

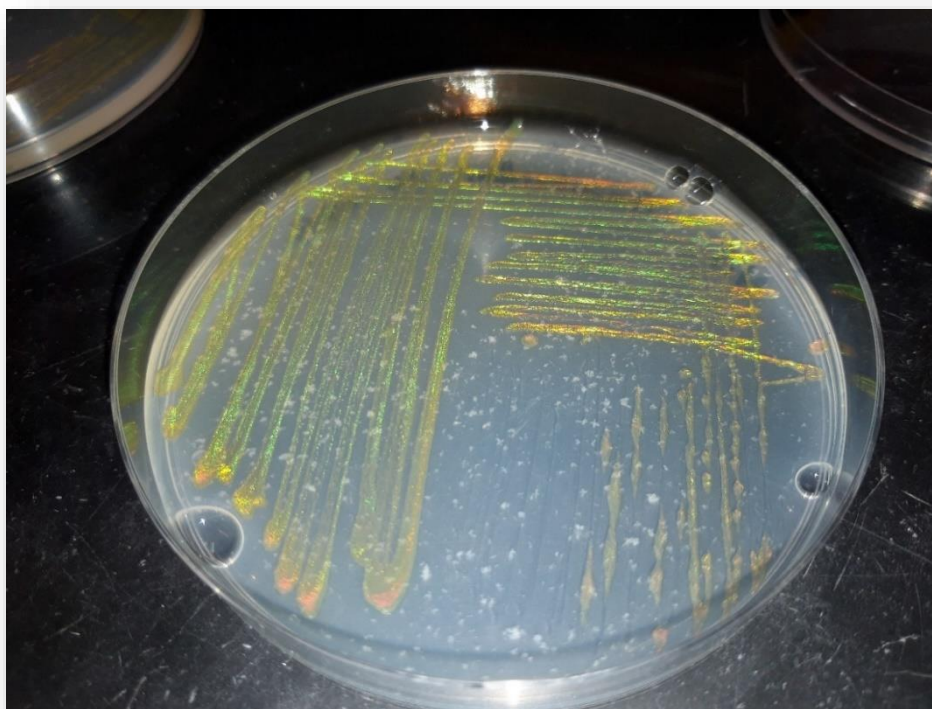


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Ανασκόπηση στα βιοϋμένια και μελέτη της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου από μονοκαλλιέργεια στελεχών στην επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα, υπό τη προσομοίωση θαλάσσιων συνθηκών



Ιωάννης Κ. Ηλιάδης

Επιβλέπων Καθηγητής:

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ 2022

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

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Ανασκόπηση στα βιοϋμένια και μελέτη της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου από μονοκαλλιέργεια στελεχών στην επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα, υπό τη προσομοίωση θαλάσσιων συνθηκών

Review on biofilms and study of the biofilm formation ability of monoculture strains on stainless steel surface under simulated marine conditions

Ιωάννης Κ. Ηλιάδης

Εξεταστική επιτροπή:

Νυχάς Γεώργιος-Ιωάννης, Καθηγητής ΓΠΑ (επιβλέπων)

Πανάγου Ευστάθιος, Καθηγητής ΓΠΑ

Δουλγεράκη Αγάπη, Εντεταλμένη Ερευνήτρια ΙΤΑΠ

Ανασκόπηση στα βιοϋμένια και μελέτη της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου από μονοκαλλιέργεια στελεχών στην επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα, υπό τη προσομοίωση θαλάσσιων συνθηκών

Π.Μ.Σ. Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Περίληψη

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της δημιουργίας βιοϋμενίου από μεμονωμένες καλλιέργειες βακτηρίων σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα, υπό τη προσομοίωση θαλάσσιων συνθηκών. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 25 στελέχη που μπορούν να βρεθούν σε ιχθύες: *Listeria monocytogenes* απομονωμένη από μονάδα επεξεργασίας τροφίμων, *Brochothrix thermosphacta* από κουτσομούρα σε πάγο, *Pseudomonas fluorescens* από ωμό γάλα, *Pseudomonas psychrophila* από μπαρμπούνη, *Pseudomonas gessardii* από γόπα σε πάγο, *Enterobacter aerogenes* από πτύελο, *Salmonella enterica* από τσιπούρα, *Vibrio harveyi* από θαλάσσια προέλευση, *Vibrio atypicus* και *Tenacibaculum discolor* απομονωμένα από Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Για τη δημιουργία βιοϋμενίου από μονή καλλιέργεια μικροοργανισμού, έγινε εμβολιασμός 10^6 κύτταρα/ml σε υδατικό διάλυμα PBS με κουπόνι ανοξειδωτου χάλυβα και αφέθηκαν 3 ώρες στους 15°C (στάδιο προσκόλλησης). Κατόπιν, η ανάπτυξη βιοϋμενίου καταγράφηκε μετά από 48 ώρες επώασης σε θερμοκρασία 25°C και θρεπτικό μέσο Marine Broth (στάδιο ανάπτυξης). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι μικροοργανισμοί σχημάτισαν βιοϋμένιο, από $1,77 - 6,37 \log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$, παρουσιάζοντας μεγάλη απόκλιση στην ικανότητα να προσαρμοστούν σε ένα τέτοιο θαλάσσιο περιβάλλον. Επίσης, στη παρούσα μελέτη έγινε μια ανασκόπηση στα στάδια ανάπτυξης του βιοϋμενίου, στους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη του, στο φαινόμενο της βιοεπίστρωσης και γενικότερα στη βιβλιογραφία για την ανάπτυξη βιοϋμενίου σε θαλάσσιο περιβάλλον. Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, για πρώτη φορά μελετήθηκαν μονοκαλλιέργειες στελεχών στην ικανότητα τους να σχηματίσουν βιοϋμένιο, όπως τα *E. aerogenes*, *V. atypicus* και *T. discolor*, ειδικά υπό τη προσομοίωση θαλάσσιων συνθηκών, σε συνδυασμό με τις συγκεκριμένες θερμοκρασίες επώασης.

Επιστημονική περιοχή: Σχηματισμός βιοϋμενίου

Λέξεις κλειδιά: βιοϋμένιο, ιχθύες, θαλάσσιο περιβάλλον, Marine Broth, βιοεπίστρωση

Review on biofilms and study of the biofilm formation ability of monoculture strains on stainless steel surface under simulated marine conditions

MSc Food Science and Technology

Department of Food Science & Human Nutrition

Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology

Abstract

The purpose of the present study was to test the effectiveness of biofilm formation by individual bacterial cultures on a stainless steel surface, under simulated marine conditions. For this particular study, 25 strains that can be found in fish were used: *Listeria monocytogenes* isolated from a food processing plant, *Brochothrix thermosphacta* from mullet on ice, *Pseudomonas fluorescens* from raw milk, *Pseudomonas psychrophila* from mullet, *Pseudomonas gessardii* from bream on ice, *Enterobacter aerogenes* from sputum, *Salmonella enterica* from bream, *Vibrio harveyi* from marine origin, *Vibrio atypicus* and *Tenacibaculum discolor* isolated from Mediterranean fish farming. To generate biofilm from a single culture of a microorganism, 10^6 cells/ml were inoculated in PBS aqueous solution with a stainless steel coupon and left for 3h at 15°C (adherence stage). Biofilm growth was then recorded after 48 hours of incubation at 25°C in Marine Broth medium (growth stage). The results showed that all microorganisms formed a biofilm, from 1.77 – 6.37 $\log(\text{cfu}/\text{cm}^2)$, showing great variation in the ability to adapt to a marine environment. Also, in the present study, a review was made on the stages of biofilm formation, the factors influencing its development, the phenomenon of biofouling and, in general, the references on biofilm development in a marine environment. According to the available references, for the first time monocultures of strains were studied in their ability to form biofilm, such as *E. aerogenes*, *V. atypicus* and *T. discolor*, especially under simulated marine conditions, combined with specific incubation temperatures.

Scientific area: Biofilm formation

Keywords: biofilm, fish, marine environment, Marine Broth, biofouling

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση του πειραματικού πρωτοκόλλου της παρούσας διπλωματικής εργασίας έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέπων καθηγητή της διπλωματικής μου εργασίας κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά για την ανάθεση της συγκεκριμένης εργασίας, την εμπιστοσύνη και την κατανόηση που έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας και της πανδημίας του covid-19. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Πανάγου Ευστάθιο και τη Δρ. Δουλγεράκη Αγάπη, οι οποίοι είναι στην τριμελή επιτροπή της παρούσας διπλωματικής, για τον χρόνο που διέθεσαν στην αξιολόγηση της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την διδάκτορα Ειρήνη Σχοινά, που επέβλεπε την πορεία μου τόσο στο εργαστήριο, όσο και κατά την συγγραφή της διπλωματικής εργασίας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω και τους υπόλοιπους καθηγητές και το προσωπικό του εργαστηρίου για την κατανόηση και την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, είναι πολύ σημαντικό να εκφράσω την τεράστια ευγνωμοσύνη μου στην οικογένεια και τους φίλους μου, καθώς χωρίς την υποστήριξη τους δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση του μεταπτυχιακού προγράμματος και της παρούσας εργασίας.

«Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της»

Περιεχόμενα

Πίνακας εικόνων & πινάκων.....	8
Πίνακας Γραφημάτων.....	9
1.Εισαγωγή.....	11
1.1. Ιστορική ανασκόπηση και ορισμός.....	11
1.2 Γενικές πληροφορίες για τη δημιουργία και ανάπτυξη βιοϋμενίου.....	12
1.3 Ο ρόλος των EPS στο βιοϋμένιο.....	14
1.4 Κύκλος ζωής βιοϋμενίου.....	16
1.5 Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη προσκόλληση.....	18
1.5.1. Επιφάνεια Πρόσδεσης.....	19
1.5.2. Μικροβιακό Στέλεχος.....	20
1.5.3. Παραγωγή εξωπολυσακχαρίτη (EPS).....	20
1.5.4. Θερμοκρασία.....	21
1.5.5. Αλατότητα.....	22
1.5.6. Surface Conditioning.....	22
1.5.7. Οξύτητα.....	23
1.5.8. Παρουσία άλλων στελεχών.....	23
1.6. Σχηματισμός ώριμου βιοϋμενίου.....	24
1.7. Δημιουργία βιοϋμενίων σε θαλάσσιες συνθήκες.....	26
2. Πειραματικό μέρος.....	31
3. Υλικά και Μέθοδοι.....	32
3.1. Μέθοδοι ανάπτυξης και ανάλυσης βιοϋμενίων.....	32
3.2. Βακτηριακά Στελέχη.....	34
3.3. Θρεπτικά Υλικά και Διαλύματα.....	36
3.4. Πειραματικό πρωτόκολλο.....	37

3.4.1. Προετοιμασία εμβολίου.....	37
3.4.2. Πρωτόκολλο σχηματισμού βιοϋμενίου στην επιφάνεια κουπονιών ανοξειδωτου χάλυβα.....	40
3.4.3. Δειγματοληψία και καταμέτρηση βιοϋμενικών κυττάρων.....	42
4. Αποτελέσματα.....	45
4.1. Εμβόλιο.....	45
4.2. Σχηματισμός βιοϋμενίου μετά από 3 ώρες επώασης (στάδιο προσκόλλησης)...	47
4.3. Σχηματισμός βιοϋμενίου μετά από 48 h επώασης (στάδιο ανάπτυξης).....	49
4.4. Σχηματισμός βιοϋμενίου μετά από 3 και 48 ώρες επώασης.....	52
5. Συζήτηση αποτελεσμάτων.....	55
6. Βιβλιογραφία.....	62

Πίνακας εικόνων & πινάκων

Εικόνα 1: Δομή βιοϋμενίου, Copyright Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Mont (Καμαρινού, 2018).....	13
Πίνακας 1: Λειτουργίες EPS σε βακτηριακά βιοϋμένια. Πιστή μετάφραση πίνακα από την δημοσίευση των Flemming & Wingender (2010)	15
Εικόνα 2: Διαδικασίες που διέπουν το σχηματισμό βιοϋμενίου (Breyers & Ratner, 2004).....	18
Εικόνα 3: Στάδια σχηματισμού βιοϋμενίου. Φάσεις 1η Πρόσδεση, 2η Συσσώρευση, 3η Ωρίμανση, 4η Διασπορά. Πηγή: https://onelife-biofilmfree.com/page/biofilm-education	24
Εικόνα 4 : Παραδείγματα θαλάσσιων πολυφαινολικών συστατικών με ιδιότητες antifouling (Vilas-Boas et. al., 2017).....	28
Πίνακας 2: Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρούσα μελέτη.....	34
Εικόνα 5 : Έλεγχος καλλιέργειας διατήρησης (stock culture) για επιμολύνσεις, μέσω spreading σε τρυβλία με TSA.....	38
Εικόνα 6: Η καλλιέργεια εργασίας σε falcon πριν και μετά από την επώαση στη βέλτιστη θερμοκρασία για 18h.....	39
Εικόνα 7: Στατώ με falcon των 15 ml, τα οποία περιέχουν 6 ml PBS και 10 γυάλινα σφαιρίδια και οι αντίστοιχοι δοκιμαστικοί σωλήνες με 9 ml PBS για τις διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις.....	42
Εικόνα 8: Επώαση πολλαπλών στελεχών στη βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνο σε επωαστήρα του εργαστηρίου.....	43
Πίνακας 3: Ο αρχικός πληθυσμός (cfu/ml) των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρούσα μελέτη.....	46
Πίνακας 4: Τα στελέχη, ο βιοϋμενικός πληθυσμός τους (log cfu/cm ²) μετά το στάδιο της προσκόλλησης και της ανάπτυξης, αλλά και η αύξηση/μείωση που παρουσίασαν από το ένα στάδιο στο άλλο.....	54

Πίνακας Γραφημάτων

Διάγραμμα 1: Ο αρχικός πληθυσμός του εμβολίου για κάθε στέλεχος (log cfu/ml). Τα στελέχη, στα οποία έγινε επανάληψη της διαδικασίας, έχουν (2) δίπλα στην ονομασία τους. Όπου: *Listeria monocytogenes* (B164, B165 και B166), *Brochothrix thermosphacta* (B112, B113, B116 και B119), *Pseudomonas fluorescens* (B218, B219 και B220), *Pseudomonas psychrophila* (B55 και B155), *Pseudomonas gessardii* (B47 και B49), *Pseudomonas fragi* (B34 και B209), *Shewanella baltica* (B70), *Shewanella putrefaciens* (B65 και B66), *Enterobacter aerogenes* (B9), *Salmonella enterica* (B52 και B452), *Vibrio harveyi* (B177), *Vibrio atypicus* (V.) και *Tenacibaculum discolor*. (B487).....45

Διάγραμμα 2: Ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (log cfu/cm²) ανά στέλεχος, τα οποία σχημάτισαν βιοϋμένιο στην επιφάνεια κουπονιών AX μετά από 3 ώρες επώαση στους 15 °C. Για τα στελέχη στα οποία έγινε επανάληψη της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Όπου: *Listeria monocytogenes* (B164, B165 και B166), *Brochothrix thermosphacta* (B112, B113, B116 και B119), *Pseudomonas fluorescens* (B218, B219 και B220), *Pseudomonas psychrophila* (B55 και B155), *Pseudomonas gessardii* (B47 και B49), *Pseudomonas fragi* (B34 και B209), *Shewanella baltica* (B70), *Shewanella putrefaciens* (B65 και B66), *Enterobacter aerogenes* (B9), *Salmonella enterica* (B52 και B452), *Vibrio harveyi* (B177), *Vibrio atypicus* (V.) και *Tenacibaculum discolor*. (B487).....48

Διάγραμμα 3: Ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων (log cfu/cm²) ανά στέλεχος, τα οποία σχημάτισαν βιοϋμένιο στην επιφάνεια κουπονιών AX μετά από 48 ώρες επώαση στους 25 °C. Για τα στελέχη στα οποία έγινε επανάληψη της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Όπου: *Listeria monocytogenes* (B164, B165 και B166), *Brochothrix thermosphacta* (B112, B113, B116 και B119), *Pseudomonas fluorescens* (B218, B219 και B220), *Pseudomonas psychrophila* (B55 και B155), *Pseudomonas gessardii* (B47 και B49), *Pseudomonas fragi* (B34 και B209), *Shewanella baltica* (B70), *Shewanella putrefaciens* (B65 και B66), *Enterobacter*

aerogenes (B9), *Salmonella enterica* (B52 και B452), *Vibrio harveyi* (B177), *Vibrio atypicus* (V.) και *Tenacibaculum discolor*. (B487).....50

Διάγραμμα 4: Συγκριτική απεικόνιση της βιοϋμενικής ανάπτυξης στην επιφάνεια AX για κάθε στέλεχος, μετά την επώαση στους 15°C για 3h σε PBS και στους 25 °C για 48h σε MB. Με πορτοκαλί παρουσιάζεται η ανάπτυξη του βιοϋμενίου μετά από 3h επώασης στους 15°C, ενώ με πράσινο χρώμα η ανάπτυξη βιοϋμενίου μετά από 48h επώασης στους 25 °C. Για τα στελέχη στα οποία έγινε επανάληψη της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Όπου: *Listeria monocytogenes* (B164, B165 και B166), *Brochothrix thermosphacta* (B112, B113, B116 και B119), *Pseudomonas fluorescens* (B218, B219 και B220), *Pseudomonas psychrophila* (B55 και B155), *Pseudomonas gessardii* (B47 και B49), *Pseudomonas fragi* (B34 και B209), *Shewanella baltica* (B70), *Shewanella putrefaciens* (B65 και B66), *Enterobacter aerogenes* (B9), *Salmonella enterica* (B52 και B452), *Vibrio harveyi* (B177), *Vibrio atypicus* (V.) και *Tenacibaculum discolor*. (B487).....52

1. Εισαγωγή

1.1. Ιστορική ανασκόπηση και ορισμός

Το γεγονός ότι οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε εκτεθειμένες επιφάνειες οδήγησε σε μελέτες και ανακαλύφθηκε ότι οι μικροοργανισμοί που συνυπάρχουν σε μια επιφάνεια, προσκολλώνται σε αυτή με ειδικούς μηχανισμούς και αναπτύσσουν βιοϋμένια. Η πρώτη παρατήρηση αυτού του φαινομένου πραγματοποιήθηκε από τον Antonie van Leeuwenhoek με τη χρήση απλού μικροσκοπίου στην επιφάνεια των δοντιών. Οι Heukelekian & Heller (1940) παρατήρησαν για πρώτη φορά την ανάπτυξη βακτηριών και την ενσωμάτωση σε επιφάνειες στους θαλάσσιους μικροοργανισμούς, ενώ ο Zobell (1943) παρατήρησε ότι ο αριθμός των βακτηριών στις επιφάνειες ήταν δραματικά υψηλότερος σε σχέση με τον μέσο ορό που υπήρχε στο θαλασσινό νερό.

Η μελέτη των βιοϋμενίων επεκτάθηκε από τους Jones et al. (1969) με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης, εφόσον τα δείγματα μπορούσαν να παρατηρηθούν σε μεγαλύτερη μεγέθυνση. Με τη χρήση ενός ειδικού πολυσακχαρίτη - κόκκινο ρουθίνιο και σύζευξη αυτού με τετροξείδιο του οσμίου, οι ερευνητές μπόρεσαν επίσης να δείξουν ότι το υλικό της μήτρας που περιβάλλει και περικλείει τα κύτταρα σε μορφή βιοϋμενίου ήταν πολυσακχαρίτης. Αργότερα μελετήθηκε η μικροβιακή μορφολογία σε συστήματα βιομηχανικού νερού, η οποία ανέδειξε ότι ήταν εξαιρετικά ανθεκτικά στα απολυμαντικά, όπως το χλώριο (Characklis, 1973). Από το 1978 με βάση την ερευνά των Costerton et al. (1978), οι οποίοι εξηγήσαν τη λειτουργία και τη δομή των βιοϋμενίων, δόθηκε μεγαλύτερη έμφαση στη σημαντικότητα της περαιτέρω μελέτης των βιοϋμενίων στο περιβάλλον. Η ερευνά στηρίχτηκε στη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης αλλά και στις πρότυπες τεχνικές μικροβιολογικής καλλιέργειας, δίνοντας μια σαφή εικόνα για τη δομή, λειτουργία και ανάπτυξη των βιοϋμενίων (Donlan, 2002; Τσουμαλάκου, 2016).

Τα βιοϋμένια είναι μια κοινότητα, που αποτελείται από μικροβιακά κύτταρα, τα οποία είναι συνδεδεμένα με ένα υπόστρωμα ή μεσεπιφάνεια ή μεταξύ τους, περικλείονται σ' ένα υλικό εξωκυττάρων πολυμερών ουσιών που τα ίδια παράγουν και παρουσιάζουν διαφορετικό φαινότυπο όσον αφορά το ρυθμό αύξησης και τη γονιδιακή έκφραση (Donlan & Costerton, 2002). Η παρουσία τους έχει παρατηρηθεί

σε διάφορες επιφάνειες όπως στους σωλήνες της βιομηχανίας τροφίμων, σε σωλήνες παροχής πόσιμου νερού και σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων (Donlan, 2002).

1.2. Γενικές πληροφορίες για τη δημιουργία και ανάπτυξη βιοϋμενίου

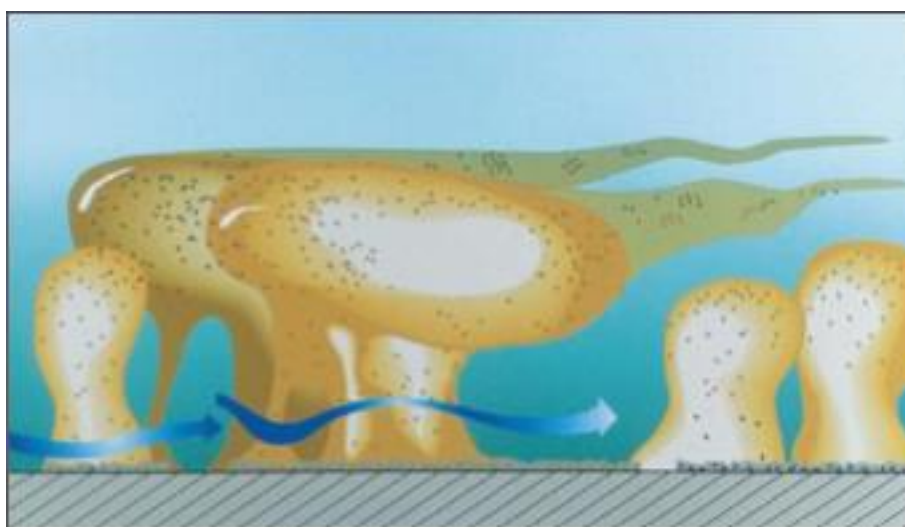
Τα έτη 1978 με 1990 επικρατούσε ως κοινή αντίληψη ότι οι δομές αυτές ήταν “πλάκες” (slabs) οργανικού υλικού, μέσα στις οποίες βρίσκονται τυχαία ενσωματωμένα ακινητοποιημένα (sessile) βακτήρια, μέχρι την παρατήρηση τους με μικροσκόπιο σάρωσης με λέιζερ CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy). Τα κύτταρα αυτά τα ονόμασαν πλαγκτονικά. Το 1987 έγινε η πρώτη παρατήρηση ζωντανού βιοϋμενίου και έκτοτε διάφοροι ορισμοί έχουν προκύψει.

