιάζει με αυτή του μανιταριού (Εικόνα 4). Η δομή μανιταριού πιστεύεται ότι είναι αυτή που επιτρέπει και τη διέλευση των θρεπτικών ουσιών στα βακτήρια, βαθιά μέσα σε ένα βιοϋμένιο.



Εικόνα 4: Απεικόνιση δομής βιοϋμενίου με CLSM.

Μετά από μια αρχική φάση καθυστέρησης παρατηρείται μια ταχεία αύξηση του πληθυσμού, που περιγράφεται ως εκθετική φάση ανάπτυξης. Αυτή εξαρτάται από τη φύση του περιβάλλοντος, τόσο από φυσικής όσο και από χημικής άποψη. Η ταχεία ανάπτυξη συμβαίνει εις βάρος των θρεπτικών ουσιών του υγρού και του υποστρώματος. Σε αυτό το στάδιο η φυσική και χημική συμβολή στην αρχική προσκόλληση τελειώνει και αρχίζουν να κυριαρχούν οι βιολογικές διεργασίες. Η απέκκριση των πολυμερών πολυκυκλικής συγκόλλησης πολυσακχαριτών (PIA) (polysaccharide intercellular adhesion polymers) και η παρουσία δισθενών κατιόντων αλληλεπιδρούν για να σχηματίσουν ισχυρότερη σύνδεση μεταξύ των κυττάρων (Dunne, 2002).

Η διαφορετική γονιδιακή έκφραση μεταξύ των δύο βακτηριακών καταστάσεων (πλακτονοειδής / sessile) συνδέεται εν μέρει με τις ανάγκες συγκόλλησης του πληθυσμού. Για παράδειγμα, η παραγωγή οργανιδίων αυτοκίνησης παρεμποδίζεται σε πολλά κύτταρα καθώς η κινητικότητα περιορίζεται και δεν είναι πλέον απαραίτητη. Ταυτόχρονα, η έκφραση ενός αριθμού γονιδίων για την παραγωγή πρωτεϊνών κυτταρικής επιφάνειας και προϊόντων απέκκρισης αυξάνεται. Οι επιφανειακές πρωτεΐνες (porin) όπως Opr C και Opr E, επιτρέπουν τη μεταφορά εξωκυτταρικών προϊόντων στο κύτταρο (Hancock, Siehnel & Martin, 1990) και υλικών έκκρισης εκτός του κυττάρου, π.χ. πολυσακχαρίτες.

Η δομή πολλών πολυσακχαριτών αρνητικών κατά Gram βακτηρίων είναι σχετικά απλή και αποτελείται είτε από ομοπολυσακχαρίτες είτε από ετεροπολυσακχαρίτες (Sutherland, 2001). Αυτά τα μόρια ενισχύουν τη δομή του βιοϋμενίου, προσδίδουν μηχανική σταθερότητα και είναι ζωτικής σημασίας για την προσκόλληση, τη συνοχή του βιοϋμενίου και για τη υπεκφυγή από δύσκολες περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι Hall-Stoodley και Stoodley (2002) προσδιόρισαν τις διαφορές στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ πλακτονικών και sessile κυττάρων και παρατήρησαν ότι 57 πρωτεΐνες που σχετίζονται με τη δημιουργία βιοϋμενίου δεν βρέθηκαν στα πλακτονικά κύτταρα.

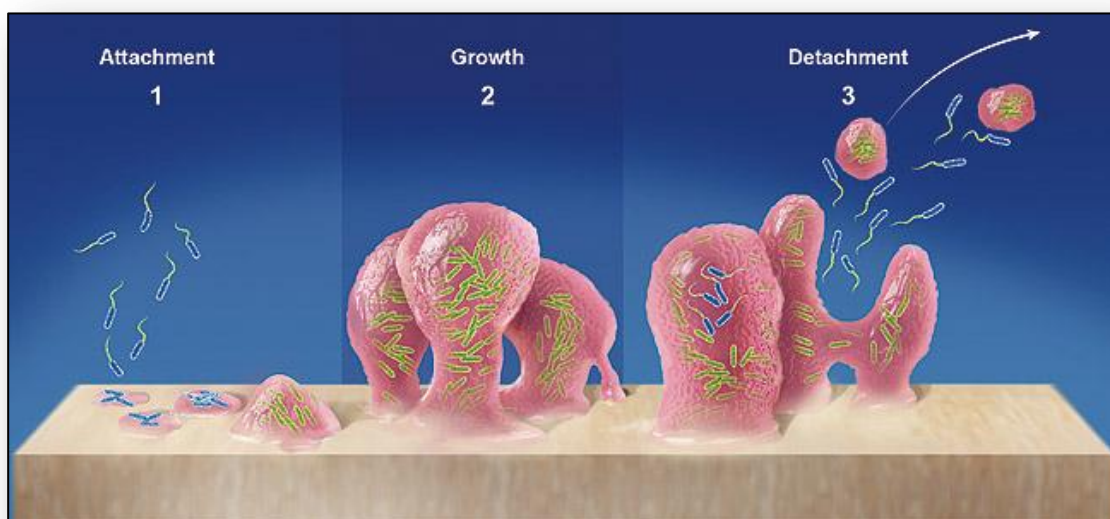
1.4.3. Τελικά στάδια ανάπτυξης του βιοϋμενίου - Quorum sensing

Η στατική φάση ανάπτυξης περιγράφει μια φάση όπου ο ρυθμός της κυτταρικής διαίρεσης ισούται με την ταχύτητα κυτταρικού θανάτου. Σε υψηλή συγκέντρωση κυττάρων, χρησιμοποιούνται από το βιοϋμένιο μια σειρά μηχανισμών σηματοδότησης κυττάρων, και αυτό ονομάζεται «αίσθηση απαρτίας» (Quorum sensing) (Bassler, 1999).

Η «αίσθηση απαρτίας» περιγράφει μια διαδικασία όπου αυτόματοι αυτεπαγωγείς (auto inducers) (χημικά και πεπτιδικά σήματα σε υψηλές συγκεντρώσεις, π.χ., λακτόνες της ομοσερίνης) χρησιμοποιούνται για να διεγείρουν τη γενετική έκφραση τόσο των μηχανικών όσο και των ενζυματικών επεξεργαστών αλγινικών, που αποτελούν ένα θεμελιώδες τμήμα της εξωκυτταρικής μήτρας των βιοϋμενίων.

1.4.4. Κατάρρευση και διασπορά του βιοϋμενίου

Η φάση θανάτου έρχεται με την κατάρρευση του βιοϋμενίου. Τα ένζυμα που λαμβάνουν μέρος παράγονται από τα ίδια τα κύτταρα, και ο ρόλος τους είναι να αποσυνθέτουν πολυσακχαρίτες που συγκρατούν το βιοϋμένιο, απελευθερώνοντας ζωντανά βακτήρια της επιφάνειας με αποτέλεσμα την δημιουργία αποικίας σε ένα νέο υπόστρωμα. Μερικά από αυτά τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στην κατάρρευση του βιοϋμενίου είναι η αλγινική λυάση που παράγεται από τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas fluorescens* και *Pseudomonas aeruginosa*, η N-ακετυλ-ηπαροζάνη λυάση που παράγεται από τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* και η υαλουρονιδάση από τον *Streptococcus equi* (Sutherland, 1999). Ταυτόχρονα, τα οπερόνια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες των μαστιγίων ρυθμίζονται κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι οργανισμοί να έχουν την ικανότητα κίνησης και τα γονίδια που κωδικοποιούν έναν αριθμό πορίνων υποεκφράζονται ολοκληρώνοντας έτσι έναν γενετικό κύκλο προσκόλλησης και συνοχής του βιοϋμενίου.



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση σε 3 φάσεις της εξελικτικής πορείας ενός βιοϋμενίου.

Φάση 1: Προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια (attachment) και παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (extracellular polymeric substances, EPS), **Φάση 2:** Ανάπτυξη και ωρίμαση της βιομενικής αρχιτεκτονικής (growth and maturation of biofilm architecture), **Φάση 3:** Αποκόλληση κυττάρων από το βιοϋμένιο (detachment) (Peters LB. Desinfectie van het wortelkanallstelsel bij de endodontische behandeling. Ned Tijdschr Tandheelkd. 2005;112:461-512(p468). Used with permission from Montana State University Center for Biofilm Engineering).

1.5. Βιοϋμένια σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων

Είναι γνωστό ότι πολλοί παθογόνοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα και σχηματίζουν βιοϋμένια όχι μόνο πάνω στις επιφάνειες των τροφίμων αλλά και στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με αυτά. Η πρόσφυση των βακτηρίων στις επιφάνειες του εξοπλισμού αποτελεί τη βασική αιτία μεταφοράς παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα στη βιομηχανία τροφίμων (Barnes, Lo, Adams, Chamberlain, 1999, Giaouris, Chorianopoulos, Nychas, 2005). Η παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών στις επιφάνειες, μπορεί να γίνει είτε άμεσα είτε έμμεσα μέσω αιωρούμενων σωματιδίων (Kusumaningrum, Riboldi, Hazeleger, Beume, 2003). Η προσκόλληση του μικροοργανισμού *Salmonella* σε επιφάνεια επεξεργασίας τροφίμων ήταν η πρώτη δημοσίευση που αναφερόταν σε βιοϋμένια τροφιμογενών βακτηρίων (Duguid, Anderson, & Campbell, 1966). Από τότε, πολλές έρευνες έχουν περιγράψει την ικανότητα των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών να προσκολλούνται σε τρόφιμα και επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων και των μικροοργανισμών *L. monocytogenes* (Frank and Koffi, 1990, Herald & Zoottola, 1988b, Mafu, Roy, Goulet & Magny, 1990), *Yersinia enterocolitica* (Herald & Zoottola, 1988a), *Campylobacter jejuni* (Kuusela, Moran, Vartio, & Kosunen, 1989) και *Escherichia coli* O157: H7 (Dewanti & Wong, 1995).

Η διασταυρούμενη επιμόλυνση από τα ακατέργαστα προϊόντα μέσω των χεριών και των σκευών θα μπορούσε να οδηγήσει σε εκδηλώσεις τροφιμογενών ασθενειών (Kusumaningrum, Riboldi, Hazeleger, Beume, 2003). Επιπλέον, οι επιφάνειες του εξοπλισμού στη βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων είναι και αυτές γνωστές ως μία πολύ σημαντική πηγή βακτηριακής μόλυνσης (Lee Wong, 1998). Πολλά από παθογόνα βακτήρια, όπως *Bacillus*, *Salmonella*, *Listeria*, *Staphylococcus* και *Escherichia*, μπορούν να προσκολληθούν και να σχηματίσουν βιοϋμένια σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων όπως επιφάνειες από μέταλλο, γυαλί, πλαστικό ή καουτσούκ (Carpentier et al., 2004, Ryu et al., 2005, Elhariry et al., 2008, Pan et al., 2009, Habimana et al., 2010). Μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των ειδών συμβάλλουν στη δημιουργία βιοϋμενίων και στην παραγωγή ενός δυναμικού τοπικού περιβάλλοντος (Moons et al., 2009, Nadell et al., 2009). Στη βιομηχανία τροφίμων, βιοϋμένια μικτής καλλιέργειας είναι συνήθως πολύ σταθερά και οι αλληλεπιδράσεις κυττάρου προς κύτταρο επηρεάζουν τον σχηματισμό, τη δομή του βιοϋμενίου και την αντοχή στους αντιμικροβιακούς χειρισμούς (Rieu et al., 2008, Remis et al., 2010, Uhlich et al 2010, van der Veen et al., 2011, Kostaki et al., 2012). Παρόλο που είναι σαφές ότι πολλά παθογόνα βακτήρια μπορούν να σχηματίσουν βιοϋμένια στη βιομηχανία τροφίμων, τα πιο

σημαντικά βακτηριακά είδη σε σχέση με την ασφάλεια των τροφίμων παρατίθενται παρακάτω (Gonzalez Ribas, 2008).

***Listeria monocytogenes*:** Το είδος *Listeria monocytogenes* είναι ένας Gram-θετικός παθογόνος μικροοργανισμός που μεταδίδεται από τα τρόφιμα και προκαλεί λιστερίωσης (Cheng et al, 2008, Allerberger et al., 2010). Αυτό το βακτήριο μπορεί να βρεθεί σε πολλά περιβάλλοντα όπως το νερό, το έδαφος, τα λύματα και τα περιττώματα των ζώων και να επιβιώσει για μεγάλο χρονικό διάστημα (Blackman et al., 1996, Kathariou, 2002). Το είδος *L. monocytogenes* μπορεί να αναπτυχθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες, υπό υψηλή οσμωτική πίεση (10% NaCl) και σε ευρύ φάσμα pH (pH 4-9) (Giotis et al., 2008). Σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων μπορεί να προσκολληθεί σε πολλές διαφορετικές επιφάνειες και να σχηματίσει βιοϋμένια (Borucki et al., 2003, Moretro et al., 2004, Moltz et al., 2005, Ryser et al., 2007, Di Bonaventura et al., 2008). Για την προσκόλλησή του χρησιμοποιεί μαστίγια, τριχίδια και μεμβρανικές πρωτεΐνες (Gonzalez Ribas, 2005). Τέλος αποδείχθηκε ότι μπορεί να σχηματίσει βιοϋμένια σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα (Keskinen et al., 2008) αυξάνοντας έτσι τις πιθανότητες περαιτέρω διασταυρούμενης μόλυνσης.

***Salmonella spp.*:** Ο μικροοργανισμός *Salmonella* ήταν από τα πρώτα αναφερόμενα τροφιμογενή παθογόνα που προσκολλώνται στις επιφάνειες των τροφίμων για τον σχηματισμό βιοϋμενίων (Duguid et al., 1966). Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το γένος *Salmonella* μπορεί να προσκολλάται και να σχηματίζει βιοϋμένια σε επιφάνειες που βρίσκονται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων όπως είναι οι επιφάνειες από πλαστικό και ανοξειδωτο χάλυβα (Joseph et al., 2001, Chmielewsky et al., 2003). Το βακτήριο *Salmonella* έχει ένα οργανίδιο στην κυτταρική επιφάνεια (SEF-17 κνήμες) για προσάρτηση σε επιφάνειες και αντίσταση στις μηχανικές δυνάμεις (Gonzalez Ribas, 2008).

***Escherichia coli*:** Το βακτήριο *E. coli* μπορεί να σχηματίσει βιοϋμένια μέσω των μαστιγίων, των τριχιδίων και των πρωτεϊνών της μεμβράνης για την προσκόλλησή τους. Μετά την προσκόλληση στις διάφορες επιφάνειες, το *E. coli* χάνει το μαστίγιο του και παράγει κολλώδη εξωκυτταρικά πολυσακχαρίδια (Gonzalez, 2005, Houdt et al., 2005). Πολλά είδη της οικογένειας *Enterobacteriaceae*, συμπεριλαμβανομένου του *E.coli*, παράγουν κυτταρίνη για την επιβίωση των βακτηριδίων στις συνθήκες του περιβαλλοντικού στρες (Lasa, 2006).

***Pseudomonas spp.*:** Βακτήρια του γένους *Pseudomonas* έχουν αναφερθεί ότι είναι μείζονα παθογόνα βακτηρίδια στον τομέα των γαλακτοκομικών προϊόντων, των πουλερικών και της μεταποίησης κρέατος (Ternstrom et al., 1993, Dogan & Boor , 2003). Στη βιομηχανία γάλακτος, οι

ψυχρότροφες ψευδομονάδες είναι τα βακτήρια που απαντώνται συχνότερα και προκαλούν επιδείνωση του νοπού γάλακτος που φυλάσσεται σε ψυχρή θερμοκρασία. Η ταχεία ανάπτυξή του σε θερμοκρασίες ψύξης και παραγωγή εξωπολυσακχαριτών παρέχει στη *Pseudomonas* μεγάλη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (Read & Costerton, 1987). Τα στελέχη του *Pseudomonas* είναι πιο ανθεκτικά στις χημικές ουσίες όταν βρεθούν ως μικτές καλλιέργειες εντός βιολογικών ταινιών με *Listeria*, *Salmonella* και άλλα παθογόνα (Gonzalez, 2005, Chmielewsky & Frank, 2003).

Πιο πρόσφατα, οι μικροβιακές συνθέσεις βιοϋμενίων που σχηματίζονται στις επιφάνειες του εξοπλισμού στις διάφορες βιομηχανίες τροφίμων (Πίνακας 1) έχουν περιγραφεί σε διάφορες εκθέσεις (Bagge-Ravn κ.ά., 2003, Gunduz & Tuncel, 2006, Guobjornsdottir, Einarsson , & Thorkelsson, 2005, Sharma & Anand, 2002). Επιπλέον, η εμφάνιση βιοϋμενίων μπορεί να μειώσει τη μεταφορά θερμότητας και την αποδοτικότητα της λειτουργίας σε εξοπλισμό ανταλλαγής θερμότητας. Στο σύστημα διανομής ύδατος, ο σχηματισμός βιοϋμενίου δεν μπορεί να παρεμποδιστεί από τα υψηλά επίπεδα υπολειμματικού χλωρίου και τα βιοϋμένια μπορούν να αυξήσουν την κατανάλωση ενέργειας, το μηχανικό μπλοκάρισμα και να επιταχύνουν τη διάβρωση των μεταλλικών επιφανειών (Kumar & Anand, 1998).

Πίνακας 1: Μικροβιακά είδη που παρουσιάστηκαν υπό μορφή βιοϋμενίου σε χώρους επεξεργασίας τροφίμων

Βιομηχανία τροφίμων	Μικροοργανισμοί (%)	Αναφορά
Βιομηχανία γαλακτοκομικών προϊόντων, γραμμές παστερίωσης	<i>Bacillus cereus</i> (12%) <i>Escherichia coli</i> (11%) <i>Shigella</i> sp. (11%) <i>Staphylococcus aureus</i> (8%)	Sharma and Anand (2002)
Βιομηχανία παγωτού, μάντας μεταφοράς ή μονάδα τροφοδοσίας	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Shigella</i>	Gunduz and Tuncel (2006)
Βιομηχανία ιχθυρών, μονάδα επεξεργασίας χαβιαριού	<i>Neisseriaceae</i> (25%) <i>Pseudomonas</i> (6%) <i>Vibrio</i> (10%) <i>Listeria</i> (3%)	Bagge-Ravn et al. (2003)
Βιομηχανία γαρίδας	<i>Pseudomonas</i> (66%) <i>P.fluorescens</i> <i>P.putida</i>	Guobjornsdottir et al. (2005)
Βιομηχανία ιχθυρών	<i>Enterobacteriaceae</i> (27%) <i>Serratia liquefaciens</i>	Guobjornsdottir et al. (2005)

1.6. Στρατηγικές ελέγχου Βιοϋμενίων

1.6.1. Πρόληψη σχηματισμού βιοϋμενίων

Έρευνες αποκάλυψαν ότι τα βιοϋμενία δημιουργούνται από διάφορους μικροοργανισμούς που βρίσκονται στις επιφάνειες του εξοπλισμού κυρίως της γραμμής παραγωγής. Ανέφεραν επίσης ότι τα βιοϋμενία που περιέχουν παθογόνα όπως ο *L. monocytogenes* έγιναν μία από τις κύριες αιτίες μόλυνσης των τροφίμων ή/και της μετάδοσης ασθενειών. Ως εκ τούτου, είναι πολύ σημαντικό να αναπτυχθούν μέθοδοι καθαρισμού και απολύμανσης και συστήματα ελέγχου σε μονάδες επεξεργασίας τροφίμων και περιβάλλοντα.

Η ορθή πρακτική παρασκευής (GMP), η ανάλυση κινδύνου και τα κρίσιμα σημεία ελέγχου (HACCP) έχουν καθιερωθεί για τον έλεγχο της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων. Επιπλέον, οι διαδικασίες καθαρισμού στο χώρο (CIP) έχουν χρησιμοποιηθεί στις γραμμές επεξεργασίας προϊόντων. Ορισμένες φυσικές μέθοδοι όπως μηχανικό βούρτσισμα, χημικοί παράγοντες όπως απορρυπαντικά και βιολογικά μέσα όπως ένζυμα εφαρμόζονται στις διαδικασίες CIP προκειμένου να αποκτήσουν ένα βιομηχανικό περιβάλλον χωρίς βιοϋμενία (Kumar & Anand, 1998). Ωστόσο, το μειονέκτημα του CIP, ακόμη και με τη χρήση ενός αποτελεσματικού συστήματος, είναι ότι συχνά παραμένουν μικροοργανισμοί και σχηματίζουν βιοϋμενία στις επιφάνειες του εξοπλισμού. Η υπολειμματική μικροχλωρίδα επιμένει μερικές φορές στις επιφάνειες του εξοπλισμού τροφίμων μετά τη θεραπεία με CIP (Dunsmore, 1981, Sharma & Anand, 2002). Αυτό ανάγκασε στην δημιουργία νέων τεχνικών πιο δραστικών από αυτές τις μεταχειρίσεις με στόχο την καταπολέμηση των βιοϋμενίων .

1.6.2. Καταπολέμηση βιοϋμενίων

Ο σχηματισμός βιοϋμενίων, αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα τόσο για τα τρόφιμα όσο και για τη βιομηχανία τροφίμων. Τα κύρια τροφιμογενή παθογόνα όπως *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. και *Campylobacter jejuni* μπορούν να σχηματίσουν βιοϋμενία παραμένοντας μια σημαντική πρόκληση για την ασφάλεια των τροφίμων στη βιομηχανία (Brandal 2006, Murphy et al. 2006, Gandhi και Chikindas 2007). Σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, ποικιλία μικροοργανισμών μπορεί να δημιουργήσει αποικίες στα τρόφιμα αλλά και στις επιφάνειες

που έρχονται σε επαφή με αυτά, οι αποικίες αυτές αναπτύσσονται και πολλές φορές δημιουργούν βιοϋμένια διαφορετικά είδη μικροοργανισμών. Μετά την ανάπτυξη τους, τα βιοϋμένια αποτελούν σημαντική δυνητική πηγή μόλυνσης των προϊόντων διατροφής και ενδέχεται να προκαλέσουν αλλοίωση των τροφίμων και / ή σημαντικούς κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών. Πολλά κρούσματα που σχετίζονται με την κατανάλωση φρέσκων προϊόντων, όπως μαρούλια, κρεμμύδια, σπανάκι και ντομάτες, έχουν συνδεθεί με ύπαρξη βιοϋμενίου παθογόνου μικροοργανισμού σε επιφάνεια επεξεργασίας τροφίμων (Beuchat 2002, Brandal 2006, Zhang et al. 2008). Οι δυσμενείς επιπτώσεις των βιοϋμενίων σε πολλές ανθρώπινες δραστηριότητες, έχουν οδηγήσει σε χρήση διάφορων τεχνικών για την πρόληψη και την καταπολέμηση τους εδώ και πολλά χρόνια.

