



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ & ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Κατασκευή σύνθετης μεταλλικής επιφάνειας με χρήση νανοτεχνολογίας
για τον έλεγχο του σχηματισμού βιοϋμενίου από επιλεγμένους
αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς

Φωτεινή Θ. Γεροδήμου

Επιβλέπων Καθηγητής:
Πανάγου Ζ. Ευστάθιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Αθήνα
2022

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Κατασκευή σύνθετης μεταλλικής επιφάνειας με χρήση νανοτεχνολογίας
για τον έλεγχο του σχηματισμού βιοϋμενίου από επιλεγμένους
αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς

“Fabrication of a composite metal surface with the use of nanotechnology
to control biofilm formation by selected spoilage and pathogenic
microorganisms”

Φωτεινή Θ. Γεροδήμου

Εξεταστική Επιτροπή:

Πανάγου Ζ. Ευστάθιος, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

Τοπογλίδης Εμμανουήλ, Επίκουρος Καθηγητής Πανεπιστήμιο Πατρών

Κατασκευή σύνθετης μεταλλικής επιφάνειας με χρήση νανοτεχνολογίας για τον έλεγχο του σχηματισμού βιοϋμενίου από επιλεγμένους αλλοιωγόνους και παθογόνους μικροοργανισμούς.

ΠΜΣ Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις βιομηχανίες τροφίμων ο ανοξειδωτος χάλυβας χρησιμοποιείται εκτενώς λόγω των ιδιοτήτων του, αλλά σε περίπτωση επιμόλυνσής του από βακτήρια, αυτά μπορούν εύκολα να σχηματίσουν βιοϋμενίο στην επιφάνειά του. Η απομάκρυνση ενός βιοϋμενίου από την επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα, απαιτεί τη χρήση χημικών απολυμαντικών μέσων. Για την μείωση των χημικών αυτών, είναι απαραίτητο να δημιουργηθούν εναλλακτικές μέθοδοι που θα ελέγχουν το σχηματισμό βιοϋμενίων από τα βακτήρια, οι οποίες θα είναι λιγότερο επιβλαβείς για τα τρόφιμα, την υγεία του καταναλωτή και το περιβάλλον. Μία τέτοια εναλλακτική μέθοδος είναι η δημιουργία μίας σύνθετης μεταλλικής επιφάνειας με τη χρήση νανοτεχνολογίας. Τα μεταλλικά νανοσωματίδια, όπως το τιτάνιο και ο άργυρος, έχουν αντιβακτηριακές ιδιότητες και λόγω του μεγέθους τους (νανοκλίμακα) αντιδρούν καλύτερα με τα βακτηριακά κύτταρα.

Στην μελέτη αυτή, δημιουργήθηκε μία σύνθετη μεταλλική επιφάνεια από ανοξειδωτο χάλυβα (SS) με μία επίστρωση λεπτού υμενίου από διοξείδιο του τιτανίου (TiO_2) στην οποία είχαν εναποθετηθεί νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs). Καθώς η ακτινοβολία UV είναι απαραίτητη για την αντιμικροβιακή δράση του διοξειδίου του τιτανίου, τα νανοσωματίδια αργύρου χρησιμοποιήθηκαν για να αυξήσουν την αντιμικροβιακή δράση έναντι της ακτινοβολίας UV, επειδή ο άργυρος είναι γνωστός ως ένας υψηλός αντιβακτηριακός παράγοντας.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν τρία βακτήρια. Τα δύο ήταν παθογόνα, *Listeria monocytogenes* και *Salmonella* Enteritidis, και το τρίτο αλλοιωγόνο, *Pseudomonas fragi*. Τα βακτήρια μελετήθηκαν ως μονοκαλλιέργειες και ως συγκαλλιέργειες (mix1 η οποία αποτελείται από τα βακτήρια *L.monocytogenes* και *P. fragii* και η mix2 που αποτελείται από τα βακτήρια *S. Enteritidis* και *P. fragi*) σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης (15 °C and 25 °C). Επίσης, ο σχηματισμός βιοϋμενίου από τα παραπάνω βακτήρια μελετήθηκε σε τρεις επιφάνειες. Στην επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα (SS) και σε δύο σύνθετες επιφάνειες μία με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου (SS+ TiO_2) και μία με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου και τα νανοσωματίδια αργύρου (SS+ TiO_2 +AgNPs).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα νανοσωματίδια αργύρου επιβράδυναν την αρχική προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στην περίπτωση των μονοκαλλιεργειών, αλλά δεν είχαν καμία επίδραση στην αρχική προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στην περίπτωση των συγκαλλιεργειών. Επίσης, τα νανοσωματίδια αργύρου απέτρεψαν το σχηματισμό βιοϋμενίου του βακτηρίου *L. monocytogenes* ως μονοκαλλιέργεια, με αποτέλεσμα τον θάνατο των κυττάρων μετά από 48 h επώασης

σε θερμοκρασία 15 °C. Ειδικότερα η μελέτη έδειξε μείωση του μικροβιακού πληθυσμού όλων των βακτηρίων ως μονοκαλλιέργειες σε θερμοκρασία 15 °C, αλλά όχι σε θερμοκρασία 25 °C. Στις συγκαλλιέργειες τα νανοσωματίδια αργύρου δεν επηρέασαν καθόλου το σχηματισμό βιοϋμενίων στην συγκαλλιέργεια mix1 αλλά επηρέασε την ανάπτυξη του βακτηρίου *S. Enteritidis* στην συγκαλλιέργεια mix2 που είχε επωαστεί σε θερμοκρασία 15 °C, η οποία μειώθηκε κατά 1,5 log CFU/cm². Και στις δύο συγκαλλιέργειες ο πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* δεν επηρεάστηκε από τα νανοσωματίδια αργύρου αλλά αντίθετα παρουσίασε αύξηση. Συγκεκριμένα, στην συγκαλλιέργεια mix2 επιβίωσε το ίδιο με το βακτήριο *L. monocytogenes*, ενώ στην συγκαλλιέργεια mix1 έδρασε ανταγωνιστικά προς το βακτήριο *S. Enteritidis*, αυξάνοντας τον μικροβιακό του πληθυσμό και στις δύο συγκαλλιέργειες κατά 0,74 log CFU/cm² σε θερμοκρασία 15°C.

Τέλος, διερευνήθηκε η επίδραση της ακτινοβολίας UV για χρόνο εφαρμογής 10 και 30 min έναντι των βιοϋμενίων στην περίπτωση των συγκαλλιεργειών. Παρατηρήθηκε ότι μετά από 10 min έκθεσης της επιφάνειας με τα νανοσωματίδια αργύρου στην ακτινοβολία UV στη συγκαλλιέργεια *L. monocytogenes* και *P. fragi*, ο μικροβιακός πληθυσμός των βακτηρίων μειώθηκε κατά 2,0 και 0,67 log CFU/cm², αντίστοιχα, και στις δύο θερμοκρασίες. Μετά από 30 min το βακτήριο *L. monocytogenes* δεν επιβίωσε στην επιφάνεια, αλλά το βακτήριο *P. fragi* μειώθηκε περισσότερο κατά 3,0 log CFU/cm² και στις δύο θερμοκρασίες. Στη συγκαλλιέργεια των βακτηρίων *S. Enteritidis* και *P. fragi*, από τα πρώτα 10 min έκθεσης της επιφάνειας με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου στην ακτινοβολία UV το παθογόνο βακτήριο εξαλείφθηκε πλήρως σε θερμοκρασία 15 °C, αλλά μπόρεσε να επιβιώσει σε θερμοκρασία 25 °C, όπου απαριθμήθηκε σε 0,87 log CFU/cm² από 3,86 log CFU/cm² που ήταν πριν την έκθεσή του σε ακτινοβολία UV. Σε αυτή την περίπτωση το βακτήριο *P. fragi* επηρεάστηκε από την έκθεση της επιφάνειας στην ακτινοβολία UV για 30 min, και ο πληθυσμός του εξαλείφθηκε πλήρως σε θερμοκρασία 15 °C, αλλά όχι σε θερμοκρασία 25 °C.

Επιστημονική περιοχή: Μικροβιολογία Τροφίμων

Λέξεις κλειδιά: Αντιβακτηριακή ικανότητα, νανοσωματίδια αργύρου, διοξείδιο του τιτανίου, UV ακτινοβολία, βακτηριακό βιοϋμένιο

Fabrication of a composite metal surface with the use of nanotechnology to control biofilm formation by selected spoilage and pathogenic microorganisms.

M.Sc. Food Safety and Quality Management Systems
Department of Food Science and Human Nutrition
Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology

ABSTRACT

In food industries stainless steel surfaces are widely used due to their material properties, but in the case of bacterial contamination, biofilms can be easily developed on them. To remove biofilms from these surfaces, the use of chemical disinfectants is required, and thus alternative approaches must be developed that are less toxic to foods, the consumer, and the environment. A promising alternative approach includes the development of novel synthetic metallic surfaces with the use on nanotechnology. In this direction, metal nanoparticles, such as titanium and silver, can be used due to their antibacterial properties and sizes (in nanoscale) that react better with bacterial cells.

In this study, a synthetic metal surface was developed from stainless steel (SS) with a coating of a thin film of titanium dioxide (TiO₂) deposited with silver nanoparticles (AgNPs). Since UV radiation is necessary to activate the antimicrobial property of titanium dioxide, silver nanoparticles were also investigated as alternative to UV radiation, since silver is well-known for its high antibacterial activity.

In this study three bacteria were used namely, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Pseudomonas fragi*. The bacteria were used either as monocultures or mix-cultures (*L. monocytogenes* and *P. fragi*, mix1; *S. Enteritidis* and *P. fragi*, mix2) incubated at 15 °C and 25 °C. Biofilm development was investigated on three surfaces, namely stainless-steel surface (SS), stainless steel with coating of titanium dioxide (SS+TiO₂) and finally stainless steel with a layer of titanium dioxide deposited with silver nanoparticles (SS+TiO₂+AgNPs).

The results illustrated that silver nanoparticles delayed the reversible attachment of bacterial cells when applied as monocultures but had no effect in the case of mixed cultures. Also, silver nanoparticles prevented biofilm formation of *L. monocytogenes* when grown as monoculture, resulting in bacterial death after 48 h of incubation at 15 °C. Generally, the results obtained in this study indicated decrease in the microbial population of all monocultures at 15 °C, but not at 25 °C. Further on, silver nanoparticles could not prevent biofilm formation in the co-culture of *L. monocytogenes* with *P. fragi* (mix 1). However, in the co-culture of *S. Enteritidis* with *P. fragi* (mix 2), the population of the pathogen was decreased by 1,5 log CFU/cm², especially at 15 °C. It needs to be noted that in both mixed cultures the biofilm

formation of *P. fragi* was not affected by silver nanoparticles and the microbial population increased by 0,74 log CFU/cm², at 25 °C, in both mixes.

Finally, the exposure of the surface with the deposited silver nanoparticles to UV radiation for 10 and 30 min in mixed cultures was investigated. Results showed that after 10 min of UV radiation of mix1, the microbial populations of *L. monocytogenes* and *P. fragi* was decreased by 2 and 0.67 log CFU/cm², respectively, at both temperatures. It must be underlined that after 30 min of UV exposure *L. monocytogenes* was fully eliminated from the surface. The population of *P. fragi* was further decreased by 3 log CFU/cm² at both temperatures. In the case of mix1, from the first 10 min of UV radiation, *S. Enteritis* was fully eliminated from the surface with the silver nanoparticles at 15 °C, but not at 25 °C. In this case, *P. fragi* was affected more from 10 min exposure UV radiation. Moreover, complete biofilm elimination from mix2 was attained after 30 min exposure of the surface with the silver nanoparticles at 15°C, but 25 °C.

Scientific Area: Food Microbiology

Keywords: Antibacterial activity, silver nanoparticles, titanium dioxide, UV radiation, bacterial biofilm

Ευχαριστίες

Αυτή η πτυχιακή εργασία αποτελεί τον επίλογο σε ένα ενδιαφέρον μεταπτυχιακό πρόγραμμα, το οποίο μου άλλαξε την οπτική μου γωνία ως προς την παραγωγή τροφίμων. Ήταν μια διάρκεια 2 ετών στην οποία γνώρισα άτομα τα οποία στάθηκαν δίπλα μου στα άγχη μου, στις δυσκολίες που προέκυψαν κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής και με βοήθησαν τόσο ψυχολογικά όσο και στα πρακτικά κατά τη διάρκεια του πειράματος.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον άνθρωπο που μου έδωσε την ευκαιρία να μελετήσω μια δικιά μου ιδέα, τον κύριο Πανάγου. Ο κ. Πανάγου χωρίς να γνωρίζει αν η μελέτη θα έχει αποτέλεσμα και χωρίς να γνωρίζει το πώς κατασκευάζεται ένα σύνθετο υλικό, εμπιστεύτηκε τόσο εμένα όσο και την ιδέα μου και με βοήθησε σε ότι χρειαζόμουν, καθώς και προσπαθούσε να βρει λύση και σε πράγματα που δεν γνώριζε και δεν γνώριζα. Το να μου δοθεί η ευκαιρία να μελετήσω μια δικιά μου ιδέα την οποία ήθελα να την πραγματοποιήσω σαν διδακτορικό και το ότι έκανα την αρχή της νωρίτερα είναι κάτι στο οποίο είμαι πολύ ευγνώμων και τον ευχαριστώ πολύ για την εμπιστοσύνη και που με άφησε να πραγματοποιήσω τη μελέτη μου - τις ανησυχίες μου. Επίσης, θέλω να τον ευχαριστήσω διότι εκτός του ότι μου έδωσε τη δυνατότητα αυτή, με εμπιστεύτηκε στο να εκπαιδύσω άτομο από πρακτική Erasmus και να γίνω υπεύθυνη της για κάποιο διάστημα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Νυχά για το χρόνο που διέθεσε για τη μελέτη της πτυχιακής μου εργασίας. Καθώς και, τον κ. Τοπογλίδη, η συστατική του οποίου με βοήθησε να γίνω δεχτεί στο συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα, την βάση των γνώσεων που μου έδωσε στο προπτυχιακό πρόγραμμα και μπόρεσα να υλοποιήσω την συγκεκριμένη μεταπτυχιακή μελέτη σήμερα, καθώς και την βοήθεια του σε γνώσεις που δεν κατείχα για την διεξαγωγή του πειράματος.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου μικροβιολογίας και βιοτεχνολογίας τροφίμων που μου εμπιστεύτηκαν το εργαστήριο και με βοήθησαν στο να αποκτήσω περισσότερη υπομονή καθώς και έμαθα πώς συντηρείται ένα εργαστήριο μικροβιολογίας. Όπως καθώς, και Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την διδάκτορα Ειρήνη Σχοινά για τη συνεχή της στήριξη και βοήθεια όσο ήταν στο εργαστήριο αλλά και καθώς αφότου έφυγε από το εργαστήριο.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους φίλους μου που ήταν δίπλα μου όταν τους χρειαζόμουν, ιδιαίτερα αυτούς που μερικές φορές ερχόντουσαν για λίγες ώρες η καθόντουσαν παραπάνω στο εργαστήριο ιδίως τα σαββατοκύριακα που καθόμουνα όλη μέρα μόνη μου. Καθώς και τους γονείς μου που κάθε μέρα επί ένα χρόνο με πήγαιναν και με έφερναν από το εργαστήριο ότι ώρα τους το ζητούσα.

Με την άδειά μου η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το Ίδρυμα

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
2. ΒΙΟΪΜΕΝΙΑ	14
2.1. ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ	15
2.1.1. ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	16
2.1.2. ΜΗ-ΑΝΤΙΣΤΡΕΠΤΗ ΠΡΟΣΚΟΛΛΗΣΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	17
2.1.3. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΕΞΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ (EPS)	18
2.1.4. ΑΙΣΘΗΣΗ ΑΠΑΡΤΙΑΣ (QS).....	19
2.1.5. ΩΡΙΜΑΝΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ.....	19
2.1.6. ΔΙΑΣΠΟΡΑ/ΑΠΟΚΟΛΛΗΣΗ	20
3. ΝΑΝΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΤΩΝ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ	21
3.1. ΤΙΤΑΝΙΟ.....	23
3.2. ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ ΜΕ UV ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑ.....	24
3.3. ΕΝΑΠΟΘΕΣΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΑΡΓΥΡΟΥ (AgNPs)	27
4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
4.1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΑΣΤΑΣ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΤΙΤΑΝΙΟΥ (TiO ₂).....	29
4.2. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΤΟΥ ΑΡΓΥΡΟΥ (AgNPs)	29
4.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΝΘΕΤΩΝ ΜΕΤΑΛΛΙΚΩΝ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ	30
4.4. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΜΒΟΛΙΩΝ.....	32
4.5. ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ	33
4.6. ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΕΠΙΚΟΛΛΗΣΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΪΜΕΝΙΟΥ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΜΕ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΜΕΝΟΥΣ ΒΑΜΒΑΚΟΦΟΡΟΥΣ ΣΤΕΙΛΕΟΥΣ (SWAB METHOD) ...	34
4.7. ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ ΜΕ UV	35
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
5.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΜΟΝΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ.....	36
5.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΒΙΟΪΜΕΝΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΓΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	40
5.3. ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΕΠΙΦΑΝΕΙΩΝ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ UV	45
6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	51
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	54
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:	55

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη με τα χαρακτηριστικά τους και την προέλευσή τους.

Πίνακας 2: Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου *S. Enteritidis* από την αρχική επικόλληση μετά από 48h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 3: Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου *P. fragi* από την αρχική επικόλληση μετά από 48 h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 4: Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου *L. monocytogenes* από την αρχική επικόλληση μετά από 48 h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 5: Μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων *L. monocytogenes* και *P. fragi* μέσα στη μικτή καλλιέργεια 1, από την αρχική επικόλληση, μετά από 48 h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 6: Μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων *S. Enteritidis* και *P. fragi* μέσα στη μικτή καλλιέργεια 2, από την αρχική επικόλληση, μετά από 48 h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

Πίνακας 7: Λογαριθμική Μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων *L. monocytogenes* και *P. fragi* κατά τη συγκαλλιέργειά τους μετά από έκθεση τους σε UV ακτινοβολία για 10 min.

Πίνακας 8: Λογαριθμική Μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων *L. monocytogenes* και *P. fragi* κατά τη συγκαλλιέργειά τους μετά από έκθεση τους σε UV ακτινοβολία για 30 min.

Πίνακας 9: Λογαριθμική Μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων *S. Enteritidis* και *P. fragi* κατά τη συγκαλλιέργειά τους μετά από έκθεσή τους σε UV ακτινοβολία για 10 min.

Πίνακας 10: Λογαριθμική Μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων *S. Enteritidis* και *P. fragi* κατά τη συγκαλλιέργειά τους μετά από έκθεση τους σε UV ακτινοβολία για 30 min.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 1: Απορρόφηση UV-VIS διαλύματος AgNPs. (ABS-nm).

Διάγραμμα 2: Ο βακτηριακός πληθυσμός των μονοκαλλιιεργειών σε $\log(\text{CFU}/\text{cm}^2)$ των εμβολίων ως προς το βακτηριακό πληθυσμό της αρχικής προσκόλλησης σε κάθε υπό μελέτη επιφάνεια (•Vaccine ο μικροβιακός πληθυσμός των εμβολίων ▪0h.SS: ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης των βακτηρίων επάνω στην επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα ▪0h.TiO₂ : ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης των βακτηρίων επάνω στην επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου και ▪0h.AgNPs: ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης των βακτηρίων επάνω στην επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου και τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου).

Διάγραμμα 3: Ανάπτυξη βιοϋμενίου του βακτηρίου *Salmonella Enteritidis* σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση στις τρεις υπό μελέτη επιφάνειες και τις δύο θερμοκρασίες επώασης (15 °C και 25 °C). Με ▪0h σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης του βακτηρίου και ▪48h ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου μετά από 48 h επώασης.

Διάγραμμα 4: Ανάπτυξη βιοϋμενίου του βακτηρίου *Pseudomonas fragii* σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση στις τρεις υπό μελέτη επιφάνειες και τις δύο θερμοκρασίες επώασης (15 °C και 25 °C). Με ▪0h σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης του βακτηρίου και ▪48h ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου μετά από 48 h επώασης.

Διάγραμμα 5: Ανάπτυξη βιοϋμενίου του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση στις τρεις υπό μελέτη επιφάνειες και τις δύο θερμοκρασίες επώασης (15 °C και 25 °C). Με ▪0h σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης του βακτηρίου και ▪48h ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου μετά από 48 h επώασης.

Διάγραμμα 6: Σύγκριση του βακτηριακού πληθυσμού των εμβολίων του κάθε μικροοργανισμού με τον βακτηριακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας mix1 που έχει προσκολληθεί στην κάθε επιφάνεια. Με ▪ Vaccine σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του εμβολίου του κάθε μικροοργανισμού, ▪ 0h.SS η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS, ▪ 0h.TiO₂ η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS+TiO₂ και ▪ 0h.AgNPs η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS+TiO₂+AgNPs

Διάγραμμα 7: Ανάπτυξη βιοϋμενίου της συγκαλλιέργειας mix1 (48 h) σε όλες τις υπό μελέτη επιφάνειες και θερμοκρασίες επώασης σε σύγκριση την αρχική επικόλληση (0 h). Όπου, ▪ 0h.P. σημειώνεται η αρχική επικόλληση του βακτηρίου *P. fragi* μέσα στο mix1, ▪ 48h.P. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪0h.L. η αρχική επικόλληση του βακτηρίου *L. monocytogenes* μέσα στο mix1 και ▪48h.L. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο.

Διάγραμμα 8: Σύγκριση του βακτηριακού πληθυσμού των εμβολίων του κάθε μικροοργανισμού με το βακτηριακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας mix2 που έχει προσκολληθεί στην κάθε επιφάνεια. Με ▪ Vaccine σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του εμβολίου του κάθε μικροοργανισμού, ▪ 0h.SS η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS, ▪ 0h.TiO₂ η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS+TiO₂ και ▪ 0h.AgNPs η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS+TiO₂+AgNPs

Διάγραμμα 9: Ανάπτυξη βιοϋμενίου της συγκαλλιέργειας mix2 (48 h) σε όλες τις υπό μελέτη επιφάνειες και θερμοκρασίες επώασης σε σύγκριση την αρχική επικόλληση (0 h). Όπου, ▪ 0h.P. σημειώνεται η αρχική επικόλληση του βακτηρίου *P. fragi* μέσα στο mix2, ▪ 48h.P. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ 0h.S. η αρχική επικόλληση του βακτηρίου *S. Enteritidis* μέσα στο mix2 και ▪ 48h.S. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο.