Τα βιοϋμένια είναι ανομοιογενή, τόσο στη σύσταση τους από σημείο σε σημείο, όσο και κατά το πέρασμα του χρόνου. Η ακριβής χημεία και φυσιολογία των βιοϋμενίων ποικίλει και σχετίζεται με τη φύση των μικροοργανισμών και το περιβάλλον στο οποίο διαβιώνουν. (Lewandowski, 2000). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από παθογόνους μικροοργανισμούς στο περιβάλλον μπορεί να παίξει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση των εν λόγω παθογόνων μικροοργανισμών. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που δραστηριοποιούνται στο βιοϋμένιο προκαλούν ασθένειες μέσω της διασποράς ενός μεγάλου αριθμού κυττάρων, που στη συνέχεια δημιουργούν μόλυνση (Huq et al., 2008).

Τα βιοϋμένια είναι παρόντα σε πολλά οικοσυστήματα, συμπεριλαμβανομένων των ευκαρυωτικών ιστών, καθώς και επιφάνειες φυσικής ή ανθρωπογενής προελεύσεως (Costerton et al., 1994). Είναι αρκετοί οι τομείς, οι οποίοι είναι γνωστό πως επηρεάζονται αρνητικά με τη παρουσία βιοϋμενίων. Αρχικά, στην ιατρική με ασθένειες όπως η πνευμονία λόγω κυστικής ίνωσης, η λοίμωξη του ουροποιητικού συστήματος, η βακτηριακή ενδοκαρδίτιδα, η ωτίτιδα, η περιοδοντίτιδα και οι επιμολύνσεις των ιατρικών συσκευών. Επιπλέον, στο περιβάλλον με τα βιοϋμένια που σχηματίζονται στις σωληνώσεις του νερού προκαλώντας ασθένειες, οι οποίες μεταδίδονται μέσω της κατανάλωσης του νερού. Εξίσου σημαντική επίδραση έχουν και στα θαλάσσια μέσα μεταφοράς με τη μορφή βιοεπίστρωσης στα έρμα των πλοίων. Το φαινόμενο αυτό προκαλεί αυξημένη τριβή

κατά τη κίνηση του πλοίου με αποτέλεσμα να αυξάνει τη κατανάλωση καυσίμων και να μειώνει την ταχύτητα του μέσου (Donlan & Costerton, 2002).

Μέσα σε ένα βιοϋμένιο υπάρχει μία βασική δομική μονάδα που λέγεται μικροαποικία (microcolony). Αυτές οι μικροαποικίες, σε σχέση με την ύπαρξή τους σε ένα ανεπτυγμένο βιοϋμένιο, εσωκλείονται σε μία “μήτρα”. Μπορεί να είναι ένα είδος κυττάρων ή πολλών ειδών. Τα κύτταρα που είναι μέσα στη μήτρα δεν κινούνται με κινήσεις Brown και η δομή τους συχνά μοιάζει με μανιτάρι (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Δομή βιοϋμενίου, Copyright Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman, Mont (Καμαρινού, 2018).

Οι πληθυσμοί των μικροοργανισμών που αναπτύσσονται στη “μήτρα” αποτελούν το 10-25% του βιοϋμενίου, ενώ το υπόλοιπο 75-90% είναι το υλικό της. Μέσα στις δομές αυτές υπάρχουν κανάλια ύδατος που συμβάλλουν στην ανάπτυξη, διατήρηση και ωρίμανση του βιοϋμενίου με τη μεταφορά των θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου και αντιμικροβιακών παραγόντων. Η μορφή μοιάζει με τις τρύπες που έχουν τα σφουγγάρια της θάλασσας (Costerton, 1999).

Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί στη Γη διαβιούν σε ποικίλα συσσωματώματα τα οποία αναφέρονται με τον όρο βιοϋμένια και αποτελούν την πιο επιτυχημένη μορφή ζωής στον πλανήτη. Παθογόνοι μικροοργανισμοί, ακόμα και κάτω από το όριο ανίχνευσης, μπορούν να προσκολληθούν στα βιοϋμένια, τα οποία λειτουργούν ως αποθήκες βακτηρίων και πηγή επαναλαμβανόμενων μολύνσεων του

νερού. Επιπρόσθετα, τα βιοϋμένια υποστηρίζουν τους υπόλοιπους κρίκους της τροφικής αλυσίδας, επιτρέποντας την παρουσία και την ανάπτυξη πρωτόζων και ασπόνδυλων ζώων (Wingender & Flemming, 2011). Οι οργανισμοί σχηματίζουν συναθροίσματα, τα οποία συνδέονται αντιστρεπτά με τις επιφάνειες και δημιουργούν ένα δίκτυο εξωκυττάρων πολυμερών ουσιών (extracellular polymeric substances EPS), οι οποίες προέρχονται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς (Donlan, 2002; Hall-Stoodley et al., 2004).

1.3. Ο ρόλος των EPS στο βιοϋμένιο

Το βιοϋμένιο αποτελείται από μια συνάθροιση μικροβιακών κυττάρων που περιβάλλονται από εξωκυτταρική πολυσακχαριδική μεμβράνη, η οποία εκκρίνεται από τα κύτταρα αυτά. Η δομική ακεραιότητα που το χαρακτηρίζει και η δυσκολία στη διατάραξη του οφείλεται σε αυτή την εξωτερική μεμβράνη που παράγεται από τα συστατικά των κυττάρων. Οι εξωτερικές μεμβράνες διαφέρουν από βιοϋμένιο σε βιοϋμένιο και παίζουν σημαντικό ρολό στην οργάνωση της κοινότητας (Branda et al., 2005).

Το κοινό χαρακτηριστικό όλων των βιοϋμενίων είναι ότι οι οργανισμοί βρίσκονται βυθισμένοι σε μία μήτρα (matrix) εξωκυττάρων πολυμερών ουσιών (EPS) μικροβιακής προελεύσεως (Flemming, 2002). Το δίκτυο των EPS αλληλοεπιδρά με το περιβάλλον και είναι υπεύθυνο για την απομάκρυνση διαλυμένων ενώσεων και τη δέσμευσή τους στο βιοϋμένιο, παρέχοντας έτσι θρεπτικά συστατικά στους μικροοργανισμούς (Flemming et al., 2007).

Τα βιοϋμένια αποτελούνται κυρίως από μικροβιακά κύτταρα και εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS). Οι EPS ευθύνονται για το 50-90% του ολικού οργανικού άνθρακα του βιοϋμενίου (Flemming et al., 2000) και μπορούν να θεωρηθούν το κύριο υλικό της μεμβράνης του βιοϋμενίου. Οι EPS από βιοϋμένιο σε βιοϋμένιο συνήθως διαφέρουν σε χημικές και φυσικές ιδιότητες, αλλά αποτελούνται κυρίως από πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες που σχηματίζουν στρώματα υδρογέλης (Wingender et al., 1999). Η ζωή μέσα στο δίκτυο των EPS προσφέρει πλεονεκτήματα στους μικροοργανισμούς. Μερικοί από αυτούς τους πολυσακχαρίτες είναι ουδέτεροι ή πολυ-ανιονικοί, όπως είναι, για παράδειγμα, η περίπτωση των EPS στα αρνητικά

κατά Gram βακτηρία. Η παρουσία των ουρονικών οξέων (όπως δ-γλυκουρονικό, δ-γαλακτουρονικό, και μαννουρονικό οξύ) ή πυρουβικά οξέα συνδεδεμένα με ακεταλικούς δεσμούς, ενισχύει τις ανιονικές ιδιότητες (Τσουμαλάκου, 2016).

Αυτή η ιδιότητα είναι σημαντική, καθώς επιτρέπει τη σύνδεση των δισθενών κατιόντων όπως το ασβέστιο και το μαγνήσιο, τα οποία έχει αποδειχθεί ότι συνδέονται εγκάρσια με το στρώμα του πολυμερούς, παρέχοντας μεγαλύτερη δεσμευτική ισχύ στα ώριμα βιοϋμένια (Flemming et al., 2000). Στην περίπτωση ορισμένων Gram-θετικών βακτηριών, όπως ο σταφυλόκοκκος, η χημική σύνθεση των EPS δύναται να είναι αρκετά διαφορετική και μπορεί να περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο κατιόντα. Άλλες EPS μπορεί να είναι πιο ευκολά διαλυτές στο νερό. Επίσης, οι EPS του βιοϋμενίου, γενικά, δεν εμφανίζουν ομοιομορφία ως προς τη χωρική και χρονική κατανομή (Leriche et al., 2000).

Ακολουθεί πίνακας (Πίνακας 1), στον οποίο παρουσιάζονται συνοπτικά οι λειτουργίες των EPS στα βακτηριακά βιοϋμένια.

Λειτουργία	Συσχέτιση με βιοϋμένιο	Εμπλεκόμενα EPS
Προσκόλληση	Επιτρέπει τα αρχικά βήματα στον αποικισμό αβιοτικών και βιοτικών επιφανειών από πλαγκτονικά κύτταρα και τη μακροχρόνια προσκόλληση ολόκληρων βιοϋμενίων σε επιφάνειες.	Πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, DNA και αμφίφιλα μόρια
Συσώρευση βακτηριακών κυττάρων	Επιτρέπει τη γεφύρωση μεταξύ κυττάρων, την προσωρινή ακινητοποίηση βακτηριακών πληθυσμών, την ανάπτυξη υψηλών κυτταρικών πυκνοτήτων και την αναγνώριση κυττάρου-κυττάρου.	Πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και DNA
Συνοχή βιοϋμενίου	Σχηματίζει ένα δίκτυο ενυδατωμένου πολυμερούς (μήτρα βιοϋμενίου), μεσολαβώντας στη μηχανική σταθερότητα των βιοϋμενίων και, μέσω της δομής των EPS, καθορίζοντας την αρχιτεκτονική του βιοϋμενίου.	Ουδέτεροι και φορτισμένοι πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και DNA
Κατακράτηση νερού	Διατηρεί ένα εξαιρετικά ενυδατωμένο μικροπεριβάλλον γύρω από τους μικροοργανισμούς, οδηγώντας στην ανοχή τους στην αποξήρανση.	Υδρόφιλοι πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες
Προστατευτικό φράγμα	Προσφέρει ανθεκτικότητα σε άμυνες του ξενιστή κατά τη διάρκεια της μόλυνσης και προσδίδει ανοχή σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες, καθώς και προστατεύει την κυανοβακτηριακή νιτρογενάση από τις βλαβερές επιδράσεις του οξυγόνου και προστατεύει από κάποια πρωτόζωα βόσκησης.	Πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες
Απορρόφηση οργανικών ενώσεων	Επιτρέπει τη συσώρευση θρεπτικών συστατικών από το περιβάλλον και την απορρόφηση ξενοβιοτικών (συμβάλλοντας έτσι στην αποτοξίνωση του περιβάλλοντος).	Πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες

Απορρόφηση ανόργανων ενώσεων	Πρωθεί το σχηματισμό γέλης πολυσακχαρίτη, την ανταλλαγή ιόντων, το σχηματισμό μετάλλων και τη συσσώρευση τοξικών ιόντων μετάλλων (συμβάλλοντας έτσι στην αποτοξίνωση του περιβάλλοντος).	Πολυσακχαρίτες και πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων ανόργανων υποκατάστατων όπως φωσφορικά και θειικά
Ενζυμική δραστηριότητα	Επιτρέπει την πέψη εξωγενών μακρομορίων για την απόκτηση θρεπτικών συστατικών και την αποικοδόμηση των EPS, επιτρέποντας την απελευθέρωση κυττάρων από βιομεμβράνες.	Πρωτεΐνες
Πηγή θρεπτικών συστατικών	Παρέχει μια πηγή ενώσεων που περιέχουν άνθρακα, άζωτο και φώσφορο για χρήση από τα βιοϋμένια.	Δυνητικά όλα τα είδη EPS
Ανταλλαγή γενετικής πληροφορίας	Διευκολύνει την οριζόντια μεταφορά γονιδίων μεταξύ των βιοϋμενικών κυττάρων.	DNA
Δότης ή δέκτης ηλεκτρονίων	Επιτρέπει τη δραστηριότητα οξειδοαναγωγής στη μήτρα του βιοϋμενίου.	Πρωτεΐνες και, πιθανώς, χουμικές ουσίες
Εξαγωγή κυτταρικών στοιχείων	Απελευθερώνει κυτταρικό υλικό ως αποτέλεσμα του μεταβολικού κύκλου.	Μεμβρανικά κυστίδια που περιέχουν νουκλεϊκά οξέα, ένζυμα, λιποπολυσακχαρίτες και φωσφολιπίδια
Περίσσεια ενέργειας	Αποθηκεύει την περίσσεια άνθρακα κάτω από μη ισορροπημένες αναλογίες άνθρακα προς άζωτο.	Πολυσακχαρίτες
Δέσμευση ενζύμων	Συσώρευση, κατακράτηση και σταθεροποίηση των ενζύμων μέσω της αλληλεπίδρασής τους με πολυσακχαρίτες.	Πολυσακχαρίτες και ένζυμα

Πίνακας 1: Λειτουργίες EPS σε βακτηριακά βιοϋμένια. Πιστή μετάφραση πίνακα από την δημοσίευση των [Flemming & Wingender \(2010\)](#).

1.4. Κύκλος ζωής βιοϋμενίου

Ο [Fletcher \(1980\)](#) περιέγραψε ότι η διαδικασία δημιουργίας ενός βιοϋμενίου μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια: προσκόλληση, σταθεροποίηση και ανάπτυξη-διαίρεση μικροοργανισμών σε μία επιφάνεια. Αντίθετα οι [Characklis & Marshal \(1990\)](#) πρόσθεσαν άλλα πέντε στάδια. Συγκεκριμένα, πρόσθεσαν την αρχική προσκόλληση, με αναστρέψιμη και μη αναστρέψιμη προσκόλληση, την ενδεχόμενη απόσπαση σε ένα ώριμο βιοϋμένιο και τον επακόλουθο σχηματισμό νέων αποικιών.

Το θεμέλιο πάνω στο οποίο αναπτύσσεται ένα βιοϋμένιο αποτελείται, αρχικά, από ένα σύνολο οργανικών και ανόργανων σωματιδίων που λέγεται conditioning layer. Στη συνέχεια οτιδήποτε μπορεί να περάσει μέσα σε ένα υγρό με βαρυτική ή κινητική δύναμη μπορεί να καθιζάνει σε ένα υπόστρωμα και να γίνει μέρος ενός conditioning layer, παρέχοντας έτσι σταθερότητα και θρεπτικά συστατικά για την ανάπτυξη του βιοϋμενίου. Η λεπτή στρώση τροποποιεί τα υποστρώματα

διευκολύνοντας έτσι την προσβασιμότητα των βακτηρίων. Η επιφανειακή τάση, η φόρτιση, το δυναμικό και οι ωσμωτικές αλληλεπιδράσεις μεταβάλλουν το conditioning layer και το υπόστρωμα (Chang & Chang, 2002).

• Προσκόλληση

Η σύνδεση ενός κυττάρου σε ένα υπόστρωμα ονομάζεται προσκόλληση και η σύνδεση μεταξύ κυττάρων λέγεται συνοχή (cohesion). Οι μηχανισμοί πίσω από αυτές τις μορφές προσκόλλησης καθορίζουν τη τελική μορφή και συνοχή του βιοϋμενίου όπως και τις επιμέρους ιδιότητες που θα το χαρακτηρίζουν.

• Αναστρέψιμη προσκόλληση

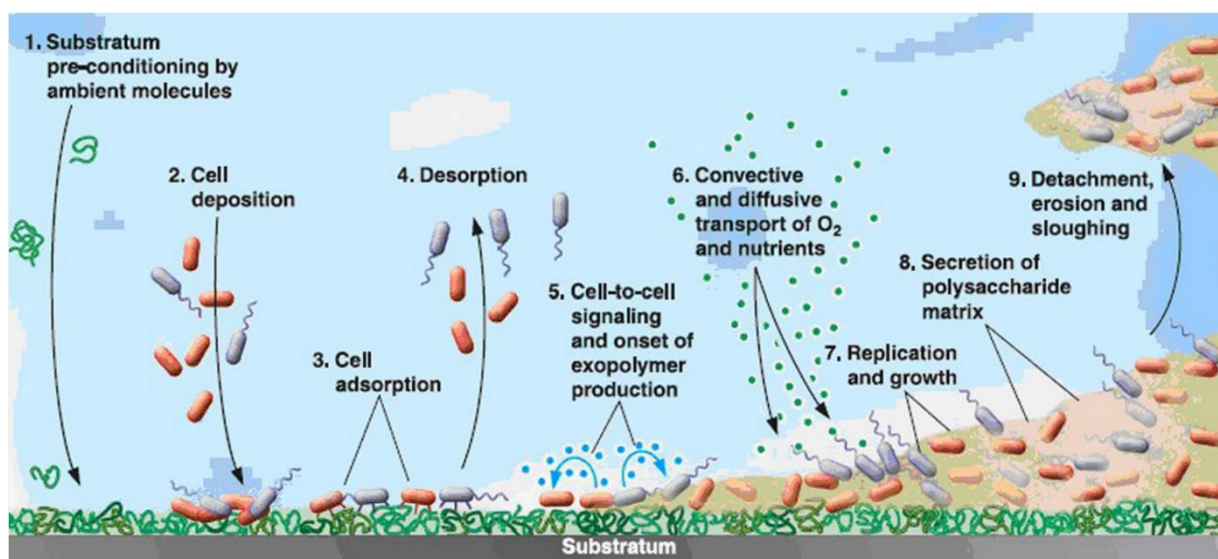
Αρχικά, πλαγκτονικά κύτταρα μικροοργανισμών μεταφέρονται στην επιφάνεια ακούσια ή εκούσια, δηλαδή με φυσικές δυνάμεις ή με αυτοκινησία π.χ. με χρήση βλεφαρίδων και μαστίγιων. Τα κύτταρα προσροφώνται αναστρέψιμα στη πρωταρχική δομή του βιοϋμενίου (conditioning layer) και μπορούν να αποκολληθούν με απωθητικές δυνάμεις, κάτι που λαμβάνει χώρα πριν τη δημιουργία υποστρώματος (Chang & Chang, 2002).

• Μη αναστρέψιμη προσκόλληση

Ορισμένα αναστρέψιμα προσκολλημένα κύτταρα παραμένουν ακινητοποιημένα και απορροφώνται μη αναστρέψιμα. Η προσκόλληση εξαρτάται από τις υδρόφιλες - υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις των επιφανειών. Η προσκόλληση σχετίζεται με τις δυνάμεις Van der Waals, τις στερικές αλληλεπιδράσεις (steric interactions) και την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση, γνωστές ως δυνάμεις DVLO (Derjaguin, Verwey, Landau και Overbeek) (Rutter & Vincent, 1980; Gallardo-Moreno et al., 2002).

Επιπρόσθετα, οι Breyers & Ratner (2004) περιέγραψαν την διαδικασία σχηματισμού του βιοϋμενίου σε εννέα στάδια, όπως περιγράφεται και παρουσιάζεται (Εικόνα 2) παρακάτω: 1) προετοιμασία της επιφάνειας προσκόλλησης από μακρομόρια που είτε υπάρχουν στο υγρό μέσο είτε ήδη επικαλύπτουν την επιφάνεια, 2) μεταφορά πλαγκτονικών κυττάρων από την υγρή φάση στην επιφάνεια

προσκόλλησης, 3) προσκόλληση κυττάρων στην επιφάνεια, 4) διασπορά των αναστρέψιμα προσκολλημένων κυττάρων, 5) μη αναστρέψιμη προσρόφηση των βακτηριακών κυττάρων στην επιφάνεια, 6) παραγωγή διακυτταρικών μορίων σηματοδότησης, 7) μεταφορά υποστρωμάτων προς και εντός του βιοϋμενίου, 8) μεταβολισμός του υποστρώματος από τα βιοϋμενικά κύτταρα και μεταφορά των προϊόντων έξω από το βιοϋμένιο (κυτταρική ανάπτυξη, αντιγραφή και παραγωγή EPS) και 9) απομάκρυνση του βιοϋμενίου από την επιφάνεια κατόπιν αποκόλλησης ή απόρριψης.



Εικόνα 2: Διαδικασίες που διέπουν το σχηματισμό βιοϋμενίου (Breyers & Ratner, 2004).

1.5. Κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη προσκόλληση

Οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν τη προσκόλληση είναι: η επιφάνεια πρόσδεσης, το είδος και το στέλεχος των μικροοργανισμών, η θερμοκρασία, η διαθεσιμότητα αυξητικών παραγόντων και θρεπτικών συστατικών, η πίεση, η αλατότητα και το pH (Chmielewski & Frank, 2003; Van Houdt & Michiels, 2010).

Είναι γνωστό ότι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν σχεδόν σε όλες τις επιφάνειες, αλλά οι ιδιότητες της επιφάνειας και το είδος του μικροοργανισμού επηρεάζουν το χρόνο που απαιτείται για τη διαδικασία προσκόλλησης, όπως και για την αντοχή που θα χαρακτηρίζει το τελικώς σχηματισμένο βιοϋμένιο (Kumar & Anand, 1998; Poulsen, 1999; Van Houdt & Michiels, 2010).