Πολλές παραδοσιακές φυσικές και χημικές μέθοδοι, όπως έκπλυση, χλωρίωση και απολύμανση με υπεριώδη ακτινοβολία, χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο και την απομάκρυνση των βιοϋμενίων. Ωστόσο, λόγω της έλλειψης αποτελεσματικότητας και ασφάλειας αυτών των μεθόδων, εξακολουθούσαν να υπάρχουν ανησυχίες (Srinivasan et al, 2008), οι οποίες οδήγησαν στην αναζήτηση, στην ανάπτυξη και την εφαρμογή νέων προσεγγίσεων για διασπορά (dispersing) ή / και αναστολή του σχηματισμού τους.

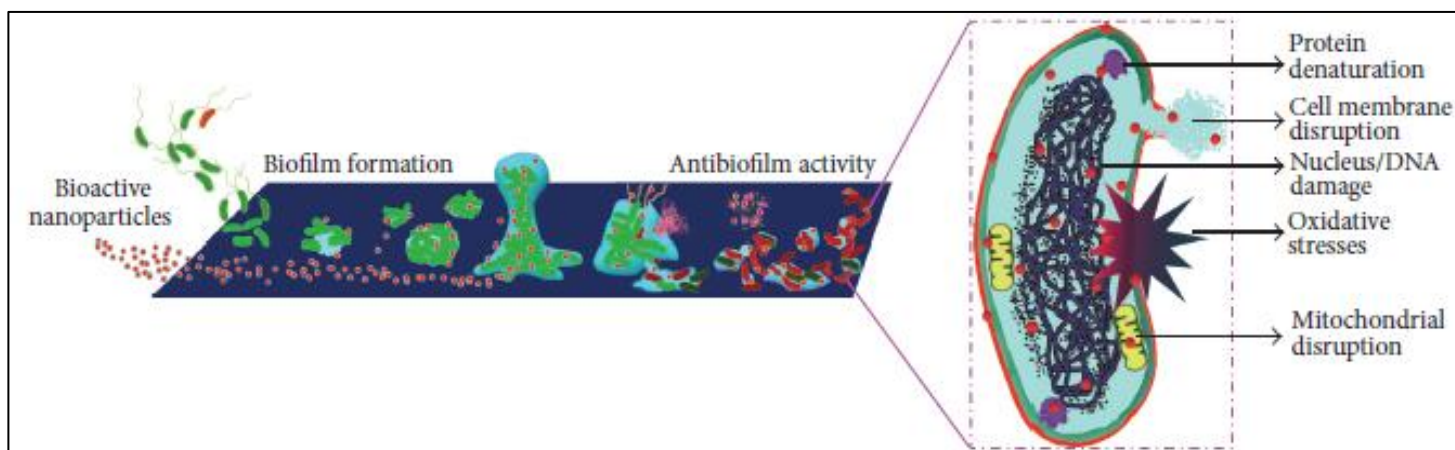
Η εξέλιξη στην έρευνα του μηχανισμού σχηματισμού των βιοϋμενίων οδήγησαν σε νέες ιδέες για την στρατηγική πρόληψης και αναστολής τους. Πολλές νέες μέθοδοι, όπως η παρεμπόδιση της αίσθησης της απαρτίας (QS), η ενζυματική διάσπαση, η βακτηριοκτόνο επικάλυψη, η χρήση νανοτεχνολογίας και η βιοηλεκτρική προσέγγιση, έχουν μελετηθεί με επιτυχία σε μια προσπάθεια να βρεθούν αποτελεσματικές εναλλακτικές λύσεις για την πρόληψη και τον έλεγχο των βιοϋμενίων. Καθώς η παρούσα εργασία εστιάζει στην καταπολέμηση των βιοϋμενίων με χρήση νανοτεχνολογίας σε συνδυασμό με υπεριώδη ακτινοβολία, θα αναλυθούν παρακάτω οι μέθοδοι αυτές.

1.6.2.1. Καταπολέμηση των βιοϋμενίων με χρήση νανοτεχνολογίας

Η νανοτεχνολογία είναι η τεχνική ενός λειτουργικού συστήματος που ασχολείται κυρίως με τους χειρισμούς στην κλίμακα μεμονωμένων ατόμων και μορίων και με ανοχή μικρότερη από 100 nm. Πρόσφατα, η χρήση νανοτεχνολογίας έχει γίνει ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για την πρόληψη και τον έλεγχο των βιοϋμενίων.

Αρκετά ανόργανα μεταλλικά νανοσωματίδια (nanoparticles NPs), όπως ο χρυσός, ο χαλκός, ο άργυρος, ο ψευδάργυρος και NP του τιτανίου, παρουσιάζουν αντι-βιοϋμενική δραστηριότητα. Οι

μηχανισμοί που υποκρύπτουν τις αντιμικροβιακές επιδράσεις των NPs δεν είναι πλήρως κατανοητοί και ποικίλλουν (Εικόνα 1). Παρόλ' αυτά πιθανοί μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αντιβακτηριακή δράση των NPs περιλαμβάνουν το μέγεθος των σωματιδίων (Morones et al., 2005), το σχήμα (Pal et al., 2007), το επιφανειακό φορτίο (Badawy et al., 2011) ή και τη σύνθεση τους και πιστεύεται ότι περιλαμβάνουν (Inbakandan et al., 2013, Hajipour et al., 2012, Lemire et al., 2013, Pelgrift et al., 2013), μεταβολές στην κυτταρική μεμβράνη (Warnes et al., 2012, Yun et al., 2013), απώλεια αναπνευστικής δραστηριότητας (Sotiriou & Pratsinis, 2010), υπεροξειδωση λιπιδίων (Hong et al., 2012) παραγωγή ROS (Subbiahdoss et al., 2012, Santo et al., 2011), ξετύλιγμα του DNA (*DNA unwinding*) (Sondi & Salopek-Sondi, 2004, Friedman et al., 2011) ή και διαταραχές στις μεταβολικές οδούς (Egger, et al., 2009, Iavicoli, et al., 2013).



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση ανάπτυξης ενός βιοϋμενίου και ο αντιμικροβιακός μηχανισμός των νανοσωματιδίων.

1.6.2.2. Καταπολέμηση βιοϋμενίων με χρήση TiO_2

Οι αντιβακτηριακές δράσεις των NPs μεταλλικών οξειδίων έχουν επίσης μελετηθεί. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το οξείδιο του ψευδαργύρου (ZnO) (Heinlaan et al., 2008), το οξείδιο του χαλκού (CuO) (Heinlaan et al., 2008), το οξείδιο του σιδήρου (Fe_2O_3), το οξείδιο του δημητρίου (CeO), το οξείδιο του αργιλίου (Al_2O_3) (Ansari et al., 2013) και το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2) (Kim et al., 2003; Adams et al., 2006; Chorianopoulos et al., 2011).

Σε σύγκριση με άλλα οξείδια μετάλλων το διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2) έχει προσελκύσει μεγάλη προσοχή ως φωτοκαταλυτικό απολυμαντικό στη βιομηχανία τροφίμων (Fujishima et al., 1999, 2000). Το TiO_2 έχει χρησιμοποιηθεί για την αδρανοποίηση μιας ευρείας ποικιλίας

μικροοργανισμών σε πολλές εφαρμογές (Matsunaga et al., 1988, Fujishima et al., 1999, Kim et al., 2003, Duffy et al., 2004, Maneerat and Hayata). Θεωρείται μη τοξικό λόγω της αδρανούς του φύσης και έχει εγκριθεί από την Αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για χρήση σε τρόφιμα, φάρμακα, καλλυντικά και υλικά που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα.

Ο πιθανός ανασταλτικός τρόπος δράσης του TiO_2 οφείλεται στη φωτοκαταλυτική δημιουργία ισχυρής οξειδωτικής ισχύος όταν φωτίζεται με υπεριώδες φως σε μήκος κύματος μικρότερο από 385 nm (Fujishima and Honda, 1972, Fujishima et al., 1999). Συγκεκριμένα τα νανοσωματίδια TiO_2 καταλύουν τη θανάτωση των βακτηρίων (Wei κ.ά., 1994, Pham κ.ά., 1995) σε συνδυασμό με τη δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας, πιθανώς λόγω της δημιουργίας πολύ δραστικών ελεύθερων ριζών υδροξυλίου (aOH) με φωτοεκπερασμένα σωματίδια TiO_2 (Ireland et al., 1993). Η πρώτη αναφορά σχετικά με την αντιμικροβιακή δράση του φωτοκαταλύτη TiO_2 σχετίζεται με την αναστολή του *Escherichia coli* σε νερό (Matsunaga et al., 1985). Έχει βρεθεί ότι οι ρίζες OH είναι περίπου χίλιες μέχρι και δέκα χιλιάδες φορές πιο αποτελεσματικές για απενεργοποίηση βιοϋμενίου του μικροοργανισμού *E. coli* από τα κοινά απολυμαντικά όπως το χλώριο, το όζον και το διοξείδιο του χλωρίου (Cho et al., 2004). Άλλη έρευνα έδειξε ότι τα νανοσωματίδια TiO_2 μπορούν να θεωρηθούν μια νέα εναλλακτική λύση για την πρόληψη βιοϋμενίου μυκητιακής προέλευσης (Haghighi et al., 2013). Τέλος μελέτες έχουν βρει ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από τα Gram-αρνητικά βακτήρια στις αντιβακτηριακές επιδράσεις του TiO_2 (Fu et al., 2005).

Περιορισμένες πληροφορίες μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση του TiO_2 σε βιοϋμένια που σχηματίζονται από βακτήρια που μεταδίδονται στα τρόφιμα. Η μόνη διαθέσιμη πληροφορία αφορά την βακτηριοκτόνο δράση των νανοκαταλυτών οξειδίων μετάλλων με πρόσμιξη αζώτου σε βιοϋμένια του μικροοργανισμού *E.coli* (Liu et al., 2007) και την φωτοκαταλυτική οξείδωση βιοϋμενίων σε επιφάνειες που ήταν επικαλυμμένες με TiO_2 (Wolfum et al., 2002).

Γενικά η βακτηριοκτόνος και η μυκητοκτόνος δράσης του TiO_2 έχει μελετηθεί έναντι πολλών μικροοργανισμών όπως *E. coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Diaporthe actinidiae* και *Penicillium expansum*. (Chorianopoulos et al., 2011, Matsunaga et al., 1985, 1988, Wei et al., 1994, Kikuchi et al., 1997, Horie et al., 1998, Sunada et al., 1998, Maness et al., 1999, Choi and Kim,

2000, Wist et al., 2002, Kim et al., 2003, Cho et al., 2004, Hur et al., 2005, Maneerat and Hayata, 2006).

1.6.2.3. Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού έναντι των βιοϋμενίων

Η φύση της δομής του βιοϋμενίου και οι φυσιολογικές ιδιότητες των βιοϋμενικών κυττάρων παρέχουν μια εγγενή αντίσταση στους αντιμικροβιακούς παράγοντες, είτε αυτοί οι αντιμικροβιακοί παράγοντες είναι αντιβιοτικά ή απολυμαντικά. Στην πραγματικότητα, όταν τα κύτταρα υπάρχουν σε ένα βιοϋμένιο, μπορούν να γίνουν 10-1000 φορές πιο ανθεκτικά στις επιδράσεις των αντιμικροβιακών παραγόντων (Prosser et al. (1987), Nickel et al. (1985), Gristina et al. (1987), Evans and Holmes, 1987). Οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για την αντοχή μπορεί να είναι ένας ή περισσότεροι από τους ακόλουθους: (i) αργή διείσδυση του αντιμικροβιακού παράγοντα στο εσωτερικό του βιοϋμενίου, (ii) αργή ανάπτυξη του βιοϋμενίου, (iii) προστασία των παθογόνων σε βιοϋμένια μικτών καλλιεργειών.

- ***Αργή διείσδυση του αντιμικροβιακού παράγοντα στο εσωτερικό του βιοϋμενίου***

Τα αντιμικροβιακά μόρια πρέπει να διαχέονται διαμέσου της μήτρας του βιοϋμενίου προκειμένου να αδρανοποιήσουν τα εγκλεισμένα σε αυτή κύτταρα. Οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες που συντάσσουν αυτή τη μήτρα παρουσιάζουν ένα διάχυτο φράγμα για αυτά τα μόρια επηρεάζοντας έτσι τον ρυθμό μεταφοράς του αντιμικροβιακού μορίου στο εσωτερικό του βιοϋμενίου αλλά και την αντίδραση μεταξύ του αντιμικροβιακού υλικού με το υλικό της μήτρας. Οι Suci et al., (1994) έδειξαν αργή διείσδυση της σιπροφλοξασίνης σε βιοϋμένιο *Pseudomonas aeruginosa*, η δράση των οποίων ενώ κανονικά χρειάζεται 40 δευτερόλεπτα για μια αποστειρωμένη επιφάνεια για μια επιφάνεια μολυσμένη με βιοϋμένιο χρειάστηκαν 21 λεπτά. Άλλη έρευνα έδειξε ότι τα ελεύθερα βακτηριακά κύτταρα ήταν 15 φορές πιο ευαίσθητα στην τομπραμυκίνη από ό, τι τα κύτταρα ενός βιοϋμενίου (Hoyle et al., 1992).

- ***Αργή ανάπτυξη του βιοϋμενίου***

Ένας άλλος μηχανισμός ανθεκτικότητας βιοϋμενίων σε αντιμικροβιακούς παράγοντες είναι ότι τα βιοϋμενικά κύτταρα αναπτύσσονται πολύ πιο αργά από τα πλαγκτονικά κύτταρα και ως εκ τούτου καταλαμβάνουν πιο αργά τους αντιμικροβιακούς παράγοντες. Χρησιμοποιώντας μια μέθοδο

κυτταρικής καλλιέργειας που έχει σχεδιαστεί για να προσδιορίζει την επίδραση του ρυθμού ανάπτυξης των βιοϋμενίων, οι Evans et al. (1990) διαπίστωσαν ότι τα βραδύτερα αναπτυσσόμενα κύτταρα *E. coli* (σε μορφή βιοϋμενίου) ήταν αυτά που ήταν πιο ανθεκτικά στο κετριμίδιο. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι οι ρυθμοί αύξησης βιοϋμενίου *S. epidermidis* επηρέασαν έντονα την ευαισθησία, όσο ταχύτερος ο ρυθμός ανάπτυξης των κυττάρων τόσο πιο γρήγορος ήταν ο ρυθμός απενεργοποίησης από την σιπροφλοξασίνη (DuGuid et al., 1990). Ακόμα οι Anwar et al. (1992) διαπίστωσαν ότι τα ώριμα (10 ημερών) ανεπτυγμένα βιοϋμένια *P. aeruginosa* ήταν πιο ανθεκτικά στην τομπραμυκίνη και την πιπερακιλλίνη από ό, τι τα νεότερα (2-ημερών) βιοϋμένια. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί με διάφορους συνδυασμούς βακτηρίων και αντιμικροβιακών παραγόντων (Amorena et al., 1999, Chuard, et al., 1993, Desai et al., 1998).

- **Προστασία των βιοϋμενίων από μικτές καλλιέργειες**

Στο φυσικό τους περιβάλλον, τα βιοϋμένια αποτελούνται από μείγματα διαφορετικών ειδών και όχι από έναν μικροοργανισμό (Lyautey et al., 2005, Simoes et al., 2008, Burmolle et al., 2010, Zijng et. 2010). Υπό αυτές τις συνθήκες, οι αλληλεπιδράσεις των ειδών μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση συγκεκριμένων φαινοτύπων. Μια πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι το παθογόνο βακτήριο *E. coli* O157: H7 σχημάτισε βιοϋμένιο 400 φορές υψηλότερο πληθυσμό όταν αναπτύχθηκε σε συνδυασμό με το *Acinetobacter calcoaceticus* (Habimana et al. 2010). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τέσσερα στελέχη που απομονώθηκαν από θαλάσσιο φύκι αλληλεπιδρούν συνεργικά σε ένα βιοϋμένιο παράγοντας περισσότερη βιομάζα και παρουσιάζοντας αξιοσημείωτα μεγαλύτερη αντοχή στο υπεροξειδίο του υδρογόνου σε σχέση με οποιοδήποτε από τα βιοϋμένια των μεμονωμένων ειδών. (Burmolle et al., 2006).

Πράγματι, πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι τα βιοϋμένια πολλαπλών ειδών γενικά είναι πιο ανθεκτικά στην απολύμανση από ότι τα βιοϋμένια μονοκαλλιιεργειών (Luppens et al., 2008, Simoes et al., 2009, Van der Veen και Abee 2010). Δυστυχώς, οι σχετικοί μηχανισμοί παραμένουν ασαφείς. Η συγκεκριμένη φύση και σύνθεση της μήτρας ενός βιοϋμενίου πολλαπλών ειδών είναι μία από τις προτεινόμενες εξηγήσεις. Έχει προταθεί ότι οι χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυμερών που παράγονται από κάθε είδος μπορεί να οδηγήσουν σε μια πιο ιξώδη μήτρα (von Canstein et al., 2002, Burmolle et al., 2006) που να μειώνει τη διείσδυση αντιμικροβιακών ουσιών. Ομοίως, επειδή ένας αντιμικροβιακός παράγοντας μπορεί να απενεργοποιηθεί σε μια μήτρα βιοϋμενίου λόγω παρουσίας κάποιων ενζύμων (Stewart et al., 2000), τα ένζυμα που παράγονται από τα διαφορετικά είδη

μπορούν να δράσουν συνεργικά έναντι τοξικών ενώσεων, έτσι ώστε τα μη παραγωγικά είδη να επωφεληθούν από τη σύνδεση μέσω της συμπλήρωσης ενζύμων (Shu et al., 2003). Μια άλλη εξήγηση είναι ότι λόγω της συγκεκριμένης χωρικής διαρρύθμισης ορισμένων βακτηριακών ειδών μέσα σε ένα βιοϋμένιο, ορισμένα στελέχη μπορούν να προστατευθούν από ένα αντιμικροβιακό παράγοντα μέσω της συσσωμάτωσής τους με άλλα, εντός της τρισδιάστατης δομής. Αναφέρεται, για παράδειγμα, ότι ο *Staphylococcus sciuri* προστατεύεται από την επίδραση του χλωρίου λόγω της συσχέτισης του με τις μικροαποικίες που σχηματίζονται από το *Kocuria* sp., ένα πιο ανθεκτικό στέλεχος (Leriche et al., 2003). Εκτός από αυτές τις πιθανές αλληλεπιδράσεις με άλλα βακτηριακά είδη, τα βακτήρια σε ένα βιοϋμένιο μπορούν επίσης να προστατευθούν και από ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης είναι ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας ενός καινοτόμου προϊόντος καθαρισμού επιφανειών βιομηχανίας για την απολύμανση επιφανειών και τα υλικών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων. Συγκεκριμένα, στόχος είναι η μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης του καινοτόμου προϊόντος έναντι των βιουμένων σημαντικών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών. Παράλληλα, για πρώτη φορά μελετήθηκε με λεπτομέρεια η αποτελεσματικότητα του απολυμαντικού παράγοντα σε μικτά βιοϋμένα παθογόνων και αλλοιογόνων μικροοργανισμών που έχουν συσχετιστεί με την βιομηχανία τροφίμων για πρώτη φορά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Βακτηριακά στελέχη

Τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη για την δημιουργία μονών καλλιεργειών και μικτών, τα χαρακτηριστικά του κάθε στελέχους καθώς και η προέλευση τους παρατίθενται στον **Πίνακα 2**. Τα συγκεκριμένα στελέχη ανήκουν στην Τράπεζα Μικροοργανισμών (FMCC) του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Πίνακας 2: Στελέχη βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη

Είδος	Στέλεχος	Χαρακτηριστικά στελέχους	Προέλευση
<i>Listeria monocytogenes</i>	B129	21350 Ορότυπος 4b	Κατεψυγμένο τρόφιμο (με βάση τον κιμά)
	B128	21085	Soft Cheese
<i>E. coli O157:H7</i>	B18	Αρνητικό σε σιγκατοξίνες NCTC 13127	Κοπρανολογική εξέταση ανθρώπου
	B289	ATCC 35150	
<i>Salmonella enterica ser. Enteritidis</i>	B56	WT	<i>L. Cocolin</i>
	B287	P167807	Surrey
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	B427	37B1	Pork (Papadopoulou et al, 2012)
	B428	29B5	
	B429	18A5	
	B430	27A1	
	B431	23A1	
	B432	20A3	
	B433	18A1	
B434	4A1		
<i>Serratia liquefaciens</i>	B292	VK6	Minced beef (Doulgeraki et al, 2011)
<i>Serratia proteomaculans</i>	B293	VK17	
<i>Citrobacter freundii</i>	B294	VK19	
<i>Hafnia alvei</i>	B295	VK20	
<i>Proteus vulgaris</i>	B306	VK101	
<i>Leuconostoc spp</i>	B233	-	Minced beef (Doulgeraki et al, 2010)
<i>Lactobacillus sakei</i>	B226	-	
<i>Pseudomonas fragi</i>	B209	DSM - 3456	Skerman VB, et al. Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 225-420, 1980

Όλα τα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη ήταν αποθηκευμένοι στους -20°C σε φιαλίδια (vials) που περιείχαν θρεπτικό ζωμό 80% Tryptic Soy Broth (TSB, LAB M) και 20% γλυκερόλη για την προστασία των κυττάρων (stock culture).