Διάγραμμα 10: Η επίπτωση της ακτινοβολίας UV για 10 min στο μικροβιακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας 1 σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό μετά από 48 h επώασης και σχηματισμού του βιοϋμενίου. Όπου, ▪ 48h.P σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ UV.10'.P. η επίδραση 10' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ 48.h.L. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο και ▪ UV.10'.L. η επίδραση 10' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο.

Διάγραμμα 11: Η επίπτωση της ακτινοβολίας UV για 30 min στο μικροβιακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας 1 σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό μετά από 48 h επώασης και σχηματισμού του βιοϋμενίου. Όπου, ▪ 48h.P. σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ UV.30'.P. η επίδραση 30' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ 48.h.L. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο και ▪ UV.30'.L. η επίδραση 30' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο.

Διάγραμμα 12: Η επίπτωση της ακτινοβολίας UV για 10 min στο μικροβιακό πληθυσμό της μικτής καλλιέργειας 2 σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό μετά από 48 h επώασης και σχηματισμού του βιοϋμενίου. Όπου, ▪ 48h.P. σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ UV.10'.P. η επίδραση 10' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ 48.h.S. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο και ▪ UV.10'.S. η επίδραση 10' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο.

Διάγραμμα 13: Η επίπτωση της ακτινοβολίας UV για 30 min στο μικροβιακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας 2 σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό μετά από 48 h επώασης και σχηματισμού του βιοϋμενίου. Όπου, ▪ 48h.P. σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ UV.30'.P. η επίδραση 30' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▪ 48.h.S. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο και ▪ UV.30'.S. η επίδραση 30' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο.

1. Εισαγωγή

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός υγείας (World Health Organization) έχει καταγράψει ότι μέσα σε ένα χρόνο το 7,6% των ανθρώπων έχουν νοσήσει από την κατανάλωση επιμολυσμένων ή αλλοιωμένων τροφίμων (Mouhoub et al., 2022). Για αυτό το λόγο ο καταναλωτής απαιτεί από τις βιομηχανίες τροφίμων την παραγωγή ασφαλών και ποιοτικών τροφίμων.

Οι περισσότερες επιμολύνσεις και αλλοιώσεις των τροφίμων γίνονται κατά κύριο λόγο κατά την διαδικασία επεξεργασίας των τροφίμων και είναι αποτέλεσμα μολύνσεων, είτε των πρώτων υλών, είτε των γραμμών παραγωγής, είτε του τελικού προϊόντος από μικροοργανισμούς. Λόγω αυτού έχει γίνει πιο συχνή η παρακολούθηση τόσο των παθογόνων όσο και των αλλοιωγόνων μικροοργανισμών στις βιομηχανίες τροφίμων και ιδίως στις βιομηχανίες που παράγουν ευαλλοίωτα τρόφιμα όπως το κρέας, το γάλα, τα ιχθυρά και τα πουλερικά (Kebbi et al., 2020). Οι μικροοργανισμοί που αλλοιώνουν τα τρόφιμα ιδιαίτερα κατά τη συντήρηση σε αερόβιες συνθήκες είναι συνήθως είδη του γένους *Pseudomonas*, ενώ από τους παθογόνους μικροοργανισμούς ιδιαίτερα σημαντική είναι η παρουσία των βακτηρίων *Salmonella spp.*, και *Listeria spp.*, που προκαλούν σοβαρά προβλήματα στην ανθρώπινη υγεία σε περίπτωση επιμόλυνσης των τροφίμων (Galie et al. 2018 ; Ciccio et al., 2022).

Από τις ψευδομονάδες, το βακτήριο *Pseudomonas fragi* είναι το κύριο είδος που βρίσκεται στα περισσότερα τρόφιμα και κυρίως στο κρέας και στα γαλακτοκομικά είδη. Είναι ένας αλλοιωγόνος, αρνητικός κατά gram βάκιλος, ο οποίος αναπτύσσεται σε αερόβιες συνθήκες. Όμως, σε μερικές περιπτώσεις, αν υπάρχει άζωτο μπορεί να αναπτυχθεί και αναερόβια, όπως για παράδειγμα σε συσκευασίες με τροποποιημένη ατμόσφαιρα (Public Health England). Τα βακτήρια αυτά είναι ψυχρότροφα και αναπτύσσονται σε θερμοκρασίες από 2 °C (T_{min}) έως και 35 °C (T_{max}), με καλύτερη θερμοκρασία ανάπτυξης στους 25 °C (T_{opt}).

Η *P. fragi* δεν είναι επικίνδυνη για τον άνθρωπο. Σε περίπτωση επιμόλυνσης, προκαλεί πόνο στο στομάχι και διάρροια. Επίσης, έχει βρεθεί ότι το συγκεκριμένο βακτήριο έχει την ικανότητα να ενισχύει στην περαιτέρω ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών, όπως *Staphylococcus aureus* και *Listeria monocytogenes* (Chen et al., 2017).

Σε αντίθεση με την *Pseudomonas fragi*, το βακτήριο *Listeria monocytogenes*, είναι ένας παθογόνος μικροοργανισμός, η παρουσία του οποίου στα τρόφιμα μπορεί να προκαλέσει τον θάνατο στις ευπαθείς ομάδες του πληθυσμού, όπως τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατεσταλμένοι. Επίσης, μπορεί να προκαλέσει ρήξη του εμβρύου και αποβολή στις εγκυμονούσες γυναίκες (Galie et al., 2018). Η *L. monocytogenes* είναι ένα προαιρετικά αναερόβιο, θετικό κατά Gram βακτήριο που υπάρχει σε ποικίλα τρόφιμα όπως, θαλασσινά, γαλακτοκομικά προϊόντα, κρέας, φρούτα, κ.ά. Μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών από -1.5 °C

έως και 45 °C, καθώς είναι ψυχότροφη, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης οι 30 °C.

Το γένος *Salmonella* περιλαμβάνει παθογόνα, προαιρετικά αναερόβια, αρνητικά κατά Gram βακτήρια, μεσόφιλα με θερμοκρασίες ανάπτυξης από 6 °C έως 46 °C και βέλτιστη θερμοκρασία 37 °C. Το πιο συχνό είδος είναι η *Salmonella enterica ser. Enteritidis* και βρίσκεται κυρίως στα πουλερικά και στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Η επιμόλυνση με *S. enterica* μπορεί να προκαλέσει στην ανθρώπινη υγεία σαλμονέλλωση, η οποία συνήθως εκδηλώνεται με γαστρεντερίτιδα, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να προκαλέσει και σηψαιμία, κυρίως σε παιδιά και ηλικιωμένους ανθρώπους, ως αποτέλεσμα να γίνει θανατηφόρα (Wang et al., 2013).

Τα βακτήρια τόσο στη φύση όσο και στο περιβάλλον μιας βιομηχανίας τροφίμων μπορούν να βρεθούν σε δύο μορφές, (α) ως ελεύθερα επιπλέοντες μικροοργανισμοί (πλαγκτονική μορφή), και (β) σε μορφή ακινητοποιημένων αποικιών (βιοϋμένιο). Κατά κύριο λόγο τα επεξεργασμένα τρόφιμα επιμολύνονται ή αλλοιώνονται όταν στις γραμμές παραγωγής τα πλαγκτονικά βακτηριακά κύτταρα έχουν μετασχηματιστεί σε βιοϋμένια (Willcock et al., 1997).

2. Βιοϋμένια

Τα βακτήρια όταν βρίσκονται στην πλαγκτονική μορφή τους είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους. Ζουν και κινούνται ελεύθερα στο περιβάλλον και έχουν την δυνατότητα μέσω κάποιων μηχανισμών να προσκολλώνται πάνω σε βιοτικές και μη επιφάνειες σχηματίζοντας βιοϋμένια. Σύμφωνα με τους Charaklis και Marshall (1990), ένα βιοϋμένιο είναι μία οργανική πολυμερή μήτρα μικροβιακής προέλευσης στην οποία βρίσκονται ενσωματωμένα ακινητοποιημένα βακτηριακά κύτταρα. Ένας άλλος ορισμός του βακτηριακού βιοϋμενίου προέρχεται από τους Costerton et al. (1995), όπου όρισαν το βιοϋμένιο ως ένας κλειστός πληθυσμός βακτηρίων, μέσα σε μία μήτρα στην οποία τα βακτήρια έχουν προσκολληθεί μεταξύ τους ή/και σε μία επιφάνεια ή υπόστρωμα (Stoodley et al., 1997). Η μήτρα των βιοϋμενίων αποτελείται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και εξωκυτταρικό DNA (Chamberlain et al., 1997).

Τα βακτηριακά βιοϋμένια μπορούν να σχηματιστούν σε αβιοτικές επιφάνειες όπως στον εξοπλισμό παραγωγής μιας βιομηχανίας τροφίμων, σε επιφάνειες αποθήκευσης ή σε βιοτικές επιφάνειες όπως στα τρόφιμα. Ο πρώτος σχηματισμός βιοϋμενίου σε τρόφιμο που αναγνωρίστηκε προερχόταν από το βακτήριο *Salmonella Enterica* (Galie et al., 2018). Το βακτήριο αυτό έχει την ικανότητα να αναπτύσσει βιοϋμένιο σε επιφάνειες της βιομηχανίας τροφίμων από ανοξείδωτο χάλυβα, πλαστικό, γυαλί, κ.ά. Επίσης, μπορεί να επιζήσει πάνω στον ανοξείδωτο χάλυβα για ένα χρόνο, ιδιαίτερα εάν επικρατούν ξηρές περιβαλλοντικές συνθήκες, γεγονός που καθιστά την παραγωγή τροφίμων επικίνδυνη για τον άνθρωπο καθώς και επιζήμια οικονομικά για την βιομηχανία τροφίμων.

Το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes*, επίσης, μπορεί να σχηματίσει εύκολα βιοϋμένιο πάνω σε διάφορες επιφάνειες όπως στον ανοξείδωτο χάλυβα και σε προπυλένιο καθώς το βιοϋμένιο τους αποτελείται κυρίως από τειχοϊκά οξέα (Colagiorgi et al., 2016). Τα τειχοϊκά οξέα αυξάνουν την υδροφιλικότητα στην μεμβράνη του βακτηρίου, γεγονός που όπως θα αναφερθεί παρακάτω, καθιστά ισχυρότερη την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε μία επιφάνεια (Brauge et al., 2018). Η παρουσία των τειχοϊκών οξέων, καθώς και η ικανότητα του βακτηρίου να αναπτύσσεται σε χαμηλές θερμοκρασίες έχει ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της ανάπτυξης βιοϋμενίου της σε θερμοκρασίες ψύξης.

Το βακτήριο *P. fragi* σε αντίθεση με τους προηγούμενους δύο παθογόνους μικροοργανισμούς έχει την ικανότητα να αναπτύσσει βιοϋμένιο ακόμα πιο εύκολα σε επιφάνειες και κυρίως σε βιοτικές επιφάνειες όπως το κρέας. Αυτό συμβαίνει γιατί παράγει ποικίλες εξωτερικές πολυμερείς ουσίες (EPS) οι οποίες το βοηθούν να επιβιώσει σχεδόν σε οποιαδήποτε επιφάνεια. Οι εξωτερικές αυτές πολυμερείς ουσίες μπορούν να προκαλέσουν ποιοτική υποβάθμιση στο κρέας που περιλαμβάνει αλλοίωση της γεύσης, της οσμής, της δομής, καθώς επίσης και των συστατικών του (Hebraud et al., 1994). Ένα βιοϋμένιο μπορεί να αποτελείται από διαφορετικούς

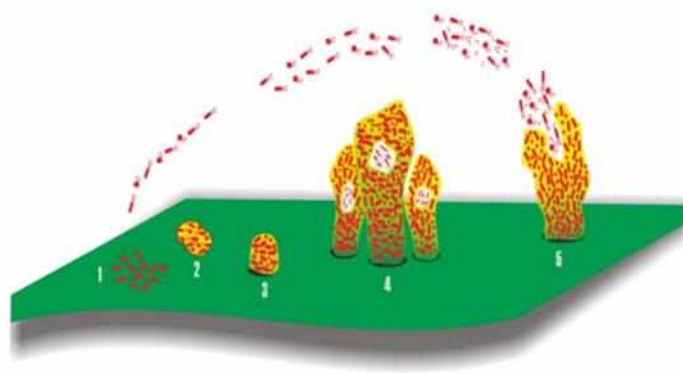
μικροοργανισμούς, όπως μύκητες, ζύμες, πρωτόζωα, κλπ., ή από συνδυασμό διαφορετικών βακτηρίων.

Τα βιοϋμένια συνήθως αναπτύσσονται από τους μικροοργανισμούς για την επιβίωσή τους όταν στο περιβάλλον που βρίσκονται υπάρχει κάποια φυσική ή μηχανική καταπόνηση όπως περιορισμένα θρεπτικά συστατικά, πολύ όξινο ή βασικό περιβάλλον κ.ά. Το βιοϋμένιο δημιουργεί συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών σε ένα μικροπεριβάλλον που τους δίδεται πιο εύκολη πρόσβαση σε θρεπτικά συστατικά, σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κυττάρων και σε καλύτερη περιβαλλοντική σταθερότητα.

2.1. Σχηματισμός Βιοϋμενίων

Το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται ένα βιοϋμένιο καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τη μορφή του. Όσο πιο ειδικές συνθήκες περιβάλλοντος έχουμε τόσο πιο πολύπλοκα και με περισσότερες δομές (στρώσεις) είναι τα βιοϋμένια. Υπάρχουν πολλοί παράγοντες που διαμορφώνουν τη μορφή της δομής ενός βιοϋμενίου. Οι σημαντικότεροι παράγοντες που καθορίζουν τη δομή του είναι τουλάχιστον τέσσερις. Αρχικά οι ιδιότητες της επιφάνειας ή του υποστρώματος που προσκολλούνται τα βακτηριακά κύτταρα επηρεάζουν περισσότερο τον σχηματισμό του βιοϋμενίου (π.χ. τραχύτητα, υδροφοβικότητα και ηλεκτροχημικές ιδιότητες). Επίσης, οι υδροδυναμικές αλληλεπιδράσεις (π.χ. οι δυνάμεις διάτμησης ή η μεταφορά μάζας), τα θρεπτικά συστατικά και οι αναστολείς, όπως οι αντιμικροβιακές ιδιότητες της επιφάνειας (Stoodley et al., 1997).

Ο μηχανισμός του σχηματισμού βιοϋμενίου, σε κάθε περίπτωση, είναι πολύπλοκος και αποτελείται από πέντε στάδια. Την αντιστρεπτή προσκόλληση, την μη-αντιστρεπτή προσκόλληση, το στάδιο της παραγωγής εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS), την ωρίμανση του βιοϋμενίου και τέλος την διασπορά/αποκόλληση των βακτηριακών κυττάρων. Παρακάτω απεικονίζονται τα πέντε στάδια του σχηματισμού των βιοϋμενίων (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Στάδια Σχηματισμού Βιοϋμενίου

2.1.1. Αντιστρεπτή Προσκόλληση Βακτηριακών Κυττάρων

Για να πραγματοποιηθεί η προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων πάνω σε μία επιφάνεια ή υπόστρωμα, εκτός του ότι θα πρέπει τα βακτήρια να μεταφερθούν προς αυτήν με κίνηση Brownian, καθίζηση ή μεταφορά, θα πρέπει επίσης, να παράγουν και ένα υπόστρωμα το οποίο θα βοηθάει στην καλύτερη προσκόλλησή τους.

Τα βακτήρια πριν προσδεθούν σε μία επιφάνεια σχηματίζουν το λεγόμενο ‘conditioning layer’ ή ‘conditioning film’, δηλαδή ένα υπόστρωμα εγκλιματισμού, το οποίο παράγεται από τα ίδια τα βακτήρια και είναι το πρώτο που θα προσκολλήσει πάνω στην επιφάνεια. Το υπόστρωμα εγκλιματισμού έχει ως σκοπό να τροποποιήσει την επιφάνεια, στην οποία θέλουν να προσδεθούν, αλλάζοντας τις φυσικοχημικές της ιδιότητες. Η σημαντικότερη τροποποίηση αφορά στη μείωση του ηλεκτρικού φορτίου και της ελεύθερης ενέργειας της επιφάνειας, η οποία μπορεί να εμποδίσει την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων. Επιπλέον, το υπόστρωμα αυτό περιέχει ίχνη οργανικών ουσιών, τα οποία αποτελούν πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών για τα βακτήρια, γεγονός που επηρεάζει το ρυθμό της βακτηριακής προσκόλλησης (Palmer et al., 1997).

Με τον σχηματισμό του υποστρώματος εγκλιματισμού τα βακτηριακά κύτταρα είναι έτοιμα να πραγματοποιήσουν την πρώτη τους προσκόλληση. Η αρχική προσκόλληση ονομάζεται αντιστρεπτή προσκόλληση, καθώς σε αυτήν τα βακτήρια εναποτίθενται στην επιφάνεια/υπόστρωμα, παραμένοντας όμως σε κίνηση Brownian δύο διαστάσεων, γεγονός που προκαλεί την ασθενή προσκόλλησή τους, άρα και την εύκολη απόσπασή τους από το υπόστρωμα.

Η προσκόλληση των κυττάρων επάνω στο υπόστρωμα επηρεάζεται και από το άθροισμα των απωθητικών ή ελκτικών δυνάμεων μεταξύ των κυτταρικών επιφανειών και της επιφάνειας/υποστρώματος. Στη περίπτωση, όπου οι ελκτικές δυνάμεις είναι ισχυρότερες από τις απωθητικές, μόνο τότε πραγματοποιείται η αντιστρεπτή προσκόλληση. Συνήθως, οι δυνάμεις αυτές είναι ασθενείς επιδράσεις μη-ειδικών φυσικών δυνάμεων όπως, οι δυνάμεις Van der Waals, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις ή οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Στα βακτήρια οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις είναι συνήθως απωθητικές καθώς τα περισσότερα βακτήρια είναι αρνητικά φορτισμένα (Muhammad et al., 2020).

Σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων πάνω σε μία επιφάνεια παίζει και η υδροφοβικότητα, τόσο των βακτηρίων όσο και της επιφάνειας πρόσδεσης. Η υδροφοβικότητα είναι μία μη-ομοιοπολική αλληλεπίδραση με χαμηλή διαβρεξιμότητα και χαμηλή επιφανειακή ενέργεια, η οποία μειώνει τις απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των δύο επιφανειών (Sulliva et al., 2017). Τα περισσότερα βακτήρια, με εξαίρεση το βακτήριο *L. monocytogenes*, προσκολλώνται σε υδρόφοβες επιφάνειες. Γενικά όσο πιο υδρόφοβη είναι η επιφάνεια προσκόλλησης, τόσο πιο

δυνατή είναι η προσκόλληση των κυττάρων πάνω σε αυτήν. Οι δομές, τα σύνθετα βιοχημικά και φυσικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων και των επιφανειών είναι ορισμένοι από τους παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα των βακτηρίων, για προσκόλληση σε υδρόφοβες ή υδρόφιλες επιφάνειες.

Ένας ακόμα παράγοντας που επηρεάζει την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων είναι το επιφανειακό ηλεκτρικό φορτίο της επιφάνειας- υποστρώματος. Το επιφανειακό ηλεκτρικό φορτίο των βακτηρίων διαφέρει ανάλογα με το είδος και μπορεί να επηρεαστεί από το μέσο ανάπτυξης που βρίσκεται, από το pH του περιβάλλοντος και το στάδιο ανάπτυξης των βακτηρίων (ηλικία). Τα περισσότερα όμως βακτηριακά κύτταρα, λόγω της παρουσίας, στην επιφάνειά τους, σημαντικών ποσοστών αμινο-ομάδων, καρβοξυλικών και φωσφορικών ομάδων, έχουν αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα να μπορούν να προσκολληθούν πιο εύκολα σε επιφάνειες που έχουν θετικό επιφανειακό φορτίο, καθώς οι αρνητικές φορτισμένες επιφάνειες θα παρουσιάσουν αντίσταση και θα απωθήσουν τα κύτταρα.

Υπάρχει ένας τελευταίος γνωστός παράγοντας που επηρεάζει την προσκόλληση, αλλά οι απόψεις σχετικά με την επίδρασή του είναι διαφορούμενες. Ο παράγοντας αυτός είναι η τραχύτητα των επιφανειών προσκόλλησης. Κάποιες μελέτες έχουν δείξει ότι λόγω των μικρότερων δυνάμεων διάτμησης και της μεγαλύτερης επιφάνειας λόγω τραχύτητας, τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να προσκολληθούν πιο εύκολα, ενώ άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι η τραχύτητα δεν είχε καμία επιρροή στην προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων (Muhammad et al., 2020). Τα αντίθετα αποτελέσματα μπορεί να οφείλονται στις υπόλοιπες φυσικοχημικές ιδιότητες των επιφανειών ή στο είδος των βακτηρίων που επηρεάζουν την αντιστρεπτή προσκόλληση των βακτηρίων σε μία επιφάνεια ή υπόστρωμα.

2.1.2. Μη-Αντιστρεπτή Προσκόλληση Βακτηριακών Κυττάρων

Όταν τα βακτηριακά κύτταρα πραγματοποιήσουν την αρχική προσκόλλησή τους στην επιφάνεια, αρχίζουν να μονιμοποιούν την σύνδεσή τους μέσω βακτηριακών προσκολλητικών οργανιδίων, όπως είναι οι κροσσοί και οι λιποπολυσακχαρίτες (LPS).