1.5.1. Επιφάνεια Πρόσδεσης

Πρακτικά, όλες οι επιφάνειες που βρίσκονται σε μη αποστειρωμένα περιβάλλοντα, τα οποία προσφέρουν επαρκείς ποσότητες νερού, μπορούν να αποικηθούν από βιοϋμένια, ακόμα και αν αυτά τα περιβάλλοντα χαρακτηρίζονται από αντίξοες συνθήκες, όπως ακραίες τιμές pH, υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλή συγκέντρωση αλατότητας, έντονη ακτινοβολία και πίεση (O'Toole et al., 2000).

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται συχνότερα στο περιβάλλον των ιχθυηρών και γενικότερα των τροφίμων είναι το πλαστικό, το καουτσούκ, το γυαλί και ο ανοξείδωτος χάλυβας. Η ικανότητα διαβροχής και η τραχύτητα μιας επιφάνειας σε συνδυασμό με τη συχνότητα καθαρισμού και απολύμανσης της καθορίζουν την υδροφοβικότητα μιας επιφάνειας, η οποία με τη σειρά της επηρεάζει την προσκόλληση των κυττάρων (Van Houdt & Michiels, 2010). Οι επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα και οι γυάλινες επιφάνειες προάγουν τη βακτηριακή σύνδεση λόγω υψηλής ελεύθερης ενέργειας και της υδρόφιλης φύσης τους. Αντίθετα, τα υλικά νάιλον, καουτσούκ, Teflon, buna-n rubber και φθοριομένα πολυμερή δεν προάγουν τη βακτηριακή σύνδεση γιατί είναι υδρόφοβα (Chmielewski & Frank, 2003; Shi & Zhu, 2009).

Οι αυλακώσεις μιας επιφάνειας όπως του ανοξείδωτου χάλυβα μπορούν να παγιδέψουν βακτήρια συμβάλλοντας με το τρόπο αυτό στο σχηματισμό βιοϋμενίου. Μεγαλύτερες αυλακώσεις έχουν το αλουμίνιο ενώ το νάιλον και το Teflon τις λιγότερες (Kumar & Anand, 1998). Η επιλογή υλικών σε ένα περιβάλλον βιομηχανίας τροφίμων είναι υψίστης σημασίας, για να μη προάγεται ο σχηματισμός βιοϋμενίων (Pérez-Rodríguez et al., 2011; Van Houdt & Michiels, 2010).

Οι Flemming & Ridgway (2009) υποστηρίζουν πως μια ορθή στρατηγική για την παρεμπόδιση ανάπτυξης βιοϋμενίων σε επιφάνειες δεν θα έχει ως στόχο να σκοτώσει όλους τους μικροοργανισμούς σε ένα σύστημα (με τη χρήση βιοκτόνων), αλλά να τους κρατήσει κάτω από ένα όριο παρεμβολής. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί περιορίζοντας τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στην επιφάνεια πρόσδεσης (νερό, υλικά, πρόσθετα κ.λπ.), δίνοντας προτεραιότητα στο καθάρισμα των

επιφανειών έναντι των βιοκτόνων και με αποτελεσματική και αντιπροσωπευτική παρακολούθηση των μέτρων καθαρισμού.

1.5.2. Μικροβιακό Στέλεχος

Τα μαστίγια, οι ίνες και τα τριχίδια είναι δομές στην επιφάνεια των βακτηρίων που συμβάλλουν στο σχηματισμό του βιοϋμενίου. Τα μαστίγια είναι ελικοειδής δομές που εκτείνονται από το κυτταρόπλασμα προς το κυτταρικό τοίχωμα και χαρακτηρίζουν τα βακτήρια με κίνηση. Έτσι, είναι υπεύθυνα για την εξάπλωση και ανάπτυξη των βιοϋμενίων κατά μήκος των επιφανειών. Τα στελέχη *Pseudomonas fluorescens*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* και *Yersinia enterocolitica* έχουν παρατηρηθεί ότι είναι παρόν στην αρχική προσκόλληση και ωρίμανση των βιοϋμενίων (Simões et al., 2010; Van Houdt & Michiels, 2010).

Οι ίνες είναι δομές που βρίσκονται επίσης στην επιφάνεια των βακτηρίων. Παρόλο που δε συμβάλλουν στην κίνηση όπως τα μαστίγια, η παρουσία ειδών που φέρουν ίνες συμβάλλει στη διαδικασία σχηματισμού βιοϋμενίου διάφορων στελεχών όπως τα *Klebsiella pneumoniae*, *Aeromonas caviae*, *Pseudomonas spp.* και *Vibrio spp.* (Simões et al., 2010; Van Houdt & Michiels, 2010).

1.5.3. Παραγωγή εξωπολυσακχαρίτη (EPS)

Οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες (EPS) είναι πολύ ανιονικές ουσίες, οι οποίες παράγονται από ορισμένα κύτταρα και συμβάλλουν στη δημιουργία του βιοϋμενίου, με τη δέσμευση κυττάρων και άλλων υλικών στην επιφάνεια τους (Van Houdt & Michiels, 2010). Συγκεκριμένα περιέχουν πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, φωσφολιπίδια, νουκλειικά οξέα και άλλες πολυμερείς ουσίες που εγκλωβίζουν νερό σε ποσοστό που φτάνει το 95% (Chmielewski & Frank, 2003). Ο πολυσακχαρίτης αυτός ορίζει τη δομή καθώς και τις χαρακτηριστικές ιδιότητες συγκόλλησης και αποκόλλησης του παραγόμενου βιοϋμενίου.

Έχει αποδειχθεί πως τα κύτταρα, τα οποία προσεγγίζουν μια επιφάνεια, δεν χρειάζεται να είναι βιώσιμα για προσκόλληση, καθώς τα ήδη υπάρχοντα EPS στην επιφάνεια αυτή επαρκούν για τη προσκόλληση (Flemming & Schaule, 1988).

Επιπρόσθετα, έχει μελετηθεί από τους [Guezennec et al \(2012\)](#) η ανασταλτική δράση των EPS για την προσκόλληση και τη παραγωγή βιοϋμενίου. Στη παραπάνω μελέτη αξιολογήθηκε η δράση εξωκυττάρων πολυσακχαριτών (EPS) απομονωμένων από θαλάσσια βακτήρια (*Alteromonas*, *Pseudomonas* και *Vibrio* spp.) ως πιθανοί αντιβιορρυπαντικοί παράγοντες. Παρατηρήθηκε ότι η παραγωγή βιοϋμενίου στην επιφάνεια του γυαλιού μειώθηκε κατά περίπου 90%, όταν η επιφάνεια αυτή είχε εμβαπτιστεί προηγουμένως στις EPS, σε σχέση με ένα καθαρισμένο γυάλινο υπόστρωμα.

1.5.4. Θερμοκρασία

Η βέλτιστη θερμοκρασία ενός μικροοργανισμού επηρεάζει το ρυθμό πρόσληψης θρεπτικών συστατικών, της ανάπτυξης του και έτσι του ταχύτερου σχηματισμού βιοϋμενίου. Έχει μελετηθεί αρκετές φορές στο παρελθόν η επίδραση της θερμοκρασίας στην ικανότητα προσκόλλησης/παραγωγής βιοϋμενίου από διάφορους μικροοργανισμούς. Στην έρευνα του [Rao \(2009\)](#) μελετήθηκε η παραγωγή βιοϋμενίου σε πάνελ από πλεξιγκλάς, σε δύο διαφορετικούς σταθμούς φυσικού θαλάσσιου περιβάλλοντος. Ο ένας σταθμός είχε τη φυσική θερμοκρασία της θάλασσας, ενώ ο άλλος είχε ελεγχόμενη θερμοκρασία στους 33,1-38,4°C. Παρατηρήθηκε πως, στο σταθμό με την ελεγχόμενη θερμοκρασία, η αύξηση της θερμοκρασίας του νερού ενίσχυσε το μεταβολισμό και επηρέασε τις περισσότερες από τις παραμέτρους του βιοϋμενίου. Πιο συγκεκριμένα, το βιοϋμένιο που σχηματίστηκε στο σταθμό με την ελεγχόμενη θερμοκρασία ήταν πολύ παχύ στα 113 μm, ενώ στον άλλον σταθμό ήταν μόλις στα 22 μm.

Είναι δύσκολο να προβλεφθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στον σχηματισμό βιοϋμενίου από ένα βακτήριο, καθώς η επίδραση αυτή παρουσιάζει μεγάλες αποκλίσεις, ακόμα και ανάμεσα σε στελέχη του ίδιου είδους. Στην έρευνα των [Iliadis et al. \(2018\)](#) σε δύο διαφορετικά στελέχη *Salmonella enterica*, το στέλεχος ορότυπου *enteritidis* σχημάτισε μέγιστο βιοϋμενικό πληθυσμό στους 34,5°C, ενώ το στέλεχος ορότυπου *typhimurium* στους 13°C. Σε μια αντίστοιχη έρευνα για το σχηματισμό βιοϋμενίου από το βακτήριο *Vibrio parahaemolyticus*, ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο στα θαλασσινά, βρέθηκε ότι οι 25°C ήταν πιο ευνοϊκοί για

το σχηματισμό βιοϋμενίου από τους 15°C και τους 37°C και πως τα παθογόνα στελέχη, κατά μέσο όρο, σχημάτισαν περισσότερο βιοϋμένιο από τα μη παθογόνα στελέχη σε όλες τις θερμοκρασίες που μετρήθηκαν (Song et al., 2017).

1.5.5. Αλατότητα

Η επίδραση του χλωριούχου νατρίου (NaCl) στην ανάπτυξη του βιοϋμενίου έχει αναφερθεί σε πολλά βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των τροφιμογενών παθογόνων, όπως έχει αναφερθεί από τους Jahid et al (2015). Οι περισσότερες μελέτες έδειξαν ότι η παρουσία του NaCl ενισχύει σημαντικά το σχηματισμό βιοϋμενίου. Επίσης, η αλατότητα έχει παρουσιαστεί ως παράγοντας που επηρεάζει την τρισδιάστατη δομή του βιοϋμενίου (Jahid et al., 2015; Wang et al., 2020).

Αντίθετα, στην μελέτη των Iliadis et al. (2018) βρέθηκε πως και για τα δύο στελέχη *S. enterica* που μελετήθηκαν, η παρουσία υψηλής συγκέντρωσης NaCl περιόρισε σημαντικά την ανάπτυξη των βιοϋμενικών κυττάρων. Ο σχηματισμός βιοϋμενίου ευνοήθηκε σε συγκεντρώσεις <4% NaCl, με βέλτιστη συγκέντρωση για την επίτευξη του μέγιστου βιοϋμενικού πληθυσμού τα 0,5-0,7% NaCl. Περαιτέρω αύξηση της αλατότητας, περιόρισε ακόμη περισσότερο το σχηματισμό βιοϋμενίου από τη *S. enterica*, ανεξάρτητα από το pH και τη θερμοκρασία.

Η επίδραση του χλωριούχου νατρίου στον σχηματισμό βιοϋμενίου έχει μελετηθεί αρκετά στο παρελθόν. Ωστόσο, η επίδραση της αλατότητας του θαλασσινού νερού δεν έχει μελετηθεί επαρκώς από καμία διαθέσιμη έρευνα.

1.5.6. Surface Conditioning

Τα περισσότερα είδη επιφανειών, όταν αυτά βυθιστούν σε νερό, αποκτούν αρνητικό φορτίο και έτσι προσελκύουν θρεπτικά συστατικά και άλλες οργανικές ενώσεις. Η διαδικασία αυτή λέγεται surface conditioning (Poulsen, 1999; Zottola & Sasahara, 1994). Αυτή η επιφάνεια μεταβάλλει το φορτίο και επομένως την ικανότητα σύνδεσης (Kumar & Anand, 1998), ενώ ταυτόχρονα διευκολύνει την πιθανότητα δημιουργίας βιοϋμενίου (Jullien et al., 2008; Simões et al., 2010).

1.5.7. Οξύτητα

Οι μεταβολές στο pH έχουν μεγάλη επίδραση στο κύκλο ζωής των κυττάρων και συχνά χρησιμοποιούνται ως απολυμαντικά για την εξουγίανση επιφανειών. Τα ελεύθερα πρωτόνια από το περιβάλλοντα χώρο εισέρχονται παθητικά από τις αντλίες πρωτονίων της κυτταρικής μεμβράνης στο κυτταρόπλασμα, δημιουργώντας έτσι ηλεκτροχημική διαβάθμιση (Rowland, 2003), ενώ όταν οι μεταβολές του pH είναι πολύ μεγάλες έχουν βιοκτόνο δράση στους μικροοργανισμούς. Η βακτηριακή απόκτηση για τη ζυγοστάθμιση πρωτονίων επιτυγχάνεται με τη σύνθεση πρωτεϊνών αντίθετου φορτίου (Olsen, 1993). Αντίθετα, εάν η οξύτητα αυξηθεί βαθμιαία, τα βακτηριακά κύτταρα διαθέτουν τους απαραίτητους μηχανισμούς και μπορούν να προσαρμοστούν (Li, 2001). Ωστόσο, κάποιες από τις ενδοκυττάρια διαδικασίες, όπως είναι η παραγωγή πολυσακχαριτών, επηρεάζεται από τις διακυμάνσεις pH σε επίπεδα που εξαρτώνται από το στέλεχος.

1.5.8 Παρουσία άλλων στελεχών

Στα τρόφιμα και στο περιβάλλον επεξεργασίας τροφίμων οι μικροοργανισμοί υπάρχουν σε μικτές καλλιέργειες και οι αλληλεπιδράσεις αυτών, σε συνδυασμό με τις ουσίες και τις συνθήκες που υπάρχουν στον περιβάλλοντα χώρο, επιτρέπουν ή δυσχεραίνουν το σχηματισμό βιοϋμενίου σύνθετων κοινοτήτων. Ανάλογα με τις ποσοτικές συγκεντρώσεις του κάθε είδους, τα κύτταρα ενός μικροοργανισμού μπορούν να αυξηθούν, να μειωθούν ή να παραμείνουν σταθερά σε συγκέντρωση (Bremer et al., 2001; Habimana et al., 2009; Van der Veen & Abee, 2011; Giaouris et al., 2012). Η σύσταση του θρεπτικού μέσου έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει τη σύσταση των πληθυσμών στα βιοϋμένια (Van der Veen & Abee, 2011).

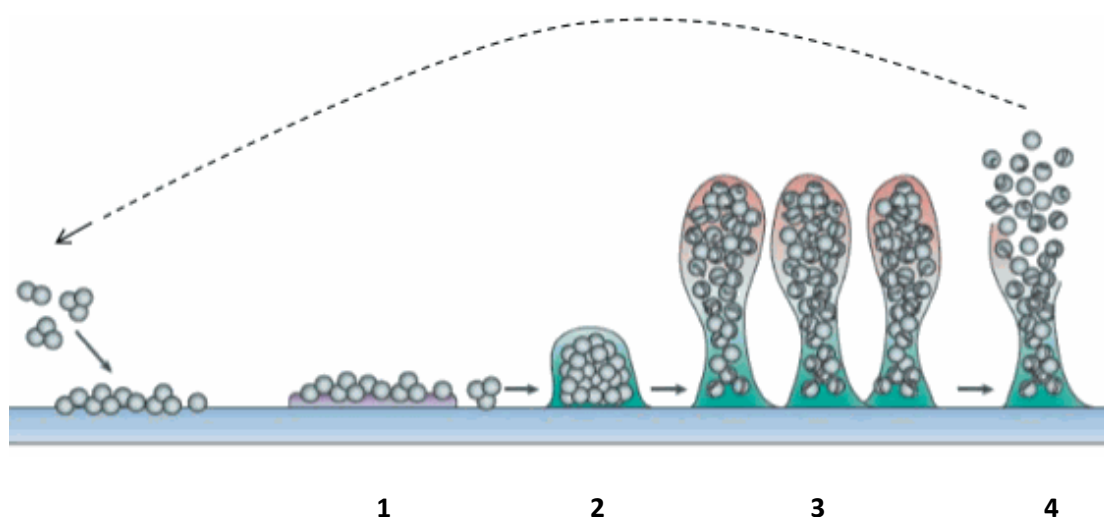
Η εναπόθεση βακτηρίων σε επιφάνειες και η ικανότητα τους να αντιστέκονται σε απολυμαντικές ουσίες, είναι ο λόγος επανεμφάνισης τους σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων. Η επιμονή αυτή μπορεί να οδηγήσει σε ανθεκτικά στο στρες κύτταρα, τα οποία είναι δύσκολο να εξαλειφθούν από τα συγκεκριμένα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων.

Μεμονωμένες καλλιέργειες βιοϋμενίων του *K. pneumoniae* και *P. aeruginosa* σε εργαστήριο είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη λεπτότερου στρώματος (15 μm

και 30 μm , αντίστοιχα), ενώ βιοϋμένιο που περιείχε και τα δυο είδη ήταν πιο παχύ (40 μm). Αυτό θα μπορούσε να οφείλεται στο γεγονός ότι το ένα είδος ενίσχυσε την σταθερότητα του αλλού (Jones et al., 1969; Τσουμαλάκου, 2016).

1.6. Σχηματισμός ώριμου βιοϋμενίου

Κατά τη δυαδική διαίρεση των κυττάρων τα θυγατρικά κύτταρα εξαπλώνονται προς τα έξω και προς τα επάνω από το σημείο προσκόλλησης για να σχηματίσουν ένα σύμπλεγμα (Hall-Stoodley & Stoodley, 2002). Αυτές οι αλληλεπιδράσεις και η ανάπτυξη εντός του βιοϋμενίου δημιουργούν τις ώριμες δομές του, οι οποίες μοιάζουν με μανιτάρι (Εικόνα 3) διευκολύνοντας έτσι τη διέλευση των θρεπτικών συστατικών στο κέντρο του.



Εικόνα3: Στάδια σχηματισμού βιοϋμενίου. Φάσεις 1η Πρόσδεση, 2η Συσσώρευση, 3η Ωρίμανση, 4η Διασπορά. Πηγή: <https://onelife-biofilmfree.com/page/biofilm-education>.

Όταν ικανοποιηθούν οι ιδανικές περιβαλλοντικές συνθήκες για την μικροβιακή κοινότητα, ξεκινάει η εκθετική φάση της ανάπτυξης. Το βιοϋμένιο μπορεί να αποτελείται από μια συνάθροιση διαφορών ειδών μικροοργανισμών, ενώ ο σχηματισμός του είναι μια αναπτυξιακή διαδικασία, που ξεκινά με την έκκριση της εξωκυτταρικής πολυσακχαριδικής μεμβράνης και οδηγεί στον σχηματισμό ενός τρισδιάστατου βιοϋμενίου (Nadel et al., 2008). Ο σχηματισμός του βιοϋμενίου μπορεί να θεωρηθεί ως ένας μηχανισμός επιβίωσης για τα βακτήρια, καθώς το

βιοϋμένιο συνήθως έχει την ικανότητα να προσφέρει προστασία από τοξικές ενώσεις, αντιβιοτικά, θερμική καταπόνηση (stress) και θήρευση (Johnson, 2007). Τα βιοϋμένια δύνανται να περιλαμβάνουν επίσης μη κυτταρικά υλικά, ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο έχουν αναπτυχθεί. Τέτοια υλικά είναι ορυκτοί κρύσταλλοι, διαβρωμένα σωματίδια, σωματίδια πηλού ή ιλύος και συστατικά του αίματος. Τα υλικά αυτά μπορούν να βρεθούν και στην εξωκυτταρική μεμβράνη των βιοϋμενίων (Salta et al., 2013). Τα βιοϋμένια, τα οποία αναπτύσσονται σε ιατρικές συσκευές, περιέχουν συνηθώς κοκκοειδείς μικροοργανισμούς συνδεδεμένους με την εξωκυτταρική μεμβράνη (Donlan, 2002).

Τα βιοϋμένια στο πόσιμο νερό περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς όπως *Escherichia coli*, *Aeromonas* και *Pseudomonas spp.*, τα οποία μπορούν να προκαλέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (September et al., 2007). Ο αριθμός των κυττάρων σε ένα βιοϋμένιο μπορεί να φθάσει τα 10^9 ανά συστάδα, η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις μπορεί να περιλαμβάνει μια μολυσματική δόση ενός παθογόνου μικροοργανισμού. Ωστόσο, η επιβίωση των βακτηριακών κυττάρων και η δυνατότητα να προκαλούν ασθένειες κατά την ύπαρξη σε βιοϋμένια δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως (Alam et al., 2007). Οι οργανισμοί που βρίσκονται σε βιοϋμένιο διαφέρουν από τους πλαγκτονικούς οργανισμούς ως προς τα γονίδια που μεταγράφονται. Τα βιοϋμένια, τα οποία αναπτύσσονται σε υποστρώματα βυθισμένα στο νερό, επίσης, περιέχουν διάτομα και νηματοειδή βακτηρία (Salta et al., 2013; Τσουμαλάκου, 2016).

Με βάση τους Tolker-Nielsen & Molin (2000), κάθε μικροβιακό βιοϋμένιο είναι μοναδικό ως προς την μορφή του, αν και η δομή τους είναι σχεδόν ίδια. Το βιοϋμένιο δεν αποτελείται από μια ενιαία και συνεχόμενη επιφάνεια. Αντίθετα, περιέχουν ένα συνδυασμό βακτηριακών στελεχών που περιβάλλονται με EPS και διαχωρίζονται μεταξύ τους με ενδιάμεσα κενά (διάυλοι νερού). Οι διάυλοι νερού λειτουργούν ως ένα δίκτυο, επιτρέποντας τη διέλευση των θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου και αντιμικροβιακών παραγόντων. Αυτό δεν συμβαίνει μόνο στα σύνθετα βιοϋμένια αλλά και σ' αυτά που αποτελούνται από ένα είδος μικροοργανισμού.

Γενικότερα, η αρχιτεκτονική μορφή των βιοϋμενίων παρουσιάζει ετερογένεια, τόσο προς τον χώρο, όσο και τον χρόνο, καθώς αλλάζει συνεχώς λόγω

των εξωτερικών και εσωτερικών διαδικασιών που πραγματοποιούνται. Οι οργανισμοί αρχικά δημιουργούν μικροαποικίες, οι οποίες με την πάροδο του χρόνου αναμειγνύονται, οδηγώντας στην μετανάστευση των κυττάρων από μια μικροαποικία σε μια άλλη (Tolker-Nielsen et al., 2000). Η δομή των μικροαποικιών αλλάζει από συμπαγή σε μια πιο χαλαρή δομή με την πάροδο του χρόνου και τα κύτταρα στο εσωτερικό των μικροαποικιών είναι κινητικά. Στη συνέχεια αυτά διασκορπίζονται από το βιοϋμένιο, με αποτέλεσμα τη διάλυση των μικροαποικιών. Η δομή των βιοϋμενίων επηρεάζεται επίσης από την αλληλεπίδραση των σωματιδίων των αντιμικροβιακών συστατικών από τον ξενιστή ή το περιβάλλον (Τσουμαλάκου, 2016).