3.2. Σχηματισμός βιοϋμενίου σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα

3.2.1. Προετοιμασία εμβολίου

Πριν από κάθε πείραμα έγινε ενεργοποίηση των καλλιιεργειών με προσθήκη 10μl της stock καλλιέργειας (-20°C) σε 5ml TSB κι επώαση σε συγκεκριμένη θερμοκρασία και χρόνο για κάθε μικροοργανισμό (25°C για *Brochothrix thermosphacta* και *Pseudomonas fragi*, 30°C για *Leuconostoc spp.* και *Lactobacillus sakei* και 37°C για *Serratia liquefaciens*, *Serratia proteomaculans*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* και *Proteus vulgaris*, *L. monocytogenes*, *E. coli* και *S. Enteritidis*).

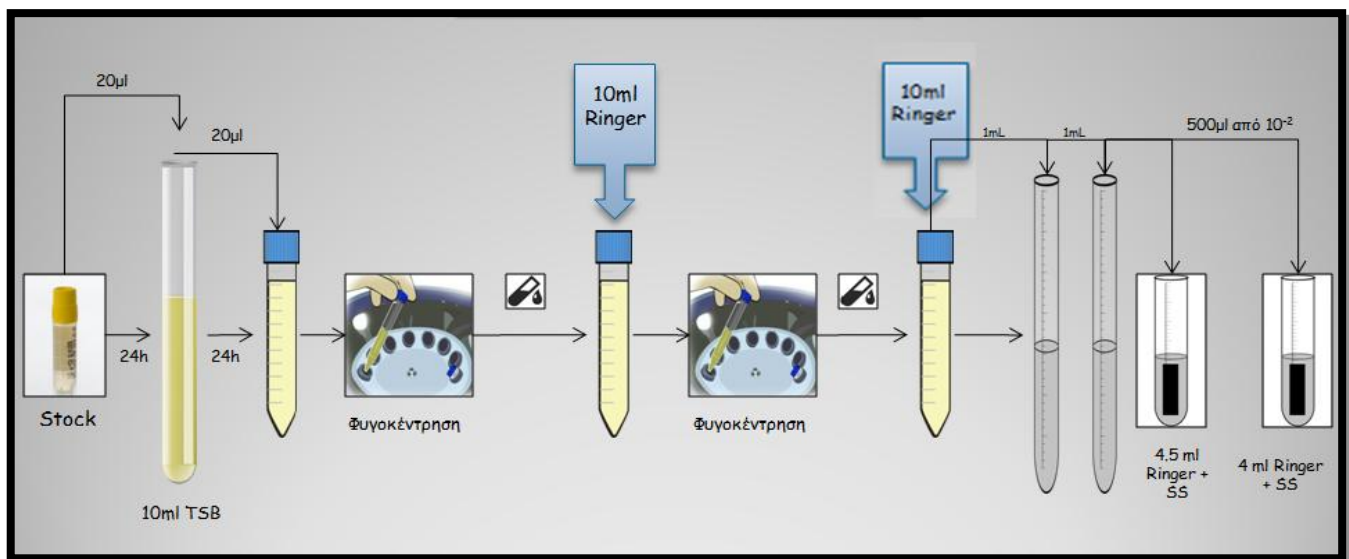
Έπειτα από 24h, 10μl από την κάθε καλλιέργεια μεταφέρθηκαν σε 10ml TSB και επώαστηκαν στις ίδιες συνθήκες για 24h ή 18h ανάλογα τον μικροοργανισμό. Για τον καθαρισμό των κυττάρων από το θρεπτικό υπόστρωμα, η ενεργή καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε σε $5000 \times g$ στους 5°C για 10 min (**Multifuge 1S-R, Thermo Electron Corporation**).

- **Προετοιμασία εμβολίου μονής καλλιέργειας**

Για τη δημιουργία εμβολίου μονής καλλιέργειας έγινε έκπλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 10 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ strength Ringer και τελικά επαναιωρήθηκαν ως καθαρές καλλιέργειες σε 10ml του ίδιου διαλύματος. Τέλος πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα $\frac{1}{4}$ strength Ringer για δημιουργία του τελικού εμβολίου μονής καλλιέργειας (500μl βακτηριακού εναιωρήματος από την 2^η αραιώση = 10^6 cfu/ml).

- **Προετοιμασία εμβολίου μικτής καλλιέργειας**

Κατά την παρασκευή εμβολίου μικτής καλλιέργειας μετά το τέλος της δεύτερης φυγοκέντρησης έγινε αρχικά ανάμειξη των διαφορετικών στελεχών του κάθε παθογόνου μικροοργανισμού. Έτσι δημιουργήθηκαν οι καλλιέργειες (α) *L. monocytogenes* αποτελούμενη από τα στελέχη B129 και B128, (β) *E. coli* αποτελούμενη από τα στελέχη B18 και B289 και (γ) *S. Enteritidis* αποτελούμενη από τα στελέχη B56 και B287 (βλ. **Πίνακα 2**). Τέλος πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα ¼ strength Ringer για δημιουργία του τελικού εμβολίου (500μl βακτηριακού εναιωρήματος από την 10^{-2} αραιώση = 10^6 cfu/ml). Οι συνδυασμοί των μικτών καλλιεργειών που έλαβαν μέρος στο πείραμα αναγράφονται αναλυτικά και με τους κωδικούς τους στο **Πίνακα 3**. Η πειραματική διαδικασία προετοιμασίας του εμβολίου απεικονίζεται στο **Σχήμα 1**.



Σχήμα 1 :Απεικόνιση πειραματικής διαδικασίας προετοιμασίας εμβολίου μονής/μικτής καλλιέργειας για σχηματισμό βιοϋμενίου σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα.

Πίνακας 3: Συνδυασμοί και κωδικοποίηση μικτών καλλιιεργειών

ΚΩΔΙΚΟΙ ΜΙΚΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ					
		Κωδικός	Παθογόνοι μικροοργανισμοί		
			<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Enteritidis</i>
128 + 129	<i>L. monocytogenes</i>	L	LL	EL	SL
18 + 289	<i>E. coli</i>	E	LE	EE	SE
56 + 287	<i>S. Enteritidis</i>	S	LS	ES	SS
292	<i>Serratia liquefaciens</i>	Ent1	LEnt1	EEnt1	SEnt1
293	<i>Serratia proteomaculans</i>	Ent2	LEnt2	EEnt2	SEnt2
294	<i>Citrobacter freundii</i>	Ent3	LEnt3	EEnt3	SEnt3
295	<i>Hafnia alvei</i>	Ent4	LEnt4	EEnt4	SEnt4
306	<i>Proteus vulgaris</i>	Ent5	LEnt5	EEnt5	SEnt5
233	<i>Leuconostoc spp</i>	LAB1	LLAB1	ELAB1	SLAB1
226	<i>Lactobacillus sakei</i>	LAB2	LLAB2	ELAB2	SLAB2
209	<i>Pseudomonas fragi</i>	P	LP	EP	SP
432	<i>Brochothrix thermosphacta 1</i>	B1	LB1	EB1	SB1
434	<i>Brochothrix thermosphacta 2</i>	B2	LB2	EB2	SB2

3.2.2. Επιφάνεια και συνθήκες ανάπτυξης βιοϋμενίου

Για την ανάπτυξη των βιοϋμενίων χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα (Stainless steel coupons), ένα υλικό που χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων και γενικότερα σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων.

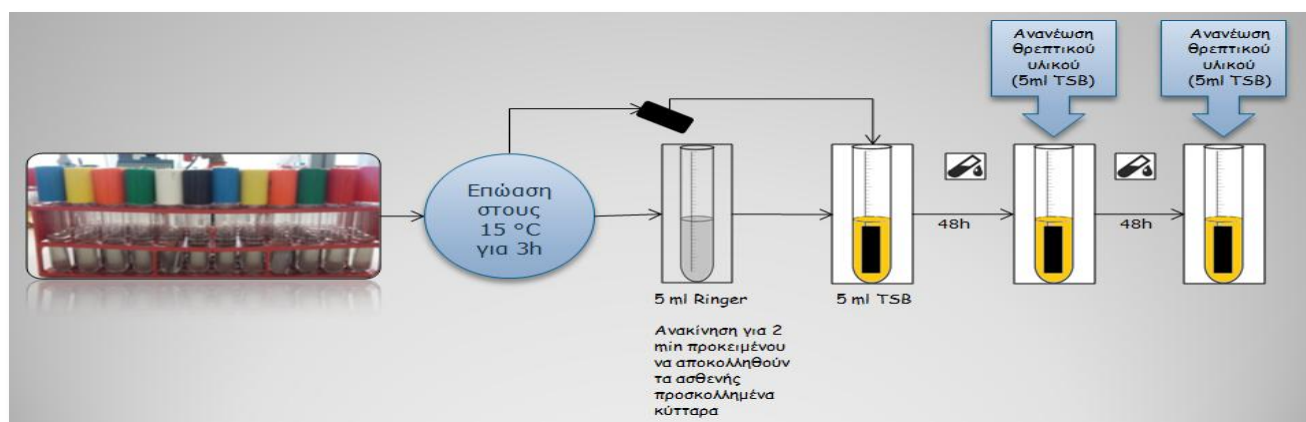
Τα πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα διαστάσεων $3 \times 1 \times 0,1$ cm τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες (half tube) με 4.5ml Ringer (στη περίπτωση μονής καλλιέργειας) ή 4 ml Ringer (στη περίπτωση εμβολιασμού μικτής καλλιέργειας) και ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min. Στην συνέχεια τα πλακίδια εμβολιάστηκαν με 500μl από την κάθε καλλιέργεια και επώαστηκαν στους 15°C για 3 h υπό στατικές συνθήκες. Για το στάδιο της ανάπτυξης του βιοϋμενίου κατά τον εμβολιασμό μονής καλλιέργειας τα πλακίδια επώαστηκαν για 6 ημέρες σε 2 διαφορετικές θερμοκρασίες στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης του κάθε μικροοργανισμού και

στους 20°C. Στην περίπτωση εμβολιασμού μικτής καλλιέργειας όλα τα πλακίδια επωάστηκαν για 6 ημέρες στους 20°C.

3.2.3. Σχηματισμός βιοϋμενίου

Ύστερα από την παρασκευή του εμβολίου ακολούθησε εμβολιασμός των πλακιδίων με 500μl βακτηριακού εναιωρήματος από την 10^{-2} αραιώση = 10^6 cfu/ml. Στην περίπτωση εμβολιασμού μονής καλλιέργειας προστέθηκαν 500μl βακτηριακού εναιωρήματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες (half tube) που περιείχαν 4.5ml Ringer και το πλακίδιο ανοξειδωτού χάλυβα. Αντίστοιχα, στη περίπτωση εμβολιασμού μικτής καλλιέργειας προστέθηκαν 500μl βακτηριακού εναιωρήματος από το κάθε μικροοργανισμό ξεχωριστά σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4ml Ringer και το πλακίδιο. Τα δείγματα επωάστηκαν για 3h στους 15°C (Στάδιο προσκόλλησης).

Στην συνέχεια με αποστειρωμένη λαβίδα τα πλακίδια μεταφέρθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 5 ml Ringer και ανακινήθηκαν χειροκίνητα για λίγα δευτερόλεπτα με στόχο την απομάκρυνση των ασθενά προσκολλημένων κυττάρων. Έπειτα τα πλακίδια μεταφέρθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 ml θρεπτικό υλικό TSB και επωάστηκαν, τα βιοϋμένια μονής καλλιέργειας στην βέλτιστη θερμοκρασία του κάθε μικροοργανισμού και στους 20°C για 6 ημέρες ενώ στη περίπτωση δημιουργίας μικτών βιοϋμενίων, τα πλακίδια επωάστηκαν στους 20°C για 6 ημέρες. Το θρεπτικό υλικό στο οποίο ήταν μέσα τα πλακίδια ανανεωνόταν ανά 48h. Η πειραματική διαδικασία σχηματισμού βιοϋμενίου φαίνεται στο **Σχήμα 2**.



Σχήμα 2: Αποϊκόνιση πειραματικής διαδικασίας σχηματισμού βιοϋμενίου σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα.

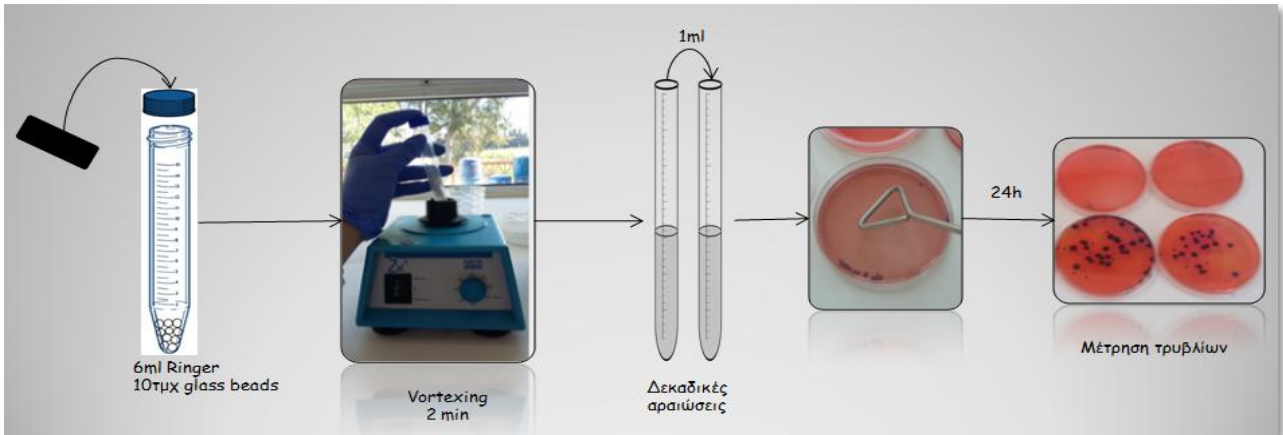
3.2.4. Ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια (Bead Vortexing)

Για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που είχαν προσκολληθεί στην επιφάνεια των πλακιδίων, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σύμφωνα με την μέθοδο στροβιλισμού με σφαιρίδια (bead Vortexing) (Kostaki et al., 2012, Chorianoopoulos et al., 2008).

Αρχικά έγινε παραλαβή των πλακιδίων από το θρεπτικό υλικό 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 σωλήνακια τύπου falcon τα οποία 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.

Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και ακολούθησε ενοφθαλμισμός 100 μl βακτηριακού εναιωρήματος και επιφανειακή εξάπλωση. Η επιφανειακή εξάπλωση μονής καλλιέργειας έγινε και σε γενικό θρεπτικό υλικό TSA για την ποσοτικοποίηση του βιοϋμενίου αλλά και σε επιλεγμένα θρεπτικά υποστρώματα ανάλογα με τον μικροοργανισμό. Στις μικτές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το PALCAM για τα στελέχη *L. monocytogenes*, TBX για τα στελέχη *E. coli*, XLD για τα στελέχη *Salmonella enterica* ser. Enteritidis, STAA για τα στελέχη *Brochothrix thermosphacta* VRBGA για τα στελέχη *Serratia liquefaciens*, *Serratia proteomaculans*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* και *Proteus vulgaris* MRS για τα στελέχη *Leuconostoc* spp. και *Lactobacillus sakei* και CFC για το στέλεχος *Pseudomonas fragi*. Έτσι για παράδειγμα στην περίπτωση εμβολιασμού μικτής καλλιέργειας με κύριο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* για όλα τα δείγματα χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα PALCAM και επώαση στους 37°C για ποσοτικοποίηση του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* και τα θρεπτικά υποστρώματα XLD, TBX, STAA, VRBGA, MRS και CFC για ποσοτικοποίηση των άλλων μικροοργανισμών της συγκαλλιέργειας.

Οι βιοϋμενικοί πληθυσμοί των επιλεγμένων στελεχών απαριθμήθηκαν και προσδιορίστηκαν μετά από επώαση των τρυβλίων σε συνθήκες ανάλογες με το κάθε μικροοργανισμό. Η πειραματική διαδικασία ποσοτικοποίησης βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια φαίνεται στο **Σχήμα 3**.



Σχήμα 3: Αποκόνιση πειραματικής διαδικασίας ποσοτικοποίησης βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια.

3.3. Απολύμανση βιοϋμενίων

3.3.1. Απολυμαντικό διάλυμα

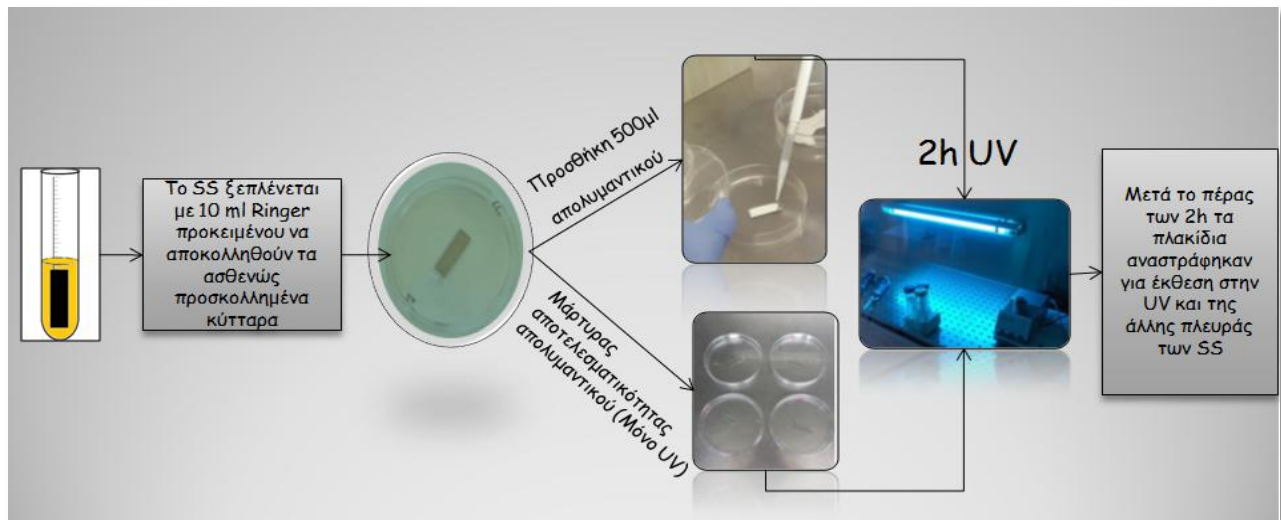
Για την απολύμανση των πλακιδίων χρησιμοποιήθηκε έτοιμο διάλυμα διοξειδίου του τιτανίου το οποίο προμηθεύτηκε από την παρασκευάστρια εταιρεία. Συγκεκριμένα, σύμφωνα με την εταιρεία σκόνη TiO₂ αναμίχθηκε με ακέτυλο ακετόνη, νερό και Triton X-100 υπό ανάδευση για την παρασκευή τελικού διαλύματος 59.58% (w/v) σύμφωνα με την μέθοδο των **Tsoukleris et al. (2007)**.

3.3.2. Διαδικασία απολύμανσης

Αφού σχηματίστηκαν τα ώριμα βιοϋμένια των μικροοργανισμών σύμφωνα με την διαδικασία της **Παραγράφου 3.3.2.**, ακολούθησε απολύμανση των πλακιδίων με απολυμαντικό.

Αρχικά έγινε παραλαβή των πλακιδίων από το θρεπτικό υλικό 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 αποστειρωμένα κενά τρυβλία. Έπειτα τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σαν μάρτυρες της απολυμαντικής δράσης, αφέθηκαν μόνο στην επίδραση της ακτίνας UV ενώ στα άλλα δείγματα με την βοήθεια πιπέτας τοποθετήθηκαν 500μl απολυμαντικού στην μία πλευρά του πλακιδίου. Τα δείγματα αφέθηκαν σε ακτινοβολία UV για 2h.

Μετά το πέρας των 2h με την βοήθεια λαβίδας το πλακίδιο αντιστράφηκε από την άλλη πλευρά και τοποθετήθηκαν άλλα 500μl από το απολυμαντικό ενώ τα πλακίδια που λειτούργησαν ως μάρτυρας της απολυμαντικής δράσης απλά αντιστράφηκαν. Τα δείγματα αφέθηκαν για άλλες 2h σε ακτινοβολία UV. Στο **Σχήμα 4** απεικονίζεται η πειραματική διαδικασία της απολυμαντικής διαδικασίας των πλακιδίων.



Σχήμα 4: Απεικόνιση απολυμαντικής διαδικασίας των κουπονιών.

3.3.3. Ποσοτικοποίηση βιοϋμενίου ύστερα από χρήση απολυμαντικού

Για να προσδιοριστεί ο αριθμός των κυττάρων που απέμεινε προσκολλημένους στην επιφάνεια των πλακιδίων μετά την επίδραση του απολυμαντικού, πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σύμφωνα με την μέθοδο στροβιλισμού με σφαιρίδια (bead Vortexing) που περιγράφεται αναλυτικά στην **Παράγραφο 3.2.4**.