Η κινητικότητα των βακτηρίων προς την επιφάνεια/υπόστρωμα προκαλείται από ειδικά οργανίδια των βακτηρίων όπως είναι τα μαστίγια, οι κροσσοί και οι βλεφαρίδες. Τα οργανίδια αυτά είναι νηματοειδή, κολλοειδής προσαρτήματα των βακτηρίων και στον σχηματισμό του βιοϋμενίου χρησιμοποιούνται αρχικά για να φέρουν τα βακτηριακά κύτταρα όσο πιο κοντά στην επιφάνεια προσκόλλησης γίνεται και μετέπειτα για την μόνιμη βακτηριακή σύνδεση στην επιφάνεια. Επίσης, τα μαστίγια ενισχύουν την αντιστρεπτή προσκόλληση υπερνικώντας τις απωθητικές δυνάμεις που μπορούν να δημιουργηθούν μεταξύ κυττάρου και επιφάνειας και

μεσολαβούν στην μετάβαση των κυττάρων από ασθενή σε μόνιμη επιφανειακή προσκόλληση (Berne et al., 2015).

Εκτός των ειδικών προσκολλητικών οργανιδίων που φέρουν τα βακτήρια, η μη-αντιστρεπτή προσκόλληση ενισχύεται μέσω των αλληλεπιδράσεων μικρής εμβέλειας. Τέτοιες είναι οι επιδράσεις των ομοιοπολικών και ιοντικών δεσμών και οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου. Επίσης, ενισχύεται από την παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερικών ουσιών (EPS), καθώς και, από τη κυτταρική επικοινωνία ή όπως ονομάζεται "Αίσθηση Απαρτίας" (Quorum Sensing, QS).

2.1.3. Παραγωγή Εξωκυτταρικών Πολυμερικών Ουσιών (EPS)

Η παραγωγή των EPS πραγματοποιείται από τα πλέον μόνιμα βακτήρια και είναι απαραίτητα συστατικά για τη δημιουργία της εξωτερικής μήτρας των βιοϋμενίων. Τα EPS είναι μία υψηλά ενυδατωμένη μήτρα η οποία αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, DNA, φωσφολιπίδια και άλλες πολυμερικές ενώσεις, όπως φαινολικές ενώσεις (Zhang et al., 2003). Κυρίως εξαρτώνται από το είδος του βακτηρίου, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και ρυθμίζονται από την αίσθηση απαρτίας (QS) των μόνιμων πλέον βακτηριακών κυττάρων. Οι πολυσακχαρίτες, το μεγαλύτερο σε ποσοστό συστατικό των EPS διαφέρουν μεταξύ των θετικών και αρνητικών κατά gram βακτηρίων. Η διαφορά τους οφείλεται κυρίως στο ιοντικό φορτίο που έχουν οι πολυσακχαρίτες. Στα αρνητικά κατά gram βακτήρια είναι συνήθως ουδέτεροι ή πολυανιονικοί, και διευκολύνουν τη σύνδεση δισθενών κατιόντων, όπως το μαγνήσιο, όπου είναι σημαντικά για την ενδυνάμωση του ήδη σχηματισμένου βιοϋμενίου. Ενώ τα θετικά κατά gram βακτήρια παράγουν κυρίως πολυσακχαρίτες που είναι κατιόντα, με αποτέλεσμα να δυσκολεύουν την σύνδεση δισθενών κατιόντων.

Τα EPS καθορίζουν τις φυσικοχημικές και βιολογικές ιδιότητες των βιοϋλικών, παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση κυττάρων, στην συσσώρευση των βακτηριακών κυττάρων, στην κατακράτηση νερού μέσα στη μήτρα, στη προσρόφηση εξωγενών οργανικών ουσιών, καθώς και στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πολυσακχαριτών με τα ένζυμα (Kievit et al., 2000). Επίσης, μεσολαβούν στην προσκόλληση των βιοϋμενίων στις επιφάνειες προσκόλλησης μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων και γεφύρωσης ιόντων. Επιπλέον, τα αρνητικά φορτισμένα EPS έχουν την ικανότητα να προστατεύουν τα βακτηριακά κύτταρα έναντι των κατιονικών αντιβιοτικών, μειώνοντας την αποτελεσματικότητά τους (Anderl et al., 2000). Τέλος, το DNA στη μήτρα του EPS λειτουργεί ως διακυτταρικός σύνδεσμος.

2.1.4. Αίσθηση Απαρτίας (QS)

Τα βακτηριακά κύτταρα διαθέτουν ένα μηχανισμό επικοινωνίας μέσω σημάτων-μορίων, είτε μεταξύ κυττάρων του ίδιου είδους, είτε μεταξύ κυττάρων διαφορετικών ειδών, που χαρακτηρίζεται με τον όρο ‘‘Αίσθηση Απαρτίας’’ (Quorum Sensing, QS). Μέσω αυτού του μηχανισμού, τα βακτηριακά κύτταρα έχουν την δυνατότητα να συντονίζουν την συμπεριφορά τους με άλλα κύτταρα στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα το σχηματισμό βιοϋμενίου. Τα σήματα αυτά εμφανίζονται σε διάφορα στάδια ανάπτυξης των βακτηρίων ή όταν παρατηρούνται αλλαγές στο περιβάλλον που βρίσκονται ή μπορεί να σχετίζονται με την κυτταρική πυκνότητα (σήματα αυτεπαγωγής, AIs) σε ένα περιβάλλον.

Ανάλογα με το βακτήριο τα χημικά σήματα που συντίθενται και απελευθερώνονται είναι διαφορετικά. Τα αρνητικά κατά gram βακτήρια συνθέτουν ακυλιωμένες λακτόνες της ομοσερίνης (acyl homoserine lactones, AHLs), ενώ τα θετικά κατά gram συνθέτουν ολιγοπεπτίδια. Για να ενεργοποιηθούν τα γονίδια που ελέγχουν τη σύνθεση των σημάτων QS θα πρέπει πρώτα τα βακτηριακά κύτταρα να έχουν ήδη αρχίσει να σχηματίζουν βιοϋμένιο, όπου τότε οι δεσμευμένες πρωτεΐνες των EPS επάγουν την ενεργοποίηση των μορίων σημάτων (Whitehead et al., 2001).

2.1.5. Ωρίμανση Βιοϋμενίου

Οι αυτεπαγωγείς (AIs) που έχουν παραχθεί μέσω του μηχανισμού QS έχουν ως αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων και ταυτόχρονα τον σχηματισμό μικρών αποικιών μέσα στη μήτρα του βιοϋμενίου, με αποτέλεσμα την ωρίμανσή του (Toyofuku et al., 2016). Με τη δημιουργία των αποικιών και την συσσώρευση περισσότερων EPS, οι αυτεπαγωγείς ρυθμίζουν την έκφραση των γονιδίων ως αποτέλεσμα της μεταβολής της κυτταρικής πυκνότητας και συμβάλλουν στην διατήρηση των υπαρχόντων βακτηριακών βιοϋμενίων (Karimi et al., 2015). Η ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων γίνεται ώστε τα κύτταρα να μπορούν να συμβιώσουν μεταξύ τους και επιπλέον τα προϊόντα αυτών των γονιδιακών αλλαγών να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή περισσότερων EPS, που λειτουργούν ως βιολογική ‘‘κόλλα’’ μεταξύ των ενσωματωμένων βακτηριακών κυττάρων.

Μετά το σχηματισμό της μήτρας των βιοϋμενίων αρχίζουν να αναπτύσσονται κανάλια γεμάτα νερό, τα οποία μεταφέρουν θρεπτικά συστατικά στις σχηματισμένες αποικίες και απομακρύνουν τα ανεπιθύμητα μεταβολικά προϊόντα (Garnett and Matthews, 2012). Η κινητικότητα των κυττάρων κοντά και μέσα στις αποικίες του ώριμου βιοϋμενίου μειώνεται, λόγω του ότι αναστέλλεται η παραγωγή βακτηριακών επιφανειακών δομών και η δομή των αποικιών μοιάζει είναι μία πολυκύτταρη δομή που μοιάζει σαν ένα μανιτάρι.

2.1.6. Διασπορά/Αποκόλληση

Το τελευταίο στάδιο ανάπτυξης ενός βιοϋμενίου περιλαμβάνει τη κατάρρευσή του ή αλλιώς τη διασπορά των επιφανειακών προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων. Η διασπορά είναι ένα φυσικό φαινόμενο, όπου τα βακτηριακά κύτταρα, είτε ως πλαγκτονική μορφή είτε ως μικροαποικίες, αποκολλούνται από το περιβάλλον του βιοϋμενίου με αποτέλεσμα να σχηματίσουν σε νέες θέσεις αποικίες και αυτόματα καινούργια βιοϋμένια. Το στάδιο της διασποράς είναι μία πολύπλοκη διαδικασία, που εξαρτάται από τα περιβάλλοντα σήματα, τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος και τους τελεστές, και αποτελείται από τρία στάδια. Την αποκόλληση των κυττάρων από το βιοϋμένιο, την μετακίνηση των κυττάρων σε νέες θέσεις της επιφάνειας και την προσκόλληση των κυττάρων στην νέα επιφάνεια/υπόστρωμα.

Η έναρξη της διασποράς/αποκόλλησης των βακτηριακών κυττάρων συνήθως γίνεται από τα ίδια τα επικολλημένα κύτταρα ως αντίδραση στις αλλαγές του περιβάλλοντός τους, όπως περιορισμένη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και αντιμικροβιακή καταπόνηση, που προκαλείται από εξωτερικές δυνάμεις, καθώς επίσης και, ως αντίδραση στην αύξηση του κυτταρικού πληθυσμού μέσα στο βιοϋμένιο. Πραγματοποιείται από ένζυμα, που παράγονται από τα ίδια τα κύτταρα, με σκοπό την αποσύνθεση των πολυσακχαριτών που συγκρατούν το βιοϋμένιο (Sutherland et al., 1999). Υπάρχουν, όμως, και άλλοι παράγοντες που ενεργοποιούν την διασπορά ενός βιοϋμενίου, οι περισσότεροι εκ των οποίων είναι φυσικοχημικοί όπως η θερμοκρασία, το pH, η έλλειψη οξυγόνου και θρεπτικών στοιχείων.

Ταυτόχρονα, με την κατάρρευση του βιοϋμενίου, τα μαστίγια ρυθμίζονται, από τα οπερόνια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες τους, ώστε να οδηγήσουν τα πλέον ελεύθερα τμήματα μικροαποικιών ή τα πλέον απελευθερωμένα πλαγκτονικά βακτηριακά κύτταρα στις νέες θέσεις και να αρχίσει έτσι ένας ακόμα κύκλος ζωής ενός βιοϋμενίου.

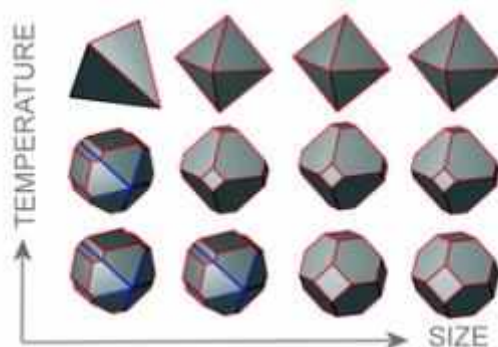
Το βακτηριακό βιοϋμένιο, λόγω της πολύπλοκης δομής τους και της μήτρας από EPS, που προστατεύει τα προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα, δεν εξαλείφεται αποτελεσματικά από τις συνηθισμένες μεθόδους απολύμανσης και καθαρισμού των επιφανειών μιας βιομηχανίας τροφίμων. Συνήθως, τα βιοϋμένια αντιμετωπίζονται με τη χρήση αντιβιοτικών, όμως η μακροχρόνια χρήση θα μπορούσε να δημιουργήσει επιπλέον προβλήματα με τη δημιουργία ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών. Επιπλέον, η χρήση των αντιβιοτικών δεν επιτρέπεται στις βιομηχανίες τροφίμων (Mulya et al., 2021).

Επομένως είναι απαραίτητη η δημιουργία εναλλακτικών μεθόδων ελέγχου του σχηματισμού βιοϋμενίων. Προς τη κατεύθυνση αυτή, μία υποσχόμενη εναλλακτική προσέγγιση είναι η χρήση της νανοτεχνολογίας για την κατασκευή νανოსύνθετων υλικών και κυρίως η χρήση μεταλλικών νανοσωματιδίων, για τη μείωση της βακτηριακής προσκόλλησης.

3. Νανοτεχνολογία για τον έλεγχο των βιοϋμενίων

Η νανοτεχνολογία αποτελεί μία επιστήμη, στην οποία η μηχανική συνδυάζεται με τη χημεία, τη φυσική και τη βιολογία (Jalali et al., 2011). Σήμερα, ο όρος νανοτεχνολογία χρησιμοποιείται για την περιγραφή της κατασκευής, μελέτης και αξιοποίησης υλικών με δομικά χαρακτηριστικά μεταξύ ατόμων και “bulk” υλικών, των οποίων τουλάχιστον η μία διάσταση βρίσκεται στη νανοδιάσταση (1 nm-100 nm). Τα υλικά αυτά εμφανίζουν ιδιότητες, που είναι σημαντικά διαφορετικές από αυτές των ατόμων και των “bulk” υλικών και η μελέτη τους συμβάλλει στην ανάπτυξη νέων επιστημονικών πεδίων και εφαρμογών (Freestone et al., 2007). Η νανοτεχνολογία καλύπτει ένα μεγάλο εύρος επιστημονικών πεδίων, όπως η ιατρική, η ηλεκτρονική, η περιβαλλοντική αποκατάσταση, η τεχνολογία τροφίμων, κ.ά.

Τα νανοϋλικά ταξινομούνται με βάση τις διαστάσεις τους στο χώρο. Υπάρχουν νανοϋλικά δύο διαστάσεων (2D) με χαρακτηριστικό παράδειγμα τα λεπτά υμένα με πάχος μέχρι 1000 nm, τα νανοϋλικά της μίας διάστασης, όπως είναι οι νανοσωλήνες και τα νανოსωματίδια (Helfin et al., 2004). Τα τελευταία χρησιμοποιούνται ευρύτατα στο εμπόριο και έχουν ποικίλες ιδιότητες σχεδόν σε όλους τους επιστημονικούς τομείς. Τα νανοςωματίδια μπορούν να παραχθούν είτε φυσικά είτε από ανθρώπινης δραστηριότητας (Govindaraj et al., 2007) και το σχήμα τους ποικίλει μεταξύ συμμετρικών μορφολογιών όπως η σφαίρα, ο κύβος, τα πολύεδρα και μεταξύ ανισότροπων μορφολογιών όπως ραβδιά, διακλαδισμένα ή ακόμα πιο σύνθετες δομές (Cheon et al., 2003). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφή τους είναι κυρίως θερμοδυναμικοί όπως η θερμοκρασία με αποτέλεσμα να αυξάνεται ή όχι το μέγεθός τους, καθώς και η συμμετρία τους. Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται πώς η θερμοκρασία σύνθεσης των νανοςωματιδίων και το τελικό μέγεθος μπορούν να επηρεάσουν τα δομικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων νανοςωματιδίων.



Εικόνα 2 Εξάρτηση της δομής των νανοςωματιδίων από τη θερμοκρασία ανάπτυξης και το τελικό μέγεθος

Από όλα τα νανοσωματίδια, αυτά που προέρχονται από ευγενή μέταλλα έχουν κερδίσει την περισσότερη προσοχή εξαιτίας των πιθανών εφαρμογών τους σε διάφορους τομείς όπως, στη βιοϊατρική, ως ηλεκτροχημικοί αισθητήρες ή ως αντιβακτηριακοί παράγοντες (Sangili et al., 2019). Τα ευγενή μέταλλα είναι ένας κοινός φωτοκαταλύτης και συν-καταλύτης λόγω των χαμηλών επιπέδων Fermi, γεγονός που τα καθιστά ικανά να χρησιμοποιηθούν ως αντιβακτηριακοί παράγοντες υπό ακτινοβολία υπεριώδους φωτός (Xing et al., 2018). Επίσης, έχουν εξαιρετική χημική σταθερότητα, υψηλή αγωγιμότητα και μοναδικό εντοπισμένο επιφανειακό συντονισμό πλασμονίου (Surface Plasmon Resonance, SPR). Από τα πλέον χρησιμοποιούμενα ευγενή μέταλλα ως νανοσωματίδια είναι ο χρυσός, το παλλάδιο και κυρίως ο άργυρος. Επίσης, από τα μέταλλα που δεν ανήκουν στην κατηγορία των ευγενών μετάλλων το τιτάνιο και ο χαλκός χρησιμοποιούνται ευρέως στην νανοτεχνολογία.

Η έρευνα των νανοσωματιδίων, τα τελευταία χρόνια, έχει επικεντρωθεί κυρίως σε βιοϊατρικές εφαρμογές ως συστήματα χορήγησης φαρμάκων (drug delivery systems) καθώς επίσης και στον έλεγχο σχηματισμού των βακτηριακών βιοϋμενίων πάνω κάθε είδους επιφάνεια και κυρίως από μεταλλικές επιφάνειες που χρησιμοποιούνται στην ιατρική και στις βιομηχανίες τροφίμων και φαρμάκων.

Ο εξοπλισμός των βιομηχανιών τροφίμων αποτελείται κυρίως από ανοξείδωτο χάλυβα, ο οποίος αν δεν καθαριστεί και εξυγιανθεί με σωστές μεθόδους, τα βακτήρια μπορούν να σχηματίσουν βιοϋμένια, με αποτέλεσμα την πιθανότητα διάβρωσης του εξοπλισμού αλλά και επιμόλυνση του τροφίμου και συνεπώς οικονομική ζημιά στην βιομηχανία (Lin et al., 2020). Λόγω αυτού του προβλήματος, η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί να αντικαταστήσει τον χάλυβα με άλλα μέταλλα ή σύνθετες μεταλλικές επιφάνειες, στις οποίες έχουν εναποτεθεί μεταλλικά νανοσωματίδια, τα οποία προσφέρουν αντιβακτηριακή δράση. Συνήθως, τα μέταλλα αυτά είναι ο χαλκός (Cu), το τιτάνιο (Ti) και ο άργυρος (Ag). Σε μερικές βιομηχανίες τροφίμων, σε χώρες όπως στην Αμερική, έχουν ξεκινήσει να χρησιμοποιούν επιφάνειες χαλκού, καθώς πολλές έρευνες έχουν αποδείξει ότι οι επιφάνειες αυτές μειώνουν το βακτηριακό φορτίο που προσκολλάται στην επιφάνεια κατά 90%. Επίσης, έχουν αποδείξει ότι ο χαλκός τόσο στη μεταλλική όσο και στην ιοντική του μορφή δεν είναι γενοτοξικός για τα ανθρώπινα κύτταρα (Santo et al., 2012). Όμως, η χρήση του χαλκού απαγορεύεται σε ορισμένες χώρες, όπως η Βραζιλία, λόγω της πιθανής τοξικότητας μέσω της επαφής του με τα τρόφιμα, παρά το γεγονός ότι η έκθεση του ανθρώπου στο χαλκό θεωρείται ασφαλής (Pontin et al., 2020).

3.1. Τιτάνιο

Ένα μέταλλο που θεωρείται ότι δεν προκαλεί τοξικότητα στο τρόφιμο όταν έρθει σε επαφή με αυτό είναι το τιτάνιο (Ti) σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Agency, EFSA) και την Αμερικάνικη Υπηρεσία για τα Τρόφιμα και τα Φάρμακα (Food and Drug Administration, FDA). Έχει οριστεί από τον FDA ότι πρόληψη 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ νανοσωματιδίων διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2) θεωρείται ασφαλής για τον άνθρωπο (Mahboob et al., 2020).

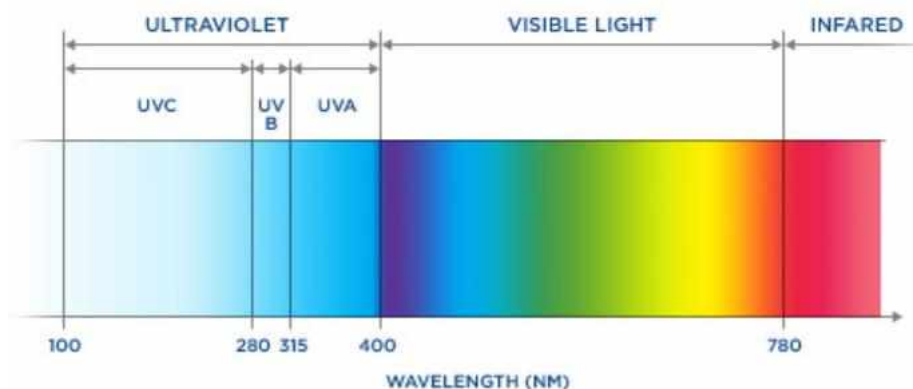
Γενικά το τιτάνιο είναι το ένατο πιο άφθονο στοιχείο στη Γη, έχει χρώμα αργυρόλευκο, είναι όλκιμο μέταλλο μικρής πυκνότητας, το οποίο είναι τόσο ισχυρό όσο ο ανοξειδωτος χάλυβας αλλά κατά 45% ελαφρύτερο. Επίσης, είναι ανθεκτικό στη διάβρωση εξαιτίας της παρουσίας λεπτής επίστρωσης οξειδίου στην επιφάνεια του μετάλλου. Αυτές οι ιδιότητες του επιτρέπουν να χρησιμοποιείται στη βιοϊατρική καθώς και στην βιομηχανία τροφίμων ως συντηρητικό έως το έτος 2021.