Έχει αποδειχθεί ότι, για την συσσώρευση των πλαγκτονικών κυττάρων στην επιφάνεια του βιοϋμενίου και τη δημιουργία των μικροαποικιών είναι απαραίτητη η από κύτταρο σε κύτταρο επικοινωνία ή αλλιώς το quorum sensing (Pesci et al., 1999; McLean et al., 1997). Ο όρος quorum sensing (αίσθημα απαρτίας) αναφέρεται στη μορφή επικοινωνίας που έχουν τα βακτήρια μεταξύ τους, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση μορίων σηματοδότησης. Μέσω του quorum sensing τα βακτήρια αντιδρούν στα ερεθίσματα που δέχονται από το περιβάλλον και ρυθμίζουν αντίστοιχα την γονιδιακή τους έκφραση (Daniels et al., 2004). Όπως αναφέρουν στην μελέτη τους οι Turan et al. (2017), το quorum sensing μπορεί, μεταξύ άλλων, να ρυθμίσει τον βακτηριακό πληθυσμό, την ανάπτυξη του βιοϋμενίου, την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικές ουσίες και την ικανότητα του βακτηρίου να προκαλέσει λοίμωξη. Ο μηχανισμός της διαδικασίας αυτής αποτελείται από την έκκριση και αναγνώριση σηματοδοτικών μορίων, τα οποία ονομάζονται αυτό-επαγωγείς (auto-inducers-AIs) και έχουν ως σκοπό την προσαρμογή των κυττάρων στο μεταβαλλόμενο περιβάλλον.

1.7. Δημιουργία βιοϋμενίων σε θαλάσσιες συνθήκες

Η βιοεπίστρωση (biofouling) είναι το αποτέλεσμα της δημιουργίας βιοϋμενίου, το οποίο περιέχει νεκρούς ή μη συνεργιστικούς για το ίδιο μικροοργανισμούς, ζύμες, σφουγγάρια της θάλασσας, άλγη, μύδια και άλλους θαλάσσιους οργανισμούς (Raiikina, 2004). Το πρόβλημα με το biofouling προκαλείται όταν ο σχηματισμός του γίνεται σε συνθετικές επιφάνειες. Η ανάπτυξη της βιοεπίστρωσης εξαρτάται από μία σειρά παραγόντων όπως: η θερμοκρασία, το pH,

η συγκέντρωση του οξυγόνου, το περιεχόμενο της οργανικής ύλης, το υλικό της επιφανείας, την τραχύτητα αυτής, το φορτίο και την υδροφοβικότητα της, τις υδροδυναμικές συνθήκες, την τοποθεσία, το βάθος, την εποχή κ.α. (Simões et al., 2010).

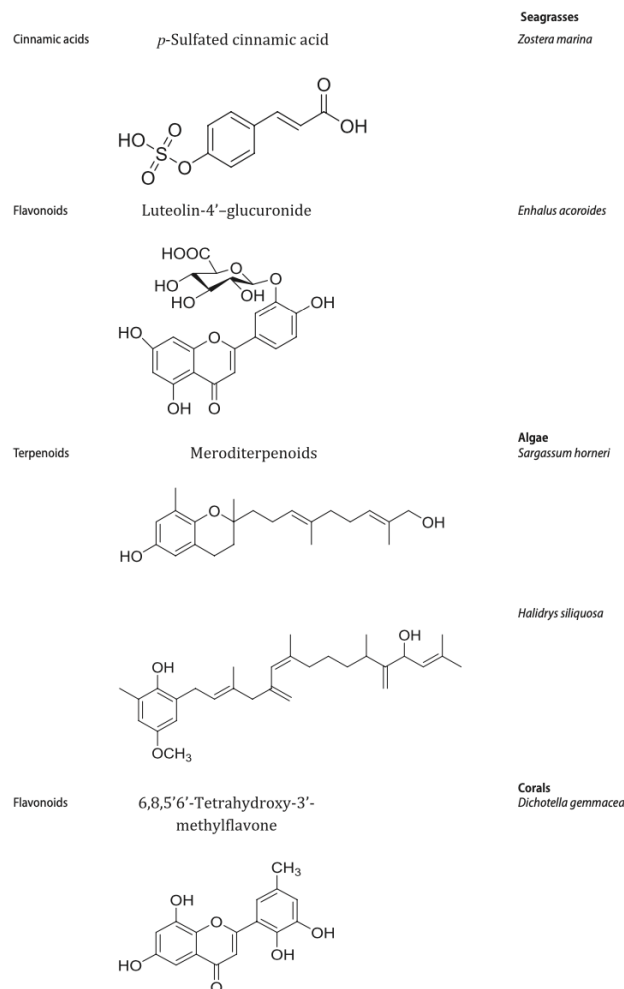
Στο θαλάσσιο περιβάλλον τα βιοϋμένια δημιουργούνται κυρίως από διάτομα και βακτηρία, τα οποία μπορούν να αποικίσουν γρηγορά σε μια περιοχή, δημιουργώντας έτσι βιοϋμένια με περιπλοκή μορφή και τρισδιάστατο σχήμα. Μπορούν να αποικίσουν σε διάφορες επιφάνειες, αρκεί η επιφάνεια να είναι βυθισμένη στο νερό. Τα βακτηριακά βιοϋμένια εμφανίζουν μεγάλη ανθεκτικότητα ακόμη και στη χρήση αντιβιοτικών σε σύγκριση με τους πλαγκτονικούς μικροοργανισμούς (Salta et al., 2013; Τσουμαλάκου, 2016).

Η βιοεπίστρωση στη θάλασσα ξεκινά με την προσκόλληση των μικροοργανισμών, οι οποίοι σχηματίζουν το μικροβιακό βιοϋμένιο, γνωστό και ως γλίτσα ("slime"), πάνω στο οποίο άλλοι οργανισμοί μπορούν να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν. Οι μικροοργανισμοί παράγουν και εκκρίνουν EPS, οι οποίες τους δίνουν τη δυνατότητα να παραμένουν προσκολλημένοι στην επιφάνεια και μεταξύ τους αλλά και να προσθέτουν όγκο στο στρώμα της επίστρωσης (Flemming, 2011). Τα μικροβιακά βιοϋμένια επιδρούν στους υπόλοιπους οργανισμούς της βιοεπίστρωσης. Για παράδειγμα, η μελέτη των Mieszkin et al. (2013) στις αλληλεπιδράσεις των μικροβιακών βιοϋμενίων και των θαλάσσιων μακροφυκών, αποκάλυψε το φάσμα των αλληλεπιδράσεων που επηρεάζουν τη μορφολογία και το ρυθμό ανάπτυξης των φυκών, αλλά ταυτόχρονα και τις στρατηγικές που ακολουθούν τα φύκη για την παρεμπόδιση του σχηματισμού βακτηριακών βιοϋμενίων.

Η βιοεπίστρωση από βακτήρια είναι ένα φαινόμενο που προκαλεί έντονα προβλήματα στις υδατοκαλλιέργειες. Η ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων μπορεί να προκαλέσει χρόνια ανατροφοδότηση της υδατοκαλλιέργειας με παθογόνα βακτήρια, τα οποία επιφέρουν σοβαρές λοιμώξεις στα εκτρεφόμενα είδη. Επιπλέον, είναι τόσο ανθεκτικά, που κατόπιν του σχηματισμού τους είναι εξαιρετικά δύσκολο να απομακρυνθούν από την επιφάνεια προσκόλλησης. Αυτό συμβαίνει διότι αναπτύσσουν ανθεκτικότητα έναντι των απολυμαντικών και των βιοκτόνων, με

αποτέλεσμα να επιζεί πάντα ένα μέρος των βιοϋμενικών κυττάρων, το οποίο διασπείρεται στο σύστημα και δημιουργεί εκ νέου βιοϋμένια (Mizan et al., 2015).

Παρεμποδιστές για το σχηματισμό της βιοεπίστρωσης είναι κάποια βιοκτόνα (biocides), τα οποία όμως έχουν τοξική δράση για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Με τη μελέτη θαλάσσιων οργανισμών με σχετικούς μηχανισμούς άμυνας (anti-fouling metabolites), οι οποίοι δεν εμφάνιζαν φαινόμενα biofouling στην επιφάνεια τους, αναπτύχθηκαν εναλλακτικά οικολογικά βιοκτόνα. Οι μη τοξικοί και βιοδιασπώμενοι παρεμποδιστές αναπτύσσονται και χρησιμοποιούνται χρόνια, αλλά πολλά στελέχη ανέπτυξαν μικροβιακή αντοχή, με τη παραγωγή anti-fouling μεταβολιτών. Η ανακάλυψη τέτοιων μεταβολιτών αυξάνεται τα τελευταία χρόνια (Εικόνα 4) (Vilas-Boas et. al., 2017).



Εικόνα 4 : Παραδείγματα θαλάσσιων πολυφαινολικών συστατικών με ιδιότητες anti-fouling (Vilas-Boas et. al., 2017).

Έκτος από τα βιοκτόνα (χημική μέθοδος), το φαινόμενο της βιοεπίστρωσης μπορεί να αντιμετωπιστεί με φυσικές και βιολογικές μεθόδους. Μερικές από τις συνηθέστερες φυσικές μεθόδους είναι η ακτινοβολία, η ηλεκτρόλυση και η αλλαγή της επιφάνειας. Η κυριότερη βιολογική μέθοδος, η οποία αποτελεί εναλλακτική των τοξικών βιοκτόνων, είναι η επικάλυψη της επιφάνειας με διαλύματα που περιέχουν ένζυμα ή άλλα φυσικά προϊόντα (Satheesh et al., 2016). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί νέες τακτικές, οι οποίες στοχεύουν στην αποτελεσματική αναστολή και τον έλεγχο της ανάπτυξης των βιοϋμενίων, χωρίς να γίνεται χρήση τοξικών βιοκτόνων. Το παραπάνω μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση φυσικών βιοκτόνων και αντιμικροβιακών ουσιών (αιθέρια έλαια), ουσιών από συνθετικές πηγές ή και ουσιών που έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς (Giaouris et al., 2014).

Στη μελέτη των Kostoglou et al. (2021) ερευνήθηκε η ικανότητα της θυμόλης, ενός φυσικού φυτικού τερπενοειδούς, το οποίο αποτελεί συστατικό των αιθέριων ελαίων πολλών φυτών (κυρίως ειδών θυμαριού και ρίγανης), να αναστέλλει την ανάπτυξη βιοϋμενίου σε ένα κοκτέιλ τεσσάρων διαφορετικών στελεχών του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* στην επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα σε βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης. Βρέθηκε πως με μόλις 15 λεπτά έκθεσης των κουπονιών σε 625 ppm θυμόλης επιτεύχθηκε μείωση του βιοϋμενικού πληθυσμού μεγαλύτερη από 4 log(cfu/cm²).

Τα βακτηριακά βιοϋμένια στο υδάτινο περιβάλλον μπορούν να συνδεθούν με επιφάνειες ζώντων ιστών, επιφάνειες καθετήρων και σωληνώσεις βιομηχανικού ή πόσιμου νερού. Η παραγωγή του αλγινικού άλατος, ενός πολυσακχαρίτη, εμφανίζεται ως μια εξωκυττάρια μήτρα σε βιοϋμένιο *Pseudomonas aeruginosa* και προκαλείται από την επαφή των κυττάρων με μια επιφάνεια. Εργαστηριακά πειράματα δείχνουν ότι τα κύτταρα του βακτηρίου *Vibrio cholerae* σχηματίζουν μορφές βιοϋμενίου σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες, προστατεύοντας έτσι τα κύτταρά τους με αυτή την εξωπολυμερή στοιβάδα (Huq et al., 2008; Τσουμαλάκου, 2016).

Η προσκόλληση των βακτηρίων μπορεί να γίνει ακόμη και σε χιτίνιους εξωσκελετούς μαλακοστράκων, οι οποίοι παρέχουν τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά. Η αφθονία ασβέστιου (Ca²⁺) στα θαλασσιά και υφάλμυρα νερά

διαδραματίζει σημαντικό ρολό στη διαμόρφωση του βιοϋμενίου, με άμεση σταθεροποίηση μεσοκυττάρων αλληλεπιδράσεων (υπό την μορφή γέφυρας/συνδέσμων άλατος), όπως έχει αποδειχτεί για τα είδη *Pseudomonas aeruginosa* και *Streptococcus downei*. Το βιοϋμένιο στο θαλασσινό περιβάλλον μπορεί επίσης να περιλαμβάνει χρώμιο, νικέλιο και μόλυβδο, τα οποία χρησιμοποιούνται ως στοιχειά κράματος για την αντίσταση στη διάβρωση του ανοξείδωτου χάλυβα που φέρουν τα θαλασσιά πλοία. Τα βιοϋμένια που αναπτύσσονται ωστόσο στις επιφάνειες αυτές διαβρώνονται με την πάροδο του χρόνου (Lopes et al., 2006; Τσουμαλάκου, 2016).

Τα αιωρούμενα σωματίδια και το πλαγκτόν στον Κόλπο της Βεγγάλης εποικούνται από κύτταρα *Vibrio cholerae* σε μορφή βιοϋμενίου. Όταν πλημμυρίζονται παρακείμενες εκβολές ποταμών στην περιοχή του Μπαγκλαντές εισάγονται τα βακτηρία της χολέρας σε υφάλμυρα οικοσυστήματα. Τα στελέχη O1 και O139 του *V. cholerae* επιβιώνουν όλο το χρόνο, ως επί το πλείστον, σε μια μη καλλιεργήσιμη κατάσταση μέσα σε συστάδες βιοϋμενίων στο οικοσύστημα δίπλα στην ακτή του κόλπου της Βεγγάλης, αντιπροσωπεύοντας έτσι το ενδημικό είδος χολέρας (*V. cholerae*) στην εν λόγω γεωγραφική περιοχή (Alam et al., 2006).

2. Πειραματικό μέρος

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της δημιουργίας βιοϋμενίου από μεμονωμένες καλλιέργειες βακτηρίων σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα. Συγκεκριμένα έγινε προσπάθεια προσομοίωσης περιβάλλοντος θάλασσας σε δύο στάδια, προσκόλλησης και ανάπτυξης. Τέλος παρατηρήθηκε η συμπεριφορά διαφορετικών στελεχών στην ικανότητα τους να σχηματίσουν βιοϋμένιο.

3. Υλικά και Μέθοδοι.

3.1. Μέθοδοι ανάπτυξης και ανάλυσης βιοϋμενίων

Υπάρχουν αρκετές μέθοδοι και συσκευές για την καλλιέργεια των βιοϋμενίων. Η επιλογή της μεθόδου ανάπτυξης καθορίζει και το είδος των δεδομένων που μπορούν να εξαχθούν και πρέπει να ληφθεί υπόψιν, ώστε να διασφαλιστεί ότι θα πληροί τις απαιτήσεις των πειραμάτων. Εκτός από την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα μελέτη (κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα), ο σχηματισμός βιοϋμενίου σε πλάκες μικροτιτλοδότησης (microtiter plates) είναι σίγουρα η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος. Αρχικά αναπτύχθηκε από την Madilyn Fletcher με σκοπό τη μελέτη της προσκόλλησης των βακτηρίων (Fletcher, 1977). Κατά τη μέθοδο αυτή, τα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται στα βοθρία (wells) μιας πλάκας μικροτιτλοδότησης πολυστυρενίου και η βιομάζα του βιοϋμενίου αξιολογείται με μέτρηση όλης της συνδεδεμένης παραγόμενης βιομάζας (Djordjevic et al., 2002).

Στην ανασκόπηση των Azeredo et al. (2017) αναφορικά με τις μεθόδους ανάπτυξης βιοϋμενίων αναφέρονται και άλλες μέθοδοι καλλιέργειας βιοϋμενίων, όπως η συσκευή βιοϋμενίων Calgary (CBD), η οποία αποτελεί εξελιγμένη μορφή της πλάκας μικροτιτλοδότησης, η Δοκιμή Δακτυλίου Βιοϋμενίου (The Biofilm Ring Test), που χρησιμοποιείται ειδικά για τη διερεύνηση των πρώιμων σταδίων ανάπτυξης του βιοϋμενίου (Chavant et al., 2007), η συσκευή Robbins, ο βιοϋμενικός αντιδραστήρας ροής σταγόνας (Drip flow biofilm reactor), οι περιστροφικοί βιοϋμενικοί αντιδραστήρες (Rotary biofilm reactors) κ.α.

Αντίστοιχα, ευρεία ποικιλία μεθόδων υπάρχει και για την ανάλυση των βιοϋμενίων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό πολλαπλών παραγόντων, όπως τον αριθμό και τον τύπο των μικροοργανισμών, την ζωτικότητα του μικροβιακού πληθυσμού, την ηλικία, το πάχος, την δομή και την επιφανειακή τοπογραφία του βιοϋμενίου. Η ανάλυση του βιοϋμενίου μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, οι οποίες συμπεριλαμβάνουν τεχνικές μικροβιολογικής καλλιέργειας,

χρωματομετρικές τεχνικές, μικροσκοπικές τεχνικές, φυσικές μεθόδους, βιοχημικές μεθόδους και μοριακές μεθόδους (Kishen & Haapasalo, 2012).

Οι Wilson et al. (2017), στην ανασκόπηση τους, διαχωρίζουν τις μεθόδους αξιολόγησης της ανάπτυξη βιοϋμενίου σε ποσοτικές (άμεσες και έμμεσες) και ποιοτικές. Οι μέθοδοι άμεσης ποσοτικοποίησης αποτελούνται από το προσδιορισμό βιώσιμων κυττάρων με καταμέτρηση τρυβλίων, τη καταμέτρηση κυττάρων με βάση τη ροή (Flow-based cell counting), τη μικροσκοπία φωτός και φθορισμού, τη μικροσκοπία σάρωσης με συνεστιακό λέιζερ και τις φθορίζουσες χρωστικές και πρωτεΐνες. Οι μέθοδοι έμμεσης ποσοτικοποίησης αποτελούνται από τη μέτρηση της ξηρής μάζας, του ολικού οργανικού άνθρακα (TOC), τη χρώση με κρυσταλλικό ιώδες, το άλας του τετραζολίου, τη βιοφωταύγεια ATP, τον ολικό προσδιορισμό πρωτεϊνών και τη μικρο-ισορροπία κρυστάλλων χαλαζία (QCMs). Τέλος, οι ποιοτικές μέθοδοι ανάλυσης είναι η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και άλλες εναλλακτικές τεχνικές φασματοσκοπίας, όπως η υπέρυθρη και η Raman φασματοσκοπία.

Στη παρούσα μελέτη χρησιμοποιείται ο προσδιορισμό βιώσιμων κυττάρων με καταμέτρηση τρυβλίων (colony forming units/ml) ή αλλιώς CFU/ml, τα οποία έπειτα μετατρέπονται σε CFU/cm² και σε Log(CFU/cm²). Η συγκεκριμένη μέθοδος αποτελεί τη πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την εκτίμηση του βιοϋμενικού πληθυσμού. Η βασική αρχή αυτής της τεχνικής είναι ο διαχωρισμός των μεμονωμένων κυττάρων σε ένα τρυβλίο με άγαρ και η ανάπτυξη αποικιών από αυτά τα κύτταρα, με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των ζωντανών από τα νεκρά κύτταρα και τη ποσοτικοποίηση των ζώντων κυττάρων χωρίς τη χρήση χρωστικών ή οργάνων (Wilson et al., 2017).

Παρόλο την ευρεία χρήση της, η συγκεκριμένη μέθοδος παρουσιάζει μερικά σοβαρά μειονεκτήματα και περιορισμούς. Αρχικά, το κλάσμα των αποσπασμένων κυττάρων μπορεί να μην αντιπροσωπεύει τον αρχικό βιοϋμενικό πληθυσμό. Επίσης, ένας υποπληθυσμός βιοϋμενικών κυττάρων μπορεί να είναι ζωντανός αλλά μη καλλιεργήσιμος (VBNC), με αποτέλεσμα να μην μπορεί να ανιχνευθεί από τη συγκεκριμένη τεχνική (Li et al., 2014). Όμως, είναι μια εξαιρετικά οικονομική μέθοδος, η οποία δεν απαιτεί ιδιαίτερη εξειδίκευση από την χειριστή, ούτε

εξεζητημένο εργαστηριακό εξοπλισμό, με αποτέλεσμα να αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι πολλών πειραματικών πρωτοκόλλων.

3.2. Βακτηριακά Στελέχη

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν στελέχη, τα οποία μπορούν να βρεθούν σε ιχθύες και άλλους θαλάσσιους οργανισμούς. Όλα τα στελέχη ήταν αποθηκευμένα για μακροχρόνια διατήρηση (stock) σε θερμοκρασία -20°C μέσα σε κρυοφιαλίδια (cryovials), με 20% γλυκερόλη, για την προστασία των κυττάρων από τη κυτταρική λύση λόγω ψύχους και 80% θρεπτικό ζωμό (Marine Broth για τα *Vibrio* και *Tenacibaculum*, ενώ για τα υπόλοιπα TSB). Όλα τα στελέχη ανανεώθηκαν και αναπτύχθηκαν σε αερόβιες συνθήκες.

Τα περισσότερα από τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη διπλωματική μελέτη ανήκουν στην Τράπεζα Μικροοργανισμών (FMCC) του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και παρουσιάζονται αναλυτικά στο παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2). Τα δύο τελευταία βακτηριακά στελέχη του πίνακα προέρχονται από αδημοσίευτη δραστηριότητα του εργαστηρίου και έχουν απομονωθεί από κλειστό σύστημα Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας.