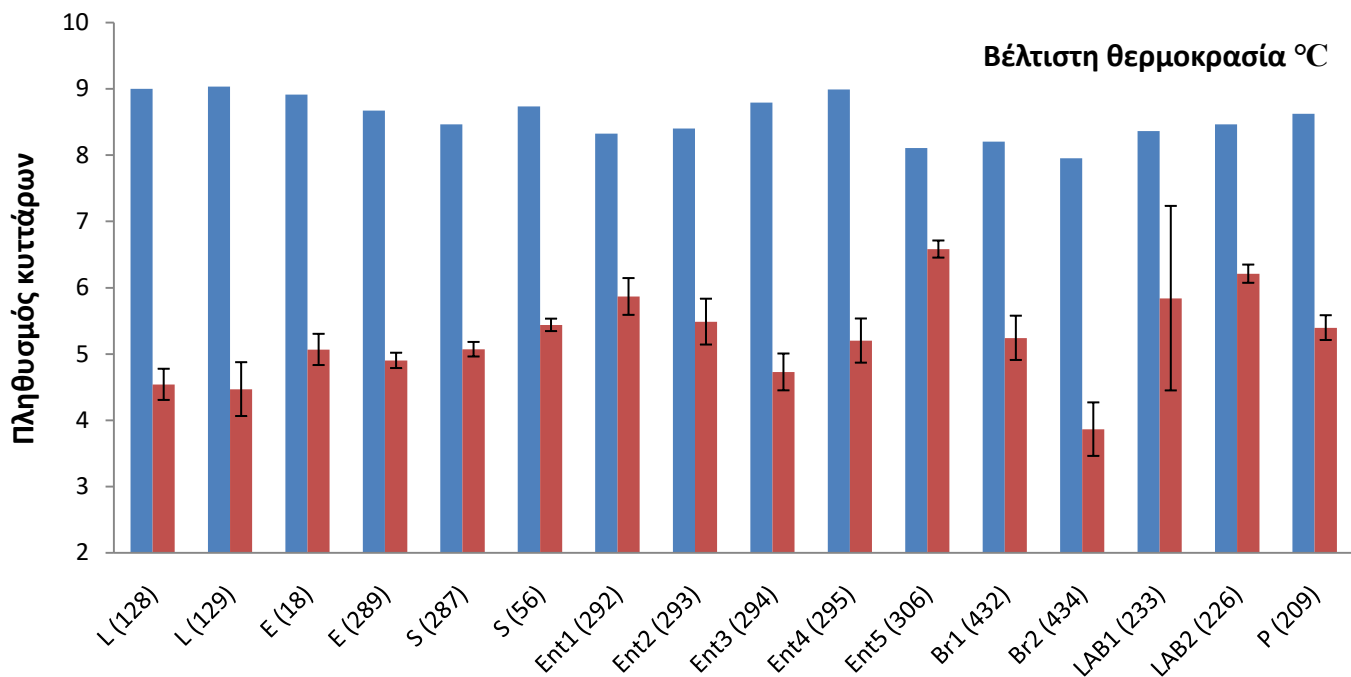
Οι βιοϋμενικοί πληθυσμοί των επιλεγμένων στελεχών που κατάφεραν να επιζήσουν μετά την χρήση του απολυμαντικού καθώς και οι μάρτυρες απολύμανσης απαριθμήθηκαν και προσδιορίστηκαν μετά από επώαση των τρυβλίων σε συνθήκες ανάλογες με το κάθε μικροοργανισμό.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Σχηματισμός βιοϋμενίων

4.1.1. Σχηματισμός βιοϋμενίου μονής καλλιέργειας

Ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός του εμβολίου καθώς και ο αρχικός πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1: Αρχικός μικροβιακός πληθυσμός εμβολίου (log cfu/ml) και αρχικός μικροβιακός πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων (log cfu/cm²). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός του εμβολίου και με κόκκινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2:** *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

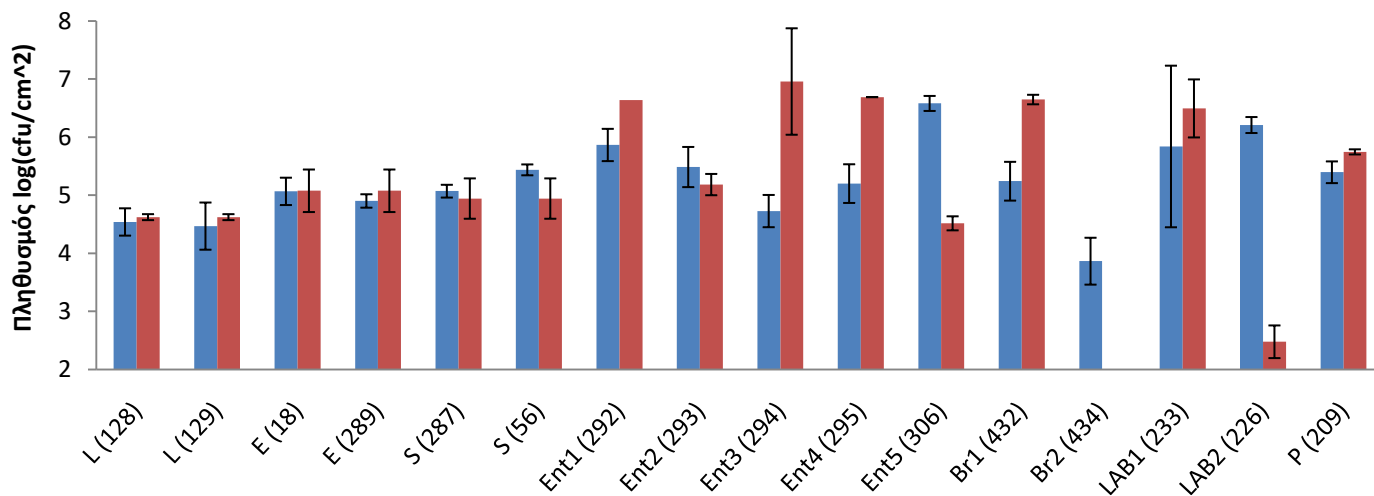
Από τα αποτελέσματα παρατηρήθηκε ότι ο αρχικός μικροβιακός πληθυσμός του εμβολίου του κάθε μικροοργανισμού διακυμάνθηκε σε τιμές 7,95 – 9,03 log (cfu/ml) με το στέλεχος *L. monocytogenes* B129 (L) να παρουσιάζει το μεγαλύτερο πληθυσμό με τιμή 9,03 log (cfu/ml) και

το στέλεχος *Brochothrix thermosphacta* B434 (Br2) το μικρότερο πληθυσμό με τιμή 7,95 log (cfu/ml).

Ο μικροβιακός πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων διακυμάνθηκε σε τιμές 3,86 – 6,58 log (cfu/cm²) με τον μικροοργανισμό *Proteus vulgaris* B306 (Ent5) να παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου με τιμή 6,58 ± 0.13 log (cfu/cm²) και το στέλεχος *Brochothrix thermosphacta* B434 (Br2) τη μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου με τιμή 3,86 ± 0.40 log (cfu/cm²).

4.1.2. Σχηματισμός βιοϋμενίου σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων που δημιουργήθηκαν σε βέλτιστη θερμοκρασία του κάθε μικροοργανισμού και στους 20 °C παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 2.



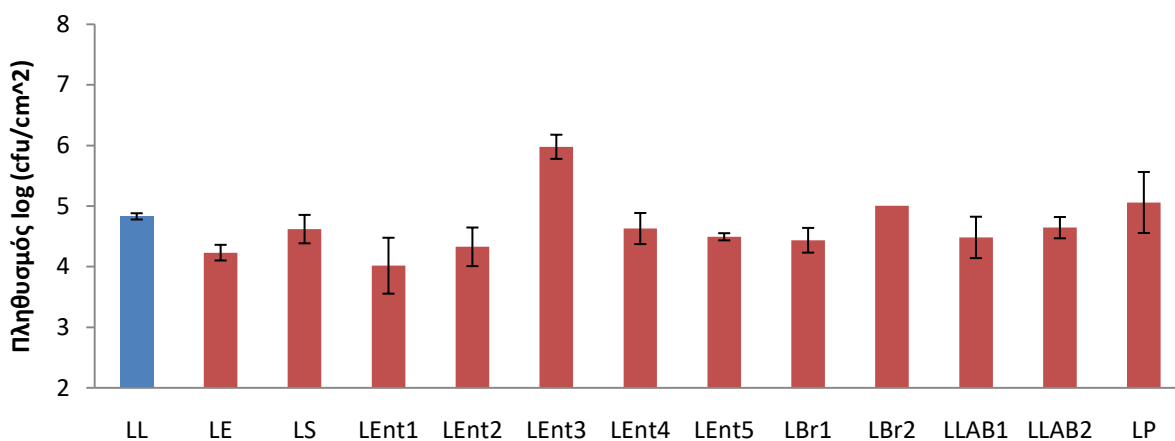
Διάγραμμα 2: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων με επώαση των κουπονιών στη βέλτιστη θερμοκρασία και πληθυσμός βιοϋμενικών κύτταρων όταν τα κουπόνια επώαστηκαν στους 20°C. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων επωασμένα στη βέλτιστη θερμοκρασίας τους και με κόκκινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων επωασμένα στους 20°C. Όπου **L**: *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E**: *E. coli* (B18 και B289) **S**: *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1**: *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2**: *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3**: *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4**: *Hafnia alvei* (B295) **Ent5**: *Proteus vulgaris* (B306) **Br1**: *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2**: *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1**: *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2**: *Lactobacillus sakei* (B226) **P**: *Pseudomonas fragi* (B209)

Παρατηρήθηκε ότι ο μικροβιακός πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων στη βέλτιστη θερμοκρασία διακυμάνθηκε σε τιμές $3,86 - 6,58 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$ με τον μικροοργανισμό *Proteus vulgaris* B306 (Ent5) να παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου με τιμή $6,58 \pm 0,13 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$ και το στέλεχος *Brochothrix thermosphacta* B434 (Br2) τη μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου με τιμή $3,86 \pm 0,40 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$. Ενώ ο μικροβιακός πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων στους $20 \text{ }^\circ\text{C}$ διακυμάνθηκε σε τιμές $2,48 - 6,96 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$ με τον μικροοργανισμό *Citrobacter freundii* B294 (Ent3) να παρουσιάζει μεγαλύτερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου με τιμή $6,96 \pm 0,92 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$ και τον μικροοργανισμό *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) μικρότερη ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου με τιμή $2,48 \pm 0,28 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$.

4.1.3. Σχηματισμός μικτού βιοϋμενίου

Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα του μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* (B128 και B129) τόσο ως βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας αλλά και ως μικτό βιοϋμένιο παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 3**.

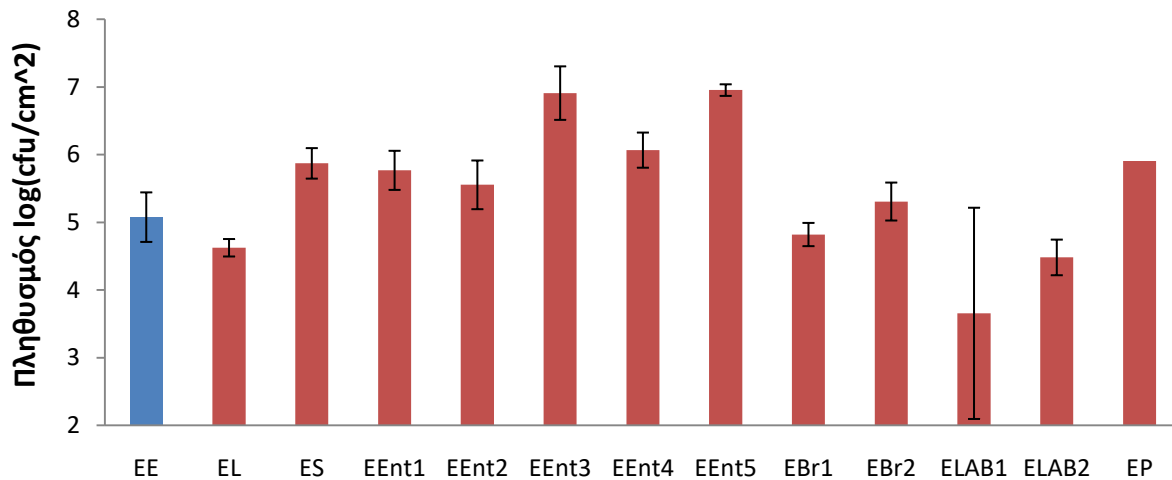
Παρατηρήθηκε ότι τα στελέχη *Citrobacter freundii* B294 (Ent3), *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br2) και *Pseudomonas fragi* B209 (P) αύξησαν τον πληθυσμό του είδους *L. monocytogenes* κατά $1,15 \pm 0,2$, $0,18$ και $0,23 \pm 0,5 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$ αντίστοιχα. Τα υπόλοιπα στελέχη μείωσαν τον πληθυσμό σε εύρος τιμών $0,19 - 0,81 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$ με το μικροοργανισμό *Serratia liquefaciens* B292 (Ent1) να παρουσιάζει την μεγαλύτερη μείωση στο πληθυσμό του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* κατά $0,81 (\text{cfu}/\text{cm}^2)$ και με τον μικροοργανισμό *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) να παρουσιάζει την μικρότερη μείωση κατά $0,6 \log (\text{cfu}/\text{cm}^2)$.



Διάγραμμα 3: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *L.monocytogenes* σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα (log cfu/cm²). Οι στήλες με μπλε χρώμα (■) απεικονίζουν το πληθυσμό της συγκαλλιέργειας των δυο στελεχών *L.monocytogenes* (strain B128 + B129) και με κόκκινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *L.monocytogenes* όταν αυτό βρίσκεται σε μικτή καλλιέργεια μαζί με άλλους μικροοργανισμούς. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2:** *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του είδους *Escherichia coli* (B18 και B289) σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα τόσο ως βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας αλλά και ως μικτό βιοϋμένιο παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 4**.

Παρατηρήθηκε ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί όταν βρίσκονταν σε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *E. coli* αύξησαν τον πληθυσμό του κατά 0,23 – 1,88 log (cfu/cm²). Ο μικροοργανισμός *Proteus vulgaris* B306 (Ent5) αύξησε το πληθυσμό του μικροοργανισμού *E. coli* κατά 1,88 log (cfu/cm²) και ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br2) αύξησε λιγότερο τον πληθυσμό του παθογόνου κατά 0,23 log (cfu/cm²). Αντίθετα οι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes* (L), *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1), *Leuconostoc* spp B233 (LAB1) και *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) μείωσαν τον πληθυσμό του *E.coli* κατά 1,42 - 0,26 log (cfu/cm²) με το μικροοργανισμό *Leuconostoc* spp. B233 (LAB1) να μειώνει το πληθυσμό *E. coli* κατά 1,42 log (cfu/cm²) και τον μικροοργανισμό *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) να μειώνει τον πληθυσμό του κατά 0,26 log (cfu/cm²).

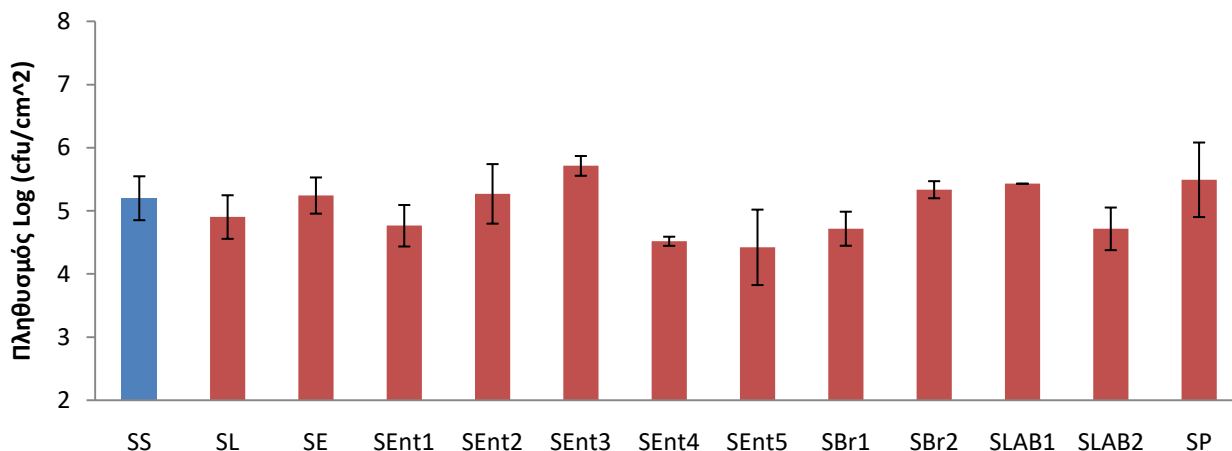


Διάγραμμα 4: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Escherichia coli* σε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα ($\log \text{cfu/cm}^2$). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός της συγκαλλιέργειας των δυο στελεχών *Escherichia coli* (strain 18 + 289) και με κόκκινο (■) ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Escherichia coli* όταν αυτός βρίσκεται σε μικτό βιοϋμένιο μαζί με άλλους μικροοργανισμούς. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2:** *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1:** *Leuconostoc spp* (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του είδους *Salmonella enterica serovar Enteritidis* (B56 και B287) σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα τόσο ως βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας αλλά και ως μικτό βιοϋμένιο παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 5**.

Παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί *E. coli* (E), *Serratia proteomaculans* B293 (Ent2), *Citrobacter freundii* B294 (Ent3), *Brochothrix thermosphacta* B434 (Br2), *Leuconostoc spp* B233 (LAB1), *Pseudomonas fragi* B209 (P) όταν ανέπτυξαν βιοϋμένιο μικτής καλλιέργειας με τον μικροοργανισμό *S. Enteritidis* αύξησαν τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων του κατά 0,04 – 0,51 $\log (\text{cfu/cm}^2)$ με τον μικροοργανισμό *E.coli* (E) να αυξάνει τον πληθυσμό κατά 0,51 $\log (\text{cfu/cm}^2)$ και τον μικροοργανισμό *Citrobacter freundii* B294 (Ent3) να προκαλεί την μικρότερη αύξηση του πληθυσμού κατά 0,04 $\log(\text{cfu/cm}^2)$. Αντίθετα οι υπόλοιποι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes* (L), *Serratia liquefaciens* B292 (Ent1), *Hafnia alvei* B295 (Ent4), *Proteus vulgaris* B306 (Ent5), *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) και *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) όταν

σημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *S. Enteritidis* μείωσαν τον πληθυσμό του κατά 0,30 – 0,78 log (cfu/cm²). Ο μικροοργανισμός *Proteus vulgaris* B306 (*Ent5*) μείωσε τον πληθυσμό κατά 0,78 log(cfu/cm²), ενώ ο μικροοργανισμός *L.monocytogenes* (*L*) μείωσε τον πληθυσμό κατά 0,30 log (cfu/cm²).



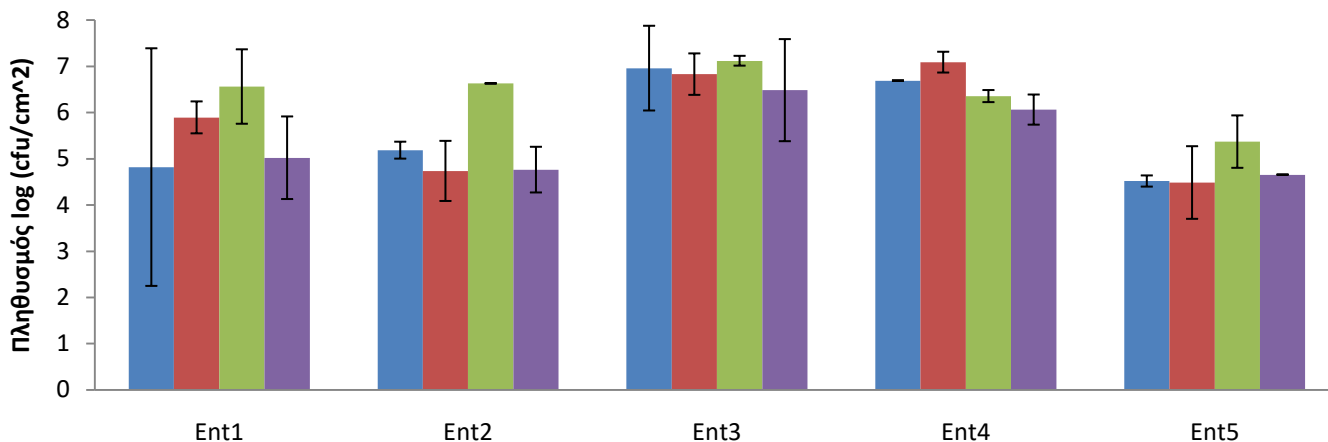
Διάγραμμα 5: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *S. Enteritidis* σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα (log cfu/cm²). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός της συγκαλλιέργειας των δυο στελεχών *S. Enteritidis* (*strain B56 και B287*) και με κόκκινο (■) ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *S. Enteritidis* όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο μαζί με άλλους μικροοργανισμούς. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2:** *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων των μικροοργανισμών *Serratia liquefaciens* B292 (Ent1), *Serratia proteomaculans* B293 (Ent2), *Citrobacter freundii* B294 (Ent3), *Hafnia alvei* B295 (Ent4), *Proteus vulgaris* B306 (Ent5) σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα τόσο ως βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας αλλά και ως μικτό βιοϋμένιο παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 6.**

Αρχικά για τον μικροοργανισμό *Serratia liquefaciens* B292 (Ent1) log (cfu/cm²) παρατηρήθηκε ότι και οι τρεις παθογόνοι μικροοργανισμοί αύξησαν τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων του Ent1. Συγκεκριμένα ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* αύξησε τον πληθυσμό κατά 1,08

$\log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$, ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* κατά $1,74 \log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$ ενώ ο μικροοργανισμός *S. Enteritidis* αύξησε κατά $0,20 \log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$ περισσότερο.

Για τον μικροοργανισμό *Serratia proteomaculans* B293 (Ent2) παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί *L.monocytogenes* και *S. Enteritidis* μείωσαν τον πληθυσμό του μικροοργανισμού Ent2 κατά $0,45$ και $0,42 \log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$ αντίστοιχα. Ενώ ο μικροοργανισμός *E. coli* αύξησε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κατά $1,44 \log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$.