Η μεγαλύτερη χρήση του τιτανίου είναι στη μορφή του διοξειδίου του τιτανίου (TiO_2), το οποίο είναι μία από τις σημαντικότερες ενώσεις του. Το διοξείδιο του τιτανίου, ή αλλιώς η τιτανία, περιέχει κενές θέσεις οξυγόνου στο κρυσταλλικό του πλέγμα και γι' αυτό θεωρείται ότι είναι ένας ημιαγωγός τύπου N. Επίσης, πρόκειται για μία λαμπρή λευκή ουσία που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση νανοςύνθετων υλικών για πιθανές εφαρμογές σε αισθητήρες, στη φωτοκατάλυση και στην αντιβακτηριδιακή θεραπεία. Η χρήση αυτού του μετάλλου στις παραπάνω εφαρμογές οφείλεται στην ευρεία διαθεσιμότητά του, το χαμηλό κόστος και στις καλύτερες ιδιότητες από τα υπόλοιπα μεταλλικά οξείδια. Έχει καλή χημική σταθερότητα, υψηλή διηλεκτρική σταθερά, αρνητικά φορτισμένο με ισοηλεκτρικό φορτίο 4,7 με 5,2, υψηλό δείκτη διάθλασης, χαμηλό δυναμικό οξειδώσεως και είναι ένας υποσχόμενος φωτοκαταλύτης. Τέλος, το TiO_2 μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως αντιμικροβιακός παράγοντας υπό ακτινοβολία υπεριώδους φωτός ως αποτέλεσμα σχηματισμού αντιδραστικών ειδών οξυγόνου στις επιφάνειές του. Το διοξείδιο του τιτανίου, υπό τη μορφή λεπτού υμενίου, έχει χρησιμοποιηθεί σαν αντιβακτηριακός παράγοντας σε ποικίλες εφαρμογές όπως σε καθετήρες, παράθυρα, ως μεμβράνες που φιλτράρουν το νερό (Falaras et al., 2011 and 2015) Η ικανότητά του αυτή μπορεί να ενισχυθεί με την εναπόθεση νανοσωματιδίων αργύρου (AgNPs) στην επιφάνεια του διοξειδίου του τιτανίου (Prakash et al., 2018).

3.2. Καταπολέμηση Βιοϋμενίων με UV ακτινοβολία

Τα τελευταία χρόνια, οι επιστήμονες προσπαθούν να βρουν εναλλακτικές και ηπιότερες επεξεργασίες απολύμανσης συγκριτικά με την απολύμανση με την εφαρμογή θερμότητας, και για το λόγο αυτό έχουν επικεντρωθεί σε φυσικές μη-θερμικές επεμβάσεις όπως η χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η UV ακτινοβολία χρησιμοποιείται εκτενώς πλέον και στα μικροβιολογικά εργαστήρια αλλά και στις βιομηχανίες τροφίμων, λόγω των περιορισμένων μεταβολών στα χαρακτηριστικά των τροφίμων κατά την απολύμανσή τους με ακτινοβολία UV, καθώς επίσης και για την αντιβακτηριακή της δράση.

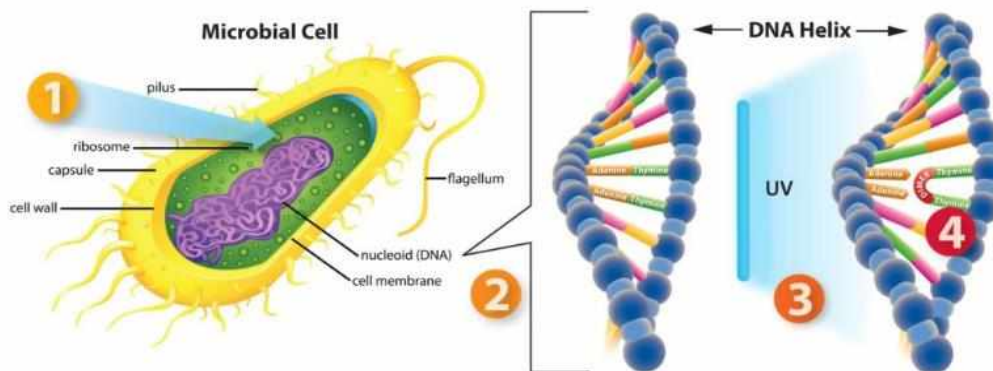
Η υπεριώδης ακτινοβολία χωρίζεται σε τρεις περιοχές ανάλογα με το εύρος του μήκους κύματος (Εικόνα 3). Η πρώτη κατηγορία είναι η UVA, με μήκος κύματος από 320 nm έως 400 nm, η οποία εφαρμόζεται για μεγάλη χρονική διάρκεια για την αποτελεσματική απολύμανση των βιοϋμενίων. Η UVA ακτινοβολία δημιουργεί δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS), οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή των πρωτεϊνών, των λιπιδίων, του DNA και των ενζύμων της κυτταρικής μεμβράνης και οδηγούν το κύτταρο σε θάνατο, αλλά η εφαρμογή της δεν είναι τόσο αποτελεσματική (Kebbi et al., 2020). Η UVB ακτινοβολία, είναι η δεύτερη κατηγορία με μήκους κύματος από 280 nm έως 320 nm, η οποία στοχεύει στην πρόκληση ζημιάς στις πρωτεΐνες και στα ένζυμα που απορροφούν κοντά στο ίδιο μήκος κύματος με τις πρωτεΐνες (280 nm) (Li et al., 2011).



Εικόνα 3: 3 κατηγορίες της UV ακτινοβολίας στο ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.

Η τρίτη κατηγορία και η πιο αποτελεσματική είναι η UVC ακτινοβολία με μήκος κύματος από 200 nm έως 280 nm. Η ακτινοβολία αυτή παρουσιάζει αντιβακτηριακή δράση σε μεγάλο εύρος βακτηρίων. Εφαρμόζεται συνήθως για την απολύμανση τροφίμων όπως κοτόπουλο, νωπό σολομό αλλά και για την απολύμανση του νερού και των εξωτερικών επιφανειών φρούτων και λαχανικών. Η αντιβακτηριακή της δράση οφείλεται στην απευθείας βλάβη που προκαλεί στο DNA και συγκεκριμένα το μήκος κύματος 265 nm. Το μήκος κύματος αυτό μπορεί να διαπεράσει το κυτταρικό τοίχωμα προκαλώντας βλάβη στη δομή των νουκλεϊκών οξέων, δεδομένου ότι οι μονοσακχαρίτες και οι βάσεις τους παρουσιάζουν μέγιστη κορυφή απορρόφησης στα

200 και 265 nm, αντίστοιχα (Εικόνα 4). Η βλάβη στα νουκλεϊκά οξέα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό διμερών πυριμιδινών (θυμίνης) στο DNA με αποτέλεσμα την πρόκληση γενετικής βλάβης στα βακτηριακά κύτταρα, τη διακοπή της αναπαραγωγής του DNA, με συνέπεια στην αδρανοποίηση των κυττάρων.



Εικόνα 4: Αντιβακτηριακή ικανότητα UVC ακτινοβολίας 1)Εισχώρηση μήκους κύματος στο κύτταρο 2) Βλάβη πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων 3)Δημιουργία διμερών θυμίνης 4) αδρανοποίηση των βακτηριακών κυττάρων.

Η αδρανοποίηση των βακτηριακών κυττάρων από την ακτινοβολία UV εξαρτάται σημαντικά από την ποσότητα της απορροφούμενης ακτινοβολίας. Η ικανότητα αυτή της UV ακτινοβολίας επηρεάζεται από την δόση UV, η οποία αναφέρεται ως ροή και εκφράζεται από την παρακάτω εξίσωση.

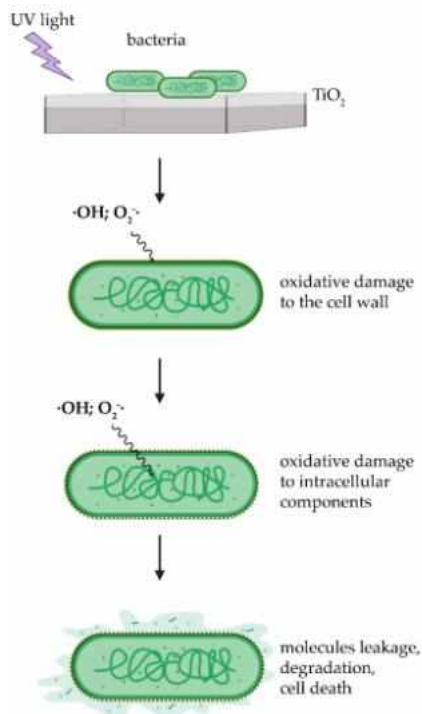
$$UV_{dose} = I \times T_{Irr}$$

Όπου, I η ένταση του υπεριώδους φωτός και T_{Irr} ο χρόνος έκθεσης στην ακτινοβολία. Οι μονάδες μέτρησης της UV_{dose} είναι $J \cdot cm^{-2} = W \cdot s \cdot cm^{-2}$ (Cadet et al., 2018).

Η UVA και UVB ακτινοβολία είναι λιγότερο αποτελεσματικές έναντι των βακτηρίων σε σύγκριση με την ακτινοβολία UVC, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη βελτίωση της ποιότητας των τροφίμων όπως τα φρούτα και τα λαχανικά. Οι καλλιέργειες έχουν αρχίσει να εγκλιματίζονται στην συνεχή έκθεση UV ακτινοβολίας, με αποτέλεσμα η παραγωγή των φλαβονοειδών και των σχετικών φαινολικών ενώσεων να αυξάνεται και να λειτουργούν ως συστατικά θωράκισης από την ακτινοβολία UV και ως αντιοξειδωτικά για τον άνθρωπο. Η αύξηση αυτή οφείλεται στην UVB και UVA ακτινοβολία. Επίσης, η ακτινοβολία UVB δρα στις καλλιέργειες ως απωθητικός παράγοντας έναντι των παρασίτων και των μικροοργανισμών, το οποίο μειώνει την χρήση των φυτοφαρμάκων στις καλλιέργειες (Neugart and Schreiner, 2018). Επίσης, η UVA σε σχέση με την UVC έχει

μεγαλύτερη διαπερατότητα και για το λόγο αυτό είναι καταλληλότερη για την επεξεργασία αδιαφανών υγρών και βιοϋλικών με υψηλό συντελεστή απορροφητικότητας.

Η UV ακτινοβολία έχει ισοδύναμο αποτέλεσμα με την θερμική παστερίωση για την θανάτωση των βακτηρίων και για το λόγο αυτό μπορεί να αποτελέσει μία αποτελεσματική φυσική μη-θερμική εναλλακτική επεξεργασία ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπληρωματική επεξεργασία απολύμανσης έναντι των σχηματισμένων βιοϋμενίων (Kebbi et al., 2020). Η χρήση της UV ακτινοβολίας επάνω σε επιφάνειες που περιέχουν τιτάνιο συμβάλλουν στο σχηματισμό περισσότερων δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS) με αποτέλεσμα την αύξηση του αντιβακτηριακού δυναμικού του τιτανίου μέσω φωτοκατάλυσης (Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Μηχανισμός φωτοκαταλυτικής ικανότητας Τιτανίου με UV ακτινοβολία έναντι βακτηρίων

3.3. Εναπόθεση νανοσωματιδίων Αργύρου (AgNPs)

Τα νανοσωματίδια αργύρου είναι από τα πλέον εμπορικά νανοσωματίδια, με ευρύ φάσμα εφαρμογών, κυρίως λόγω των αντιμικροβιακών ιδιοτήτων τους. Τα AgNPs έχουν μοναδικές οπτικές, ηλεκτρικές και θερμικές ιδιότητες και ενσωματώνονται σε προϊόντα που περιλαμβάνουν από φωτοβολταϊκά έως βιολογικούς και χημικούς αισθητήρες. Τα τελευταία χρόνια, μια από τις συχνότερες εφαρμογές τους είναι η χρήση τους για αντιμικροβιακή επικάλυψη στις βιοϊατρικές συσκευές. Για το λόγο αυτό, η πιθανή τους χρήση σε επιφάνειες εξοπλισμού βιομηχανιών τροφίμων για την μείωση της μικροβιακής δραστηριότητας είναι μία λύση που θα πρέπει να μελετηθεί (Li et al., 2018).

Τα AgNPs έχουν ένα ευρύ φάσμα αντιμικροβιακής δράσης, τόσο έναντι θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων, όσο και έναντι μυκήτων και ιών. Είναι γνωστό ότι τα AgNPs είναι τοξικά σε μία μεγάλη ποικιλία βακτηρίων, όπως των *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella Enterica*, *Listeria monocytogenes* κ.α. (Almeida et al., 2015).

Έχει προαναφερθεί ότι η εμφύτευση ιόντων αργύρου στα μέταλλα που βασίζονται στο τιτάνιο προσδίδουν πολύ καλές αντιβακτηριακές ιδιότητες. Όταν τα βακτήρια προσκολληθούν σε επιφάνειες τιτανίου που έχουν ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου, τα AgNPs είναι ικανά να θανατώσουν τα βακτήρια με δύο υποθετικούς μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την απελευθέρωση ιόντων αργύρου από τα AgNPs, τα οποία προσκολλώνται στο κυτταρικό τοίχωμα και στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των βακτηρίων μέσω ηλεκτροστατικής δράσης. Η απελευθέρωση των ιόντων αργύρου γίνεται μέσω της διαδικασίας αερόβιας οξείδωσης και αυτά τα παραγόμενα ιόντα έχουν την ικανότητα να αλληλοεπιδρούν κυρίως με ομάδεςθειόλης διαφόρων πρωτεϊνών και ενζύμων οι οποίες βρίσκονται στην αναπνευστική αλυσίδα των βακτηρίων και διαταράσσουν το κυτταρικό τους τοίχωμα. Επίσης, διευκολύνουν τη δημιουργία δραστικών μορφών οξυγόνου (ROS), οι οποίες αδρανοποιούν την αντιγραφή του DNA και την παραγωγή ATP με αποτέλεσμα τον θάνατο των βακτηρίων (Liao et al., 2019).

Ο δεύτερος μηχανισμός είναι η άμεση αλληλεπίδραση των AgNPs με τα βακτήρια. Δεδομένου ότι η αναλογία επιφάνειας προς τον όγκο τους είναι μεγάλη, μπορούν να διεισδύσουν στο κύτταρο ή να προσκολληθούν στο κυτταρικό τοίχωμα, προκαλώντας βλάβη στο DNA και δημιουργώντας πόρους στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα τη διαρροή των συστατικών του κυττάρου και το θάνατό του.

Η αντιβακτηριακή δράση των AgNPs δεν παρατηρείται σε αναερόβιες συνθήκες, ακόμα και εάν υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις νανοσωματιδίων, διότι η απουσία οξυγόνου αποτρέπει την απελευθέρωση των ιόντων αργύρου (Huang et al., 2020). Επίσης, η αντιβακτηριακή δράση των νανοσωματιδίων επηρεάζεται από το σχήμα και το μέγεθός τους. Καλύτερη αντιβακτηριακή δραστηριότητα παρουσιάζουν τα νανοσωματίδια που έχουν σφαιρική ή τριγωνική δομή (Urnukhsaikhana et al., 2021).

Επιπλέον, τα AgNPs που το μέγεθος τους είναι μεγαλύτερο από 10 nm χρησιμοποιούν τα απελευθερωμένα ιόντα αργύρου για την καταπολέμηση των βακτηρίων, ενώ αυτά που είναι μικρότερα από 10 nm καταπολεμούν μόνο τους τα βακτήρια (Sobye et al., 2015).

Ο σκοπός αυτής της εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση μιας σύνθετης μεταλλικής επιφάνειας από ανοξείδωτο χάλυβα, η οποία είχε επικαλυφθεί με λεπτό υμένιο διοξειδίου του τιτανίου (TiO₂), στην επιφάνεια του οποίου είχαν ενσωματωθεί νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs), έναντι του σχηματισμού βακτηριακών βιοϋμενίων. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου μελετήθηκε με τη χρήση τριών διαφορετικών βακτηρίων, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas fragi* και *Salmonella enteritidis*, τόσο ως μονοκαλλιέργειες όσο και ως συγκαλλιέργειες του αλλοιωγόνου βακτηρίου με τους δύο παθογόνους μικροοργανισμούς ξεχωριστά.

4. Υλικά και Μέθοδοι

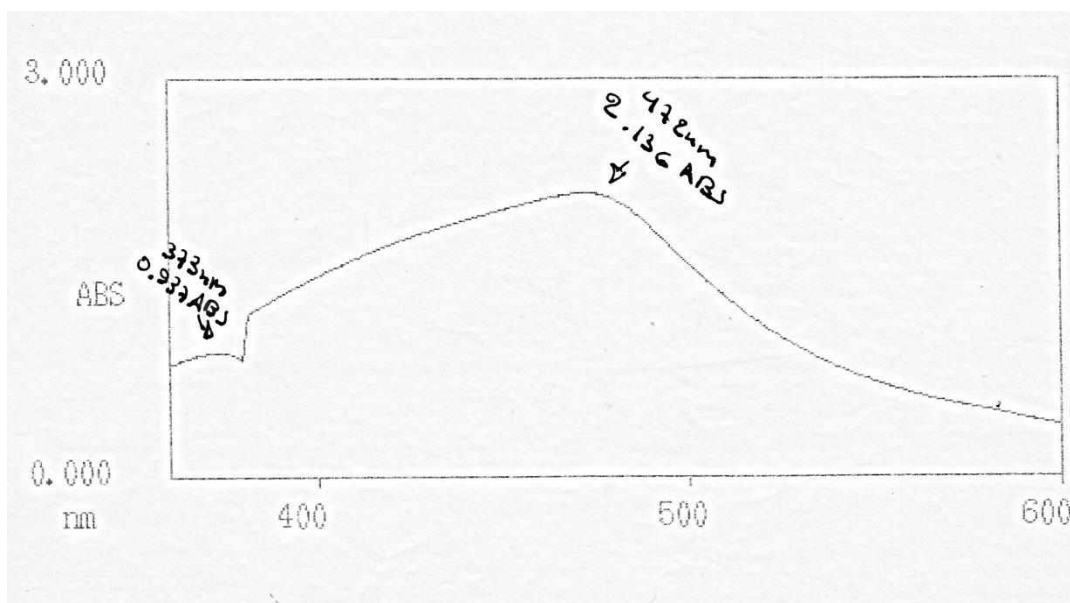
4.1. Παρασκευή Πάστας Διοξειδίου του Τιτανίου (TiO₂)

Για την προσθήκη του λεπτού υμενίου από διοξείδιο του τιτανίου στην επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των Chorianoopoulos et al. (2011) με ορισμένες παραλλαγές. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή της πάστας του διοξειδίου του τιτανίου ήταν σκόνη TiO₂ (Degussa P25, Sigma-Aldrich, China), Tween-80 (Merck, France), Acetyl-Acetone (Sigma-Aldrich, Germany) και απεσταγμένο νερό.

Πριν την παρασκευή της πάστας, 5 gr σκόνης TiO₂ τοποθετήθηκαν για 12 h σε σταθερή θερμοκρασία 200 °C. Στη συνέχεια το κονίαμα TiO₂ τοποθετήθηκε σε πορσελάνη στην οποία προστέθηκαν 10 mL ακετυλοακετόνης και σταδιακά 5 mL απεσταγμένου νερού υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία 45 °C για 45 λεπτά. Έπειτα από μία ώρα ανάδευση χωρίς θέρμανση, προστέθηκαν 4 σταγόνες από το Tween-80 και ακολούθησε ανάδευση για άλλες 3 h. Πριν χρησιμοποιηθεί η πάστα του τιτανίου τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 1 h και έμεινε στον ξηραντήρα για 1 ημέρα σε θερμοκρασία 45 °C.

4.2. Παρασκευή Νανοδοματιδίων του Αργύρου (AgNPs)

Για την παρασκευή των νανοδοματιδίων του αργύρου 0,5 mL tri-sodium citrate (30mM) (PanReac AppliChem, Germany) αναμείχθηκαν με 2 mL νιτρικό άργυρο (AgNO₃, 5mM) (Honeywell- Fluka, Germany) μέσα σε 45 mL δισαπεσταγμένο νερό κάτω από συνεχή ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία 30 °C. Στη συνέχεια 0,5 mL 40.000 Mw PVP (Polyvinylpyrrolidone, Sigma-Aldrich, China) προστέθηκαν στο διάλυμα καθώς και 0,5 mL sodium borohydride (NaBH₄, 50 mM) (Sigma-Aldrich, USA). Μετά τη προσθήκη sodium borohydride παρατηρήσαμε μεταβολή του χρώματος του διαλύματος από διαφανές σε έντονο μουσταρδί/κίτρινο, γεγονός που υποδηλώνει το σχηματισμό των νανοδοματιδίων του αργύρου. Το τελικό διάλυμα αναδεύτηκε για 2 h σε θερμοκρασία 50 °C και στη συνέχεια τοποθετήθηκε για μία ώρα κάτω από υπεριώδες φως (UV light) για να πολλαπλασιαστούν τα νανοδοματίδια αργύρου. Τέλος, αποθηκεύτηκε σε σκουρόχρωμα φιαλίδια μακριά από το φως. Μετά την παρασκευή τους, με την χρήση φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-VIS) μετρήθηκε η απορρόφηση των AgNPs, η οποία παρουσίασε μέγιστη τιμή σε μήκος κύματος 472 nm (Διάγραμμα 2), το οποίο υποδηλώνει την ύπαρξη AgNPs και ότι το σχήμα των περισσότερων νανοδοματιδίων είναι σφαιρικό.



Εικόνα 6 Απορρόφηση UV-VIS διαλύματος AgNPs (ABS-nm)

4.3. Παρασκευή σύνθετων μεταλλικών επιφανειών

Ως κύρια βάση των σύνθετων μεταλλικών επιφανειών χρησιμοποιήθηκε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα (coupons SS) διαστάσεων 0,1 mm x 0,8 mm x 0,1 mm. Πριν την χρήση τους οι μεταλλικές επιφάνειες τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 30 min, ακολούθησε έκπλυση των επιφανειών με 5 mL προπανόλης και τέλος τοποθετήθηκαν στον ξηραντήρα για 2 h.

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές επιφάνειες, α) μεταλλικές επιφάνειες χωρίς επίστρωση (SS coupons, μάρτυρας, control), β) μεταλλικές επιφάνειες με επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου (SS+TiO₂ coupons) και γ) μεταλλικές επιφάνειες με επίστρωση TiO₂ επάνω από την οποία είχαν προστεθεί τα νανοσωματίδια αργύρου (SS+TiO₂+AgNPs coupons) .