Είδος	Στέλεχος	Θερμοκρασία Ανάπτυξης ($^{\circ}\text{C}$)	Προέλευση Στελέχους
<i>Listeria monocytogenes</i>	B164	37	Μονάδα επεξεργασίας τροφίμων
	B165		
	B166		
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	B112	25	Κουτσομούρα σε πάγο
	B113		
	B116		

	B119		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	B218	28	Ωμό γάλα
	B219		
	B220		
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	B55	30	Μπαρμπούνι
	B155	26	-
<i>Pseudomonas gessardii</i>	B47	30	Γόπα σε πάγο
	B49		
<i>Pseudomonas fragi</i>	B34	25	-
	B209		
<i>Shewanella baltica</i>	B70	25	-
<i>Shewanella putrefaciens</i>	B65	25	-
	B66		
<i>Enterobacter aerogenes</i>	B9	37	Πτύελο
<i>Salmonella enterica</i>	B52	37	Τσιπούρα
	B452		-
<i>Vibrio harveyi</i>	B177	30	Θαλάσσια Προέλευση
<i>Vibrio atypicus</i>	v	25	Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια
<i>Tenacibaculum discolor</i>	B487	25	Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια

Πίνακας 2: Στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρούσα μελέτη.

3.3. Θρεπτικά Υλικά και Διαλύματα

Για την πραγματοποίηση του πειραματικού πρωτοκόλλου ήταν απαραίτητη η παρασκευή και η χρήση των παρακάτω θρεπτικών υλικών και διαλυμάτων:

Tryptone Soy Agar (TSA) της εταιρείας LabM με κωδικό προϊόντος LAB011. Η παρασκευή του συγκεκριμένου θρεπτικού υλικού έγινε σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

- ✓ Ζυγίστηκαν 37g σκόνης TSA και διαλύθηκαν σε 1000ml απιονισμένου ύδατος.
- ✓ Αναδεύτηκαν μέχρι πλήρους διάλυσης σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα.
- ✓ Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά.

Tryptone Soy Broth (TSB) της εταιρείας Biolife με κωδικό προϊόντος 4021552. Η παρασκευή του συγκεκριμένου θρεπτικού υλικού έγινε σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

- ✓ Ζυγίστηκαν 30g σκόνης TSB και διαλύθηκαν σε 1000ml απιονισμένου ύδατος.
- ✓ Αναδεύτηκαν μέχρι πλήρους διάλυσης σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα.
- ✓ Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά.

Marine Agar (MA) της εταιρείας Condalab με κωδικό προϊόντος 1059. Η παρασκευή του συγκεκριμένου θρεπτικού υλικού έγινε σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

- ✓ Ζυγίστηκαν 55,2g σκόνης MA και διαλύθηκαν σε 1000ml απιονισμένου ύδατος.
- ✓ Αναδεύτηκαν μέχρι πλήρους διάλυσης σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα.
- ✓ Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά.

Marine Broth (MB) της εταιρίας Condalab με κωδικό προϊόντος 1217. Η παρασκευή του συγκεκριμένου θρεπτικού υλικού έγινε σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

- ✓ Ζυγίστηκαν 40,2g σκόνης MB και διαλύθηκαν σε 1000ml απιονισμένου ύδατος.
- ✓ Αναδεύτηκαν μέχρι πλήρους διάλυσης σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα.
- ✓ Το θρεπτικό υλικό αποστειρώθηκε στους 121°C για 15 λεπτά.

Phosphate Buffered Saline (PBS) της εταιρίας Oxoid με κωδικό προϊόντος BR0014. Η παρασκευή του συγκεκριμένου αραιωτικού διαλύματος έγινε σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:

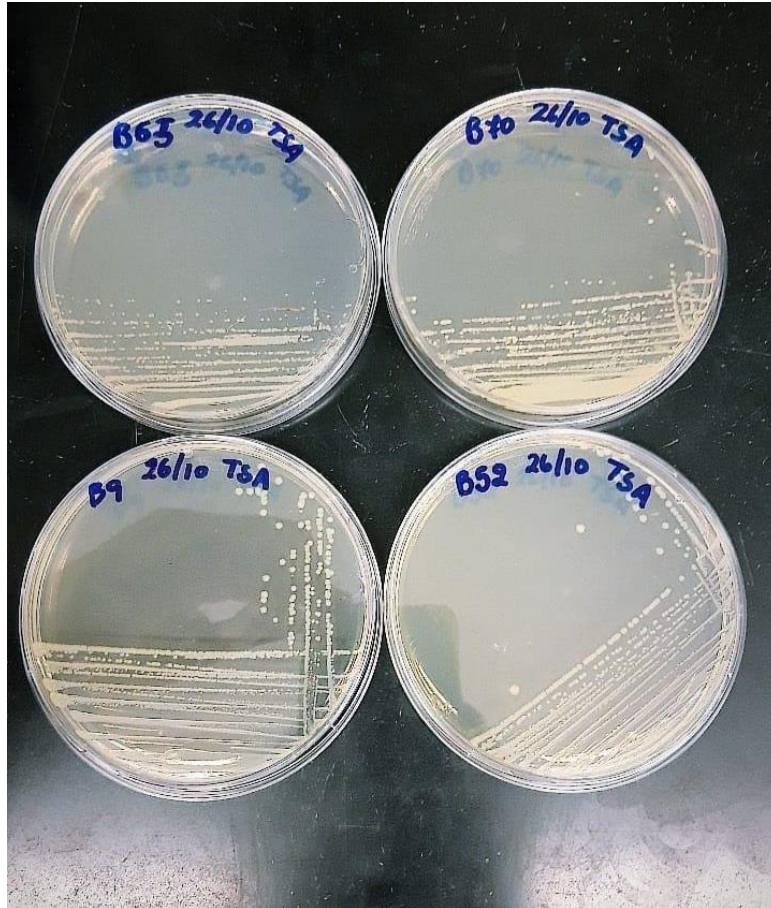
- ✓ Διαλύθηκαν, με τη βοήθεια θερμαινόμενου μαγνητικού αναδευτήρα, 10 ταμπλέτες PBS για κάθε 1000ml απιονισμένου ύδατος.
- ✓ Το διάλυμα αποστειρώθηκε στους 115°C για 10 λεπτά.

3.4. Πειραματικό πρωτόκολλο

Το πειραματικό πρωτόκολλο της παρούσας διπλωματικής εργασίας βασίστηκε στην έρευνα των [Kostaki et al. \(2012\)](#).

3.4.1. Προετοιμασία εμβολίου

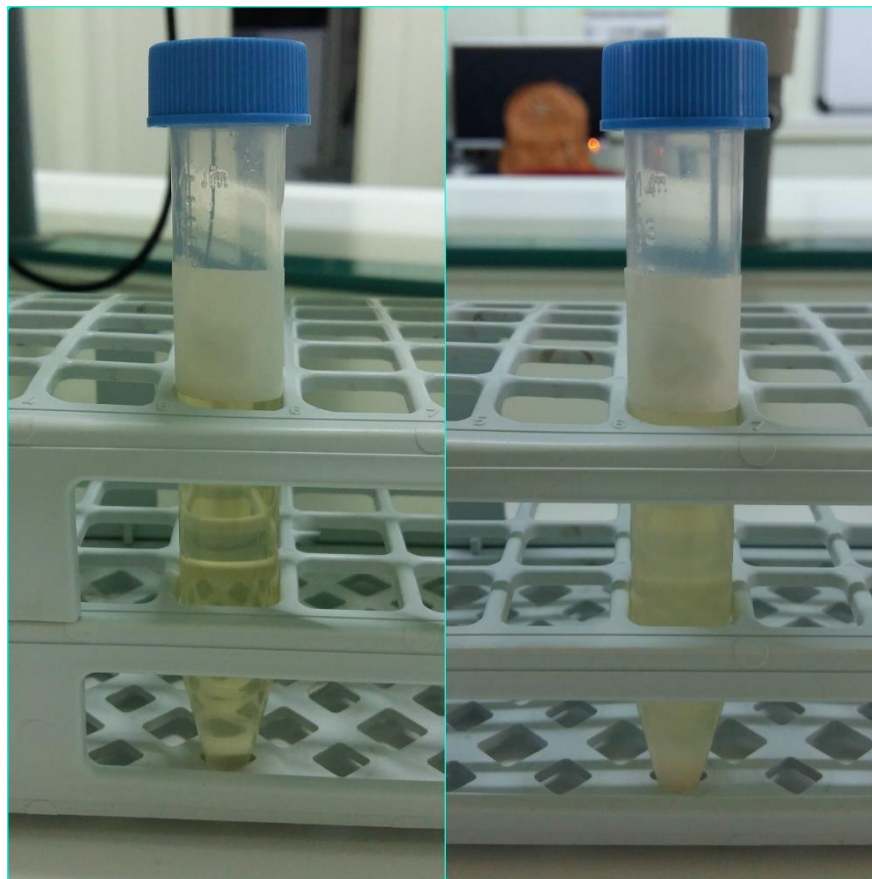
- i. Από τη καλλιέργεια διατήρησης (stock culture) κάθε στελέχους μεταφέρθηκαν, με τη βοήθεια πιπέτας, 50μl σε κοντό δοκιμαστικό σωλήνα (half tube), ο οποίος περιείχε 5ml από το κατάλληλο υγρό θρεπτικό υλικό (Marine Broth για τα θαλάσσια είδη/TSB για τα υπόλοιπα).



Εικόνα 5 : Έλεγχος καλλιέργειας διατήρησης (*stock culture*) για επιμολύνσεις, μέσω *spreading* σε τρυβλία με TSA.

- ii. Ακολούθησε επώαση για 24h στη βέλτιστη θερμοκρασία του κάθε βακτηριακού στελέχους (**Πίνακας 2**).
- iii. Για τον καθαρισμό των κυττάρων από το υπόστρωμα, με την βοήθεια πιπέτας, μεταφέρθηκαν 100μl από κάθε δοκιμαστικό σωλήνα σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης (*falcon*), στους οποίους προηγουμένως είχε τοποθετηθεί ο κατάλληλος συνδυασμός υγρών θρεπτικών μέσων. Για τα θαλάσσια στελέχη σε κάθε *falcon* μεταφέρθηκαν 10ml αποστειρωμένου *Marine Broth* ενώ για τα υπόλοιπα στελέχη μεταφέρθηκαν 9ml TSB και 1ml *Marine Broth*.

- iv. Οι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης επώαστηκαν για 18h στη βέλτιστη θερμοκρασία του αντίστοιχου στελέχους (καλλιέργεια εργασίας).



Εικόνα 6: Η καλλιέργεια εργασίας σε falcon πριν και μετά από την επώαση στη βέλτιστη θερμοκρασία για 18h.

- v. Για το καθαρισμό τους από το θρεπτικό υπόστρωμα, κάθε καλλιέργεια εργασίας φυγοκεντρήθηκε στα 5000g για 10 λεπτά στους 4°C χρησιμοποιώντας την επιτραπέζια φυγόκεντρο.
- vi. Το υπερκείμενο κάθε καλλιέργειας εργασίας απορρίφθηκε προσεκτικά, δίχως να διαλυθεί το ίζημα και έπειτα προστέθηκαν 10 ml διαλύματος PBS, αναδεύτηκαν και πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρηση στα 5000g για 10 λεπτά στους 4°C (1η έκπλυση).

- vii. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά, δίχως να διαλυθεί το ίζημα και έπειτα προστέθηκαν 10 ml διαλύματος PBS, αναδεύτηκαν και πραγματοποιήθηκε τρίτη φυγοκέντρηση στα 5000g για 10 λεπτά στους 4°C (2η έκπλυση).
- viii. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά, δίχως να διαλυθεί το ίζημα και έπειτα προστέθηκαν 10 ml διαλύματος PBS και αναδεύτηκαν (βακτηριακό εναιώρημα με συγκέντρωση $\approx 10^8$ κύτταρα/ml).
- ix. Σε κάθε βακτηριακό εναιώρημα πραγματοποιήθηκαν δύο διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 9ml PBS. Τελικά το βακτηριακό εναιώρημα κάθε στελέχους είχε συγκέντρωση $\approx 10^6$ κύτταρα/ml.
- x. Για την εξακρίβωση της συγκέντρωσης του βακτηριακού εναιωρήματος ($\approx 10^6$ κύτταρα/ml), το οποίο θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοϋμενίου, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις και έπειτα μεταφέρθηκαν από αυτές 100μl σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό υλικό (μέθοδος spreading). Αφού τα τρυβλία επώαστηκαν στην βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνο για το κάθε στέλεχος, οι αποικίες καταμετρήθηκαν και υπολογίστηκε ο ακριβής πληθυσμός του βακτηριακού εναιωρήματος.

3.4.2. Πρωτόκολλο σχηματισμού βιοϋμενίου στην επιφάνεια κουπονιών ανοξειδωτου χάλυβα

Για την ανάπτυξη των βιοϋμενίων χρησιμοποιήθηκαν πλακίδια ανοξειδωτου χάλυβα (AX) (Stainless steel coupons).

- i. Με τη βοήθεια πιπέτας, μεταφέρθηκαν 500μl από το κάθε βακτηριακό εναιώρημα (συγκέντρωσης $\approx 10^6$ κύτταρα/ml) μέσα σε αποστειρωμένους

κοντούς δοκιμαστικούς σωλήνες, οι οποίοι περιείχαν από ένα κουπόνι AX και 4,5ml διαλύματος PBS. Χρησιμοποιήθηκαν έξι κουπόνια AX ανά στέλεχος, τρία για καταμέτρηση του βιοϋμενίου στις 3h ανάπτυξης και τρία για τις 48h ανάπτυξης.

- ii. Οι σωλήνες επώστηκαν στους 15 °C για 3 ώρες (στάδιο προσκόλλησης των κυττάρων στην επιφάνεια του AX).
- iii. Έπειτα, με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας, τα κουπόνια AX μεταφέρθηκαν σε άλλους κοντούς δοκιμαστικούς σωλήνες, που ο καθένας περιείχε 5ml διαλύματος PBS και το στατώ ανακινήθηκε εντόνως, με σκοπό την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων από την επιφάνεια των κουπονιών.
- iv. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας, τρία κουπόνια AX μεταφέρθηκαν σε κοντούς δοκιμαστικούς σωλήνες με 5ml Marine Broth (MB) και επώστηκαν στους 25 °C για 48h. Τα υπόλοιπα τρία κουπόνια AX μεταφέρθηκαν ομοίως σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης (falcon των 15ml), οι οποίοι περιείχαν 6ml διαλύματος PBS και 10 γυάλινα σφαιρίδια (glass beads) διαμέτρου 3mm.
- v. Με το πέρασμα των 48 ωρών, τα τρία κουπόνια AX απομακρύνθηκαν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες και ξεπλύθηκαν με 5ml διαλύματος PBS σε κάθε πλευρά τους, με τη βοήθεια πιπέτας και αποστειρωμένης λαβίδας.
- vi. Μετά το ξέπλυμα τα κουπόνια μεταφέρθηκαν (ομοίως με το στάδιο iv) σε falcon των 15ml, τα οποία περιείχαν 6ml διαλύματος PBS και 10 γυάλινα σφαιρίδια.

3.4.3. Δειγματοληψία και καταμέτρηση βιοϋμενικών κυττάρων

Το πειραματικό πρωτόκολλο για την δειγματοληψία και τη καταμέτρηση των βιοϋμενικών κυττάρων ήταν ίδιο τόσο για τα κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα που επωάστηκαν μόνο για 3 ώρες όσο και για εκείνα που επωάστηκαν 48 ώρες και περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω:

- i. Όλοι οι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης (falcon) με τα σφαιρίδια αναδεύτηκαν ομοιόμορφα (bead vortexing) για 2 λεπτά, σε μέγιστη ένταση, με τη χρήση συσκευής στροβιλισμού (vortex), προκειμένου να αποκολληθούν όσο το δυνατόν περισσότερα προσκολλημένα βιοϋμενικά κύτταρα.
- ii. Έπειτα, με τη βοήθεια πιπέτας, απομακρύνθηκε 1ml βακτηριακού εναιωρήματος από το κάθε falcon και πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Για τις αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με 9ml διαλύματος PBS.



Εικόνα 7: Στατώ με falcon των 15 ml, τα οποία περιέχουν 6 ml PBS και 10 γυάλινα σφαιρίδια και οι αντίστοιχοι δοκιμαστικοί σωλήνες με 9 ml PBS για τις διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις.

- iii. Ακολούθως, 100μl από τη μηδενική αραιώση (falcon) και την κάθε δεκαδική αραιώση μεταφέρθηκαν, με τη βοήθεια πιπέτας, σε τρυβλία με το κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω το κατάλληλο θρεπτικό υλικό για τα θαλάσσια είδη ήταν το Marine Agar ενώ για τα υπόλοιπα το TSA.
- iv. Με τη βοήθεια αποστειρωμένου μεταλλικού τριγώνου έγινε ομοιόμορφη διασπορά των κυττάρων στην επιφάνεια των τρυβλίων (μέθοδος spreading-επιφανειακή εξάπλωση). Για κάθε κουπόνι ΑΧ πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις κατά τη δειγματοληψία, επομένως χρησιμοποιήθηκαν δύο τρυβλία για κάθε αραιώση του βακτηριακού εναιωρήματος.
- v. Τα τρυβλία επωάστηκαν στην βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνο για το κάθε στέλεχος.



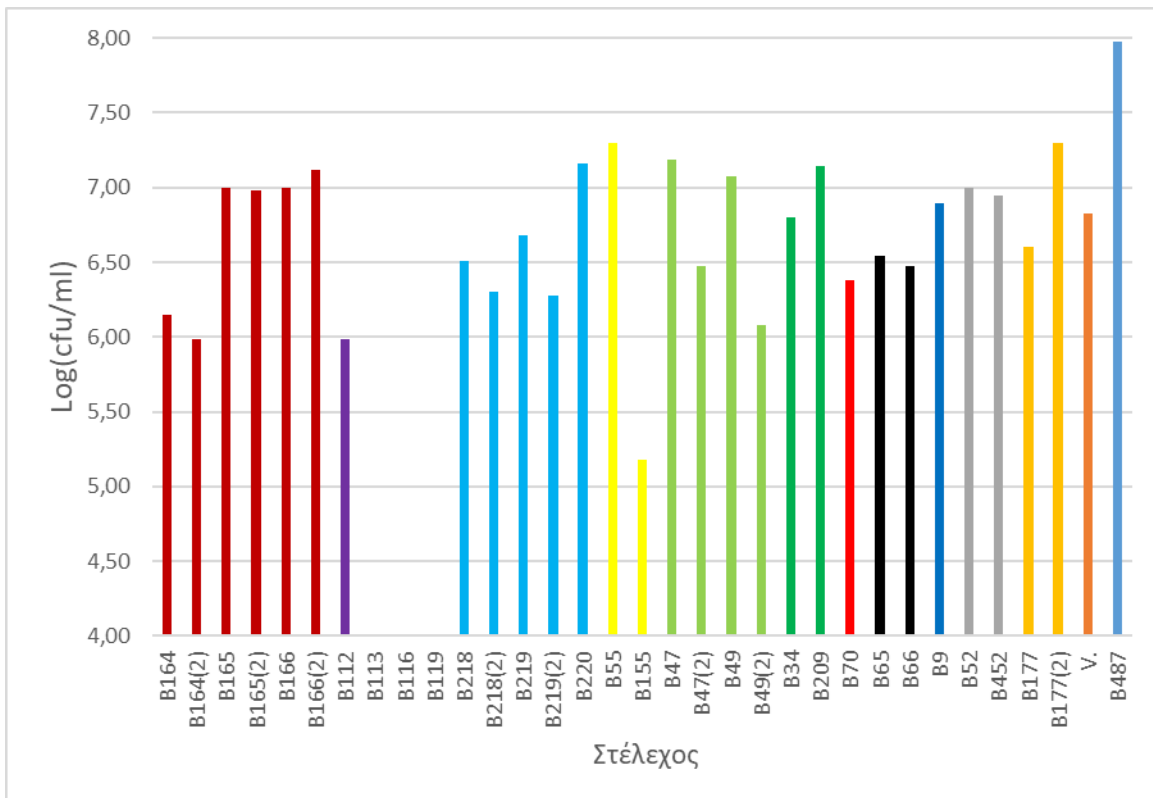
Εικόνα 8: Επώαση πολλαπλών στελεχών στη βέλτιστη θερμοκρασία και χρόνο σε επωαστήρα του εργαστηρίου.

vi. Για κάθε τεμάχιο ΑΧ, καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες και υπολογίστηκε ο πληθυσμός των βιοϋμενικών κυττάρων (CFU/ml). Η καταμέτρηση αποικιών έγινε σε εκείνα τα τρυβλία που περιείχαν 30-300 αποικίες.

4.Αποτελέσματα

4.1. Εμβόλιο

Ο αρχικός πληθυσμός στο εμβόλιο του κάθε στελέχους παρουσιάζεται παρακάτω στο **Διάγραμμα 1** και στον **Πίνακα 3**.



Διάγραμμα 1: Ο αρχικός πληθυσμός του εμβολίου για κάθε στέλεχος (log cfu/ml). Τα στελέχη, στα οποία έγινε επανάληψη της διαδικασίας, έχουν (2) δίπλα στην ονομασία τους. Όπου: *Listeria monocytogenes* (B164, B165 και B166), *Brochothrix thermosphacta* (B112, B113, B116 και B119), *Pseudomonas fluorescens* (B218, B219 και B220), *Pseudomonas psychrophila* (B55 και B155), *Pseudomonas gessardii* (B47 και B49), *Pseudomonas fragi* (B34 και B209), *Shewanella baltica* (B70), *Shewanella putrefaciens* (B65 και B66), *Enterobacter aerogenes* (B9), *Salmonella enterica* (B52 και B452), *Vibrio harveyi* (B177), *Vibrio atypicus* (V.) και *Tenacibaculum discolor* (B487).

Στέλεχος	Αρχικός πληθυσμός (cfu/ml)	
	1 ^η επανάληψη	2 ^η επανάληψη
B487	9.5 x 10 ⁷	-
B220	1.45 x 10 ⁷	-
B177	4.0 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁷
<i>V. atypicus</i>	6.7 x 10 ⁶	-
B155	1.5 x 10 ⁵	-
B47	1.55 x 10 ⁷	3.0 x 10 ⁶
B209	1.39 x 10 ⁷	-
B55	2.0 x 10 ⁷	-
B66	3.0 x 10 ⁶	-
B70	2.4 x 10 ⁶	-
B65	3.5 x 10 ⁶	-
B9	7.8 x 10 ⁶	-
B52	1.0 x 10 ⁷	-
B34	6.35 x 10 ⁶	-
B49	1.18 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁶
B218	3.2 x 10 ⁶	2.0 x 10 ⁶
B219	4.8 x 10 ⁶	1.9 x 10 ⁶
B164	1.4 x 10 ⁶	0.97 x 10 ⁶
B165	1.0 x 10 ⁷	0.96 x 10 ⁷
B166	1.0 x 10 ⁷	1.3 x 10 ⁷
B112	0.97 x 10 ⁶	-
B452	0.88 x 10 ⁷	-
B113	0	-
B116	0	-
B119	0	-

Πίνακας 3: Ο αρχικός πληθυσμός (cfu/ml) των στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για τη παρούσα μελέτη.