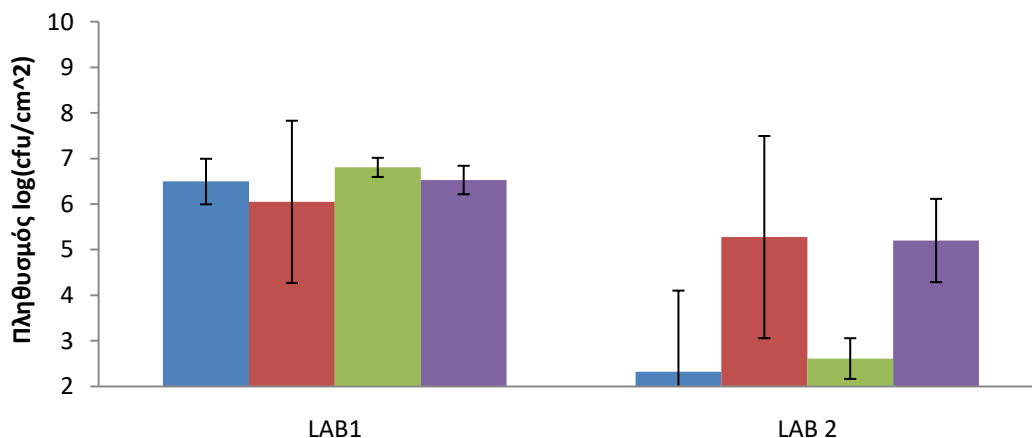
Διάγραμμα 6: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων πάνω σε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα ($\log \text{cfu}/\text{cm}^2$). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των Εντεροβακτηρίων (Ent1, Ent2, Ent3, Ent4, Ent5) όταν αυτά ανέπτυξαν βιοϋμενίο σε μονοκαλλιέργεια, με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων των Εντεροβακτηρίων όταν αυτά σχημάτισαν μικτό βιοϋμενίο με τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, με πράσινο (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμενίο με τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* και με μοβ (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμενίο με τον μικροοργανισμό *Salmonella enterica ser. Enteritidis*. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2:** *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

Το ίδιο παρατηρήθηκε και στην περίπτωση του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* B294 (Ent3). Οι μικροοργανισμοί *L.monocytogenes* και *S. Enteritidis* μείωσαν τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων του Ent3 κατά $0,13$ και $0,48 \log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$ αντίστοιχα. Ενώ ο μικροοργανισμός *E. coli* αύξησε τον πληθυσμό κατά $0,16 \log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$.

Για τον μικροοργανισμό *Hafnia alvei* B295 (Ent4) παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί *Escherichia coli* και *S. Enteritidis* μείωσαν τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων του Ent4 κατά 0,34 και 0,63 log(cfu/cm²) αντίστοιχα. Ενώ ο μικροοργανισμός *L.monocytogenes* αύξησε τον πληθυσμό του κατά 0,40 log(cfu/cm²).

Τέλος για τον μικροοργανισμό *Proteus vulgaris* B306 (Ent5) παρατηρήθηκε αύξηση των βιοϋμενικών κυττάρων στο μικτό βιοϋμενίο με *L.monocytogenes* κατά 0,03 log(cfu/cm²). Ενώ οι μικροοργανισμοί *E. coli* και *S. Enteritidis* μείωσαν τον πληθυσμό κατά 0,85 και 0,14 log(cfu/cm²) αντίστοιχα.

Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων των γαλακτικών μικροοργανισμών *Leuconostoc* spp. B233 (LAB1) και *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) σε πλακίδια ανοξειδώτου χάλυβα τόσο ως βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας αλλά και ως μικτό βιοϋμένιο παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 7**.



Διάγραμμα 7: Πληθυσμός γαλακτικών βιοϋμενικών κυττάρων πάνω σε επιφάνεια ανοξειδώτου χάλυβα (log cfu/cm²). Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των δυο Γαλακτικών βακτηρίων (*strain* B233 + B226) όταν αυτά βρίσκονται σε βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας, με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων των Γαλακτικών όταν αυτά σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Listeria monocytogenes*, με πράσινο (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* και με μοβ (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *S. Enteritidis* Όπου **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226)

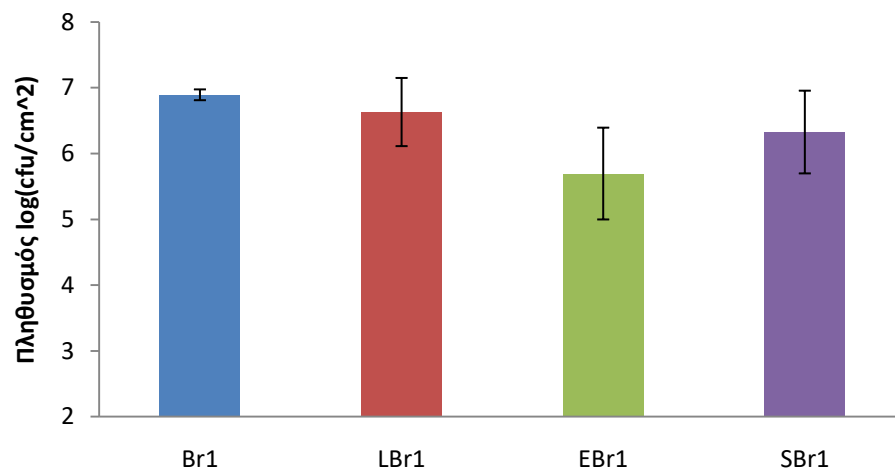
Για τον μικροοργανισμό *Leuconostoc* spp B233 (LAB1) παρατηρήθηκε ότι οι μικροοργανισμοί *E. coli* και *S. Enteritidis* αύξησαν τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού

Leuconostoc spp κατά 0,31 και 0,03 log(cfu/cm²) αντίστοιχα. Ενώ ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* μείωσε τον πληθυσμό κατά 0,44 log(cfu/cm²).

Για τον μικροοργανισμό *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) παρατηρήθηκε ότι όλοι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes*, *E. coli* και *S. Enteritidis* αύξησαν τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κατά 2,95, 0,29 και 2,88 log(cfu/cm²) αντίστοιχα.

Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα τόσο ως βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας αλλά και ως μικτό βιοϋμένιο παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 8**.

Παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) μειώθηκε όταν βρισκόταν σε συγκαλλιέργεια και με τους τρεις παθογόνους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes*, *E. coli* και *S. Enteritidis* κατά 0,26, 1,2 και 0,57 log(cfu/cm²) αντίστοιχα.

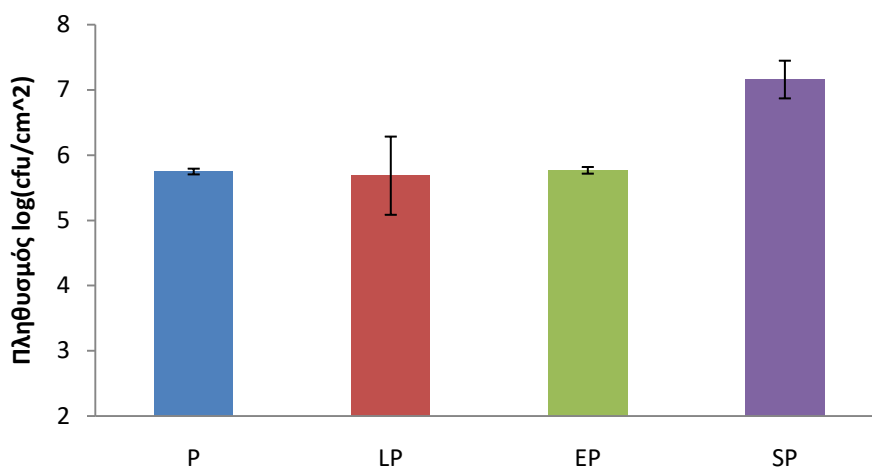


Διάγραμμα 8: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) πάνω στην επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *Brochothrix thermosphacta* B432, όταν αυτά σχημάτισαν σε βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας, με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *Brochothrix thermosphacta* B432 όταν αυτά σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, με πράσινο (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Escherichia coli* και με μοβ (■) όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με

τον μικροοργανισμό *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Pseudomonas fragi* B209 (P) σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα τόσο ως βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας αλλά και ως μικτό βιοϋμένιο παρουσιάζεται στο **Διάγραμμα 9**.

Παρατηρήθηκε ότι ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Pseudomonas fragi* B209 (P) μειώθηκε όταν βρισκόταν σε μικτό βιοϋμένιο με τον παθογόνο μικροοργανισμό *L. monocytogenes* κατά 0,06 log(cfu/cm²). Ενώ ο πληθυσμός τους αυξήθηκε όταν ανέπτυξε μικτό βιοϋμένιο με τους παθογόνους μικροοργανισμούς *E. coli* και *S. Enteritidis* κατά 0,02 και 1,41 log(cfu/cm²) αντίστοιχα.

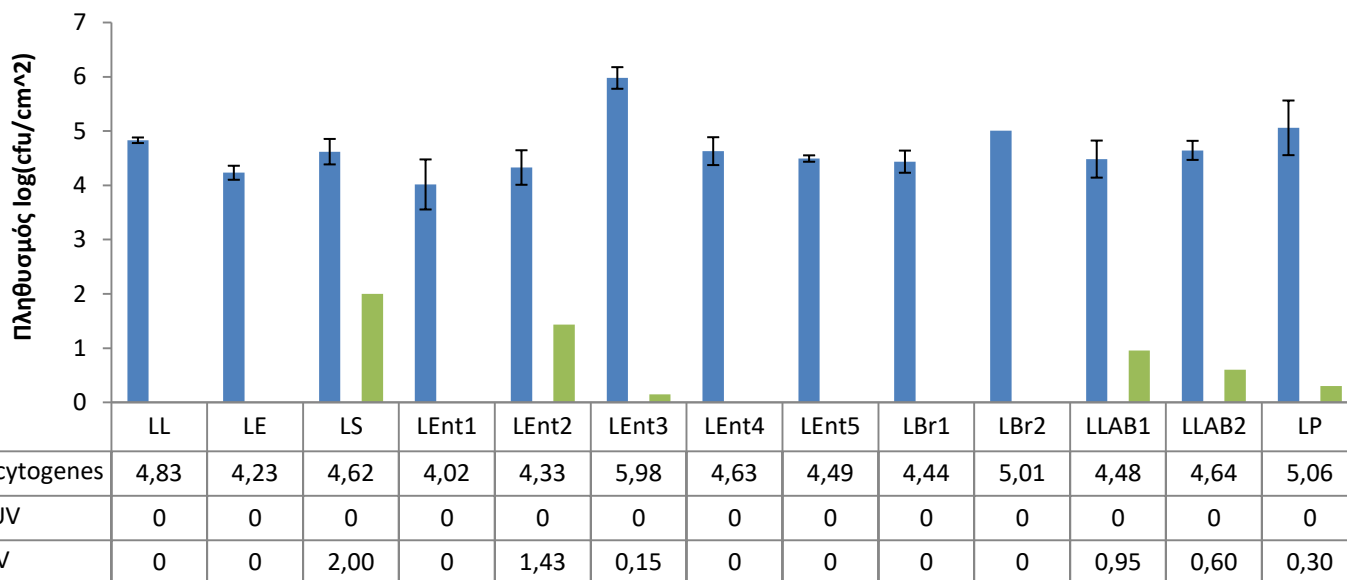


Διάγραμμα 9: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Pseudomonas fragi* (B209) (P) πάνω σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων σε βιοϋμένιο μονοκαλλιέργειας, με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *Pseudomonas fragi* όταν αυτά σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*, με πράσινο (■) όταν σχημάτισαν σε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *E. coli* και με μοβ (■) όταν ανέπτυξαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *Salmonella enterica* ser. Enteritidis. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

4.2. Αξιολόγηση της απολυμαντικής δράσης έναντι βιοϋμενίων μονής/μικτής καλλιέργειας

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes* (στελέχη B128 και B129), που σχηματίστηκαν σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 10.

Παρατηρήθηκε ότι όταν ο μικροοργανισμός *L. monocytogenes* σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό βιοϋμενικών κυττάρων κάτω του ορίου ανίχνευσης ($<1 \text{ cfu/cm}^2$). Το ίδιο συνέβη όταν βρισκόταν σε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *E. coli*, *Serratia liquefaciens* B292 (Ent1), *Hafnia alvei* B295 (Ent4), *Proteus vulgaris* B306 (Ent5), *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) και *Brochothrix thermosphacta* B434 (Br2), η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης ($<1 \text{ cfu/cm}^2$). Ενώ σε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *S. Enteritidis*, *Serratia proteomaculans* B293 (Ent2), *Citrobacter freundii* B294 (Ent3), *Leuconostoc* spp B233 (LAB1), *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) και *Pseudomonas fragi* B209 (P) τα βιοϋμενικά κύτταρα του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* δεν μειώθηκαν τόσο κατά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Με τον μικροοργανισμό *S. Enteritidis* να μειώνει το πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων της *L. monocytogenes* έναντι στη δράση της UV, από 4,62 σε 2,00 log (cfu/cm²), και τον μικροοργανισμό *Pseudomonas fragi* B209 (P) να μειώνει τον πληθυσμό της από 5,06 σε 0,30 log (cfu/cm²). Η δράση του απολυμαντικού σε συνδυασμό με την υπεριώδη ακτινοβολία μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης.

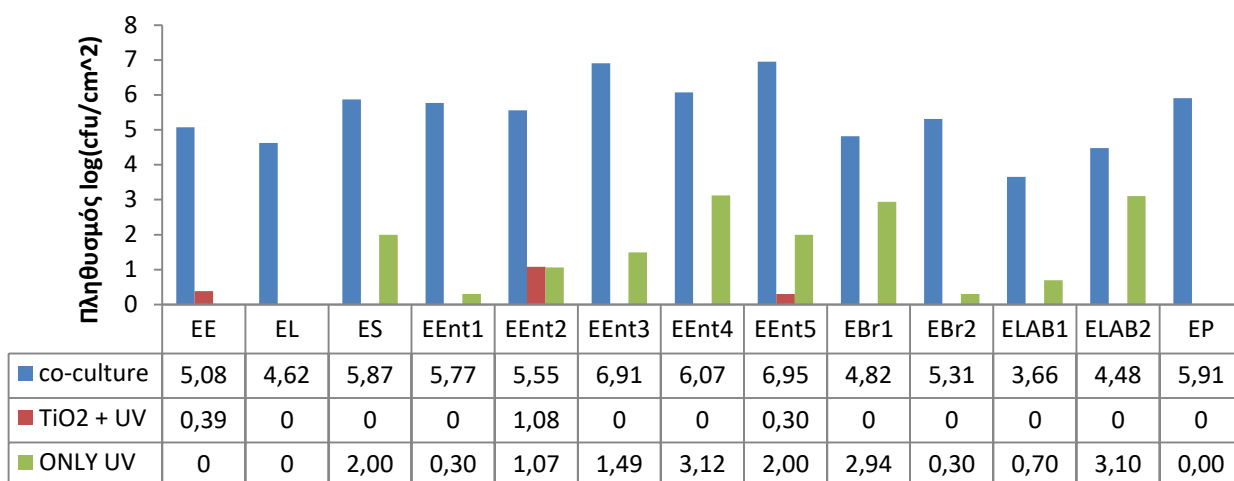


Διάγραμμα 10: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *L. monocytogenes* B128 και B129 όταν αυτά βρίσκονται σε βιοϋμένιο μονή καλλιέργειας και σε μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes* που επέζησε ύστερα από την έκθεση σε υπερϊώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes* που επέζησαν ύστερα από την χρήση απολυμαντικού και υπερϊώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2:** *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *Escherichia coli* (στελέχη B-18 και B-289), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπερϊώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπερϊώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 11.**

Παρατηρήθηκε ότι, όταν ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* σχημάτισαν βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας η εφαρμογή της υπερϊώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης (<1 cfu/cm²). Ενώ κατά τη δράση του απολυμαντικού τα βιοϋμενικά κύτταρα μειώθηκαν από 5,08 σε 0,39 log (cfu/cm²). Όταν ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* ανέπτυξε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes* και

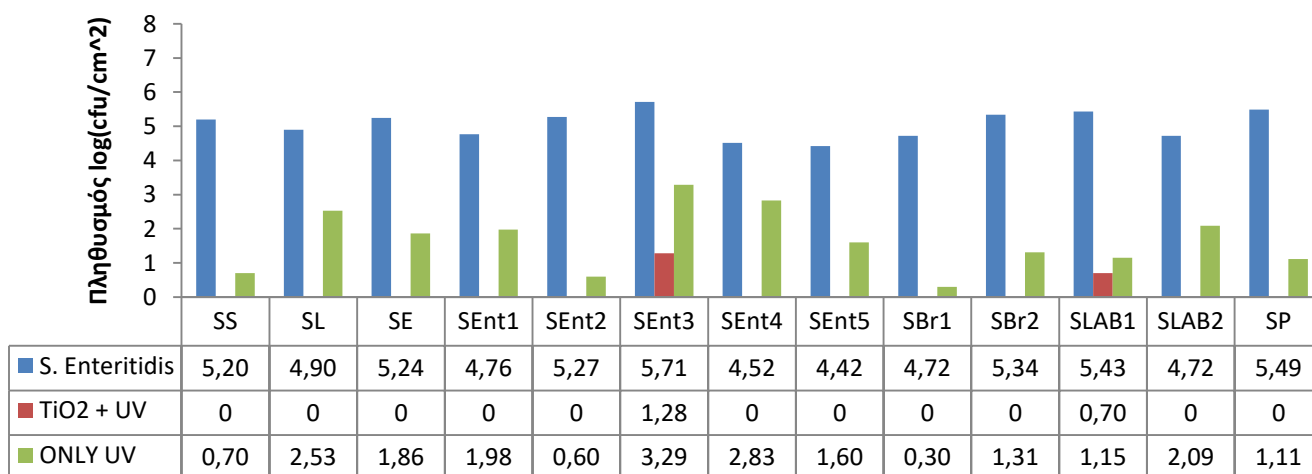
Pseudomonas fragi B209 (P) η επίδραση της υπερϊώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό των κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όταν όμως σχημάτισαν βιοϋμένιο μικτής καλλιέργειας με τους μικροοργανισμούς, *Serratia liquefaciens* B292 (Ent1), *Serratia proteomaculans* B293 (Ent2), *Citrobacter freundii* B294 (Ent3), *Hafnia alvei* B295 (Ent4), *Proteus vulgaris*, B306 (Ent5), *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1), *Brochothrix thermosphacta* B434 (Br2), *Salmonella enterica* ser.Enteritidis, *Leuconostoc* spp B233 (LAB1) και *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων δεν μειώθηκε κάτω από το όριο ανίχνευσης υπό τη δράση της υπερϊώδους ακτινοβολίας. Ενώ όταν σχημάτισε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *Serratia proteomaculans* B293 (Ent2) και *Proteus vulgaris* B306 (Ent5) τα βιοϋμενικά κύτταρα του *E.coli* δεν μειώθηκαν κάτω από το όριο ανίχνευσης, ούτε υπό τη δράση του απολυμαντικού.



Διάγραμμα 11: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *E. coli* B18 και B289 όταν αυτά σχημάτισαν βιοϋμένιο μονή καλλιέργειας και σε μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *E.coli* πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *E.coli* που επέζησε ύστερα από την εφαρμογή της υπερϊώδους ακτινοβολίας και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *E.coli* που επέζησαν ύστερα από την χρήση απολυμαντικού και υπερϊώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2:** *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *S. Enteritidis* (στελέχη B-56 και B-287), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 12**.

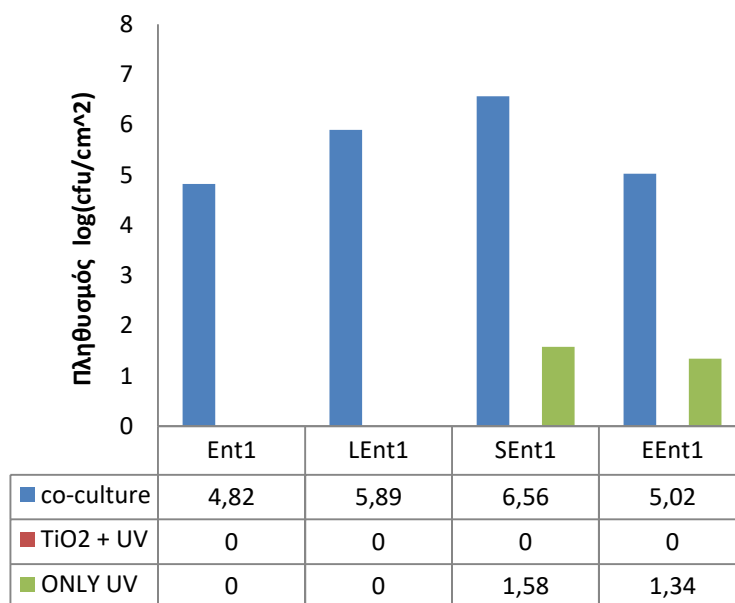
Παρατηρήθηκε ότι, ο μικροοργανισμός *S. Enteritidis* είτε σχημάτισαν βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας είτε ως μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς τα βιοϋμενικά του κύτταρα μειώθηκαν υπό την εφαρμογή υπεριώδους ακτινοβολίας. Ενώ η δράση του απολυμαντικού μείωσε των πληθυσμό όλων των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης εκτός από την περίπτωση που ο μικροοργανισμός *S. Enteritidis* σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *Citrobacter freundii* B294 (Ent3) και *Leuconostoc* spp B233 (LAB1) όπου η δράση του απολυμαντικού μείωσε τον πληθυσμό από 5,71 σε 1,28 log (cfu/cm²) και από 5,43 σε 0,70 log (cfu/cm²) αντίστοιχα.



Διάγραμμα 12: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *S. Enteritidis* B56 και B287 όταν αυτά σχημάτισαν βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *S. Enteritidis* πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *S. Enteritidis* που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *S. Enteritidis* που επέζησαν μετά από την εφαρμογή απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432) **Br2:** *Brochothrix thermosphacta* (B434) **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *Serratia liquefaciens* B292 (Ent1), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 13**.

