

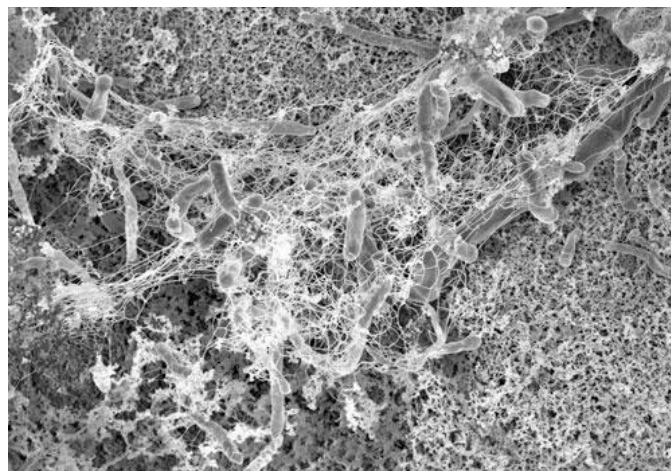
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΙΓΑΙΟΥ

Σχολή Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής



«Μοντελοποίηση σχηματισμού βιο-υμενίου από τη *Salmonella enterica* πάνω σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα συναρτήσει της θερμοκρασίας, του pH και της αλατότητας»



Πτυχιακή Μελέτη: **Δασκαλοπούλου Αικατερίνη** (fns13021)

Ηλιάδης Ιωάννης (fns13031)

Τριμελής Επιτροπή Αξιολόγησης: α) **Γκισούρης Ευστάθιος**, Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιολογίας Τροφίμων (Επιβλέπων)

β) **Καραντώνης Χαράλαμπος**, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Τροφίμων

γ) **Μακρής Δημήτριος**, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας Τροφίμων

Ιανουάριος 2018, Μύρινα, Λήμνος

Περιεχόμενα

Κατάλογος εικόνων	4
Κατάλογος πινάκων	6
Ευχαριστίες	7
Ελληνική Περίληψη	8
Αγγλική Περίληψη (Abstract)	9
Θεωρητικό Μέρος	10
Κεφάλαιο 1	11
Σχηματισμός βιο-υμενίων και επιπτώσεις αυτών στη βιομηχανία τροφίμων	11
1.1 Βιο-υμενία και βήματα ανάπτυξης	11
1.2 Σχηματισμός βιο-υμενίου	15
1.3 Βιο-υμενίο: προβλήματα στη βιομηχανία τροφίμων	16
Κεφάλαιο 2	23
<i>Salmonella Enterica</i> : ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο.....	23
2.1 Μορφολογικές και βιοχημικές ιδιότητες.....	23
2.2 Ταξινόμηση και ονοματολογία	23
2.3 Φυσιολογία	24
2.4 Επιδημιολογία	25
2.5 Σαλμονέλωση	26
Πειραματικό Μέρος	28
Κεφάλαιο 3	29
Σκοπός Μελέτης	29
Κεφάλαιο 4	30
Υλικά και μέθοδοι	30
4.1 Απαραίτητος εξοπλισμός	30
4.2 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα	32
4.3 Βακτηριακά στελέχη και πειραματικός σχεδιασμός	33
4.4 Προετοιμασία βακτηριακών καλλιιεργιών εργασίας	36
4.5 Προετοιμασία αλατούχων βακτηριακών εναιωρημάτων	38

4.6 Προετοιμασία τεμαχίων ανοξειδωτου χάλυβα	39
4.7 Πρωτόκολλο σχηματισμού βιο-υμενίου πάνω σε τεμάχια AX	39
4.8 Απαρίθμηση προσκολλημένων / βιο-υμενικών κυττάρων πάνω σε τεμάχια AX.....	40
4.9 Στατιστικές Αναλύσεις	42
Κεφάλαιο 5	43
Αποτελέσματα	43
Κεφάλαιο 6	52
Συζήτηση	52
Βιβλιογραφία	55

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα εξωφύλλου Απεικόνιση βιο-υμενίου σε μικροσκόπιο σάρωσης.....	1
Εικόνα 1.1.1 Στάδια ανάπτυξης βιο-υμενίου: 1. Αρχική προσκόλληση, 2. Μη αναστρέψιμη προσκόλληση, 3.Πρώρη ανάπτυξη της αρχιτεκτονικής βιουμενίου (σχηματισμός βιουμενίου), 4. Ωρίμανση, 5. Διασπορά. Τα στάδια παρουσιάζονται υπό μορφή σκίτσου αλλά και ηλεκτρονικών μικρογραφιών.....	11
Εικόνα 1.1.2 Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του σχηματισμού βιο-υμενίου σε κουπόνια από πολυστυρένιο σε <i>A. hydrophila</i>	14
Εικόνα 1.3.1 Προσκόλληση του <i>A.hydrophila</i> σε στομάτια από μαρούλι iceberg που αναπτύχθηκε στους 25 °C για 24 ώρες.....	17
Εικόνα 2.1.1 Απεικόνιση της <i>Salmonella</i> σε μικροσκόπιο φωτός.....	23
Εικόνα 2.2.1 Γενική επισκόπηση της τωρινής ταξινόμησης του <i>Salmonella enterica</i>	24
Εικόνα 2.4.1 Οδοί μετάδοσης του βακτηρίου <i>Salmonella</i>	26
Εικόνα 4.1.1 Συσκευή αποστείρωσης ή αυτόκαυστο σε λειτουργία.....	31
Εικόνα 4.1.2 Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας.....	31
Εικόνα 4.1.3 Μηχανικός αναδευτήρας (vortexer).....	31
Εικόνα 4.1.4 Ρύγχοι (tips) μηχανικών μικροπιπέτων των 10μl.....	32
Εικόνα 4.4.1 Ενοφθαλμισμένο τρυβλίο με το στέλεχος B18 μετά το πέρας των 24 ωρών (προκαλλιέργεια).....	37
Εικόνα 4.4.2 Πλαστικός σωλήνας φυγοκέντρωσης με το στέλεχος B18 πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) το πέρας των 18 ωρών (καλλιέργεια εργασίας).....	37
Εικόνα 4.5.1 Επιτραπέζια φυγόκεντρος ρυθμισμένη στις κατάλληλες τιμές.....	38
Εικόνα 4.5.2 Φασματοφωτόμετρο ορατού ρυθμισμένο στα 600nm.....	39
Εικόνα 4.8.1 Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης με τα τεμάχια AX (μηδενική αραιώση) και γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με 9ml ¼ Ringer (δεκαδικές αραιώσεις).....	41
Εικόνα 4.8.2 Τρυβλίο TSA με καταμετρημένες αποικίες των προσκολλημένων / βιο-υμενικών κυττάρων.....	42
Εικόνα 5.3 Παρατηρούμενες (measured) και προβλεπόμενες (predicted) τιμές σχηματισμού βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη <i>S. enterica</i> DFSN_B18 (A) και DFSN_B68 (B), πάνω στα τεμάχια AX, για τα δεκαοκτώ διακριτά σημεία του πειραματικού σχεδιασμού. Η διαγώνιος γραμμή είναι η γραμμή ταυτότητας (line of identity). Τα σημεία πάνω απ' αυτή τη γραμμή αντιπροσωπεύουν προβλέψεις που είναι μεγαλύτερες από τον παρατηρούμενο σχηματισμό βιο-υμενίου και έτσι είναι	

«επικίνδυνα ψευδείς» (“fail-dangerous”). Αντιστρόφως, τα σημεία που βρίσκονται κάτω από τη γραμμή ταυτότητας είναι «ασφαλείς ψευδείς» (“fail-safe”) προβλέψεις..... 45

Εικόνα 5.6 Διαγράμματα contour και διάγραμμα επιπέδου επιθυμητότητας (desirability), που περιγράφουν την επίδραση των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (NaCl, pH, T) στο σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από το στέλεχος *S. enterica* DFSN_B18 πάνω στα τεμάχια AX..... 47

Εικόνα 5.7 Διαγράμματα contour και διάγραμμα επιπέδου επιθυμητότητας (desirability), που περιγράφουν την επίδραση των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (NaCl, pH, T) στο σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από το στέλεχος *S. enterica* DFSN_B68 πάνω στα τεμάχια AX..... 48

Εικόνα 5.8 Διαγράμματα contour που περιγράφουν τη συνεργηστική επίδραση της συγκέντρωσης NaCl (0,5-8,5%) και του pH (5-8) στο σχηματισμό βιουμενίου ($\text{logCFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη *S. enterica*: DFSN_B18 (αριστερά) και DFSN_B68 (δεξιά), σε ολόκληρη την εξεταζόμενη κλίμακα της θερμοκρασίας (13 - 39 °C). Κάθε διάγραμμα κατασκευάστηκε λαμβάνοντας υπόψη 125 διαφορετικές προβλεπόμενες αντιδράσεις..... 49

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 4.3.1 Εξετασθέντα βακτηριακά στελέχη.....	33
Πίνακας 4.3.2 Κωδικές ονομασίες και πειραματικές τιμές στα τρία κωδικοποιημένα επίπεδα της κάθε ανεξάρτητης μεταβλητή που θα χρησιμοποιηθούν στον πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό.....	34
Πίνακας 4.3.3 Πειραματικός σχεδιασμός με πραγματικές και κωδικοποιημένες τιμές.....	35
Πίνακας 4.3.4 Πειράματα επαλήθευσης του μοντέλου επιφανειακής απόκρισης (response surface model) για την προσκόλληση/σηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τη <i>S. enterica</i> πάνω στα τεμάχια AX.....	36
Πίνακας 5.1 Πολυωνυμικές εξισώσεις και στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν την επίδραση των υπό θεώρηση ανεξάρτητων μεταβλητών στην απόκριση (σηματισμό βιο-υμενίου, $\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη <i>S. enterica</i> DFSN_B18 και DFSN_B68, όπως υπολογίστηκαν ακολούθως της εφαρμογής ενός κεντρικού σύνθετου πειραματικού σχεδιασμού (central composite experimental design).....	43
Πίνακας 5.2 Συντελεστές παλινδρόμησης (regression coefficients) των πολυωνυμικών εξισώσεων και στατιστικές παράμετροι για τον καθένα.....	44
Πίνακας 5.4 Προβλεπόμενες συνθήκες (περιβαλλοντικές παράμετροι) που οδηγούν στο μέγιστο σηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη <i>S. enterica</i> DFSN_B18 και DFSN_B68, πάνω στα τεμάχια AX και θεωρητικά υπολογισμένη μέγιστη τιμή γι' αυτήν την απόκριση.....	45
Πίνακας 5.5 Παρατηρούμενες (μετρούμενες) (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) και προβλεπόμενες τιμές (μέσες τιμές \pm τυπικά σφάλματα), όσον αφορά το σηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη <i>S. enterica</i> DFSN_B18 και DFSN_B68, πάνω στα τεμάχια AX, για τα 18 διακριτά σημεία του πειραματικού σχεδιασμού.....	46
Πίνακας 5.9 Παρατηρούμενες και προβλεπόμενες τιμές, όσον αφορά το σηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη <i>S. enterica</i> DFSN_B18 και DFSN_B68, πάνω στα τεμάχια AX, για τα έξι επαληθευτικά πειράματα αλλά και τις συνθήκες μέγιστου σηματισμού βιο-υμενίου.....	50
Πίνακας 5.10 Παράγοντες bias και ακρίβειας (accuracy) των μοντέλων που περιγράφουν το σηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη <i>S. enterica</i> DFSN_B18 και DFSN_B68, πάνω στα τεμάχια AX, όπως αυτοί υπολογίστηκαν από τις παρατηρούμενες και προβλεπόμενες τιμές των επαληθευτικών πειραμάτων.....	50

Ευχαριστίες

Καταρχάς, θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε θερμά τον επιβλέπων καθηγητή της πτυχιακής μας κύριο Ευστάθιο Γκιαούρη του τμήματος Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, για την ευκαιρία που μας έδωσε να ασχοληθούμε με μια τόσο ενδιαφέρον πτυχιακή μελέτη αλλά και για τη συνεχή βοήθεια που μας παρείχε καθόλη τη διάρκεια αυτής. Επιπλέον θα θέλαμε να ευχαριστήσουμε και τους υπόλοιπους καθηγητές αλλά και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου του τμήματος για την κατανόηση και την υποστήριξη τους.

Τέλος, είναι πολύ σημαντικό να εκφράσουμε την τεράστια ευγνωμοσύνη μας στην οικογένεια και τους φίλους μας, διότι χωρίς την υποστήριξη τους δεν θα ήταν δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Περίληψη

Η *Salmonella enterica* είναι ένα από τα πιο σημαντικά τροφιμογενή παθογόνα βακτήρια, ενώ τα τελευταία χρόνια αποτελεί τον πιο συχνό παράγοντα στην εμφάνιση τροφιμογενών επιδημιών. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι ικανό να σχηματίζει βιο-υμενίο σε πολλές επιφάνειες και μπορεί έτσι να παραμένει μακροχρόνια προσκολλημένο σε αυτές, ανάλογα με το στέλεχος και τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Στη παρούσα μελέτη ερευνήθηκε η αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας (T, 13-39 °C), του pH (5-8) και της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου (NaCl, 0,5-8,5 %) στο σχηματισμό βιο-υμενίου από δύο διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *Salmonella enterica* (ορότυποι Enteritidis και Typhimurium) υπό συνθήκες χαμηλών θρεπτικών συστατικών και χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία απόκρισης επιφάνειας. Η ανάπτυξη του βιο-υμενίου πραγματοποιήθηκε πάνω σε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα (AX), η οποία επώαστηκε για 24 ώρες σε 1/10 αραιωμένο θρεπτικό ζωμό τρυπτόνης, υπό 18 διαφορετικούς συνδυασμούς των τριών παραγόντων (T, pH, NaCl). Έτσι, χρησιμοποιώντας τη μεθοδολογία ελαχίστων τετραγώνων, προέκυψε μια πολυωνυμική εξίσωση δευτέρου βαθμού για κάθε στέλεχος, η οποία περιγράφει το σχηματισμό βιο-υμενίου ($\log\text{CFU}/\text{cm}^2$) συναρτήσει των ανεξάρτητων παραγόντων (T, pH, NaCl). Και τα δύο μαθηματικά μοντέλα μπόρεσαν να προβλέψουν με αξιοπιστία τη συνδυαστική επίδραση αυτών των παραγόντων στο σχηματισμό βιο-υμενίου, με τις προβλεπόμενες τιμές να βρίσκονται σε καλή συμφωνία με τις πειραματικές παρατηρήσεις ($R^2 \geq 0,96$, $P \leq 0,0001$). Βρέθηκε ότι και για τα δύο στελέχη, η παραγωγή βιο-υμενίου ευνοήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl (<4%) και υψηλές τιμές pH (>7), ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία. Συνεπώς η αύξηση της περιεκτικότητας σε NaCl περιόρισε την ανάπτυξη του βιο-υμενίου, ενώ η αύξηση της θερμοκρασίας είχε διαφορετική επίδραση σε κάθε στέλεχος. Πιο συγκεκριμένα, οι θερμοκρασίες 34,5 και 13 °C ήταν οι προβλεπόμενες για τη μεγιστοποίηση του σχηματισμού βιο-υμενίου από τα στελέχη Enteritidis και Typhimurium αντίστοιχα, κάτι που επαληθεύτηκε και πειραματικά. Εν κατακλείδι, τα μοντέλα αυτά παρέχουν περιεκτικές και ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τη συνδυαστική επίδραση βασικών για τα τρόφιμα παραγόντων στην ανάπτυξη βιο-υμενίου από ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο, με σκοπό τον περιορισμό της παρουσίας του στη βιομηχανία τροφίμων.

Αγγλική Περίληψη (Abstract)

Salmonella Enterica is one of the most important foodborne pathogenic bacteria, as it has been the most common factor in the appearance of foodborne outbreaks in recent years. This particular bacterium forms biofilm on many surfaces and remains long-term attached to them, depending on the strain and environmental conditions. The present study evaluated the interaction of temperature (T; 13 – 39 °C), pH (5 – 8) and sodium chloride (NaCl) concentration (0,5 – 8,5%) in biofilm formation by two *S. enterica* strains (ser. Enteritidis and Typhimurium) under low nutrient conditions and using response surface methodology. Biofilm growth was performed on stainless steel (SS) surfaces, which were incubated for 24 hours in 1/10 diluted tryptone soy broth, under 18 different combinations of the three factors (T, pH, NaCl). Thus, using least square regression analysis, a second order polynomial model, describing the relationship between biofilm formation ($\log\text{CFU}/\text{cm}^2$) and the independent factors (T, pH, NaCl), was obtained for each strain. Both mathematical models were able to reliably predict the combined effect of these factors on biofilm formation, with the predicted values being in good agreement with the experimental observations ($R^2 \geq 0,96$, $P \leq 0,0001$). It was found that for both strains biofilm production was favored at low NaCl concentrations (<4%) and high pH values (> 7), regardless of temperature. Therefore, the increase in NaCl content reduced the biofilm growth, whereas the temperature increase had a different effect on each strain. Specifically, temperatures of 34,5 and 13 °C were predicted to maximize biofilm formation by strains Enteritidis and Typhimurium, respectively, which was also verified experimentally. In conclusion, these models provide comprehensive and accurate information on the combined effect of crucial food-related factors on biofilm growth of an important food-borne pathogen in order to limit its persistent presence in food industry.

Θεωρητικό Μέρος

Κεφάλαιο 1

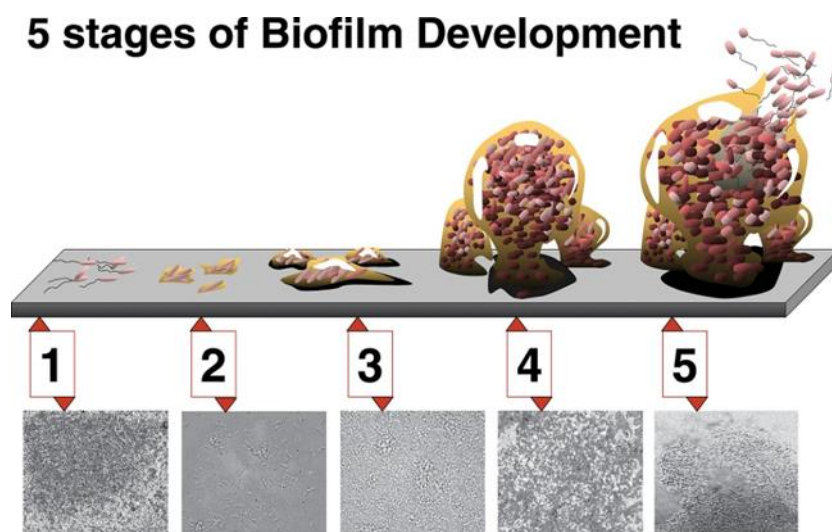
Σχηματισμός βιο-υμενίων και επιπτώσεις αυτών στη βιομηχανία τροφίμων

1.1 Βιο-υμένια και βήματα ανάπτυξης

A. Εισαγωγή

Τα βιο-υμένια είναι μια συσσωμάτωση μικροοργανισμών, που συνδέονται με μια επιφάνεια και αναπτύσσονται πάνω σε αυτή (Costerton et al., 2001). Ο σχηματισμός και η ανάπτυξη των βιο-υμενίων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου το βακτηριακό στέλεχος (Borucki et al., 2003; Chae et al., 2000), τις ιδιότητες επιφάνειας του υλικού και τις περιβαλλοντικές παραμέτρους, όπως το pH, τα θρεπτικά επίπεδα και τη θερμοκρασία (Donlan, 2002). Τα κύτταρα βιο-υμενίου είναι πιο ανθεκτικά στους αντιμικροβιακούς παράγοντες από τα πλαγκτονικά βακτήρια, καθώς έχουν ένα φράγμα που εμποδίζει ή μειώνει την επαφή με αντιμικροβιακούς παράγοντες (O'Toole et al., 2000).

Κάθε τύπος μικροοργανισμού θα μπορούσε να σχηματίσει βιο-υμένιο και να παίζει βασικό ρόλο σε πολλές λοιμώξεις (Parsek et al., 2003). Βιώνοντας ένα αφιλόξενο περιβάλλον, είναι σημαντικό για τα βακτήρια να σχηματίσουν βιο-υμένιο ως στρατηγική επιβίωσης (Stepanovic et al., 2004; Stepanovic et al., 2003). Ο σχηματισμός βιο-υμενίου είναι μία σταδιακή και δυναμική διαδικασία που αποτελείται από (1) αρχική προσκόλληση, (2) μη αναστρέψιμη προσκόλληση, (3) πρόωρη ανάπτυξη της αρχιτεκτονικής βιουμενίου, (4) ωρίμανση και (5) διασπορά (Εικόνα 1.1.1)



Εικόνα 1.1.1 Στάδια ανάπτυξης βιο-υμενίου: 1. Αρχική προσκόλληση, 2. Μη αναστρέψιμη προσκόλληση, 3. Πρόωρη ανάπτυξη της αρχιτεκτονικής βιουμενίου (σχηματισμός βιουμενίου), 4. Ωρίμανση, 5. Διασπορά. Τα στάδια παρουσιάζονται υπό μορφή σκίτσου αλλά και ηλεκτρονικών μικρογραφιών. Εικόνα από τον D.Davis και Monroe, D “Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms” PLoS Biol, Vol. 5, issue 11.

B. Αρχική προσκόλληση

Η αρχική προσκόλληση των βακτηρίων μπορεί να είναι ενεργή ή παθητική, ανάλογα με την κινητικότητα ή τη βαρυτική μεταφορά της πλαγκτονικής μορφής τους, τη διάχυση ή τη διατμητική δύναμη της περιβάλλουσας υγρής φάσης (Kumar et al., 1998). Η προσκόλληση του κυττάρου κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας εξαρτάται έντονα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της βακτηριακής κυτταρικής επιφάνειας (Ferreira et al., 2010). Αρχικά, τα προσκολλημένα κύτταρα, αυτά που προέρχονται από το σχηματισμό βιο-υμενίου σε μια επιφάνεια, κατέχουν μόνο μια μικρή ποσότητα εξωκυτταρικής πολυμερούς ουσίας (EPS) και πολλά είναι ικανά για ανεξάρτητη κίνηση (O'Toole et al., 1998) με κινητικότητα συστολής ή ολίσθησης που βασίζεται σε μεσολάβηση τριχιδίων (pilus). Σε αυτό το στάδιο, η πρόσφυση είναι αναστρέψιμη, καθώς οι προσκολλημένοι μικροοργανισμοί δεν έχουν ακόμη δεσμευτεί για τη διαδικασία διαφοροποίησης – μία σειρά μορφολογικών αλλαγών - που οδηγεί σε σχηματισμό βιο-υμενίου. Οπότε πολλά από τα κύτταρα μπορεί να αποσπαστούν από την επιφάνεια και να επιστρέψουν στον πλαγκτονικό τρόπο ζωής τους (Stoodley et al., 2002).