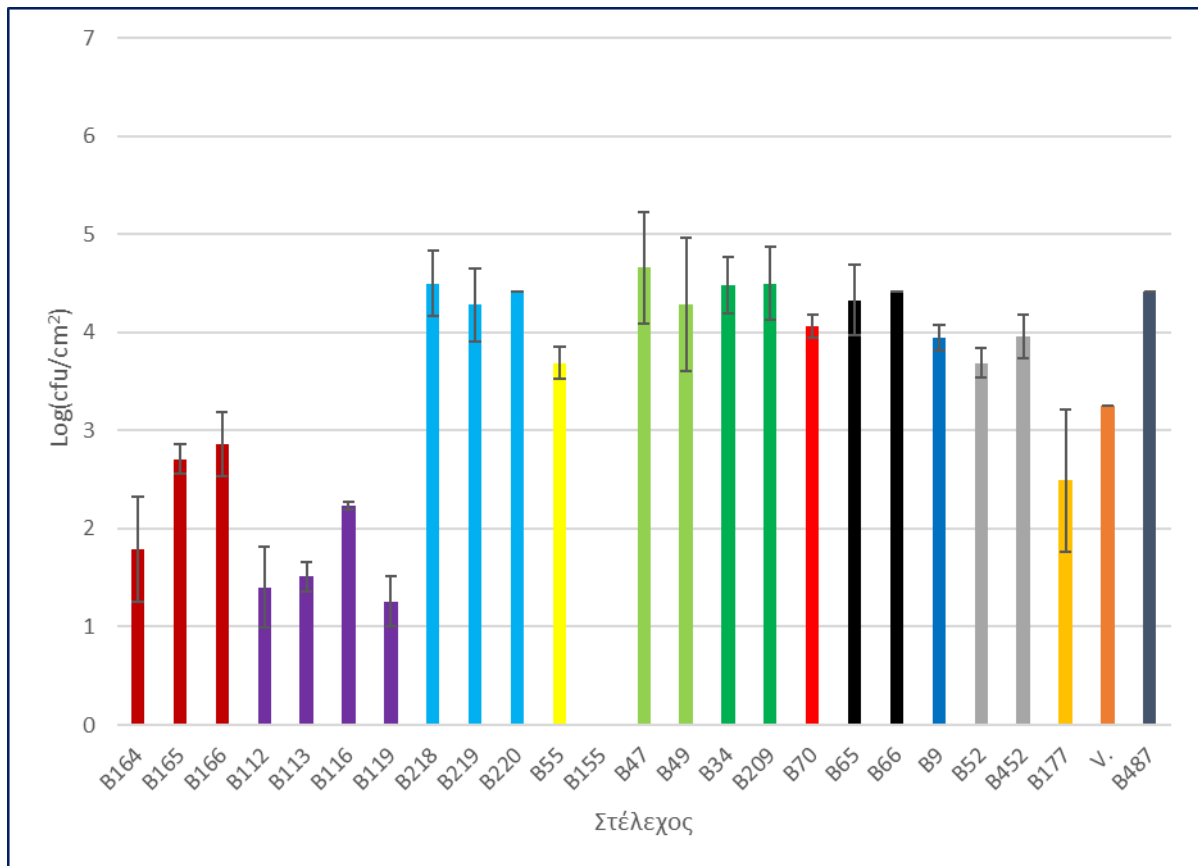
Από τα αποτελέσματα φαίνεται, ότι ο αρχικός πληθυσμός του εμβολίου, σχεδόν σε όλα τα στελέχη, κυμαινόταν σε τιμές από 10⁶ - 10⁷ cfu/ml ή αλλιώς 6-7 log(cfu/ml). Με εξαίρεση τα στελέχη όπου δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη και δεν

υπήρξε χρόνος για επαναληπτικούς εμβολιασμούς, το στέλεχος B155 είχε το μικρότερο αρχικό πληθυσμό ενώ το *Tenacibaculum discolor* τη μεγαλύτερη βιομάζα για την ανάπτυξη βιοϋμενίου.

Ο αριθμός των δεκαδικών αραιώσεων, που πραγματοποιήθηκε σε κάθε βακτηριακό εναιώρημα κάθε στελέχους, για τον προσδιορισμό του αρχικού πληθυσμού του εμβολίου ήταν εμπειρικός και εκτιμήθηκε από το μέγεθος του ιζήματος που είχε κάθε στέλεχος μετά από την τελευταία φυγοκέντρηση (έκπλυση). Γι' αυτό το λόγο, υπάρχουν αποκλίσεις στον αρχικό βακτηριακό πληθυσμό, τόσο από στέλεχος σε στέλεχος, όσο και από επανάληψη σε επανάληψη ίδιου στελέχους. Για τα στελέχη *Brochothrix thermosphacta* B113, B116 και B119 δεν παρατηρήθηκε ανάπτυξη κατά τη καλλιέργεια τους σε TSA, κατά τη καταμέτρηση του αρχικού πληθυσμού του εμβολίου, αλλά υπήρξε δημιουργία βιοϋμενίου κατά την εκπόνηση του πειραματικού πρωτοκόλλου. Αντίθετα, το B112, το οποίο αποτελεί ίδιο είδος βακτηρίου (*B. thermosphacta*) με τα παραπάνω, στο ίδιο θρεπτικό υλικό ανέπτυξε αρχικό πληθυσμό 0.97×10^6 cfu/ml.

4.2. Σχηματισμός βιοϋμενίου μετά από 3 ώρες επώασης (στάδιο προσκόλλησης)

Το αρχικό βακτηριακό εναιώρημα κάθε στελέχους, με $\approx 10^6$ κύτταρα/ml (εμβόλιο), τοποθετήθηκε σε διάλυμα PBS και σε θερμοκρασία 15 °C για 3 ώρες, ώστε να μελετηθεί η προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια του AX και η ικανότητα κάθε στελέχους να δημιουργεί βιοϋμένιο. Τα αποτελέσματα του σταδίου προσκόλλησης, τα οποία εξήχθησαν όπως περιγράφεται στο πειραματικό πρωτόκολλο, παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 2**.



Διάγραμμα 2: Ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (log cfu/cm²) ανά στέλεχος, τα οποία σχημάτισαν βιοϋμένιο στην επιφάνεια κουπονιών AX μετά από 3 ώρες επώαση στους 15 °C. Για τα στελέχη στα οποία έγινε επανάληψη της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Όπου: *Listeria monocytogenes* (B164, B165 και B166), *Brochothrix thermosphacta* (B112, B113, B116 και B119), *Pseudomonas fluorescens* (B218, B219 και B220), *Pseudomonas psychrophila* (B55 και B155), *Pseudomonas gessardii* (B47 και B49), *Pseudomonas fragi* (B34 και B209), *Shewanella baltica* (B70), *Shewanella putrefaciens* (B65 και B66), *Enterobacter aerogenes* (B9), *Salmonella enterica* (B52 και B452), *Vibrio harveyi* (B177), *Vibrio atypicus* (V.) και *Tenacibaculum discolor* (B487).

Τα περισσότερα στελέχη κατάφεραν να προσκολληθούν επαρκώς στην επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα μόλις σε τρεις ώρες επώασης, σε πληθυσμούς που έφτασαν περίπου τους 3-5 λογαρίθμους (log cfu/cm²). Στο στέλεχος B155 *P. psychrophila* δεν ανιχνεύθηκε καθόλου προσκόλληση στις τρεις ώρες επώασης, σε αντίθεση με το στέλεχος B55 του ίδιου είδους που αναπτύχθηκε κατά 3,69 log(cfu/cm²).

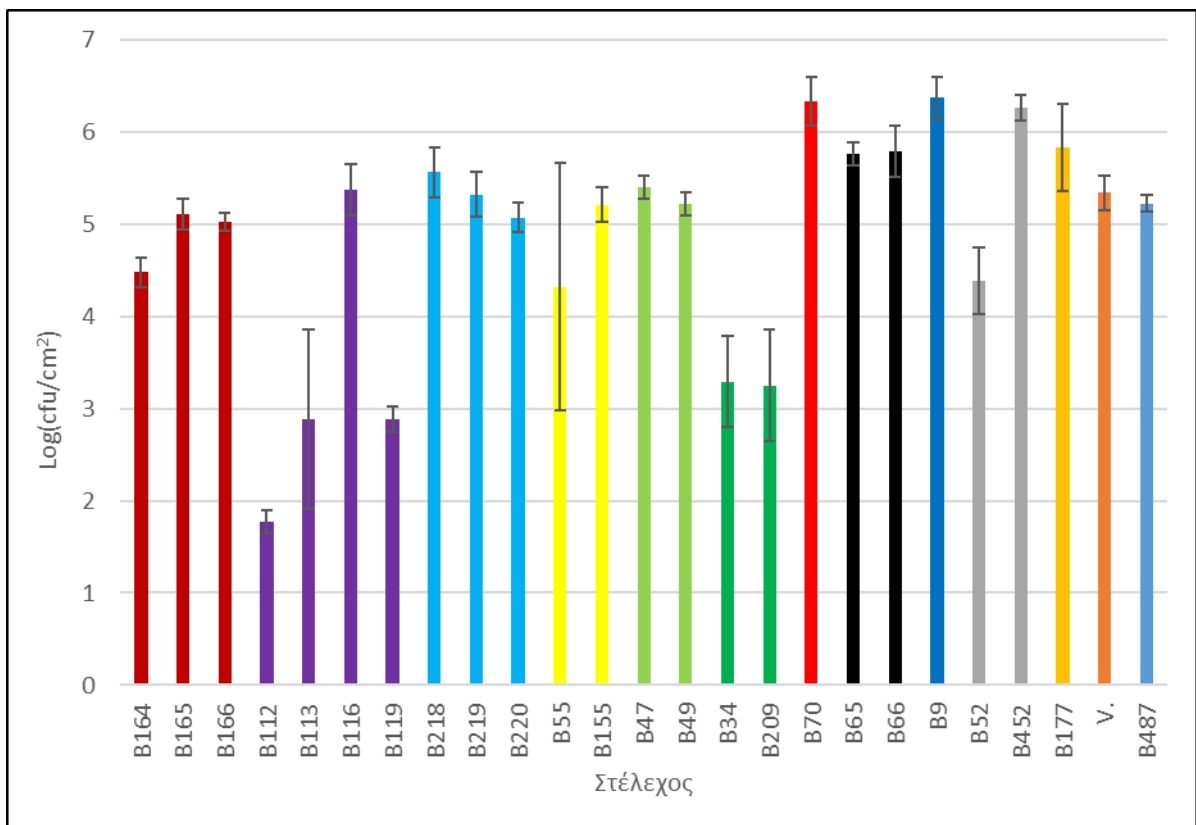
Στα στελέχη B112, B113 και B119 (*B. thermosphacta*) παρατηρήθηκε ανάπτυξη κοντά στο 1 log(cfu/cm²). Στα στελέχη B116 (*B. thermosphacta*), B164 (*L.*

monocytogenes) και B177 (*V. harveyi*) κατά 2 log(cfu/cm²) περίπου. Στο *V. atypicus* (V.) και στα στελέχη B155 και B166 (*L. monocytogenes*) παρατηρήθηκε ανάπτυξη κοντά στα 3 log(cfu/cm²). Επιπλέον, τα στελέχη: B218, B219, B220 (*P. fluorescens*), B55 (*P. psychrophila*), B49 (*P. gessardii*), B34 και B209 (*P. fragi*), B70 (*S. baltica*), B65 και B66 (*S. putrefaciens*), B9 (*E. aerogenes*), B52 και B452 (*S. enterica*) και B487 (*T. discolor*) αναπτύχθηκαν κατά 4 log(cfu/cm²) περίπου. Τέλος, το στέλεχος *P. gessardii* B47 παρουσίασε τη μεγαλύτερη προσκόλληση στην επιφάνεια του AX, η οποία έφτασε τα 4,66 log(cfu/cm²).

Από τα τέσσερα στελέχη του *B. thermosphacta*, το B116 παρουσίασε μεγαλύτερη προσκόλληση, περίπου κατά 1 log(cfu/cm²) παραπάνω σε σχέση με τα B112, B113 και B119. Το ίδιο παρατηρήθηκε και στα στελέχη της *L. monocytogenes*. Το B164 προσκολλήθηκε περίπου κατά 1 log(cfu/cm²) λιγότερο από τα B165 και B166.

4.3. Σχηματισμός βιοϋμενίου μετά από 48 h επώασης (στάδιο ανάπτυξης)

Τρία τεμάχια AX για κάθε στέλεχος, μετά την επώαση τους στους 15°C για 3 ώρες, τοποθετήθηκαν σε διάλυμα Marine Broth (MB) σε θερμοκρασία 25°C για 48 ώρες, ώστε να μελετηθεί η ικανότητα του κάθε στελέχους να δημιουργεί βιοϋμένιο στην επιφάνεια του AX υπό τη προσομοίωση θαλάσσιων συνθηκών. Τα αποτελέσματα, τα οποία εξήχθησαν όπως περιγράφεται στο πειραματικό πρωτόκολλο, παρουσιάζονται στο **Διάγραμμα 3**.



Διάγραμμα 3: Ο πληθυσμός των βιοϊμενικών κυττάρων (log cfu/cm²) ανά στέλεχος, τα οποία σχημάτισαν βιοϊμένιο στην επιφάνεια κουπονιών AX μετά από 48 ώρες επώαση στους 25 °C. Για τα στελέχη στα οποία έγινε επανάληψη της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Όπου: *Listeria monocytogenes* (B164, B165 και B166), *Brochothrix thermosphacta* (B112, B113, B116 και B119), *Pseudomonas fluorescens* (B218, B219 και B220), *Pseudomonas psychrophila* (B55 και B155), *Pseudomonas gessardii* (B47 και B49), *Pseudomonas fragi* (B34 και B209), *Shewanella baltica* (B70), *Shewanella putrefaciens* (B65 και B66), *Enterobacter aerogenes* (B9), *Salmonella enterica* (B52 και B452), *Vibrio harveyi* (B177), *Vibrio atypicus* (V.) και *Tenacibaculum discolor* (B487).

Τα περισσότερα στελέχη κατάφεραν να αναπτυχθούν σημαντικά στην επιφάνεια του ανοξειδωτού χάλυβα, υπό την θαλάσσια προσομοίωση του MB, σε 48 ώρες επώασης, σε πληθυσμούς που έφτασαν περίπου τα 4-6 log(cfu/cm²) ή εναλλακτικά 10⁴-10⁶ cfu/cm². Από τα 25 στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή τη μελέτη, τα 20 κατάφεραν, υπό τις παραπάνω συνθήκες, να ξεπεράσουν σε πληθυσμό τα 4 log(cfu/cm²), ενώ 17 στελέχη κατάφεραν να ξεπεράσουν σε πληθυσμό τα 5 log(cfu/cm²).

Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος *B. thermosphacta* B112 αναπτύχθηκε λιγότερο από 2 log(cfu/cm²), ενώ τα στελέχη B113 και B119 του ίδιου είδους αναπτύχθηκαν κατά ένα λογάριθμο περισσότερο (2,88 log cfu/cm² αμφότερα). Αντίθετα, από τα τέσσερα στελέχη του *B. thermosphacta* μόνο το B116 κατάφερε να αναπτυχθεί σημαντικά, φθάνοντας τα 5,37 log(cfu/cm²).

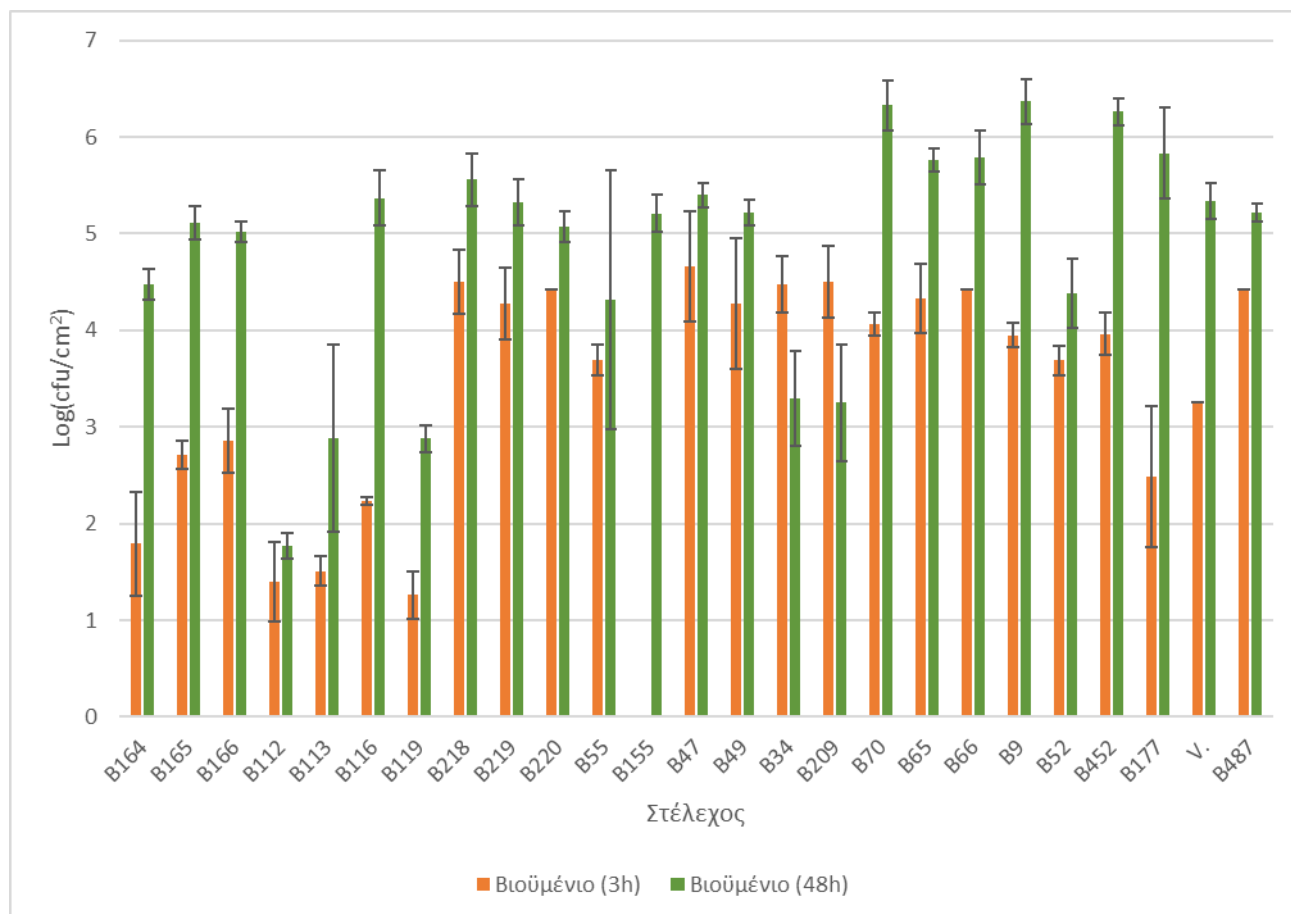
Στα στελέχη B113 και B119 (*B. thermosphacta*), B34 και B209 (*P. fragi*) παρατηρήθηκε ανάπτυξη κοντά στα 3 log(cfu/cm²), ενώ στα στελέχη B164 (*L. monocytogenes*), B55 (*P. psychrophila*) και B52 (*S. enterica*) κοντά στα 4 log(cfu/cm²). Τα στελέχη B165 και B166 (*L. monocytogenes*), B116 (*B. thermosphacta*), B218, B219 και B220 (*P. fluorescens*), B155 (*P. psychrophila*), B47 και B49 (*P. gessardii*), *V. atypicus* και B487 (*T. discolor*) αναπτύχθηκαν περίπου στα 5 log(cfu/cm²). Τέλος, στα στελέχη B70 (*S. baltica*), B65 και B66 (*S. putrefaciens*), B9 (*E. aerogenes*), B452 (*S. enterica*) και B177 (*V. harveyi*) παρατηρήθηκε ανάπτυξη κοντά στα 6 log(cfu/cm²).

Το στέλεχος *V. harveyi* B177 ήταν το μοναδικό στις 48h επώασης, το οποίο παρουσίασε σημαντική απόκλιση (πάνω από 0,5 log cfu/cm²) από τη μια επανάληψη στην άλλη. Συγκεκριμένα, στη 1^η επανάληψη αναπτύχθηκε στα 5,42 log(cfu/cm²), ενώ στη 2^η επανάληψη στα 6,24 log(cfu/cm²). Μεγαλύτερο βιοϋμενικό πληθυσμό σχημάτισε το στέλεχος B9. Δεύτερο με αμελητέα διαφορά το B70 και τρίτο στη κατάταξη το B452. Τα τρία αυτά στελέχη ήταν τα μοναδικά που ξεπέρασαν τα 6 log(cfu/cm²).

4.4. Σχηματισμός βιοϋμενίου μετά από 3 και 48 ώρες επώασης

Η σύγκριση του βιοϋμενικού πληθυσμού για κάθε στέλεχος, μετά την επώαση στους 15°C για 3h και στους 25°C για 48h, παρουσιάζεται παρακάτω στο **Διάγραμμα 4**.

4.