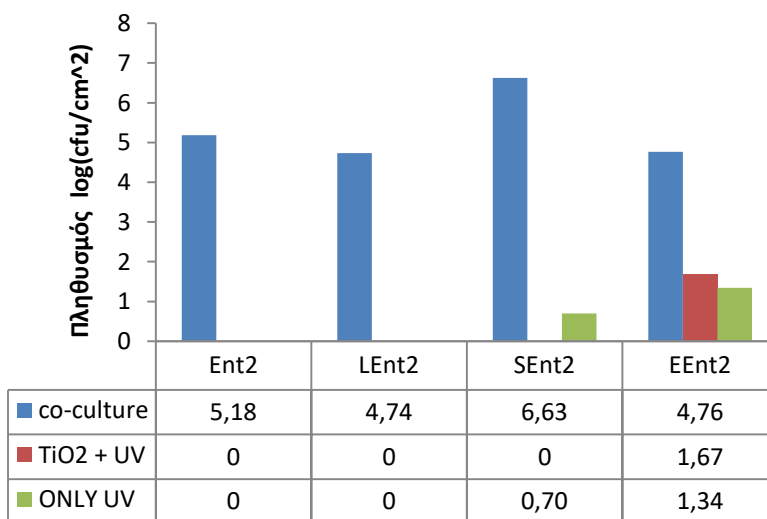
Παρατηρήθηκε ότι, όταν ο μικροοργανισμός *Serratia liquefaciens* B292 (Ent1) σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Το ίδιο συνέβη και όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes*. Ενώ όταν σχημάτισαν μικτό βιοϋμένιο με το μικροοργανισμό *Salmonella enterica* ser. Enteritidis ο πληθυσμός μειώθηκε από 6,56 σε 1,58 log (cfu/cm²) και με το *E.coli* ο πληθυσμός μειώθηκε από 5,02 σε 1,34 log (cfu/cm²) υπό τη εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η δράση του απολυμαντικού σε συνδυασμό με την υπεριώδη ακτινοβολία μείωσε τον πληθυσμό όλων των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης.



Διάγραμμα 13: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Serratia liquefaciens* B292 όταν σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent1 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent1 που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent1 που επέζησαν ύστερα από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent1:** *Serratia liquefaciens* (B292).

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *Serratia proteomaculans* B293 (Ent2), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 14**.

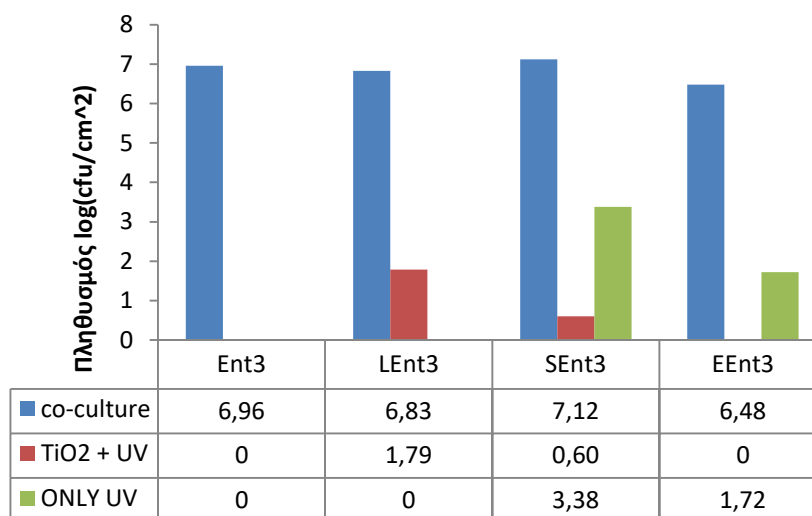
Παρατηρήθηκε ότι, όταν ο μικροοργανισμός *Serratia proteomaculans* B293 (Ent2), ανέπτυξε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και σε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας και του απολυμαντικού μείωσε τον πληθυσμό βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όταν ανέπτυξε μικτό βιοϋμένιο με το μικροοργανισμό *S. Enteritidis* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας παρουσίασε μείωση του βιοϋμενικού πληθυσμού από 6,63 σε 0,70 log (cfu/cm²) και η δράση του απολυμαντικού μείωσε τον πληθυσμό βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Ενώ όταν βρισκόταν σε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *E.coli* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε το βιοϋμενικό πληθυσμό από 4,76 σε 1,34 log (cfu/cm²) και η εφαρμογή απολυμαντικού μείωσε το βιοϋμενικό πληθυσμό από 4,76 σε 1,67 log (cfu/cm²).



Διάγραμμα 14: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Serratia proteomaculans* B293 όταν αυτό ανέπτυξε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent2 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent2 που επέζησε μετά την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent2 που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent2:** *Serratia proteomaculans* (B293).

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *Citrobacter freundii* B294 (Ent3), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από σε έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 15**.

Παρατηρήθηκε ότι, όταν ο μικροοργανισμός *Citrobacter freundii* B294 (Ent3) σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας, η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας και η εφαρμογή του απολυμαντικού μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όταν βρισκόταν σε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *L. monocytogenes* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης και του απολυμαντικού μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 6,83 σε 1,79 log (cfu/cm²). Όταν σχημάτισε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *S. Enteritidis* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας και η εφαρμογή του απολυμαντικού μείωσαν τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης.

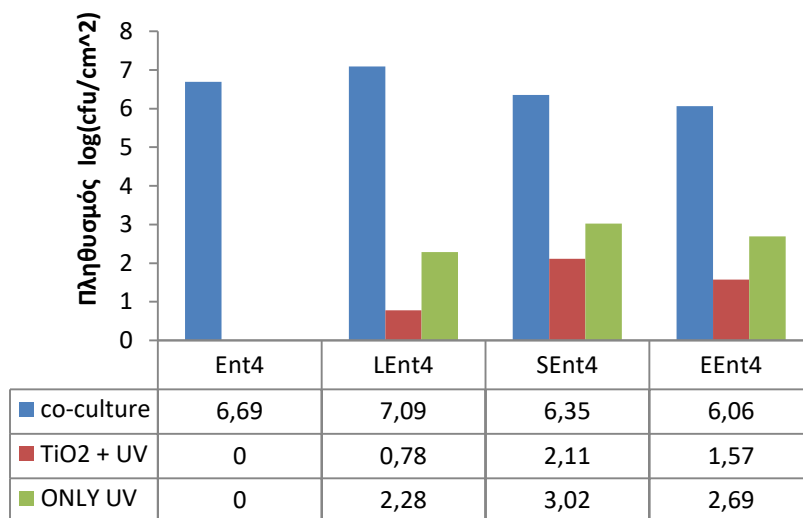


Διάγραμμα 15: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Citrobacter freundii* B294 όταν σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent3 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent3 που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent3 που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent3:** *Citrobacter freundii* (B294)

Ενώ όταν βρισκόταν σε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *E. coli* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 6,48 σε 1,72 log (cfu/cm²) ενώ η εφαρμογή του απολυμαντικού μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *Hafnia alvei* B295 (Ent4), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 16**.

Παρατηρήθηκε ότι, όταν ο μικροοργανισμός *Hafnia alvei* B295 (Ent4) ανέπτυξαν βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης.

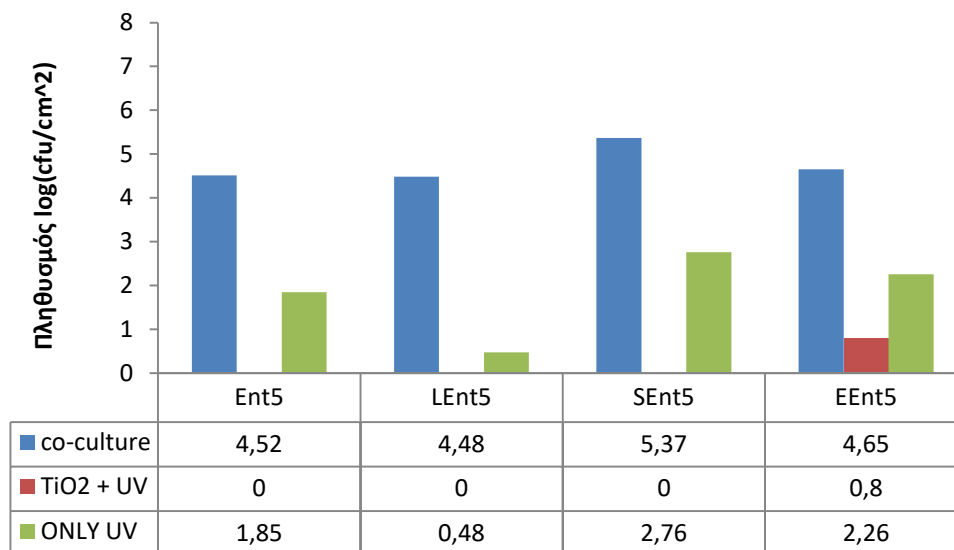


Διάγραμμα 16: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Hafnia alvei* B295 όταν σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent4 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent4 που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent4 που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent4:** *Hafnia alvei* (B295)

Όταν σχημάτισε μικτό βιοϋμένιο με *L. monocytogenes* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 7,09 σε 2,28 log (cfu/cm²) ενώ η χρήση του απολυμαντικού μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 7,09 σε 0,78 log (cfu/cm²), σε μικτό βιοϋμένιο με *S. Enteritidis* η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 6,35 σε 3,02 log (cfu/cm²) ενώ η εφαρμογή του απολυμαντικού μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 6,35 σε 2,11 log (cfu/cm²). Σε μικτό βιοϋμένιο με *E. coli* η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 6,06 σε 2,69 log (cfu/cm²) ενώ η εφαρμογή του απολυμαντικού μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 6,06 σε 1,57 log (cfu/cm²).

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *Proteus vulgaris* B306 (Ent5), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 17**.

Παρατηρήθηκε ότι, όταν ο μικροοργανισμός *Proteus vulgaris* B306 (Ent5) σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 4,52 σε 1,85 log (cfu/cm²) ενώ η χρήση του απολυμαντικού μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όταν ανέπτυξε μικτό βιοϋμένιο με το μικροοργανισμό *L. monocytogenes* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων από 4,48 σε 0,48 log (cfu/cm²), ενώ η χρήση του απολυμαντικού μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όταν ανέπτυξε μικτό βιοϋμένιο με *S. Enteritidis* η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων από 5,37 σε 2,76 log (cfu/cm²), ενώ η εφαρμογή του απολυμαντικού μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Τέλος όταν ο *Proteus vulgaris* B306 (Ent5) ανέπτυξε μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *E. coli* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 4,65 σε 2,26 log (cfu/cm²) ενώ η χρήση του απολυμαντικού μείωσε τον βιοϋμενικό πληθυσμό από 4,65 σε 0,8 log (cfu/cm²).

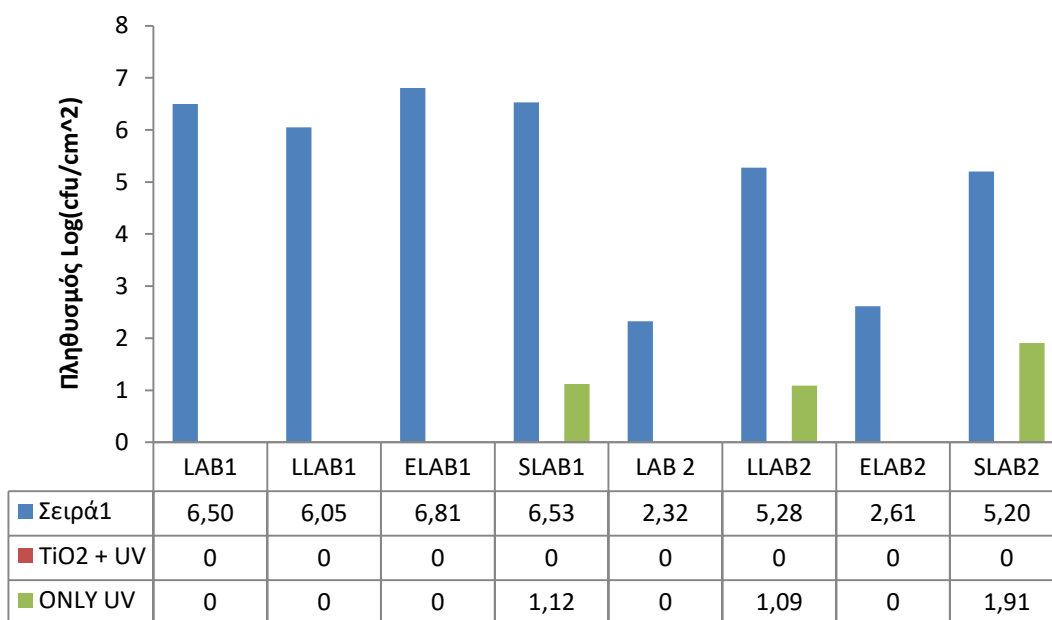


Διάγραμμα 17: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Proteus vulgaris* B306 όταν αυτό ανέπτυξε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent5 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων Ent5 που επέζησε μετά από έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων Ent5 που επέζησαν μετά από απολυμαντικό απολυμαντικό και υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Ent5:** *Proteus vulgaris* (B306)

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων των γαλακτικών βακτηρίων *Leuconostoc* spp B233 (LAB1) και *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξείδωτου χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 18.**

Για τα βιοϋμενικά κύτταρα του μικροοργανισμού *Leuconostoc* spp B233 (LAB1) παρατηρήθηκε ότι στο βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας αλλά και στα μικτά βιοϋμένα με τους 2 παθογόνους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes* και *E. coli* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε το πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Ενώ στο μικό βιοϋμένιο με *Salmonella enterica* ser.Enteritidis η υπεριώδης ακτινοβολία μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων από 6,53 σε 1,12 log (cfu/cm²), η εφαρμογή του απολυμαντικού μείωσε τον πληθυσμό κάτω από το όριο ανίχνευσης.

Για τα βιοϋμενικά κύτταρα του μικροοργανισμού *Lactobacillus sakei* B226 (LAB2) παρατηρήθηκε ότι στο βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και στο μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *E.coli* η εφαρμογή της υπερϊόδους ακτινοβολίας μείωσε το πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Στο μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes* και *S. Enteritidis* υπό τη δράση της υπερϊόδους ακτινοβολίας τα βιοϋμενικά κύτταρα του μικροοργανισμού *Lactobacillus sakei* μειώθηκαν από 5,28 σε 1,09 log (cfu/cm²) και από 5,20 σε 1,91 log (cfu/cm²) αντίστοιχα. Η χρήση του απολυμαντικού μείωσε το πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης.

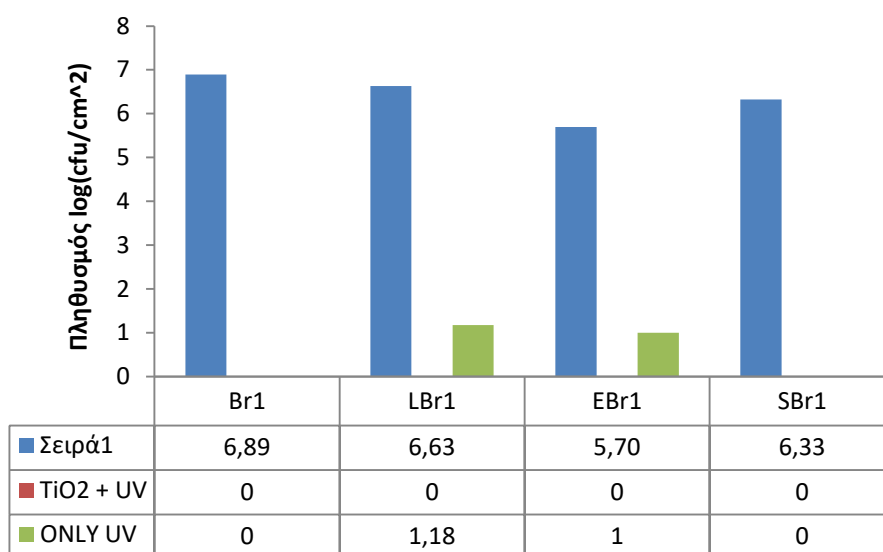


Διάγραμμα 18: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων των μικροοργανισμών *Leuconostoc* spp (LAB1) και *Lactobacillus sakei* (LAB2) τόσο ως μονοκαλλιέργειες όσο και σε μικτές καλλιέργειες με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς, μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων LAB1 και LAB2 πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων LAB1 και LAB2 που επέζησε μετά από την εφαρμογή μόνο της υπερϊόδους ακτινοβολίας και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων LAB1 και LAB2 που επέζησαν μετά από τη εφαρμογή απολυμαντικού και υπερϊόδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **LAB1:** *Leuconostoc* spp (B233) **LAB2:** *Lactobacillus sakei* (B226).

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση

τους σε υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h και μετά από έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 19**.

Παρατηρήθηκε ότι, όταν ο μικροοργανισμός *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) ανέπτυξε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και μικτό βιοϋμένιο με τον μικροοργανισμό *S. Enteritidis* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε το πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης. Όταν ο *Brochothrix thermosphacta* B432 (Br1) σχημάτισε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes* και *E. coli* η υπεριώδης ακτινοβολία μείωσε τον πληθυσμό από 6,63 σε 1,18 log (cfu/cm²) και από 5,70 σε 1 log (cfu/cm²) αντίστοιχα. Η εφαρμογή του απολυμαντικού μείωσε το πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης και στις δυο περιπτώσεις μικτών βιοϋμενίων.

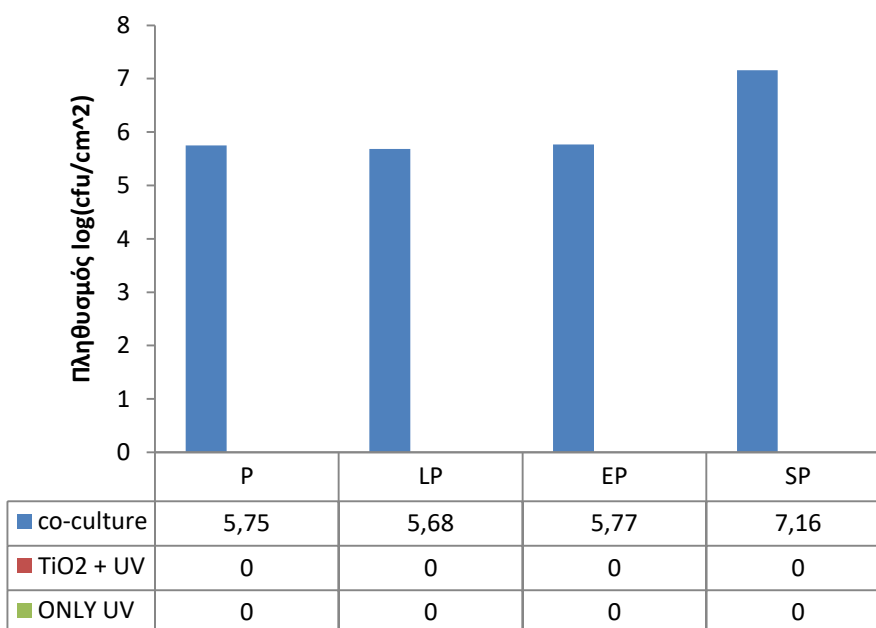


Διάγραμμα 19: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων του μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta* B432 όταν αυτό βρίσκεται σε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας και σε μικτό βιοϋμένιο με άλλους μικροοργανισμούς, πριν και μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Br1* πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων *Br1* που επέζησε μετά από εφαρμογή μόνο της υπεριώδους ακτινοβολίας και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων *Br1* που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **Br1:** *Brochothrix thermosphacta* (B432)

Οι πληθυσμοί βιοϋμενικών κυττάρων *Pseudomonas fragi* B209 (P), που σχηματίστηκαν πάνω σε πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα, πριν την απολύμανση, μετά από έκθεση τους σε υπεριώδη

ακτινοβολία για 2 h και μετά από σε έκθεση τους στο απολυμαντικό και στην υπεριώδη ακτινοβολία για 2 h παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 20**.

Παρατηρήθηκε ότι, όταν ο μικροοργανισμός *Pseudomonas fragi* B209 (P) σχημάτισε βιοϋμένιο μονής καλλιέργειας αλλά και μικτό βιοϋμένιο με τους 3 υπόλοιπους παθογόνους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes*, *Salmonella enterica* ser. Enteritidis και *E. coli* η εφαρμογή της υπεριώδους ακτινοβολίας μείωσε τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων κάτω από το όριο ανίχνευσης.



Διάγραμμα 20: Πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων των μικροοργανισμών *Pseudomonas fragi* (B209) (P) τόσο ως μονοκαλλιέργεια όσο και σε μικτή καλλιέργεια με άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς, μετά από την διαδικασία της απολύμανσης. Με μπλε χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων P πριν την απολύμανση, με πράσινο χρώμα (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων P που επέζησε μετά από την εφαρμογή μόνο της υπεριώδους ακτινοβολίας και με κόκκινο (■) απεικονίζεται ο πληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων P που επέζησαν μετά από την χρήση απολυμαντικού και υπεριώδους ακτινοβολίας. Όπου **L:** *L. monocytogenes* (B128 και B129) **E:** *E. coli* (B18 και B289) **S:** *S. Enteritidis* (B56 και B287) **P:** *Pseudomonas fragi* (B209)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα βακτήρια έχουν τη δυνατότητα να σχηματίζουν βιοϋμένια στις εγκαταστάσεις παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων που μπορούν εύκολα να μεταφερθούν στα ίδια τα προϊόντα (Hall-Stoodley et al., 2004). Η εμφάνιση βιοϋμενίων σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων προκαλεί μολύνσεις που οδηγούν σε μειωμένη διάρκεια ζωής των προϊόντων, μετάδοση ασθενειών (Jessen and Lammert, 2003) και οικονομικές απώλειες λόγω τεχνικών βλαβών στα μηχανήματα. Τα βιοϋμενικά κύτταρα είναι δύσκολο να αφαιρεθούν από επιφάνειες τροφίμων και είναι πιο ανθεκτικά σε απολυμαντικά σε σύγκριση με τις πλαγκτονικές τους μορφές (Gilbert et al, 2003, Gandhi και Chikindas, 2007).