Οι επιφανειακές ιδιότητες παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στη βακτηριακή προσκόλληση. Γενικά, οποιαδήποτε επιφάνεια είναι ευάλωτη στην ανάπτυξη βιο-υμενίου, όπως το πλαστικό, το γυαλί, το μέταλλο, το ξύλο και τα προϊόντα διατροφής. Η προσκόλληση στην επιφάνεια εξαρτάται επίσης από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας, όπως την υφή (αδρή ή λεία) (Donlan, 2002), το επιφανειακό φορτίο (Abdallah et al., 2009), την υδροφοβικότητα (Donlan, 2002), το pH, τη θερμοκρασία (Nilsson et al., 2011), και τη θρεπτική σύσταση του διαλύματος προετοιμασίας (Donlan, 2002; Gerstel et al., 2001). Για παράδειγμα στην έρευνα των Sinde et al (2000) βρέθηκε ότι η *Salmonella* και η *Listeria* μπορούν να προσδεθούν σε υψηλότερο βαθμό σε υδρόφοβες επιφάνειες από ότι σε υδρόφιλες. Επιπλέον, οι επιφάνειες που επικαλύπτονται από ένα λεγόμενο υμένιο προετοιμασίας (conditioning film), το οποίο περιλαμβάνει μακρομόρια, όπως οργανικές ουσίες, θα ενισχύσει την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων (Tang et al., 2009). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οποιοδήποτε προυπάρχον EPS θα διευκολύνει την προσκόλληση (Flemming et al., 1988).

Γ. Μη αναστρέψιμη προσκόλληση

Η αλλαγή από την αναστρέψιμη στη μη αναστρέψιμη προσκόλληση είναι η μετατόπιση από μία ασθενή αλληλεπίδραση των βακτηρίων με την επιφάνεια σε μία μόνιμη συγκόλληση με την παρουσία EPS (Stoodley et al., 2002). Μετά από μη αναστρέψιμη προσκόλληση, είναι απαραίτητη ισχυρή δύναμη διάτμησης ή χημική θραύση των δυνάμεων πρόσδεσης από ένζυμα, απορρυπαντικά, επιφανειοδραστικές ουσίες, απολυμαντικά (Sinde et al., 2000) και/ή θερμότητα για την αφαίρεση βιο-υμενίου (Augustin et al., 2004; Maukonen et al., 2003; Sinde et al., 2000). Οι Gerke et al. (1998) εργάστηκαν με τον *Staphylococcus epidermis* και έχουν δείξει ότι

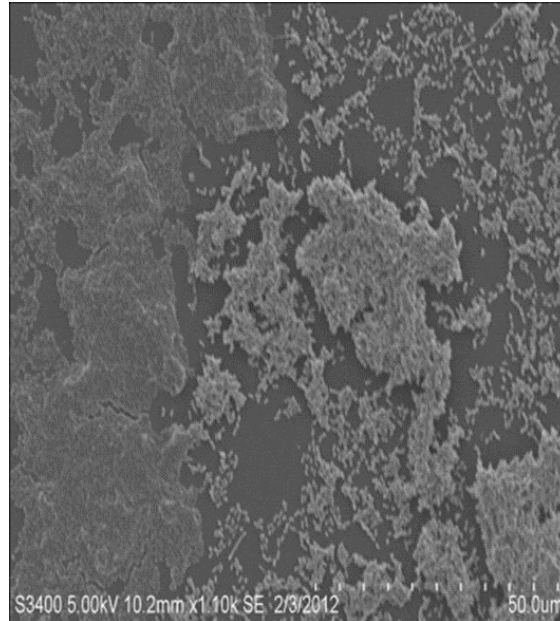
προσκολλημένα βακτήρια παράγουν μία πολυσακχαριδική ενδοκυτταρική προσκόλληση που συνδέει τα κύτταρα μαζί και διευκολύνει τον σχηματισμό μικροαποικίας και την ωρίμανση του βιο-υμενίου.

Δ. Πρόωρη ανάπτυξη της αρχιτεκτονικής βιο-υμενίου (σχηματισμός μικροαποικιών)

Ο σχηματισμός μικροαποικιών προκύπτει από την ταυτόχρονη συσσώρευση και ανάπτυξη μικροοργανισμών και σχετίζεται με την παραγωγή της EPS (Chmielewski et al., 2003), η οποία συμβάλλει στην ενίσχυση του δεσμού μεταξύ των βακτηρίων και του υποστρώματος και σταθεροποιεί την αποικία από οποιοδήποτε περιβαλλοντικό στρες (Donlan, 2002). Μελέτες βακτηριακών ειδών σε φυσικά συστήματα έχουν δείξει ότι η συσσώρευση θα μπορούσε να περιλάβει την πρόσληψη πλαγκτονικών κυττάρων από το περιβάλλον μέσο, ως αποτέλεσμα της από κύτταρο σε κύτταρο επικοινωνίας (quorum sensing) (McLean et al., 1997, Pesci et al., 1999). Οι O'Toole et al. (1998) ανέφεραν ότι για να λάβει χώρα η δημιουργία μικροαποικιών του *Pseudomonas aeruginosa* PA14 απαιτούνται τριχίδια (pili) τύπου IV. Η κολυμβητική κινητικότητα θεωρήθηκε ότι επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να ξεπεράσουν τις απωθητικές δυνάμεις στη διεπαφή επιφάνειας-νερού, επιτρέποντάς τους να φτάσουν το υπόστρωμα και να σχηματίσουν μικροαποικίες, με συστροφή κινητικότητας, που τροφοδοτείται από επέκταση και ανάκληση των τριχιδίων (pili) τύπου IV (Skerker et al., 2001). Οι μικροαποικίες μπορεί να είναι πολύ ωφέλιμες, καθώς παρέχουν ανταλλαγή υποστρώματος μεταξύ των ειδών και/ή αμοιβαία αφαίρεση τελικού προϊόντος σε βακτήρια (Costerton et al., 1994).

Ε. Ωρίμανση

Η ωρίμανση του βιο-υμενίου είναι το στάδιο, όπου το βιο-υμένιο αναπτύσσεται σε μία οργανωμένη δομή, η οποία μπορεί να είναι επίπεδη ή σε σχήμα μανιταριού (Εικόνα 1.1.2), ανάλογα με την πηγή θρεπτικών ουσιών στην οποία βασίζεται (Chmielewski et al., 2003; Klausen et al., 2003). Προκειμένου να επιτευχθεί δομική ωριμότητα απαιτείται περίοδος τουλάχιστον δέκα ημερών (Stoodley et al., 2002). Τα βακτήρια αναπτύσσονται κάτω από άμισχη (sessile) μορφή σε ετερογενείς πολύπλοκες εγκλεισμένες μικροαποικίες διασκορπισμένες με ανοικτά κανάλια νερού (Davey et al., 2000). Σε μια μελέτη, τα ώριμα βιο-υμένια αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν με τις χημειοστατικές καλλιέργειες του *P. Aeruginosa* με την τεχνολογία μικροσυστοιχιών DNA (DNA microarray technology) (Whiteley et al., 2001). Η μελέτη έδειξε ότι άλλαξαν 70 γονίδια, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που εμπλέκονται στη μετάφραση, το μεταβολισμό, τη μεταφορά μεμβράνης και/ή την έκκριση και ρύθμιση γονιδίων.



Εικόνα 1.1.2 Εικόνα από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης του σχηματισμού βιο-υμενίου σε κουπόνια από πολυστυρένιο σε *A. Hydrophila*.

ΣΤ. Διασπορά

Η διασπορά είναι το τελευταίο στάδιο στον κύκλο σχηματισμού βιο-υμενίου, το οποίο επιτρέπει στα κύτταρα να επανέλθουν στην πλαγκτονική τους μορφή (Sauer et al., 2002). Εξωτερικές διαταραχές, όπως αυξημένη διάτμηση υγρού (Stoodley et al., 2002), εσωτερικές διεργασίες βιο-υμενίου, όπως η ενδογενής ενζυμική αποικοδόμηση ή η απελευθέρωση της EPS ή της πρωτεΐνης που δεσμεύει την επιφάνεια, είναι όλα πιθανές αιτίες αποκόλλησης βιο-υμενίου (Kaplan et al., 2003; Kaplan et al., 2004). Η αποκόλληση φαίνεται να είναι ενεργή διαδικασία που επιτρέπει τον αποικισμό νέων θέσεων (Sauer et al., 2002). Επιπλέον, η ασιτία θεωρείται επίσης λόγος της απόσπασης και επιτρέπει στα βακτήρια να ψάξουν για περιβάλλον πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά (O'Toole et al., 2000).

Άλλοι ερευνητές πρότειναν επίσης τη συμμετοχή της ενζυμικής δραστηριότητας στην αποικοδόμηση της EPS. Για παράδειγμα, η παραγωγή του ενζύμου dispersin B, που υποβιβάζει τα βιο-υμένια του *Staphylococcus epidermidis* βρίσκεται στο *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Kaplan et al., 2004). Άλλη μελέτη δείχνει ότι τα βιο-υμένια μπορούν να αφαιρεθούν από τις επιφάνειες με ήπια έκπλυση εάν υπάρχει υπερέκφραση της αλγινικής λυάσης, η οποία θα προκαλούσε την αποικοδόμηση του αλγινικού.

1.2 Σχηματισμός βιο-υμενίου

A. Δυνατότητα σχηματισμού βιο-υμενίου

Η ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό όχι μόνο μεταξύ ειδών. Ακόμη και στο ίδιο είδος με διαφορετικά στελέχη και ορότυπους (serovars), η δυνατότητα σχηματισμού βιο-υμενίου μπορεί να διαφέρει σημαντικά. Για παράδειγμα, μία μελέτη πάνω στην ικανότητα πέντε ορότυπων *Salmonella enterica* να προσκολληθούν και να αποικίσουν άθικτα και αποκομμένα επιφάνειες μαρουλιών και λάχανων (Patel et al., 2010) έδειξε ότι οι ορότυποι Tennessee και Thompson μπορούν να παράξουν πολύ περισσότερο βιο-υμένιο από ότι οι ορότυποι Braenderup, Negev και Newport: και θα μπορούσαν να θεωρηθούν ισχυροί παραγωγοί βιο-υμενίου σύμφωνα με τα κριτήρια που προτάθηκαν από τους Stepanovic et al. (2004). Σε μία άλλη εργασία, τα *Listeria monocytogenes* Scott A και 3990 ήταν γνωστά ως παραγωγοί υψηλής ποσότητας βιο-υμενίου, ενώ τα στελέχη *L.monocytogenes* YM96 και 303 ήταν παραγωγείς μέτριου βιο-υμενίου και το *L.monocytogenes* 17 ήταν το λιγότερο παραγωγικό σε σχηματισμό βιο-υμενίου (Chmielewski et al., 2006). Ωστόσο, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη δυνατότητα σχηματισμού βιο-υμενίου, όπως οι επιφανειακές ιδιότητες και η διαθεσιμότητα θρεπτικών υλικών. Τα στελέχη *Salmonella* spp. και *Listeria monocytogenes* προσκολλώνται κατά προτίμηση σε υδρόφοβες επιφάνειες υλικών (Donlan, 2002). Επιπλέον, η παραγωγή βιο-υμενίου από το *Bacillus cereus* σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα σε διεπαφή υγρού-αέρα βρέθηκε πυκνότερη από ότι σε βυθισμένα συστήματα (Wijman et al., 2007). Ομοίως, μελετήθηκε *Staphylococcus* που είχε απομονωθεί από τρόφιμα και περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων και το βιο-υμένιο ήταν πυκνότερο με παρουσία NaCl ή γλυκόζης (Moretto et al., 2003). Επίσης, εικάζεται ότι ο μεταβολισμός υδατανθράκων μπορεί να έχει επίδραση στην παραγωγή βιο-υμενίου μεταξύ διάφορων gram θετικών βακτηρίων (Pillai et al., 2004). Οπότε, η δυνατότητα σχηματισμού βιο-υμενίου ποικίλλει μεταξύ γενών, ειδών και στελεχών και επηρεάζεται από άλλους παράγοντες, όπως ότι ένας τύπος βακτηρίων μπορεί να γίνει δυνατός παραγωγός βιο-υμενίου υπό ένα συγκεκριμένο περιβάλλον και να γίνει αδύναμος σε ένα άλλο περιβάλλον.

B. Υλικά επιφάνειας επαφής με τα τρόφιμα για το σχηματισμό βιο-υμενίου

Εκτός από τα βακτηριακά γένη και είδη, εξωτερικοί παράγοντες παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο επηρεάζοντας το βαθμό προσκόλλησης και το σχηματισμό βιο-υμενίου. Τα υλικά που αποτελούν τις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα έχει υποτεθεί πως έχουν μεγάλη επίδραση στο βαθμό προσκόλλησης και στο σχηματισμό βιο-υμενίου. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για τις επιφάνειες επαφής με τα τρόφιμα είναι ο ανοξειδωτός χάλυβας, το γυαλί, το καουτσούκ, η πολυουρεθάνη (Chia et al., 2009), το τεφλόν, το nitrile butyl rubber (NBR, Buna-n) (Storgards et al.,

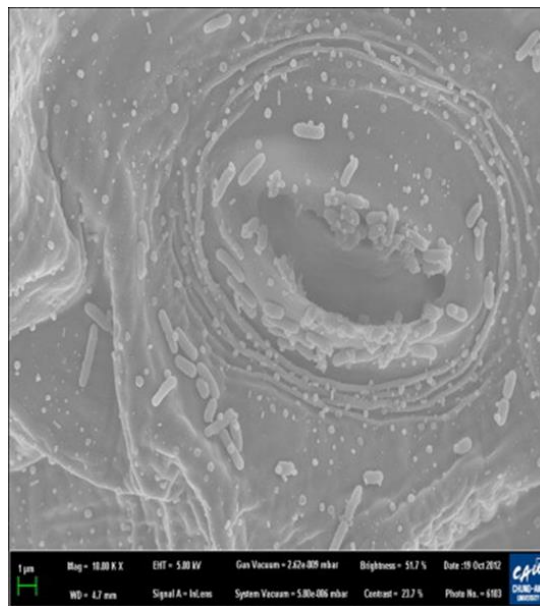
1999) και το ξύλο – για τις αναπτυσσόμενες χώρες (Mariani et al., 2011). Οι Stepanovic et al. (2004) ανέφεραν ότι τα *Salmonella* spp. και το *L.monocytogenes* μπορούν να παράγουν υψηλά επίπεδα βιο-υμενίων σε πλαστικές επιφάνειες. Σε μια άλλη μελέτη, η αδρότητα της επιφάνειας ενός μεταφορικού μίαντα από πολυουρεθάνη αναφέρθηκε να έχει σημαντική επιρροή στην ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου του *L.monocytogenes*. Ακόμη και τα ασθενή στελέχη έδειξαν την ικανότητα να σχηματίσουν βιο-υμένιο και δεν μπορούσαν να εξαλειφθούν πλήρως (Chaturongkasumrit, 2011). Οι Adetunji et al. (2011) μελέτησαν το σχηματισμό βιο-υμενίου σε επιφάνειες ξύλου, ανοξειδωτού χάλυβα και γυαλιού, με τα αποτελέσματα να αποδεικνύουν ότι το ξύλο ενθαρρύνει το σχηματισμό βιο-υμενίου χάρη στην αραιότητα και απορροφητικότητα του, που μπορούν να παγιδεύουν οργανικά υλικά και βακτήρια. Οι συγγραφείς δήλωσαν ότι το γυαλί είναι η προτιμότερη επιφάνεια για επαφή με τα τρόφιμα, το οποίο οφείλεται στη λεία του επιφάνεια και στις ιδιότητες αντίστασης στη διάβρωση, ενώ ο ανοξειδωτός χάλυβας μπορεί να αντισταθεί σε ζημιά από κρούση καλύτερα, αλλά είναι ευάλωτος στη διάβρωση. Οι Chia et al. (2009) βρήκαν ότι η *Salmonella* προσκολλήθηκε καλύτερα σε τεφλόν, ακολουθούμενο από ανοξειδωτο χάλυβα και γυαλί, μετά Buna-n και πολυουρεθάνη. Έχει προταθεί ότι τα προσκολλημένα κύτταρα βασίζονται στις ενδιάμεσες ελεύθερες δυνάμεις της επιφάνειας. Τα αποτελέσματά τους πρότειναν ότι η αδρότητα της επιφάνειας δεν έχει καμία συσχέτιση με την προσκόλληση, ενώ πολλοί άλλοι συγγραφείς έχουν δηλώσει το αντίθετο (Howell et al., 2006; Scardino et al., 2006). Εικάζεται πως η διαφορά μεταξύ του βαθμού της αδρότητας επιφάνειας που μελετήθηκε βασίζεται σε μια υποκειμενική αξιολόγηση (π.χ. γυαλισμένη ή αγυάλιστη), που θα μπορούσε να είναι και ο λόγος των διαφορετικών παρατηρήσεων (Chia et al., 2009). Αντίστοιχα, οι Arnold et al. (2004) ανέφεραν ότι υπήρχαν δραματικά λιγότερα βακτηριακά κύτταρα προσκολλημένα σε ανοξειδωτο χάλυβα που είχε δεχτεί ηλεκτροθεραπεία συγκριτικά με μια επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα που δεν είχε υποστεί κάποια επεξεργασία. Προτάθηκε επίσης, ότι πέρα από το ίδιο το υλικό άλλοι παράγοντες υγιεινής, όπως συγκολλήσεις, αρμοί, γωνίες και σχεδιασμός εξοπλισμού θα μπορούσαν να είναι επίσης ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει το σχηματισμό βιουμενίου (Gudbjornsdottir et al., 2005).

1.3 Βιο-υμένιο: προβλήματα στη βιομηχανία τροφίμων

A. Βιομηχανία παραγωγής

Οι στρατηγικές μικροβιακού ελέγχου επί του παρόντος δεν είναι αρκετά αποτελεσματικές ώστε να παρέχουν πλήρη εξάλειψη των επικίνδυνων μικροοργανισμών χωρίς να επηρεάζουν την ποιότητα των προϊόντων (FAO/WHO, 2008, p. 151). Έχει καταγραφεί ότι η ασφάλεια της παράτασης της διάρκειας ζωής των προϊόντων φρέσκιας κοπής εξαρτάται από το στάδιο καθαρισμού/πλυσίματος, ενώ η δράση των απολυμαντικών στα προϊόντα μπορεί να μειώσει στο μέγιστο μόνο 2

λογαρίθμους του βακτηριακού πληθυσμού: οι μικροοργανισμοί πιθανώς προστατεύονται από τη θέση τους στο φυτικό ιστό (εσωτερικοποιημένα, σε στομάτια, ρωγμές, σχισμές, κομμένες επιφάνειες), και/ή από βιο-υμένια που παράγονται από τα ίδια τα μικρόβια (Whipps et al., 2008). Το τριμάρισμα, η κοπή, το πλύσιμο, η έκπλυση, η αφυδάτωση και η συσκευασία χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία παραγωγής και θεωρούνται ως η κύρια πηγή της διασταυρούμενης μόλυνσης (Suslow, 2001). Οι Lopez-Galvez et al. (2010) ερεύνησαν την επίδραση του μεταγενέστερου πλυσίματος με χλωριούχα ή υποχλωριώδες νάτριο σε μικρής διάρκειας επιμολυσμένο φρεσκοκομμένο μαρούλι. Τα αποτελέσματα υπέδειξαν ότι τα βήματα μεταγενέστερης απολύμανσης δε μπορούν να αδρανοποιήσουν αποτελεσματικά τα κύτταρα *Escherichia coli* σε ιστό λαχανικών. Μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης τα βακτηριακά κύτταρα ανιχνεύθηκαν σε συστοιχίες ή στομάτια ιστών (Εικόνα 1.3.1), όπου θεωρούνται προστατευμένα από απολυμαντικά, το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει την αναποτελεσματικότητα των απολυμαντικών διαλυμάτων. Ωστόσο, διαλύματα διοξειδίου του χλωρίου και υποχλωριώδους νατρίου ήταν ικανά να απενεργοποιήσουν ένα μεγάλο μέρος των κυττάρων *E.coli* που μεταφέρθηκαν από ένα εμβολιασμένο δείγμα στο νερό έκπλυσης. Συνιστάται ότι τα απολυμαντικά πρέπει να χρησιμοποιούνται ώστε να αποφευχθεί η διασταυρούμενη μόλυνση από μολυσμένη παραγωγή σε καθαρή παραγωγή (Keskinen et al., 2009; Lopez-Galvez et al., 2010).



Εικόνα 1.3.1 Προσκόλληση του *A.Hydrophila* σε στομάτια από μαρούλι iceberg που αναπτύχθηκε στους 25 °C για 24 ώρες.

Τα περισσότερα προϊόντα καταναλώνονται συνήθως ωμά ως εκ τούτου, η συσκευασία, το τελευταίο βήμα της επεξεργασίας θεωρείται ως ένα από τα κρίσιμα σημεία ελέγχου. Αυτό το τελευταίο βήμα θα πρέπει να ελέγχεται προσεκτικά και τακτικά για να αποφευχθεί η επαναμόλυνση. Έχει παρατηρηθεί ότι το 12,3% όλων των τροφιμογενών εξάρσεων από το 1990 έως το 2007 αφορούσε φρέσκα προϊόντα ενώ το 10% είχε προκληθεί από ακατάλληλο χειρισμό μετά τη συγκομιδή από τη φάρμα και το υπόλοιπο ποσοστό σχετιζόταν με την ανάπτυξη, τη συσκευασία, τη μεταφορά ή την

επεξεργασία των νωπών προϊόντων (Alliance For Food and Framing, 2010). Το 2011, υπήρξε μία έξαρση συνδεδεμένη με ένα πεπόνι μολυσμένο με *L.monocytogenes* (Caron, 2011). Εικάζεται πως η ρίζα του προβλήματος των εξάρσεων ήταν η ανθυγιεινή κατάσταση του υπόστεγου συσκευασίας. Επιπλέον, οι μικροοργανισμοί βρέθηκαν επίσης σε άλλα μέρη περιλαμβάνοντας τον μάντα μεταφοράς, την περιοχή ξήρανσης και τους σωλήνες δαπέδου (Neuman, 2011). Θεωρείται ότι τα παθογόνα προσκολλώνται σταθερά σε απρόσιτα μέρη (Neuman, 2011) και σχηματίζουν βιο-υμένιο και μετά εισάγονται στην παραγωγή (Sapers, 2001).

Οι μικροοργανισμοί, έχει βρεθεί ότι, προσκολλώνται κατά προτίμηση σε άθικτες επιφάνειες παραγωγής (Liao et al., 2001). Οι Gandhi et al. (2001) βρήκαν αποδείξεις από βακτήρια σε βάθος 12 μm μέσα σε άθικτο ιστό λουλουδιών άλφαλαφα. Σε μία άλλη μελέτη από τους Han et al. (2000), παρατηρήθηκε ότι δεν υπήρχε αξιοσημείωτη ανάπτυξη από *E.coli* O157:H7 πάνω σε μη τραυματισμένες επιφάνειες πράσινης πιπεριάς μετά από εμβολιασμό και επώαση για 24 ώρες στους 37 °C, ενώ σημαντική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμός βρέθηκε σε άθικτες επιφάνειες. Απολυμαντικά όπως το όζον, η χλωρίνη και τα οργανικά οξέα βρέθηκαν να είναι αναποτελεσματικά εναντίον μικροβιακών βιο-υμενίων (Olmez et al., 2010). Το υπεροξειδίο του υδρογόνου είναι επίσης σχετικά αναποτελεσματικό στην εξάλειψη του *E.coli* 766 σε πεπόνια: παρατηρήθηκε να μειώνεται κατά λιγότερο από 1 log (Sapers et al., 2003).

B. Βιομηχανία Γαλακτοκομικών

Το γάλα είναι ένα πολύ φθαρτό προϊόν και είναι πραγματικά ευάλωτο σε μόλυνση από διάφορους μικροοργανισμούς. Οι κύριες πηγές μολυσμένου γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων θεωρείται ότι συνήθως προέρχονται από ακατάλληλα καθαρισμένο και απολυμασμένο εξοπλισμό (Jessen et al., 2003; Koutzayiotis, 1992). Είναι τεκμηριωμένο ότι τα βακτήρια που αντιμετωπίζονται συχνά στο γαλακτοκομικό περιβάλλον ανήκουν στο γένος *Enterobacter* (Salo et al., 2006), *Listeria* (Waak et al., 2002), *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* (Sharma et al., 2002) και *Pseudomonas* (Wiedman et al., 2000). Το 2011, υπήρξε απόσυρση ωμού γάλακτος που διανεμήθηκε στην πολιτεία της Ουάσινγκτον λόγω μόλυνσης από *L.monocytogenes* (Anonymous, 2011). Εικάζεται ότι ο τύπος των βακτηρίων στα δείγματα γάλακτος μπορεί να εμφάνισε σχηματισμό βιο-υμενίου. Για παράδειγμα, το μεγαλύτερο ποσοστό των θερμοανθεκτικών ειδών *Streptococci* και *Bacillus* στο παστεριωμένο γάλα συγκριτικά με το ωμό γάλα θα μπορούσε να οφείλεται στη μόλυνση λόγω διασποράς του βιο-υμενίου (Flint et al., 1997).

Μέχρι σήμερα, υπάρχουν πολλές μελέτες επικεντρωμένες στα διάφορα βακτήρια των εργοστασίων γαλακτοκομικών. Αρκέτες μελέτες (Mafu et al., 1990; Vanhaecke et al., 1990) έχουν υποδείξει ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση μεταξύ ανωμαλιών επιφάνειας ή αδρότητας και της ικανότητας προσκόλλησης των βακτηρίων.

Ωστόσο, οι [Latorre et al. \(2010\)](#) διεξήγαγαν μία μελέτη στη παρουσία βιο-υμενίου που περιείχε *L.monocytogenes* σε εξοπλισμό αρμέγματος ως πιθανή πηγή μόλυνσης σε γαλακτοκομική φάρμα. Αφού λήφθηκαν θετικά αποτελέσματα, η σάρωση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο του εξοπλισμού έδειξε την παρουσία μεμονωμένων και συστάδων βακτηρίων και υποτέθηκε ότι σχετίζεται κυρίως με γδαρμένες επιφάνειες.

Σε μια άλλη μελέτη αξιολογήθηκε η προσκόλληση και ο σχηματισμός βιο-υμενίου από *L.monocytogenes* σε ανοξειδωτο χάλυβα και Buna-n rubber, τα οποία συνήθως χρησιμοποιούνται στον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων ([Helke et al., 1993](#)). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η λακτόζη δεν είχε επίδραση σε καμία από τις δύο επιφάνειες όσον αφορά στην προσκόλληση, ενώ άλλες ενώσεις έδειξαν σημαντική επίδραση. Μία παρόμοια μελέτη εξήγησε εν μέρη γιατί τα βιο-υμενία σε επιφάνειες Buna-n rubber είναι πιο ανθεκτικά σε απολυμαντικά σε σχέση με τα υπόλοιπα βιο-υμενία ([Wong, 1998](#)).

Γ. Βιομηχανία επεξεργασίας ιχθυηρών

Στη βιομηχανία επεξεργασίας ιχθυηρών, τόσο ο εξοπλισμός όσο και το νερό θεωρούνται σημαντικές ανησυχίες. Επίσης, πολλοί τύποι βακτηρίων που μολύνουν ιχθυηρά έχουν βρεθεί ικανά για σχηματισμό βιο-υμενίου, περιλαμβάνοντας τα *Vibrio cholerae* ([Faruque et al., 2006](#)), *Vibrio parahaemolyticus* ([Enos-Berlage et al., 2005](#)), *Vibrio vulnificus* ([Joseph et al., 2004](#)) και *Vibrio alginolyticus* ([Kogure et al., 1998](#)). Πολλά γένη πέρα από τα *Vibrio*, όπως τα *L.monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Aeromonas* και *Pseudomonas* spp., είναι επίσης γνωστά για το σχηματισμό βιο-υμενίου στη βιομηχανία επεξεργασίας ιχθυηρών και θαλασσινών ([Rajjkowski, 2009](#)).

Τόσο σημαντικό όσο οποιοδήποτε από τα άλλα συστατικά που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία θαλασσινών, το θαλασσινό νερό χρησιμοποιείται αντί του γλυκού νερού για οικονομικούς λόγους. Παρόλο που το νερό επεξεργάζεται με συνδυασμένη χλωρίωση και σύστημα υπεριώδους ακτινοβολίας (UV), το επεξεργασμένο θαλασσινό νερό βρέθηκε μολυσμένο με *Vibrio* spp., που προκλήθηκε από σχηματισμό βιο-υμενίου στο σύστημα διανομής θαλασσινού νερού μετά τη διαδικασία επεξεργασίας ([Shikongo-Nambabi et al., 2010](#)). Διάφοροι συγγραφείς έχουν δηλώσει ότι η αποτυχία του χλωρίου να εμποδίσει το σχηματισμό βιο-υμενίου και το ώριμο βιο-υμένιο δεν ήταν λόγω επίδρασης του pH ([Momba et al., 2002](#); [Shikongo-Nambabi et al., 2010](#)). Έχει διαπιστωθεί ότι συχνά υπάρχει κάποια απώλεια στην ποιότητα του νερού μετά την υποβολή του σε διαδικασία επεξεργασίας, η οποία συνήθως προκαλείται από κύτταρα που αποκολλούνται από το βιο-υμένιο στο σύστημα διανομής λόγω της αναποτελεσματικότητας του χλωρίου ([Momba et al., 2004](#); [September et al, 2007](#); [Shikongo-Nambabi et al., 2010](#)). Επιπρόσθετα, ο σχηματισμός βιο-υμενίου από τα θαλασσινά μολυσμένα με *Vibrio harveyi* σε επιφάνειες –πλαστικό, πλάκα τσιμέντου ή κουπόνι χάλυβα- αξιολογήθηκε επίσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρξε μόνο μια ελαφρά μείωση του βιο-υμενίου στις πλάκες τσιμέντου και στο

πλαστικό (χλώριο 20 ppm, 10 λεπτά), ενώ τα κύτταρα εξολοθρεύθηκαν τελείως σε μεγαλύτερη συγκέντρωση (χλώριο 100 ppm, 10 λεπτά) στα κουπόνια χάλυβα. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό για τα εκκολαπτήρια γαρίδας δεδομένου ότι οι δεξαμενές αποθήκευσης νερού, οι σωλήνες ύδατος πολυαιθυλενίου και οι επιφάνειες των προνυμφικών δεξαμενών είναι ευαίσθητες σε σχηματισμό βιο-υμενίου (Karunasagar et al., 1996).

Σε μελέτη των Guðbjörnsdóttir et al. (2005), αποδείχθηκε ότι προσκολλημένα βακτήρια βρίσκονται σε πολλές τοποθεσίες στις γραμμές επεξεργασίας θαλασσινών, παρά το γεγονός ότι απόλυτος καθαρισμός και απολύμανση πραγματοποιούνται τακτικά. Gram-αρνητικές ράβδοι, δηλαδή *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., Enterobacteriaceae και ζύμες, απομονώθηκαν από ένα εργοστάσιο επεξεργασίας γαρίδας, ενώ το *Pseudomonas* spp. και τα Enterobacteriaceae βρέθηκαν κυρίως στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας ψαριών. Αυτοί οι οργανισμοί θεωρούνται ως οι κύριες αιτίες της αλλοίωσης των νωπών ή διατηρημένων με απλή ψύξη ψαριών (Gram et al., 1996). Πιο σημαντικά, σημειώθηκε ότι η παρουσία των *Pseudomonas* spp. θα ενίσχυε σημαντικά τον αποικισμό του *L. Monocytogenes* σε ανοξείδωτο χάλυβα (Guðbjörnsdóttir et al., 2005). Παρατηρήθηκε ότι τα *Vibrio* spp. δεν είναι το μόνο γένος που βρίσκεται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας θαλασσινών. Άλλα γένη όπως *Pseudomonas* spp., *Aeromonas* spp., διαπιστώθηκε ότι ήταν σημαντικοί παραγωγοί βιο-υμενίου και η παρουσία τους θα ενίσχυε το σχηματισμό βιο-υμενίου από άλλα γένη. Σε μια άλλη μελέτη σχετικά με τη συσχέτιση των δυνατοτήτων σχηματισμού βιο-υμενίου από τη *Salmonella* και την εμμονή της στα εργοστάσια ιχθυοτροφών και ζωοτροφών, τα *Salmonella agona* και *Salmonella montevideo* βρέθηκαν καλοί παραγωγοί βιο-υμενίου, ενώ βρέθηκε ότι το *Salmonella typhimurium* είναι ένας αδύναμος παραγωγός βιο-υμενίου. Τα αποτελέσματα της μελέτης ανέφεραν επίσης ότι η διατήρηση της *Salmonella* στο εργοστάσιο εξαρτάται σημαντικά στην ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου του εκάστοτε στελέχους (Vestbyc et al., 2009). Ωστόσο, ανέφερε επίσης ότι το επίπεδο σχηματισμού βιο-υμενίου μπορεί να επηρεαστεί θετικά ή αρνητικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η φυσική μικροχλωρίδα (Carpentier et al., 2004; Guðbjörnsdóttir et al., 2005).

Δ. Βιομηχανία πουλερικών

Έχουν διεξαχθεί πολλές μελέτες σχετικά με το σχηματισμό βιο-υμενίου στη βιομηχανία επεξεργασίας πουλερικών. Σε κάποιες από αυτές, έχει εντοπιστεί ότι η σκόνη, οι επιφάνειες, τα περιττώματα, οι ζωοτροφές πουλερικών και η μεταφορά ζώντων πουλερικών μεταξύ μονάδων παραγωγής και μεταποίησης είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες κινδύνου για τη μόλυνση με *Salmonella* (Marin et al., 2009; Park et al., 2011; Ramesh et al., 2002). Επιπλέον, περίπου το 50% των στελεχών που απομονώθηκαν σε φάρμες πουλερικών ήταν σε θέση να παράγουν βιο-υμένιο (Marin et al., 2009). Η πρόσδεση των 25 στελεχών της σαλμονέλας σε τέσσερα διαφορετικά υλικά (πολυτετραφθοροαιθυλένιο-γνωστό επίσης ως Teflon, ανοξείδωτο ατσάλι,

καουτσούκ και πολυουρεθάνη), τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά στη βιομηχανία πουλερικών, μελετήθηκε. Μεταξύ αυτών, οι απομονώσεις *Salmonella sofia* (εκτός από τα S1635 και S1636) μπορούν γενικά να προσκολληθούν σε υψηλότερο βαθμό στις διαφορετικές επιφάνειες συγκριτικά με τις άλλες απομονώσεις. Έτσι προτάθηκε ότι ο ορότυπος *Salmonella sofia* πιθανόν να έχει περισσότερα τριχίδια ή κροσσούς από τους άλλους ορότυπους (Chia et al., 2009). Τα αποτελέσματα της μελέτης συμφωνούν επίσης με τα δεδομένα από τους Helke et al. (1993), ότι το *S. typhimurium* μπορεί να προσαρμοστεί πιο εύκολα στον ανοξειδωτο χάλυβα από το καουτσούκ. Σε μια διαφορετική μελέτη, ο χαρακτηρισμός του σχηματισμού βιο-υμενίου και η προσκόλληση του *S. typhimurium* DT104 (Kim et al., 2009) αξιολογήθηκε, με τα αποτελέσματα να δείχνουν, ότι ο κύριος παράγοντας συνεισφοράς στη σύνθεση του λιποπολυσακχαρίτη (LPS) και στο σχηματισμό βιο-υμενίου του *S. typhimurium* DT104 είναι το γονίδιο rfbA.

Εκτός από τα *Salmonella* spp., τα *Campylobacter* spp. είναι παθογόνα που επίσης βρίσκονται συχνά στην επεξεργασία πουλερικών και στα πουλερικά (Deming et al., 1987; Harris et al., 1986; Hopkins et al., 1983; Sanders et al., 2007). Πολλοί ερευνητές έχουν προσπαθήσει να κατανοήσουν τη συμπεριφορά του *Campylobacter jejuni* στην επεξεργασία πουλερικών. Ως αποτέλεσμα, έχει καθοριστεί ότι η θερμοκρασία είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την επιβίωσή τους (Chan et al., 2001; Dykes et al., 2003; Trachoo et al., 2002). Συγκεκριμένα, οι Hanning et al. (2008) απέδειξαν ότι το καλλιεργημένο *C. jejuni* μπορεί να αντέξει περισσότερο σε βιο-υμένια στους 32 °C, σε σύγκριση με την επιβίωση των καλλιεργούμενων πλαγκτονικών κυττάρων και βιο-υμενίων στους 10 °C. Τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης έδειξαν ότι διευκολύνεται η προσκόλληση του *C. jejuni* στις επιφάνειες από ένα προϋπάρχον βιο-υμένιο, οπότε είναι σημαντικό να ενισχυθεί ο έλεγχος των βιο-υμενίων στην επεξεργασία πουλερικών.

Ε. Βιομηχανία κρέατος

Τα οργανικά υπολείμματα στην επεξεργασία τροφίμων θα μπορούσαν να είναι μια θέση για τη συσσώρευση των μικροοργανισμών και το σχηματισμό βιο-υμενίου, καθώς αποτελούν πηγή διασταυρούμενης μόλυνσης, κάτι που θεωρείται αρκετά ανησυχητικό από πολλούς ερευνητές (Brooks et al., 2008, McLandsborough et al., 2006; Simões et al., 2010). Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί με σκοπό τη βαθύτερη κατανόηση των βιο-υμενίων. Για παράδειγμα, το *E. Coli* έχει μελετηθεί από ερευνητές για να διαπιστώσουν την "προσκόλληση και το σχηματισμό βιο-υμενίου από το *E.coli* O157: H7 σε διαφορετικές θερμοκρασίες, σε διάφορες επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα στην επεξεργασία βοδινού" (Dourou et al., 2011). Στα αποτελέσματα της μελέτης, τα κύτταρα που ήταν προσκολλημένα στην επιφάνεια αυξάνονταν με την πάροδο του χρόνου ακόμη και κάτω από χαμηλές θερμοκρασίες, το οποίο μπορεί να προέκυψε, από τη μετανάστευση των κυττάρων προς την επιφάνεια με κινητικότητα που προκαλείται από μαστίγια (flagellar) και κινητικότητα Brownian (Van Houdt et

al., 2005). Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την προσκόλληση του *E. coli* O157: H7 είναι η παρουσία άλλων μικροοργανισμών στις επιφάνειες (Castonguay et al., 2006; Klayman et al., 2009; Marouani-Gadri et al., 2009). Για παράδειγμα, το *E. Coli* O157: H7 βρέθηκε ανίκανο να σχηματίσει βιο-υμένιο υπό συνθήκες δυναμικής ροής λόγω των διατμητικών δυνάμεων, ενώ τα βιο-υμένια του *Acinetobacter calcoaceticus* -απομονώθηκε από μονάδες επεξεργασίας κρέατος- είναι καλά οργανωμένα και μπορούν να αναπτυχθούν τόσο σε στατικές όσο και δυναμικές συνθήκες. Η έρευνα των Habimana et al. (2010) έδειξε ότι τα κύτταρα *E.coli* O157: H7 ενσωματώνονταν και καλύπτονταν από βιο-υμένιο του *Acinetobacter calcoaceticus* κάτω από στατικές αλλά και δυναμικές συνθήκες ανάπτυξης. Έτσι έγινε ευρέως αντιληπτό, ότι τα βιο-υμένια με περισσότερα από ένα είδη μικροοργανισμών, μπορεί να αυξήσουν τις δυνατότητες για την ανάπτυξη των παθογόνων παραγόντων στη βιομηχανία τροφίμων (Burmølle et al., 2006; Habimana et al., 2010; Stewart et al., 2008).

Στ. Βιομηχανία έτοιμων για κατανάλωση (RTE) τροφίμων

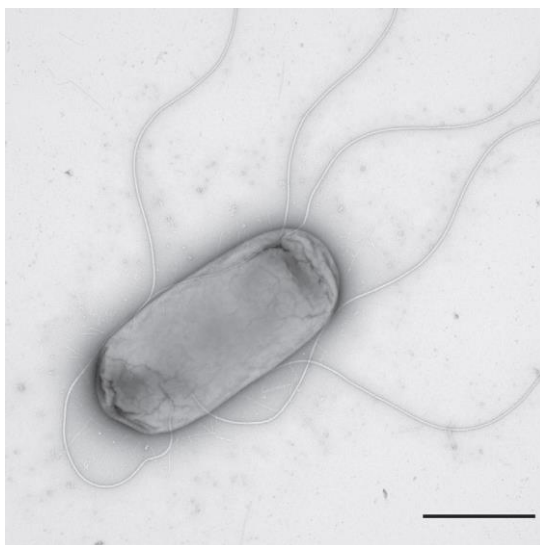
Λόγω των αλλαγών στον τρόπο ζωής, τα ready-to-eat (RTE) τρόφιμα έχουν γίνει πολύ δημοφιλή. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα μπορούν να θεωρηθούν τρόφιμα σχετικά υψηλού κινδύνου δεδομένου, ότι τα προϊόντα θα καταναλωθούν απευθείας χωρίς να υποβληθούν σε οποιαδήποτε βακτηριοκτόνο διαδικασία. Επιπλέον, ο χρόνος και οι συνθήκες αποθήκευσης είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ποιότητα των RTE τροφίμων (Sofos et al., 2010). Αυτά τα τρόφιμα θα μπορούσαν ενδεχομένως να είναι ευαίσθητα σε διασταυρούμενη μόλυνση κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας και του χειρισμού. Ειδικότερα, μετά το μαγείρεμα, τα προϊόντα ενδέχεται να ξαναμολυνθούν κατά τη φόρτωση, τη μεταφορά, τη ζύγιση και τη συσκευασία (Osaili et al., 2011). Οι Garrido et al. (2009) αξιολόγησαν την εμφάνιση και τα επίπεδα του *L. monocytogenes* σε ψυχόμενα RTE προϊόντα για παρατεταμένη κατανάλωση στη βόρεια Ισπανία. Διαπιστώθηκε ότι το καπνιστό ψάρι ήταν το πιο συχνά μολυσμένο από παθογόνα τρόφιμο μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Εικάζεται ότι τα υλικά τεμαχισμού που χρησιμοποιήθηκαν στην επεξεργασία ήταν η πηγή μόλυνσης λόγω σχηματισμού βιο-υμενίου. Συγκριτικά, ο καπνιστός σολομός βρέθηκε να είναι το περισσότερο μολυσμένο προϊόν με *L. monocytogenes* στη μελέτη των Di Pinto et al. (2010). Σύμφωνα με μια έρευνα από τους Wagner et al. (2007), τα ψάρια και τα θαλασσινά βρέθηκαν επίσης εξαιρετικά μολυσμένα με *L. monocytogenes* μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Η έρευνα επιπλέον έδειξε ότι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα μόλυνσης για μη συσκευασμένα ή ανασυσκευασμένα RTE τρόφιμα. Επιπλέον, μελετήθηκε η παραγωγή βιο-υμενίου από το *E. coli* O157: H7 και η μεταφορά του από επιφάνειες επαφής σε κρέας, πουλερικά, παραπροϊόντα RTE και προϊόντων παραγωγής. Η μελέτη έδειξε ότι το στέλεχος *E. Coli* O157: H7 θα μπορούσε να αποτελέσει ανησυχία σε μια μεγάλη ποικιλία προϊόντων διατροφής, καθώς μπορεί να σχηματίσει βιο-υμένια στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των τροφίμων (Silagyi et al., 2009).

Κεφάλαιο 2

***Salmonella enterica*: ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο βακτήριο**

2.1 Μορφολογικές και βιοχημικές ιδιότητες

Το *Salmonella* είναι ραβδόμορφο, αρνητικό κατά Gram βακτήριο με ικανότητα κίνησης, με τα μαστίγια να κατανέμονται ομοιόμορφα πάνω στην κυτταρική επιφάνεια (Εικόνα 2.1.1). Παραλλαγές χωρίς μαστίγια και μη κινητά στελέχη, που περιέχουν δυσλειτουργικά μαστίγια, έχουν αναφερθεί. Το συγκεκριμένο βακτήριο είναι προαιρετικά αναερόβιο και μη σποριογόνο, ικανό να χρησιμοποιεί μεγάλη ποικιλία θρεπτικών συστατικών (χημειοργανότροφο). Χρησιμοποιεί τόσο αναπνευστικά όσο και ζυμωτικά μεταβολικά μονοπάτια. Γενικά, είναι αρνητικό στην οξειδάση και θετικό στην καταλάση και χρησιμοποιεί το κιτρικό οξύ ως πηγή άνθρακα. Τα περισσότερα στελέχη παράγουν υδρόθειο, αποκαρβοξυλιωμένη λυσίνη και ορνιθίνη, ενώ δεν χρησιμοποιούν ουρία. Πολλές από αυτές τις ιδιότητες χρησιμοποιούνται για το σχεδιασμό μεθόδων αναγνώρισης, όπως για παράδειγμα τρυβλία με άγαρ ξυλόξης-λυσίνης-δεοξυχολικού οξέος (XLD) στην πρότυπη μέθοδο ISO 6579.

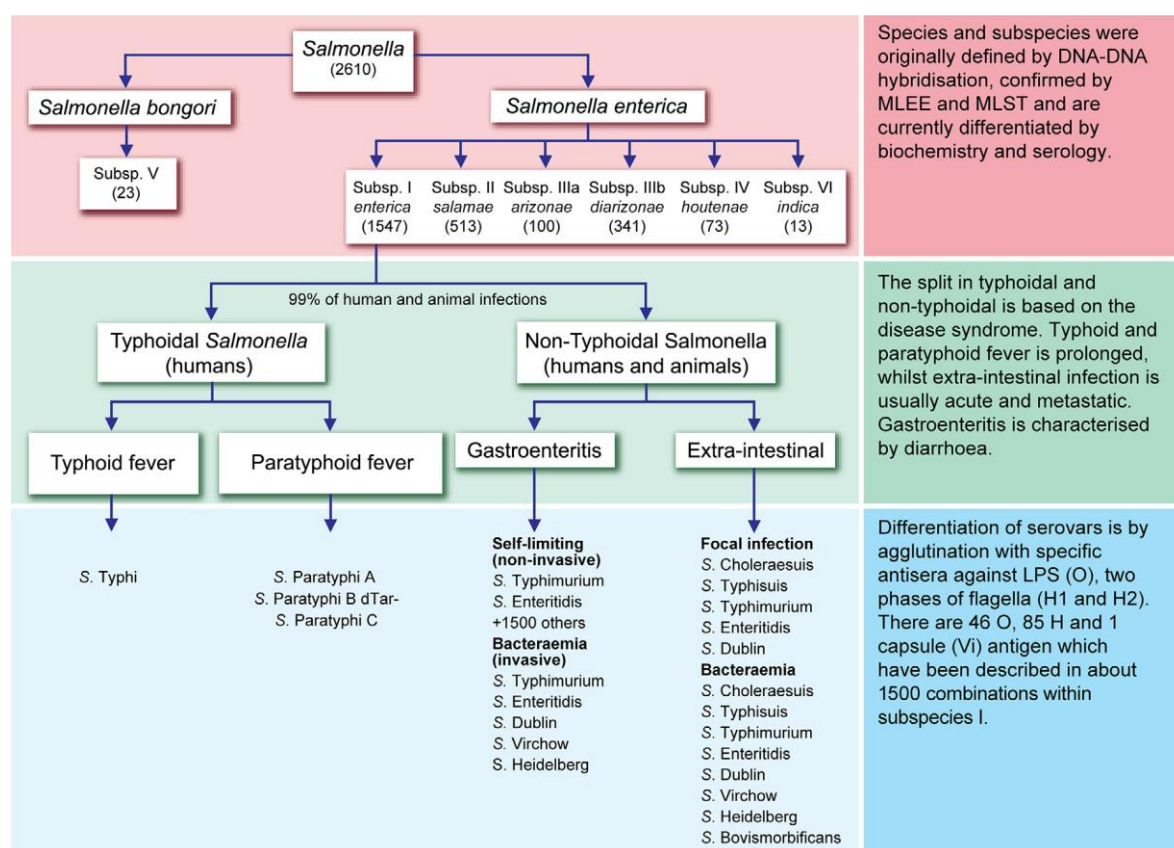


Εικόνα 2.1.1 Απεικόνιση της *Salmonella* σε μικροσκόπιο φωτός.

2.2 Ταξινόμηση και ονοματολογία

Το γένος *Salmonella* είναι μέλος της οικογένειας Enterobacteriaceae και περιέχει δύο είδη, τα *Salmonella enterica* και *Salmonella bongori*, το καθένα από τα οποία αποτελείται από πολλαπλούς ορότυπους. Το *S. enterica* υποδιαιρείται σε έξι υποείδη: *S. enterica ssp. enterica* (I), *S. Enterica ssp. salamae* (II), *S. enterica ssp. arizonae* (IIIa), *S. enterica ssp. diarizonae* (IIIb), *S. enterica ssp. houtenae* (IV) και *S.*

enterica ssp. *indica* (VI). Το είδος *S. bongori* ήταν προηγουμένως ταξινομημένο ως υποείδος V. Το *S. enterica* ssp. *enterica* σχετίζεται κυρίως με ανθρώπους και θερμόαιμα ζώα, ενώ τα άλλα υποείδη βρίσκονται σε ψυχρόαιμα ζώα και στο περιβάλλον. Αυτή η ταξινόμηση έχει υποβληθεί σε πολλές ανακατατάξεις με την πάροδο του χρόνου, ως αποτέλεσμα των μεθοδολογικών βελτιώσεων που αποκαλύπτουν την πραγματική σχέση μεταξύ των βακτηρίων αυτής της ομάδας. Τα υποείδη του *Salmonella* χωρίζονται περαιτέρω σε οροτύπους σύμφωνα με το σχέδιο White-Kauffmann-Le Minor. Ο διαχωρισμός των οροτύπων βασίζεται στα αντιγονικά χαρακτηριστικά, που περιλαμβάνουν τους σωματικούς (O) λιποπολυσακχαρίτες (LPS), τα αντιγόνα του μαστιγίου (H) και το αντιγόνο της κάψουλας (Vi). Επί του παρόντος, περίπου 2600 ορότυποι *Salmonella* έχουν ταυτοποιηθεί, με τους περισσότερους ορότυπους να ανήκουν στο *S. enterica* (Εικόνα 2.2.1).



Εικόνα 2.2.1 Γενική επισκόπηση της τωρινής ταξινόμησης του *Salmonella enterica* από τους [Achtman et al. \(2012\)](#). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. PLoS Pathog 8(6), p. e 1002776.

2.3 Φυσιολογία

Το *Salmonella* μπορεί να βρεθεί σε φυσικά περιβάλλοντα, όπως το νερό, το έδαφος και τα φυτά, αλλά δεν φαίνεται να αυξάνεται σημαντικά εκεί. Ωστόσο, δεδομένου ότι είναι γνωστό πως είναι αρκετά ανθεκτικό σε διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες, μπορεί να επιβιώσει για εβδομάδες σε νερό και αρκετά χρόνια στο έδαφος, όσο οι συνθήκες είναι ευνοϊκές. Έχει επίσης αναφερθεί ότι

επιβιώνει για παρατεταμένες χρονικές περιόδους σε τρόφιμα που είναι κατεψυγμένα ή σε θερμοκρασία δωματίου. Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι 37 °C, αλλά ο οργανισμός μπορεί να αναπτυχθεί σε ένα αρκετά ευρύ φάσμα (7-45 °C), ενώ σε ακραίες περιπτώσεις παρατηρήθηκε ανάπτυξη στα τρόφιμα στους 2-4 °C. Επίσης όσον αφορά στο pH η ανάπτυξη γίνεται σε τιμές 4,5-9,5, με τη βέλτιστη τιμή να βρίσκεται μεταξύ 6,5-7,5. Η ενεργότητα νερού (a_w) πρέπει να είναι $\geq 0,93$ για να καταστεί δυνατή η ανάπτυξη του βακτηρίου στα τρόφιμα, ενώ γενικά παρατηρείται αναστολή αυτής υπό την παρουσία NaCl σε συγκεντρώσεις 3-4%. Συγκεκριμένα το *Salmonella enterica* είναι φυσικός κάτοικος (inhabitant) του γαστρεντερικού σωλήνα των οικόσιτων και άγριων ζώων, των πουλιών και των εντόμων.

Το *Salmonella* έχει μεγάλη ικανότητα προσαρμογής σε διάφορες περισσότερο ή λιγότερο δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως χαμηλό pH, υψηλή θερμοκρασία και χαμηλή a_w . Αυτό καθιστά τα συγκεκριμένα βακτήρια ικανά να ξεπεράσουν άλλους μικροοργανισμούς σε ανάπτυξη, κάτι που πιθανόν να οδηγήσει σε προβλήματα επιμόλυνσης και σχηματισμού βιο-υμενίου στα περιβάλλοντα παραγωγής τροφίμων.

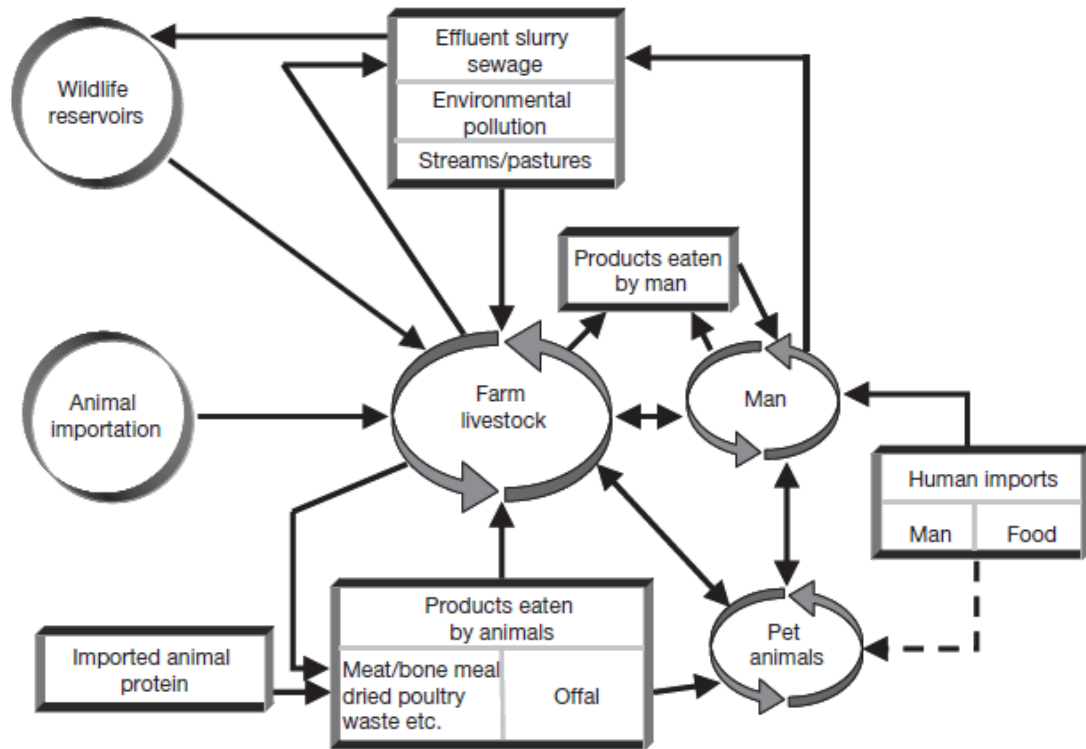
2.4 Επιδημιολογία

Η *Salmonella* βρίσκεται παγκοσμίως και αποτελεί σημαντικό ζωνοσογόνο βακτήριο. Υπολογίζεται ότι κάθε χρόνο είναι υπεύθυνη για 93,8 εκατομμύρια κρούσματα ανθρώπινης γαστρεντερίτιδας παγκοσμίως και από αυτά, 80,3 εκατομμύρια περιπτώσεις εκτιμάται ότι είναι τροφιμογενείς. Στην ΕΕ, 95.548 επιβεβαιωμένα κρούσματα ανθρώπινων λοιμώξεων από *Salmonella* αναφέρθηκαν στην Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων το 2011. Ωστόσο, πολλές περιπτώσεις σαλμονέλλωσης θεωρείται πως δεν έχουν καταγραφεί καθώς πολλά από τα άρρωστα άτομα δεν αναζητούν ιατρική φροντίδα.

Οι ορότυποι *Salmonella ser. Enteritidis* και *Salmonella ser. Typhimurium* είναι οι πιο συχνά αναφερόμενοι ορότυποι και ευθύνονται από κοινού περίπου για το 70% όλων των λοιμώξεων από *Salmonella* στην Ευρώπη. Οι ανθρώπινες λοιμώξεις που προκαλεί το *Salmonella ser. Enteritidis* σχετίζονται κυρίως με την κατανάλωση μολυσμένων αυγών και κρέατος πουλερικών, ενώ οι περιπτώσεις του *Salmonella ser. Typhimurium* συνηθέστερα συνδέονται με την κατανάλωση μολυσμένου χοιρινού, βοδινού και κρέατος πουλερικών.

Η μετάδοση του βακτηρίου στους ανθρώπους γίνεται μέσω επαφής με το περιβάλλον, τα ζώα και τον άνθρωπο (**Εικόνα 2.4.1**). Στις βιομηχανικές χώρες, η κύρια πηγή των λοιμώξεων από *Salmonella* είναι προϊόντα τροφίμων που προέρχονται από μολυσμένα ζώα, ιδίως νωπά κρέατα και αυγά. Σε αναπτυσσόμενες χώρες, ένα μεγάλο μέρος των ανθρώπινων κρουσμάτων οφείλεται σε μολυσμένα λαχανικά, το νερό, και την από άνθρωπο-σε-άνθρωπο μετάδοση. Πρόσφατα, παρατηρήθηκε αύξηση στα

καταγεγραμμένα κρούσματα σαλμονέλωσης, που προκλήθηκαν από μολυσμένα φρούτα και λαχανικά.



Εικόνα 2.4.1 Οδοί μετάδοσης του βακτηρίου *Salmonella*. Από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας -WHO- (1983). Guidelines on prevention and control of salmonellosis, A. H. Hinton (ed.), Geneva, p. 22

2.5 Σαλμονέλωση

Μολύνσεις του ανθρώπου από *Salmonella* μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες κλινικές καταστάσεις, όπως ο εντερικός (τυφοειδής) πυρετός, η απλή εντεροκολίτιδα και οι συστηματικές μολύνσεις από μη τυφοειδείς μικροοργανισμούς. Λίγα είδη *Salmonella* μπορούν να προκαλέσουν μόλυνση και η μολυσματική δόση γενικά θεωρείται ότι είναι $>10^4$ CFU g⁻¹. Ένας κοινός παρανομαστής των τροφίμων που σχετίζονται με χαμηλές μολυσματικές δόσεις είναι η υψηλή περιεκτικότητα σε λίπη (π.χ. το βούτυρο κακάο στη σοκολάτα, τα λιπαρά γάλακτος στο τυρί και το ζωικό λίπος στο κρέας).

Ο εντερικός πυρετός συνδέεται με τους οροτύπους *Typhi* και *Paratyphi A, B* και *C* και τα συμπτώματα περιλαμβάνουν διάρροια, παρατεταμένο και οξύ πυρετό, κοιλιακό πόνο, πονοκέφαλο και πλήρη σωματική εξάντληση που εμφανίζονται μετά από περίοδο επώασης 7-28 ημέρες. Μετά την αρχική οξεία φάση της νόσου, ακολουθεί η ασυμπτωματική κατάσταση χρόνιου φορέα. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, είναι δυνατόν για τη *Salmonella* να προκαλέσει επεμβατική (συστηματική) ασθένεια, με την εισαγωγή της στην ροή του αίματος και την εξάπλωση σε όλο το σώμα. Η φύση και η σοβαρότητα των μολύνσεων εξαρτώνται από διάφορους παράγοντες, όπως ο

μολυσματικός ορότυπος της *Salmonella*, η μολυσματικότητα του στελέχους, η μολυσματική δόση και ο ξενιστής. Οι θεραπείες του εντερικού πυρετού περιλαμβάνουν τη χρήση υποστηρικτικής θεραπείας και/ή αντιβιοτικών για την αποφυγή συστηματικών λοιμώξεων. Ωστόσο, η αξιοσημείωτη αύξηση της ανθεκτικότητας των στελεχών προς αρκετά αντιβιοτικά την τελευταία δεκαετία, έχει περιορίσει την αποτελεσματικότητά τους στη θεραπεία του ανθρώπου.

Η σαλμονέλωση με μη τυφοειδή στελέχη οδηγεί σε εμφάνιση συμπτωμάτων 8-72 ώρες έπειτα από την κατάποση του παθογόνου. Οι γαστρεντερικές λοιμώξεις προκαλούνται κυρίως από ορότυπους όπως *Enteritidis* και *Typhimurium*. Συνήθως, η *Salmonella* αποικίζει το έντερο με προσκόλληση στα επιθηλιακά κύτταρα, χρησιμοποιώντας τα τριχίδια (fimbria), στη συνέχεια εισβάλλει στο βλεννογόνο και πολλαπλασιάζεται στο λεμφοειδή ιστό. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν μη αιματηρή διάρροια και κοιλιακό πόνο που υποχωρούν μέσα σε 5 μέρες από την αρχική εκδήλωση των συμπτωμάτων καθώς η ασθένεια είναι συνήθως αυτοπεριοριζόμενη. Είναι σύνηθες να χρησιμοποιείται μόνο υποστηρικτική θεραπεία για τη θεραπεία της μη τυφοειδούς σαλμονέλωσης δεδομένου ότι διαπιστώθηκε πως η χρήση αντιβιοτικών παρατείνει την κατάσταση φορέα. Όμως, η μη τυφοειδής σαλμονέλωση είναι πιθανό να επιδεινωθεί και να οδηγήσει σε συστηματικές λοιμώξεις και χρόνιες παθήσεις όπως ασηπτική αντιδραστική αρθρίτιδα, το σύνδρομο Reiter και η αγκυλωτή σπονδυλίτιδα.

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 3

Σκοπός

Στη παρούσα πτυχιακή μελέτη ερευνήθηκε η συνδυαστική επίδραση τριών κύριων περιβαλλοντικών παραμέτρων (αλατότητα, pH και θερμοκρασία) στο σχηματισμό βιο-υμενίου από δύο διαφορετικά βακτηριακά στελέχη *Salmonella enterica* (ορότυποι Enteritidis και Typhimurium). Η ανάπτυξη του βιο-υμενίου πραγματοποιήθηκε πάνω σε επιφάνεια ανοξείδωτου χάλυβα (AX), που προσομοιάζει βιομηχανικό εξοπλισμό σε βιομηχανία τροφίμων.

Σε κάθε βακτηριακό στέλεχος εφαρμόστηκε ίδιο πειραματικό πρωτόκολλο. Οι επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα (AX) επώαστηκαν για 24 ώρες σε 1/10 αραιωμένο θρεπτικό ζωμό τρυπτόνης, υπό 18 διαφορετικούς συνδιασμούς των τριών παραγόντων (T, pH, NaCl). Μετά το πέρας της πειραματικής διαδικασίας προέκυψε μια μαθηματική πολυωνυμική εξίσωση δευτεύρου βαθμού για κάθε στέλεχος, η οποία περιγράφει το σχηματισμό βιο-υμενίου συναρτήσει των τριών περιβαλλοντικών παραμέτρων. Με τον τρόπο αυτό κατέστη δυνατή τόσο η σύγκριση της ικανότητας των δύο στελεχών να σχηματίζουν βιο-υμένιο όσο και ο προσδιορισμός των συνθηκών που οδηγούν στο μέγιστο σχηματισμό βιο-υμενίου, λαμβάνοντας υπόψη τη συνδυαστική επίδραση της αλατότητας, του pH και της θερμοκρασίας.

Κεφάλαιο 4

Υλικά και Μέθοδοι

4.1 Απαραίτητος εξοπλισμός

Ο παρακάτω εξοπλισμός χρησιμοποιήθηκε για την διεκπεραίωση του πειραματικού πρωτοκόλλου:

- κοντοί και μακροί γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες (διαμέτρου 16 mm) με τα καπάκια τους
- πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης (falcon των 15 και 50 ml) με βιδωτά καπάκια
- βάσεις στήριξης (στατώ) δοκιμαστικών σωλήνων και falcon
- σωληνάρια Eppendorf[®]
- ογκομετρικοί κύλινδροι
- γυάλινα ποτήρια ζέσεως
- μικροβιολογικός κρίκος (κρίκος ενοφθαλμισμού)
- πλαστικά τρυβλία Petri (διαμέτρου 90 mm)
- μεταλλικό τρίγωνο για τη διασπορά των κυττάρων
- γυάλινες φιάλες Duran
- μηχανικές μικροπιπέττες
- ρύγχοι (tips) μηχανικών μικροπιπέττων
- τεμάχια ανοξειδωτου χάλυβα (διαστάσεων: 3 x 1 x 0,1 cm)
- γυάλινα σφαιρίδια (διαμέτρου 3 mm)
- αποστειρωμένη λαβίδα
- χρονόμετρο
- θάλαμος νηματικής ροής (τύπου II)
- λύχνος Bunsen
- επωαστήρες
- υδατόλουτρο (ρυθμισμένο στους 47°C)
- συσκευή αποστείρωσης ή αυτόκαυστο
- θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας
- μαγνήτες ανάδευσης
- μηχανικός αναδευτήρας (vortexer)
- αναλυτικός ηλεκτρονικός ζυγός ακριβείας
- φασματοφωτόμετρο ορατού
- πλαστικές κυψελίδες φασματοφωτόμετρου (1 ml)
- επιτραπέζια φυγόκεντρος
- ψυγείο (4°C)
- καταψύκτης (-40°C)



Εικόνα 4.1.1 Συσκευή αποστείρωσης ή αυτόκαυστο σε λειτουργία



Εικόνα 4.1.2 Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας



Εικόνα 4.1.3 Μηχανικός αναδευτήρας (vortexer)



Εικόνα 4.1.4 Ρύγχιοι (tips) μηχανικών μικροπιπέτων των 10μl

4.2 Θρεπτικά υλικά και διαλύματα

- **Θρεπτικός ζωμός τρυπτόνης (Tryptone Soy Broth, TSB)** (θρεπτικός ζωμός γενικού σκοπού). Για τη παρασκευή του TSB χρησιμοποιήθηκε το Soyabean Casein Digest Medium της εταιρίας Himedia (M011) σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:
 - ✓ Ζυγίστηκαν 30g σκόνης TSB και διαλύθηκαν μέσα σε 1000 ml απιονισμένου ύδατος.
 - ✓ Αναδεύτηκαν μέχρι πλήρους διάλυσης σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα.
 - ✓ Αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 λεπτά.
 - ✓ Το έτοιμο μέσο αποθηκεύτηκε στο ψυγείο στους 4 °C.

- **Θρεπτικός ζωμός τρυπτόνης 1/10 αραιωμένος (dTSB)** με ρυθμισμένο pH. Για τη παρασκευή του dTSB χρησιμοποιήθηκε το Soyabean Casein Digest Medium της εταιρίας Himedia (M011) σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:
 - ✓ Ζυγίστηκαν 3g σκόνης TSB και διαλύθηκαν μέσα σε 1000 ml απιονισμένου ύδατος.
 - ✓ Αναδεύτηκαν μέχρι πλήρους διάλυσης σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα.
 - ✓ Για τη ρύθμιση της τιμής pH χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα HCL και NaOH.
 - ✓ Αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 λεπτά.
 - ✓ Το έτοιμο μέσο αποθηκεύτηκε στο ψυγείο στους 4 °C.

- **Θρεπτικό άγαρ τρυπτόνης (Tryptone Soy Agar, TSA)** (στερεό θρεπτικό υλικό γενικού σκοπού). Για τη παρασκευή του TSA χρησιμοποιήθηκε το Trypticasein Soy Agar της εταιρίας Conda (1068) σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:
 - ✓ Ζυγίστηκαν 40g σκόνης TSA και διαλύθηκαν μέσα σε 1000 ml απιονισμένου ύδατος.
 - ✓ Αναδεύτηκαν μέχρι πλήρους διάλυσης σε θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα.

- ✓ Αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 λεπτά.
 - ✓ Το έτοιμο μέσο τοποθετήθηκε σε τρυβλία, τα οποία έπειτα αποθηκεύτηκαν στο ψυγείο στους 4 °C
- **Αλατούχο διάλυμα ¼ Ringer.** Για τη παρασκευή του διαλύματος χρησιμοποιήθηκαν ταμπλέτες Ringer’s Solution ¼ strength tablets της εταιρίας LABM (LAB100Z) σύμφωνα με τη παρακάτω διαδικασία:
- ✓ Διαλύθηκε μια ταμπλέτα για κάθε 500 ml απιονισμένου ύδατος.
 - ✓ Αποστειρώθηκαν στους 121 °C για 15 λεπτά.
 - ✓ Το έτοιμο μέσο αποθηκεύτηκε στο ψυγείο στους 4 °C.

4.3 Βακτηριακά στελέχη και πειραματικό σχεδιασμός

Για τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά στελέχη *Salmonella enterica*, τα οποία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

α/α	Κωδικός	Είδος	Υποείδος	Ορότυπος	Πηγή / Προέλευση
1	DFSN_B18	<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>	Enteritidis	Αυγά
2	DFSN_B68	<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>	Typhimurium	Άνθρωπος

Πίνακας 4.3.1 Εξετασθέντα βακτηριακά στελέχη.

Στο συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό εξετάστηκε ο σχηματισμός βιομυνίου από αυτά τα στελέχη, πάνω σε επιφάνεια ανοξειδωτού χάλυβα (AX), υπό την επίδραση τριών κύριων περιβαλλοντικών παραμέτρων (ανεξάρτητες μεταβλητές). Οι τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές που μελετήθηκαν ήταν η αλατότητα εκφρασμένη ως συγκέντρωση NaCl, το pH και η θερμοκρασία T (°C). Κάθε μεταβλητή κωδικοποιήθηκε σε τρία επίπεδα, - 1, 0 και 1, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}, \quad x_i = 1, 2, 3$$

Όπου:

x_i και X_i : η αδιάστατη (dimensionless) και η πραγματική τιμή (actual value) της ανεξάρτητης μεταβλητής i ,

X_0 : η πραγματική τιμή της ανεξάρτητης μεταβλητής i στο κεντρικό σημείο, και

ΔX_i : η μεταβολή της X_i που αντιστοιχεί στη μοναδιαία μεταβολής της αδιάστατης τιμής.

Ανεξάρτητες μεταβλητές	Κωδικές ονομασίες	Πειραματικές τιμές στα κωδικοποιημένα επίπεδα μεταβλητών		
		-1	0	1
NaCl (%)	X ₁	0,5	4,5	8,5
pH	X ₂	5	6,5	8
T (°C)	X ₃	13	26	39

Πίνακας 4.3.2 Κωδικές ονομασίες και πειραματικές τιμές στα τρία κωδικοποιημένα επίπεδα της κάθε ανεξάρτητης μεταβλητή που θα χρησιμοποιηθούν στον πλήρη παραγοντικό σχεδιασμό.

Χρησιμοποιήθηκε ένας 2³ πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (full-factorial Box-Behnken design) έτσι ώστε να προσδιοριστεί η σχέση που υπάρχει μεταξύ της απόκρισης (σχηματισμός βιο-υμενίου, Log₁₀CFU/cm²) και των ανεξάρτητων μεταβλητών (περιβαλλοντικών παραμέτρων), καθώς και για να καθοριστούν εκείνες οι προϋποθέσεις (περιβαλλοντικές παράμετροι) που οδηγούν στο μέγιστο σχηματισμό βιο-υμενίου.

Για τη καλύτερη μοντελοποίηση όλων των αποτελεσμάτων του σχηματισμού βιο-υμενίου ήταν απαραίτητη η πραγματοποίηση συνολικά δεκαοκτώ πειραμάτων. Κάθε πείραμα αποτελούταν από την ίδια πειραματική διαδικασία (όπως περιγράφεται παρακάτω) αλλά από διαφορετικό συνδυασμό των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών.

Πείραμα	Ανεξάρτητες μεταβλητές		
	NaCl (X ₁)	pH (X ₂)	T (X ₃)
1	0,5 (-1)	5 (-1)	13 (-1)
2	0,5 (-1)	5 (-1)	39 (1)
3	0,5 (-1)	8 (1)	13 (-1)
4	0,5 (-1)	8 (1)	39 (1)
5	8,5 (1)	5 (-1)	13 (-1)
6	8,5 (1)	5 (-1)	39 (1)
7	8,5 (1)	8 (1)	13 (-1)
8	8,5 (1)	8 (1)	39 (1)
9	0,5 (-1)	6,5 (0)	26 (0)
10	8,5 (1)	6,5 (0)	26 (0)
11	4,5 (0)	5 (-1)	26 (0)
12	4,5 (0)	8 (1)	26 (0)
13	4,5 (0)	6,5 (0)	13 (-1)
14	4,5 (0)	6,5 (0)	39 (1)
15	4,5 (0)	6,5 (0)	26 (0)
16	4,5 (0)	6,5 (0)	26 (0)
17	4,5 (0)	6,5 (0)	26 (0)
18	4,5 (0)	6,5 (0)	26 (0)

Πίνακας 4.3.3 Πειραματικός σχεδιασμός με πραγματικές και κωδικοποιημένες τιμές.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τον πειραματικό σχεδιασμό υποβλήθηκαν σε ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis) χρησιμοποιώντας μεθοδολογία ελαχίστων τετραγώνων (least square methodology) έτσι ώστε να ληφθεί το μαθηματικό μοντέλο (εξίσωση). Τα διαγράμματα με τη μορφή οικοπέδων περιγράμματος (contour plots) ελήφθησαν με τη χρήση του προσαρμοσμένου μοντέλου (fitted model), με ταυτόχρονη διακύμανση των ανεξάρτητων μεταβλητών χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα SigmaPlot^R v11.0.0.77 (Systat Software Inc., Chicago, Illinois, USA).

Επιπλέον της στατιστικής επικύρωσης (statistical validation) του πειραματικού μοντέλου, πραγματοποιήθηκε και πειραματική επαλήθευση (experimental verification) αυτού. Αυτό το στάδιο επαλήθευσης διενεργήθηκε μέσω έξι επιπλέον πειραμάτων

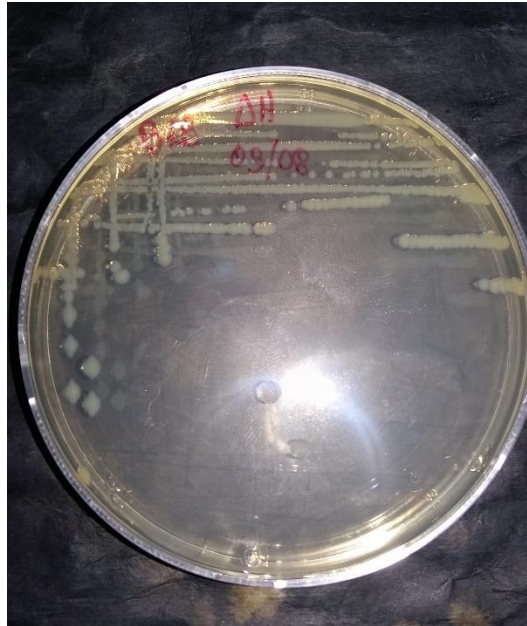
(όπως φαίνεται στον παρακάτω πίνακα), τα οποία πραγματοποιήθηκαν ελέγχοντας διαφορετικούς συνδυασμούς των περιβαλλοντικών παραμέτρων (ανεξάρτητων μεταβλητών) απ' αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή του μοντέλου. Οι παράγοντες bias και ακρίβειας (accuracy) υπολογίστηκαν ακολούθως ως δείκτες της απόδοσης του μοντέλου.

Πείραμα	Ανεξάρτητες μεταβλητές		
	NaCl (X ₁)	pH (X ₂)	T (X ₃)
1	1,5 (-0,75)	7 (0,33)	19 (-0,54)
2	3,5 (-0,25)	7 (0,33)	19 (-0,54)
3	7,5 (0,75)	7 (0,33)	19 (-0,54)
4	1,5 (-0,75)	7 (0,33)	33 (0,54)
5	3,5 (-0,25)	7 (0,33)	33 (0,54)
6	7,5 (0,75)	7 (0,33)	33 (0,54)

Πίνακας 4.3.4 Πειράματα επαλήθευσης του μοντέλου επιφανειακής απόκρισης (response surface model) για την προσκόλληση / σχηματισμό βιο-υμενίου (Log₁₀CFU/cm²) από τη *S. enterica* πάνω στα τεμάχια AX.

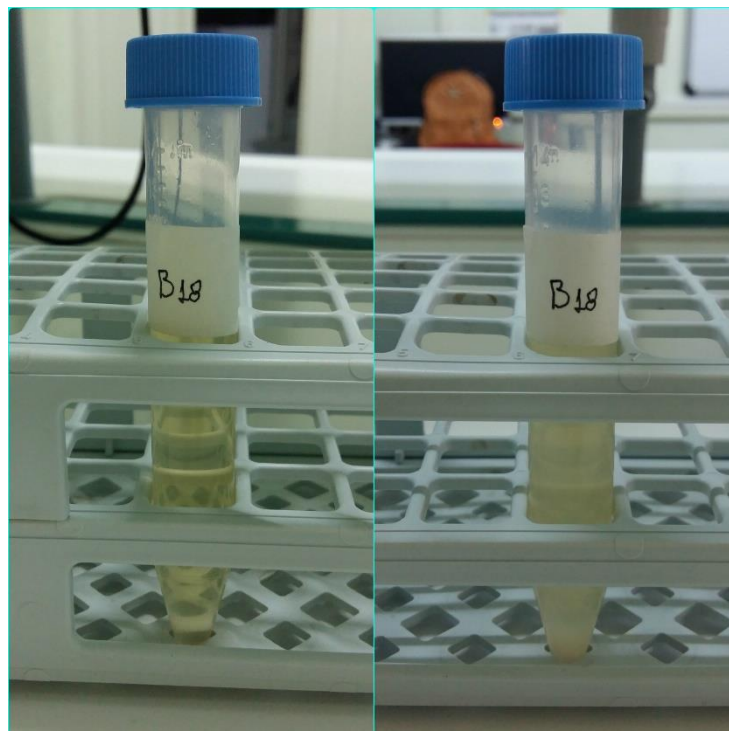
4.4 Προετοιμασία βακτηριακών καλλιιεργειών εργασίας

1. Αρχικά ξεπαγώθηκαν οι καλλιέργειες διατήρησης του κάθε στελέχους, οι οποίες βρίσκονταν παγωμένες μέσα σε διάλυμα TSB και 15% γλυκερόλης σε σωληνάριο erpendorf στη κατάψυξη (-40 °C).
2. Ένα τρυβλίο για κάθε στέλεχος ενοφθαλμίστηκε με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου, με τη μέθοδο των παράλληλων γραμμών (streaking), ξεκινώντας από την καλλιέργεια διατήρησης.
3. Τα ενοφθαλμισμένα τρυβλία επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες (προκαλλιέργειες).



Εικόνα 4.4.1 Ενοφθαλμισμένο τρυβλίο με το στέλεχος B18 μετά το πέρας των 24 ωρών (προκαλλιέργεια).

4. Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου ενοφθαλμίστηκαν 10 ml θρεπτικού ζωμού TSB μέσα σε πλαστικό σωλήνα φυγοκέντρησης (falcon των 15 ml), ξεκινώντας από την προκαλλιέργεια του κάθε στελέχους. Για τον ενοφθαλμισμό επιλέχθηκε μια ευδιάκριτη και μεμονωμένη αποικία.
5. Οι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης επώαστηκαν στους 37 °C για 18 ώρες (καλλιέργειες εργασίας).



Εικόνα 4.4.2 Πλαστικός σωλήνας φυγοκέντρησης με το στέλεχος B18 πριν (αριστερά) και μετά (δεξιά) το πέρας των 18 ωρών (καλλιέργεια εργασίας).

4.5 Προετοιμασία αλατούχων βακτηριακών εναιωρημάτων

1. Κάθε καλλιέργεια εργασίας φυγοκεντρήθηκε στα 2000 g για 10 λεπτά (σε θερμοκρασία δωματίου) χρησιμοποιώντας την επιτραπέζια φυγόκεντρο.
2. Το υπερκείμενο κάθε καλλιέργειας εργασίας απορρίφθηκε προσεκτικά, δίχως να διαλυθεί το ίζημα και έπειτα προστέθηκαν μέσα στο σωλήνα 10 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ Ringer, αναδεύτηκαν και πραγματοποιήθηκε δεύτερη φυγοκέντρωση στα 2000 g για 10 λεπτά (1η έκπλυση).
3. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά, δίχως να διαλυθεί το ίζημα και έπειτα προστέθηκαν μέσα στο σωλήνα 10 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ Ringer, αναδεύτηκαν και πραγματοποιήθηκε τρίτη φυγοκέντρωση στα 2000 g για 10 λεπτά (2η έκπλυση).



Εικόνα 4.5.1 Επιτραπέζια φυγόκεντρος ρυθμισμένη στις κατάλληλες τιμές.

4. Το υπερκείμενο απορρίφθηκε προσεκτικά, δίχως να διαλυθεί το ίζημα και έπειτα προστέθηκαν μέσα στο σωλήνα 10 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ Ringer και αναδεύτηκαν (βακτηριακό εναιώρημα, συγκέντρωση $\approx 10^{8-9}$ κύτταρα/ml).
5. 100 μl από το βακτηριακό εναιώρημα του κάθε στελέχους μεταφέρθηκαν μέσα σε πλαστική κυψελίδα φασματοφωτομέτρου (του 1 ml), στην οποία είχαν ήδη προστεθεί 900 μl $\frac{1}{4}$ Ringer. Ακολούθως μετρήθηκε η απορρόφηση στα 600 nm (A_{600nm}).



Εικόνα 4.5.2 Φασματοφωτόμετρο ορατού ρυθμισμένο στα 600nm.

6. Για κάθε στέλεχος, προετοιμάστηκε μέσα σε άδειο αποστειρωμένο πλαστικό falcon των 50 ml βακτηριακό εναιώρημα τελικού όγκου 30 ml και απορρόφησης $A_{600nm}=0,1$ (συγκέντρωση $\approx 10^{6-7}$ κύτταρα/ml). Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε ο κανόνας των αραιώσεων $A_{αρχ} \times V_{αρχ} = A_{τελ} \times V_{τελ}$, ενώ ως διαλύτης για την αραιώση χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο διάλυμα $\frac{1}{4}$ Ringer.
7. Επαληθεύτηκε μέσω φασματοφωτομέτρησης ότι το κάθε βακτηριακό εναιώρημα που προετοιμάστηκε είχε όντως απορρόφηση $A_{600nm}=0,1$. Επίσης για επαλήθευση μετρήθηκε ο κυτταρικός πληθυσμός του κάθε εναιωρήματος ($A_{600nm}=0,1$) μέσω της μεθόδου των διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων και καταμέτρησης αποικιών σε τρυβλία.

4.6 Προετοιμασία τεμαχίων ανοξειδωτου χάλυβα

1. Τα τεμάχια εμβαπτίστηκαν μέσα σε 2% v/v διάλυμα απορρυπαντικού (RBS 35), για 30 λεπτά υπό ανάδευση στους 50 °C.
2. Τα τεμάχια ξεπλύθηκαν αρκετές φορές με νερό βρύσης και στη συνέχεια με απεσταγμένο.
3. Το κάθε τεμάχιο τοποθετήθηκε μεμονωμένα μέσα σε κοντούς γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες (με καπάκια), οι οποίοι έπειτα αποστηρώθηκαν στους 121 °C για 15 λεπτά.

4.7 Πρωτόκολλο σχηματισμού βιο-υμενίου πάνω σε τεμάχια AX

1. Με τη βοήθεια μικροπιπέτας, μεταφέρθηκαν 5 ml από το κάθε αλατούχο βακτηριακό εναιώρημα ($A_{600nm} = 0,1$) μέσα σε κοντούς δοκιμαστικούς σωλήνες, οι

οποίοι περιείχαν από ένα τεμάχιο AX. Χρησιμοποιήθηκαν τρία τεμάχια AX ανά στέλεχος, δηλαδή συνολικά έξι τεμάχια ανα πείραμα.

2. Οι σωλήνες επώστηκαν στην κατάλληλη θερμοκρασία για 2 ώρες (στάδιο προσκόλλησης των κυττάρων).
3. Έπειτα, με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας, απομακρύνθηκαν τα τεμάχια AX από τον κάθε κοντό δοκιμαστικό σωλήνα και εμβαπτίστηκαν μέσα σε άλλο κοντό δοκιμαστικό σωλήνα, που περιείχε 5 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ Ringer, για 5 λεπτά (έκπλυση για την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων).
4. Μετά τα 5 λεπτά και με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας απομακρύνθηκαν τα τεμάχια AX από τον κάθε κοντό δοκιμαστικό σωλήνα και εμβαπτίστηκαν μέσα σε άλλο κοντό δοκιμαστικό σωλήνα, που περιείχε 5 ml θρεπτικού ζωμού dTSB, του οποίου η τιμή pH και η αλατότητα είχαν ρυθμιστεί στα επιθυμητά επίπεδα.
5. Τέλος οι σωλήνες επώστηκαν για 24 ώρες στην κατάλληλη θερμοκρασία (στάδιο σχηματισμού βιο-υμενίων).

4.8 Απαρίθμηση προσκολλημένων / βιο-υμενικών κυττάρων πάνω σε τεμάχια AX

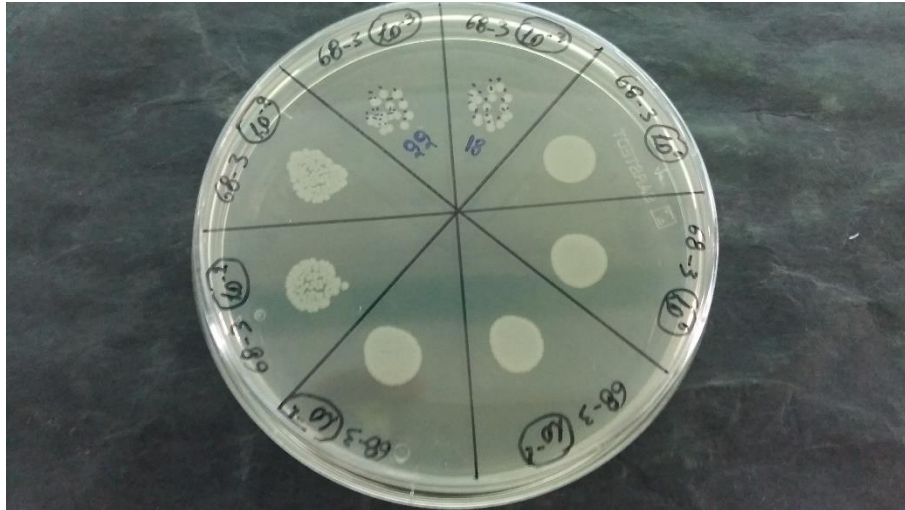
1. Στο τέλος της περιόδου των 24 ωρών και με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας απομακρύνθηκαν τα τεμάχια AX από τον κάθε κοντό δοκιμαστικό σωλήνα με το θρεπτικό ζωμό και εμβαπτίστηκαν μέσα σε άλλο κοντό δοκιμαστικό σωλήνα, που περιείχε 5 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ Ringer, για 5 λεπτά (1η έκπλυση για την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων).
2. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας, απομακρύνθηκαν τα τεμάχια AX από τον κάθε κοντό δοκιμαστικό σωλήνα με το διάλυμα $\frac{1}{4}$ Ringer και εμβαπτίστηκαν μέσα σε άλλο κοντό δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 5 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ Ringer, για 5 λεπτά (2η έκπλυση για την απομάκρυνση των ασθενώς προσκολλημένων κυττάρων).
3. Κάθε τεμάχιο AX τοποθετήθηκε μέσα σε πλαστικό σωληνάκι φυγοκέντρησης (falcon των 15 ml), που περιείχε 6 ml διαλύματος $\frac{1}{4}$ Ringer και 10 γυάλινα σφαιρίδια (διαμέτρου 3 mm).
4. Όλοι οι πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρησης με τα σφαιρίδια αναδεύτηκαν ομοιόμορφα και για 2 λεπτά, σε μέγιστη ένταση, με τη χρήση συσκευής στροβιλισμού (vortexer), προκειμένου να αποκολληθούν όσο το δυνατόν περισσότερα προσκολλημένα / βιο-υμενικά κύτταρα.

5. Έπειτα, με τη βοήθεια μηχανικής μικροπιπέτας, απομακρύνθηκε 1 ml βακτηριακού εναιωρήματος από τον κάθε σωλήνα και πραγματοποιήθηκαν 3 διαδοχικές δεκαδικές αραιώσεις. Για τις αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες με 9 ml $\frac{1}{4}$ Ringer.



Εικόνα 4.8.1 Πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρωσης με τα τεμάχια AX (μηδενική αραιώση) και γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες με 9ml $\frac{1}{4}$ Ringer (δεκαδικές αραιώσεις).

6. Ακολούθως, 20 μ l από τη μηδενική αραιώση και την κάθε δεκαδική αραιώση (2 σταγόνες των 10 μ l), μεταφέρθηκαν, με τη βοήθεια μικροπιπέτας, σε τρυβλίο TSA. Κάθε τρυβλίο TSA είχε προηγουμένως χωριστεί σε ισόποσα κομμάτια, με τη χρήση μαρκαδόρου, για την ευκολότερη τοποθέτηση και διαχώριση των σταγόνων.
7. Τα τρυβλία έπειτα επώαστηκαν στους 37 °C για 24 ώρες.
8. Για κάθε τεμάχιο AX, καταμετρήθηκαν όλες οι αποικίες και υπολογίστηκε ο πληθυσμός των προσκολλημένων/βιο-υμενικών κυττάρων (CFU/ml). Η καταμέτρηση αποικιών έγινε σε εκείνες τις κηλίδες που περιείχαν 3-30 αποικίες. Για τον υπολογισμό του πληθυσμού χρησιμοποιήθηκε ο τύπος: CFU/ml = αριθμός αποικιών x παράγοντα αραιώσης.



Εικόνα 4.8.2 Τρυλίο TSA με καταμετρημένες αποικίες των προσκολλημένων / βιο-υμενικών κυττάρων.

9. Τέλος το αποτέλεσμα μετατράπηκε από CFU/ml σε CFU/cm². Για τη μετατροπή των αποτελεσμάτων εφαρμόστηκε ο τύπος: $CFU/cm^2 = CFU/ml \times 0,9$.

4.9 Στατιστικές Αναλύσεις

Κάθε πείραμα διεξήχθη δύο φορές χρησιμοποιώντας ανεξάρτητες βακτηριακές καλλιέργειες, ενώ σε κάθε βιολογική επανάληψη συμπεριελήφθησαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις (τεμάχια AX). Για τον υπολογισμό των μέσων τιμών και των τυπικών αποκλίσεων, τα δεδομένα των κυτταρικών πληθυσμών (συγκεντρώσεων) πάνω στα τεμάχια (CFU/cm²) είχαν προηγουμένως μετατραπεί σε δεκαδικούς λογαρίθμους (Log₁₀).

Προκειμένου να αξιολογηθεί η σημαντικότητα (significance) του μαθηματικού μοντέλου εφαρμόστηκε ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA). Οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν χρησιμοποιώντας το λογισμικό πρόγραμμα JMP^R v10.0.0 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA), έχοντας ορίσει επίπεδο σημαντικότητας τουλάχιστον 95% ($\alpha = 0,05$).

Κεφάλαιο 5

Αποτελέσματα

Η πειραματική διαδικασία σχεδιάστηκε με στόχο την αξιολόγηση της επίδρασης των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (περιβαλλοντικών παραμέτρων) και συγκεκριμένα της αλατότητας (% NaCl), του pH και της θερμοκρασίας (T, °C), στο σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τη *S. enterica* πάνω σε τεμάχια AX. Για την κατασκευή του μαθηματικού μοντέλου (εξίσωσης), οι παρατηρούμενες (μετρούμενες) τιμές των προσκολλημένων/βιο-υμενικών πληθυσμών ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) που ελήφθησαν μέσω του πειράματος αναλύθηκαν μέσω πολλαπλής παλινδρόμησης (multiple regression).

Οι μαθηματικές εξισώσεις που προέκυψαν μετά την απομάκρυνση των μη σημαντικών παραγόντων ($P > 0,05$), ήταν οι ακόλουθες, για τα στελέχη DFSN_B18 και DFSN_B68, αντίστοιχα:

$$\text{Log CFU}/\text{cm}^2 = 4,54 - 1,20*\text{NaCl} - 0,30*(\text{NaCl}*\text{pH}) - 0,47*(\text{NaCl}*T) - 0,47*\text{NaCl}^2 + 0,65*\text{pH}^2 - 0,48*T^2$$

$$\text{Log CFU}/\text{cm}^2 = 4,68 - 0,78*\text{NaCl} - 0,83*T - 0,32*(\text{NaCl}*\text{pH}) - 0,5*\text{NaCl}^2$$

Στους Πίνακες 5.1 και 5.2 εμφανίζονται οι στατιστικές παράμετροι των παραπάνω εξισώσεων (συνολικά και για τον κάθε συντελεστή, αντίστοιχα), όπως αυτές προέκυψαν από την ανάλυση διακύμανσης (analysis of variance, ANOVA).

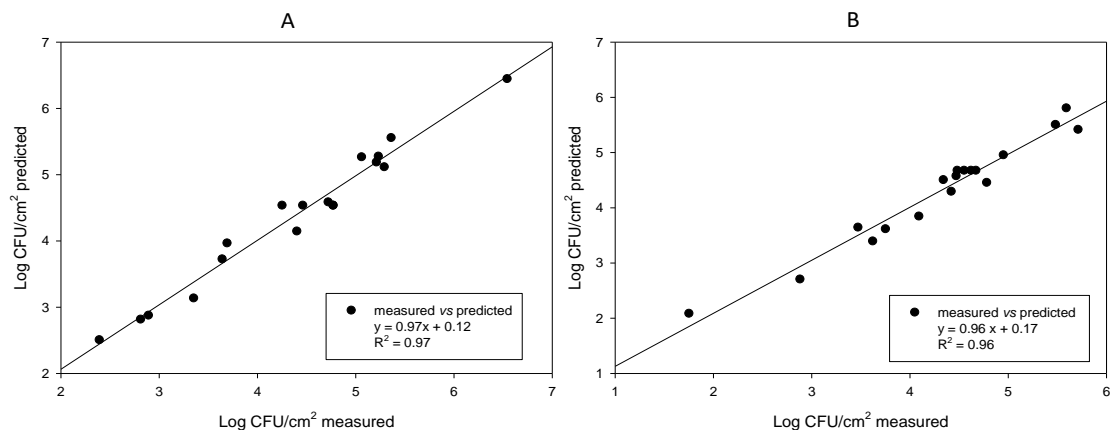
Απόκριση	Στέλεχος	Πολυωνυμική εξίσωση*	R ²	R ² _{adj}	P
Log CFU/cm ²	DFSN_B18	4,54 - 1,20*NaCl - 0,30*(NaCl*pH) - 0,47*(NaCl*T) - 0,47*NaCl ² + 0,65*pH ² - 0,48*T ²	0,97	0,94	<0,0001
	DFSN_B68	4,68 - 0,78*NaCl - 0,83*T - 0,32*(NaCl*pH) - 0,5*NaCl ²	0,96	0,91	0,0001

Πίνακας 5.1 Πολυωνυμικές εξισώσεις και στατιστικές παράμετροι που περιγράφουν την επίδραση των υπό θεώρηση ανεξάρτητων μεταβλητών στην απόκριση (σχηματισμό βιο-υμενίου, $\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη *S. enterica* DFSN_B18 και DFSN_B68, όπως υπολογίστηκαν ακολούθως της εφαρμογής ενός κεντρικού σύνθετου πειραματικού σχεδιασμού (central composite experimental design). *Αφορά τις κωδικοποιημένες τιμές των μεταβλητών.

Στέλεχος	Παράμετρος	Εκτίμηση	Διάστημα		P value	Αναλογία t
			Εμπιστοσύνης 95%			
			Χαμηλότερο	Υψηλότερο		
DFSN_B 18	Intercept	4,54 ± 0,10	4,31	4,78	<0,000 1	44,09
	NaCl	-1,20 ± 0,08	-1,39	-1,01	<0,000 1	-14,46
	NaCl*pH	-0,30 ± 0,09	-0,51	-0,08	0,012	-3,21
	NaCl*T	-0,47 ± 0,09	-0,68	-0,26	0,001	-5,07
	NaCl ²	-0,47 ± 0,16	-0,83	-0,1	0,019	-2,92
	pH ²	0,65 ± 0,16	0,28	1,02	0,004	4,08
	T ²	-0,48 ± 0,16	-0,85	-0,11	0,017	-3,02
DFSN_B 68	Intercept	4,68 ± 0,11	4,43	4,94	<0,000 1	41,85
	NaCl	-0,78 ± 0,09	-0,99	-0,57	<0,000 1	-8,67
	T	-0,83 ± 0,09	-1,03	-0,62	<0,000 1	-9,18
	NaCl*pH	-0,32 ± 0,10	-0,55	-0,09	0,013	-3,17
	NaCl ²	-0,50 ± 0,17	-0,90	-0,10	0,020	-2,91

Πίνακας 5.2 Συντελεστές παλινδρόμησης (regression coefficients) των πολυωνομικών εξισώσεων και στατιστικές παράμετροι για τον καθένα. * Η αναλογία t (t ratio) είναι η εκτίμηση (estimate) που διαιρείται με το τυπικό σφάλμα (standard error). Αναλογίες t μεγαλύτερες από 1.96 (σε απόλυτη τιμή) υποδηλώνουν ότι ο συντελεστής είναι στατιστικά σημαντικά διαφορετικός από το 0 στο επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

Τα μοντέλα αυτά εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας το συντελεστή παλινδρόμησης (R^2), τον προσαρμοσμένο συντελεστή παλινδρόμησης (R^2_{adj}), και τη στατιστική σημαντικότητα (P). Για παράδειγμα, όσον αφορά το στέλεχος DFSN_B18, οι τιμές αυτές ήταν ίσες με 0,97, 0,94, και <0,0001, αντίστοιχα. Αυτό πρακτικά σημαίνει πως το παραγόμενο μοντέλο είναι σε θέση να εξηγεί το 94% της μεταβλητότητας (variability) που παρατηρείται στα πειραματικά δεδομένα, επιβεβαιώνοντας έτσι την καταλληλότητά του να εξηγεί την επίδραση της αλατότητας, του pH και της θερμοκρασίας στο σχηματισμό βιο-υμενίου από τη *S. enterica* πάνω στα τεμάχια AX. Έτσι λοιπόν εμφανίζεται μια ικανοποιητική αντιστοίχιση (satisfactory match) μεταξύ των παρατηρούμενων (μετρούμενων) και των προβλεπόμενων αποκρίσεων (observed and predicted responses) (**Εικόνα 5.3**), με τα δύο συγκεκριμένα μοντέλα να μπορούν με αξιοπιστία να προβλέψουν εκείνες τις πειραματικές συνθήκες (περιβαλλοντικές παραμέτρους) που οδηγούν στο μέγιστο σχηματισμό βιο-υμενίου (**Πίνακας 5.4**).



Εικόνα 5.3 Παρατηρούμενες (measured) και προβλεπόμενες (predicted) τιμές σχηματισμού βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη *S. enterica* DFSN_B18 (A) και DFSN_B68 (B), πάνω στα τεμάχια AX, για τα δεκαοκτώ διακριτά σημεία του πειραματικού σχεδιασμού. Η διαγώνιος γραμμή είναι η γραμμή ταυτότητας (line of identity). Τα σημεία πάνω απ' αυτή τη γραμμή αντιπροσωπεύουν προβλέψεις που είναι μεγαλύτερες από τον παρατηρούμενο σχηματισμό βιο-υμενίου και έτσι είναι «επικίνδυνα ψευδείς» (“fail-dangerous”). Αντιστρόφως, τα σημεία που βρίσκονται κάτω από τη γραμμή ταυτότητας είναι «ασφαλείς ψευδείς» (“fail-safe”) προβλέψεις.

Στέλεχος	Μέγιστη προβλεπόμενη τιμή ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$)	Συνθήκες		
		NaCl (%)	pH	T (°C)
DFSN_B18	$6,50 \pm 0,49$	0,5	8,0	34,5
DFSN_B68	$5,84 \pm 0,51$	0,7	7,3	13

Πίνακας 5.4 Προβλεπόμενες συνθήκες (περιβαλλοντικές παράμετροι) που οδηγούν στο μέγιστο σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη *S. enterica* DFSN_B18 και DFSN_B68, πάνω στα τεμάχια AX και θεωρητικά υπολογισμένη μέγιστη τιμή γι' αυτήν την απόκριση.

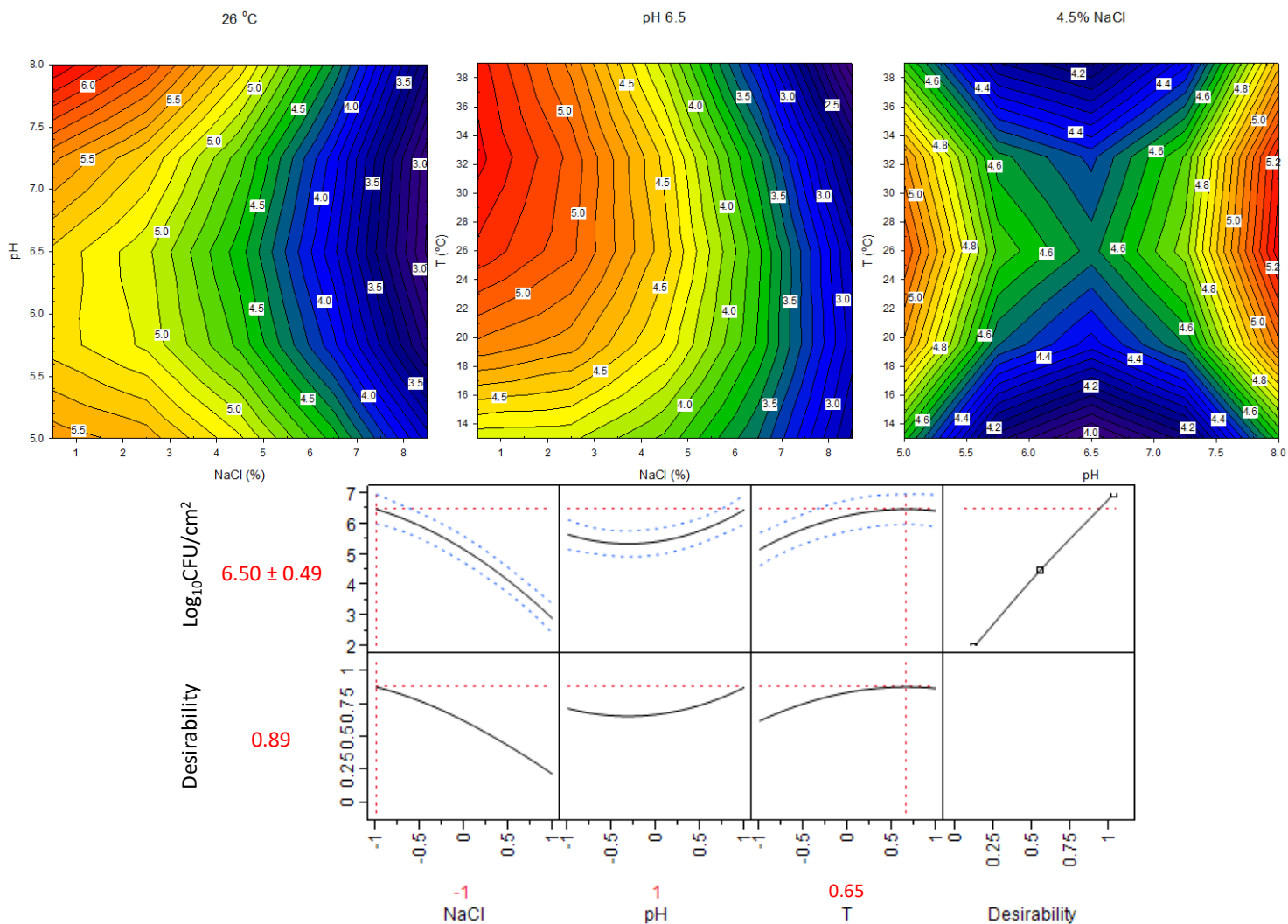
Έτσι, όσον αφορά το στέλεχος DFSN_B18, η μαθηματική εξίσωση προέβλεψε ότι η μέγιστη τιμή του σχηματισμού βιο-υμενίου πρέπει να είναι $6,50 \pm 0,49 \text{ logCFU}/\text{cm}^2$ και επιτυγχάνεται με επώαση των τεμαχίων AX στους $34,5 \text{ }^\circ\text{C}$, σε dTSB που περιέχει 0,5% NaCl και παρουσιάζει τιμή pH 8,0. Αντίστοιχα, για το στέλεχος DFSN_B68, η εξίσωση προέβλεψε ότι η μέγιστη τιμή του σχηματισμού βιο-υμενίου πρέπει να είναι $5,84 \pm 0,51 \text{ logCFU}/\text{cm}^2$ και επιτυγχάνεται με επώαση τεμαχίων AX στους $13 \text{ }^\circ\text{C}$, σε dTSB που περιέχει 0,7% NaCl και παρουσιάζει τιμή pH 7,3.

Αναλυτικά, οι τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών (X_1 , X_2 και X_3), μαζί με τις παρατηρούμενες (μετρούμενες) και προβλεπόμενες τιμές για την απόκριση (σχηματισμό βιο-υμενίου, $\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) για τα δύο στελέχη *S. enterica* DFSN_B18 και DFSN_B68, σε καθένα από τα 18 σημεία του πειραματικού σχεδιασμού ($n = 18$) δίδονται αναλυτικά στον **Πίνακα 5.5**.

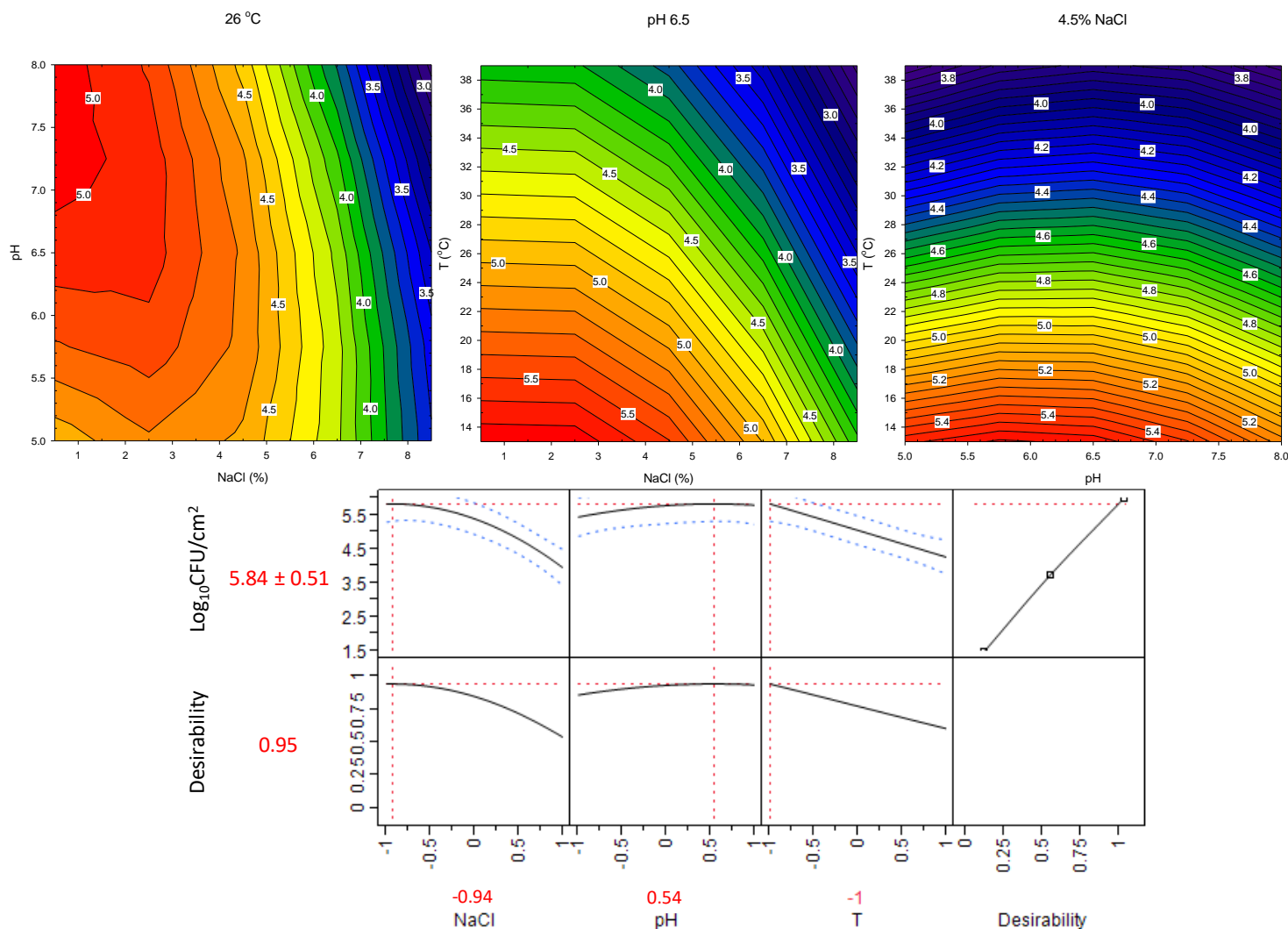
Σημείο Σχεδιασμού	Ανεξάρτητες μεταβλητές*			Απόκριση: Log CFU/cm ²			
	NaCl (X ₁)	pH (X ₂)	T (X ₃)	Στέλεχος: DFSN_B18		DFSN_B68	
				Παρατηρούμενη	Προβλεπόμενη	Παρατηρούμενη	Προβλεπόμενη
1	0,5 (-1)	5 (-1)	13 (-1)	4,72 ± 0,28	4,59 ± 0,23	5,71 ± 0,03	5,42 ± 0,25
2	0,5 (-1)	5 (-1)	39 (1)	5,36 ± 0,12	5,56 ± 0,23	3,47 ± 0,25	3,65 ± 0,25
3	0,5 (-1)	8 (1)	13 (-1)	5,21 ± 0,16	5,19 ± 0,23	5,59 ± 0,11	5,81 ± 0,25
4	0,5 (-1)	8 (1)	39 (1)	6,54 ± 0,11	6,45 ± 0,23	4,42 ± 0,09	4,30 ± 0,25
5	8,5 (1)	5 (-1)	13 (-1)	3,64 ± 0,01	3,73 ± 0,23	4,34 ± 0,06	4,51 ± 0,25
6	8,5 (1)	5 (-1)	39 (1)	2,81 ± 0,24	2,82 ± 0,23	2,88 ± 0,23	2,71 ± 0,25
7	8,5 (1)	8 (1)	13 (-1)	3,35 ± 0,14	3,14 ± 0,23	3,75 ± 0,02	3,62 ± 0,25
8	8,5 (1)	8 (1)	39 (1)	2,39 ± 0,42	2,51 ± 0,23	1,75 ± 0,17	2,09 ± 0,25
9	0,5 (-1)	6,5 (0)	26 (0)	5,23 ± 0,28	5,28 ± 0,19	4,95 ± 0,05	4,96 ± 0,20
10	8,5 (1)	6,5 (0)	26 (0)	2,89 ± 0,21	2,88 ± 0,19	3,62 ± 0,20	3,40 ± 0,20
11	4,5 (0)	5 (-1)	26 (0)	5,29 ± 0,24	5,12 ± 0,19	4,47 ± 0,10	4,58 ± 0,20
12	4,5 (0)	8 (1)	26 (0)	5,06 ± 0,07	5,27 ± 0,19	4,78 ± 0,08	4,46 ± 0,20
13	4,5 (0)	6,5 (0)	13 (-1)	3,69 ± 0,25	3,97 ± 0,19	5,48 ± 0,17	5,51 ± 0,20
14	4,5 (0)	6,5 (0)	39 (1)	4,40 ± 0,11	4,15 ± 0,19	4,09 ± 0,28	3,85 ± 0,20
15	4,5 (0)	6,5 (0)	26 (0)	4,25 ± 0,06	4,54 ± 0,10	4,62 ± 0,13	4,68 ± 0,11
16	4,5 (0)	6,5 (0)	26 (0)	4,46 ± 0,12	4,54 ± 0,10	4,48 ± 0,04	4,68 ± 0,11
17	4,5 (0)	6,5 (0)	26 (0)	4,77 ± 0,07	4,54 ± 0,10	4,55 ± 0,10	4,68 ± 0,11
18	4,5 (0)	6,5 (0)	26 (0)	4,77 ± 0,06	4,54 ± 0,10	4,67 ± 0,10	4,68 ± 0,11

Πίνακας 5.5 Παρατηρούμενες (μετρούμενες) (μέσες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις) και προβλεπόμενες τιμές (μέσες τιμές ± τυπικά σφάλματα), όσον αφορά το σχηματισμό βιο-υμενίου (Log₁₀CFU/cm²) από τα δύο στελέχη *S. enterica* DFSN_B18 και DFSN_B68, πάνω στα τεμάχια AX, για τα 18 διακριτά σημεία του πειραματικού σχεδιασμού. * Οι κωδικοποιημένες (αδιάστατες) τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών εμφανίζονται μέσα στις παρενθέσεις.

Η διακύμανση του σχηματισμού βιο-υμενίου (Log₁₀CFU/cm²) ως συνάρτηση της ταυτόχρονης διακύμανσης των ανεξάρτητων μεταβλητών της διαδικασίας (process variables) δόθηκε με τη μορφή οικοπέδων περιγράμματος (contour plots) (**Εικόνες 5.6 και 5.7**, για τα στελέχη DFSN_B18 και DFSN_B68, αντίστοιχα).



Εικόνα 5.6 Διαγράμματα contour και διάγραμμα επιπέδου επιθυμητότητας (desirability), που περιγράφουν την επίδραση των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (NaCl, pH, T) στο σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από το στέλεχος *S. enterica* DFSN_B18 πάνω στα τεμάχια AX.



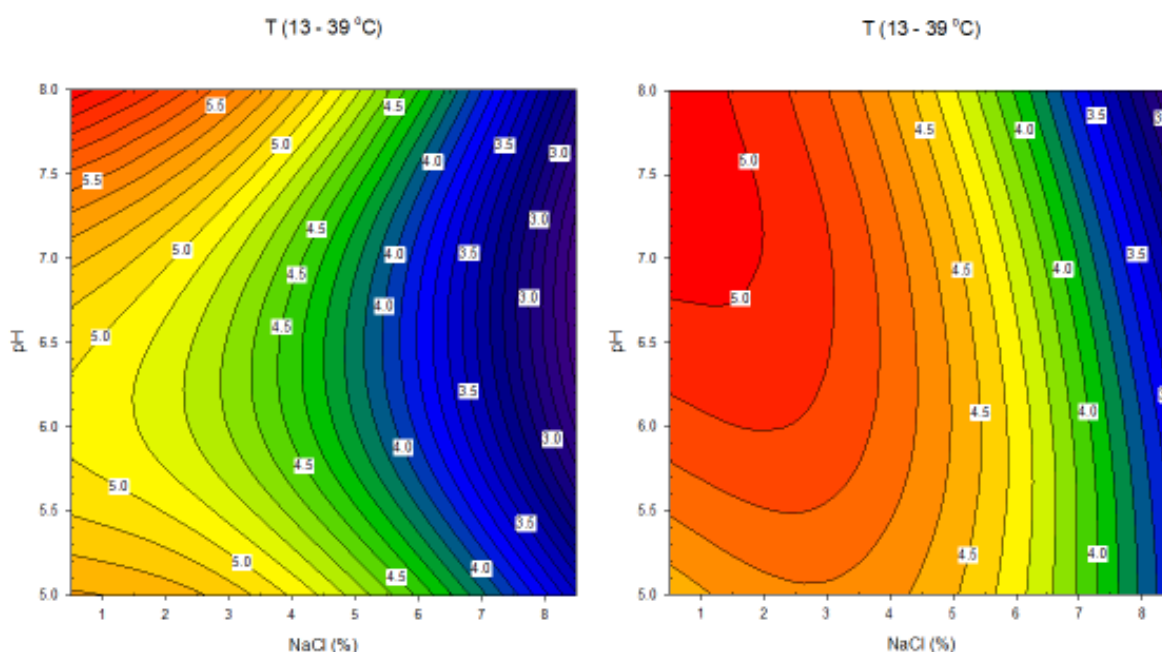
Εικόνα 5.7 Διαγράμματα contour και διάγραμμα επιπέδου επιθυμητότητας (desirability), που περιγράφουν την επίδραση των τριών ανεξάρτητων μεταβλητών (NaCl, pH, T) στο σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από το στέλεχος *S. enterica* DFSN_B68 πάνω στα τεμάχια AX.

Όσον αφορά το στέλεχος DFSN_B18 (**Εικόνα 5.6**) και το πρώτο διάγραμμα contour, το οποίο παρουσιάζει τη σχέση μεταξύ συγκέντρωσης NaCl (%) και pH στο σχηματισμό βιο-υμενίου σε σταθερή θερμοκρασία (T) στους 26 °C, η αύξηση της αλατότητας οδηγεί στη μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιο-υμενίου. Επίσης, στο ίδιο διάγραμμα παρατηρείται, ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl (<5%) και στα πιο ακραία pH (5 και 8) το συγκεκριμένο στέλεχος μπορεί να φτάσει σε πληθυσμό $\geq 5,0 \text{ logCFU}/\text{cm}^2$. Πιο συγκεκριμένα, στις χαμηλότερες NaCl συγκεντρώσεις και σε pH 8, ο σχηματισμός βιο-υμενίου μεγιστοποιείται. Αντιθέτως, σε ενδιάμεσες τιμές pH (5,7-6,5) ο σχηματισμός βιο-υμενίου ελαχιστοποιείται, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση NaCl. Το δεύτερο διάγραμμα contour απεικονίζει τη συσχέτιση της συγκέντρωσης NaCl (%) με τη T (°C) στο σχηματισμό βιο-υμενίου σε σταθερό pH ίσο με 6,5. Και σε αυτό το διάγραμμα γίνεται φανερό ότι για το στέλεχος DFSN_B18 η αύξηση της αλατότητας οδηγεί στη μείωση της ικανότητας σχηματισμού βιο-υμενίου. Ωστόσο, σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl και ταυτόχρονα σε αυξημένες θερμοκρασίες (T), το συγκεκριμένο στέλεχος είναι ικανό να παράξει βιο-υμένιο σε μεγάλο βαθμό ($\geq 5,0$

logCFU/cm²). Εν τέλει, στο τρίτο διάγραμμα contour, γίνεται ξανα αντιληπτή η ανασταλτική επίδραση των ουδέτερων τιμών pH (6 - 7) στον σχηματισμό βιο-υμενίου από το στέλεχος, ασχέτως της θερμοκρασίας.

Σχετικά με το στέλεχος DFSN_B68 (**Εικόνα 5.7**), όπως μπορεί να παρατηρηθεί στο πρώτο διάγραμμα contour, η αύξηση της αλατότητας οδηγεί σε μείωση ανάπτυξης βιο-υμενίου και σε αυτό το στέλεχος. Χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl και παράλληλα pH μεγαλύτερο από 7 φαίνεται να είναι οι ιδανικές συνθήκες ώστε το συγκεκριμένο στέλεχος να παράξει μέγιστο βιο-υμενίο ($\geq 5,0$ logCFU/cm²). Στο δεύτερο διάγραμμα contour επιβεβαιώνεται το κατασταλτικό αποτέλεσμα της αυξανόμενης περιεκτικότητας σε NaCl, αλλά και η παρόμοια ανασταλτική δράση της αύξησης της θερμοκρασίας (T). Έτσι, σε pH 6,5, ο σχηματισμός βιο-υμενίου από το συγκεκριμένο στέλεχος μεγιστοποιείται καθώς τόσο η περιεκτικότητα σε αλάτι όσο και η θερμοκρασία μειώνονται. Στο τρίτο διάγραμμα contour επιβεβαιώνεται η κατασταλτική δράση της αύξησης της θερμοκρασίας (T) στην ανάπτυξη βιο-υμενίου. Τελικά, στο ίδιο διάγραμμα γίνεται φανερό, ότι η απόκλιση του pH από τη τιμή 6,5 περίπου, ελαχιστοποιεί την ανάπτυξη βιο-υμενίου από το στέλεχος DFSN_B68.

Αξίζει να σημειωθεί, πως τα συμπεράσματα που προέκυψαν, από τα παραπάνω διαγράμματα contour για κάθε στέλεχος, δεν αλλάζουν σημαντικά κατά την κατασκευή νέων διαγραμμάτων με διαφορετικές τις σταθερές τιμές των τριών παραγόντων. Για παράδειγμα, η συνεργηστική επίδραση της συγκέντρωσης NaCl (%) και του pH στο σχηματισμό βιο-υμενίου από τα δύο στελέχη σε ολόκληρη την εξεταζόμενη κλίμακα της θερμοκρασίας (13 - 39 °C) παρουσιάζεται στην **Εικόνα 5.8**.



Εικόνα 5.8 Διαγράμματα contour που περιγράφουν τη συνεργηστική επίδραση της συγκέντρωσης NaCl (0,5-8,5%) και του pH (5-8) στο σχηματισμό βιο-υμενίου (log CFU / cm²) από τα δύο στελέχη *S. enterica*: DFSN_B18 (αριστερά) και DFSN_B68 (δεξιά), σε ολόκληρη την εξεταζόμενη κλίμακα της θερμοκρασίας (13 - 39 °C). Κάθε διάγραμμα κατασκευάστηκε λαμβάνοντας υπόψη 125 διαφορετικές προβλεπόμενες αντιδράσεις.

Τέλος, εξετάζοντας τα διαγράμματα επιπέδου επιθυμητότητας (**Εικόνα 5.6** και **Εικόνα 5.7**) για τα δύο στελέχη, καταλήγουμε σε συμπεράσματα όμοια με τα παραπάνω. Υπάρχει συμφωνία λοιπόν ανάμεσα στα διαγράμματα contour και τα διαγράμματα επιπέδου επιθυμητότητας (desirability).

Τα αποτελέσματα των έξι επαληθευτικών πειραμάτων αλλά και των προβλεπόμενων συνθηκών που οδηγούν στο μέγιστο σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) εμφανίζονται στον **Πίνακα 5.9**.

Πείραμα	Ανεξάρτητες μεταβλητές			Απόκριση: $\text{Log CFU}/\text{cm}^2$			
	NaCl (X ₁)	pH (X ₂)	T (X ₃)	Στέλεχος: DFSN_B18		DFSN_B68	
				Παρατηρούμενη	Προβλεπόμενη	Παρατηρούμενη	Προβλεπόμενη
1	1,5 (-0,75)	7,0 (0,33)	19 (-0,54)	4,54 ± 0,24	4,96 ± 0,31	4,79 ± 0,02	5,46 ± 0,33
2	3,5 (-0,25)	7,0 (0,33)	19 (-0,54)	5,58 ± 0,11	4,67 ± 0,25	4,45 ± 0,13	5,27 ± 0,28
3	7,5 (0,75)	7,0 (0,33)	19 (-0,54)	3,43 ± 0,09	3,39 ± 0,30	4,38 ± 0,24	4,14 ± 0,33
4	1,5 (-0,75)	7,0 (0,33)	33 (0,54)	6,30 ± 0,10	5,46 ± 0,30	4,61 ± 0,11	4,60 ± 0,34
5	3,5 (-0,25)	7,0 (0,33)	33 (0,54)	5,52 ± 0,25	4,92 ± 0,26	5,13 ± 0,02	4,40 ± 0,27
6	7,5 (0,75)	7,0 (0,33)	33 (0,54)	2,60 ± 0,41	3,13 ± 0,30	3,74 ± 0,07	3,26 ± 0,33
7 (max DFSN_B18)	0,5 (-1)	8,0 (1)	34,5 (0,65)	6,61 ± 0,05	6,50 ± 0,49	-	-
8 (max DFSN_B68)	0,7 (-0,94)	7,3 (0,54)	13 (-1)	-	-	6,03 ± 0,20	5,84 ± 0,51

Πίνακας 5.9 Παρατηρούμενες και προβλεπόμενες τιμές, όσον αφορά το σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη *S. enterica* DFSN_B18 και DFSN_B68, πάνω στα τεμάχια AX, για τα έξι επαληθευτικά πειράματα αλλά και τις συνθήκες μέγιστου σχηματισμού βιο-υμενίου. * Οι κωδικοποιημένες (αδιάστατες) τιμές των ανεξάρτητων μεταβλητών εμφανίζονται μέσα στις παρενθέσεις.

Βάσει αυτών των τιμών (παρατηρούμενων και προβλεπόμενων) υπολογίστηκαν οι παράγοντες bias και ακρίβειας (accuracy) των μοντέλων για το κάθε στέλεχος (**Πίνακας 5.10**). Αυτές οι τιμές είναι μέσα στα όρια προκειμένου το κάθε μοντέλο να θεωρηθεί αποδεκτό (Ross, 1996).

Παράγοντες	Στέλεχος	
	DFSN_B18	DFSN_B68
bias	0,97	0,99
accuracy	1,11	1,10

Πίνακας 5.10 Παράγοντες bias και ακρίβειας (accuracy) των μοντέλων που περιγράφουν το σχηματισμό βιο-υμενίου ($\text{Log}_{10}\text{CFU}/\text{cm}^2$) από τα δύο στελέχη *S. enterica* DFSN_B18 και DFSN_B68, πάνω στα τεμάχια AX, όπως αυτοί υπολογίστηκαν από τις παρατηρούμενες και προβλεπόμενες τιμές των επαληθευτικών πειραμάτων.

Για παράδειγμα, παράγοντας bias ίσος με 0,97 (όπως αυτός υπολογίστηκε για το μοντέλο του στελέχους DFSN_B18) υποδηλώνει πως οι παρατηρήσεις υπερέιχαν των προβλέψεων, κατά μέσο όρο, κατά 3%.

Ο παράγοντας ακρίβειας δείχνει τη διάδοση (spread) των αποτελεσμάτων (παρατηρούμενων τιμών) σε σχέση με την πρόβλεψη, δηλαδή το πόσο κοντά, κατά μέσον όρο, είναι οι προβλέψεις με τις παρατηρήσεις. Στην προκειμένη περίπτωση και όσον αφορά και πάλι το στέλεχος DFSN_B18, οι προβλέψεις βρέθηκαν, κατά μέσο όρο, στο 11% της παρατήρησης (παρατηρούμενη τιμή/1,11 – παρατηρούμενη τιμή*1,11).

Κεφάλαιο 6

Συζήτηση

Στη παρούσα πτυχιακή μελέτη, εφαρμόστηκε η μεθοδολογία απόκρισης επιφάνειας (response surface methodology) για την ποσοτική εκτίμηση του συνδυαστικού αποτελέσματος τριών κρίσιμων περιβαλλοντικών παραγόντων, που σχετίζονται με τα τρόφιμα: τη συγκέντρωση NaCl (0,5 - 8,5%), το pH (5-8) και τη T (13-39 °C), στο σχηματισμό βιο-υμενίου από δύο στελέχη *S. Enterica*, τα οποία ανήκουν σε δύο από τους συνηθέστερους οροτύπους, που συνήθως απομονώνονται από ασθενείς (Enteritidis και Typhimurium). Ο ανοξείδωτος χάλυβας (AX) AISI 304 βρίσκεται συνήθως στον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων και συνεπώς στη συγκεκριμένη μελέτη κρίθηκε σημαντικό να χρησιμοποιηθεί ως επιφάνεια προσκόλλησης και σχηματισμού βιο-υμενίου. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα εξεταζόμενα όρια για κάθε περιβαλλοντικό παράγοντα επιλέχθηκαν, σύμφωνα με προκαταρκτικά πειράματα, τα οποία έδειξαν ότι η εφαρμογή ακόμη πιο ακραίων περιβαλλοντικών τιμών θα οδηγούσε σε μη ανιχνεύσιμους πληθυσμούς βιο-υμενίου (κάτω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου επίστρωσης, 0,95 logCFU/cm²).

Υπό τις παραπάνω πειραματικές συνθήκες, οι πληθυσμοί των βιο-υμενίων βρέθηκαν: από 2,39 ± 0,42 μέχρι 6,54 ± 0,11 logCFU/cm² για το στέλεχος DFSN_B18 (Enteritidis) και από 1,75 ± 0,17 μέχρι 5,59 ± 0,11 logCFU/cm² για το στέλεχος DFSN_B68 (Typhimurium). Και για τα δύο στελέχη, ο μικρότερος βιο-υμενικός πληθυσμός παρατηρήθηκε στο όγδοο πείραμα (8,5% NaCl, pH 8 and 39 °C), ενώ το μέγιστο παρατηρούμενο βιο-υμένιο καταγράφηκε κατά την επώασή στη χαμηλότερη περιεκτικότητα NaCl (0,5%) και στο υψηλότερο pH (8). Εν τούτοις, για το στέλεχος DFSN_B18 ο μέγιστος πληθυσμός βιο-υμενίου δόθηκε από πείραμα στους 39 °C ενώ για το στέλεχος DFSN_B68 από πείραμα στους 13 °C. Οι πολυωνυμικές εξισώσεις προέβλεψαν ότι η μέγιστη τιμή του βιο-υμενίου για το DFSN_B18 επιτυγχάνεται με επώαση κουπονιών AX σε dTSB στους 34,5 °C (0,5% NaCl, pH 8) και για το στέλεχος DFSN_B68 με επώαση κουπονιών AX σε dTSB στους 13 °C (0,5% NaCl, pH 7,3), κάτι που συμφωνεί με τις πειραματικές παρατηρήσεις. Το γεγονός αυτό είναι αξιοσημείωτο, διότι αποδεικνύει ότι ακόμα και στελέχη που ανήκουν στο ίδιο είδος μπορούν να παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στη συμπεριφορά τους.

Οπότε, γίνεται αντιληπτό ότι η θερμοκρασία (T) είναι ένας από τους πιο σημαντικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες για το σχηματισμό βιο-υμενίου από το *S. Enterica*, όπως και σε πολλά άλλα μικροβιακά είδη. Σε προηγούμενες μελέτες έχει αποδειχθεί η ευνοϊκή επίδραση της μείωσης της θερμοκρασίας, από τη βέλτιστη τιμή πλαγκτονικής ανάπτυξης (περίπου 37 °C) σε θερμοκρασίες δωματίου (περίπου 20-30 °C) στην ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου από τη *Salmonella* (Giaouris et al., 2005; Lamas et al., 2016). Στην έρευνα των Yang et al. (2016) μελετήθηκε ο σχηματισμός βιο-υμενίου από το *Salmonella* Enteritidis στους 4 και 25 °C. Βρέθηκε ότι το *S. Enteritidis* σχημάτισε σημαντικά πυκνότερο βιο-υμένιο στους 25 °C σε σύγκριση με εκείνο που σχηματίστηκε στους 4 °C. Μια άλλη μελέτη των Nguyen et al. (2014) για το σχηματισμό βιο-υμενίου από το *Salmonella* Typhimurium έδειξε, ότι η αύξηση της θερμοκρασίας (από 28 σε 37 °C) επηρέασε θετικά την ταχύτητα της αρχικής

κυτταρικής προσκόλλησης (πρώτες 14 ώρες), αν και οι μέγιστοι αριθμοί προσκολλημένων κυττάρων (μετά από 24 ώρες) δεν ήταν διαφορετικοί μεταξύ αυτών των συνθηκών. Γενικότερα, οι [Marion-Ferey et al. \(2003\)](#) ανέφεραν ότι η υψηλή θερμοκρασία δεν αύξησε την αποτελεσματικότητα της απομάκρυνσης βιο-υμενίου από *Salmonella*.

Στη συγκεκριμένη πτυχιακή μελέτη και τα δύο στελέχη σχημάτισαν μέγιστο βιο-υμένιο στις πιο αλκαλικές τιμές pH. Ειδικά, οι βέλτιστες προβλεπόμενες τιμές pH για τη παραγωγή βιο-υμενίου ήταν 8 και 7,3, για τα στελέχη DFSN_B18 και DFSN_68, αντίστοιχα. Μελέτη των [Wang et al. \(2016\)](#) για την επίδραση έντονων όξινων συνθηκών (acid stress) στο βιο-υμένιο του *Salmonella* Enteritidis σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα έδειξε παρόμοια αποτελέσματα. Σύμφωνα με αυτή τη μελέτη, η εφαρμογή βραχυπρόθεσμων αδύναμων όξινων συνθηκών (pH 5,5-6) θα μπορούσε να βοηθήσει στη προσκόλληση των κυττάρων στην επιφάνεια, ενώ η εφαρμογή μακροπρόθεσμων αδύναμων όξινων συνθηκών ή έντονων όξινων συνθηκών ανέστειλε το σχηματισμό βιο-υμενίου. Σε μία άλλη εργασία, που ασχολήθηκε με τη μοντελοποίηση του σχηματισμού βιο-υμενίου από το *S. Newport*, το οποίο απομονώθηκε από έντερο βοδινού, σε μικροπλακίδια πολυστυρενίου με TSB στους 37°C για 48 ώρες και σε διάφορους συνδυασμούς pH (3,3-7,8) και ενεργότητας νερού (a_w , 0,894-0,997), οι προβλεπόμενες τιμές για pH_{min} , pH_{opt} , pH_{max} ήταν 3,6, 6,0 και 9,7, αντίστοιχα ([Dimakopoulou-Papazoglou et al., 2016](#)). Αντίθετα, οι [Yang et al. \(2016\)](#) παρατήρησαν ότι παρόλο που το pH επηρέασε σημαντικά ($P < 0,05$) τον πληθυσμό των κυττάρων σε ορισμένες περιπτώσεις, δεν βρέθηκε κάποιο σταθερό μοτίβο στον τρόπο που επιδρά στο σχηματισμό του βιο-υμενίου από το *S. Enteritidis*. Επιπρόσθετα, οι [O'Leary et al. \(2015\)](#) εκτίμησαν, ότι εκτός από τα γονίδια που σχετίζονται με την παραγωγή βιο-υμενίου σε ουδέτερο pH, υπάρχουν, για το *S. Typhimurium*, γονίδια των οποίων τα πρωτεϊνικά παράγωγα βοηθούν ειδικά στην παραγωγή βιο-υμενίου σε όξινα περιβάλλοντα.

Για τα στελέχη DFSN_18 και DFSN_68 βρέθηκε, ότι η αύξηση της αλατότητας οδηγεί σε δραστική μείωση του σχηματιζόμενου βιο-υμενίου, ανεξάρτητα του pH και της θερμοκρασίας (T). Ως εκ τούτου, οι βέλτιστες προβλεπόμενες συγκεντρώσεις NaCl ήταν 0,5 και 0,7% για κάθε στέλεχος, αντίστοιχα. Ομοίως, όταν ερευνήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου από 60 στελέχη *S. enterica* σε μικροπλακίδια πολυστυρενίου, τα οποία επώαστηκαν για 48 ώρες σε TSB με διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl (0,5-8,0%), παρατηρήθηκε, για το 48,3% των στελεχών, μέγιστη παραγωγή βιο-υμενίου στη μικρότερη συγκέντρωση (0,5%) NaCl ([Lianou et al., 2012](#)). Επιπλέον, οι [Dimakopoulou-Papazoglou et al. \(2016\)](#), στην έρευνα που αναφέρθηκε παραπάνω, διαπίστωσαν ότι η ενεργότητα νερού (a_w) για την βέλτιστη ανάπτυξη βιο-υμενίου από το *S. Newport* ήταν 0,994. Στη συγκεκριμένη έρευνα σημειώθηκε ότι a_w ίση με 0,997 αντιστοιχεί σε 0,5% NaCl, ενώ a_w ίση με 0,987 αντιστοιχεί σε 2,5% NaCl. Συνεπώς, η συγκέντρωση NaCl για το μέγιστο σχηματισμό βιο-υμενίου είναι κοντά στο 0,5%.

Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει πως η *S. enterica* είναι ικανή να σχηματίζει περισσότερο βιο-υμένιο κάτω από συνθήκες φτωχές σε θρεπτικά συστατικά ([Kostaki et al., 2012](#); [Speranza et al., 2011](#); [Stepanović et al., 2004](#)). Για τον παραπάνω λόγο αλλά και με σκοπό την προσομοίωση των περιορισμένων σε θρεπτικές ουσίες

συνθηκών, που αντιμετωπίζει το βακτήριο στα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, σε αυτή τη μελέτη η ανάπτυξη βιο-υμενίου έγινε με επώαση των κουπονιών AX σε 1/10 dTSB αντί για TSB. Έτσι, τα αποτελέσματα βρέθηκαν σύμφωνα με εκείνα της έρευνας των [Bhowmick et al. \(2011\)](#) όπου ο σχηματισμός βιο-υμενίου από *S. Weltevreden* σε 1/100 dTSB ήταν σημαντικά μεγαλύτερος συγκριτικά με αυτόν σε TSB. Το ίδιο απέδειξαν και οι [Blana et al. \(2017\)](#) σε μελέτη για το *S. Typhimurium*, το οποίο παρουσίασε μικρότερη ικανότητα παραγωγής βιο-υμενίου σε περιβάλλοντα υψηλής θρεπτικής αξίας σε αντιδιαστολή με εκείνα χαμηλής αξίας.

Η μεθοδολογία απόκρισης επιφάνειας (RSM) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως τα τελευταία χρόνια σε πολλές έρευνες, όπως στην ανάπτυξη βιο-υμενίου από το *Bacillus cereus* σε ψυκτικές δεξαμενές από ανοξείδωτο χάλυβα ([Kumari et al., 2014](#)), στη πρόβλεψη της προσκόλλησης του *Escherichia coli* O157:H7 και τη δυνατότητα του να σχηματίζει βιο-υμένιο σε πολλές επιφάνειες ([Santos Mendonça et al., 2012](#)) και στη συνεργική απενεργοποίηση του βιο-υμενίου αναερόβιας αποχέτευσης από ελεύθερο νιτρώδες οξύ και υπεροξείδιο του υδρογόνου ([Jiang et al., 2013](#)). Όσον αφορά στη *S. Enterica* η RSM χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση και τη πρόβλεψη του σχηματισμού βιο-υμενίου από το *S. Virchow* σε σχέση με το pH και τη θερμοκρασία ([Ariafar et al., 2016](#)) και το *S. Infantis* σε σχέση με το pH, τη θερμοκρασία και τη σύσταση του μέσου ([Speranza et al., 2011](#)). Ωστόσο, από όσο είναι γνωστό, η μεθοδολογία απόκρισης επιφάνειας (RSM) δεν έχει εφαρμοστεί ποτέ για την ποσοτική εκτίμηση του συνδυαστικού αποτελέσματος περιβαλλοντικών παραγόντων (που σχετίζονται με τα τρόφιμα) στο σχηματισμό βιο-υμενίου από τους οροτύπους *Enteritidis* και/ή *Typhimurium*.

Εν κατακλείδι, τα δύο πολυωνυμικά μοντέλα, που παράχθηκαν στη συγκεκριμένη πτυχιακή, μπορούν να παρέχουν περιεκτικές και ακριβείς πληροφορίες σχετικά με τη συνδυαστική επίδραση βασικών για τα τρόφιμα παραγόντων (NaCl, pH και T) στην ανάπτυξη βιο-υμενίου από ένα σημαντικό τροφιμογενές παθογόνο, με σκοπό τον περιορισμό της επίμονης παρουσίας του στη βιομηχανία τροφίμων. Και για τα δύο στελέχη η αύξηση της περιεκτικότητας σε NaCl περιόρισε την ανάπτυξη του βιο-υμενίου. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις NaCl (<4%), ο σχηματισμός βιο-υμενίου ευνοήθηκε με την αύξηση του pH. Ωστόσο, υπό συνθήκες μη ανασταλτικών συγκεντρώσεων NaCl, περιορισμένων θρεπτικών συστατικών και μόλις σε περίοδο 24 ωρών σε θερμοκρασία 20-25 °C, και τα δύο στελέχη ήταν ικανά να φτάσουν σε πληθυσμό >5,0 logCFU/cm². Αυτό είναι ένα ανησυχητικό γεγονός, που πρέπει σίγουρα να εξεταστεί σοβαρά από τις βιομηχανίες τροφίμων δεδομένου, ότι η θερμοκρασία σε πολλές από αυτές κυμαίνεται στο εύρος αυτό (20-25 °C). Τα αποτελέσματα της παρούσας πτυχιακής μελέτης είχαν πολλά κοινά σημεία με άλλες έρευνες που αναφέρθηκαν παραπάνω. Όμως δεν υπήξε ταύτιση, ίσως λόγω διαφορετικού πειραματικού πρωτοκόλλου ή εξεταζόμενων στελεχών/οροτύπων. Τέλος, θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστεί σε μελλοντική έρευνα, η πιθανή αλληλεπίδραση αυτών των στελεχών στο σχηματισμό βιο-υμενίου, ή ακόμα και η αλληλεπίδραση τους με άλλους μικροοργανισμούς.

Βιβλιογραφία

Abdallah, F. B., Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., & Bakhrouf, A. (2009). Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 394-398.

Achtman et al. (2012). Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica*. *PLoS Pathog* 8(6), p. e 1002776.

Adetunji, V. O., & Isola, T. O. (2011). Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp on wood, steel and glass surfaces. *Global Veterinarian*, 6(1), 6-10.

Alliance for Food and Farming. (2010). Analysis of produce related foodborne illness outbreaks. Retrieved 21.11.12, from http://www.foodandfarming.info/docs/386Produce_Analysis_2010_Final.pdf.

Anonymous. (2011). Raw milk cheddar recalled due to *Listeria* concerns. Food Safety News, Retrieved 26.04.12, from <http://www.foodsafetynews.com/2011/11/rawmilk-cheddar-recalled-due-to-listeria-concerns/>.

Anwar, H., Dasgupta, M. K., & Costerton, J. W. (1990). Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34(11), 2043-2046.

Ariafar, M. N., Buzrul, S., & Akçelik, N. (2016). Modeling and predicting the biofilm formation of *Salmonella* Virchow with respect to temperature and pH. *Acta Biologica Hungarica*, 67(1), 99-111.

Arnold, J. W., Boothe, D. H., Suzuki, O., & Bailey, G. W. (2004). Multiple imaging techniques demonstrate the manipulation of. *Journal of Microscopy*, 216(3), 215-221.

Augustin, M., Ali-Vehmas, T., & Atroschi, F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical sciences: a Publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques*, 7(1), 55-64.

Bhowmick, P. P., Devegowda, D., Ruwandepika, H. A., Fuchs, T. M., Srikumar, S., Karunasagar, I., & Karunasagar, I. (2011). *gcpA* (*stm1987*) is critical for cellulose production and biofilm formation on polystyrene surface by *Salmonella enterica* serovar Weltevreden in both high and low nutrient medium. *Microbial Pathogenesis*, 50(2), 114-122.

Blana V., Georgomanou A., Giaouris E. (2017). Assessing biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on abiotic substrata in the presence of quorum sensing signals produced by *Hafnia alvei*. *Food Control*, 80, 83-91.

- Borucki, M. K., Peppin, J. D., & White, D. (2003). Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7336-7342.
- Brooks, J. D., & Flint, S. H. (2008). Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *International Journal of Food Science & Technology*, 43(12), 2163-2176.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006). Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(6), 3916-3923.
- Caron, C. (2011). CDC: Cantaloupe *Listeria* outbreak deadliest in a decade - ABC News. Retrieved 21.11.12, from <http://abcnews.go.com/Health/cdc-cantaloupelisteria-outbreak-deadliest-decade/story?id=14622507#.UKx7K-SE3pw>.
- Carpentier, B., & Chassaing, D. (2004). Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. *International Journal of Food Microbiology*, 97(2), 111-122.
- Castonguay, M.-H., van der Schaaf, S., Koester, W., Krooneman, J., van der Meer, W., Harmsen, H., et al. (2006). Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence proficient bacteria. *Research in Microbiology*, 157(5), 471-478.
- Chae, M. S., & Schraft, H. (2000). Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 62(1-2), 103-111.
- Chan, K. F., Tran, H. L., Kanenaka, R. Y., & Kathariou, S. (2001). Survival of clinical and poultry-derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4 °C). *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 4186-4191.
- Chaturongkasumrit, Y., Takahashi, H., Keeratipibul, S., Kuda, T., & Kimura, B. (2011). The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. *Food Control*, 22(12), 1893-1899, Elsevier Ltd.
- Chia, T. W. R., Goulter, R. M., McMeekin, T., Dykes, G. A., & Fegan, N. (2009). Attachment of different *Salmonella* serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. *Food Microbiology*, 26(8), 853-859, Elsevier Ltd.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2006). A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. *LWT - Food Science and Technology*, 39(1), 11-19.

- Costerton, J. W., & Stewart, P. S. (2001). Battling biofilms. *Scientific American*, 285(1), 74-81.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Debeer, D., Caldwell, D., & Korber, D. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2137-2142.
- Da Silva N, et al. (ed.) (2013) Microbiological examination methods of food and water, pp. 217–248. Leiden, The Netherlands: CRC Press/Balkema.
- Davey, M. E., & O’Toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 64(4), 847-867.
- Davis, D. Monroe, D “Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms” *PLoS Biol*, Vol. 5, issue 11.
- Deming, M. S., Tauxe, R. V., Blake, P. A., Dixon, S. E., Fowler, B. S., Jones, T. S., et al. (1987). *Campylobacter enteritis* at a university: transmission from eating chicken and from cats. *American Journal of Epidemiology*, 126(3), 526-534, Oxford University Press.
- Di Pinto, A., Novello, L., Montemurro, F., Bonerba, E., & Tantillo, G. (2010). Occurrence of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods from supermarkets in Southern Italy. *The New Microbiologica*, 33(3), 249-252.
- Dimakopoulou-Papazoglou, D., Lianou, A., & Koutsoumanis, K. P. (2016). Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. *Food Microbiology*, 53(Pt B), 76-81.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890, Centers for Disease Control and Prevention.
- Dourou, D., Beauchamp, C. S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K. E., Smith, G. C., et al. (2011). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *International Journal of Food Microbiology*, 149(3), 262-268, Elsevier B.V.
- Dykes, G. A., Sampathkumar, B., & Korber, D. R. (2003). Planktonic or biofilm growth affects survival, hydrophobicity and protein expression patterns of a pathogenic *Campylobacter jejuni* strain. *International Journal of Food Microbiology*, 89(1), 1-10.
- EFSA and ECDC (2014) The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal* 12(2): 3547. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>.
- Enos-Berlage, J. L., Guvener, Z. T., Keenan, C. E., & McCarter, L. L. (2005). Genetic determinants of biofilm development of opaque and translucent *Vibrio parahaemolyticus*. *Molecular Microbiology*, 55(4), 1160-1182.
- Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.

FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization] (2008). Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs: Meeting Report. *Rome: Microbiological Risk Assessment Series No. 14*.

Faruque, S. M., Biswas, K., Udden, S. M. N., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., Nair, G. B., et al. (2006). Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(16), 6350-6355.

Ferreira, C., Pereira, A. M., & Melo, L. F. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Applied Microbiology*, 845-854.

Flemming, H.-C., & Schaule, G. (1988). Biofouling on membranes e a microbiological approach. *Desalination*, 70(1-3), 95-119.

Flint, S. H., Bremer, P. J., & Brooks, J. D. (1997). Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 11(1), 81-97.

Fransisca, L., Zhou, B., Park, H., & Feng, H. (2011). The effect of calcinated calcium and chlorine treatments on *Escherichia coli* O157:H7 87-23 population reduction in radish sprouts. *Journal of Food Science*, 76(6), 404-412.

Gandhi, M., Golding, S., Yaron, S., & Matthews, K. R. (2001). Use of green fluorescent protein expressing *Salmonella stanley* to investigate survival, spatial location, and control on alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection*, 64(12), 1891-1898.

Garrido, V., Vitas, A. I., & García-Jalón, I. (2009). Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: prevalence by brands and retail establishments.

Gerke, C., Kraft, A., Süssmuth, R., Schweitzer, O., & Götz, F. (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(29), 18586-18593.

Gerstel, U., & Römling, U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate *agfD* promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environmental Microbiology*, 3(10), 638-648.

Giaouris, E., Chorianopoulos, N., & Nychas, G. J. (2005). Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2149-2154.

Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 121-137.

Guðbjörnsdóttir, B., Einarsson, H., & Thorkelsson, G. (2005). Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1), 55-61.

- Habimana, O., Heir, E., Langsrud, S., Asli, A. W., & Møretrø, T. (2010). Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(13), 4557-4559.
- Haeusler GM and Curtis N (2013). Non-typhoidal Salmonella in children: microbiology, epidemiology and treatment. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 764: 13–26.
- Han, Y., Sherman, D. M., Linton, R. H., Nielsen, S. S., & Nelson, P. E. (2000). The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to green pepper surfaces. *Food Microbiology*, 17(5), 521-533.
- Hanning, I., Jarquin, R., & Slavik, M. (2008). *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 105(4), 1199-1208.
- Harris, N. V., Weiss, N. S., & Nolan, C. M. (1986). The role of poultry and meats in the etiology of *Campylobacter jejuni/coli* Enteritis. *American Journal of Public Health*, 76(4), 407e411.
- Helke, D. M., & Wong, A. C. L. (1994). Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *Journal of Food Protection*, 57(6), 963-968, International Association for Food Protection.
- Helke, D. M., Somers, E. B., & Wong, A. C. L. (1993). Attachment of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* to stainless steel and buna-N in the presence of milk and individual milk components. *Journal of Food Protection*, 56(6), 479-484.
- Hopkins, R. S., & Scott, A. S. (1983). Handling raw chicken as a source for sporadic *Campylobacter jejuni* infections. *The Journal of Infectious Diseases*, 148(4), 770.
- Howell, D. & Behrends, B. (2006). A review of surface roughness in antifouling coatings illustrating the importance of cutoff length. *Biofouling*, 22(5-6), 401-410.
- International Organisation for Standardization (2002) ISO 6579:2002 Microbiology of food and animal feeding stuffs – horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Geneva, Switzerland: International Organisation for Standardization.
- Jessen, B., & Lammert, L. (2003). Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 265-269.
- Koutzayiotis, C. (1992). Bacterial biofilms in milk pipelines. *African Journal of Dairy Science*, 24, 19-22.
- Jiang, G., Yuan, Z. (2013). Synergistic inactivation of anaerobic wastewater biofilm by free nitrous acid and hydrogen peroxide. *Journal of Hazardous Materials* 250-251, 91-98.
- Joseph, L. A., & Wright, A. C. (2004). Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 889-893.

- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., & Fine, D. H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous b-hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4693-4698.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.
- Karunasagar, I., Ota, S. K., & Karunasagar, I. (1996). Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces. *Aquaculture*, 140(3), 241-245.
- Keskinen, L. A., Burke, A., & Annous, B. A. (2009). Efficacy of chlorine, acidic electrolyzed water and aqueous chlorine dioxide solutions to decontaminate *Escherichia coli* O157:H7 from lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 132(2-3), 134-140, Elsevier B.V.
- Kim, H., Ryu, J.-H., & Beuchat, L. R. (2006). Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(9), 5846-5856.
- Kim, S.-H., & Wei, C.-I. (2009). Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar typhimurium DT104 on food contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 72(9), 1841-1847.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., et al. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511-1524.
- Klayman, B. J., Volden, P. A., Stewart, P. S., & Camper, A. K. (2009). *Escherichia coli* O157:H7 requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell. *Environmental Science & Technology*, 43(6), 2105-2111.
- Kogure, K., Ikemoto, E., & Morisaki, H. (1998). Attachment of *Vibrio alginolyticus* to glass surfaces is dependent on swimming speed. *Journal of Bacteriology*, 180(4), 932-937.
- 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*) 475 conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2586-2595.
- Kothari A, Pruthi A, and Chugh TD (2008). The burden of enteric fever. *Journal of Infection in Developing Countries* 2(4): 253–259.
- 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.
- Kumari, S., Sarkar, P.K., (2014). *In vitro* model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control*, 36(1), 153-158.

- Lamas, A., Fernandez-No, I. C., Miranda, J. M., Vázquez, B., Cepeda, A., & Franco, C. M. (2016). Biofilm formation and morphotypes of *Salmonella enterica subsp. arizonae* differs from those of other *Salmonella enterica* subspecies in isolates from poultry houses. *Journal of Food Protection*, 79(7), 1127-1134.
- Latorre, A. A., Van Kessel, J. S., Karns, J. S., Zurakowski, M. J., Pradhan, A. K., Boor, K. J., et al. (2010). Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. *Journal of Dairy Science*, 93(6), 2792-2802, Elsevier.
- Lee MB and Greig JD (2013). A review of nosocomial *Salmonella* outbreaks: infection control interventions found effective. *Public Health* 127(3): 199–206.
- Lianou, A., & Koutsoumanis, K. P. (2012). Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 171-178.
- Liao, C.-H., & Cooke, P. H. (2001). Response to trisodium phosphate treatment of *Salmonella* Chester attached to fresh-cut green pepper slices. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(1), 25-32.
- Löfström C., Hansen T., Maurischat S., Malorny B., (2016). *Salmonella*: Salmonellosis. *Encyclopedia of Food and Health* 701-705, Elsevier Ltd.
- López-Gálvez, F., Gil, M. I., Truchado, P., Selma, M. V., & Allende, A. (2010). Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during prewashing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. *Food Microbiology*, 27(2), 199-204.
- Mafu, A. A., Roy, D., Goulet, J., & Magny, P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene, and rubber surfaces after short contact times. *Journal of Food Protection*, 53(9), 742-746.
- Mariani, C., Oulahal, N., Chamba, J.-F., Dubois-Brissonnet, F., Notz, E., & Briandet, R. (2011). Inhibition of *Listeria monocytogenes* by resident biofilms present on wooden shelves used for cheese ripening. *Food Control*, 22(8), 1357-1362, Elsevier Ltd.
- Marin, C., Hernandiz, A., & Lainez, M. (2009). Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants. *Poultry Science*, 88(2), 424-431.
- Marion-Ferey K., Pasmore M., Stoodley P., Wilson S., Husson G.P., Costerton J.W. (2003). Biofilm removal from silicone tubing: An assessment of the efficacy of dialysis machine decontamination procedures using an in vitro model. *Journal of Hospital Infection*, 53 (1) (2003), pp. 64-71.
- Marouani-Gadri, N., Augier, G., & Carpentier, B. (2009). Characterization of bacterial strains isolated from a beef-processing plant following cleaning and disinfection influence of isolated strains on biofilm formation by Sakaï and EDL 933 *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 133(1-2), 62-67, Elsevier B.V.

- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(6), 327-356.
- McLandsborough, L., Rodriguez, A., Pérez-Conesa, D., & Weiss, J. (2006). Biofilms: at the interface between biophysics and microbiology. *Food Biophysics*, 1(2), 94-114.
- 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.
- Momba, M. N. B., & Binda, M. A. (2002). Combining chlorination and chloramination processes for the inhibition of biofilm formation in drinking surface water system models. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4), 641-648.
- Momba, M. N. B., & Makala, N. (2004). Comparing the effect of various pipe materials on biofilm formation in chlorinated and combined chlorine-chloraminated water systems. *WaterSA*, 30(2), 175-182.
- Møretrø, T., Hermansen, L., Holck, A. L., Sidhu, M. S., Rudi, K., & Langsrud, S. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion among *Staphylococci* from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5648-5655.
- Morris JG and Potter M (eds.) (2013). Foodborne infections and intoxications. London, UK: Elsevier Science.
- Neuman, W. (2011). *Listeria* outbreak traced to Colorado cantaloupe packing shed - NYTimes. Retrieved 21.11.2012, from <http://www.nytimes.com/2011/10/20/business/listeria-outbreak-traced-to-colorado-cantaloupe-packing-shed.html?pagewanted=all>.
- Nguyen, H. D. N., Yang, Y. S., & Yuk, H. G. (2014). Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 383-388.
- Nilsson, R. E., Ross, T., & Bowman, J. P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 14-24, Elsevier B.V.
- O' Leary, D., McCabe, E., McCusker, M.P., Martnis, M., Fanning, S., Duffy, G. (2015). Acid environments affect biofilm formation and gene expression in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 7-16.
- O'Toole, G. A., & Kaplan, H. B. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 49-79.
- Kaplan, J. B., Rangunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(7), 2633-2636.

- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295-304.
- Ölmez, H., & Temur, S. D. (2010). Effects of different sanitizing treatments on biofilms and attachment of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on green leaf lettuce. *LWT - Food Science and Technology*, 43(6), 964-970, Elsevier Ltd.
- Osaili, T. M., Alaboudi, A. R., & Nesiar, E. A. (2011). Prevalence of *Listeria* spp. and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from raw chicken and ready-to-eat chicken products in Jordan. *Food Control*, 22(3-4), 586-590, Elsevier Ltd.
- Park, S. H., Jarquin, R., Hanning, I., Almeida, G., & Ricke, S. C. (2011). Detection of *Salmonella* spp. survival and virulence in poultry feed by targeting the *hilA* gene. *Journal of Applied Microbiology*, 111(2), 426-432.
- Parsek, M. R., & Singh, P. K. (2003). Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Review of Microbiology*, 57, 677-701.
- Patel, J., & Sharma, M. (2010). Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1-2), 41-47, Elsevier B.V.
- Pesci, E. C., Milbank, J. B., Pearson, J. P., McKnight, S., Kende, A. S., Greenberg, E. P., et al. (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.
- Pillai, S. K., Sakoulas, G., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C., Murray, B. E., & Inouye, R. T. (2004). Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Infectious Diseases*, 190(5), 967-970.
- Popoff MY and Le Minor LE (2005) *Salmonella*. In: Garrity GM, et al. (ed.) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer.
- Rajkowski, K. T. (2009). Biofilms in fish processing. In P. M. Fratamico, B. A. Annous & N. W. Gunther (Eds.), *Biofilms in the food and beverage industries* (pp. 499-516). Woodhead Publishing.
- Ramesh, N., Joseph, S. W., Carr, L. E., Douglass, L. W., & Wheaton, F. W. (2002). Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poultry Science*, 81(6), 904-910.
- Ronner, A. B., & Wong, A. C. L. (1993). Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and buna-n rubber. *Journal of Food Protection*, 56(9), 750-758.
- Ross, T., 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Bacteriology* 81, 501-508.
- Salmonella in domestic animals*. Barrow PA and Methner U (eds.) (2013) Wallingford, UK: CABI Publishing.

Salmonella: from genome to function. Porwollik S (ed.) (2011) Poole, UK: *Caister Academic Press*.

Salo, S., Ehavald, H., Raaska, L., Vokk, R., & Wirtanen, G. (2006). Microbial surveys in Estonian dairies. *LWT - Food Science and Technology*, 39(5), 460-471.

Sanders, S. Q., Boothe, D. H., Frank, J. F., & Arnold, J.W. (2007). Culture and detection of *Campylobacter jejuni* within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 70(6), 1379-1385.

Santos Mendonça, R.C., Morelli, A.M.F., Pereira, J.A.M., De Carvalho, M.M., De Souza, N.L. (2012). Prediction of *Escherichia coli* O157:H7 adhesion and potential to form biofilm under experimental conditions. *Food Control*, 23(2), 389-396.

Sapers, G. M. (2001). Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology*, 39(4), 305-311.

Sapers, G. M., & Sites, J. E. (2003). Efficacy of 1% hydrogen peroxide wash in decontaminating apples. *Journal of Food Science*, 68(5), 1793-1797.

Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Bacteriology*, 184(4), 1140-1154.

Scardino, A. J., Harvey, E., & De Nys, R. (2006). Testing attachment point theory: diatom attachment on microtextured polyimide biomimics. *Biofouling*, 22(1-2), 55-60.

September, S. M., Els, F. A., Venter, S. N., & Brözel, V. S. (2007). Prevalence of bacterial pathogens in biofilms of drinking water distribution systems. *Journal of Water and Health*, 05(2), 219-227.

Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. *Food Microbiology*, 19, 627-636.

Shikongo-Nambabi, M., Kachigunda, B., & Venter, S. N. (2010). Evaluation of oxidising disinfectants to control *Vibrio* biofilms in treated seawater used for fish processing. *WaterSA*, 36(3), 215-220.

Silagyi, K., Kim, S.-H., Lo, Y. M., & Wei, C.-i (2009). Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiology*, 26(5), 514-519, Elsevier Ltd.

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.

Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17, 439-447.

- Skerker, J. M., & Berg, H. C. (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), 6901-6904.
- Sofos, J. N., & Geornaras, I. (2010). Overview of current meat hygiene and safety risks and summary of recent studies on biofilms, and control of *Escherichia coli* O157:H7 in non-intact, and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat, meat products. *Meat Science*, 86(1), 2-14, Elsevier Ltd.
- Sokunrotanak Srey, Iqbal Kabir Jahid, Sang-Do Ha* (2013). Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585, Elsevier Ltd.
- Speranza, B., Corbo, M. R., & Sinigaglia, M. (2011). Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *Journal of Food Science*, 76(1), 12-16.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Mijac, V., & Svabic-Vlahovic, M. (2003). Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*, 20, 339-343.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., & Svabic-Vlahovic, M. (2004). Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology*, 38(5), 428-432.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(3), 199-210.
- Stoodley, P., Cargo, R., Rupp, C. J., Wilson, S., & Klapper, I. (2002). Biofilm material properties as related to shear-induced deformation and detachment phenomena. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29(6), 361-367.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187-209.
- Storgards, E., Simola, H., Sjöberg, A.-M., & Wirtanen, G. (1999). Hygiene of gasket materials used in food processing equipment part 1: new materials. *Food and Bioproducts Processing*, 77(2), 137-145.
- Suslow, T. V. (2001). Water disinfection: A practical approach to calculating dose values for preharvest and postharvest applications. Publication 7256. Agriculture and Natural Resources, University of California. <http://vric.ucdavis.edu>.
- Tang, X., Flint, S. H., Bennett, R. J., Brooks, J. D., & Morton, R. H. (2009). Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 36(12), 1491-1497.
- Trachoo, N., Frank, J. F., & Stern, N. J. (2002). Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. *Journal of Food Protection*, 65(7), 1110-1116.
- Van Houdt, R., & Michiels, C. W. (2005). Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 626-633.

- Vanhaecke, E., Remon, J. P., Moors, M., Raes, F., De Rudder, D., & Van Peteghem, A. (1990). Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion to 304 and 316-L stainless steel: role of cell surface hydrophobicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(3), 788-795.
- 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*, 5, 20.
- Waak, E., Tham, W., & Danielsson-Tham, M.-L. (2002). Prevalence and fingerprinting of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw whole milk in farm bulk tanks and in dairy plant receiving tanks. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3366-3370.
- Wagner, M., Auer, B., Trittmittel, C., Hein, I., & Schoder, D. (2007). Survey on the *Listeria* contamination of ready-to-eat food products and household environments in Vienna, Austria. *Zoonoses and Public Health*, 54(1), 16-22.
- Wang, H., Wu, N., Jiang, Y., Ye, K., Xu, X., Zhou, G. (2016). Response of long-term acid stress to biofilm formation of meat-related *Salmonella* Enteritidis. *Food Control*, 69, 214-220.
- Whipps, J. M., Hand, P., Pink, D. A. C., & Bending, G. D. (2008). Chapter 7: human pathogens and the phyllosphere. *Advances in Applied Microbiology*, 64, 183-221.
- Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., et al. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Letter to Nature*, 413, 860-864.
- Wiedmann, M., Weilmeier, D., Dineen, S. S., Ralyea, R., & Boor, K. J. (2000). Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2085-2095.
- Wijman, J. G. E., de Leeuw, P. P. L. A., Moezelaar, R., Zwietering, M. H., & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(5), 1481-1488.
- WHO (1983). *Guidelines on prevention and control of salmonellosis*, A. H. Hinton (ed.), Geneva, p. 22
- Wong, A. C. L. (1998). Biofilms in food processing environments. *Journal of Dairy Science*, 81(10), 2765-2770, Elsevier.
- Yang, Y., Mikš-Krajnik, M., Zheng, Q., Lee, S.-B., Lee, S.-C., Yuk, H.-G. (2016). Biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. *Food Microbiology*, 54, 98-105.