Η δημιουργία των λεπτών υμενίων TiO₂ επάνω στις μεταλλικές επιφάνειες (SS coupons) έγινε με την τεχνική “doctor-blade” και ακολούθησε ψήσιμο σε φούρνο υψηλής θερμοκρασίας. Η πάστα του TiO₂ απλώθηκε στη μία μεριά της μεταλλικής επιφάνειας με μία γυάλινη ράβδο και στη συνέχεια αφέθηκαν να στεγνώσουν για 10 min μέσα σε ένα τρυβλίο. Τέλος οι επιφάνειες ψήθηκαν σε θερμοκρασία 450 °C για 1 h (Chorianopoulos et al., 2011). Αφού κρύωσαν μέσα στο φούρνο, οι μισές επιφάνειες (coupons SS+TiO₂) αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία μέχρι να χρησιμοποιηθούν ενώ οι υπόλοιπες χρησιμοποιήθηκαν για την επίστρωση της δεύτερης σύνθετης μεταλλικής επιφάνειας από νανοσωματίδια αργύρου.

Για την παρασκευή της σύνθετης μεταλλικής επιφάνειας με AgNPs, τα έτοιμα SS+TiO₂ coupons προστέθηκαν σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 mL διάλυμα AgNPs και τοποθετήθηκαν κάτω από UV φως για 1 h. Μετά από την τοποθέτησή τους σε θερμοκρασία 60 °C για 2 μέρες, οι μεταλλικές επιφάνειες αφαιρέθηκαν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία εναποθέτοντας στην επιφάνειά τους ακόμα 1 mL διάλυμα AgNPs. Ύστερα τοποθετήθηκαν ξανά για 30 min κάτω από λάμπα UV και έπειτα μπήκαν πάλι στο ξηραντήρα για μία μέρα. Τα νέα coupons SS+TiO₂+AgNPs αποθηκεύτηκαν σε αποστειρωμένα τρυβλία σε σκοτεινό μέρος ώστε να μην αναπτυχθούν περισσότερο τα νανοσωματίδια αργύρου μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

Οι μεταλλικές επιφάνειες με τον ανοξειδωτο χάλυβα καθώς επίσης και αυτές με την επικάλυψη TiO₂ πριν τη χρήση τους για την μελέτη τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες (half tubes) που περιείχαν 4,5 mL διαλύματος ¼ strength Ringer για την περίπτωση των μονοκαλλιεργειών και 4 mL Ringer για την περίπτωση της μικτής καλλιέργειας και αποστειρώθηκαν σε θερμοκρασία 121 °C για 15 min. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην περίπτωση των μεταλλικών επιφανειών με επικάλυψη AgNPs, η αποστείρωση των επιφανειών πραγματοποιήθηκε με έκθεση σε ακτινοβολία UV για 30 min σε τρυβλία και ύστερα τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 4,5 mL διαλύματος Ringer για την περίπτωση των μονοκαλλιεργειών και 4 mL διαλύματος Ringer για την περίπτωση της μικτής καλλιέργειας.



Εικόνα 7 Αριστερά επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα με επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου (TiO₂) και δεξιά επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα με επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου και ενσωματωμένα AgNPs.

4.4. Προετοιμασία Εμβολίων

Για την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 3 μικροοργανισμοί εκ των οποίων οι δύο ήταν παθογόνοι (*Salmonella* Enteritidis, *Listeria monocytogenes*) και ο τρίτος αλλοιωγόνος (*Pseudomonas fragi*). Οι εν λόγω μικροοργανισμοί χρησιμοποιήθηκαν είτε ως μονοκαλλιέργεια είτε ως συγκαλλιέργεια ανά δύο και ανήκουν στην Τράπεζα Μικροοργανισμών (FMCC) του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και στον Πίνακα 1 παρατίθενται τα χαρακτηριστικά και η προέλευση του κάθε στελέχους.

Πίνακας 1 Βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη με τα χαρακτηριστικά τους και την προέλευσή τους.

Βακτήριο	Στέλεχος	Χαρακτηριστικά Στελέχους	Προέλευση
<i>Listeria monocytogenes</i>	B165	-	<u>Βιομηχανία επεξεργασίας τροφίμων</u>
<i>Pseudomonas fragii</i>	B209	DSM-3456	-
<i>Salmonella enterica ser. Enteritidis</i>	B287	P167807	<u>Πανεπιστήμιο Surrey</u>

Τα βακτηριακά στελέχη ήταν αποθηκευμένα σε θερμοκρασία -20 °C σε φιαλίδια με 80% θρεπτικό ζωμό Tryptic Soy Broth (TSB, BioLife, Italy) και 20% γλυκερόλη. Η δημιουργία των εμβολίων πραγματοποιήθηκε με τη μεταφορά 10 μL του κάθε στελέχους, σε φιαλίδιο falcon όγκου 15 mL το οποίο περιείχε 10 mL υγρό υπόστρωμα TSB. Ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία 30 °C για 48h για το βακτήριο *L. monocytogenes*, 25 °C για 48h για το βακτήριο *P. fragi* και 37 °C για 24h για το βακτήριο *S. Enteritidis*.

Το εμβόλιο των βακτηρίων που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των βιοϋμενίων ετοιμάστηκε ως εξής. Αρχικά 10 μL των ενεργοποιημένων βακτηριακών κυττάρων προστέθηκαν σε φιαλίδιο falcon που περιείχε 10 mL υπόστρωμα TSB. Ακολούθησε επώαση για 24h στη βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης για το κάθε στέλεχος. Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε με επώαση όλων των στελεχών σε θερμοκρασία 15 °C για 18 h. Μετά την επώαση τα βακτηριακά κύτταρα έπρεπε να καθαριστούν από το θρεπτικό υπόστρωμα πριν τη χρήση τους.

Για το σκοπό αυτό τα εμβόλια φυγοκεντρήθηκαν σε 5000x g σε θερμοκρασία 4 °C για 15 min. Ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος των κυττάρων με 10 mL αποστειρωμένου διαλύματος ¼ strength Ringer (Neogen, UK) και τέλος ανάδευση

του εναιωρήματος σε συσκευή vortex. Η όλη διαδικασία επαναλήφθηκε άλλη μία φορά. Στα καθαρισμένα εμβόλια πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε αποστειρωμένο διάλυμα ¼ strength Ringer για την δημιουργία του τελικού εμβολίου του κάθε στελέχους. Οι δύο αραιώσεις έγιναν ώστε να μειωθεί ο αριθμός των βακτηριακών κυττάρων από 10^8 CFU/mL σε 10^6 CFU/mL για καλύτερη μελέτη.



Εικόνα 8 Τζημα βακτηριακών κυττάρων σε falcon που περιέχει 10 mL ¼ strength Ringer έπειτα από φυγοκέντριση. Αριστερά εμβόλιο του βακτηρίου *S. Enteritidis* και δεξιά εμβόλιο του βακτηρίου *P. fragi*.

4.5. Επιμόλυνση επιφανειών και ανάπτυξη βιοϋμενίου

Για την ανάπτυξη των βιοϋμενίων, συγκεκριμένος όγκος βακτηριακού εναιωρήματος προστέθηκε στους αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν κάθε μία από τις τρεις υπό μελέτη μεταλλικές επιφάνειες. Στην περίπτωση της μονοκαλλιέργειας προστέθηκε σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα όγκος, 0,5 mL εμβολίου από το κάθε ένα βακτηριακό στέλεχος. Στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας προστέθηκε στους δοκιμαστικούς σωλήνες όγκος 0,5 mL βακτηριακού εναιωρήματος από κάθε μικροοργανισμό. Οι συγκαλλιέργειες περιείχαν τους μικροοργανισμούς *L. monocytogenes* και *P. fragi (mix1)* και το βακτήριο *S. Enteritidis* μαζί με *P. fragi (mix2)*. Στη συνέχεια οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν για 3h σε θερμοκρασία 15 °C ώστε να προσκολληθούν τα βακτηριακά κύτταρα επάνω στις μεταλλικές επιφάνειες.

Στη συνέχεια οι μισές μεταλλικές επιφάνειες αφαιρέθηκαν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετήθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας σε άλλους αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες όπου περιείχαν 5 mL διαλύματος ¼ strength Ringer. Ακολούθησε ελαφριά ανάδευση προκειμένου να απομακρυνθούν από τις επιφάνειες τα χαλαρά προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα. Τέλος, οι μεταλλικές επιφάνειες μεταφέρθηκαν σε νέους αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν 5 mL TSB και ακολούθησε επώαση στις δύο υπό μελέτη θερμοκρασίες (15 °C και 25 °C) για 48h ώστε να μελετηθεί η ανάπτυξη των βιοϋμενίων.



Εικόνα 9 Δοκιμαστικός σωλήνας με 5 mL TSB και επιφάνεια με επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου στο οποίο έχει γίνει αρχική προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων έτοιμο για επώαση.

Στις υπόλοιπες μισές μεταλλικές επιφάνειες πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για τον προσδιορισμό του ποσοστού επικόλλησης των βακτηριακών κυττάρων πάνω στην κάθε επιφάνεια.

4.6. Ποσοτικοποίηση κυττάρων επικόλλησης και βιοϋμενίου με χρήση της μεθόδου με αποστειρωμένους βαμβακοφόρους στείλους (Swab method)

Η μέθοδος Swab χρησιμοποιείται συχνά στις βιομηχανίες τροφίμων για τον έλεγχο των γραμμών και χώρων παραγωγής και αποθήκευσης των τροφίμων για τυχόν επιμολύνσεις. Για αυτό τον λόγο χρησιμοποιήθηκε η συγκεκριμένη μέθοδος για την ποσοτικοποίηση των κυττάρων επάνω στις υπό μελέτη επιφάνειες τόσο σε μηδενικό χρόνο (μετά τις 3 h που γίνεται η προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες) όσο και μετά από 48h που το βιοϋμένιο έχει αρχίσει να αναπτύσσεται. Η διαδικασία και για τις δύο περιπτώσεις ήταν η ίδια.

Αρχικά, οι επιφάνειες απομακρύνθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας από το θρεπτικό υπόστρωμα και υποβλήθηκαν σε έκπλυση με 5 mL αποστειρωμένου διαλύματος $\frac{1}{4}$ strength Ringer στην πλευρά που επρόκειτο να πραγματοποιηθεί η δειγματοληψία προκειμένου να απομακρυνθούν τα ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα. Στη συνέχεια περνώντας ένα αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στείλειό (swab), πάνω από την υπό μελέτη επιφάνεια, συλλέχθηκαν τα προσκολλημένα κύτταρα.

Μετά την δειγματοληψία ο στείλειός τοποθετήθηκε σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 10 mL $\frac{1}{4}$ strength Ringer και ακολούθησε ανάδευση για 1 min σε συσκευή Vortex, με σκοπό την απομάκρυνση των κυττάρων από το στείλειό. Ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις και επιφανειακή εξάπλωση σε θρεπτικά υποστρώματα για την απαρίθμηση των βιοϋμενικών κυττάρων. Στη περίπτωση των μονοκαλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα TSA (Neogen, UK) ενώ στη περίπτωση των

μεικτών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα για το κάθε μικροοργανισμό. Συγκεκριμένα, για το βακτήριο *L. monocytogenes* χρησιμοποιήθηκε PALCAM (BioLife, Italy), για το βακτήριο *P. fragi* Pseudomonas agar με αντιβιοτικό CFC (Neogen, UK) και για το βακτήριο *S. Enteritidis* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα XLD (LAB, Neogen, UK).

Τα τρυβλία επώστηκαν σε θερμοκρασίες 30°C και 25°C για 48h για την απαρίθμηση των βακτηρίων *L. monocytogenes* και *P. fragi* 25 °C, αντίστοιχα, ενώ για το βακτήριο *S. Enteritidis* η επώαση των τρυβλίων πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 37 °C για 24h. Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων στις επιφάνειες υπολογίστηκε από τον ακόλουθο τύπο:

$$\log \left(\frac{\text{αποικίες} \times \text{αραίωση}}{1,8 \text{ cm}^2} \right)$$

όπου 1,8 cm² η συνολική επιφάνεια δειγματοληψίας από τις μεταλλικές επιφάνειες. Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως log CFU/cm².

4.7. Απολύμανση επιφανειών με UV

Μετά τον ενοφθαλμισμό των μεταλλικών επιφανειών με τους υπό μελέτη μικροοργανισμούς ακολούθησε επώαση για 48 h στις δύο επιλεγμένες θερμοκρασίες. Ακολούθησε έκπλυση των επιφανειών με 5 mL Ringer και τοποθέτηση σε ακτινοβολία UV για 10 και 30 min. Μετά το πέρας του χειρισμού, ακολούθησε δειγματοληψία με τη μέθοδο swab για την ποσοτικοποίηση των κυττάρων στις επιφάνειες. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος χειρισμός πραγματοποιήθηκε μόνο για την περίπτωση των συγκαλλιεργειών mix1 και mix2.



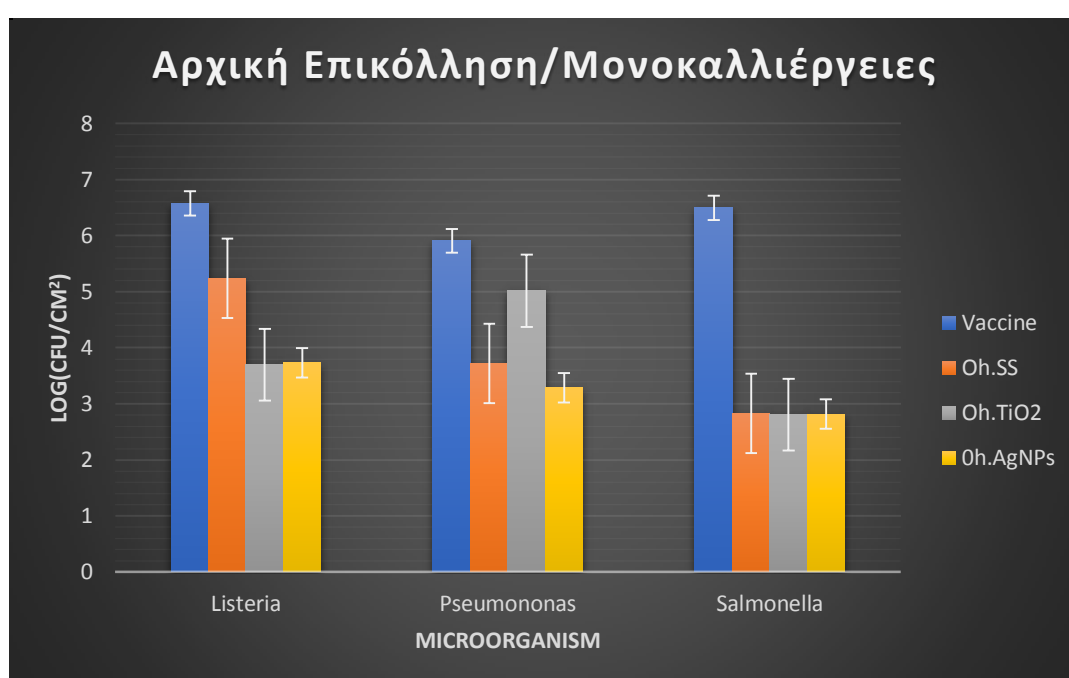
Εικόνα 10 Απολύμανση επιφανειών με ακτινοβολία UV μετά από 48 h επώασης. Η απολύμανση γίνεται μέσα σε laminar.

5. Αποτελέσματα

5.1. Ανάλυση βιοϋμενίων από τη μονοκαλλιέργεια των μικροοργανισμών

Αρχική προσκόλληση

Στο Διάγραμμα 2 παρουσιάζεται ο βακτηριακός πληθυσμός του κάθε εμβολίου που χρησιμοποιήθηκε σε σύγκριση με το βακτηριακό πληθυσμό που προσκολλήθηκε στην κάθε επιφάνεια μετά από 3 h επώασης σε θερμοκρασία 15 °C.



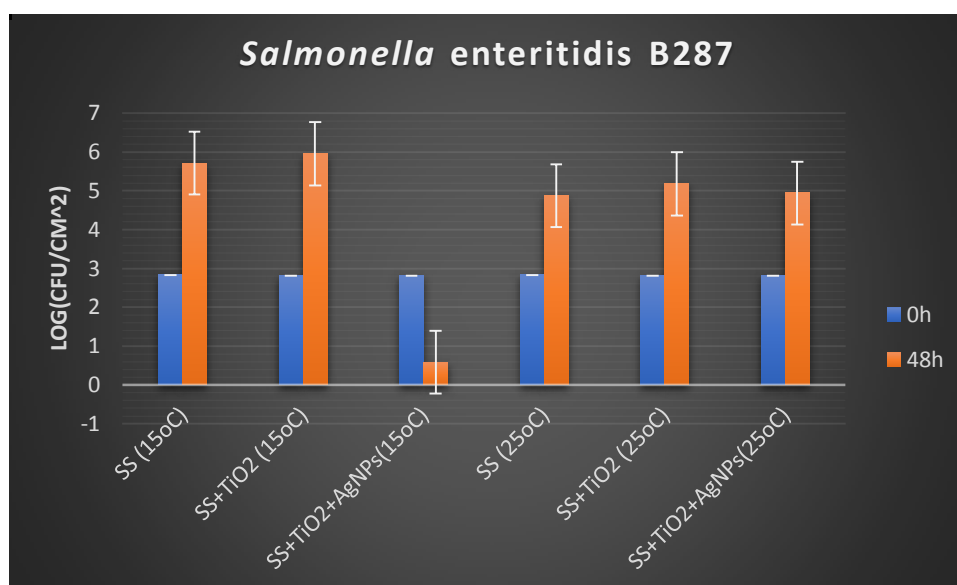
Διάγραμμα 2 Ο βακτηριακός πληθυσμός των μονοκαλλιεργειών σε log CFU/cm² των εμβολίων ως προς το βακτηριακό πληθυσμό της αρχικής προσκόλλησης σε κάθε υπό μελέτη επιφάνεια (■Vaccine: ο μικροβιακός πληθυσμός των εμβολίων ■Oh.SS: ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης των βακτηρίων επάνω στην επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα ■Oh.TiO₂: ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης των βακτηρίων επάνω στην επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου και ■Oh.AgNPs: ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης των βακτηρίων επάνω στην επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου και τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου).

Από το παραπάνω Διάγραμμα 2 προκύπτει ότι η επικόλληση του βακτηρίου *S. Enteritidis* και στις τρεις υπό μελέτη επιφάνειες ήταν ίδια (2,81 log CFU/cm² ±0,02) και ότι το ποσοστό επικόλλησης ήταν το μισό από αυτό του αρχικού εμβολίου (6,49 log CFU/cm²). Επίσης, παρατηρείται ότι το βακτήριο *P. fragi* είχε επικολληθεί περισσότερο στην επιφάνεια με επικάλυψη TiO₂ με μικροβιακό πληθυσμό 5,02 log CFU/cm² και, λιγότερο στις άλλες δύο επιφάνειες με τον μικρότερο πληθυσμό να παρατηρείται στην επιφάνεια που περιείχε AgNPs, 3,29 log CFU/cm². Αναφορικά με

το βακτήριο *L. monocytogenes*, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη επικόλληση στην επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα ($5,24 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$) συγκριτικά με τις άλλες δύο επιφάνειες στις οποίες επικολλήθηκε η μισή ποσότητα του αρχικού εμβολίου ($3,70-3,73 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$). Είναι προφανές ότι η ανοξειδωτή μεταλλική επιφάνεια στην οποία είχε γίνει επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου και είχαν ενσωματωθεί νανοσωματίδια αργύρου, μειώνει την δυνατότητα προσκόλλησης βακτηριακών κυττάρων και των τριών μικροοργανισμών που μελετήθηκαν.

Ανάπτυξη βιοϋμενίου μονοκαλλιιεργειών σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης:

Μετά την αρχική προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων, οι επιφάνειες επώαστηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες ($15 \text{ }^\circ\text{C}$ και $25 \text{ }^\circ\text{C}$) για 48 h, προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη βιοϋμενίου του κάθε μικροοργανισμού. Τα Διαγράμματα 3-5 παρουσιάζουν τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) κάθε μικροοργανισμού στις υπό μελέτη επιφάνειες, στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης.



Διάγραμμα 3 Ανάπτυξη βιοϋμενίου του βακτηρίου *Salmonella Enteritidis* σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση στις τρεις υπό μελέτη επιφάνειες και τις δύο θερμοκρασίες επώασης ($15 \text{ }^\circ\text{C}$ και $25 \text{ }^\circ\text{C}$). Με \blacksquare 0h σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης του βακτηρίου και \blacksquare 48h ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου μετά από 48 h επώασης.

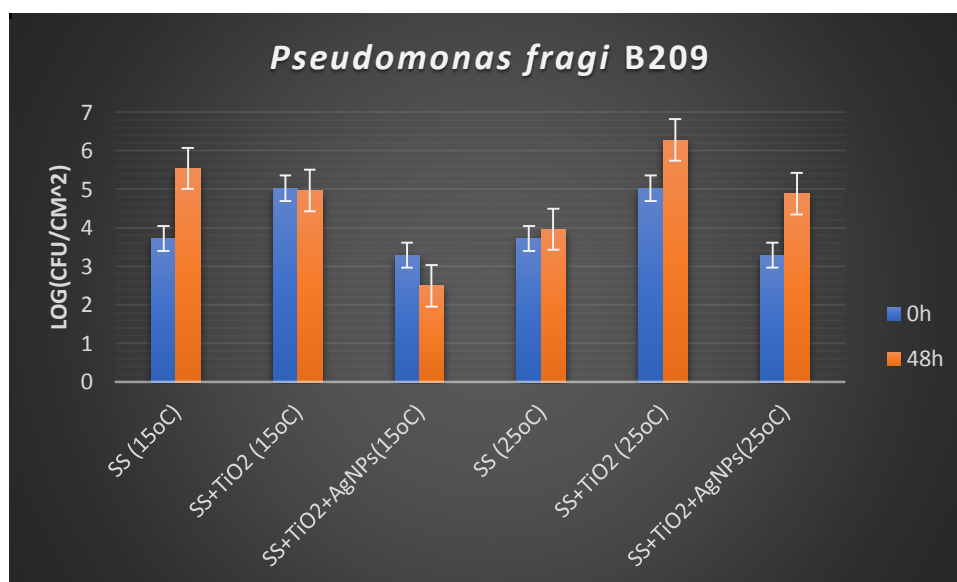
Από το Διάγραμμα 3 παρατηρείται ότι η ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων (AgNPs) στη μεταλλική επιφάνεια με επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου (TiO₂), δεν επέτρεψε την περαιτέρω ανάπτυξη των προσκολλημένων κυττάρων του βακτηρίου *S. Enteritidis*, σε θερμοκρασία $15 \text{ }^\circ\text{C}$ και μάλιστα παρατηρήθηκε μείωση των ήδη προσκολλημένων κυττάρων. Η αρχική προσκόλληση ήταν $2,81 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$ και ο πληθυσμός των βακτηριακών κυττάρων μετά από 48 h έχει μειωθεί κατά $2,23 \log \text{CFU}/\text{cm}^2$. Όμως, σε θερμοκρασία $25 \text{ }^\circ\text{C}$ η χρήση AgNPs δεν ήταν αποτελεσματική

στη μείωση του πληθυσμού των βιοϋμενικών κυττάρων, με αποτέλεσμα ο μικροβιακός πληθυσμός του παθογόνου *S. Enteritidis* να αυξάνεται κατά 2 λογαρίθμους και να φτάνει στο μικροβιακό πληθυσμό που είχαν αναπτύξει, στην ίδια θερμοκρασία, οι άλλες δύο επιφάνειες. Ο Πίνακας 2 δείχνει τη μεταβολή του πληθυσμού ως προς την αρχική επικόλληση, σε κάθε υπό μελέτη επιφάνεια και στις δύο θερμοκρασίες επώασης.

Πίνακας 2 Μεταβολή του πληθυσμού της *S. Enteritidis* από την αρχική επικόλληση μετά από 48 h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

	<u>15 °C</u>	<u>25 °C</u>
	<u>log CFU/cm²</u>	<u>log CFU/cm²</u>
SS	2,88	0,82
SS+TiO₂	3,14	1,26
SS+TiO₂+AgNPs	-2,23	2,13

Σχετικά με το βακτήριο *P. fragi* παρατηρείται μείωση του βακτηριακού πληθυσμού κατά 1 περίπου λογάριθμους, σε θερμοκρασία 15 °C (Διάγραμμα 4), η οποία είναι μικρότερη συγκριτικά με τη μείωση του πληθυσμού του βακτηρίου *S. Enteritidis*.



Διάγραμμα 4 Ανάπτυξη βιοϋμενίου του βακτηρίου *Pseudomonas fragi* σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση στις τρεις υπό μελέτη επιφάνειες και τις δύο θερμοκρασίες επώασης (15 °C και 25 °C). Με ■0h σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης του βακτηρίου και ■48h ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου μετά από 48 h επώασης.

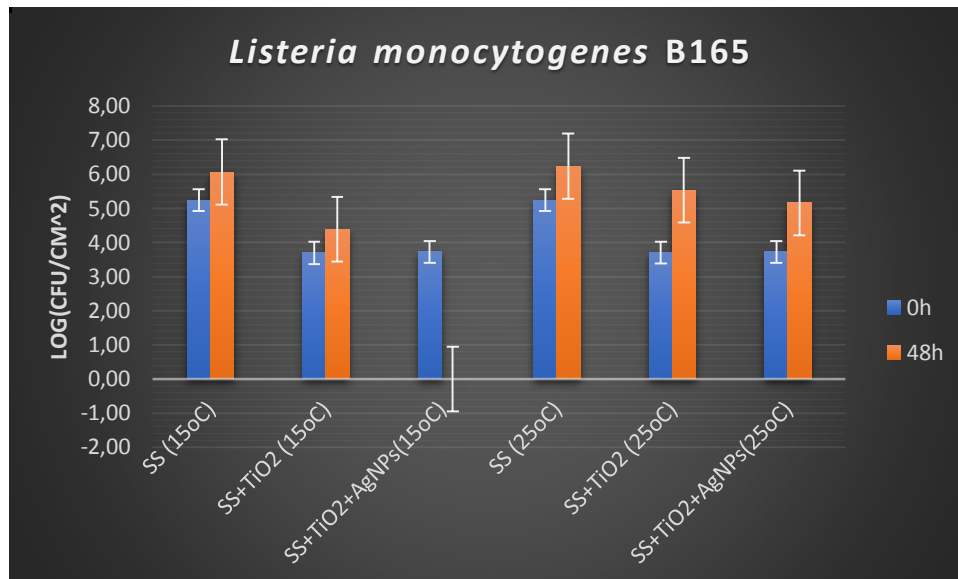
Στον Πίνακα 3 παρουσιάζεται η μεταβολή (αύξηση ή μείωση) του πληθυσμού του βακτηρίου *P.fragi* σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση.

Πίνακας 3 Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου *P. fragi* από την αρχική επικόλληση μετά από 48 h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

	<u>15 °C</u>	<u>25 °C</u>
	<u>log CFU/cm²</u>	<u>log CFU/cm²</u>
SS	1,82	0,24
SS+TiO₂	-0,06	1,26
SS+TiO₂+AgNPs	-0,79	1,60

Επίσης, παρατηρείται ότι σε θερμοκρασία 25 °C, στην οποία ευνοείται καλύτερα η ανάπτυξη του βακτηρίου *P. fragi*, στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs), παρατηρήθηκε διαφορά στο πληθυσμό σε σύγκριση με την επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα (SS) και μικρότερη διαφορά σε σύγκριση με την επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα με επικάλυψη διοξειδίου του τιτανίου (SS+TiO₂). Στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα AgNPs σε αυτή τη θερμοκρασία είχαμε αύξηση 1,60 log CFU/cm², ενώ στην επιφάνεια χωρίς επίστρωση είχαμε μικρότερη αύξηση 0,24 log CFU/cm².

Τέλος, τα κύτταρα του βακτηρίου *L. Monocytogenes*, δεν μπόρεσαν να αναπτυχθούν περαιτέρω σε θερμοκρασία 15 °C στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου (Διάγραμμα 5). Επίσης, παρατηρείται ότι η ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes* στην επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα ευνοείται το ίδιο και στις δύο θερμοκρασίες επώασης. Ενώ στην μεταλλική επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου ο βακτηριακός πληθυσμός αυξάνεται περισσότερο σε θερμοκρασία 25 °C .



Διάγραμμα 5 Ανάπτυξη βιοϋμενίου του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση στις τρεις υπό μελέτη επιφάνειες και τις δύο θερμοκρασίες επώασης (15 °C και 25 °C). Με ■0h σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής προσκόλλησης του βακτηρίου και ■48h ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου μετά από 48 h επώασης.

Επίσης, από τον Πίνακα 4 πάλι παρατηρείται παρόμοια ανάπτυξη του μικροβιακού πληθυσμού κατά 1 με 1,83 log CFU/cm² και στις τρεις επιφάνειες σε θερμοκρασία 25 °C με την μικρότερη ανάπτυξη να την έχει η επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα.

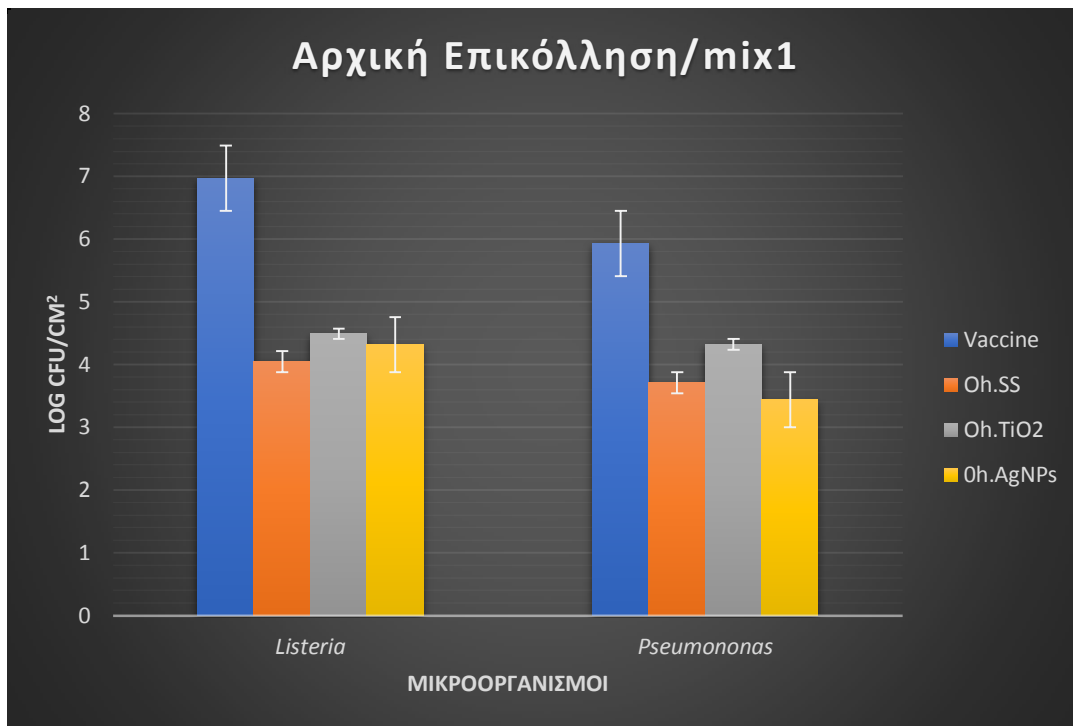
Πίνακας 4 Μεταβολή του πληθυσμού του βακτηρίου *L. monocytogenes* από την αρχική επικόλληση μετά από 48 h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

	15 °C	25 °C
	log CFU/cm²	log CFU/cm²
SS	0,82	1,00
SS+TiO2	0,69	1,83
SS+TiO2+AgNPs	-3,73	1,43

5.2. Ανάλυση βιοϋμενίων από τη συγκαλλιέργεια των μικροοργανισμών

Αρχική προσκόλληση συγκαλλιέργειας 1 (mix1)

Στο Διάγραμμα 6 παρουσιάζεται ο μικροβιακός πληθυσμός της αρχικής επικόλλησης των βακτηριακών κυττάρων της συγκαλλιέργειας 1 (mix 1), η οποία αποτελείται από τα βακτήρια *P. fragi* και *L. Monocytogenes*, ως προς το πληθυσμό του εμβολίου.

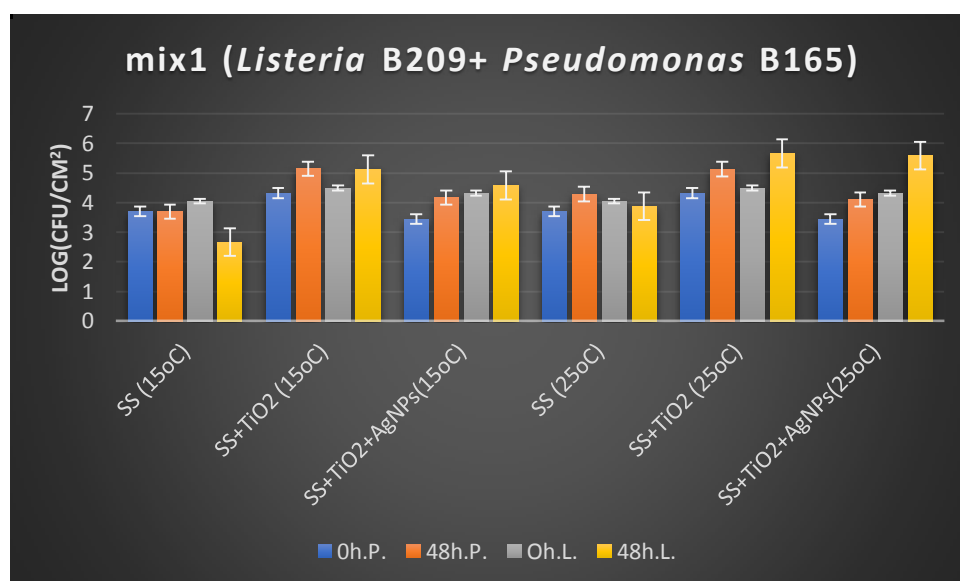


Διάγραμμα 6 Σύγκριση του βακτηριακού πληθυσμού των εμβολίων του κάθε μικροοργανισμού με τον βακτηριακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας mix1 που έχει προσκολληθεί στην κάθε επιφάνεια. Όπου, ▣ Vaccine, σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του εμβολίου του κάθε μικροοργανισμού, ▨ Oh.SS η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS, ▩ Oh.TiO₂ η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS+TiO₂ και ▪ Oh.AgNPs η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS+TiO₂+AgNPs

Στην συγκαλλιέργεια 1 οι επιφάνειες είχαν εμβολιαστεί με 0,5 mL εμβολίου του βακτηρίου *P. fragi* και 0,5 mL εμβολίου του βακτηρίου *L. monocytogenes*. Από το Διάγραμμα 7 παρατηρείται ότι ο αριθμός των μικροβιακών πληθυσμών των δύο βακτηρίων προσκολλήθηκαν εξίσου στις τρεις μεταλλικές επιφάνειες. Επίσης, παρατηρείται ότι το βακτήριο *P. fragi* έχει προσκολληθεί περίπου 1 λογάριθμο λιγότερο (3.44 log CFU/cm²) από το βακτήριο *L. monocytogenes* (4,32 log CFU/cm²) στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs). Τέλος, παρατηρείται ότι στην επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα με την επίστρωση του διοξειδίου του τιτανίου και οι δύο μικροοργανισμοί έχουν προσκολληθεί κατά 0,5 λογάριθμο περισσότερο σε σύγκριση των άλλων δύο μεταλλικών επιφανειών. Από τα παραπάνω αποτελέσματα αναγνωρίζεται το γεγονός ότι στην επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα με επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου που έχουν ενσωματωθεί νανοσωματίδια αργύρου δεν επιβραδύνει την αρχική προσκόλληση της συγκαλλιέργειας 1 και ιδίως του βακτηρίου *L. monocytogenes*.

Ανάπτυξη βιοϋμενίου mix1 σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

Μετά την αρχική προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων, οι επιφάνειες επώαστηκαν σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (15 °C και 25 °C) για 48 h, προκειμένου να μελετηθεί η ανάπτυξη βιοϋμενίου του κάθε μικροοργανισμού. Τα Διάγραμμα 7 παρουσιάζει τον πληθυσμό των βιοϋμενικών κυττάρων (log CFU/cm²) κάθε μικροοργανισμού στις υπό μελέτη επιφάνειες, στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης.



Διάγραμμα 7 Ανάπτυξη βιοϋμενίου της συγκαλλιέργειας mix1 (48 h) σε όλες τις υπό μελέτη επιφάνειες και θερμοκρασίες επώασης σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση (0 h). Όπου, ▣ 0h.P. σημειώνεται η αρχική επικόλληση του βακτηρίου *P. fragi* μέσα στο mix1, ▣ 48h.P. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ▣ 0h.L. η αρχική επικόλληση του βακτηρίου *L. monocytogenes* μέσα στο mix1 και ▣ 48h.L. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο.

Από το Διάγραμμα 7 και τον Πίνακα 5 παρατηρείται μείωση των βακτηρίων της συγκαλλιέργειας 1 και ιδίως του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά 1,38 log CFU/cm², σε θερμοκρασία 15 °C, στην επιφάνεια χωρίς επίστρωση. Αντίθετα, σε θερμοκρασία 25 °C παρατηρείται αύξηση του βακτηρίου *P. fragi* και μία μικρή μείωση του βακτηρίου *L. Monocytogenes* κατά 0,17 log CFU/cm² σε αντίθεση με τις άλλες δύο επιφάνειες. Επίσης, προκύπτει ότι η παρουσία των νανοσωματιδίων αργύρου στην συγκαλλιέργεια 1 δεν ήταν αποτελεσματική στη μείωση του πληθυσμού των βιοϋμενικών κυττάρων τόσο του βακτηρίου *L. monocytogenes* όσο και του βακτηρίου *P. fragi* και στις δύο θερμοκρασίες επώασης, καθώς και η ανάπτυξη των δύο βακτηρίων ήταν παρόμοια με την ανάπτυξη των βακτηρίων που είχαν προσκολληθεί στην επιφάνεια με επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου.

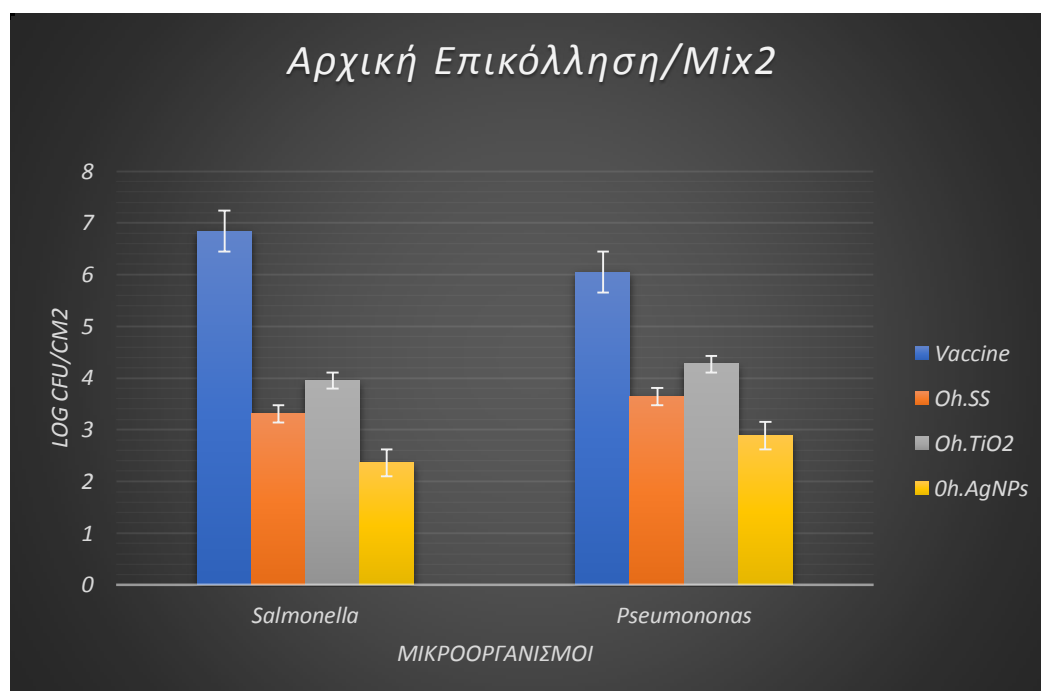
Πίνακας 5 Μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων *L. monocytogenes* και *P. fragi* μέσα στη συγκαλλιέργεια mix1, από την αρχική επικόλληση, μετά από 48 h επόασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

<i>L. monocytogenes</i>			<i>P. fragi</i>		
	<u>15 °C</u> log CFU/cm ²	<u>25 °C</u> log CFU/cm ²		<u>15 °C</u> log CFU/cm ²	<u>25 °C</u> log CFU/cm ²
SS	-1,38	-0,17	SS	-0,01	0,58
SS+TiO ₂	0,63	1,17	SS+TiO ₂	0,83	0,81
SS+TiO ₂ +AgNPs	0,26	1,27	SS+TiO ₂ +AgNPs	0,73	0,66

Τέλος, παρατηρείται ότι στη μεταλλική επιφάνεια με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου, καθώς και στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου το βακτήριο *P. fragi* ευνοείται σε θερμοκρασία 15 °C, ενώ σε θερμοκρασία 25 °C ευνοείται περισσότερο το βακτήριο *L. monocytogenes*.

Αρχική προσκόλληση μικτής καλλιέργειας 2 (mix2)

Το Διάγραμμα 8 παρουσιάζει την αρχική επικόλληση του μικροβιακού πληθυσμού της συγκαλλιέργειας 2, η οποία αποτελείται από 0,5 mL εμβολίου του βακτηρίου *S. Enteritidis* και 0,5 mL εμβολίου του βακτηρίου *P. fragi*, σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό των εμβολίων.



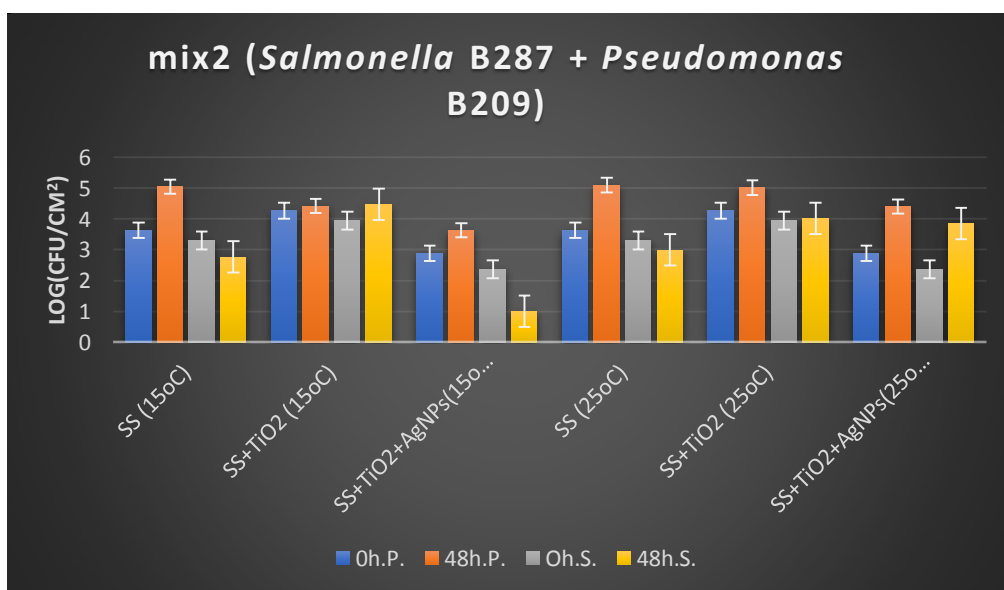
Διάγραμμα 8 Σύγκριση του βακτηριακού πληθυσμού των εμβολίων του κάθε μικροοργανισμού με το βακτηριακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας mix2 που έχει προσκολληθεί στην κάθε επιφάνεια. Όπου, ■ Vaccine σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του εμβολίου του κάθε μικροοργανισμού, ■ Oh.SS η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS, ■ Oh.TiO₂ η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS+TiO₂ και ■ Oh.AgNPs η αρχική επικόλληση του κάθε μικροοργανισμού στην επιφάνεια SS+TiO₂+AgNPs

Από το Διάγραμμα 8 παρατηρείται ότι στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου, το βακτήριο *S. Enteritidis* έχει προσκολληθεί κατά 1 λογάριθμο λιγότερο σε σύγκριση με τις άλλες δύο επιφάνειες. Το ίδιο παρατηρείται και για το βακτήριο *P. fragi*, το οποίο έχει προσκολληθεί κατά 0,5 λογάριθμο λιγότερο. Από το Διάγραμμα 8 προκύπτει ότι τα βακτήρια της συγκαλλιέργειας 2 έχουν προσκολληθεί σε παρόμοιο λογάριθμο με τον μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* να είναι ελάχιστα περισσότερος σε σύγκριση με τον μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *S. Enteritidis* και στις τρεις επιφάνειες. Είναι προφανές ότι στη συγκαλλιέργεια 2 η παρουσία των νανοσωματιδίων έχει επιβραδύνει την αρχική προσκόλληση και των δύο βακτηρίων, ιδίως της *S. Enteritidis*.