Η παρούσα εργασία είχε ως σκοπό τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας ενός καινοτόμου προϊόντος καθαρισμού επιφανειών βιομηχανίας, για την απολύμανση επιφανειών και υλικών που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία τροφίμων έναντι σημαντικών τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών.

Τα 13 διαφορετικά είδη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, είναι αυτά που τυπικά απαντώνται σε σύνθετα βιομηχανικά οικοσυστήματα, όπως αυτά της βιομηχανίας κρέατος. Οι μικροοργανισμοί *L. monocytogenes*, *S. Enteritidis* και *E. coli* είναι παθογόνα βακτήρια που βρίσκονται ενσωματωμένα σε βιοϋμένια επιφάνειας βιομηχανίας τροφίμων, όταν οι συνθήκες υγιεινής δεν είναι οι καταλληλότερες (Beresford et al. 2001, Joseph et al. 2001). Τα υπόλοιπα είδη μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν για τους σκοπούς της μελέτης είναι αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί και συγκεκριμένα τα εντεροβακτήρια, *Serratia liquefaciens*, *Serratia proteomaculans*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei* και *Proteus vulgaris*, στελέχη του αλλοιόγνου μικροοργανισμού *Brochothrix thermosphacta*, γαλακτικά βακτήρια *Leuconostoc* spp, *Lactobacillus sakei* και *Pseudomonas fragi*. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αφήθηκαν να αναπτύξουν βιοϋμένια σε θερμοκρασία 20°C για 6 μέρες, προκειμένου να προσομοιαστούν, όσο γίνεται, οι περιβαλλοντικές συνθήκες σχηματισμού βιοϋμενίων σε περιβάλλοντα βιομηχανίας τροφίμων. Είναι γνωστό πως πολυδύναμα βιοϋμένια σε εγκαταστάσεις παραγωγής κρέατος χρειάζονται αρκετές μέρες ή ακόμα και εβδομάδες για να αναπτυχθούν (Jessen and Lammert, 2003). Ακόμα η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για ποσοτικοποίηση των βιοϋμενίων πριν αλλά και μετά την απολύμανση ήταν η μέθοδος στροβιλισμού με γυάλινα σφαιρίδια. Έχει αποδειχθεί ότι η μέθοδος αυτή είναι

αποτελεσματική στο να δίνει "ακατέργαστες" εκτιμήσεις μετρήσεων των βιοϋμενίων (Kostaki et al., 2012, Chorianopoulos et al., 2008).

Αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίων σε πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα 13 διαφορετικών μικροοργανισμών, στη βέλτιστη θερμοκρασία του κάθε μικροοργανισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι μικροοργανισμοί κατάφεραν και σχημάτισαν βιοϋμένια πληθυσμού που διακυμάνθηκε από 3,86 – 6,58 log (cfu/cm²). Έχει βρεθεί από μελέτες ότι η χρήση ανοξειδωτού χάλυβα στις βιομηχανίες τροφίμων είναι ικανή να παγιδεύει βακτήρια λόγω των μεγάλων ρωγμών και της σπογγώδους εμφάνισης του, συμβάλλοντας έτσι στην εξάπλωση των βιοϋμενίων (Kumar and Anand 1998). Πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί προκειμένου να περιγράψουν την ικανότητα ειδικά των παθογόνων μικροοργανισμών να προσκολλούνται σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων συμπεριλαμβανομένων και των μικροοργανισμών *L.monocytogenes* (Frank & Koffi, 1990, Herald & Zoottola, 1988b, Mafu, Roy, Goulet & Magny , 1990), *Yersinia enterocolitica* (Herald & Zoottola, 1988a), *Campylobacter jejuni* (Kuusela, Moran, Vartio, & Kosunen, 1989) και *Escherichia coli* O157: H7 (Dewanti & Wong, 1995). Άλλη μελέτη έδειξε ότι ο μικροοργανισμός *Salmonella* μπορεί να προσκολλάται και να σχηματίζει βιοϋμένια σε επιφάνειες ανοξειδωτο χάλυβα (Joseph et al., 2001, Chmielewsky et al., 2003).

Στην συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στην ανάπτυξη των βιοϋμενικών κυττάρων. Έτσι στην μία περίπτωση τα πλακίδια ανοξειδωτού χάλυβα επώαστηκαν στη βέλτιστη θερμοκρασία του κάθε μικροοργανισμού ενώ στην άλλη περίπτωση τα πλακίδια επώαστηκαν στους 20°C. Παρατηρήθηκε ότι στους 20°C τα κύτταρα κατάφεραν να προσκολληθούν και να δημιουργήσουν βιοϋμένια μεγαλύτερου πληθυσμού συγκριτικά με τη βέλτιστη θερμοκρασία του κάθε μικροοργανισμού. Η προσκόλληση των κυττάρων για η δημιουργία βιοϋμενίων είναι γνωστό ότι επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων της επιφάνειας πρόσδεσης, της παρουσίας βακτηριακών επιφανειακών αποθεμάτων, της θερμοκρασίας, της παρουσία μικτής καλλιέργειας (Chmielewski and Frank 2003, Herrera et al., 2007, Rivas et al., 2007, Rode et al., 2007, Van Houdt and Michiels 2010) και τις περισσότερες φορές δρουν συνεργικά προκειμένου να επιτύχουν την τέλεια προσκόλληση των κυττάρων πάνω σε μία επιφάνεια. Οι Herald και Zottola (1988) παρατήρησαν ότι η παρουσία μαστιγίων στα βακτήρια που προσκολλούνται σε επιφάνειες εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Στους 35°C τα κύτταρα έδειξαν ότι έχουν ένα μαστίγιο, ενώ στους 21°C είχαν δύο έως τρία μαστίγια και στους 10°C, τα κύτταρα

παρουσίασαν πολλά μαστίγια. Αυτό μπορεί να υποδηλώνει ότι η αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ των βακτηρίων και του υποστρώματος μπορεί να αυξηθεί με τη μείωση της θερμοκρασίας, αυξάνοντας την πιθανότητα προσκόλλησης. Αυτή μπορεί να είναι και η εξήγηση που τα κύτταρα που προσκολλούνται με την βοήθεια μαστιγίων σε μία επιφάνεια, κατάφεραν και σχημάτισαν αποικίες μεγαλύτερου πληθυσμού στους 20°C απ' ότι στη βέλτιστη θερμοκρασία. Ωστόσο στη βιβλιογραφία υπάρχουν και έρευνες που είναι αντίθετες αυτών των αποτελεσμάτων. Οι Mai και Conner (2007) αξιολόγησαν την προσκόλληση του *L. monocytogenes* σε ανοξείδωτο χάλυβα κάτω από διαφορετικές θερμοκρασίες (4°C, 20°C, 30°C, 37°C και 42°C) και απέδειξαν ότι ο σχηματισμός βιοϋμενίου μειώθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στη μελέτη του Kadam et al. (2013) όπου 143 στελέχη του *L. monocytogenes* εξετάστηκαν για την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε 4 διαφορετικές θερμοκρασίες (12°C, 20°C, 30°C και 37°C) και αποδείχθηκε ότι ο σχηματισμός βιοϋμενίου μειώθηκε με τη μείωση της θερμοκρασίας. Άλλοι ερευνητές έδειξαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για έναν μικροοργανισμό συσχετίζεται με αύξηση της πρόσληψης θρεπτικών συστατικών που οδηγεί σε γρήγορο σχηματισμό βιοϋμενίων (Stapanovic, Cirkovic, Mijac, et al., 2003).

Στο φυσικό αλλά και βιομηχανικό περιβάλλον, τα βιοϋμένια αποτελούνται από μείγματα διαφορετικών ειδών και όχι από έναν μικροοργανισμό. Έτσι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών μπορεί να επηρεάζουν την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου (Lyautey et al., 2005, Simoes et al., 2008, Burmolle et al., 2010, Zijngge et. 2010). Για να είναι τα αποτελέσματα της έρευνας αξιόπιστα και να προσεγγίσουν τις αληθινές συνθήκες που υπάρχουν σε ένα χώρο βιομηχανίας τροφίμων στο πείραμα μελετήθηκε, η επίδραση που έχουν οι μικτές καλλιέργειες στο σχηματισμό βιοϋμενίου ενός μικροοργανισμού. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι κατά την συγκαλλιέργεια ενός μικροοργανισμού με έναν άλλον, ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων μπορεί είτε να αυξηθεί είτε να μειωθεί σε σχέση με τον πληθυσμό βιοϋμενικών κυττάρων της μονοκαλλιέργειας. Αναλυτικότερα στην περίπτωση του παθογόνου μικροοργανισμού *L. monocytogenes* παρατηρήθηκε ότι όλα τα εντεροβακτήρια με εξαίρεση το *Citrobacter*, τα γαλακτικά βακτήρια καθώς και το ένα στέλεχος *Brochothrix thermosphacta (Br1)* μείωσαν τον πληθυσμό του κατά 0,19-0,81 log (cfu/cm²), για τον μικροοργανισμό *E. coli* παρατηρήθηκε ότι μόνο 3 μικροοργανισμοί κατάφεραν να μειώσουν τον πληθυσμό του, τα γαλακτικά βακτήρια *Leuconostoc spp.* και *Lactobacillus sakei*, και το ένα στέλεχος *Brochothrix thermosphacta (Br1)* κατά 1,42 - 0,26 log. Ενώ για τον μικροοργανισμό *Salmonella enterica ser. Enteritidis* οι μικροοργανισμοί που μείωσαν τον πληθυσμό του ήταν τα εντεροβακτήρια *Serratia liquefaciens*, *Hafnia alvei*, *Proteus*

vulgaris, το ένα στέλεχος *Brochothrix thermosphacta* (*Br1*) και ο *Leuconostoc* spp. Από τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται ότι τα γαλακτικά βακτήρια παίζουν σημαντικό ρόλο στην μείωση των παθογόνων μικροοργανισμών όταν βρίσκονται σε συγκαλλιέργεια μαζί τους. Πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι μία ομάδα γαλακτικών βακτηρίων των *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus sakei*, and *Lactobacillus curvatus* ήταν ικανή να μειώσει τον σχηματισμό βιοϋμενίου παθογόνων μικροοργανισμών και συγκεκριμένα των *L. monocytogenes*, *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 (Gómez et al., 2016). Άλλη έρευνα έδειξε ότι ο μικροοργανισμός *Lactococcus lactis* επηρεάζει την ανάπτυξη του *L. monocytogenes*, λόγω ανταγωνισμού ή παραγωγής βακτηριοσίνης. Το υπάρχον βιοϋμένιο του γαλακτικού αυτού βακτηρίου μπορεί να μειώσει την προσκόλληση του παθογόνου *L. monocytogenes* (Habimana et al., 2009). Γενικότερα από την βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι τα δευτερογενή είδη, τα κύτταρα του βιοϋμενίου ενός παθογόνου μικροοργανισμού μπορεί να αυξηθούν, να μειωθούν ή να παραμείνουν ανεπηρέαστα συγκριτικά με βιοϋμένια ενός είδους (Bremer et al., 2001, Habimana et al., 2009, van der Veen και Abee 2011). Ένα βιοϋμένιο μικτών ειδών μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην επιβίωση των υπόλοιπων βακτηρίων, όπως υποδεικνύεται στη μελέτη των Bremer et al. (2001), όπου κύτταρα *L. monocytogenes* ήταν ανακτήσιμα για μεγαλύτερες περιόδους όταν καλλιιεργήθηκαν με *Flavobacterium* spp., σε σύγκριση με την καθαρή καλλιέργεια. Μια άλλη πρόσφατη μελέτη ανέφερε ότι το παθογόνο βακτήριο *E. coli* O157: H7 σχημάτισε βιοϋμένιο με 400 φορές υψηλότερο πληθυσμό όταν αναπτύχθηκε σε συνδυασμό με το *Acinetobacter calcoaceticus* (Habimana et al. 2010).

Ακόμα μελετήθηκε η αντιμικροβιακή δράση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και η δράση απολυμαντικού με κύριο αντιμικροβιακό παράγοντα το TiO_2 , σε βιοϋμένια μονής και μικτής καλλιέργειας. Από τα αποτελέσματα, φάνηκε ότι η ακτινοβολία UV ήταν ικανή να σκοτώσει αρκετά μεγάλο πληθυσμό βιοϋμενικών κυττάρων τη τάξης των 3 - 4 λογαρίθμων, ο συνδυασμός της όμως με χρήση απολυμαντικού TiO_2 ενίσχυσε την αντιμικροβιακή ικανότητα με αποτέλεσμα στις περισσότερες περιπτώσεις τη πλήρη θανάτωση τους. Έρευνα έχει δείξει ότι η χρήση συνδυασμού υπεριώδους ακτινοβολίας και απολυμαντικού TiO_2 ήταν πιο αποτελεσματική στη θανάτωση βιοϋμενικών κυττάρων *L. monocytogenes* απ' ότι η χρήση μόνο του απολυμαντικού TiO_2 (Chorianopoulos et al., 2010). Άλλη μελέτη έδειξε παρόμοια αποτελέσματα, καθώς η αντιβακτηριακή δραστηριότητα του TiO_2 έναντι βιοϋμενικών κυττάρων *B. subtilis* και *E. coli* ήταν σημαντικά μεγαλύτερη παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας. Μάλιστα ο βαθμός παρεμπόδισης για το *B. subtilis* ήταν 2,5 φορές μεγαλύτερος παρουσία από ότι απουσία UV, σε σύγκριση με το *E. coli* που ήταν 1,8 φορές μεγαλύτερη. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η παρατήρηση ότι υπήρχαν μικτά

βιοϋμένια μικροοργανισμών που παρουσίασαν ανθεκτικότητα μετά από την εφαρμογή του απολυμαντικού και της UV μετά από 2 ώρες, χαρακτηριστικό παράδειγμα του παθογόνου μικροοργανισμού *E. coli* όταν σχημάτισε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *Serratia proteomaculans* και *Proteus vulgaris* αλλά και του μικροοργανισμού *S. Enteritidis* όταν σχημάτισε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *Citrobacter freundii* και *Leuconostoc* spp. Δεδομένου όμως ότι σύμφωνα με τον κατασκευαστή η βιομηχανία τροφίμων θα εφαρμόζει την UV παρουσία του απολυμαντικού πάνω από 5 ώρες, οι μικροοργανισμοί που παρουσίασαν μικρή ανθεκτικότητα θα θανατώνονται και αυτοί. Γενικά από την βιβλιογραφία έχει βρεθεί ότι το TiO_2 έχει χρησιμοποιηθεί για την αδρανοποίηση μιας ευρείας ποικιλίας μικροοργανισμών σε πολλές εφαρμογές (Matsunaga et al., 1988, Fujishima et al., 1999, Kim et al., 2003, Duffy et al., 2004, Maneerat and Hayata). Έχει βρεθεί μάλιστα ότι οι ρίζες υδροξυλίου (OH) που παράγονται κατά την δράση του, έναντι σε κάποιον μικροοργανισμό, είναι περίπου χίλιες μέχρι και δέκα χιλιάδες φορές πιο αποτελεσματικές για απενεργοποίηση βιοϋμένιου του μικροοργανισμού *E. coli* σε σχέση με άλλα απολυμαντικά όπως το χλώριο, το όζον και το διοξειδίο του χλωρίου (Cho et al., 2004). Έχει αναφερθεί ότι το TiO_2 είναι τοξικό τόσο στα αρνητικά κατά Gram όσο και στα θετικά κατά Gram-βακτήρια, μελέτες έχουν δείξει ότι τα θετικά κατά Gram-βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από τα Gram-αρνητικά βακτήρια στις αντιβακτηριακές επιδράσεις του TiO_2 (Fu et al., 2005). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη καθώς παρατηρήθηκε ότι τα θετικά κατά Gram-βακτήρια που εξετάστηκαν έναντι του απολυμαντικού όπως ήταν *L. monocytogenes*, *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus sakei* και *Brochothrix thermosphacta* ήταν τα μοναδικά είδη μικροοργανισμών που τα βιοϋμενικά τους κύτταρα δεν παρουσίασαν αντίσταση στην δράση του απολυμαντικού, τόσο ως μονοκαλλιέργειες όσο και ως μικτές καλλιέργειες. Γενικά η βακτηριοκτόνος και η μυκητοκτόνος δράσης του TiO_2 έχει μελετηθεί έναντι πολλών μικροοργανισμών όπως *E. coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Vibrio parahaemolyticus*, *L. monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Diaporthe actinidiae* και *Penicillium expansum*. (Matsunaga κ.ά., 1985, 1988, Wei κ.ά., 1994, Kikuchi et al., 1997, Horie et al., 1998, Sunada et al., 1998 · Maness et al., 1999 · Choi and Kim, 2000 · Wist et al., 2002 · Kim et al., 2003 · Cho et al., 2004, Hur et al., 2005, Maneerat and Hayata, 2006). Δεν έχει μελετηθεί όμως η δράση του έναντι σε βιοϋμένια μικτών καλλιεργειών, και εδώ έγκειται η πρωτοτυπία της παρούσας μελέτης.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση που ασκούν οι μικτές καλλιέργειες στην αντιμικροβιακή δράση του φωτοκαταλυτικού απολυμαντικού TiO_2 και παρατηρήθηκε πως οι μικτές καλλιέργειες επηρέασαν την ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού έναντι στη δράση του αντιμικροβιακού

παράγοντα, είτε παρουσιάζοντας αντίσταση σε αυτό είτε παρουσιάζοντας περισσότερη ευαισθησία.. Για παράδειγμα όταν ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* εκτέθηκε στην δράση της ακτινοβολίας UV ως μονοκαλλιέργεια, θανατώθηκαν όλα τα βιοϋμενικά του κύτταρα όταν όμως βρισκόταν σε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *Salmonella enterica ser. Enteritidis*, *Serratia proteomaculans*, *Citrobacter freundii*, *Leuconostoc* spp., *Lactobacillus sakei* και *Pseudomonas fragi* παρουσίασε ανθεκτικότητα έναντι στην αντιμικροβιακή δράση της ακτινοβολίας UV. Από την άλλη όταν ο μικροοργανισμός *Salmonella enterica ser. Enteritidis* εκτέθηκε στην δράση του απολυμαντικού ως μονοκαλλιέργεια θανατώθηκαν όλα τα βιοϋμενικά κύτταρα ακόμα και αυτά που είχαν επιζήσει υπό την δράση μόνο της ακτινοβολίας UV. Όταν βρισκόταν όμως σε μικτή καλλιέργεια με τους μικροοργανισμούς *Citrobacter freundii* και *Leuconostoc* spp παρουσίασε ανθεκτικότητα στη δράση του απολυμαντικού. Ο μικροοργανισμός *Escherichia coli* παρουσίασε ως μονοκαλλιέργεια ανθεκτικότητα στην δράση του απολυμαντικού, όταν αναπτύχθηκε σε μικτό βιοϋμένιο με τους μικροοργανισμούς *Salmonella enterica ser. Enteritidis*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia proteomaculans*, *Citrobacter freundii*, *Hafnia alvei*, *Proteus vulgaris*, *Brochothrix thermosphacta*, *Leuconostoc* spp. και *Lactobacillus sakei* θανατώθηκαν όλα τα βιοϋμενικά κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού.

Πολυάριθμες μελέτες έχουν δείξει ότι τα βιοϋμένια πολλαπλών ειδών γενικά είναι πιο ανθεκτικά στην απολύμανση από ότι τα βιοϋμένια μονοκαλλιεργειών (Luppens et al., 2008, Simoes et al., 2009, Van der Veen και Abee 2010). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι τέσσερα στελέχη που απομονώθηκαν από θαλάσσιο φύκι αλληλεπιδρούν συνεργικά σε ένα βιοϋμένιο παράγοντας περισσότερη βιομάζα και παρουσιάζοντας αξιοσημείωτα μεγαλύτερη αντοχή στο υπεροξείδιο του υδρογόνου σε σχέση με οποιοδήποτε από τα βιοϋμένια των μεμονωμένων ειδών (Burmolle et al., 2006). Επίσης σε άλλη έρευνα που έχει γίνει παρατηρήθηκε, ότι η ανθεκτικότητα βιοϋμενίων μικτών καλλιεργειών σε απολυμαντικά όπως στο υπεροξικό οξύ και στο χλωριούχο βενζαλκόνιο ήταν υψηλότερη από εκείνη που εκδηλώνεται από τα αντίστοιχα βιοϋμένια μονής καλλιέργειας (van der Veen και Abee 2011). Οι James et al. (1995) έδειξαν ότι το πάχος του βιοϋμενίου επηρεάζεται από τον αριθμό των διαφορετικών μικροοργανισμών από το οποίο αποτελείται. Αποτελέσματα του πειράματος τους έδειξαν ότι οι καθαρές καλλιέργειες των βιοϋμενίων *K. pneumoniae* ή *P. aeruginosa* σε έναν εργαστηριακό αντιδραστήρα ήταν λεπτότερες (15 μm και 30 μm αντίστοιχα) από ένα βιοϋμένιο που περιείχε και τα δύο είδη εμφανίζοντας πάχος 40 μm. Το πάχος ενός βιοϋμενίου παίζει σημαντικό ρόλο στην ανθεκτικότητα που θα παρουσιάσει έναντι κάποιου

απολυμαντικού, όσο πιο παχύ είναι ένα βιοϋμένιο τόσο πιο δύσκολη είναι η δράση του απολυμαντικού.

Σε αυτή τη μελέτη αποδείχθηκε ότι η χρήση του απολυμαντικού με κύριο αντιμικροβιακό παράγοντα το νανοσωματίδιο TiO_2 σε συνδυασμό με ακτινοβολία UV είναι ένας αποτελεσματικός τρόπος για τη μείωση του χρόνου απολύμανσης, εξαλείφοντας παθογόνους μικροοργανισμούς καθώς και τα μικτά βιοϋμένια που μπορεί να έχουν δημιουργήσει μαζί με άλλους μικροοργανισμούς πάνω σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, ενισχύοντας έτσι την ασφάλεια των τροφίμων και εξοικονομώντας χρόνο και χρήμα. Συμπερασματικά, η χρήση του απολυμαντικού με το φωτοκαταλυτικό παράγοντα TiO_2 ως εναλλακτικό τρόπο απολύμανσης μολυσμένων επιφανειών παρουσιάζει μια ενδιαφέρουσα περίπτωση η οποία με περαιτέρω ανάπτυξη μπορεί να προσφέρει ισχυρά μέσα απολύμανσης κατά τον σχηματισμό βιοϋμενίων.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- A. M. El Badawy, R. G. Silva, B. Morris, K. G. Scheckel, M. T. Suidan, and T. M. Tolaymat, “Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles,” *Environmental Science and Technology*, vol. 45, no. 1, pp. 283–287, 2011.
- Adams, L. K., Lyon, D. Y., and Alvarez, P. J. J. (2006). Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. *Water Res.* 40, 3527–3532. doi: 10.1016/j.watres.2006.08.004
- Allerberger F, Wagner M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection.* 2010; 16: 16–23.
- Amorena, B., E. Gracia, M. Monzon, J. Leiva, C. Oteiza, M. Perez, J.-L. Alabart, and J. Hernandez-Yago. 1999. Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 44:43–55.
- Angst EC (1922) The fouling of ship bottoms by bacteria Report, Bureau Construction and repair, United States Navy Department, Washington (cited from ZoBell & Allen, 1935).
- Ansari, M. A., Khan, H. M., Khan, A. A., Cameotra, S. S., Saquib, Q., and Musarrat, J. (2013). Interaction of Al₂O₃ nanoparticles with *Escherichia coli* and their cell envelope biomolecules. *J. Appl. Microbiol.* 116, 772–783. doi: 10.1111/jam.12423
- Anwar, H., J. L. Strap, K. Chen, and J. W. Costerton. 1992. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1208–1214.
- Barnes LM, Lo MF, Adams MR, Chamberlain AHL. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied and Environmental Microbiology.* 1999; 65: 4543–48.
- Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* 1999;2:582–7.
- Beuchat LR. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes Infect* 4:413–23.
- Blackman IC, Frank JF. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. *Journal of Food Protection.* 1996; 59: 827-31.
- Booth IR. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev* 1985;49:359–78.
- Borucki MK, Peppin JD, White D, Loge F, Call DR. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology.* 2003; 69: 7336-42.
- Brandal MT. 2006. Fitness of human enterica pathogens on plants and implications for food safety. *Annu Rev Phytopathol* 44:367–92.

- Bremer, P. J., I. A. N. Monk, and C. M. Osborne. (2001) Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium* spp. *Journal of Food Protection* 64(9): 1369–1376.
- Carpentier B, Chassaing D. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 97:111- 122.
- Chang YI, Chang PK. The role of hydration force on the stability of the suspension of *Saccharomyces cerevisiae* application of the extended DLVO theory. *Colloids Surf A: Physicochem Eng Aspects* 2002;211:67–77
- Characklis WG, Marshal KC. *Biofilms*. New York: John Wiley and Sons; 1990.
- Cheng Y, Siletzky R, Kathariou S. Genomic division/lineages, epidemic clones and population structure. In: Dongyou, L.(Ed.), *Handbook of Listeria monocytogenes*. 2008; CRC Press, Boca Raton, pp. 337–57.
- Chia, T. W. R., R. M. Goulter, T. McMeekin, G. A. Dykes, and N. Fegan. (2009) Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology* 26(8): 853–859.
- Chmielewski, R. N. and J. F. Frank. (2003) Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2(1): 22–32.
- Chmielewsky RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003; 2: pp: 22-32.
- Chorianopoulos, N. G., Tsoukleris, D. S., Panagou, E. Z., Falaras, P., and Nychas, G. E. (2011). Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing. *Food Microbiol.* 28, 164–170. doi: 10.1016/j.fm.2010.07.025
- Chuard, C., P. Vaudaux, F. A. Waldvogel, and D. P. Lew. 1993. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* growing on fibronectin-coated surfaces to bactericidal antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:625–632.
- Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999;11:217–21.
- D. Inbakandan, C. Kumar, L. S. Abraham, R. Kirubakaran, R. Venkatesan, and S. A. Khan, “Silver nanoparticles with anti microfouling effect: a study against marine biofilm forming bacteria,”*Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 111, pp. 636– 643, 2013.
- Da Silva Meira, Q. G., I. de Medeiros Barbosa, A. J. Alves Aguiar Athayde, J. P. de Siqueira-Júnior, and E. L. de Souza. (2012) Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control* 25(2): 469–475.

- De Weger LA, van der Vlugt C, Wijffjes AHM, et al. Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J Bacteriol* 1987;169:2769–73.
- Desai, M., T. Buhler, P. H. Weller, M. R. W. Brown. 1998. Increasing resistance of planktonic and biofilm cultures of *Burkholderia cepacia* to ciprofloxacin and ceftazidime during exponential growth. *J. Antimicrob. Chemother.* 42:153–160.
- Dewanti, R., & Wong, A. C. L. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 147e164.
- Di Bonaventura G, Piccolomini R, Paludi D, D’Orio V, Vergara A, Conter M, Ianieri A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *Journal of Applied Microbiology*. 2008; 104: 1552–61.
- Dobell C. Antony van Leeuwenhoek and his “Little animals”. New York: Dover Publications INC, 1960:239–55.
- Dogan B, Boor KJ. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003; .69:130-138.
- Dourou, D., C. S. Beauchamp, Y. Yoon et al. (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(3): 262–268.
- Duguid JP, Anderson ES, Campbell I. Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *Journal of Pathology and Bacteriology*. 1966; 92: 107.
- DuGuid, I. G., E. Evans, M. R. W. Brown, and P. Gilbert. 1990. Growthrate- dependent killing by ciprofloxacin of biofilm-derived *Staphylococcus epidermidis*; evidence for cell-cycle dependency. *J. Antimicrob. Chemother.* 30:791–802.
- Duguid, J. P., Anderson, E. S., & Campbell, I. (1966). Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 92(1), 107e138.
- Dunne WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* 2002;15:155–66
- Elhariry HM. Biofilm formation by endospore-forming bacilli on plastic surface under some food-related and environmental stress conditions. *Global Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 2008; 3 (2): 69-78.
- Evans, D. J., D. G. Allison, M. R. W. Brown, and P. Gilbert. 1990. Effect of growth-rate on resistance of gram-negative biofilms to cetrimide. *J. Antimicrob. Chemother.* 26:473–478.
- Evans, R.C. and Holmes, C.J. (1987) Effect of vancomycin hydrochloride on *Staphylococcus epidermidis* biofilm associated with silicone elastomer. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 889–894
- Fletcher M. *Microbial adhesion to surfaces*. Chichester: Ellis Horwood; 1980.

- Fletcher M. The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can J Microbiol* 1977;23:1–6.
- Frank, J. F., & Koffi, R. A. (1990). Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, 53, 550e554.
- G. A. Sotiriou and S. E. Pratsinis, “Antibacterial activity of nanosilver ions and particles,” *Environmental Science and Technology*, vol. 44, no. 14, pp. 5649–5654, 2010.
- Gallardo-Moreno AM, Gonzalez-Martin ML, Perez-Giraldo C, et al. The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. *J Colloid Interf Sci* 2002;271:351–8.
- Gandhi M, Chikindas ML. 2007. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *Intl J Food Microbiol* 113:1–15.
- Ganesh CK, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry a review. *Int J Food Microbiol* 1998;42:9–27.
- Ganesh CK, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry a review. *Int J Food Microbiol* 1998;42:9–27.
- Giaouris E, Choriantopoulos N, Nychas, GJE Effect of temperature, pH and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces, as indicated by bead vortexing method and by conductance measurements. *Journal of Food Protection*. 2005; 68: 2149–54.
- Giaouris, E. D. and G.-J. E. Nychas. (2006) The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology* 23(8): 747–752.
- Giaouris, E., N. Choriantopoulos, P. Skandamis, and G.-J. Nychas. (2012) Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments. In *Salmonella—A Dangerous Foodborne Pathogen*, eds. B. S. M. Mahmoud, pp. 157–180. Rijeka, Croatia: Intech.
- Giotis E, Mudcharee J, Wilkinson B, Blair I, McDowell D. Role of Sigma B factor in the alkaline tolerance of *Listeria monocytogenes* 10403S and cross protection against subsequent ethanol and osmotic stress. *Journal of Food Protection*. 2008; 71: 1481 – 5.
- Gonzalez Ribas F. Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad de desinfectantes in situ de productos limpiadores comerciales. 2005.
- Gonzalez Ribas F. Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad de desinfectantes in situ de productos limpiadores comerciales. 2005.
- Gristina, A.G. et al. (1987) Adhesive colonization of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials* 8, 423–426

- H. Yun, J. D. Kim, H. C. Choi, and C. W. Lee, “Antibacterial activity of CNT-Ag and GO-Ag nanocomposites against gramnegative and gram-positive bacteria,” *Bulletin of the Korean Chemical Society*, vol. 34, no. 11, pp. 3261–3264, 2013.
- Habimana, O, Heir E, Langsrud S, Asli AW, Mϕretrϕ T. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010; 76(13): 4557–59.
- Hall-Stoodley L, Stoodley P. Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:228–33.
- Hancock REW, Siehnel R, Martin N. Outer membrane proteins of *Pseudomonas*. *Mol Microbiol* 1990;4:1069–75.
- Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H. C., and Kahru, A. (2008). Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308–1316. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.047
- Henrici A. Studies of freshwater bacteria. 1. A direct microscopic technique. *J Bacteriol* 1933;25:277–86.
- Herald PJ, Zottola EA. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J Food Sci* 1988;53:1549–52.
- Herald PJ, Zottola EA. Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *J Food Sci* 1988;53:1549–52
- Herald, P. J., & Zoottola, E. A. (1988b). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. *Journal of Food Science*, 53(5), 1549e1562.
- Hermansson M. The DLVO theory in microbial adhesion. *Colloids Surf B Biointerf* 1999;14:105–19.
- Houdt RV, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*. 2005; 156: pp: 626-33.
- Hoyle, B. D., C. K. W. Wong, and J. W. Costerton. 1992. Disparate efficacy of tobramycin on Ca₂₋, Mg₂₋, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Can. J. Microbiol.* 38:1214–1218.
- J. R. Morones, J. L. Elechiguerra, A. Camacho et al., “The bactericidal effect of silver nanoparticles,” *Nanotechnology*, vol. 16, no. 10, pp. 2346–2353, 2005.
- J.A. Lemire, J. J.Harrison, andR. J.Turner, “Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 11, no. 6, pp. 371–384, 2013.
- James GA, Beaudette L, Costerton JW. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology* 1995;15:257–62.
- Jensen, A., M. H. Larsen, H. Ingmer, and B. F. Vogel. (2007) Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Food Protection* 70(3): 592–599.

- Jones HC, Roth IL, Saunders WM III. Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol* 1969;99:316–25.
- Joseph B, Ota SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 2001; 64: pp: 367-372.
- Jullien, C., T. Benezech, C. Le Gentil et al. (2008) Physico-chemical and hygienic property modifications of stainless steel surfaces induced by conditioning with food and detergent. *Biofouling* 24(3): 163–172.
- Kadam, S. R., H. M. W. den Besten, S. van der Veen et al. (2013) Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *International Journal of Food Microbiology* 165(3): 259–264.
- Kathariou S. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection*. 2002; 65: 1811-29.
- Keskinen LA, Todd ECD, Ryser E. Transfer of surface dried *Listeria monocytogenes* from stainless steel knife blades to roast turkey breast. *Journal of Food Protection*. 2008; 71: pp: 176-81.
- Kim, B., Kim, D., Cho, D., and Cho, S. (2003). Bactericidal effect of TiO₂ photocatalyst on selected food-borne pathogenic bacteria. *Chemosphere* 52, 277–281. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00051-1
- Klapper I, Rupp CJ, Cargo R, et al. Viscoelastic fluid description of bacterial biofilm material properties. *Biotechnol Bioeng* 2002;80:289–96.
- Kostaki M, Chorianopoulos N, Braxou E, Nychas GJ, Giaouris E. 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*. 2012; 78(8): 2586–95.
- Kumar, C. G. and S. K. Anand. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *International Journal of Food Microbiology* 42(1–2): 9–27.
- Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer R R Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology*. 2003; 85: 227-36.
- Kuusela, P., Moran, A. P., Vartio, T., & Kosunen, T. U. (1989). Interaction of *Campylobacter jejuni* with extracellular matrix components. *Biochimica et Biophysica Acta*, 993(2e3), 297e300.
- Lasa I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. *International Microbiology*. 2006; 9: 21-8
- Lee Wong AC. Biofilms in Food Processing Environments, *Journal of Dairy Science*. 1998; 81:2765-70.

- Lewandowski, Z. 2000. Structure and function of biofilms, p. 1–17. In L. V. Evans (ed.), *Biofilms: recent advances in their study and control*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Lewandowski, Z. 2000. Structure and function of biofilms, p. 1–17. In L. V. Evans (ed.), *Biofilms: recent advances in their study and control*. Harwood Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands.
- Li Y. Cell density modulates acid adaption in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol* 2001;183:6875–84.
- Liu Y, Yang S, Xu H, et al. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *J Biotechnol* 2004;110:251–6.
- M. J. Hajipour, K. M. Fromm, A. Akbar Ashkarran et al., “Antibacterial properties of nanoparticles,” *Trends in Biotechnology*, vol. 30, no. 10, pp. 499–511, 2012.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53(9), 742e746.
- Mai, T. L. and D. E. Conner. (2007) Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel. *International Journal of Food Microbiology* 120(3): 282–286.
- Marion-Ferey K, Pasmore M, Stoodley P, et al. Biofilm removal from silicone tubing: an assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *J Hospital Infect* 2002;53:64–71.
- Moltz AG, Martin SE. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *Journal of Food Protection*. 2005; 68: 92-97.
- Moons P, Michiels CW, Aertsen A. Bacterial interactions in biofilms. *Critical Reviews in Microbiology*. 2009; 35(3): 157–168.
- Moretro T, Langsrud S. *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments. *Biofilms*.2004; 1: 107-21.
- Murphy C, Carroll C, Jordan KN. 2006. Environmental survival mechanisms of the food borne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol* 100:623–32.
- Nadell CD, Xavier J B, Foster KR. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009; 33(1): 206–24.
- Nascentes, N., E. Chiarini, M. Teresa, M. De Aguiar, and L. Augusto. (2012) PFGE characterisation and adhesion ability of *Listeria monocytogenes* isolates obtained from bovine carcasses and beef processing facilities. *Meat Science* 92(4): 635–643.
- Natacha C. Gómez, Juan M. P. Ramiro, Beatriz X. V. Quecan, and Bernadette D. G. de Melo Franco. Use of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria (LAB) Biofilms for the Control of *Listeria*

monocytogenes, *Salmonella* Typhimurium, and *Escherichia coli* O157:H7 Biofilms Formation 2016; 7:863

- Nickel, J.C. et al. (1985) Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary tract catheter. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27, 619–624
- Nilsson, R. E., T. Ross, and J. P. Bowman. (2011) Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology* 150(1): 14–24.
- Nisbet BA, Sutherland IW, Bradshaw IJ, et al. XM-6: a new gel-forming bacterial polysaccharide. *Carbohydr Polym* 1984;4:377–94.
- Norwood, D. E. and A. Gilmour. (2001) The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Letters in Applied Microbiology* 33(4): 320–324.
- Ohashi A, Harada H. Adhesion strength of biofilm developed in an attached-growth reactor. *Water Sci Technol* 2004;29:281–8.
- Oliveira R, Melo L, Oliveira A, et al. Polysaccharide production and biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens*: effects of pH and surface material. *Colloids Surf B: Biointerf* 1994;2:41–6.
- Olsen ER. Influence of pH on bacterial gene expression. *Mol Microbiol* 1993;8:5–14.
- Pan Y, Breidt F, Kathariou S. Competition of *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a and 4b strains in mixed-culture biofilms. *Applied and Environmental Microbiology.* 2009; 75(18): 5846–52.
- Pérez-Rodríguez, F., D. Campos, E. T. Ryser et al. (2011) A mathematical risk model for *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination of lettuce during processing. *Food Microbiology* 28(4): 694–701.
- Poulsen, L. V. (1999) Review: Article microbial biofilm in food processing. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie* 32: 321–326.
- Prosser, B.L. et al. (1987) Method of evaluating effects of antibiotics on bacterial biofilm. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1502–1506
- R. Y. Pelgrift and A. J. Friedman, “Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, no. 13-14, pp. 1803–1815, 2013.
- Read RR, Costerton JW. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology.* 1987; 3 (12):1080-90.
- Remis JP, Costerton JW, Auer M. Biofilms: Structures that may facilitate cell–cell interactions. *The ISME Journal.* 2010; 4(9):1085–87.
- Rieu A, Lemaître JP, Guzzo J, Piveteau P. Interactions in dual species biofilms between *Listeria monocytogenes* EGD-e and several strains of *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology.* 2008; 126(1–2): 76–82.

- Rowland BM. Bacterial contamination of dental unit waterlines: what is your dentist spraying into your mouth? *Clin Microbiol Newslett* 2003;25:73–7.
- Rutter PR, Vincent B. *Microbial adhesion to surfaces*. London: Ellis Horwood; 1980.
- Ryser ET, Marth EH. *Listeria, Listeriosis and Food Safety*. 3rd Edn., CRC Press, Inc. New York. 2007. pp: 873.
- Ryu, J. and L. R. Beuchat. (2005) Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: Effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Applied and Environmental Microbiology* 71(1): 247–254.
- Ryu, Jee-Hoon, Beuchat, LR. Biofilm formation and sporulation by *Bacillus cereus* on stainless steel surface and subsequent resistance of vegetative cells and spores to chlorine, chlorine dioxide, and a peroxyacetic acid-based sanitizer. *Journal of Food Protection*. 2005; 68(12): 2614–22.
- S. L. Warnes, V. Caves, and C. W. Keevil, “Mechanism of copper surface toxicity in *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* involves immediate membrane depolarization followed by slower rate of DNA destruction which differs from that observed for Gram-positive bacteria,” *Environmental Microbiology*, vol. 14, no. 7, pp. 1730–1743, 2012.
- S. Pal, Y. K. Tak, and J. M. Song, “Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 6, pp. 1712–1720, 2007.
- Shi, X. and X. Zhu. (2009) Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology* 20(9): 407–413.
- Silva, S., P. Teixeira, R. Oliveira, and J. Azeredo. (2008) Adhesion to and viability of *Listeria monocytogenes* on food contact surfaces. *Journal of Food Protection* 71(7): 1379–1385.
- Simões, M., L. C. Simões, and M. J. Vieira. (2010) A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT—Food Science and Technology* 43(4): 573–583.
- Speranza, B., M. R. Corbo, and M. Sinigaglia. (2011) Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *Journal of Food Science* 76(1): M12–M16
- Srinivasan S, Harrington GW, Xagorarakis I, Goel R. 2008. Factors affecting bulk to total bacteria ratio in drinking water distribution systems. *Water Res* 42:3393–404.
- Stepanovic S, Cirkovic I, Mijac V, et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol* 2003;20:339–43.
- Stoodley P, Boyle JD, Dodds I, Lappin-Scott HM. Consensus model of biofilm structure. In: Wimpenny JWT, Gilbert PS, Lappin-Scott HM, Jones M, editors. *Biofilms: community interactions and control*. Cardiff, UK: Bioline; 1997. p. 1–9.
- Stoodley P, Cargo R, Rupp CJ, et al. Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2002;29:361–7.

- Stoodley P, Lewandowski Z, Boyle J, et al. Structural deformation of bacterial biofilms caused by short-term fluctuations in fluid shear: an in situ investigation of biofilm rheology. *Biotechnol Bioeng* 1999;65:83–92.
- Suci, P. A., M. W. Mittelman, F. P. Yu, and G. G. Geesey. 1994. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2125–2133.
- Sutherland IW. Microbial polysaccharides from Gram-negative bacteria. *Int Dairy J* 2001;11:663–74.
- Sutherland IW. Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydr Polym* 1999;38:319–28.
- Ternstrom A, Lindberg AM, Molin G. Classification of the spoilage flora of raw and pasteurised bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. *Journal of Applied Bacteriology.* 1993; 75: 25-34.
- Tolker-Nielsen T, Brinch UC, Ragas PC, Andersen JB, Jacobsen CS, Molin S. Development and dynamics of *Pseudomonas* sp. biofilms. *J Bacteriol* 2000;182:6482–9.
- Tolker-Nielsen T, Molin S. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol* 2000;40:75–84.
- Uhlich GA, Rogers DP, Mosier D A. *Escherichia coli* serotype O157:H7 retention on solid surfaces and peroxide resistance is enhanced by dual-strain biofilm formation. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2010; 7(8): 935–943.
- van der Veen S, Abee T. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *International Journal of Food Microbiology.* 2011; 144(3): 421–31.
- Van Houdt, R. and C. W. Michiels. (2010) Biofilm formation and the food industry—A focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1117–1131.
- Villain-Simonnet A, Milas M, Rinaudo MA. New bacterial exopolysaccharide (YAS34). II. Influence of thermal treatments on the conformation and structure. *Int J Biol Macromol* 2000;27:77–87.
- Zhang LF, Yang de J, Chen HC, Sun R, Xu L, Xiong ZC, Govender T, Xiong CD. 2008. An ionically crosslinked hydrogel containing vancomycin coating on a porous scaffold for drug delivery and cell culture. *Intl J Pharm* 353:74–87.
- ZoBell CE, Allen E. The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *J Bacterial* 1935;29:239–51.
- Zottola, E. and K. C. Sasahara. (1994) Microbial biofilms in the food processing industry—Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology* 23(2): 125–148