Διάγραμμα 4: Συγκριτική απεικόνιση της βιοϋμενικής ανάπτυξης στην επιφάνεια AX για κάθε στέλεχος, μετά την επώαση στους 15°C για 3h σε PBS και στους 25 °C για 48h σε MB. Με πορτοκαλί παρουσιάζεται η ανάπτυξη του βιοϋμενίου μετά από 3h επώασης στους 15°C, ενώ με πράσινο χρώμα η ανάπτυξη βιοϋμενίου μετά από 48h επώασης στους 25 °C. Για τα στελέχη στα οποία έγινε επανάληψη της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων. Όπου: *Listeria monocytogenes* (B164, B165 και B166), *Brochothrix thermosphacta* (B112, B113, B116 και B119), *Pseudomonas fluorescens* (B218, B219 και B220), *Pseudomonas psychrophila* (B55 και B155), *Pseudomonas gessardii* (B47 και B49), *Pseudomonas fragi* (B34 και B209), *Shewanella baltica* (B70), *Shewanella putrefaciens* (B65 και B66), *Enterobacter aerogenes* (B9), *Salmonella enterica* (B52 και B452), *Vibrio harveyi* (B177), *Vibrio atypicus* (V.) και *Tenacibaculum discolor* (B487).

Όλα τα στελέχη παρουσίασαν ανάπτυξη βιοϋμενίου στην επιφάνεια του AX μετά το πέρας της επώασης των 48h. Κατά τη 1^η επανάληψη του πειραματικού πρωτοκόλλου με το στέλεχος *Vibrio atypicus* δεν παρατηρήθηκε καμία ανάπτυξη, τόσο στο αρχικό εμβόλιο, όσο και στην επιφάνεια του AX. Αυτό προφανώς δεν οφείλεται στο ίδιο το στέλεχος, αλλά στο λάθος χειρισμό του πειραματικού πρωτοκόλλου. Όπως φάνηκε στη 2^η επανάληψη, το *V. atypicus* ήταν παραπάνω από ικανό να προσκολληθεί, να αναπτυχθεί στην επιφάνεια του AX και να δημιουργήσει βιοϋμένιο στο διάλυμα του Marine Broth.

Το *P. psychrophila* B155 ήταν το μοναδικό στέλεχος το οποίο, ενώ δεν ανιχνεύθηκε καμία ανάπτυξη μετά το στάδιο της προσκόλλησης (3h), παρουσίασε σημαντική ανάπτυξη μετά την τελική επώαση (48h), σε βιοϋμενικό πληθυσμό που έφτασε τα 5,21 log(cfu/cm²).

Το Marine Broth, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την επώαση των στελεχών στους 25°C για 48h, περιέχει τα θρεπτικά συστατικά, το αλάτι και τα ιχνοστοιχεία που απαιτούνται για την ανάπτυξη των θαλάσσιων βακτηρίων (*Vibrio spp.*, *Tenacibaculum spp.* κ.α.). Η υψηλή περιεκτικότητα του σε αλάτι (19,4 g/L) χρησιμοποιείται για την προσομοίωση του θαλασσινού νερού. Άλλα ορυκτά χρησιμοποιούνται για τη μίμηση της μεταλλικής σύνθεσης του θαλασσινού νερού. Εξαιτίας της μεγάλης περιεκτικότητας του Marine Broth σε χλωριούχο νάτριο (NaCl) και γενικότερα της σύνθεσης του, δημιουργείται ένα περιβάλλον, το οποίο δεν είναι καθόλου ευνοϊκό για την ανάπτυξη κάποιων βακτηρίων. Στη συγκεκριμένη μελέτη, τα δύο στελέχη του *Pseudomonas fragi* B34 και B209, ενώ κατά το στάδιο της προσκόλλησης στο διάλυμα PBS ανέπτυξαν βιοϋμένιο στα 4,5 log(cfu/cm²), μετά το στάδιο της ανάπτυξης σε MB παρουσίασαν μείωση στο σχηματιζόμενο βιοϋμένιο περίπου κατά 1,2 log(cfu/cm²).

Αντιθέτως, για όλα τα υπόλοιπα στελέχη του πειραματικού πρωτοκόλλου, οι μη ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης του Marine Broth φαίνεται πως, στη πραγματικότητα, δεν εμπόδισαν την ανάπτυξη του βιοϋμενικού πληθυσμού. Η ανάπτυξη στο Marine Broth στους 25°C για 48h επώασης (στάδιο ανάπτυξης), σε σύγκριση με το στάδιο προσκόλλησης, ήταν στατιστικά μη σημαντική για κάποια στελέχη (π.χ. B112, B52), ενώ για κάποια άλλα στελέχη παρατηρήθηκε μεγάλη πληθυσμιακή αύξηση (στατιστικώς σημαντική). Πιο συγκεκριμένα, τα στελέχη B177,

V., B66, B70, B65, B9, B164, B165, B166, B452, B116 και B119, μόλις σε 48 ώρες επώασης στο MB παρουσίασαν ανάπτυξη 2-3 log(cfu/cm²).

Ακολουθεί πίνακας (**Πίνακας 4**), στον οποίο παρουσιάζονται όλα τα στελέχη, ο βιοϋμενικός πληθυσμός τους (log cfu/cm²) μετά το στάδιο της προσκόλλησης και της ανάπτυξης, αλλά και η αύξηση/μείωση που παρουσίασαν από το ένα στάδιο στο άλλο.

Είδος	Στέλεχος	Log(cfu/cm ²)		Αύξηση/Μείωση
		Προσκόλληση	Ανάπτυξη	
<i>L. monocytogenes</i>	B164	1,79 ± 0,54	4,48 ± 0,16	2,69
	B165	2,71 ± 0,15	5,11 ± 0,17	2,40
	B166	2,86 ± 0,33	5,02 ± 0,10	2,16
<i>B. thermosphacta</i>	B112	1,40 ± 0,41	1,77 ± 0,13	0,37
	B113	1,51 ± 0,15	2,88 ± 0,97	1,37
	B116	2,23 ± 0,04	5,37 ± 0,28	3,14
	B119	1,26 ± 0,25	2,88 ± 0,14	1,62
<i>P. fluorescens</i>	B218	4,50 ± 0,33	5,56 ± 0,27	1,06
	B219	4,28 ± 0,37	5,32 ± 0,24	1,04
	B220	4,42	5,07 ± 0,16	0,65
<i>P. psychrophila</i>	B55	3,69 ± 0,16	4,32 ± 0,34	0,63
	B155	< όριο ανίχνευσης	5,21 ± 0,19	>4,00
<i>P. gessardii</i>	B47	4,66 ± 0,57	5,40 ± 0,13	0,74
	B49	4,28 ± 0,68	5,22 ± 0,13	0,94
<i>P. fragi</i>	B34	4,48 ± 0,29	3,29 ± 0,49	-1,19
	B209	4,50 ± 0,37	3,25 ± 0,60	-1,25
<i>S. baltica</i>	B70	4,06 ± 0,12	6,33 ± 0,26	2,27
<i>S. putrefaciens</i>	B65	4,33 ± 0,36	5,76 ± 0,12	1,43
	B66	4,42	5,79 ± 0,28	1,37
<i>E. aerogenes</i>	B9	3,95 ± 0,13	6,37 ± 0,23	2,42
<i>S. enterica</i>	B52	3,69 ± 0,15	4,38 ± 0,36	0,69
	B452	3,96 ± 0,22	6,26 ± 0,14	2,30
<i>V. harveyi</i>	B177	2,49 ± 0,73	5,83 ± 0,47	3,34
<i>V. atypicus</i>	V.	3,25	5,34 ± 0,19	2,09
<i>T. discolor</i>	B487	4,42	5,22 ± 0,09	0,80

Πίνακας 4: Τα στελέχη, ο βιοϋμενικός πληθυσμός τους (log cfu/cm²) μετά το στάδιο της προσκόλλησης και της ανάπτυξης, αλλά και η αύξηση/μείωση που παρουσίασαν από το ένα στάδιο στο άλλο.

5. Συζήτηση αποτελεσμάτων

Οι ζωνοόσοι είναι ασθένειες που μεταδίδονται από τα ζώα στον άνθρωπο και αποτελούν μεγάλη απειλή για την υγεία και τη ζωή των ανθρώπων σε όλο τον κόσμο. Σύμφωνα με εκτιμήσεις του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (ΠΟΥ), 600 εκατομμύρια περιπτώσεις ασθενειών, οι οποίες προκαλούνται από μολυσμένα τρόφιμα, σημειώθηκαν το 2010, συμπεριλαμβανομένων σχεδόν 350 εκατομμυρίων που προκλήθηκαν από παθογόνα βακτήρια (Chlebicz A et al., 2018). Τα βακτήρια, που βρίσκονται σε θαλάσσια περιβάλλοντα, παρουσιάζουν σημαντική ικανότητα στην προσαρμογή στις αλλαγές του περιβάλλοντος και στις συνθήκες πίεσης, συμπεριλαμβανομένων των μεταβολών της θερμοκρασίας (Kloska et al., 2020).

Η *Salmonella* spp. καθώς και η *L. monocytogenes* δύναται συμπτωματικά να βρεθούν στο εντερικό σύστημα των ιχθυηρών. Ως εκ τούτου, υπάρχει η πιθανότητα να καταλήξουν σε επιφάνειες (μηχανήματα και εξοπλισμός) στη βιομηχανία παραγωγής τροφίμων και να παραμείνουν εκεί με τη μορφή βιοϋμενίου (Chlebicz et al., 2018). Η συχνή εμφάνιση μικροβίων στα τρόφιμα, καθώς και η ακατάλληλη ή απρόσεκτη επεξεργασία τους, οδηγεί σε συχνές δηλητηριάσεις. Τα συμπτώματα των τροφιμογενών λοιμώξεων μπορεί να είναι ήπια, μερικές φορές σαν γρίπη, αλλά μπορεί επίσης να συνοδεύονται από σοβαρές επιπλοκές, οι οποίες μπορεί να είναι ακόμα και θανατηφόρες (Chlebicz et al., 2018).

Τα βακτήρια έχουν την ικανότητα να σχηματίσουν βιοϋμένιο σε θαλάσσια περιβάλλοντα, στην επιφάνεια οργανικών και ανόργανων υλικών (Hall-Stoodley et al., 2004). Επιπρόσθετα, μπορούν να αναπτυχθούν βιοϋμένια και στις εγκαταστάσεις παραγωγής τροφίμων θαλάσσιας προέλευσης. Τα κύτταρα, τα οποία περιέχονται μέσα στη δομή του βιοϋμενίου, είναι αρκετά πιο ανθεκτικά έναντι των καθαριστικών εξυγίανσης και των απολυμαντικών σε σχέση με τις πλαγκτονικές τους μορφές (Gandhi & Chikindas, 2007).

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν ο έλεγχος της αποτελεσματικότητας της δημιουργίας βιοϋμενίου από μεμονωμένες καλλιέργειες βακτηρίων σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, υπό τη προσομοίωση θαλάσσιων συνθηκών. Συγκεκριμένα, έγινε προσομοίωση θαλάσσιου περιβάλλοντος κατά το στάδιο της ανάπτυξης του βιοϋμενίου με την επώαση όλων των στελεχών σε Marine Broth στους 25 °C για 48

ώρες. Παράλληλα, παρατηρήθηκε η ικανότητα των στελεχών να σχηματίσουν βιοϋμένιο μετά από τρίωρη επώαση στους 15°C σε PBS (στάδιο προσκόλλησης) στην επιφάνεια του ΑΧ.

Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 25 βακτηριακά στελέχη, τα οποία μπορούν να βρεθούν σε ιχθύες και άλλα θαλάσσιας προέλευσης τρόφιμα. *L. monocytogenes* απομονωμένη από μονάδα επεξεργασίας τροφίμων, *B. thermosphacta* απομονωμένη από κουτσομούρα σε πάγο, *P. fluorescens* απομονωμένο από ωμό γάλα, *P. psychrophila* απομονωμένο από μπαρμπούνι, *P. gessardii* απομονωμένο από γόπα σε πάγο, *E. aerogenes* απομονωμένο από πτύελο, *S. enterica* απομονωμένη από τσιπούρα, *V. harveyi* θαλάσσιας προέλευσης, *V. atypicus* και *T. discolor* απομονωμένα από Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια.

Τα αποτελέσματα έδειξαν πως όλοι οι μικροοργανισμοί σχημάτισαν βιοϋμένιο από 1,77 έως 6,37 log(cfu/cm²). Είναι γνωστό ότι είναι συχνός ο σχηματισμός βιοϋμένιου στην επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα όπως αυτός υπάρχει στις βιομηχανίες τροφίμων (Kumar and Anand, 1998), όπως έχει αποδειχθεί και για τη Salmonella (Acharjee et al., 2021; Chmielewsky et al., 2003; Vestby et al., 2009).

Μπορεί να γίνει σύγκριση των αποτελεσμάτων κατά προσέγγιση με παρόμοια μελέτη, η οποία είχε θερμοκρασίες επώασης 10°C και 20°C και επώαση έως 7 ημέρες (Dhowlaghar et al., 2018), όπως και για τους 10°C και 22°C και επώαση μέχρι και 28 ημέρες (Dhowlaghar et al., 2018). Ενδιαφέρον παρουσιάζει πως, με παρόμοια αποτελέσματα, τα επίπεδα βιοϋμένιου της σαλμονέλας στην επιφάνεια του ΑΧ έφθασαν τα 4,5 log(cfu/cm²) στους 10°C και τα 6,5 log(cfu/cm²) στους 22°C σε 7 ημέρες επώασης (Dhowlaghar et al., 2018). Αντίστοιχα, στη παρούσα μελέτη τα επίπεδα βιοϋμένιου των στελεχών της σαλμονέλας στην επιφάνεια του ανοξειδωτου χάλυβα έφθασαν τα 3,8 log(cfu/cm²) στους 15°C και τα 6,26 log (cfu/cm²) στους 25°C σε 48h (B452).

Επιπρόσθετα, σε μελέτη για το σχηματισμό βιοϋμένιου από τη *L. monocytogenes*, τα παθογόνα βακτήρια αφέθηκαν να σχηματίσουν βιοϋμένιο σε κουπόνια ΑΧ, τα οποία επώαστηκαν στους 15°C για έως και 240h, σε περιοδικά ανανεώσιμο υπόστρωμα χυμού ψαριών παρασκευασμένο με υδρόβια εκχύλιση σάρκας τσιπούρας. Ο μέγιστος πληθυσμός βιοϋμένιου καταμετρήθηκε περίπου στα

6 log(cfu/cm²) μετά από 192h επώασης (Papaioannou et al., 2018). Επιπλέον, οι Dhowlaghar et al. (2018) μελέτησαν το σχηματισμό βιοϋμενίου από το βακτήριο *L. monocytogenes* σε υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις εκχυλίσματος βλέννας γατόψαρου, σε διάφορες επιφάνειες επαφής με τρόφιμα, στους 10 και 22°C. Η ανάπτυξη και ο σχηματισμός βιοϋμενίου όλων των στελεχών *L. monocytogenes* αυξήθηκε στις υψηλότερες συγκεντρώσεις εκχυλίσματος βλέννας γατόψαρου στους 10 και στους 22°C. Ανακάλυψαν ότι όταν προστεθούν 15 μg/ml εκχυλίσματος βλέννας γατόψαρου σε εναιώρημα 3 log(cfu/ml) *L. monocytogenes*, τα επίπεδα του βιοϋμενίου του βακτηρίου στην επιφάνεια του AX φτάνουν τα 4-5 log(cfu/cm²) στους 10°C και 5-6 log(cfu/cm²) στους 22°C σε 7 ημέρες επώασης. Αντίστοιχα, στη παρούσα μελέτη, τα επίπεδα βιοϋμενίου των στελεχών *L. monocytogenes* στην επιφάνεια του AX μετά την επώαση στο Marine Broth για 48h στους 25°C έφθασαν περίπου στα 4,5 log(cfu/cm²) για το στέλεχος B164, στα 5,1 log(cfu/cm²) για το στέλεχος B165 και στα 5 log(cfu/cm²) για το στέλεχος B166.

Στην έρευνα των Quintieri et al. (2020) για το στέλεχος *P. fluorescens* 10³ cfu/ml κύτταρα του βακτηρίου καλλιεργήθηκαν σε ζωμό M63 για 72 ώρες. Στις 24 ώρες επώασης παρατηρήθηκε μείωση του καταμετρούμενου βιοϋμενικού πληθυσμού κατά 2,1 ± 0,15 και 1,3 ± 0,2 log(cfu/ml). Αντιθέτως, στη παρούσα μελέτη, ο πληθυσμός του βιοϋμενίου των στελεχών του *P. fluorescens* (B218, B219 και B220) στην επιφάνεια του AX μετά την επώαση στο Marine Broth έφθασαν τα 5,07-5,56 log(cfu/cm²) στους 25 °C στις 48h επώασης. Για το στέλεχος *P. gessardii* δε βρέθηκε αντίστοιχη βιβλιογραφία, αλλά έχει καταγραφεί η παρουσία του συγκεκριμένου βακτηρίου σε γαλακτοβιομηχανία (Weber et. al., 2019) σε φρούτα (Husain et. al., 2017) και σε πάγο στην Ανταρκτική (Buonocore et. al., 2020) σε μορφή βιοϋμενίου.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των Wickramasinghe et al. (2020), οι οποίοι παρατήρησαν το σχηματισμό βιοϋμενίου από στελέχη *P. fragi*. Τα βιοϋμένια αναπτύχθηκαν σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, που τοποθετήθηκαν στην επιφάνεια αποστειρωμένων κομματιών βόειου κρέατος στους 10°C και στους 25°C. Οι εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες των μεμβρανών εκχυλίστηκαν σε διαλυτές και δεσμευμένες μορφές και αξιολογήθηκαν χημικά για ολικούς υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και εξωκυτταρικό DNA. Τα δείγματα από τη φασματοσκοπία Raman ελήφθησαν από πλαγκτονικά βακτήρια και μεμβράνες των βιοϋμενίων που

αναπτύχθηκαν στους 10°C και 25°C. Παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στους συνολικούς υδατάνθρακες και τις πρωτεΐνες όταν το βιοϋμένιο του *P. fragi* αναπτύχθηκε στους 10°C σε σύγκριση με τους 25 °C. Επίσης, υψηλότερα επίπεδα υδατανθράκων ανιχνεύθηκαν στα βιοϋμενικά κύτταρα σε σύγκριση με τα πλαγκτονικά. Αυτή η μελέτη αναδεικνύει ότι τα ψυχροτροφικά στελέχη του *P. fragi* μπορούν να ανταποκριθούν στο στρες λόγω ψύχους αυξάνοντας τις εξωκυτταρικές εκκρίσεις πολυμερών και τον σχηματισμό βιοϋμενίου, σε σύγκριση με υψηλότερες θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και στη παρούσα μελέτη, καθώς τα δύο στελέχη του *P. fragi* B34 και B209, ενώ κατά το στάδιο της προσκόλλησης στους 15 °C ανέπτυξαν βιοϋμένιο κοντά στα 4,5 log(cfu/cm²), μετά το στάδιο της ανάπτυξης στους 25°C παρουσίασαν μείωση στο σχηματιζόμενο βιοϋμένιο περίπου κατά 1,2 log(cfu/cm²).

Η *Shewanella baltica* παίζει σημαντικό ρόλο στην απονιτροποίηση και τη βιοαποκατάσταση του θαλάσσιου περιβάλλοντος, αλλά έχει επίσης αναγνωριστεί ως υπεύθυνη για την αλλοίωση των θαλασσινών που αποθηκεύονται στον πάγο (Kloska et al., 2020). Η *S. baltica* KB30, η οποία απομονώθηκε από το θαλασσινό νερό που συλλέγεται στον Αρκτικό Κύκλο, έχει διερευνηθεί στο παρελθόν για ορισμένες φυσιολογικές και μεταβολικές ικανότητες. Το παραπάνω στέλεχος παρουσιάζει μια ασυνήθιστα μεγάλη προσαρμογή στις διακυμάνσεις της θερμοκρασίας, συγκεκριμένα από τους 0°C έως και πάνω από τους 35°C, με τη βέλτιστη ανάπτυξη σε ένα πολύ ευρύ φάσμα θερμοκρασιών (15–30 °C), αντανακλώντας έτσι την ικανότητα του βακτηρίου να προσαρμόζεται σε σχετικά ακραίες συνθήκες (Leyva-Díaz et al., 2017). Η ικανότητα αυτή παρατηρήθηκε και στη παρούσα μελέτη, καθώς τα επίπεδα βιοϋμενίου της *S. baltica* (B70) στην επιφάνεια του AX έφθασαν τα 4 log(cfu/cm²) στους 15°C σε μόλις 3 ώρες επώασης και περίπου τα 6.3 log(cfu/cm²) στους 25°C σε 48 ώρες.

Παγκοσμίως, η *Shewanella putrefaciens* είναι ο κυρίαρχος μικροοργανισμός που αλλοιώνει τα θαλασσινά κατά την αποθήκευσή τους σε ψυγείο. Αυτό το βακτήριο μπορεί να προσκολληθεί σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες για να σχηματίσει βιοϋμένιο, το οποίο συμβάλλει στην υποβάθμιση της ποιότητας των θαλασσινών και στη μείωση της διάρκειας ζωής τους. Ο μηχανισμός σχηματισμού βιοϋμενίου από τη *S. putrefaciens* δεν έχει ακόμη περιγραφεί αποτελεσματικά αλλά

έχει μελετηθεί η ανάπτυξη ώριμου βιοϋμενίου στους 4, 15 και 30°C. Ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι φυσικές διαστάσεις του ώριμου βιοϋμενίου, δηλαδή η βιομάζα, ο όγκος και το μέσο πάχος, τα οποία ήταν υψηλότερα στους 4°C σε σύγκριση με τους 15 και 30°C (Yan & Xie, 2020). Στη παρούσα μελέτη τα επίπεδα βιοϋμενίου της *S. putrefaciens* (B65 και B66) στην επιφάνεια του AX έφθασαν τα 4,3-4,5 log(cfu/cm²) στους 15 °C κατά το στάδιο της προσκόλλησης και αυξήθηκαν στα 5.8 log(cfu/cm²) στους 25°C στο στάδιο της ανάπτυξης.