Ανάπτυξη βιοϋμενίου mix2 σε διαφορετικές θερμοκρασίες επώασης

Ο λογάριθμος του κάθε μικροοργανισμού της συγκαλλιέργειας 2 μετά από επώαση 48 h στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 9.

Από το Διάγραμμα 9 είναι προφανές ότι στην επιφάνεια με τα εναποθετημένα AgNPs, έχουμε μία σημαντική μείωση της *S. Enteritidis*, στους 15 °C, και μία μικρή ανάπτυξη της *P. fragi*.



Διάγραμμα 9 Ανάπτυξη βιοϋμενίου της συγκαλλιέργειας mix2 (48 h) σε όλες τις υπό μελέτη επιφάνειες και θερμοκρασίες επώασης σε σύγκριση με την αρχική επικόλληση (0 h). Όπου, ■ 0h.P. σημειώνεται η αρχική επικόλληση του βακτηρίου *P. fragi* μέσα στο mix2, ■ 48h.P. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ■ 0h.S. η αρχική επικόλληση του βακτηρίου *S. Enteritidis* μέσα στο mix2 και ■ 48h.S. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο.

Επίσης, και από τον Πίνακα 6 βλέπουμε ότι σε θερμοκρασία 25 °C η επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αυξάνει το βακτηριακό πληθυσμό κατά 1 λογάριθμο σε σύγκριση με τις άλλες δύο επιφάνειες. Καθώς, και ότι το βακτήριο *P. fragi* με το

βακτήριο *S. Enteritidis* σε αυτή τη θερμοκρασία δεν ανταγωνίζονται μεταξύ τους, αλλά, συνυπάρχουν καθώς έχουμε την ίδια αύξηση στους μικροβιακούς πληθυσμούς των δύο βακτηρίων ($1,50 \log \text{CFU/cm}^2$), σε αντίθεση με τον ανταγωνισμό που έχουν σε θερμοκρασία 15°C . Επίσης, μπορεί να παρατηρηθεί ότι στην επιφάνεια του ανοξειδωτου χάλυβα υπάρχει ανταγωνισμός μεταξύ των δύο μικροοργανισμών και στις δύο θερμοκρασίες επώασης με το βακτήριο *P. fragi* να κυριαρχεί έναντι του βακτηρίου *S. Enteritidis*.

Πίνακας 6 Μεταβολή του πληθυσμού των βακτηρίων *S. Enteritidis* και *P. fragi* μέσα στη συγκαλλιέργεια mix2, από την αρχική επικόλληση, μετά από 48 h επώασης στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες

S. Enteritidis

	15°C log CFU/cm ²	25°C log CFU/cm ²
SS	-0,54	-0,31
SS+TiO ₂	0,52	0,06
SS+TiO ₂ +AgNPs	-1,36	1,50

P. fragi

	15°C log CFU/cm ²	25°C log CFU/cm ²
SS	1,41	1,46
SS+TiO ₂	0,15	0,75
SS+TiO ₂ +AgNPs	0,74	1,51

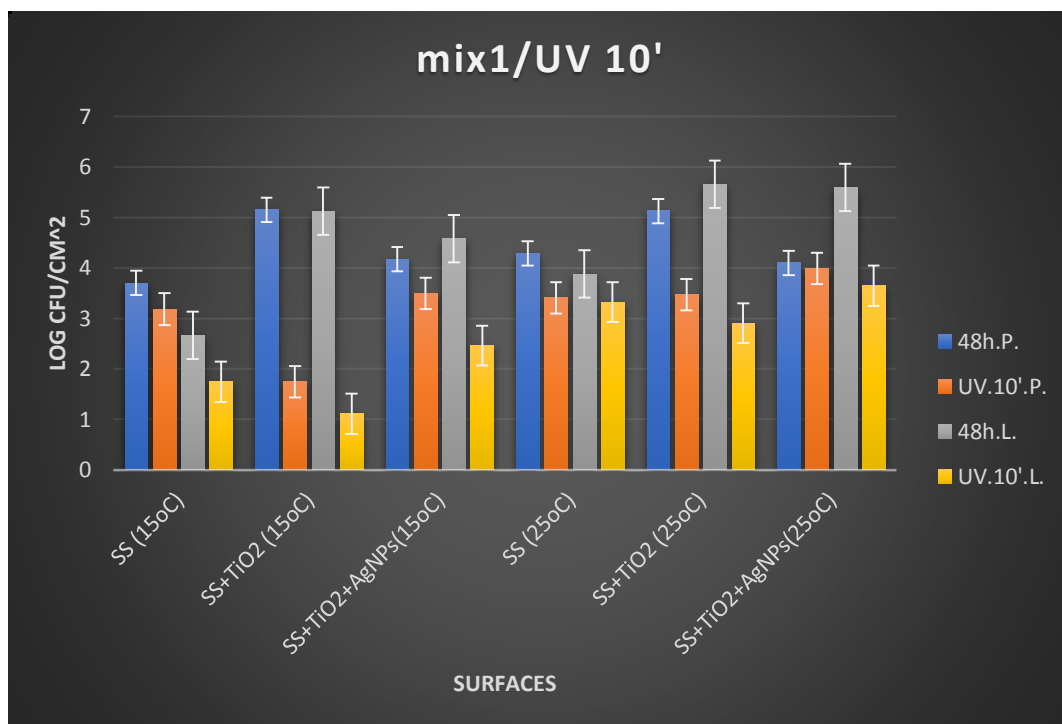
5.3. Απολύμανση επιφανειών με χρήση ακτινοβολίας UV

Χρήση UV έναντι της συγκαλλιέργειας *L. monocytogenes* και *P. fragi* (mix1)

Η απολύμανση με χρήση ακτινοβολίας UV χρησιμοποιήθηκε μόνο στην περίπτωση των μιγμάτων καλλιιεργειών και σε δύο διαφορετικούς χρόνους (10 και 30 min).

Στα Διαγράμματα 10 και 11 παρατηρείται η επίπτωση των διαφορετικών χρόνων έκθεσης των επιμολυσμένων επιφανειών σε ακτινοβολία UV, 10 min και 30 min, αντίστοιχα.

Αρχικά, μετά την επίδραση 10 min έκθεσης σε ακτινοβολία UV στις επωασμένες επιφάνειες, παρατηρείται από το Διάγραμμα 10 μία μείωση και των δύο βακτηρίων στις τρεις υπό μελέτη επιφάνειες και τις δύο θερμοκρασίες επώασης.



Διάγραμμα 10 Η επίπτωση της ακτινοβολίας UV για 10 min στο μικροβιακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας mix1 σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό μετά από 48 h επώασης και σχηματισμού του βιοϋμένιου. Όπου, ■ 48h.P. σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μκτό βιοϋμένιο, ■ UV.10'.P. η επίδραση 10' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* στο μκτό βιοϋμένιο, ■ 48.h.L. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μκτό βιοϋμένιο και ■ UV.10'.L. η επίδραση 10' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μκτό βιοϋμένιο.

Από τον Πίνακα 7 και από το Διάγραμμα 10, επίσης, παρατηρείται ότι στην επιφάνεια με επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου έχει μειωθεί ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* κατά 4 και 2,75 λογαρίθμους και ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* έχει μειωθεί κατά 3,4 και 1,6 log CFU/cm², σε θερμοκρασία 15 °C και 25 °C αντίστοιχα. Μία παρόμοια μείωση, αλλά μόνο σε θερμοκρασία 15 °C, προκύπτει και στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου, που το βακτήριο *L. monocytogenes* έχει μειωθεί κατά 2 log CFU/cm² και το βακτήριο *P. fragi* έχει μειωθεί ελάχιστα κατά 0,67 log CFU/cm².

Πίνακας 7 Λογαριθμική μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων *L. monocytogenes* και *P. fragi* στη συγκαλλιέργεια mix1 μετά από έκθεσή τους σε ακτινοβολία UV για 10 min.

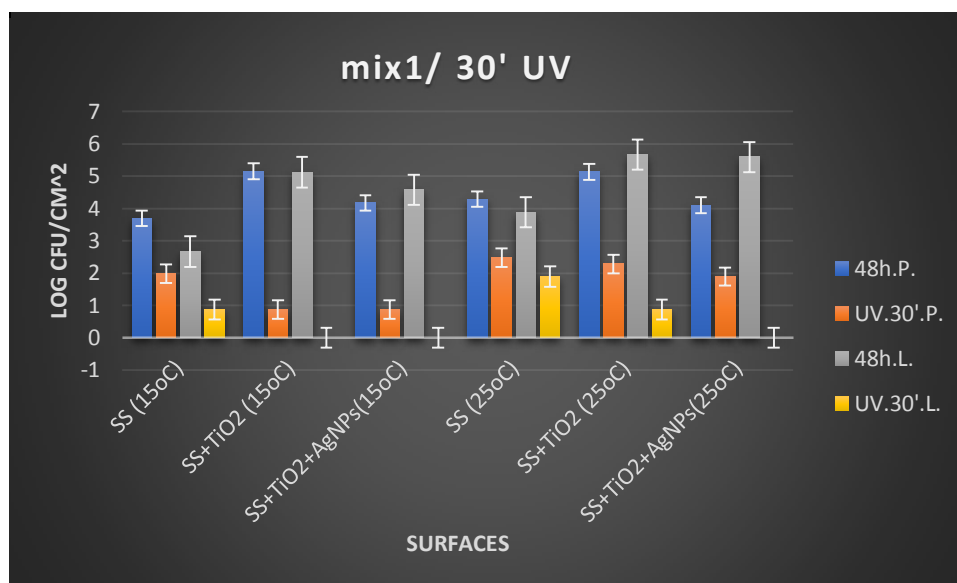
L. monocytogenes

	15 °C log CFU/cm ²	25 °C log CFU/cm ²
SS	-0,92527	-0,55609
SS+TiO2	-4,00908	-2,75416
SS+TiO2+AgNPs	-2,11959	-1,94201

P. fragi

	15 °C log CFU/cm ²	25 °C log CFU/cm ²
SS	-0,51774	-0,88
SS+TiO2	-3,40527	-1,66
SS+TiO2+AgNPs	-0,6727	-0,11

Στο Διάγραμμα 11 παρατηρούμε την επίδραση παραπάνω χρονικού διαστήματος UV, στα 30 min.



Διάγραμμα 11 Η επίπτωση της ακτινοβολίας UV για 30 min στο μικροβιακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας mix1 σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό μετά από 48 h επώασης και σχηματισμού του βιοϋμενίου. Όπου, ■ 48h.P. σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μκτό βιοϋμένιο, ■ UV.30'.P. η επίδραση 30' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* στο μκτό βιοϋμένιο, ■ 48h.L. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μκτό βιοϋμένιο και ■ UV.30'.L. η επίδραση 30' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *L. monocytogenes* στο μκτό βιοϋμένιο.

Από το Διάγραμμα 11, παρατηρείται περισσότερη μείωση του μικροβιακού πληθυσμού και των δύο μικροοργανισμών μέσα στην συγκαλλιέργεια 1 σε σύγκριση με τα 10 min UV.

Με συνδυασμό τον Πίνακα 8 παρατηρείται, επίσης, ότι η επιφάνεια με την επίστρωση του διοξειδίου του τιτανίου, καθώς και, η επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου (SS+TiO₂ και SS+TiO₂+AgNPs) παρουσιάζουν μεγαλύτερη απολυμαντική ικανότητα σε τόσο μικρό χρονικό διάστημα, με μείωση 5 λογαρίθμων για το βακτήριο *L. monocytogenes* και στις δύο θερμοκρασίες επώασης και μία μείωση από 2,5 έως 4 λογαρίθμους για το βακτήριο *P. fragi*, από τι η επιφάνεια του ανοξείδωτου χάλυβα. Αυτό που παρατηρείται επίσης από το διάγραμμα είναι ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* στις επιφάνειες αυτές που είχαν επωαστεί σε θερμοκρασία 15 °C έχει εξαλειφθεί τελείως, ενώ σε αυτές που είχαν επωαστεί σε θερμοκρασία 25 °C έχει εξαλειφθεί μόνο από την επιφάνεια με τα ενσωματωμένα AgNPs.

Τέλος, για το βακτήριο *P. fragi* παρατηρείται ότι σε καμία από τις 3 επιφάνειες δεν έχει εξαλειφθεί τελείως, σε καμία από τις δύο θερμοκρασίες επώασης. Αλλά έχει μειωθεί αρκετά στην επιφάνεια με την επίστρωση του διοξειδίου του τιτανίου και στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου που έχουν επωαστεί σε θερμοκρασία 15 °C.

Πίνακας 8 Λογαριθμική μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων *L. monocytogenes* και *P. fragi* στη συγκαλλιέργεια mix1 μετά από έκθεσή τους σε ακτινοβολία UV για 30 min.

L. monocytogenes

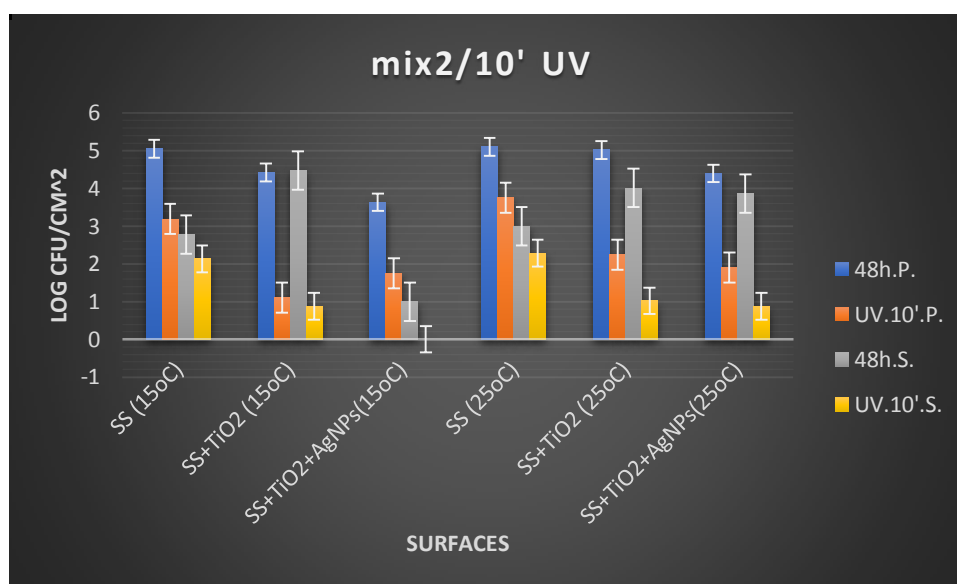
	15 °C log CFU/cm ²	25 °C log CFU/cm ²
SS	-1,79764	-1,98476
SS+TiO ₂	-5,12	-4,78764
SS+TiO ₂ +AgNPs	-4,58	-5,59

P. fragi

	15 °C log CFU/cm ²	25 °C log CFU/cm ²
SS	-1,71671	-1,81
SS+TiO ₂	-4,27764	-2,85
SS+TiO ₂ +AgNPs	-3,29764	-2,20

Χρήση UV έναντι συγκαλλιέργειας *S. Enteritidis* και *P. fragi* (mix2)

Στο Διάγραμμα 12 παρουσιάζεται η επίδραση της έκθεσης των επιφανειών σε 10 min ακτινοβολίας UV για την συγκαλλιέργεια 2. Αυτό που παρατηρείται είναι ότι τα 10 min ακτινοβολίας UV ήταν αρκετό χρονικό διάστημα για να εξαλείψει τελείως το βακτήριο *S. Enteritidis* στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου που είχε επωαστεί σε θερμοκρασία 15°C.



Διάγραμμα 12 Η επίπτωση της ακτινοβολίας UV για 10 min στο μικροβιακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας mix2 σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό μετά από 48 h επώασης και σχηματισμού του βιοϋμένιου. Όπου, ■ 48h.P. σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ■ UV.10'.P. η επίδραση 10' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ■ 48.h.S. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο και ■ UV.10'.S. η επίδραση 10' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο.

Από τον Πίνακα 9 παρατηρείται ότι τα 10 min ακτινοβολίας UV είχαν μεγαλύτερη επίδραση στην επιφάνεια με την επίστρωση του διοξειδίου του τιτανίου, όπου παρατηρείται μείωση 3,5 log CFU/cm² και στα δύο βακτήρια σε θερμοκρασία 15 °C, και μείωση περίπου 2,85 log CFU/cm² και στα δύο βακτήρια σε θερμοκρασία 25°C. Τέλος, παρατηρείται ότι η μείωση των μικροβιακών πληθυσμών, σε θερμοκρασία 25 °C, στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου ήταν παρόμοια με την μείωση των μικροβιακών πληθυσμών στην επιφάνεια με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου.

Πίνακας 9 Λογαριθμική μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων *S. Enteritidis* και *P. fragi* στη συγκαλλιέργεια mix2 μετά από έκθεσή τους σε ακτινοβολία UV για 10 min.

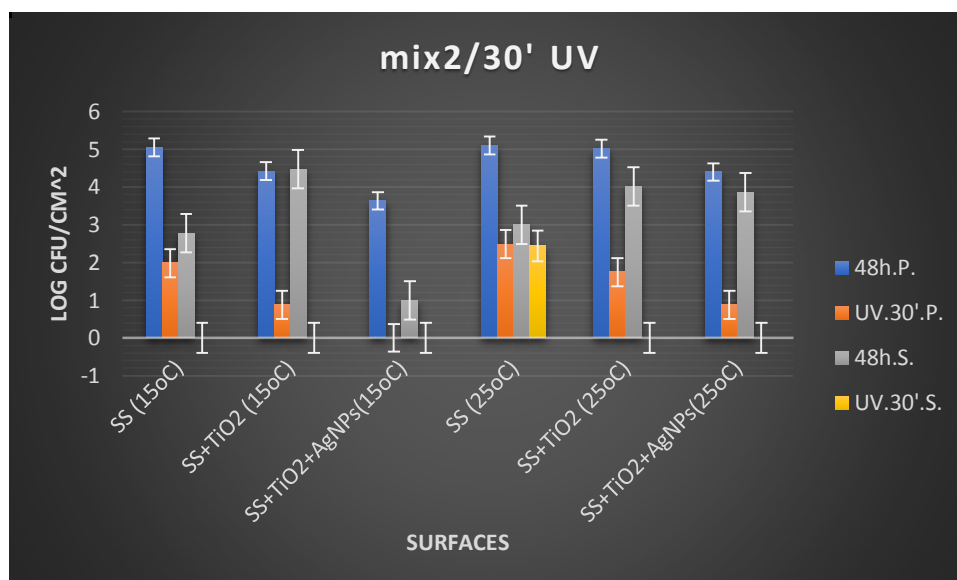
S. Enteritidis

	<u>15 °C</u> log CFU/cm ²	<u>25 °C</u> log CFU/cm ²
SS	-0,6362	-0,71568
SS+TiO2	-3,59764	-2,98712
SS+TiO2+AgNPs	-1	-2,98764

P. fragi

	<u>15 °C</u> log CFU/cm ²	<u>25 °C</u> log CFU/cm ²
SS	-1,86203	-1,35
SS+TiO2	-3,30908	-2,78
SS+TiO2+AgNPs	-1,88527	-2,50

Με την επέκταση του χρονικού διαστήματος της έκθεσης των επιφανειών σε ακτινοβολία UV στα 30 min παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο *S. Enteritidis* εξαλείφθηκε πλήρως από όλες τις επιφάνειες, με εξαίρεση την επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα που είχε επωαστεί στους 25 °C. (Διάγραμμα 13)



Διάγραμμα 13 Η επίπτωση της ακτινοβολίας UV για 30 min στο μικροβιακό πληθυσμό της συγκαλλιέργειας mix2 σε σύγκριση με το μικροβιακό πληθυσμό μετά από 48 h επόασης και σχηματισμού του βιοϋμένιου. Όπου, ■ 48h.P. σημειώνεται ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ■ UV.30'.P. η επίδραση 30' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *P. fragi* στο μικτό βιοϋμένιο, ■ 48h.S. ο μικροβιακός πληθυσμός του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο και ■ UV.30'.S. η επίδραση 30' UV στο μικροβιακό πληθυσμό του βακτηρίου *S. Enteritidis* στο μικτό βιοϋμένιο.

Επίσης, από το Διάγραμμα 13 γίνεται αντιληπτό ότι σε θερμοκρασία 15 °C, το μικτό βακτηριακό βιοϋμένιο που είχε αναπτυχθεί μετά από 48 h στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια αργύρου εξαλείφθηκε πλήρως.

Επίσης, από τον Πίνακα 10 παρατηρείται ότι σε όλες τις επιφάνειες τα 30 min UV έχει μεγάλη επίδραση ως προς το αναπτυγμένο μικτό βιοϋμένιο.

Πίνακας 10 Λογαριθμική μείωση του πληθυσμού των βακτηρίων S. Enteritidis και P. fragi στη συγκαλλιέργεια mix2 μετά από έκθεσή τους σε ακτινοβολία UV για 30 min.

S. Enteritidis

	<u>15 °C</u> log CFU/cm ²	<u>25 °C</u> log CFU/cm ²
SS	-2,77	-0,56517
SS+TiO2	-4,47	-4,01
SS+TiO2+AgNPs	-1	-3,86

P. fragi

	<u>15 °C</u> log CFU/cm ²	<u>25 °C</u> log CFU/cm ²
SS	-3,06671	-2,62
SS+TiO2	-3,54764	-3,28
SS+TiO2+AgNPs	-3,63	-3,53

6. Συζήτηση

Στη φάση της αντιστρεπτής προσκόλλησης παρατηρήθηκε ότι στην σύνθετη μεταλλική επιφάνεια με τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) οι μικροοργανισμοί ως μονοκαλλιέργειες επικολλήθηκαν σε λιγότερο ποσοστό στις control μεταλλική επιφάνεια και στη επιφάνεια με την επίστρωση διοξειδίου του τιτανίου. Μόνη εξαίρεση ήταν το βακτήριο *S. Enteritidis* όπου και στις τρεις επιφάνειες το ποσοστό αρχικής επικόλλησης ήταν μικρότερο κατά 1,5 log CFU/cm², σε σύγκριση με τους άλλους δύο μικροοργανισμούς. Όσο για τις μικτές καλλιέργειες παρατηρήθηκε ότι η συγκαλλιέργεια mix1 παρουσίασε παρόμοια αρχική επικόλληση και στις τρεις επιφάνειες, με τους δύο μικροοργανισμούς να συνυπάρχουν επάνω στην επιφάνεια. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι το βακτήριο *P. fragi* έχει την ικανότητα να συμβάλει στην ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes* και γενικά παθογόνων μικροοργανισμών που είναι gram-positive βακτήρια (Chen et al., 2017). Όμως, στην συγκεκριμένη συγκαλλιέργεια παρατηρήθηκε ότι και οι δύο μικροοργανισμοί προσκολλήθηκαν κατά 1 λογάριθμο λιγότερο στην υπό μελέτη σύνθετη επιφάνεια σε σύγκριση με τις άλλες δύο επιφάνειες. Επίσης, παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο *P. fragi* είναι ανταγωνιστικό έναντι στο βακτήριο *S. Enteritidis* και σε κάθε επιφάνεια προσκολλήθηκε περισσότερο συγκριτικά με το βακτήριο *S. Enteritidis*.

Μετά από 48 h μελετήθηκε η περαιτέρω ανάπτυξη των προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων επάνω στην κάθε επιφάνεια. Αρχικά για τις περιπτώσεις των μονοκαλλιεργειών παρατηρήθηκε ότι τα δείγματα που είχαν επωαστεί σε θερμοκρασία 25 °C δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επιφανειών και οι μικροβιολογικές αναλύσεις έδειξαν τον σχηματισμό βιοϋμενίου σε κάθε επιφάνεια. Σε θερμοκρασία 15 °C παρατηρήθηκε μείωση του προσκολλημένου βακτηριακού πληθυσμού επάνω στην επιφάνεια με τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) και στις τρεις μονοκαλλιέργειες. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι ο παθογόνος μικροοργανισμός *S. Enteritidis* με την παρουσία των AgNPs μπορεί να συνεχίσει τον σχηματισμό βιοϋμενίου σε θερμοκρασία 25 °C αλλά σε θερμοκρασία 15 °C τα AgNPs έχουν την ικανότητα να επιβραδύνουν την περαιτέρω προσκόλλησή τους. Το ίδιο ισχύει και για το παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes* αλλά σε αυτή τη περίπτωση τα αποτελέσματα έδειξαν την πλήρη εξάλειψη των βακτηριακών κυττάρων επάνω από τη σύνθετη μεταλλική επιφάνεια SS+TiO₂+AgNPs. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο βακτήριο *P. fragi* ήταν ανάλογη με τους άλλους δύο μικροοργανισμούς, αλλά παρατηρήθηκε ότι η μείωση σε θερμοκρασία 15 °C ήταν πολύ μικρότερη από τη μείωση που παρατηρήθηκε για τους παθογόνους μικροοργανισμούς, ενώ αντίστοιχα η αύξηση σε θερμοκρασία 25 °C ήταν μεγαλύτερη σε σύγκριση με τις επιφάνειες του ανοξειδωτού χάλυβα χωρίς επικάλυψη και του ανοξειδωτού χάλυβα (control) με επικάλυψη διοξειδίου του τιτανίου.

Η ποσοτικοποίηση των βακτηριακών βιοϋμενίων έγινε και για τις μικτές καλλιέργειες. Η σημαντικότερη παρατήρηση στις δύο μικτές καλλιέργειες ήταν ότι το

βακτήριο *P. fragi* όχι μόνο επιβίωσε σε κάθε περίπτωση αλλά αναπτυσσόταν περισσότερο. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι στη συγκαλλιέργεια mix1 στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια και οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν ελάχιστα σε θερμοκρασία 15 °C, ενώ στην επιφάνεια SS στην ίδια θερμοκρασία παρουσιάστηκε μείωση και των δύο μικροοργανισμών και ιδίως του παθογόνου *L. monocytogenes*. Αντίθετα, σε θερμοκρασία 25 °C παρατηρήθηκε ότι το βακτήριο *L. monocytogenes* αναπτύχθηκε σε μεγαλύτερο πληθυσμό συγκριτικά με το βακτήριο *P. fragi* στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα νανοσωματίδια. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι το βακτήριο *P. fragi* είναι το μοναδικό είδος του γένους *Pseudomonas* που δεν έχει την ικανότητα να παράγει siderophores, ενώ το βακτήριο *L. monocytogenes* μπορεί να παράγει (Ercolini et.al., 2010). Δεδομένου ότι το βακτήριο *P. fragi* χρειάζεται σίδηρο για την επιβίωση και περαιτέρω ανάπτυξή τους, βοηθά στην ανάπτυξη του βακτηρίου *L. monocytogenes* και την χρησιμοποιούν ως πηγή σιδήρου (Naik et.al., 2017). Στη συγκαλλιέργεια mix2 παρατηρήθηκε ότι και στις δύο θερμοκρασίες επώασης οι δύο μικροοργανισμοί λειτούργησαν ανταγωνιστικά, με το βακτήριο *P. fragi* να κυριαρχεί έναντι του παθογόνου *S. Enteritidis*, με εξαίρεση την επιφάνεια με τα εναποθετημένα νανοσωματίδια αργύρου σε θερμοκρασία 25 °C όπου οι δύο μικροοργανισμοί αναπτύχθηκαν το ίδιο. Όμως, στην θερμοκρασία 15 °C παρατηρήθηκε ότι το παθογόνο *S. Enteritidis* μειώθηκε αρχικά κατά περίπου 1.5 λογάριθμοι ενώ η ανάπτυξη του βακτηρίου *P. fragi* δεν ήταν πολύ μεγάλη.

Λόγω του ότι στις δύο μικτές καλλιέργειες παρατηρήθηκε σχηματισμός του βιοϋμένιου στη σύνθετη επιφάνεια με τα ενσωματωμένα AgNPs χρησιμοποιήθηκε η χρήση ακτινοβολίας UV για την περαιτέρω απολύμανση και μελέτη της επιφάνειας αυτής σε σύγκριση με τις δύο control επιφάνειες.

Η έκθεση των επιφανειών στην ακτινοβολία UV πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές χρονικές διάρκειες, 10 και 30 min στην κάθε επιφάνεια. Παρατηρήθηκε ότι οι επιφάνειες που είχαν επιμολυνθεί με την συγκαλλιέργεια mix1 παρουσίασαν μετά από 10 min έκθεση στην ακτινοβολία UV, σημαντική μείωση του βακτηριακού πληθυσμού του παθογόνου *L. monocytogenes* μέσα στο μικτό βιοϋμένιο στην υπό μελέτη επιφάνεια και για τις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες. Αλλά δεν ήταν αρκετή ώρα για την εξάλειψή του. Με την περαιτέρω έκθεση των επιφανειών κάτω από ακτινοβολία UV παρατηρήθηκε περισσότερη μείωση με αποτέλεσμα την πλήρη εξάλειψη του παθογόνου *L. monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο και την επιβίωση ελάχιστων βακτηριακών κυττάρων του βακτηρίου *P. fragi* στην επιφάνεια με τα ενσωματωμένα AgNPs. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματα προηγούμενης μελέτης (Chorianopoulos et al., 2011), παρατηρείται ότι η ενσωμάτωση των νανοσωματιδίων αργύρου στο λεπτό υμένιο TiO_2 προκαλεί μείωση την έκθεσης τους στην ακτινοβολία UV έως και 30 min για την πλήρη εξάλειψη της *L. monocytogenes*. Για την συγκαλλιέργεια mix2 παρατηρήθηκε ότι από τα πρώτα 10 min έκθεσης στην ακτινοβολία UV είχαμε την πλήρη εξάλειψη του παθογόνου *S. Enteritidis* στις επιφάνειες με AgNPs που είχαν επωαστεί σε θερμοκρασία 15 °C. Αντίθετα,

απαιτήθηκε έκθεση 30 min στην ακτινοβολία UV προκειμένου να εξαλειφθεί πλήρως το παθογόνο *S. Enteritidis* από όλες τις επιφάνειες, με εξαίρεση την επιφάνεια SS που είχε προηγουμένως επωαστεί σε θερμοκρασία 25 °C. Επίσης μετά από έκθεση 30 min σε ακτινοβολία UV, το μικτό βιοϋμένιο που είχε αναπτυχθεί στην επιφάνεια με τα νανοσωματίδια αργύρου (AgNPs) και είχε επωαστεί σε θερμοκρασία 15 °C εξαλείφθηκε τελείως, και δεν ήταν δυνατή η απαρίθμηση κυττάρων τόσο για την *S. Enteritidis* όσο και για την *P. fragi*.

7. Συμπεράσματα

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδειξαν ότι παρά την παρουσία των νανοσωματιδίων αργύρου πάνω σε μία μεταλλική επιφάνεια, εάν υπάρχει μικτή καλλιέργεια δεν επηρεάζεται σημαντικά ο σχηματισμός του βακτηριακού βιοϋμενίου . Σε περίπτωση μονοκαλλιιεργειών και σε χαμηλές θερμοκρασίες όμως μειώνεται η ικανότητα των αρχικών προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων να προσκολληθούν μόνιμα και να αναπτύξουν βιοϋμένια. Αυτό συμβαίνει διότι με την αύξηση της θερμοκρασίας το μέγεθος των νανοσωματιδίων αυξάνεται οπότε το μέγεθος της επιφάνειας μικραίνει με αποτέλεσμα πλέον η αντιβακτηριακή δράση να πραγματοποιείται από τα ιόντα αργύρου που παράγονται λόγω οξείδωσης από τα νανοσωματίδια και όχι από τα ίδια νανοσωματίδια αργύρου. Σε περίπτωση μη αυξημένης παραγωγής ιόντων αργύρου , η αντιβακτηριακή δράση ελαττώνεται με αποτέλεσμα τα επιζώντα προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα να αναπτύσσουν βιοϋμένια για την ανάπτυξη και την επιβίωσή τους. Με τη χρήση UV επιτυγχάνεται περαιτέρω η οξείδωση των νανοσωματιδίων αργύρου με αποτέλεσμα να απελευθερώνονται και περισσότερα ιόντα αργύρου από τα νανοσωματίδια αλλά και περισσότερες δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) τόσο από τα νανοσωματίδια αλλά και από το λεπτό υμένιο διοξειδίου του τιτανίου. Τα ROS καθώς και τα ιόντα αργύρου έχουν την ικανότητα να προκαλούν βλάβες στην κυτταρική μεμβράνη και στο DNA των βακτηριακών κυττάρων με αποτέλεσμα τον κυτταρικό θάνατο.

Η συνέχεια της μελέτης αυτής είναι να βρεθεί μία μέθοδος που θα προσδίδει στα νανοσωματίδια αργύρου περισσότερη χημική σταθερότητα για την καλύτερη απόδοσή τους όταν συνδυάζεται με το τιτάνιο ή άλλα μέταλλα που χρησιμοποιούνται στις βιομηχανίες τροφίμων . Καθώς και η περαιτέρω μελέτη της αντιβακτηριακής δράσης τους σε περισσότερους μικροοργανισμούς και η μείωση της τοξικότητάς τους στον άνθρωπο. Επίσης, μία άλλη σκέψη είναι ότι τα νανοσωματίδια αργύρου μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως βιοαισθητήρες για την ανίχνευση ειδικών παραγόμενων ουσιών των βακτηρίων, ως μία ταχεία μέθοδος ανάλυσης και ανίχνευση μικροοργανισμών σε μία βιομηχανία τροφίμων .

Βιβλιογραφία:

1. Mouhoub, A., Guendouz, A., Belkamel, A. (2022) Assessment of the antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activities of essential oils for potential application of active chitosan films on food preservation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38, 179.
2. Kebbi, Y., Muhammad, A. I., Anderson, S. S. (2020) Recent advances on the application of UV-Led technology for microbial inactivation: Progress and mechanism', *Comprehensive Reports in food science and food safety*, 19, 3501-3527.
3. Di Ciccio, P., Rubiola, S., Panebianco, F. (2022) Biofilm formation and genomic features of *Listeria monocytogenes* strains isolated from meat and dairy industries located in Piedmont (Italy), *International Journal of Food Microbiology*, 378
4. Public Health England (2015) Identification of *Pseudomonas* species and other non-glucose fermenters, *UK Standards for Microbiology Investigations*, 3, 1-41
5. Chen, W., Honghai, H., Chunjiang, Z. (2017) Adaption response of *Pseudomonas fragi* on refrigerated solid matrix to a moderate electric field, *BMC Microbiology*, 17 (32)
6. Galie, S., Garcia-Gutierrez, C., Miquelez E.M. (2018) Biofilms in food industry: Health Aspects and Control Methods, *Frontiers in Microbiology*, 9, 898
7. Wang, H., Ding, S., Wang, G. (2013) In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combine microscopic and spectroscopic approach, *International Journal of Food Microbiology*, 167, 293-302
8. Willcock, L., Holah, J., Allison, D.G., Gilbert, P. (1997) Populations dynamics in steady-state biofilms: Effects of growth environment upon dispersal', *Biofilms: Community Interactions and Control*, BioLine, 23-32
9. Stoodley, P., Boyle, J.D., Dodds, I., Lappin-Scott, H.M. (1997) Consensus Model of Biofilm Structure, *Biofilms: Community Interactions and Control*, BioLine, 1-10
10. Colagiorgi, A., Ciccio, P.D., Zanardi, E., Ghidini, S., Ianieri, A. (2018) A Look inside the *Listeria Monocytogenes* biofilms extracellular matrix, *Microorganisms*, 4, 22
11. Brauge, T., Faille, C., Sadovskaya, I. (2018) The absence of N-acetylglucosamine in wall teichoic acids of *Listeria monocytogenes* modifies biofilm architecture and tolerance to rinsing and cleaning procedures, *PLoS One*, 1
12. Hebraud, M., Dubois, E., Potier, P., Labadie, J. (1994) Effect of growth temperature on the protein levels in a psychotrophic bacterium *Pseudomonas fragi*, *Journal of Bacteriology*, 13, 4017-4024
13. Muhammad, M.H., Idris, A.L., Xiao, F. (2020) Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches, *Frontiers in Microbiology*, 11, 928
14. Chamberlain, A.H.L., (1997) Matrix Polymers: The key to biofilm processes, *Biofilms: Community Interactions and Control*, BioLine, 41-46
15. Palmer, R.Jr., White, D.C. (1997) Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control, *Trends Microbiology*, 11, 435-440
16. Sulliva, T. (2017) Marine Diatom Settlement on Microtextured Materials in Static field trials, *Journal of Material Science*, 52, 10
17. Berne, C., Ducret, A., Hardy, G.G., Brun, Y.V. (2015) Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacterial, *Microbial Biofilms*, 3, 4

18. Zhang, X., Bishop, P.L. (2003) Biodegradability of Biofilm Extracellular Polymeric Substances, *Chemosphere*, 50 (1), 63-69
19. de Kievit, T.R., Iglewski, B.H. (2000) Bacterial Quorum Sensing in Pathogenic Relationships, *Infection and Immunity*, 68(9), 4839-4849
20. Anderl, J.N., Franklin, M.J., Stewart, P.S. (2000) Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella Pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44(7), 1818-1824
21. Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, J.L., Salmond, G.P.C. (2001) Quorum-sensing in gram-negative Bacteria, *FEMS Microbiology*, 25(4), 365-404
22. Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T. (2016) Environmental factors that shape biofilm formation, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 80(1), 7-12
23. Karimi, A., Karig, D., Kumar, A., Ardekani, A.M. (2015) Interplay of physical mechanism and biofilm processes: review of microfluidic methods, *Royal Society of Chemistry*, 15, 23-42
24. Garnett, J.A. and Matthews, S. (2013) Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective, *Current Protein and Peptide Science*, 13(8), 739-755
25. Sutherland, I.W. (1999) Polysaccharases for microbial exopolysaccharides, *Carbohydrate Polymers* 38(4), 217-230
26. Mulya, E., Waturangi, D.E. (2021) Screening and quantification of anti-quorum sensing and antibiofilm activity of Actinomycetes isolates against food spoilage biofilm-forming bacteria, *BMC Microbiology*, 21(1)
27. Jalali, S., Pacheco-Torgal, F. (2011) Nanotechnology: Advantages and drawbacks in the field of construction and building material, *Construction and Building Materials*, 25(2), 582-590
28. Freestone, I., Meeks, N., Sax, Margaret, Higgitt, C. (2007) The Lycurgus cup-a-Roman nanotechnology, *Gold Bulletin*, 40(4), 270-277
29. Helfin, J., Ventra, M., Evoy, S. (2004) Introduction to Nanoscale Science and Technology, Book, Springer
30. Govindaraj, A., Rao, C.N.R., Vivekchand, S.R.C., Biswas, K. (2007) Synthesis of inorganic nanomaterials, *Dalton Transactions*, 34, 3728-3749
31. Cheon, J., Lee, S.M., Cho, S.N. (2003) Anisotropic shape control of colloidal inorganic nanocrystals, *Advanced Materials*, 15(5), 441-444
32. Sangili, A., Annalakshmi, M., Cheb, S.M., Balasubramanian P. (2019) Synthesis of silver nanoparticles decorated on core-shell structured tannic acid-coated iron oxide nanospheres for excellent electrochemical detection and efficient catalytic reduction of hazardous 4-nitrophenol, *Composites Part B: Engineering*, 162, 33-42
33. Xing, Z., Zhao, T., Xiu, Z., Chen, P. (2018) Synergistic effect of surface plasmon resonance, Ti^{3+} and oxygen vacancy defects on Ag/MoS₂/TiO_{2-x} ternary heterojunctions with enhancing photothermal catalysis for low-temperature waste H₂O degradation, *Journal of Hazardous Materials*, 364, 117-124
34. Lin, J., Hu, J., Wang, W, Liu, K. (2020) Thermo and light-responsive strategies of smart Titanium-containing composite material surface enhancing bacterially anti-adhesive properties, *Chemical Engineering Journal*, 407
35. Santo, C.E., Quaranta, D., Grass, G. (2012) Antimicrobial metallic copper surfaces kill *Staphylococcus haenolyticus* via membrane damage, *Microbiology Open*, 1(1), 46-52

36. Pontin, K.P., Borges, K.A., Furian, T.Q. (2020) Antimicrobial activity of copper surfaces against biofilm formation by *Salmonella Enteritidis* and its potential application in the poultry industry, *Food Microbiology*, 94
37. Mahboob, S., Nivetha, R., Gopinath, K. (2020) Facile synthesis of gold and platinum doped titanium oxide nanoparticles for antibacterial and photocatalytic activity: A photodynamic approach, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 33
38. Falaras, P., Pelaez, M., Nolan, N.T., Pillai, S.C. (2012) A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications, *Applied Catalysis B: Environmental*, 125, 331-349
39. Falaras, P., Athanasekou, C.P., Moustakas, N.G. (2015) Ceramic photocatalytic membranes for water filtration under UV and visible light, *Applied Catalysis B: Environmental*, 178, 12-19
40. Prakash, J., Sun, S., Swart, H.C. (2018) Noble metals-TiO₂ nanocomposites: from fundamental mechanisms to photocatalysis, surface enhanced Raman scattering and antibacterial applications, *Applied Materials today*, 11, 82-135
41. Xiaoling, L., Miao, C., Lei, W. (2019) Evaluation survey of microbial disinfection methods in UV-LED water treatment systems, *Science of the Total Environment*, 659, 1415-1427
42. Cadet, J., Douki, T. (2018) Formation of UV-induced DNA damage contributing to skin cancer development, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 17(12), 1816-1841
43. Neugart, S. and Schreiner, M. (2018) UVB and UVA as eustressors in horticultural and agricultural crops, *Scientia Horticulturae*, 234, 370-381
44. Li, W. R., Xie, X.B., Shi, Q.S. (2010) Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles on *Escherichia coli*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 4, 1115-1122
45. Almeida, A.C., Franco, E.A.N. (2015) Application of nanotechnology in food packaging, *Polímeros*, 25, 89-97
46. Liao, C., Li, Y., Tjong, S.C. (2019) Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles, *International Journal of Molecular Science*, 20(2), 449
47. Huang, R., Lei, L., Li, B. (2020) Nanograins on Ti-25Nb-3Mo-2Sn3Zr alloy facilitate fabricating biological surface through dual-ion implantation to concurrently modulate the osteogenic functions of mesenchymal stem cells and kill bacteria, *Journal of Materials Science and Technology*, 73, 31-44
48. Urnukhsaikhon, E., Bold, B.E., Gunbileg, A. (2021) Antibacterial activity and characteristics of silver nanoparticles biosynthesized from *Candus Crispus*, *Scientific Reports*, 11(1)
49. Soby, A. K., (2015) Bactericidal effect of silver nanoparticles: determination of size and shape of triangular silver nanoprisms and spherical silver nanoparticles and their bactericidal effect against *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*, *School of Engineering and Science Nanotechnology*
50. Chorianopoulos, N.G., Tsoukleris, D.S. Panagou E.Z. (2011) Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysis as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing., *Food Microbiology*, 28(1), 164-170
51. Ercolini, D., Casaburi, A. (2010) Different molecular types of *Pseudomonas fragi* have the same overall behavior as meat spoilers, *International Journal of food microbiology*, 142, 120--131

52. Naik, M.M., Bhangui, P., Bhat, C. (2017) The first report on *Listeria monocytogenes* producing siderophores and responds positively to N-acyl homoserine lactone (AHL) molecules by enhanced biofilm formation, *Archives of Microbiology*, 10, 1409-1415