Η *Salmonella enterica ser. enteritidis* είναι ο πιο συχνά ανιχνευόμενος ορότυπος στην ανθρώπινη σαλμονέλωση εξαιτίας της ικανότητας του να παράγει βιοϋμένιο και της μεγάλης μεταδοτικότητας του από ζώα και τρόφιμα ζωικής προέλευσης στον άνθρωπο (Ćwiek et al., 2020). Στη μελέτη των Akinola et al. (2020) αξιολογήθηκε η επίδραση των θερμοκρασιών επώασης (25°C, 37°C και 40°C) στη δυνατότητα σχηματισμού βιοϋμενίου από διάφορους ορότυπους *S. enterica*. Στη μελέτη αυτή βρέθηκε ότι η ικανότητα να σχηματίσουν βιοϋμένιο, περίπου του 80% των οροτύπων *S. enterica*, αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης αλλά μειώθηκε στους 40°C. Τα ευρήματα της παραπάνω έρευνας υποδεικνύουν ότι η μέση θερμοκρασία ευνοεί το σχηματισμό βιοϋμενίου στους ορότυπους *Salmonella enterica* και πως υπάρχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση μεταξύ του σχηματιζόμενου βιοϋμενίου και της θερμοκρασίας επώασης ($p \geq 0,01$). Ωστόσο, η επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στο σχηματισμό βιοϋμενίου ήταν διαφορετική από ορότυπο σε ορότυπο.

Στην μελέτη των Iliadis et al. (2018) μελετήθηκε η επίδραση του pH, της αλατότητας και της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη βιοϋμενίου στην επιφάνεια AX από δύο στελέχη *S. enterica*, ένα στέλεχος *S. Enteritidis* και ένα *S. Typhimurium*. Η επώαση των AX έγινε στη κατάλληλη θερμοκρασία (13°C, 26°C και 39°C) για 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο TSB, στο οποίο είχε ρυθμιστεί κατάλληλα το pH και η αλατότητα. Ανάμεσα στους διαφορετικούς συνδυασμούς θερμοκρασίας, pH και αλατότητας που μελετήθηκαν υπήρχαν κάποιοι παρόμοιοι με τις συνθήκες ανάπτυξης της παρούσας μελέτης. Για θερμοκρασία επώασης 26°C, pH 8 και 4,5% NaCl τα δύο στελέχη αναπτύχθηκαν περίπου στα 5 log(cfu/cm²), ενώ το στέλεχος *S. Enteritidis* παρουσίασε μέγιστη ανάπτυξη βιοϋμενίου 6,5 log(cfu/cm²) για θερμοκρασία 34,5°C, pH 8 και αλατότητα 0,5%. Στη παρούσα μελέτη, τα στελέχη της *S. enterica* αναπτύχθηκαν σε

Marine Broth (pH περίπου 7,6 και συγκέντρωση NaCl 19,4 g/L) στους 25°C για 48 ώρες. Πιο συγκεκριμένα, το στέλεχος B452 αναπτύχθηκε περίπου στα 6,3 log(cfu/cm²) και το στέλεχος B52 αναπτύχθηκε περίπου στα 4,4 log(cfu/cm²).

Το στέλεχος *Vibrio harveyi* είναι ένα καλά αναγνωρισμένο και σοβαρό παθογόνο των ψαριών και των θαλάσσιων ασπόνδυλων. Τα άρρωστα ψάρια μπορεί να εμφανίσουν μια σειρά αλλοιώσεων, συμπεριλαμβανομένων βλαβών στα μάτια (τύφλωση), γαστρεντερίτιδας, μυϊκής νέκρωσης, δερματικών ελκών και νόσου της σήψης της ουράς (Austin & Zhang, 2006). Για τις γαρίδες, το συγκεκριμένο βακτήριο θεωρείται ως ο αιτιολογικός παράγοντας της φωτεινής δόνησης κατά την οποία τα προσβεβλημένα ζώα λάμπουν στο σκοτάδι. Υπάρχει μια δεύτερη κατάσταση της γαρίδας γνωστή ως *Bolitas nigricans* όπου η πεπτική οδός είναι γεμάτη με σφαίρες αποκομμένου ιστού. Αναγνωρίζεται ότι οι μηχανισμοί παθογένειας του *V. harveyi* μπορεί να είναι διαφορετικοί στα ψάρια και στις γαρίδες. Οπότε, γίνεται αντιληπτό πως η παρουσία του συγκεκριμένου βακτηρίου σε θαλάσσια περιβάλλοντα όπως οι ιχθυοκαλλιέργειες μπορεί να αποτελέσει κίνδυνο για την υγεία των θαλάσσιων οργανισμών (Robertson et al, 1998). Στη συγκεκριμένη μελέτη το στέλεχος *Vibrio harveyi* B177 κατάφερε να αναπτυχθεί περίπου κατά 5,8 log(cfu/cm²) σε μόλις 48 ώρες επώασης στους 25°C.

Η Tenacibaculosis (μυξοβακτηριδίαση) είναι μια βακτηριακή ελκώδης νόσος που προσβάλλει τα θαλάσσια ψάρια και αποτελεί σημαντική απειλή για την υδατοκαλλιέργεια παγκοσμίως. Οι αιτιολογικοί του παράγοντες είναι τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Tenacibaculum*, των οποίων η μόλυνση μπορεί να προκαλέσει εξωτερικά παθολογικά συμπτώματα και αλλοιώσεις, όπως έλκη, αιμορραγικές και νεκρωτικές αλλοιώσεις στο δέρμα, πτερύγια και ουρά, αιμορραγική στοματίτιδα και διάβρωση της ουράς και των πτερυγίων (Gourzioti et al., 2016). Συνεπώς, όπως και με το *V. harveyi*, η παρουσία του σε θαλάσσια περιβάλλοντα, υπό μορφή βιοϋμενίου, μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα στην υγεία των ιχθύων και να μειώσει την αποδοτικότητα της υδατοκαλλιέργειας. Δεν βρέθηκε κάποια μελέτη με το συγκεκριμένο στέλεχος που συσχετίζεται με τη παραγωγή βιοϋμενίου. Στη παρούσα μελέτη το στέλεχος *T. discolor*, που απομονώθηκε από Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια, αναπτύχθηκε από 4,42 log(cfu/cm²) σε μόλις 3 ώρες επώασης στα 5,22 log(cfu/cm²) στις 48 ώρες επώασης στο Marine Broth.

Σύμφωνα με τη διαθέσιμη βιβλιογραφία, για πρώτη φορά μελετήθηκαν μονοκαλλιέργειες στελεχών στην ικανότητα τους να σχηματίσουν βιοϋμένιο, όπως τα *E. aerogenes*, *V. atypicus* και *T. discolor*, ειδικά υπό αυτές τις συνθήκες. Για το *P. psychrophila* και το *B. thermosphacta* δε βρέθηκε βιβλιογραφία με μονοκαλλιέργεια βιοϋμένιου. Επιπλέον, δε βρέθηκαν μελέτες με το πρωτόκολλο στις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν στη παρούσα μελέτη. Περεταίρω πειραματικά πρωτόκολλα πρέπει να εκπονηθούν σε μικτές καλλιέργειες βακτηρίων, ώστε να προσομοιωθεί η μικροχλωρίδα των ιχθύων και να μελετηθεί η συνδυαστική δράση των βακτηρίων στην ανάπτυξη του βιοϋμένιου. Για παράδειγμα, οι [Papaioannou et al. \(2018\)](#) σε μικτές καλλιέργειες δε βρήκαν τον ίδιο πληθυσμό βιοϋμένιου *L. monocytogenes* σε σχέση με μονοκαλλιέργεια του ίδιου βακτηρίου. Το συγκεκριμένο βακτήριο υπό τέτοιες συνθήκες μικτής καλλιέργειας δεν κατάφερε να ξεπεράσει τα 2 log(cfu/cm²) βιοϋμενικού πληθυσμού.

6. Βιβλιογραφία

- ❖ Acharjee, M., Hoque, R., Shreya, S.S., Tabassum, N., Acharjee, M.R., Rezanujjaman, M., Rahman, M., Amin, A. & Mahmud, M.R (2021). Antibiotic susceptibility pattern of fish pathogens: A new approach of emerging the bacterial resistance through biofilm formation in *in-vitro* condition. *Saudi Journal of Biological Sciences*,28(12):6933-6938.
- ❖ Akinola, S. A., Tshimpamba, M. E., Mwanza, M., & Ateba, C. N. (2020). Biofilm Production Potential of *Salmonella* Serovars Isolated from Chickens in North West Province, South Africa. *Polish journal of microbiology*, 69(4), 427–439.
- ❖ Alam, M., Sultana, M., Nair, G., Sack, R., Sack, D., Siddique, A., Ali, A., Huq, A. & Colwell, R. (2006). Toxigenic *Vibrio cholerae* in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:2849-2855.
- ❖ Austin, B. & Zhang, X.-H. (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology*, Volume 43, Issue 2.
- ❖ Azeredo, J., Azevedo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M. et al. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews in Microbiology*, Volume 43, Issue 3, p. 313-351.
- ❖ Branda, S.S., Vik, A., Friedman, L. & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, Vol.13 No.1.
- ❖ Breyers, J. D., & Ratner, J. P. (2004). Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM News*, 70, 232–237.
- ❖ Buonocore, C., Tedesco, P., Vitale, G. A., Esposito, F. P., Giugliano, R., Monti, M. C., D'Auria, M. V., & De Pascale, D. (2020). Characterization of a New Mixture of Mono-Rhamnolipids Produced by *Pseudomonas gessardii* Isolated from Edmonson Point (Antarctica). *Marine drugs*, 18(5), 269.
- ❖ Chang, Y.I. & Chang, P.K. (2002). The role of hydration force on the stability of the suspension of *Saccharomyces cerevisiae* application of the extended DLVO theory. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 211:67–77.

- ❖ Characklis W.G. (1973). Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes. *Water Research*, 7:1249–58.
- ❖ Chavant, P., Gaillard-Martinie, B., Talon, R., Hébraud, M. & Bernardi, T. (2007). A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 68:605–12.
- ❖ Chlebicz, A. & Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5):863.
- ❖ Chmielewsky, R.A.N. & Frank, J.F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2:22-32.
- ❖ Costerton, J.W. (1999). Introduction to biofilm. *International Journal of Antimicrobial Agent*, 11:217-21.
- ❖ Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. (1994). Biofilms, the Customized Microniche. *Journal of Bacteriology*, Apr. 1994, p. 2137-2142.
- ❖ Ćwiek, K., Korzekwa, K., Tabiś, A., Bania, J., Bugła-Płoskońska, G., & Wieliczko, A. (2020). Antimicrobial Resistance and Biofilm Formation Capacity of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis Strains Isolated from Poultry and Humans in Poland. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 9(8), 643.
- ❖ Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 28, Issue 3, Pages 261–289.
- ❖ Dhowlaghar, N., Abeyundara, P.A., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., Chang, S., Cheng, W.H. & Sharma, C.S. (2018). Growth and Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* in Catfish Mucus Extract on Four Food Contact Surfaces at 22 and 10°C and Their Reduction by Commercial Disinfectants. *Journal of Food Protection*, 81(1):59-67.

- ❖ Dhowlaghar, N., Bansal, M., Schilling, M.W. & Nannapaneni, R. (2018). Scanning electron microscopy of *Salmonella* biofilms on various food-contact surfaces in catfish mucus. *Food Microbiology*, 74:143-150.
- ❖ Dhowlaghar, N., De Abrew Abeysundara, P., Nannapaneni, R., Schilling, M.W., Chang, S., Cheng, W.H. & Sharma, C.S. (2018). Biofilm formation by *Salmonella* spp. in catfish mucus extract under industrial conditions. *Food Microbiology*, 70:172-180.
- ❖ Djordjevic, D., Wiedmann, M. & Mclandsborough, L.A. (2002). Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:2950–8.
- ❖ Donlan R.M. (2000). Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO Journal*, 46:47–52.
- ❖ Donlan R.M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, Vol 8, No9.
- ❖ Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 15(2):167-93.
- ❖ Flemming, H.C. & Ridgway, H. (2009). Biofilm Control: Conventional and Alternative Approaches. *Marine and Industrial Biofouling* (pp.103-117).
- ❖ Flemming, H.C. & Schaule, G. (1988). Biofouling on membranes – a microbiological approach. *Desalination* 70 : 95–119.
- ❖ Flemming, H.C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, volume 8, pages623–633.
- ❖ Flemming, H.C. (2002). Biofouling in water systems – cases, causes and countermeasures. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59:629–640.
- ❖ Flemming, H.C. (2011). The perfect slime. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 86(2011) 251-259.
- ❖ Flemming, H.C., Neu, T. & Wozniak, D.-J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". *Journal of Bacteriology*, 189(22):7945-7.

- ❖ Fletcher, M. (1977). The effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *The Canadian Journal of Microbiology*, 23:1–6.
- ❖ Gallardo-Moreno, A.M., Gonzalez-Martin, M.L., Perez-Giraldo, C., Bruque, J.M. & Gómez-García, A.C. (2004). The measurement temperature: an important factor relating physicochemical and adhesive properties of yeast cells to biomaterials. *Journal of Colloid and Interface Science* ;271:351–8.
- ❖ Gandhi, M. & Chikindas, M.L. (2007). *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113:1–15.
- ❖ Giaouris, E., Chorianopoulos, N. & Nychas, G.J. (2014). Acquired acid adaptation of *Listeria monocytogenes* during its planktonic growth enhances subsequent survival of its sessile population to disinfection with natural organic compounds. *Food Research International*, Volume 64, Pages 896-900.
- ❖ Gourzioti, E., Kolygas, M.N., Athanassopoulou, F. & Babili, V. (2016). Tenacibaculosis in aquaculture farmed marine fish. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 67(1): 21-32.
- ❖ Guezennec, J., Herry, J.M., Kouzayha, A., Bachere, E., Mittelman, M.W. & Bellon Fontaine, M.N. (2012). Exopolysaccharides from unusual marine environments inhibit early stages of biofouling. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 66:1-7.
- ❖ Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13:228–33.
- ❖ Heukelekian, H. & Heller, A. (1940). Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology*, 40:547–58.
- ❖ Husain, F. M., Ahmad, I., Al-Thubiani, A. S., Abulreesh, H. H., AlHazza, I. M., & Aqil, F. (2017). Leaf Extracts of *Mangifera indica* L. Inhibit Quorum Sensing - Regulated Production of Virulence Factors and Biofilm in Test Bacteria. *Frontiers in microbiology*, 8, 727.
- ❖ Iliadis I., Daskalopoulou A., Simões M. & Giaouris E., (2018). Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm

formation by *Salmonella enterica* ser. *Enteritidis* and *Typhimurium* under low nutrient food-related conditions. *Food Research International*, 107, 10-18.

- ❖ Jahid, I.K., Mizan, F.R., Ha, A.-J. & Ha, S.-D. (2015). Effect of salinity and incubation time of planktonic cells on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing of *Aeromonas hydrophila*. *Food Microbiology*, 49:142-51.
- ❖ Jones, H.C., Roth, I.L. & Saunders, W.M. (1969). Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology*, 99:316–25.
- ❖ Kishen, A. & Haapasalo, M. (2012). Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontic Topics*, 22, 58–78.
- ❖ Kloska, A., Cech, G. M., Sadowska, M., Krause, K., Szalewska-Pałasz, A., & Olszewski, P. (2020). Adaptation of the Marine Bacterium *Shewanella baltica* to Low Temperature Stress. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4338.
- ❖ Kostaki, M., Chorianopoulos, N., Braxou, E., Nychas, G.-J. & Giaouris, E. (2012). Differential Biofilm Formation and Chemical Disinfection Resistance of Sessile Cells of *Listeria monocytogenes* Strains under Monospecies and Dual-Species (with *Salmonella enterica*) Conditions. *ASM Journals, Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 78, No. 8.
- ❖ Kostoglou, D., Tsaklidou, P., Iliadis, I., Garoufallidou, N., Skarmoutsou, G., Koulouris, I. & Giaouris, E. (2021). Advanced Killing Potential of Thymol against a Time and Temperature Optimized Attached *Listeria monocytogenes* Population in Lettuce Broth. *Biomolecules*, 11(3), 397.
- ❖ Kumar, C. G. & Anand, S.K. (1998). Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *International Journal of Food Microbiology*, 42(1–2): 9–27.
- ❖ Leriche, V., Sibille, P. & Carpentier, B. (2000). Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1851–6.
- ❖ Lewandowski, Z. (2000). Structure and function of biofilms, p. 1–17. In L. V. Evans (ed.), *Biofilms: recent advances in their study and control*. *Harwood Academic Publishers*.

- ❖ Leyva-Díaz, J. C., Poyatos, J. M., Barghini, P., Gorrasi, S., & Fenice, M. (2017). Kinetic modeling of *Shewanella baltica* KB30 growth on different substrates through respirometry. *Microbial cell factories*, 16(1), 189.
- ❖ Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D & Faucher, S.P. (2014). The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 5:258.
- ❖ Li, Y. (2001). Cell density modulates acid adaption in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 183:6875–84.
- ❖ McLean, R.J.C., Whiteley, M., Stickler, D.J. & Fuqua, W.C. (1997). Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 154, 259-263.
- ❖ Mieszkin, S., Callow, M.E. & Callow, J.A. (2013). Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: A mini review. *Biofouling*, 29(9).
- ❖ Mizan, F.R., Jahid, I.K. & Ha, S.-D. (2015). Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge. *Food Microbiology*, Volume 49, Pages 41-55.
- ❖ O'Toole, G., Kaplan, H.-B. & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 54 : 49-79.
- ❖ Papaioannou, E., Giaouris, E., Berillis, P. & Boziaris, I. (2018). Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *International Journal of Food Microbiology*, 21;267:9-19.
- ❖ Pérez-Rodríguez, F., Campos, D., Ryser A.T., Buchholz A.L., Posada-Izquierdo, G.D., Marks, B.P., Zurera, G. & Todd, E. (2011). A mathematical risk model for *Escherichia coli* O157:H7 cross-contamination of lettuce during processing. *Food Microbiology* 28(4): 694–701.
- ❖ Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P., McKnight, S., Kende, A.S., Greenberg, E.P. & Iglewski, B.H. (1999). Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(20), 11229-11234.

- ❖ Poulsen, L. V. (1999) Review: Article microbial biofilm in food processing. *Lebensmittel- Wissenschaft Und-Technologie*, 32:321–326.
- ❖ Quintieri, L., Fanelli, F., Zühlke, D., Caputo, L., Logrieco, A. F., Albrecht, D., & Riedel, K. (2020). Biofilm and Pathogenesis-Related Proteins in the Foodborne *P. fluorescens* ITEM 17298 With Distinctive Phenotypes During Cold Storage. *Frontiers in microbiology*, 11, 991.
- ❖ Railkin, A.I. (2004). Marine Biofouling: Colonization Processes and Defenses. Florida, USA: CRC Press.
- ❖ Rao T.S. (2009). Comparative effect of temperature on biofilm formation in natural and modified marine environment. *Aquatic Ecology*, 44:463–478.
- ❖ Robertson, P.A.W., Calderon, J., Carrera, L., Stark, J.R., Zherdmant, M. & Austin, B. (1998). Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae, *Diseases of Aquatic Organisms*, 32:151-155.
- ❖ Rutter, P.R., Vincent, B. (1980). Microbial adhesion to surfaces. London: Ellis Horwood.
- ❖ Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K.R. & Briand, J.F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. *Environmental microbiology*, 15(11), 2879-2893.
- ❖ Satheesh, S., Ba-akdah, M.A. & Al-Sofyani, A.A. (2016). Natural antifouling compound production by microbes associated with marine microorganisms — A review. *Electronic Journal of Biotechnology*, Volume 21, Pages 26-35.
- ❖ Shi, X. & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in Food. *Science & Technology*, 20(9): 407–413.
- ❖ Simões, M., Simões, L.C. & Vieira, M.J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT—Food Science and Technology*, 43(4): 573–583.
- ❖ Song, X., Ma, Y., Fu, J., Zhao, A., Guo, Z., Malakar, P.K., Pan, Y. & Zhao, Y. (2017). Effect of temperature on pathogenic and non-pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* biofilm formation. *Food Control*, Volume 73, Part B, Pages 485-491.

- ❖ Turan, N.B., Chormey, D.S., Büyükpınar, Ç., Engin, G.O. & Bakirdere, S. (2017). Quorum sensing: Little talks for an effective bacterial coordination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 91, Pages 1-11.
- ❖ Van Houdt, R. & Michiels, C.W. (2010). Biofilm formation and the food industry— A focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology* 109: 1117–1131.
- ❖ Vestby, L.K., Møretrø, T., Langsrud, S., Heir, E. & Nesse, L.L. (2009). Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 27;5:20.
- ❖ Vilas-Boas, C., Sousa, E., Pinto, M. & Correia-da-Silva, M. (2017). An antifouling model from the sea: a review of 25 years of zosteric acid studies. *Biofouling*, 33(10):927-942.
- ❖ Wang, F., Deng, L., Huang, F., Wang, Z., Lu, Q. & Xu, C. (2020). Flagellar Motility Is Critical for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Biofilm Development. *Frontiers in Microbiology*. 9;11:1695.
- ❖ Wang, J., Liu, Q., Wu, B., Hu, H., Dong, D., Yin, J. & Ren, H. (2020). Effect of salinity on mature wastewater treatment biofilm microbial community assembly and metabolite characteristics. *Science of The Total Environment* Volume 711, 1 April 2020, 134437.
- ❖ Weber, M., Liedtke, J., Plattes, S., & Lipski, A. (2019). Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and -independent methods. *PloS one*, 14(9), e0222238.
- ❖ Wickramasinghe, N.N., Hlaing, M.M., Ravensdale, J.T., Coorey, R., Chandry, P.S. & Dykes, G.A. (2020). Characterization of the biofilm matrix composition of psychrotrophic, meat spoilage pseudomonads. *Scientific Reports* 10 , article number: 16457.
- ❖ Wilson, C., Lukowicz, R., Merchant, S., Valquier-Flynn, H., Caballero, J., Sandoval, J., Okuom, M. et al. (2017). Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-review. *Journal of Engineering and Technology*, 6(4).

- ❖ Wingender, J. & Flemming, H.C. (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, Volume 214, Issue 6, Pages 417-423.
- ❖ Wingender, J., Neu, T. & Flemming, H.-C. (1999). What are Bacterial Extracellular Polymeric Substances?. *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, pp 1–19.
- ❖ Yan, J., & Xie, J. (2020). Comparative Proteome Analysis of *Shewanella putrefaciens* WS13 Mature Biofilm Under Cold Stress. *Frontiers in microbiology*, 11, 1225.
- ❖ Zobell C.E. (1943). The effect of solid surfaces on bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46:39–56.
- ❖ Καμαρινού Χ. (2018). Εφαρμογή νανοτεχνολογίας για την απολύμανση επιφανειών τροφίμων, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου.
- ❖ Τσουμαλάκου Ε. (2016). Παρατήρηση βιοϋμενίων θαλάσσιων μικροοργανισμών σε φίλτρα τσιγάρων, ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ.