



**Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής**

**Σχολή Επιστημών Τροφίμων**

**Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Σχηματισμός και ανίχνευση μικροβιακών βιοφίλμ σε  
παραγωγικούς χώρους τροφίμων**

**English Title**

**The forming and detection of microbial biofilms in food  
production environments**

**Όνόματα φοιτητών**

**ΚΑΛΑΦΑΤΗ ΝΙΚΗ (19684027)**

**ΝΙΚΟΛΑΣ ΠΑΤΕΡΑΣ (19684073)**

**Όνομα εισηγητή**

**ΑΝΘΙΜΙΑ ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ**

**ΑΙΓΑΛΕΩ/ΑΙΓΑΛΕΟ 2024**

Έγινε δεκτή

Οι υπογράφοντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει τη πτυχιακή εργασία με τίτλο ‘Σχηματισμός και ανίχνευση μικροβιακών βιοφίλμ σε παραγωγικούς χώρους τροφίμων’ που παρουσιάστηκε από τους ‘Πατέρας Νικόλας’ και ‘Καλαφάτη Νίκη’ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία

ΑΝΘΙΜΙΑ ΜΠΑΤΡΙΝΟΥ

Ημερομηνία

ΚΟΝΤΕΛΕΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ

Ημερομηνία

ΣΤΡΑΤΗ ΕΙΡΗΝΗ

## Δήλωση περί λογοκλοπής/Copyright

Έχοντας πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικής ιδιοκτησίας, δηλώνω ότι είμαι αποκλειστική/ός συγγραφέας της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Δηλώνω, επίσης, ότι αναλαμβάνω όλες τις συνέπειες, όπως αυτές νομίμως ορίζονται, στην περίπτωση που διαπιστωθεί διαχρονικά ότι η εργασία μου αυτή ή τμήμα αυτής αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.

Όνομα φοιτητών:

Καλαφάτη Νίκη



Πατέρας Νικόλας



## **Ευχαριστίες**

Θέλουμε να ευχαριστήσουμε την επιβλέπουσα καθηγήτρια Ανθιμία Μπατρίνου για τη βοήθεια που μας πρόσφερε για την πραγματοποίηση αυτής της πτυχιακής εργασίας. Θέλουμε επίσης να ευχαριστήσουμε τους υπεύθυνους καθηγητές και το εργαστηριακό προσωπικό των διαφόρων εργαστηρίων που μας επέτρεψαν να παρευρεθούμε σε αυτά, ώστε να έχουμε υλικό για την παρούσα εργασία.

## Περίληψη

Τα βιοφίλμ είναι μικροοργανισμοί που προσκολλώνται σε μία επιφάνεια και σχηματίζουν ένα πλέγμα (ενσωματωμένο). Λόγω του ευνοϊκού περιβάλλοντος αναπτύσσονται σε διάφορα περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, και προκαλούν επιμόλυνση, διάβρωση και μειώνουν τα αποτελέσματα των διεργασιών. Υπάρχουν διάφοροι μικροοργανισμοί παθογόνοι- αλλοιογόνοι και αερόβιοι-αναερόβιοι που μπορούν να δημιουργήσουν βιοφίλμ και να μολύνουν τους χώρους παραγωγής. Λόγω της επικινδυνότητάς τους πρέπει να υπάρχουν μέτρα για την εξάλειψη αυτών. Πολλές φορές η χρήση των απολυμαντικών είναι πιθανόν να οδηγήσει στην προσαρμογή και ανάπτυξη αντοχής των βιοφίλμ. Έχουν αναπτυχθεί διάφορες ποιοτικές και ποσοτικές μέθοδοι για την ανίχνευση των βιοφίλμ. Σκοπός αυτής της εργασίας είναι η κατανόηση της ανθεκτικότητας των βιοφίλμ σε διάφορες επιφάνειες επαφής με τρόφιμα, ενάντια σε συμβατικά απολυμαντικά, χρησιμοποιώντας μία χρωστική ανίχνευσης βιοφίλμ (TBF300) και η σύγκριση της ανθεκτικότητας αυτής με τη βοήθεια στατιστικών πακέτων. Για το πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκαν 144 έλεγχοι και υπολογίστηκαν οι Δείκτες Σχηματισμού Βιοφίλμ (ΔΣΒ) για να συγκριθεί η ανθεκτικότητα των βιοφίλμ. Τέλος, ελέγχθηκε η υπόθεση ότι είναι πιο δύσκολο να απομακρυνθεί το βιοφίλμ στις γωνίες σε σχέση με τις λείες επιφάνειες και βρέθηκε ότι ο ΔΣΒ είναι μεγαλύτερος κατά μέσο όρο στις γωνίες από ότι στις λείες επιφάνειες ( $p < 0,05$ ).

**Λέξεις κλειδιά:** βιοφίλμ, προσκόλληση, αντοχή, απολυμαντικά, έλεγχος, εξάλειψη

## Abstract

Biofilms are microorganisms that adhere to a surface and form a matrix (embedded). Due to the favorable environment they grow in various food processing environments, and cause contamination, corrosion and reduce process effects. There are various pathogenic- spoilage and aerobic-anaerobic microorganisms that can create biofilms and contaminate production areas. Due to their hazardous nature, measures must be taken to eliminate them. In many cases, the use of disinfectants is likely to lead to the adaptation and development of resistance of the biofilms. Various qualitative and quantitative methods have been developed for the detection of biofilms. The aim of this study is to understand the resistance of biofilms on different food contact surfaces against conventional disinfectants using a pigment (TBF300) and to compare this resistance using statistical packages. For the experimental part, 144 tests were performed and the Biofilm Formation Indexes (BFI) were calculated to compare the resistance of the biofilms. Finally, the hypothesis that it is more difficult to remove biofilm on corners than on smooth surfaces was tested, using the SPSS statistical package and the BFI was found to be higher on average on corners than on smooth surfaces ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** biofilms, adhesion, resistance, disinfectants, control, elimination

## Περιεχόμενα

Δήλωση περί λογοκλοπής.....	3
Ευχαριστίες.....	4
Περίληψη.....	5
Abstrac.....	5
Κατάλογος πινάκων.....	8
Κατάλογος σχημάτων.....	8
Κατάλογος διαγραμμάτων.....	10
Κατάλογος εικόνων.....	10
Εισαγωγή.....	12
1. Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των βιοφίλμ στην Βιομηχανία Τροφίμων.....	14
1.1. Γενικά χαρακτηριστικά των βιοφίλμ.....	14
1.2.Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων.....	20
1.3. Παραδείγματα μικροοργανισμών που παράγουν βιοφίλμ στη βιομηχανία Τροφίμων.....	26
2. Έλεγχος και εξάλειψη βιοϋμενίου.....	33
2.1. Απολυμαντικά και αντοχή στο βιοϋμένιο.....	39
2.2. Τρόποι ανίχνευσης βιοφίλμ.....	45
3. Πειραματικό μέρος.....	
3.1 σκοπός πειράματος.....	50
3.2. Πειραματική διαδικασία.....	50
3.3. Αποτελέσματα και συζήτηση.....	50
Συμπεράσματα.....	65
Βιβλιογραφία.....	67

## Κατάλογος πινάκων

Πίνακας 1: Βαθμολογία και εμφάνιση της χρώσης TBF300.....	50
Πίνακας 2: Παράδειγμα διεργασίας ελέγχου βιοφίλμ με το TBF300S.....	51
Πίνακας 3: Μετρήσεις και score 1 <sup>ης</sup> εφαρμογής TBF300.....	60
Πίνακας 4: Μετρήσεις και score 2 <sup>ης</sup> εφαρμογής TBF300.....	61
Πίνακας 5: Πίνακας των score με διαφοροποίηση στα είδη των επιφανειών.....	61
Πίνακας 6: Μετρήσεις και score 1 <sup>ης</sup> εφαρμογής TBF300 (μόνο για πάγκους και γωνίες).....	63
Πίνακας 7: Μετρήσεις και score 2 <sup>ης</sup> εφαρμογής TBF300 (μόνο για πάγκους και γωνίες)....	63
Πίνακας 8: Αποτελέσματα SPSS για πάγκους και γωνίες χωρίς επιμόλυνση.....	64
Πίνακας 9: Αποτελέσματα SPSS για πάγκους και γωνίες με επιμόλυνση ζύμης ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ).....	65

## Κατάλογος σχημάτων

Σχήμα 1: Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων σταδίων σχηματισμού βιοϋμενίου (i) προσκόλληση, (ii) σχηματισμός μικροαποικίας, (iii) ωρίμανση με κυτταρική διαφοροποίηση και (iv) αποκόλληση ή διασπορά, και τη συμμετοχή των βακτηριακών παραγόντων μολυσματικότητας σε κάθε στάδιο. Συντομογραφίες: ActA, πρωτεΐνη πολυμερισμού της ακτίνης- Bar, πρωτεΐνη που σχετίζεται με το βιοφίλμ- bcsA, βακτηριακή σύνθεση κυτταρίνης- CidA, πρωτεΐνη επίδρασης κυτταρικού θανάτου- csg, γονίδιο σύνθεσης ελικοειδών ινιδίων (curli)- EPS, εξωκυτταρική πολυμερής ουσία- eDNA, εξωκυτταρικό DNA- FnBP, πρωτεΐνες δέσμησης ινωδονεκτίνης- icaA, διακυτταρική προσκόλληση- LAP, πρωτεΐνη προσκόλλησης <i>Listeria</i> - PIA, διακυτταρική προσκολλητική πρωτεΐνη πολυσακχαριτών- SasG, επιφανειακή πρωτεΐνη <i>S. aureus</i> - SpA, πρωτεΐνη <i>A. S. aureus</i> . Εικόνα προσαρμοσμένη με την άδεια των Ray and Bhunia 2014.(Bai. et al.,2021).....	15
---	----

Σχήμα 2: Χωρική κατανομή σε βιοφίλμ μεικτών ειδών: (A) ξεχωριστές μικροαποικίες μονοειδών (Nielsen et al. 2000), (B) ανάμειξη (Rickard et al. 2006), (C) διατεταγμένα σε



στρώματα (Habimana et al. (2010), reviewed by Yuan et al (2020)).....18

**Σχήμα 3:** Μια σύνθετη αλληλεπίδραση παραγόντων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό, την αρχιτεκτονική και, ως εκ τούτου, τη λειτουργικότητα του βιοφίλμ, που σχετίζονται με το συγκεκριμένο βιομηχανικό τρόφιμο στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. (Whitehead and Verran et al.,2015).....18

**Σχήμα 4:** Αλληλουχία γεγονότων στο σχηματισμό βιοφίλμ σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Πρώτον, οργανικά μόρια από τα τρόφιμα εναποτίθενται στην επιφάνεια του εξοπλισμού και σχηματίζουν ένα διαμορφωμένο (conditioned) φιλμ. Δεύτερον, οι βιολογικά ενεργοί μικροοργανισμοί έλκονται από τα οργανικά μόρια. Τρίτον, παραμένουν επίμονα μικροβιακά κύτταρα μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση και ξεκινούν την ανάπτυξή τους. Τέλος, το βιοφίλμ σχηματίζεται με την έκφραση κυτταρικών γονιδίων και το quorum sensing (Shi and Zhu (2009)).....22

**Σχήμα 5:** Βακτήρια και μύκητες που υπάρχουν στα δείγματα εκκίνησης. Βακτηριακές V3-V4 και μυκητιακές υπερμεταβλητές περιοχές ITS2 που αλληλουχήθηκαν και καταγράφηκαν ως λειτουργικές ταξινομικές μονάδες μηδενικής ακτίνας (zOTU). Αυτές οι αλληλουχίες στη συνέχεια αποδόθηκαν στους οργανισμούς προέλευσης σε επίπεδο γένους ή είδους. (A) Αφθονία βακτηρίων και μυκήτων του έτους 1 στα δείγματα εκκίνησης. Τα κυκλικά διαγράμματα απεικονίζουν τις σχετικές αφθονίες ανάγνωσης για τους ενδεικνυόμενους οργανισμούς. Ακολουθίες με αφθονίες ανάγνωσης μικρότερες από το 1% του συνόλου ομαδοποιήθηκαν ως "άλλες". (B) Αφθονίες βακτηρίων στα δείγματα εκκίνησης του έτους 2. Τα αμπλικόνια ITS2 PCR των μυκήτων δεν ανακτήθηκαν από τα δείγματα εκκίνησης του έτους 2. (Bose. et al.,2021).....31

**Σχήμα 6:** Χρησιμοποιώντας ομοεστιακή μικροσκοπία μπορεί να αποδειχθεί ότι καθώς οπτικοποιούνται τα τροφικά υλικά και τα κύτταρα, η κατανομή των κυττάρων (μπλε) και του οργανικού υλικού (ροζ) σχηματίζει ένα ετερογενές πλέγμα όπου μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα. (a-c). Πιο κοντά στην επιφάνεια, το διαμορφωμένο (conditioned) φιλμ είναι πιο διαδεδομένο, αλλά όταν οπτικοποιείται από την επιφάνεια μέχρι την κορυφή του σωματιδίου τροφής (d-f) τα βακτήρια γίνονται πιο εμφανή. Στην κορυφή του σωματιδίου της τροφής (g-i) κυριαρχούν τα βακτήρια (Whitehead and Verran (2015)).....42

<b>Σχήμα 7:</b> Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντίσταση του βιοφίλμ στα χημικά απολυμαντικά (Yuan et al 2021)).....	42
<b>Σχήμα 8:</b> Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ανοξειδωτού χάλυβα από βιοφίλμ 3 ημερών που σχηματίστηκαν από <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Carrascosa. et al. (2021)) .....	47
<b>Σχήμα 9:</b> Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) από ανοξειδωτο χάλυβα με βιοφίλμ 7 ημερών που σχηματίστηκαν από <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Carrascosa. et al. (2021)) .....	47
<b>Σχήμα 10:</b> Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) από ανοξειδωτο χάλυβα με βιοφίλμ 7 ημερών που σχηματίστηκαν από <i>Pseudomonas fluorescens</i> μετά από επεξεργασία με υπεροξικό οξύ (250 ppm) για 15 λεπτά (Carrascosa. et al. (2021)).....	48
<b>Σχήμα 11:</b> Πρωτόκολλο εφαρμογής TBF300S ( <a href="https://biofilmtest.com/en_gb/deteccion-y-eliminacion-de-biofilms/">https://biofilmtest.com/en_gb/deteccion-y-eliminacion-de-biofilms/</a> ).....	50

## **Κατάλογος διαγραμμάτων**

<b>Διάγραμμα 1:</b> Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής σε συσκευές με θέρμανση.....	62
<b>Διάγραμμα 2:</b> Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής σε συσκευές με ψύξη.....	62
<b>Διάγραμμα 3:</b> Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής σε επιφάνειες παραγωγικών χώρων.....	63
<b>Διάγραμμα 4:</b> Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής σε επιφάνειες με επιμόλυνση.....	63
<b>Διάγραμμα 5:</b> Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής (μόνο για πάγκους και γωνίες).....	64

## **Κατάλογος εικόνων**

<b>Εικόνα1:</b> Σκεύασμα χρωστικής βιοφίλμ, TBF300 ( <a href="https://biofilmtest.com/en_gb/deteccion-y-eliminacion-de-biofilms/">https://biofilmtest.com/en_gb/deteccion-y-eliminacion-de-biofilms/</a> ) .....	49
<b>Εικόνα 2:</b> Γωνία επιμολυσμένη με <i>Saccharomyces cerevisiae</i> στο εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.....	51
<b>Εικόνα 3:</b> Επιφάνεια (πάγκος) επιμολυσμένη με <i>Saccharomyces cerevisiae</i> στο εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.....	51

<b>Εικόνα 4:</b> Γωνία 2 επιμολυσμένη με <i>Saccharomyces cerevisiae</i> στο εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.....	52
<b>Εικόνα 5:</b> Επιφάνεια (πάγκος) 2 επιμολυσμένη με <i>Saccharomyces cerevisiae</i> στο εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.....	52
<b>Εικόνα 6:</b> Κλίβανος 1 εργαστήριο μικροβιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	53
<b>Εικόνα 7:</b> Κλίβανος 2 εργαστήριο μικροβιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	53
<b>Εικόνα 8:</b> Φούρνος μικροκυμάτων 1 (εσωτερικό) εργαστήριο μικροβιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	54
<b>Εικόνα 9:</b> Φούρνος μικροκυμάτων 1 (εσωτερικό πόρτας) εργαστήριο μικροβιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	54
<b>Εικόνα 10:</b> Φούρνος μικροκυμάτων 1 (πίατο) εργαστήριο μικροβιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	55
<b>Εικόνα 11:</b> Φούρνος μικροκυμάτων 2 (πίατο) εργαστήριο μικροβιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	55
<b>Εικόνα 12:</b> Ψυγείο 1 εργαστήριο μικροβιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	56
<b>Εικόνα 13:</b> Ψυγείο 2 εργαστήριο μικροβιολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	56
<b>Εικόνα 14:</b> Αποστειρωτήρας εργαστήριο επεξεργασίας τροφίμων Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	57
<b>Εικόνα 15:</b> Παστεριωτήρας εργαστήριο επεξεργασίας τροφίμων Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	57
<b>Εικόνα 16:</b> Καταψύξης εργαστήριο επεξεργασίας τροφίμων Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	57
<b>Εικόνα 17:</b> Γενήτρια εργαστήριο επεξεργασίας τροφίμων Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	58
<b>Εικόνα 18:</b> Πρίζα (γωνία) εργαστήριο χημικής σύστασης Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	58
<b>Εικόνα 19:</b> Βρύση (γωνία) εργαστήριο χημικής σύστασης Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	59
<b>Εικόνα 20:</b> Επιφάνεια 1 εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	59
<b>Εικόνα 21:</b> Γωνία 1 εργαστήριο οινολογία Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής .....	59

## Εισαγωγή

Τα βιοφίλμ είναι αποικίες μικροοργανισμών που συχνά προσκολλώνται σε μία επιφάνεια, αλλά και μεταξύ τους, ενώ παράλληλα βρίσκονται σε ένα ενσωματωμένο πλέγμα. Δημιουργούνται από πολλούς μικροοργανισμούς παθογόνους και μη και στόχος τους είναι η προστασία από εξωτερικούς παράγοντες. Οι μικροοργανισμοί αυτοί βρίσκονται στην αδρανή φάση, όπου είναι συνδεδεμένοι μεταξύ τους στην επιφάνεια μέσω του πλέγματος. Τα βακτήρια συγκρατούνται μεταξύ τους και παράγουν ουσίες που ονομάζονται εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS). Ο κύκλος ανάπτυξης των βιοφίλμ περιλαμβάνει τα εξής στάδια: 1) Αρχική προσκόλληση των μικροβίων σε μια επιφάνεια και μεταξύ τους 2) Σχηματισμός μικροαποικιών 3) Ωρίμανση του βιοφίλμ 4) Διασπορά. Σχετικά με την αρχιτεκτονική του βιοφίλμ εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από κάποια μικροβιολογικά χαρακτηριστικά, από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και από ένα συνδυασμό επιφανειακών μορφολογιών.

Τα βιοφίλμ μπορούν να προσκολληθούν σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες. Το μέγεθος της παραγωγής στις σύγχρονες γραμμές επεξεργασίας αποτελούν το τέλειο περιβάλλον για την ανάπτυξη των βιουμένων. Τα υλικά από τα οποία είναι φτιαγμένη η επιφάνεια επεξεργασίας τροφίμων λειτουργούν ως τεχνητά υποστρώματα για παθογόνους και μη μικροοργανισμούς. Όσον αφορά την υδροφοβικότητα παίζει σημαντικό ρόλο για την προσκόλληση των μικροοργανισμών. Από ένα μέρος ανάπτυξης των βιοφίλμ μπορεί να καταλήξει να επιμολυνθεί ολόκληρος ο εξοπλισμός και οι μηχανισμοί και να υπάρξουν επιπτώσεις στα υλικά, καθώς και στην απόδοση των διεργασιών της επεξεργασίας τροφίμων.

Υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί που ευθύνονται για τον πολλαπλασιασμό των βιοφίλμ, μερικοί από αυτούς είναι η *Listeria Monocytogenes*, η *Salmonella enterica*, η *Eserichia coli* και οι *Cambylobacter spp*. Οι μικροοργανισμοί στα βιοϋμένα μπορεί να είναι αλλοιογόνοι ή παθογόνοι και σαν πλειονότητα αερόβιοι αλλά και αναερόβιοι.

Εφόσον τα βιοφίλμ δημιουργούν προβλήματα στους χώρους επεξεργασίας τροφίμων θα χρειαστεί να υπάρχουν μέτρα πρόληψης και εξάλειψης για τον περιορισμό τους. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με τεχνικές όπως ο συχνός καθαρισμός, η CIP που σε μερικές περιπτώσεις πιθανόν να τα εξαλείψει, η τεχνολογία εμποδίων, τα ενζυμικά απορρυπαντικά, που αποικοδομούν το βιοφίλμ, η χρήση κοκτέιλ φάγων, τροποποιημένων φάγων και συνδυασμών φάγων με άλλα αντιμικροβιακά, προσέχοντας τους συνδυασμούς μεθόδων, ώστε να μην οδηγηθούμε στο αντίθετο αποτέλεσμα.

Αφού τα κύτταρα σχηματίσουν βιουμένα αποκτούν υψηλότερη αντοχή στα αντιμικροβιακά σε σχέση με τα πλαγκτονικά, η οποία τα καθιστά πιο δύσκολο να καταστραφούν από τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων. Επίσης, σημαντικό ρόλο σε αυτήν παίζει η ηλικία των βιοφίλμ με ανάλογη σχέση, καθώς και τα υπολείμματα τροφίμων στις επιφάνειες, τα οποία βοηθούν των σχηματισμό βιουμένων και αλλάζουν τις ιδιότητες της επιφάνειας. Επιπροσθέτως, η υπερβολική χρήση αντιμικροβιακών

παραγόντων μπορεί να αυξήσει την αντοχή, λόγω προσαρμογής των μικροοργανισμών και μεταφοράς των ιδιοτήτων αυτών σε άλλα μη ανθεκτικά.

Τα βιοϋμένια μπορούν να μελετηθούν με διάφορες μεθόδους πέραν της καλλιέργειας. Μερικές από αυτές είναι το κρυσταλλικό ιώδες που είναι μία χρώση, η χρώση με σαφρανίνη και ο συνδυασμός χρώσεων. Επίσης, άλλες τεχνικές (μοριακές) είναι η PCR, η βιοφωταύγια και μέθοδος με μοριακούς ανιχνευτές. Κάποιες από τις μεθόδους όπου η επιφάνεια δεν χρειάζεται να έχει σχεδιαστεί είναι η φασματομετρία υπέρυθρου (FT-IR), φασματοσκοπία, συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης-λείζερ, NMR και μικροσκοπία φθορισμού. Για την μελέτη της δομής των βιοφίλμ χρησιμοποιείτε η συνεστιακή μικροσκοπία.

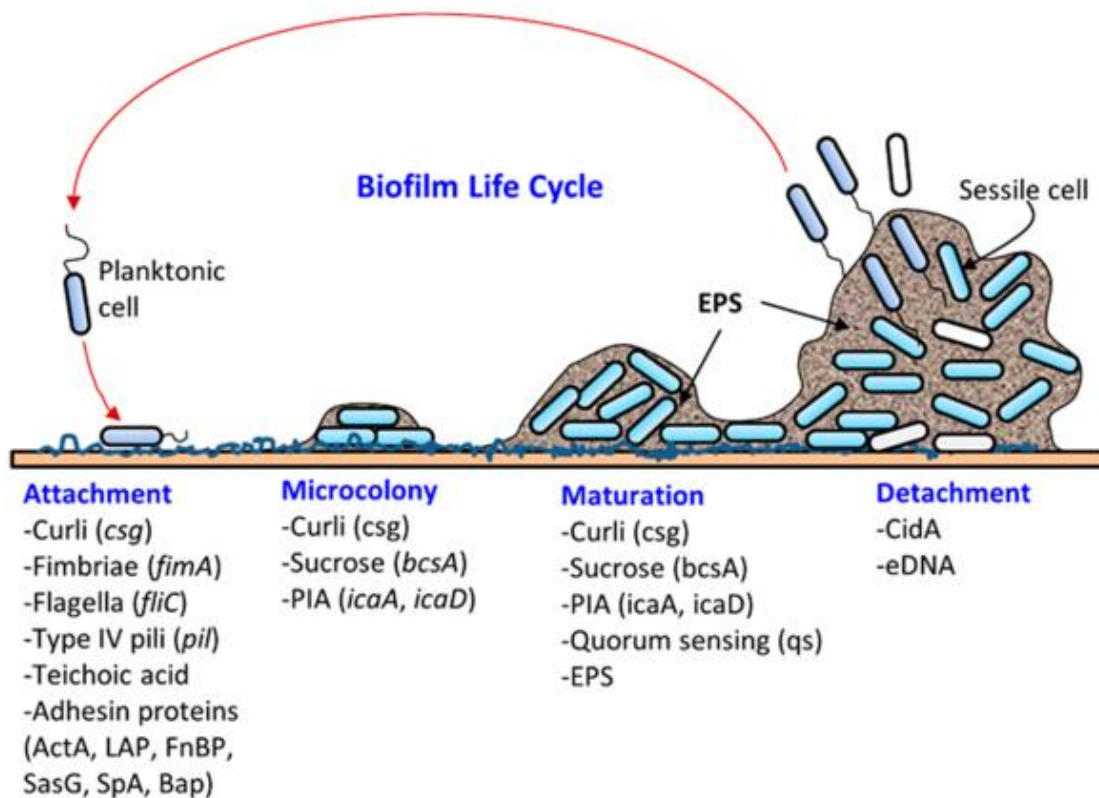
## **Κεφάλαιο 1: Χαρακτηριστικά και ιδιότητες των βιοφίλμ στην Βιομηχανία Τροφίμων**

Τα βιοφίλμ είναι ένα πρότυπο αυτοπροστατευτικής ανάπτυξης των βακτηρίων, τα οποία διαφέρουν από τα πλαγκτονικά κύτταρα. Παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον για την υγιεινή των τροφίμων, δεδομένου ότι τα βιοϋμένια μπορεί να περιέχουν αλλοιογόνα και παθογόνα βακτήρια, γεγονός που αυξάνει τη μόλυνση μετά την επεξεργασία και τον κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Επιπλέον, τα κύτταρα βιοφίλμ είναι πιο ανθεκτικά στον καθαρισμό και την απολύμανση στη βιομηχανία τροφίμων. Ο σχηματισμός βιοφίλμ είναι μια πολύπλοκη διαδικασία κατά την οποία γενετικοί μηχανισμοί και πολυάριθμοι παράγοντες όπως οι ιδιότητες του υποστρώματος και των επιφανειών των βακτηριακών κυττάρων που εμπλέκονται (Shi and Zhu 2009). Ο όρος βιοφίλμ χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει κύτταρα και οργανικό υλικό που συγκρατούνται σε μια επιφάνεια, αυτά δεν έχουν την χαρακτηριστική, κλασική μορφολογία τύπου βιοϋμενίου "μανιταριού" (Whitehead and Verran 2015). Έχει αποδειχθεί ότι οι μικροοργανισμοί που προσκολλώνται στο υπόστρωμα και αναπτύσσονται σε βιοϋμένιο είναι πιο ανθεκτικοί σε αντιβιοτικά και απολυμαντικά, από ό,τι τα πλαγκτονικά κύτταρα. Η ανθεκτικότητά τους εξαρτάται από τη μεταβολική τους δραστηριότητα και αυξάνεται με την ηλικία του βιοφίλμ (Sandholm, T. and Wirtanen, G (1992), Genigeorgis, C (1995), Costerton et al (1995), Frank and Koffi (1990), Krysinski et al (1992), reviewed by Venø, Lena (1999)).

### **1.1. Γενικά χαρακτηριστικά των βιοφίλμ**

Τα μικρόβια μπορούν να χωριστούν σε δύο ομάδες ανάλογα με την φάση ανάπτυξης τους : πλαγκτονικό ή αδρανές (Fletcher (1991)). Στο πλαγκτονικό στάδιο τα μικρόβια ζουν ως μεμονωμένοι οργανισμοί που επιπλέουν ελεύθερα, ενώ στο αδρανές στάδιο είναι προσκολλημένα σε μια επιφάνεια, σχηματίζουν βιοϋμένιο και λειτουργούν ως στενά συνδεδεμένη κοινότητα (Genigeorgis (1995)). Οι μικροοργανισμοί σχηματίζουν βιοφίλμ όταν τα θρεπτικά συστατικά περιορίζονται και σε αυτή την κατάσταση ο σκοπός τους είναι να συλλάβουν θρεπτικά συστατικά από το περιβάλλον (Genigeorgis (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Οι διαφορές μεταξύ της ικανότητας σχηματισμού βιοφίλμ, διαπιστώθηκαν ότι υπάρχουν μεταξύ των διαφόρων ορότυπων (serovars) *S. enterica* που λαμβάνονται από διαφορετικά στάδια του περιβάλλοντος της πτηνοτροφικής μονάδας [Schonewille et al (2012)]. Η εργασία αυτή κατέδειξε ότι ορισμένα απομονωμένα στελέχη της φάρμας ήταν ικανά να σχηματίζουν βιοφίλμ υπό εργαστηριακές συνθήκες, ενώ τα στελέχη που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο δεν ήταν (Schonewille et al (2012), reviewed by Whitehead and Verran 2015). Με βάση τη διαδικασία του σχηματισμού βιοφίλμ, η κλιμάκωση των φιλμ, όπως τα υπολείμματα τροφίμων και ποτών, πιθανόν να αυξήσουν το σχηματισμό βιοφίλμ (Kumar and Anand. 1998, reviewed by Wagner et al 2021). Ο σχηματισμός βιοφίλμ πραγματοποιείται σε διάφορα στάδια: (i) προσκόλληση, (ii) σχηματισμός μικροαποικιών, (iii) ωρίμανση με κυτταρική διαφοροποίηση και (iv) αποκόλληση ή διασπορά (Σχήμα 1). Στα βιοϋμένια, οι μικροοργανισμοί παράγουν φλοιοειδή ινίδια (fimbriae), ελικοειδή ινίδια (curli), μαστίγια (flagella),

πρωτεΐνες προσκόλλησης και κάψουλες για να προσκολληθούν σταθερά σε μια επιφάνεια (Flemming, Wingender (2010), Nadell et al (2016), reviewed by Bai et al (2021)). Ο σχηματισμός ενός βιοφίλμ μπορεί να διαρκέσει από μερικές ημέρες έως αρκετές εβδομάδες (Zottola and Sasahara (1994), Genigeorgis (1995)). Ως εκ τούτου, έχει μεγάλη σημασία να υπάρχει μια αποτελεσματική μέθοδος καθαρισμού που να αποφεύγει το σχηματισμό βιοϋμενίου κατά την πρώτη περίοδο (Genigeorgis (1995)). Το βιοφίλμ έχει μια αυξημένη αντοχή σε ακραία θερμότητα, φως και ξήρανση (Costerton et al (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Τα βακτηριακά κύτταρα μέσα στο πλέγμα του βιοφίλμ είναι ανθεκτικά στα χημικά απολυμαντικά (10-1000 φορές), σε σύγκριση με τα αντίστοιχα πλαγκτονικά κύτταρα (Acker et al (2014), reviewed by Yuan et al (2021)). Δεδομένου ότι το πλέγμα παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του βιοφίλμ, διατηρώντας το κοντά μεταξύ του και ενυδατώνοντας τα μικροβιακά κύτταρα, η αποικοδόμησή του θα μπορούσε να αποτελέσει μια αποτελεσματική στρατηγική κατά του βιοφίλμ (Giaouris et al (2020)).



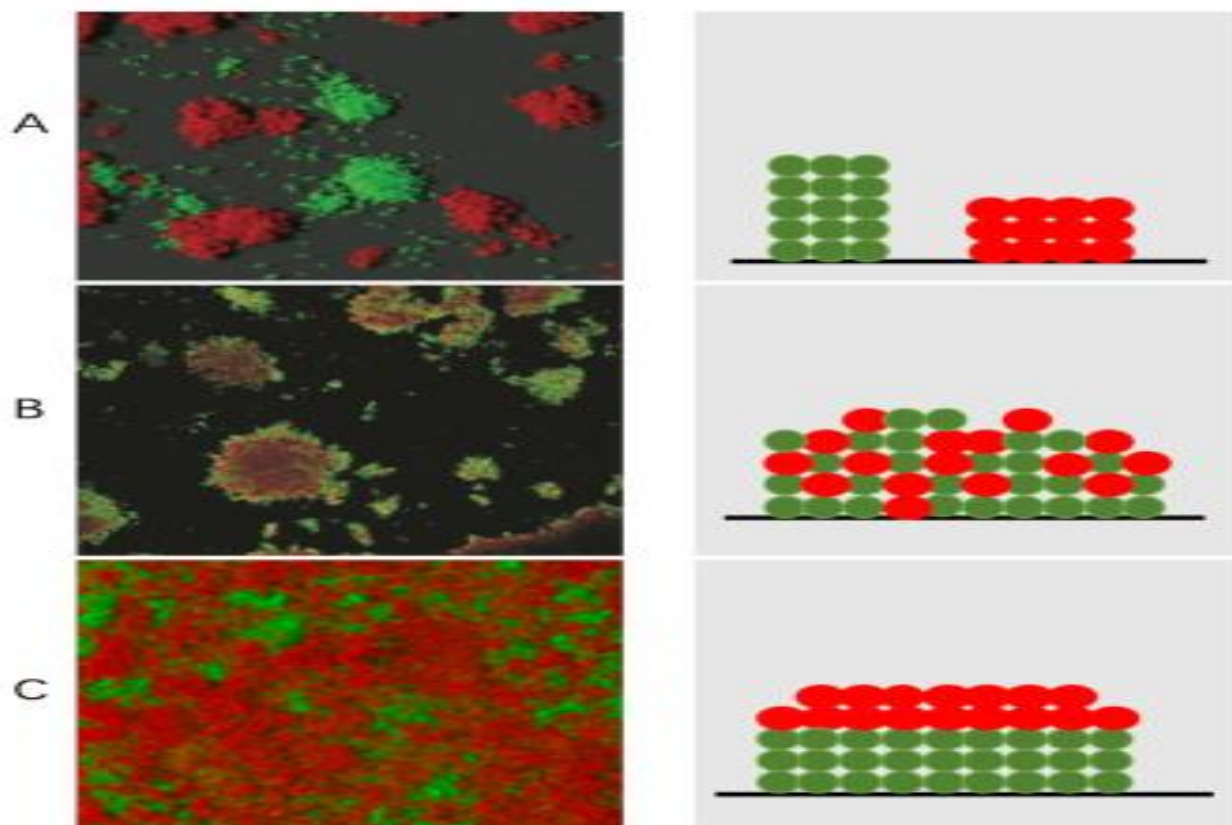
Σχήμα 1. Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων σταδίων σχηματισμού βιοϋμενίου (i) προσκόλληση, (ii) σχηματισμός μικροαποικίας, (iii) ωρίμανση με κυτταρική διαφοροποίηση και (iv) αποκόλληση ή διασπορά, και τη συμμετοχή των βακτηριακών παραγόντων μολυσματικότητας σε κάθε στάδιο. Συντομογραφίες: ActA, πρωτεΐνη πολυμερισμού της ακτίνης- Bap, πρωτεΐνη που σχετίζεται με το βιοφίλμ- bcsA, βακτηριακή σύνθεση κυτταρίνης- CidA, πρωτεΐνη επίδρασης κυτταρικού θανάτου- csg, γονίδιο σύνθεσης ελικοειδών ινιδίων (curli)- EPS, εξωκυτταρική πολυμερής ουσία- eDNA, εξωκυτταρικό DNA- FnBP, πρωτεΐνες δέσμευσης ινωδονεκτίνης- icaA, διακυτταρική προσκόλληση- LAP, πρωτεΐνη προσκόλλησης *Listeria*- PIA, διακυτταρική προσκολλητική πρωτεΐνη πολυσακχαριτών- SasG, επιφανειακή πρωτεΐνη *S. aureus* - SpA, πρωτεΐνη *A. S. aureus*. Εικόνα προσαρμοσμένη με την άδεια των Ray and Bhunia 2014 (Bai. et al (2021)).

Οι πολυσακχαρίτες, οι πρωτεΐνες, τα φωσφολιπίδια, τα τειχοϊκά και ακόμη και τα νουκλεϊκά οξέα είναι τα κύρια συστατικά του EPS. Σε ορισμένες ειδικές συνθήκες, ανόργανοι κρύσταλλοι, σωματίδια ιλύος και συστατικά του αίματος βρίσκονται στο EPS των βιοϋμενίων (Donlan, 2002). Μια κοινότητα βιοϋμενίου μπορεί να αποτελείται από ένα ή/και πολλά είδη βακτηρίων και να σχηματίζει ένα ενιαίο στρώμα ή τρισδιάστατες δομές. Τα ώριμα βιοϋμενία είναι εξαιρετικά οργανωμένα οικοσυστήματα στα οποία τα κανάλια νερού είναι διασκορπισμένα και μπορούν να παρέχουν διόδους για την ανταλλαγή θρεπτικών ουσιών, μεταβολιτών και αποβλήτων (Sauer et al., 2007, reviewed by Shi and Zhu, 2009). Περίπου το ένα τρίτο του ξηρού βάρους του βιοφίλμ είναι βακτηριακά κύτταρα και το υπόλοιπο βάρος προέρχεται από μόρια που προέρχονται από τα βακτήρια, όπως πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και DNA, που αποτελούν το EPS (Costerton et al (1999), Nadell et al (2016), reviewed by Bai et al (2021)). Ωστόσο, η σύνθεση του EPS στα βιοφίλμ ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό από το ένα βακτηριακό είδος στο άλλο και επηρεάζεται έντονα από τις συνθήκες ανάπτυξης (Flemming and Wingender (2010), reviewed by Yuan et al (2020)). Η παραγωγή EPS από βακτήρια βιοφίλμ εξυπηρετεί πολλές λειτουργίες, οι οποίες περιλαμβάνουν: διευκόλυνση της αρχικής προσκόλλησης των βακτηρίων σε μια επιφάνεια, σχηματισμό και διατήρηση της δομής, της μικροαποικίας και του βιοφίλμ, ενισχυμένη ανθεκτικότητα βιοφίλμ σε περιβαλλοντικό στρες και αντιμικροβιακούς παράγοντες. Τέλος, το EPS-πλέγμα επιτρέπει στα βακτήρια να δεσμεύουν θρεπτικά συστατικά (Costerton et al (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι αν και το EPS και η δομή του βιοφίλμ θεωρούνται καθοριστικοί παράγοντες στην ανθεκτικότητα του βιοφίλμ, η ικανότητα ενός αντιμικροβιακού παράγοντα να διεισδύει σε ένα βιοφίλμ δεν συσχετίζεται με την αποτελεσματικότητα θανάτωσης ή απομάκρυνσής του (Araujo et al. (2014), reviewed by Yuan et al (2020)). Οι πολυσακχαρίτες και ο φλοϊός (fimbria) στα κυτταρικά τοιχώματα των μικροοργανισμών μπορούν να σχηματίσουν μια γέφυρα μεταξύ των κυττάρων και της επιφάνειας που αποικίζεται (Zottola (1994), reviewed by Venø, Lena (1999)). Το βιοφίλμ και η βιορύπανση είναι δύο όροι που αναφέρονται στη βιολογική προσκόλληση και ανάπτυξη στις επιφάνειες επαφής (Zottola and Sasahara (1994)). Η βιολογική ρύπανση χρησιμοποιείται σε περιπτώσεις όπου το φιλμ θεωρείται επιβλαβές (Zottola and Sasahara (1994)). Το βιοφίλμ αποτελείται τόσο από μικρόβια όσο και από τις εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες τους (EPS), συνήθως πολυσακχαρίτες (Costerton et al (1987)). Ο σκοπός του σχηματισμού του βιοφίλμ είναι η προστασία των μικροβίων από εχθρικά περιβάλλοντα και να ενεργεί ως παγίδα για τα θρεπτικά συστατικά (reviewed by Venø, Lena (1999)).

Το βιοφίλμ έχει πορώδη δομή με τριχοειδή κανάλια νερού μέσα στα οποία διανέμονται το νερό και τα θρεπτικά συστατικά (Costerton et al (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Τα βιοϋμενία μπορεί να έχουν μια στρωματοποιημένη δομή, όπου ένα είδος εντοπίζεται στα κατώτερα στρώματα και το άλλο είδος βρίσκεται στα ανώτερα στρώματα (Σχήμα 2C). Αυτή η οργάνωση μπορεί να επιτρέψει τόσο τη συνεργασία (Habimana et al. (2010)), όσο και ανταγωνιστικές αλληλεπιδράσεις (An et al. (2006), reviewed by Yuan et al (2020)). Η βακτηριακή ανάπτυξη στο βαθύτερο στρώμα του βιοφίλμ μειώνεται

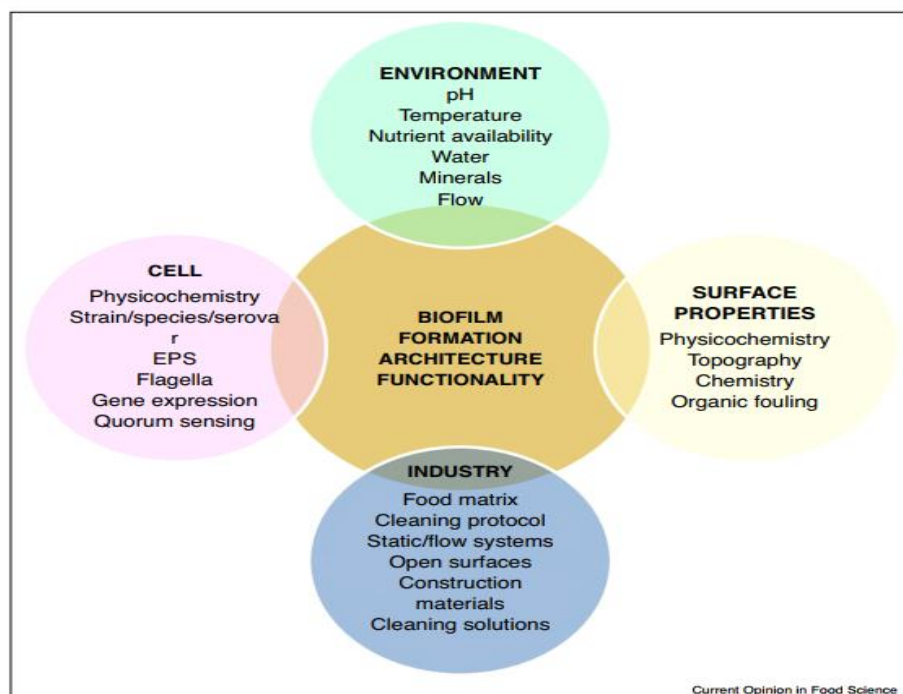


λόγω περιορισμού των θρεπτικών συστατικών και του οξυγόνου που μπορεί να μειώσει την αποτελεσματικότητα των αντιμικροβιακών ουσιών, η οποία επίσης αναγνωρίζεται ως μέσο επιβίωσης για τα βακτήρια στα βιοφίλμ που εκτίθενται σε απολυμαντικά (Flemming et al. (2016), reviewed by Yuan et al (2021)). Ο σχηματισμός, η αρχιτεκτονική και η λειτουργία του βιοφίλμ εξαρτάται από ένα ευρύ φάσμα και συνδυασμό επιφανειακών μορφολογιών (χημεία, τοπογραφία, φυσικοχημεία), περιβαλλοντικών συνθηκών (pH, διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, θερμοκρασία, ξενιστής πρωτεΐνες/προσκολλητικές ουσίες, ταχύτητα ροής στο περιβάλλον, δυναμική των ρευστών) και μικροβιολογικών παραγόντων (αρνητικό/θετικό κατά Gram, μικροβιακό σχήμα, δομή, μοριακή σύνθεση, είδη, τύπο και τον αριθμό των διαφόρων ειδών, φυσικοχημεία, φάση ανάπτυξης, ηλικία, παρουσία μαστιγίων, βλεφαρίδων, καψουλών ή εξωπολυμερών ουσιών) (Camproccia et al (2013), reviewed by Whitehead and Verran (2015), Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Costerton et al (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Η ηλικία ενός βιοφίλμ έχει επίσης προταθεί ότι επηρεάζει τόσο την αρχιτεκτονική όσο και τη λειτουργία του βιοφίλμ, δηλαδή τα παλαιότερα βιοφίλμ είναι πιο δύσκολο να αφαιρεθούν από τα νεότερα βιοφίλμ, επειδή δεν είχαν το χρόνο να προσκολληθούν σφιχτά στο υπόστρωμα (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Zottola (1994), Muatapha and Liewen (1989), reviewed by Venø, Lena (1999)), όπου η αύξηση του *E. coli* O157:H7 πληθυσμού παρατηρήθηκε καθώς προχωρούσε ο χρόνος αποθήκευσης σε επιφάνειες που συναντώνται σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας κρέατος (Dourou et al (2011)) και τα γερασμένα βιοϋμένια του *L. monocytogenes* επέδειξαν ανθεκτικότητα σε ξήρανση (Hingston et al (2013), reviewed by Whitehead and Verran et al.,2015). Με την αληθινή έννοια της αρχιτεκτονικής του βιοφίλμ για μια σειρά από παθογόνα τροφίμων, τα ώριμα βιοφίλμ περιγράφονται γενικά ως μια συλλογή συστάδων ή πλεκτών αλυσίδων (*L. monocytogenes*) [Rieu et al (2008)], μπορεί να είναι σε σχήμα μπάλας (*L. monocytogenes*) [Rieu et al (2008)], σε σχήμα μανιταριού (σταφυλόκοκκοι) [Otto M (2008)] ή σε σχήμα κηρήθρας (*Vibrio cholerae*) (Berk et al (2012), reviewed by Whitehead and Verran et al 2015). Χρησιμοποιώντας *E. coli* αποδείχθηκε ότι τα βιοφίλμ προσαρμόζουν την αρχιτεκτονική τους προκειμένου να αντιμετωπίσουν υδροδυναμικές συνθήκες και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών ουσιών (Yazdi and Ardekani (2012); Teodo' sio et al (2013), reviewed by Whitehead and Verran et al.,2015). Ο σχηματισμός, η αρχιτεκτονική και η λειτουργία των βιοϋμενίων είναι πολύπλοκα φαινόμενα που επηρεάζονται από τις ιδιότητες της επιφάνειας, τους μικροβιολογικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες που σχετίζονται με το συγκεκριμένο βιομηχανικό περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται (Σχήμα 3)(Whitehead and Verran 2015). Όπως είναι αναμενόμενο, ο ρόλος της υδροδυναμικής έχει σημαντική επίδραση στην αρχιτεκτονική του βιοφίλμ.(Whitehead and Verran 2015).



Σχήμα 2. Χωρική κατανομή σε βιοφίλμ μεικτών ειδών: (A) ξεχωριστές μικροσκοπικές μονοειδών (Nielsen et al. 2000), (B) ανάμειξη (Rickard et al. 2006), (C) διατεταγμένα σε στρώματα (Habimana et al (2010), reviewed by Yuan et al (2020)).

Figure 1



Σχήμα 3: Μια σύνθετη αλληλεπίδραση παραγόντων έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό, την αρχιτεκτονική και, ως εκ τούτου, τη λειτουργικότητα του βιοφίλμ, που σχετίζονται με το συγκεκριμένο βιομηχανικό τρόφιμο στο περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται. (Whitehead and Verran et al (2015)).

Πολλά βακτηριακά είδη που ανήκουν σε βιομηχανικά και φυσικά περιβάλλοντα τείνουν να σχηματίζουν βιοϋμένια σε επιφάνεια ανοξειδώτου χάλυβα, τα οποία παραμένουν ανέπαφα ή λιγότερο επηρεασμένα ακόμη και μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση. Συνεπώς, θα πρέπει να δοθεί προσοχή προς σχεδιασμό του εξοπλισμού και στις φυσικές ιδιότητες του υλικού που χρησιμοποιείται (Yuan et al (2021)). Η παραγωγή βιοφίλμ μικτών ειδών είναι εξαιρετικά δυναμική και εξαρτάται από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας προσκόλλησης (Tang et al (2011)), τα συστατικά του πλέγματος του τροφίμου (Van Houdt and Michiels (2010)), τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Govaert et al (2018)) και τα εμπλεκόμενα βακτηριακά κύτταρα (Yuan et al (2018), Makoncova et al (2017), (reviewed by Carrascosa. et al. 2021)). Διαφοροποιήσεις στην ανάπτυξη, ειδικά για το στέλεχος και η επιβίωση μέσα σε βιοφίλμ πολλών εκιδών μπορεί να εξηγούν γιατί ορισμένοι τύποι *L. monocytogenes* επιμένουν στα τρόφιμα και υπογραμμίζει τη σημασία της συμπερίληψης περισσότερων του ενός στελέχους κάθε είδους σε μελέτες αλληλεπιδράσεων εντός μικροβιακών βιοφίλμ. (Fagerlund et al.,2021). Όταν τα βακτήρια αλληλοεπιδρούν συνεργιστικά στο σχηματισμό βιοφίλμ, υπάρχει η δυνατότητα αυξημένης επιβίωσης αυτών των βακτηρίων, παθογόνων βακτηρίων όπως το *E. coli* O157:H7 σε νοπιά προϊόντα περιβάλλοντα επεξεργασίας (Liu et al (2014), reviewed by Whitehead and Verran et al.,2015). Περιγράφεται μια συνεργατική κοινότητα δύο ειδών από τους Kives et al. (2005) έδειξε ότι τα βιοϋμένια που σχηματίζονται από *P. fluorescens* και *Lactococcus lactis* που απομονώθηκαν από νοπιά γάλα ήταν δομικά πιο πολύπλοκα και είχαν ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της βακτηριακής προσκόλλησης έως και 100 και 20.000 φορές για *P. fluorescens* και *L. lactis*, αντίστοιχα (reviewed by Yuan et al (2020)). Μία από τις παρενέργειες της ζωής σε ένα βιοφίλμ είναι ο ανταγωνισμός για τα θρεπτικά συστατικά και το οξυγόνο (Nivens et al (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Σε τέτοια συστήματα ο ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά και η ανοχή σε ανασταλτικές ενώσεις είναι πιθανόν να είναι υψηλότερης σημασίας για την επικράτηση ενός είδους από ό,τι η ικανότητα να προσκολλάται σε μια επιφάνεια και να δημιουργεί ένα ισχυρό πλέγμα (Fagerlund et al.,(2021)). Η σημασία των αλληλεπιδράσεων των μικτών ειδών στα βιοφίλμ στον τομέα των τροφίμων είναι περαιτέρω από μια σειρά πρόσφατων μελετών, στις οποίες εμπλέκονται η επεξεργασία γαλακτοκομικών προϊόντων, η ζυθοποιία, η ζύμωση, οι εγκαταστάσεις εστίασης, τα νοπιά προϊόντα, η επεξεργασία ψαριών και η επεξεργασία κρέατος (Yuan et al (2020)).

Ορισμένες δια-ειδικές αλληλεπιδράσεις εντός μικτών βακτηριακών κοινοτήτων διέπονται από ένα κύτταρο-κυτταρικό σύστημα επικοινωνίας γνωστό ως quorum sensing (QS). Το quorum sensing στηρίζεται στην παραγωγή και ανίχνευση αυτοενισχυτών και ενορχηστρώνει τις βακτηριακές αποκρίσεις ανάλογα με το επίπεδο αυτών των μορίων σήματος (Yuan et al (2020)). Τα βακτήρια χρησιμοποιούν το quorum sensing για να συντονίσουν την παραγωγή και τη διασπορά βιοφίλμ, όταν τα βακτήρια προσκολλώνται σε μια βιοτική ή αβιοτική επιφάνεια, και η προσκόλληση από κύτταρο σε κύτταρο εμπλέκεται σε επικοινωνία μέσω ενός εξωκυτταρικού συστήματος κυτταρικής

σηματοδότησης βασισμένου στο quorum sensing (QS) (Toushik et al (2020), (reviewed by Carrascosa. et al. 2021)). Τα βακτήρια στα βιοφίλμ επικοινωνούν μέσω μόρια σηματοδότησης και χρησιμοποιούν το quorum sensing για να βελτιστοποιήσουν τους παράγοντες ιογένεσης και την επιβίωσή τους [ten Cate (2006)]. Το quorum sensing αναγνωρίζεται ευρέως ως ένας αποτελεσματικός μηχανισμός ρύθμισης της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων που είναι υπεύθυνα για τις κοινές συμπεριφορές των βακτηρίων (Gonzalez and Keshavan (2006), (reviewed by Whitehead and Verran et al.,2015).

Τα βιοϋμένια είναι ικανά να προσκολλώνται σε μια πολύ μεγάλη ποικιλία με επιφάνειες με διακριτές βιοτικές και αβιοτικές συνθέσεις, συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπινων ιστών και των ιατρικών συσκευών (Carrascosa. et al. 2021). Ακόμη και σε μια ενιαία καλλιέργεια, η προσκόλληση μπορεί να εισάγει κάποια ετερογένεια, καθώς τα κύτταρα μπορεί να προσκολλώνται με διαφορετικούς τρόπους (Venø, Lena. (1999)). Η LAP είναι μια πρωτεΐνη προσκόλλησης (Jagadeesan et al (2010)), έχει αποδοθεί έμμεσα στο σχηματισμό βιοφίλμ (reviewed by Bai et al (2021)). Ένα άλλο πρωτεϊνικό μόριο που λειτουργεί ως προσκολλητική ουσία μεταξύ κυττάρων στο σχηματισμό βιοφίλμ είναι η πρωτεΐνη που σχετίζεται με το βιοφίλμ (Bar). Αρκετές πρωτεΐνες προσκόλλησης διαδραματίζουν βασικό ρόλο στη διαδικασία μόλυνσης από την *L. monocytogenes* και το σχηματισμό βιοφίλμ (Bai. et al. (2021)).

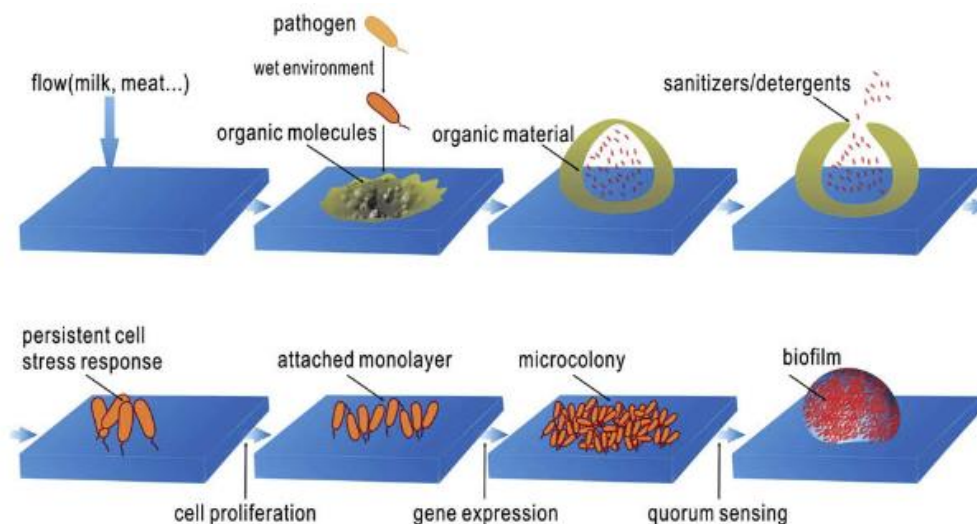
**Παράγοντες που σχετίζονται με τις επιφάνειες ή τα βακτήρια που μπορούν να επηρεάσουν την προσκόλληση από την πλαγκτονική φάση και την εξέλιξη του βιοφίλμ, όπως:** Επιφανειακό φορτίο, Υδροφοβικότητα, Θερμοκρασία, Παρουσία υποστρωμάτων, Βακτηριακά συστατικά της κυτταρικής επιφάνειας, φλοιοειδή (fimbria), βλεφαρίδες (pili) και μαστίγια (flagella) (González and Keshavan (2006), Plieth (2008), Rosado-Castro et al (2018), Rosenberg and Kjelleberg (1986), (reviewed by Carrascosa. et al. 2021)).

## **1.2.Ανάπτυξη βιοϋμενίου σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων**

Η στερεή επιφάνεια μπορεί να είναι βιοτική (κρέας, προϊόντα, στοματική κοιλότητα, έντερο, ουρογεννητικός σωλήνας, δέρμα, κ.λπ.) ή αβιοτική (δάπεδα, τοίχοι, αποχετεύσεις, εξοπλισμός ή επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα). Μικρόβια προσκολλώνται σε επιφάνειες παράγοντας μια εξωκυτταρική πολυμερή ουσία (EPS) που σχηματίζει ένα τρισδιάστατο σκελετό βιοϋμενίου. Μεταφορικά, το EPS είναι το "σπίτι" που καλύπτει και προστατεύει βακτήρια στα βιοϋμένια (Flemming, et al (2007)). Παρόλο που η αρχιτεκτονική του βιοφίλμ είναι συμπαγής, προστατεύει τα βακτήρια από φυσική επίδραση, το μεγαλύτερο μέρος του βιοϋμενίου εξακολουθεί να αποτελείται από νερό (Yaron and Romling (2014), reviewed by Bai. et al.,(2021)). Οι σύγχρονες γραμμές επεξεργασίας τροφίμων αποτελούν κατάλληλο περιβάλλον για το σχηματισμό βιοφίλμ στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, κυρίως λόγω της πολυπλοκότητας των μονάδων παραγωγής, της μεγάλης παραγωγικής περιόδου, τη μαζική παραγωγή προϊόντων και τις μεγάλες περιοχές ανάπτυξης βιοϋμενίων (Lindsay and von Holy (2006), (reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Επειδή ο

σχηματισμός ενός βιοϋμενίου περιλαμβάνει ως πρώτο βήμα τη σύνδεση ή προσκόλληση πλαγκτονικών κυττάρων σε μια στερεή επιφάνεια, εάν η επιφάνεια στην οποία σχηματίζεται το βιοφίλμ τροποποιηθεί σε ορισμένο βαθμό, για παράδειγμα, με τροποποίηση της μορφολογίας της ή των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της (π.χ. υδροφοβικότητα, υδρόφιλοτητα, ηλεκτρικό φορτίο), η μικροβιακή προσκόλληση και η επακόλουθη ανάπτυξη και ωρίμανση του βιοφίλμ μπορούν να περιοριστούν. Η προσκόλληση βακτηρίων σε βιομηχανικές επιφάνειες μπορεί στη συνέχεια να ελαχιστοποιηθεί με τη χρήση ελεγχόμενης τοπογραφίας, όπως έδειξαν οι Hsu et al. (2013) χρησιμοποιώντας πυρίτιο και αλουμίνιο (reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)). Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό βιοφίλμ είναι οι ιδιότητες της επιφάνειας και η εναπόθεση οργανικού υλικού. Πριν από την έναρξη του σχηματισμού βιοφίλμ, η αρχική κυτταρική προσκόλληση, προσκόλληση (σε επιφάνειες), συγκράτηση και πολλαπλασιασμός των κυττάρων πρέπει να συμβούν (Whitehead and Verran 2015). Οι χημικές, τοπογραφικές και φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας επηρεάζουν την αρχική προσρόφηση και κατανομή των οργανικών υλικών (Bonsaglia et al. (2014); Whitehead and Verran (2007); Chaturongkasumrit et al (2011); Whitehead et al. (2009), reviewed by Whitehead and Verran et al.,2015). Μόλις μια επιφάνεια έχει προσβληθεί με οργανικό υλικό, το βιοφίλμ μπορεί να λάβει χώρα ως σχηματισμός βιομάζας, η αρχιτεκτονική της οποίας, θα εξαρτάται από μια σειρά περιβαλλοντικών και μικροβιολογικών επιδράσεων (Whitehead and Verran 2015). Πρώτον, οργανικά μόρια από τα τρόφιμα εναποτίθενται στις επιφάνειες των εξοπλισμών. Δεύτερον, βιολογικά ενεργοί μικροοργανισμοί προσελκύονται στις διαμορφωμένες (conditioned) επιφάνειες. Τρίτον, ορισμένα μικροβιακά κύτταρα παραμένουν ακόμη και μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση και ξεκινούν την ανάπτυξή τους. Τέλος, μεγαλύτερα βιοϋμενία σχηματίζονται με τη βοήθεια της έκφρασης γονιδίων και του quorum sensing (Σχήμα 4). Κατά τη διαδικασία του σχηματισμού βιοϋμενίου, οι ιδιότητες του υποστρώματος και των επιφανειών των κυττάρων, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που το περιβάλλουν και η γενετική ρύθμιση των βακτηρίων παίζουν σημαντικό ρόλο στην αναστρέψιμη ή μη αναστρέψιμη προσκόλληση και στο σχηματισμό μικροαποικιών σε ένα μεγάλο βιοφίλμ. (Shi and Zhu 2009). Πολυάριθμες επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένου του ανοξειδωτού χάλυβα και του τεφλόν έχουν αποδειχθεί ότι προσελκύουν πρωτεΐνες γάλακτος και σχηματίζουν διαμορφωμένα (conditioned) υποστρώματα (Mcguire & Swartzel, 1989, Speers & Gilmour, 1985), τα οποία μπορεί να ενθαρρύνουν ή να αναστέλλουν βακτηριακή προσκόλληση ανάλογα με τη συγκέντρωση του γάλακτος (reviewed by Shi and Zhu (2009)). Στη βιομηχανία τροφίμων, είδη που σχηματίζουν βιοφίλμ εμφανίζονται σε περιβάλλοντα εργοστασίων και μπορούν να είναι παθογόνα για τον άνθρωπο επειδή αναπτύσσουν δομές βιοϋμενίου. Τα περιβάλλοντα επεξεργασίας της βιομηχανίας τροφίμων, π.χ. ξύλο, γυαλί, ανοξειδωτός χάλυβας, πολυαιθυλένιο, καουτσούκ, πολυπροπυλένιο, κ.λπ., λειτουργούν ως τεχνητά υποστρώματα για αυτά τα παθογόνα (Abdallah et al (2015), Colagiorgi et al (2017), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Στις φυσικές και βιομηχανικές παροχές νερού, ο σχηματισμός βιοϋμενίου συμβαίνει παρά τη χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά (Venø, Lena. (1999)). Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν επίσης να προσκολληθούν και να αναπτυχθούν

σε επιφάνειες τροφίμων, εξοπλισμό και περιβάλλοντα επεξεργασίας για να σχηματίσουν βιοϋμένια. Για παράδειγμα, η *Listeria monocytogenes* σχηματίζει βιοϋμένια σε αποχετεύσεις δαπέδων, δεξαμενές αποθήκευσης, χειροκίνητα φορτηγά, ιμάντες μεταφοράς και άλλα υλικά που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα (Kim & Frank, 1995- Mafu et al (1990), reviewed by Shi and Zhu (2009)). Τέλος, οι παραγωγοί τροφίμων θα πρέπει επίσης να γνωρίζουν το γεγονός ότι τα βιοϋμένια που σχηματίζονται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων μπορούν να προστατεύσουν μεμονωμένα κύτταρα από διάφορους παράγοντες επεξεργασίας και υγιεινής, μπορούν επίσης να λειτουργήσουν ως δεξαμενή μικροοργανισμών με αυξημένη ανθεκτικότητα έναντι ευρέου φάσματος αντιμικροβιακών ουσιών και συνθηκών πίεσης. Από την άποψη αυτή, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι τα βιοϋμένια έχουν αναγνωριστεί ως εστίες για γενετικής προσαρμοστικότητας και οριζόντιας μεταφοράς γονιδίων (Mo et al. (2017), Van Meervenne et al. (2014)), διευκολύνοντας έτσι τη διάδοση κινητών γενετικών στοιχείων και καθοριστικών παραγόντων ανθεκτικότητας εντός και μεταξύ των ειδών που κατοικούν σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)).



Σχήμα 4: Αλληλουχία γεγονότων στο σχηματισμό βιοφίλμ σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Πρώτον, οργανικά μόρια από τα τρόφιμα εναποτίθενται στην επιφάνεια του εξοπλισμού και σχηματίζουν ένα διαμορφωμένο (conditioned) φιλμ. Δεύτερον, οι βιολογικά ενεργοί μικροοργανισμοί έλκονται από τα οργανικά μόρια. Τρίτον, παραμένουν επίμονα μικροβιακά κύτταρα μετά τον καθαρισμό και την απολύμανση και ξεκινούν την ανάπτυξή τους. Τέλος, το βιοφίλμ σχηματίζεται με την έκφραση κυτταρικών γονιδίων και το quorum sensing (Shi and Zhu (2009)).

Τα βιοϋμένια συνεπάγονται μεγάλες προκλήσεις για τη βιομηχανία τροφίμων, επειδή επιτρέπουν στα βακτήρια να προσκολλώνται σε μια σειρά επιφανειών, όπως καουτσούκ, πολυπροπυλένιο, πλαστικό, γυαλί, ανοξείδωτο ατσάλι, ακόμη και σε προϊόντα τροφίμων, μέσα σε λίγα μόλις λεπτά, τα οποία ακολουθούνται από ανάπτυξη ώριμων βιοϋμενίων μέσα σε λίγες ημέρες (ή και ώρες) (Hall-Stoodley et al (2004), (reviewed by Carrascosa. et al. (2021))). Αν και υπάρχουν πολλές μελέτες για το σχηματισμό βιοϋμενίου σε πλαστικό, ανοξείδωτο χάλυβα ή γυάλινες επιφάνειες, απαιτούνται πιο εμπεριστατωμένες μελέτες των βιοϋμενίων που σχηματίζονται από τροφιμογενή παθογόνα, που σχηματίζονται απευθείας

σε επιφάνειες τροφίμων, για παράδειγμα σε φλούδες πεπονιού ή σε τσόφλια αυγών (Bai. et al. (2021)). Ωστόσο, τα κρίσιμα σημεία, όπως οι ρωγμές και τα άκρα, όπου τα βιοφίλμ εμφανίζονται εύκολα αλλά είναι δύσκολο να προσεγγιστούν, αποτελούν πρόκληση να ληφθούν δείγματα (Winkelstroter et al. (2014), reviewed by Yuan et al (2020)).

Ορισμένα πειράματα αποκάλυψαν ότι η προσκόλληση βακτηρίων είναι πιο πιθανό να συμβεί σε πιο τραχιές επιφάνειες (Tang et al (2011), Dhowlaghar et al (2018)), ενώ άλλα δεν διαπίστωσαν καμία συσχέτιση μεταξύ της τραχύτητας και της προσκόλλησης βακτηρίων (Jindal et al (2018)). Υδροφοβες επιφάνειες τείνουν να προσελκύουν περισσότερα βακτήρια, αλλά οι μελέτες που εξέτασαν την επίδραση της υδροφοβικότητας παρουσιάζουν αντίθετα αποτελέσματα (Gomes et al (2015), Veluz et al (2012)), ενώ άλλα πειράματα δείχνουν ότι οι υδρόφιλες επιφάνειες επιτρέπουν την προσκόλληση περισσότερων βακτηρίων από ό,τι οι αντίστοιχες υδρόφοβες (Dhowlaghar et al (2018), Jindal et al (2018), (reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Εάν τα υλικά της επιφάνειας είναι λεία και σε καλή κατάσταση (χωρίς ρωγμές ή αδιέξοδα) καθαρίζονται εύκολα. Ένας μικρός συντελεστής R (R = τραχύτητα υλικού) σημαίνει ότι το υλικό έχει μόνο λίγες ρωγμές (Venø, Lena's personal interview (1998)). Στη βιομηχανία τροφίμων ορισμένοι οργανισμοί έχουν θέσει πρότυπα για τους υψηλότερους συντελεστές R που είναι αποδεκτοί (Friis 1998), reviewed by Venø, Lena (1999)).

Στις βιομηχανίες τροφίμων, οι επιπτώσεις που σχετίζονται με το βιοφίλμ (παθογένεια, διάβρωση μεταλλικών επιφανειών, και αλλοίωση των οργανοληπτικών ιδιοτήτων λόγω έκκρισης πρωτεασών ή λιπασών) είναι ζωτικής σημασίας. Για παράδειγμα, στη γαλακτοβιομηχανία διάφορες διεργασίες και δομές (αγωγοί, δεξαμενές νωπού γάλακτος, φυγόκεντροι βουτύρου, παστεριωτές, δεξαμενές τυριού, εργαλεία συσκευασίας) μπορούν να λειτουργήσουν ως επιφανειακά υποστρώματα για το σχηματισμό βιοφίλμ σε διαφορετικές θερμοκρασίες και περιλαμβάνουν αρκετές μικτά αποικιστικά είδη (Carrascosa. et al. (2021). Το βιοφίλμ μπορεί να σχηματιστεί παντού: σε τουαλέτες, νεροχύτες, βιομηχανικά συστήματα νερού και σε ιατρικές συσκευές. Το βιοφίλμ μπορεί να προκαλέσει απώλεια ενέργειας και μπλοκάρισμα των σωλήνων, των πύργων ψύξης και των δεξαμενών νερού. Επιπλέον, η διάβρωση της διεργασίας εξοπλισμού και αλλαγή στη μετάδοση θερμότητας ως συνέπεια του σχηματισμού βιοφίλμ (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), reviewed by Venø, Lena (1999)). Ως εκ τούτου, οι επιφάνειες και τα υλικά του εξοπλισμού, καθώς και τα δάπεδα και οι τοίχοι, επηρεάζουν επίσης τα βιοφίλμ, μαζί με τις νεκρές περιοχές, ρωγμές, πορώδεις και τραχιές επιφάνειες υλικών, οι οποίες πρέπει να εξαλειφθούν για την αποφυγή σχηματισμού βιοφίλμ (Simoes et al (2010), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Βιοφίλμ που σχηματίζεται στο εσωτερικό των σωλήνων μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη ροή μέσω του σωλήνα. Ως συνέπεια της αυξημένης ρύπανσης, η μετάδοση θερμότητας μπορεί να μειωθεί, το προϊόν μπορεί να μολυνθεί και οι σωλήνες μπορεί να διαβρωθούν λόγω της παραγωγής οξέων στο βιοφίλμ. Στις βιομηχανίες τροφίμων, το βιοφίλμ μπορεί να οδηγήσει

σε μικροβιακή μόλυνση του εξοπλισμού (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Genigeorgis (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένοι οι σωλήνες, αντλεί οργανικό υλικό και ιόντα, με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια διαμορφωμένη (conditioned) επιφάνεια (Venø, Lena (1999)). Τα βιοφίλμ βρίσκονται συχνά σε ρωγμές, γωνίες, παρεμβύσματα, αρμούς και ρωγμές στο υλικό του σωλήνα ή σε αδιέξοδα του συστήματος των σωλήνων (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Genigeorgis (1995)). Εάν το βιοφίλμ δεν απομακρυνθεί εγκαίρως, το πάχος του φιλμ μπορεί να μεταβάλει τον ρυθμό ροής (reviewed by Venø, Lena (1999)). Ο σχηματισμός βιοφίλμ σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων αποτελεί απειλή για τα γαλακτοκομικά προϊόντα από άποψη ποιότητας και διάρκεια ζωής (Rather et al (2021)).

Ένας αριθμός παραγόντων, όπως η αυξημένη επεξεργασία, ο χρόνος, το πολύπλοκο σύστημα επεξεργασίας, η καθυστερημένη μεταφορά και η διανομή κ.ο.κ., έχουν αυξήσει πολλές φορές το πρόβλημα του σχηματισμού βιοφίλμ, οδηγώντας σε υποβάθμιση της ποιότητας των γαλακτοκομικών προϊόντων και σε αυξημένη πιθανότητα εμφάνισης εστιών ασθενειών (Teh et al (2014), reviewed by Rather et al (2021))<sup>1</sup>. Η μαστίτιδα των βοοειδών συγκαταλέγεται μεταξύ των πιο κοινών ασθενειών που πρέπει να αντιμετωπίσει η γαλακτοβιομηχανία, με αποτέλεσμα σημαντικές οικονομικές απώλειες λόγω της απώλειας γάλακτος και του κόστους θεραπείας. Αυτό προκαλείται από παθογόνους σταφυλόκοκκους που είναι ικανοί να σχηματίζουν βιοφίλμ στο εσωτερικό του μαστού και να το καθιστούν αναποτελεσματική την επακόλουθη αντιβιοτική θεραπεία (Giaouris et al (2020)).

Στις εταιρείες ζυθοποιίας, η μόλυνση μπορεί να συμβεί είτε κατά τη διάρκεια της παραγωγής (πρωτογενείς μολύνσεις) ή κατά την πλήρωση του προϊόντος (δευτερογενείς μολύνσεις). Εντός του τομέα της ζυθοποιίας, σχεδόν τα μισά από όλα τα περιστατικά μόλυνσης αποδίδονται στα στάδια της πλήρωσης, δηλαδή κατά την εμφιάλωση, την σφράγιση, την κονσερβοποίηση και τη βαρελοποίηση (Wagner et al.,(2021); Back (2003); Storgårds (2000); Storgårds and Priha (2009). Διάφορες μελέτες έχουν εντοπίσει βασικούς μικροοργανισμούς σε ζυθοποιεία που βρέθηκαν χρονικά και χωρικά ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, υποδεικνύοντας μια υψηλού βαθμού εξειδίκευση στην εγκατάσταση και τη μικροβιακή ποικιλομορφία (Bokulich et al (2015);Jespersen and Jakobsen (1996); Priha et al (2016);Schneiderbanger et al (2018); Timke et al (2005); Timke et al (2005); Timke et al (2008); Timke et al (2004)). Ο πιο προβληματικός μικροοργανισμός αλλοίωσης της μύρας είναι ο *Lactobacillus brevis* (Riedl et al (2019); Schneiderbanger et al (2018), reviewed by Wagner et al.,2021). Έχει αποδειχθεί ότι οι *L.brevis* που απομονώθηκαν από διάφορες περιοχές κατά μήκος της γραμμής παραγωγής της μύρας είναι σε θέση να παράγουν βιοϋμένια (Riedl et al (2019)). Επίσης αξιοσημείωτο είναι ότι η αραιωμένη μύρα (δηλ. μύρα 50% αραιωμένη με νερό- μύρα σίτου, μύρα lager, pilsener και δυνατή μύρα) έχει παρουσιάσει ενισχυμένο σχηματισμό βιοϋμενίου σε σύγκριση με την καθαρή μύρα (Riedl et al (2019)) Αυτό θα μπορούσε να προκύψει από την αραιώση των εχθρικών ενώσεων



που απαντώνται στη μύρα, όπως η αιθανόλη, το CO<sub>2</sub> και τα πικρά οξέα λυκίσκου. Οι θέσεις στην περιοχή πλήρωσης, όπου τα υπολείμματα της μύρας αραιώνονται με υπολείμματα νερού καθαρισμού, θα μπορούσαν να υποστηρίξουν το σχηματισμό βιοφίλμ από το *L. brevis*. (reviewed by Wagner et al.,2021). Μετά την παραγωγή, πολλές μύρες διανέμονται σε βαρέλια που συνδέονται με συστήματα διανομής σε χώρους λιανικής πώλησης, όπου υπάρχουν άφθονες ευκαιρίες για μικροβιακή αλλοίωση. Ένα συνήθως παραγνωρισμένο στάδιο ποιοτικού ελέγχου της αλυσίδας εφοδιασμού μύρας βρίσκεται στο τέλος της λιανικής πώλησης, όπου τα βαρέλια μύρας τροφοδοτούν γραμμές βαρελιών σε μπαρ και εστιατόρια υπό μη αποστειρωμένες συνθήκες (Bose. et al.,2021). Από την πλευρά της διανομής, οι Bose et al (2021) παρατήρησαν ότι η συνήθης γραμμή διαδικασίας καθαρισμού είναι ανεπαρκής για τη διατήρηση της ποιότητας της μύρας σε συστήματα βυτιοφόρων λιανικής πώλησης και ότι επιμένουν τα ανθεκτικά μικροβιακά βιοφίλμ που αποκαθιστούν γρήγορα πολύπλοκες κοινότητες αλλοίωσης.

#### **Θέσεις ανάπτυξης βιοφίλμ από συγκεκριμένους μικροοργανισμούς:**

Τυπικές θέσεις όπου η *L. monocytogenes* επιβιώνει σε περιβάλλοντα παραγωγής τροφίμων είναι γρατζουνιές ή αυλακώσεις ή μεταξύ διαφορετικών τύπων (φθαρμένων) υλικών ή πολύπλοκου εξοπλισμού, όπως αποχετεύσεις, δάπεδα, μεταφορείς ή τεμαχιστές, θέσεις που είναι συχνά δύσκολο να προσεγγιστούν και όπου τείνουν να συσσωρεύονται θρεπτικά συστατικά και στερεά, καθώς και θέσεις σε θερμοκρασία δωματίου ή πιο κρύες [Carpentier and Cerf (2011)]. Για παράδειγμα, το βιοφίλμ σχηματίζεται σε ανοιχτές λείες επιφάνειες από ανοξείδωτο χάλυβα, πιθανότατα να αποτελεί σημαντικό ζήτημα στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων. Παρ' όλα αυτά, οι περισσότερες μελέτες που έχουν αναθεωρηθεί χρησιμοποιούν ανοξείδωτες επιφάνειες (coupons) από ανοξείδωτο χάλυβα ως υλικό στερεάς επιφάνειας (reviewed by Fagerlund et al.,(2021)). Η *Listeria monocytogenes* έχει ανιχνευθεί σε αποχετεύσεις, συμπυκνωμένο ή στάσιμο νερό, δάπεδα και εξοπλισμό επεξεργασίας (Genigeorgis (1995)). Μετά από καθαρισμό, η *Listeria monocytogenes* μπορεί να επιβιώσει σε αερολύματα και αποτελούν απειλή επαναμόλυνσης (Venø, Lena. (1999)). Στα πολυμικροβιακά βιοφίλμ, η *Pseudomonas* έχει αποδειχθεί ότι υποστηρίζει την παραμονή και την επιβίωση του *L. monocytogenes* σε ιμάντες μεταφοράς σε μια μονάδα επεξεργασίας σολομού η οποία επαληθεύτηκε περαιτέρω σε συνθήκες προσομοίωσης (Langsrud et al.,2016, reviewed by Bai et al (2021)).

Ο *Streptococcus thermophilus* έχει βρεθεί προσκολλημένος στους εναλλάκτες θερμότητας σε εξοπλισμό επεξεργασίας γάλακτος. Το βιοφίλμ βρέθηκε στην πλευρά της εκροής του παστεριωμένου γάλακτος και στην πλευρά όπου εισέρχεται το νωπό γάλα αντίστοιχα (Genigeorgis (1995)). Σπόρια του *Bacillus cereus* έχουν επίσης βρεθεί στο γάλα, αυτά προκαλούν προβλήματα επειδή είναι υδρόφοβα και επομένως έλκονται από τις επιφάνειες των σωλήνων της διεργασίας εξοπλισμού (Anderson et al (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)).

Τα είδη *Bacillus* απαντώνται συχνά στο περιβάλλον επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων και μπορούν να σχηματίσουν βιοφίλμ σε επιφάνειες που περιέχουν τα σπόρια τους και με αυτόν τον τρόπο

να αντιστέκονται στα καθεστώτα καθαρισμού στο χώρο (CIP) που εφαρμόζονται συνήθως στη γαλακτοβιομηχανία (Giaouris et al (2020)).

Για παράδειγμα, υπολείμματα τροφίμων όπως το γάλα και το κρέας που εμπλουτίζονται με πρωτεΐνες, λίπη και υδατάνθρακες, προάγουν την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό των μικροοργανισμών και ευνοούσαν το σχηματισμό βιοφίλμ δύο ειδών από τα *E. coli* και *S.aureus* (Dutra et al. 2018). Η λακτόζη του γάλακτος αύξησε το βιοφίλμ σχηματισμό τόσο από τον *Bacillus subtilis*, μέσω της ενεργοποίησης του LuxS-διαμεσολαβούμενου συστήματος quorum sensing (Duanis-Assaf et al. 2016), όσο και στον *S. aureus*, μέσω της προώθησης πολυσακχαριτών διακυτταρικής προσκόλλησης (Xue, Chen και Shang 2014). Υψηλές συγκεντρώσεις ελεύθερου  $Ca^{2+}$  και  $Mg^{2+}$  στο γάλα είχαν ως αποτέλεσμα τον ενισχυμένο σχηματισμό βιοφίλμ από *Geobacillus* spp. (Somerton et al. (2015), reviewed by Yuan et al (2020)).

### **Παραδείγματα μικροοργανισμών που παράγουν βιοφίλμ στη βιομηχανία τροφίμων**

Ο μικροβίοκοσμος που βρίσκεται στις επιφάνειες εγκαταστάσεων επεξεργασίας τροφίμων μετά από διαδικασίες απολύμανσης αναφέρεται συνήθως ότι είναι ποικίλος και περιλαμβάνει παθογόνα και αλλοιογόνα βακτήρια, καθιστώντας την απομάκρυνσή τους από τις επιφάνειες επαφής με τα τρόφιμα μια τεράστια πρόκληση (Maes et al. (2019), reviewed by Yuan et al (2021)). Η σύνθεση των βακτηρίων στα βιοφίλμ επίσης επηρεάζεται από τα υλικά της επιφάνειας, τις συνθήκες ανάπτυξης και την ωριμότητα του βιοφίλμ (Pinto et al (2019), reviewed by Bai et al (2021)). Οι περισσότεροι μικροοργανισμοί σε ένα βιοφίλμ είναι αερόβιοι αλλά οι αναερόβιοι μικροοργανισμοί είναι επίσης παρόντες (Genigeorgis (1995)). Η έλλειψη οξυγόνου θα οδηγήσει στο σχηματισμό μιας ανοξικής ζώνης, όπου επικρατούν αναερόβιες συνθήκες και όπου τα ζυμωτικά βακτήρια είναι ιδιαίτερα ενεργά (Genigeorgis (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Επιπλέον, η δυνατότητα χρήσης ευεργετικών βιοφίλμ για την παραγωγή μύρας δοκιμάστηκε και συνεχής ζύμωση με αντιδραστική ακινητοποιημένη μαγιάς φάνηκε να είναι μια πολλά υποσχόμενη διαδικασία. (Wagner et al.,2021). Μία από τις πιο διερευνημένες παραμέτρους είναι αυτή της θερμοκρασίας, η οποία με διάφορα στελέχη *L. monocytogenes* ή *S. enterica* που βρέθηκαν σε περιβάλλον παραγωγής τροφίμων [Weiler et al (2013); Kadam SR et al (2013); Nilsson et al (2011); Schonewille et al (2012)]. Το pH και τα βιοκτόνα έχουν επίσης αποδειχθεί να έχουν σημαντική επίδραση στην αρχιτεκτονική του βιοφίλμ- τα παθογόνα τροφίμων *E. coli*, *L. monocytogenes* ή *S. enterica* ορότυποι *Typhimurium* έδειξαν ότι η αυξημένη παραγωγή βιοϋμενίου συσχετίστηκε με τις πιο όξινες ή τις πιο αλκαλικές συνθήκες ανάπτυξης που εξετάστηκαν [Lianou and Koutsoumanis (2012);Nguyen et al (2014) ; Capita et al (2014);Schlisselberg and Yaron (2013);Corcoran et al (2014)]. Σε αντίθεση με τα παραπάνω ευρήματα, άλλοι διαπίστωσαν ότι δεν υπήρχε καμία σταθερή σχέση μεταξύ της ικανότητας σχηματισμού βιοφίλμ και της ικανότητας να αντέχει σε εκθέσεις στρες (όξινα, αλκαλικά, θερμότητα και επεξεργασίες υψηλής υδροστατικής πίεσης) χρησιμοποιώντας βεροκυτταροτοξινογόνα στελέχη *E. Coli* (Alvarez-Ordóñez et al (2013), (reviewed by Whitehead and Verran 2015). Η σημασία και το αντίκτυπο των βιοϋμενίων στη

βιομηχανία τροφίμων έχουν καταστεί σαφείς σε διάφορες εργασίες όπου η διασταυρούμενη επιμόλυνση είναι κοινή μεταξύ αυτών των τροφίμων, με ένα ευρύ φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp., *Bacillus cereus* και *Echerichia coli*. O157:H7 (Anand et al (2014), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)).

Οι συνήθεις μικροοργανισμοί που σχηματίζουν βιοφίλμ ποικίλλουν σε διαφορετικά περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, οι οποίοι μπορεί να περιλαμβάνουν *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus* spp., *Lactobacillus* spp., *Brochothrix thermosphacta*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Serratia* spp., *Enterobacteriaceae*, *Psychrobacter*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Campylobacter* spp. και *Pseudomonas* spp. (Ray and Bhunia (2014), Mazaheri et al (2021), reviewed by Bai et al (2021), Møretro and Langsrud (2017)). Ορισμένα βακτήρια έχουν μεγαλύτερη τάση να σχηματίζουν βιοφίλμ. Τα πιο συνηθισμένα από αυτά είναι τα *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* και *Bacillus* (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Genigeorgis (1995)). Τα βακτήρια που συνήθως βρίσκονται στο πόσιμο νερό είναι τα *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* και *Achromobacter* (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), reviewed by Venø, Lena (1999)).

Η *L. monocytogenes* είναι ένα ανθεκτικό παθογόνο με την ικανότητα να σχηματίζει βιοφίλμ σε τρόφιμα και επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα. Τα βιοφίλμ της *L. monocytogenes* αναπτύσσονται μέσω των διαδικασιών της αρχικής προσκόλλησης, του σχηματισμού μικροαποικιών και της ωρίμανσης (Shi and Zhu 2009). Μόλις η *L. monocytogenes* βρει μια θέση σε μια εγκατάσταση επεξεργασίας τροφίμων, μπορεί να προσκολληθεί σε διάφορες αβιοτικές επιφάνειες, όπως ο ανοξείδωτος χάλυβας, το PVC και το πολυστερένιο, και να αρχίσει να σχηματίζει βιοϋμένια, τα οποία μπορεί να είναι ανθεκτικά στην απολύμανση και να οδηγήσουν σε επαναλαμβανόμενη μόλυνση των τροφίμων (Di Bonaventura et al (2008), Reis-Teixeira et al (2017), reviewed by Bai et al (2021)). Τα βιοφίλμ αναπτύχθηκαν σε γυάλινα καλύμματα σε αντιδραστήρα με εφαρμοζόμενες διατμητικές δυνάμεις και η *L. monocytogenes* διαπιστώθηκε ότι μεταναστεύει στο κάτω στρώμα του βιοφίλμ διπλού είδους. Ενδεχομένως, η *L. monocytogenes* μόνη της δεν ήταν σε θέση να σχηματίσει παχύ βιοφίλμ παρουσία διατμητικών δυνάμεων, ενώ το στη συγκαλλιέργεια, η *Pseudomonas* που σχηματίζει ισχυρά βιοφίλμ παρείχε ένα προστατευμένο βιοφίλμ στο οποίο η *L. monocytogenes* μπορούσε να ευδοκιμήσει (Puga et al (2018)), (reviewed by Fagerlund et al (2021)). Μια τέτοια μελέτη σημείωσε ότι αν και δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο σχηματισμό βιοφίλμ μεταξύ ανθεκτικών και μη ανθεκτικών στελεχών *Listeria monocytogenes* από τον ίδιο γονότυπο στους 30°C (Ochiai et al. 2014)), τα ανθεκτικά απομονωμένα στελέχη της *L. monocytogenes* παρήγαγαν σημαντικά περισσότερο βιοφίλμ στους 37°C

σε σχέση με τα μη ανθεκτικά στελέχη. Επιπλέον, σε μια μελέτη απομονώσεων που απομονώθηκαν αρχικά από τρόφιμα και μη τρόφιμα που ήρθαν σε επαφή με επιφάνειες σε 30 καταστήματα λιανικής πώλησης (*delicatessens*), παρατηρήθηκε αυξημένη προσκόλληση μεταξύ 23 *L. Monocytogenes* επίμονων στελεχών σε σχέση με 73 μη επίμονα στελέχη την 1η ημέρα μιας δοκιμασίας σχηματισμού προσκόλλησης-βιοφίλμ 5 ημερών (Wang et al. (2015a), reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)). Άλλοι μικροοργανισμοί από περιβάλλοντα της βιομηχανίας τροφίμων που μελετήθηκαν πρόσφατα σε βιοϋμένια μικτών ειδών με το *L. monocytogenes* είναι τα *Bacillus*, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος, *Escherichia coli*, *Vibrio*, *Salmonella*, *Staphylococcus* και ζύμες [Oxaran et al (2018);Alonso et al (2020);de Grandi et al (2018), Alonso and Kabuki (2019), Jara et al (2020), Dygico et al (2019), Hossain et al (2020), Shao et al (2020), Chen et al (2019), Agusti'n and Brugnoni (2018)]. Ωστόσο, δεν απομονώνονται συνήθως όλοι αυτοί οι μικροοργανισμοί από κοινού με τον *L. monocytogenes* στη βιομηχανία τροφίμων, υποδεικνύοντας ότι μπορεί να υπάρχουν σε άλλες οικολογικές θέσεις από τον *L. monocytogenes* στα εργοστάσια. Άλλες μελέτες, που εξετάζουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του *L. monocytogenes* και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών όπως του *P. aeruginosa* ή της *Salmonella Typhimurium* [Iniguez-Moreno et al (2019), Yamakawa et al (2018), Govaert et al (2019)], έχουν πολύ περιορισμένη σημασία για τη βιομηχανία τροφίμων, δεδομένου ότι αυτά τα παθογόνα σπάνια συναντώνται μαζί σε περιβάλλοντα της βιομηχανίας τροφίμων (Møretro and Langsrud (2017)) (reviewed by Fagerlund et al.,(2021)).

Τα στελέχη *Salmonella* που απομονώθηκαν από προϊόντα, τα οποία σχημάτιζαν μεγαλύτερα βιοϋμένια σε πολυστυρένιο, πολυκαρβονικό και ανοξειδωτο χάλυβα και παρέμειναν σε σημαντικά υψηλότερους αριθμούς σε φύλλα σπανακιού μετά την άρδυσή τους με τεχνητά μολυσμένο νερό από ό,τι η *Salmonella*, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα στελέχη προϊόντων έχουν αποκτήσει ειδικές ικανότητες να αποικίζουν υλικά επαφής και τρόφιμα στην αλυσίδα εφοδιασμού προϊόντων (Patel et al. 2013)). Παρομοίως, θερμόφιλα στελέχη των *Geobacillus* spp. και *Anoxybacillus flavithermus*, που απομονώθηκαν αρχικά από σκόνη γάλακτος, αποδείχθηκε ότι σχηματίζουν καλά βιοϋμένια σε ανοξειδωτο χάλυβα μόνο παρουσία αποβουτυρωμένου γάλακτος, γεγονός που υποδηλώνει την υψηλή εξάρτηση των ειδών αυτών από το υπόστρωμα για το σχηματισμό βιοϋμένιου (Sadiq et al. (2017), reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)). Ο *S. enterica* ορότυπος *Typhimurium* είναι ένα από τα πιο κοινά βακτηριακά στελέχη που σχετίζονται με την ανθρώπινη γαστρεντερίτιδα (Zhang et al., (2003)). Αυτό το βακτήριο έχει αποδειχθεί να σχηματίζει βιοϋμένια σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες (reviewed by Shi and Zhu et al.,(2009))

Όσον αφορά την *E. coli*, έχει αναφερθεί ότι τα στελέχη του ορότυπου O103:H2 παράγουν περισσότερο βιοφίλμ, σε μια ποικιλία διαφορετικών θερμοκρασιών (12°C, 20°C και 37°C), από ό,τι τα στελέχη που αντιπροσωπεύουν τον ορότυπο O26:H11 ή O103:H25 (Nesse et al. (2014), reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)). Η *E. coli* μπορεί να χρησιμοποιήσει βλεφαρίδες, μαστίγια και μεμβρανικές

πρωτεΐνες για να ξεκινήσει την προσκόλληση σε αβίωτες επιφάνειες, όταν τα μαστίγια χάνονται μετά την προσκόλληση και τα βακτήρια αρχίζουν να παράγουν μια εξωκυττάρια πολυμερή ουσία (EPS) που βοηθά στην καλύτερη αντοχή των βακτηρίων στα απολυμαντικά (Lim et al (2019), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)).

Ο *Pseudomonas* είναι ένα ετερότροφο, κινητικό, αρνητικό κατά Gram ραβδοειδές βακτήριο. Οι ψευδομονάδες είναι γενικά πανταχού παρόντες ψυχρότροφοι οργανισμοί αλλοίωσης που βρίσκονται συχνά σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των δαπέδων και των αποχετεύσεων, καθώς και σε φρούτα, λαχανικά, και στις επιφάνειες κρέατος, καθώς και σε γαλακτοκομικά προϊόντα χαμηλής οξύτητας (González-Rivas et al (2018), Chmielewski and Frank (2003), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Το *P. aeruginosa* παράγει ένα ισχυρό βιοφίλμ, το οποίο ενισχύει την επιβίωσή του σε διάφορες επιφάνειες και προστατεύει τα κύτταρα από άλλες σκληρές συνθήκες και θεραπείες (Klausen et al (2003)). Μια άλλη σημαντική πρόκληση με τον *P. aeruginosa* είναι η ανθεκτικότητά του σε πολλαπλές κατηγορίες αντιβιοτικών (Bai. et al. 2021)).

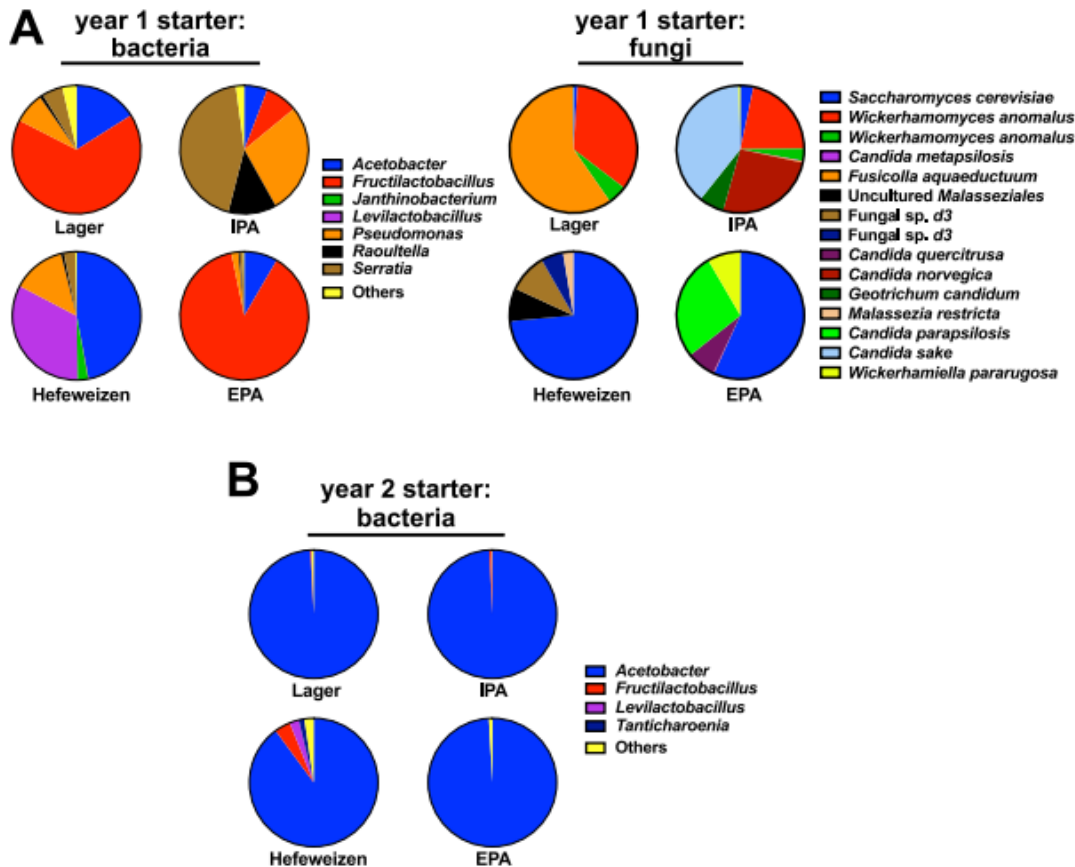
Το *C. jejuni*, επίσης γνωστό αναερόβιο βακτήριο, μπορεί να αναπτύξει βιοϋμένια τόσο σε μικροαερόφιλες (5% O<sub>2</sub> και 10% CO<sub>2</sub>) όσο και σε αερόβιες (20% O<sub>2</sub>) συνθήκες (Télez (2010), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Το *Campylobacter jejuni* και το *Campylobacter coli* αποδείχθηκε ότι σχηματίζουν περισσότερα βιοϋμένια σε γυαλί, πολυστυρένιο και ανοξείδωτο χάλυβα όταν το μέσο ανάπτυξης συμπληρωνόταν με ένα έκκριμα κρέατος κοτόπουλου, το οποίο αποτελούσε πρόσθετη πηγή θρεπτικών συστατικών και κάλυπτε και κλιμάκωνε τις αβιοτικές επιφάνειες (Brown et al. (2014)). Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν επίσης για τη *Salmonella* spp. και *Campylobacter* spp. χρησιμοποιώντας χυμό χοιρινού κρέατος και κοτόπουλου παρουσία πολυστυρενίου και γυάλινων επιφανειών (Li et al. (2017b)) και για τη *Salmonella* spp. χρησιμοποιώντας εκχύλισμα βλέννας γατόψαρου και μια ποικιλία διαφορετικών υλικών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα (Dhowlaghar et al. (2018), reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)).

Ο *B. cereus* είναι υπεύθυνος για το σχηματισμό βιοφίλμ σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, όπως οι ανοξείδωτοι ατσάλινοι σωλήνες, οι ιμάντες μεταφοράς και οι δεξαμενές αποθήκευσης (Grigore-Gurgu et al (2019), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)).

Το ίδιο μοτίβο επεκτείνεται σε μια ποικιλία ειδών, συμπεριλαμβανομένου του *Staphylococcus aureus*, για τον οποίο έχει αποδειχθεί ότι ο γονότυπος B, που εμπλέκεται συχνότερα στη μετάδοση από ζώο σε ζώο, είναι ικανότερος να αναπτύσσει βιοϋμένια από άλλους γονότυπους όταν εξετάζεται στους 37°C και στους 20°C και μετά από 48 και 72 ώρες επώασης (Thiran et al. (2017), reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)).

Τα αλλοιωτικά μικρόβια εισέρχονται στη διαδικασία παρασκευής κυρίως από την προσθήκη μη αποστειρωμένων συστατικών, την έκθεση στον αέρα ή τον μολυσμένο εξοπλισμό (Bokulich et al (2012); Bokulich and Bamforth (2013); Bokulich et al (2015)). Αρκετά μικρόβια αλλοίωσης είναι γνωστά στην κοινότητα της ζυθοποιίας επειδή είναι συνήθως μεταξύ αυτών τα βακτήρια γαλακτικού οξέος (LAB), τα βακτήρια οξικού οξέος (AAB) και οι άγριες ζύμες αποτελούν κυρίαρχες ομάδες (Wagner et al (2021), Bokulich et al (2015), Suzuki (2011), Janagama et al (2018), Rodríguez-Saavedra et al (2020)), (reviewed by Bose et al (2021)). Τα περιγραφόμενα βακτήρια αλλοίωσης αντιπροσωπεύονται κυρίως από τα γένη *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Pectinatus* και *Megasphaera* και ζύμες όπως *Saccharomyces* και *Dekkera* (Storgårds et al (2006), reviewed by Wagner et al 2021). Χρησιμοποιώντας μια δοκιμασία μικροπλάκας (microplate), οι Timke et al. (2008) έδειξαν ότι απομονώσεις της *Candida pelliculosa* από επιφάνειες επεξεργασίας σε δύο ζυθοποιεία ήταν σε θέση να σχηματίζουν βιοϋμένια. Οι τυπικοί αλλοιωτές της μύρας, όπως ο *S. cerevisiae*, δεν ήταν σε θέση να σχηματίσουν βιοϋμένια- ωστόσο, το δυναμικό αλλοίωσης της μύρας τους ήταν πολύ υψηλότερο από εκείνο των απομονωμένων *Candida*. (reviewed by Wagner et al.,2021). Οι Parijs και Steenackers (2018) πρότειναν ότι η CIP μείωσε το επίπεδο του μικροβιακού ανταγωνισμού, γεγονός που ευνόησε την άνθιση ενός υποσυνόλου ειδών. Στο ενδιάμεσο επίπεδο του πληρωτικού υλικού, βρέθηκαν ζυμομύκητες μόνο μετά την CIP. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεταφορά των ζυμομυκήτων σε αυτό το τμήμα κατά τη διάρκεια του καθαρισμού (Wagner et al 2021). Η σύγκριση των δομών της κοινότητας αποκάλυψε ότι τα πιο κυρίαρχα βακτηριακά μέλη στη συλλογή του έτους 1 διέφεραν σημαντικά μεταξύ κάθε είδους μύρας, με κύρια μέλη τα *Acetobacter*, *Fructilactobacillus* ή *Serratia* (Σχήμα 5A) (Bose. et al.,2021). Ένα άλλο θέμα είναι το υλικό της γραμμής σχεδίασης. Περιστασιακά συνιστάται η αντικατάσταση των γραμμών (Brewer's (2019)), αλλά δεν υπάρχει επίσημη κατευθυντήρια γραμμή για το πότε, ποιο συγκεκριμένο υλικό να χρησιμοποιηθεί ή πώς να διαγνωστεί ένα σοβαρό πρόβλημα ενός βιοφίλμ. Το κόστος αντικατάστασης της γραμμής και ο χρόνος διακοπής λειτουργίας είναι άλλες οικονομικές εκτιμήσεις. Από την παρούσα μελέτη, μπορούμε να προτείνουμε ότι ίσως οι βαρελίσιες μύρες να παρακολουθούνται για *Acetobacter* επειδή ήταν κοινά σε όλα τα δείγματα. Έχουμε απομονώσει πρόσφατα στελέχη του *Acetobacter* από αυτό το σύστημα βαρελιών και αξιολογούμε την ικανότητά τους να σχηματίζουν βιοφίλμ σε διάφορα υλικά (reviewed by Bose. et al (2021)). Στα τελευταία στάδια της διαδικασίας ζυθοποιίας, τα είδη *Lactobacillus lindneri*, και τα μέλη των ομάδων *Lactobacillus*, *Pectinatus* και *Megasphaera cerevisiae* έχουν ανιχνευθεί κατά κύριο λόγο ( Wagner et al.,2021). Δεν αποτελεί έκπληξη το γεγονός ότι πολλά από τα κυρίαρχα μέλη των κοινοτήτων των γραμμών λιανικής πώλησης βαρελιών είναι γνωστά για την πρόκληση αλλοίωσης της μύρας στα ζυθοποιεία, όπως οι LABs και οι AABs. Οι LABs θεωρούνται ένα από τα κυρίαρχα μολυσματικά μικρόβια στα ζυθοποιεία και μπορούν να περιέχουν γονίδια που τους καθιστούν ανθεκτικούς στον λυκίσκο, έτσι ώστε να μπορούν να παραμείνουν σε μύρες με υψηλή περιεκτικότητα σε εκχύλισμα λυκίσκου (Rodríguez-Saavedra et al (2020), Feyereisen et al (2020), Maifreni et al (2015)). Μια πρόσφατη διερεύνηση των ιδιοτήτων ανάπτυξης του *F. lindneri* έδειξε ότι το βακτήριο αυτό μπορεί να

εισέλθει σε μια "βιώσιμη αλλά μη καλλιεργήσιμη" (VBNC) κατάσταση σε χαμηλές θερμοκρασίες και ότι απαιτεί αναερόβιες συνθήκες για ισχυρή ανάπτυξη (Liu et al (2017)). Ως εκ τούτου, διαφεύγει από τον συνήθη έλεγχο αποικιών για μόλυνση και μπορεί να παραμείνει απαρατήρητο σε ψυχόμενες μπύρες για μεγάλο χρονικό διάστημα (reviewed by Bose. et al (2021)).



Σχήμα 5: Βακτήρια και μύκητες που υπάρχουν στα δείγματα εκκίνησης. Βακτηριακές V3-V4 και μυκητιακές υπερμεταβλητές περιοχές ITS2 που αλληλουχίστηκαν και καταγράφηκαν ως λειτουργικές ταξινομικές μονάδες μηδενικής ακτίνας (zOTU). Αυτές οι αλληλουχίες στη συνέχεια αποδόθηκαν στους οργανισμούς προέλευσης σε επίπεδο γένους ή είδους. (A) Αφθονία βακτηρίων και μυκήτων του έτους 1 στα δείγματα εκκίνησης. Τα κυκλικά διαγράμματα απεικονίζουν τις σχετικές αφθονίες ανάγνωσης για τους ενδεικνυόμενους οργανισμούς. Ακολουθίες με αφθονίες ανάγνωσης μικρότερες από το 1% του συνόλου ομαδοποιήθηκαν ως "άλλες". (B) Αφθονίες βακτηρίων στα δείγματα εκκίνησης του έτους 2. Τα αμπλικόνια ITS2 PCR των μυκήτων δεν ανακτήθηκαν από τα δείγματα εκκίνησης του έτους 2 (Bose. et al (2021)).

Οι αναφερόμενοι μικροοργανισμοί που σχηματίζουν βιοφίλμ στα γαλακτοκομικά προϊόντα είναι ο *Bacillus*, ο *Staphylococcus*, η *Listeria* και τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, όπως ο *Streptococcus*, ο *Pediococcus* και ο *Leuconostoc* (θετικά κατά Gram), *Klebsiella*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Moraxella*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Shigella*, *Escherichia* και *Pseudomonas*. (αρνητικά κατά Gram) (Tang et al (2009), Weber et al (2019)). Τα ψυχρότροφα μικρόβια διαπιστώθηκε ότι είναι υπεύθυνα για τις περισσότερες αλλοιώσεις σε τρόφιμα που διατηρούνται στο ψυγείο. Τα πιο ψυχρότροφα μικρόβια που απομονώθηκαν από γαλακτοκομικά προϊόντα περιλαμβάνουν Gram-αρνητικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas*, όπως τα *P. brenneri* (Machado et al (2017)), *P. putida*

(Scatamburlo et al (2015), *P. koreensis* (Andreani et al (2016)) και το κυρίαρχο είναι το *P. fluorescens* (Rossi et al (2018), reviewed by Rather et al (2021)).

Μικρά ιζήματα υπολειμμάτων τροφών πλούσιων σε πρωτεΐνες και υδατάνθρακες, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος και του κρόκου αυγού, αναφέρεται ότι αύξησαν την αντοχή των επιφανειακά προσκολλημένων ζυμομυκήτων αλλοίωσης (*Saccharomyces cerevisiae* και *Debaryomyces hansenii*) και των βακτηρίων γαλακτικού οξέος στα απολυμαντικά και προώθησε τη διασταυρούμενη επιμόλυνση και την αλλοίωση των τροφίμων (Shikano et al. (2017); Kuda et al. (2016). Τα φυτικά ιζήματα, αν και φτωχά σε πρωτεΐνες και λιπίδια, περιέχουν πολυσακχαρίτες που έχουν υψηλή υδατοσυγκρατική ικανότητα, και ως εκ τούτου θα μπορούσαν να προστατεύουν τα βακτηριακά κύτταρα από τα απολυμαντικά. Επιπλέον, τα λαχανικά που περιέχουν ορισμένα αντιοξειδωτικά (π.χ. ασκορβικό οξύ και καροτενοειδή) μπορεί επίσης να προστατεύουν τα κύτταρα του βιοφίλμ από τα αντιδραστικά οξυγόνα (reviewed by Yuan et al.,(2021)). Διάφοροι απλοί υδατάνθρακες μπορούν να διαμορφώσουν το σχηματισμό βιοφίλμ στα βακτήρια. Παραδείγματα περιλαμβάνουν τη γλυκόζη, η οποία βρέθηκε ότι ρυθμίζει τα μόρια quorum sensing της ακυλο-ομοσερινικής λακτόνης στην *Aeromonas hydrophila* (Jahid et al.2013), και η λακτόζη του γάλακτος, η οποία αποδείχθηκε ότι ενισχύει τον σχηματισμό βιοφίλμ τόσο στον *S. aureus*, προκαλώντας την παραγωγή πολυσακχαριτικής διακυτταρικής πρωτεΐνης προσκόλλησης (Xue et al. 2014), και *Bacillus subtilis*, μέσω της ενεργοποίησης του συστήματος quorum sensing με τη μεσολάβηση του LuxS (Duanis-Assaf et al.2016) (Alvarez-Ordóñez et al (2019)).



## Κεφάλαιο 2: Έλεγχος και εξάλειψη βιοϋμενίου

Δεδομένου ότι τα βιοϋμενία αποτελούν σοβαρές προκλήσεις για την βιομηχανία τροφίμων, μια σειρά τεχνικών, όπως ο καθαρισμός και η απολύμανση, οι βακτηριοφάγοι, τα ένζυμα κατά των βιοφίλμ, τα φυσικά προϊόντα, τα βακτήρια γαλακτικού οξέος και οι βακτηριοκίνες τους, η τροποποίηση των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα, οι αναστολείς quorum sensing, και φυσική επεξεργασία, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για να την ελαχιστοποίηση της συσσώρευσης βιοϋμενίων σε περιβάλλοντα τροφίμων (Yuan et al. 2020), reviewed by Yuan et al (2021)). Για την πρόληψη της εισόδου μικροοργανισμών στην παραγωγή τροφίμων, τα εργοστάσια, καθώς και την υγιεινή του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού θα πρέπει να είναι σχεδιασμένα ώστε να περιορίζει την πρόσβαση μικροοργανισμών. Ασηπτικός εξοπλισμός πρέπει να είναι απομονωμένος από μικροοργανισμούς και ξένα σωματίδια. Για να αποφευχθεί η ύπαρξη ανάπτυξης μικροοργανισμών, ο εξοπλισμός θα πρέπει να σχεδιάζεται έτσι ώστε να μην υπάρχουν περιοχές όπου οι μικροοργανισμοί μπορούν να φιλοξενοούνται και να αναπτύσσονται, μαζί με τα κενά, τις ρωγμές και τις νεκρές περιοχές. Αυτό είναι επίσης σημαντικό κατά τη διάρκεια παραγωγής, όταν οι μικροοργανισμοί μπορούν να αναπτυχθούν πολύ γρήγορα υπό ευνοϊκές συνθήκες (European Hygienic Engineering and Design Group (2018), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Γενικά, η αύξηση της θερμοκρασίας της επεξεργασίας μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών παραγόντων. Όταν η απολύμανση είναι σε χαμηλές θερμοκρασίες, η χρήση υψηλότερων συγκεντρώσεων βιοκτόνων ή η επιμήκυνση του χρόνου επαφής μπορεί να αυξήσει την αποτελεσματικότητα (Møretro et al. (2012)). Οι Abdallah et al. (2015) έδειξαν ότι η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην ανθεκτικότητα του βιοφίλμ εξαρτιόταν από τους δραστικούς παράγοντες σε κάθε απολυμαντικό προϊόν. Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης επηρεάζεται επίσης από τη σχετική υγρασία (reviewed by Yuan et al (2021)). Άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες, όπως το pH, η θερμοκρασία, και η υγρασία, μπορούν επίσης να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης. Πολλά απολυμαντικά έχουν το βέλτιστο εύρος pH για το για τη βέλτιστη δράση τους (Yuan et al (2021)). Τέλος η εξερεύνηση των σωστών συνδυασμών μεθόδων ελέγχου είναι πολύ σημαντική, καθώς οι ακατάλληλοι συνδυασμοί μπορεί να προκαλέσουν ανταγωνιστικά αποτελέσματα και να ενισχύσουν το σχηματισμό βιοφίλμ μειώνοντας την αντι-βιοφίλμ δραστηριότητα (Yuan et al (2021)).

Τα συστήματα καθαρισμού στη θέση τους (CIP) δεν έχουν σχεδιαστεί για να εξαλείφουν το σχηματισμό βιοφίλμ, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις μπορούν να εξαλείψουν το σχηματισμό βιοφίλμ εάν ο σχεδιασμός του συστήματος είναι κατάλληλος (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992)). Εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί ένα κανονικό σύστημα CIP, ο χρόνος αλκαλικής επεξεργασίας πρέπει να αυξηθεί ((Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992)). Η αύξηση του χρόνου επαφής μεταξύ του απορρυπαντικού και της επιφάνειας, έχει δείξει μείωση του αριθμού των βιώσιμων οργανισμών

((Genigeorgis (1995)). Συχνός καθαρισμός και το σχολαστικό στέγνωμα του εξοπλισμού επεξεργασίας μετά καθαρισμού παρέχει ένα ακόμη εμπόδιο κατά των μικροοργανισμών που προσπαθούν να δημιουργήσουν βιοϋμένιο (Genigeorgis (1995), reviewed by Venø, Lena. (1999)). Ορισμένες φυσικές μέθοδοι, όπως το μηχανικό βούρτσισμα, οι χημικοί παράγοντες όπως τα απορρυπαντικά και βιολογικά μέσα όπως τα ένζυμα εφαρμόζονται στις διαδικασίες CIP προκειμένου να επιτευχθεί ένα βιομηχανικό περιβάλλον απαλλαγμένο από βιοφίλμ (Kumar & Anand, (1998), reviewed by Shi and Zhu (2009)).

Ειδικότερα, τα συστήματα ανάλυσης κινδύνου και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) παρέχουν τις ικανότητες για την αντικατάσταση των λεπτομερών ρυθμιστικών απαιτήσεων με τους γενικούς στόχους που πρέπει να εκπληρωθούν (Fortin (2020)), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Αυτή τη στιγμή, τα βακτηριακά βιοφίλμ δεν έχουν μελετηθεί συγκεκριμένα στο σύστημα HACCP που έχει εφαρμοστεί στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Shi and Zhu (2009)).

Παρόλο που καμία ενιαία προσέγγιση δεν μπορεί επί του παρόντος να αντιμετωπίσει το πρόβλημα των ανεπιθύμητων βιοφίλμ, ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων τεχνικών ελέγχου, που ονομάζεται "προσέγγιση εμποδίων", θα μπορούσε να απομακρύνει αποτελεσματικότερα τους οργανισμούς του βιοφίλμ από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων, καθώς θα επιτίθενται στους μικροοργανισμούς με διαφορετικούς τρόπους, ακολουθούμενη από μια συνολική αποτελεσματική μείωση των βακτηριακής μόλυνσης (Yuan et al. (2020)). Η τεχνολογία εμποδίων είναι μια νέα και πολλά υποσχόμενη τεχνική για την καταπολέμηση των βιοφίλμ, δεδομένου ότι βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της χημικής απολύμανσης, μειώνει τις ποσότητες των χρησιμοποιούμενων απολυμαντικών, εξοικονομεί ενέργεια και διάρκεια της επεξεργασίας. Η νέα έννοια της "τεχνολογίας εμποδίων" προκαλεί την έξυπνη χρήση συνδυασμών φυσικοχημικών, χημικών-χημικών, ή βιολογικών-χημικών μεθόδων απολύμανσης για τον αποτελεσματικό έλεγχο των ανεπιθύμητων μικροβιακών βιοϋμενίων με το να χτυπά διαφορετικούς στόχους εντός των βακτηριακών κυττάρων ταυτόχρονα (Yuan et al.,(2021)). Η συνεργιστική μείωση της βακτηριακής μόλυνσης στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα με την τεχνολογία των εμποδίων έχει αποδειχθεί με επιτυχία από πολλές μελέτες (Ban and Kang (2016), Lim et al (2019), Jung et al (2018), Hussain et al. (2019), Kim et al (2019), reviewed by Yuan et al (2021)).

#### **Παραδείγματα συνεργιστικών ενεργειών :**

- Η εξήγηση για αυτό το συνεργιστικό αποτέλεσμα είναι η συνδυασμένοι μηχανισμοί αδρανοποίησης βακτηρίων: υπερϊώδης ακτινοβολία καταστρέφει το DNA και το RNA των βακτηρίων και το υποχλωριώδες νάτριο καταστρέφει το βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα (Yuan et al (2021)).

- Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η συνδυασμένη χρήση της υπερϊώδους ακτινοβολίας και της χημικής απολύμανσης είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική κατά των κυττάρων του βιοφίλμ (Yuan et al. (2021)).
- Αποτελέσματα δείχνουν ότι τα χημικά απολυμαντικά σε συνδυασμό με υπερήχους έχουν μεγάλη δυνατότητα ως πολλά υποσχόμενες προσεγγίσεις για την απολύμανση του εξοπλισμού τροφίμων και των πραγματικών επιφανειών τροφίμων (Yuan et al (2021)).
- Ο συνδυασμός υδατικού διοξειδίου του χλωρίου (200 μg/ml, 10 λεπτά) και ξήρανση (43% RH και 22°C για 12 ώρες) επίσης έδειξε συνεργιστικά αποτελέσματα στην απομάκρυνση των βιοϋμενίων που σχηματίστηκαν από το *E. coli* O157:H7 σε ξύλινες επιφάνειες (Bang et al. (2014), reviewed by Yuan et al (2021))
- Ο πιθανός λόγος για την ενισχυμένη μείωση των βιοφίλμ *E. coli* O157:H7 είναι ο υποθανατηφόρος τραυματισμός των κυττάρων που προκαλείται από το διοξείδιο του χλωρίου, η οποία τα καθιστά πιο ευαίσθητα σε πρόσθετες καταπονήσεις (Yuan et al (2021)).
- Οι επιφανειοδραστικές ουσίες, όπως το θειικό δωδεκυλικό νάτριο, μπορούν να δράσουν ως αντιπροσκολλητικοί παράγοντες και το λεβουλινικό οξύ μπορεί να βοηθήσει στην απομάκρυνση του πολυμερούς προσκόλλησης με τη χηλική σύνδεση δισθενών κατιόντων που απαιτούνται για την σύνδεση του πολυμερούς με την επιφάνεια (Yuan et al (2021)).
- Οι Ban και Kang (2016) ανέφεραν ότι ο συνδυασμός επεξεργασίας απολυμαντικών με ατμό παράγει συνεργιστικό αποτέλεσμα μειώνοντας το σχηματισμό βιοφίλμ μικτών ειδών από *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium* και *L. monocytogenes* όπως αποδεικνύεται από τις μετρήσεις και την απεικόνιση. Ο πιο αποτελεσματικός συνδυασμός για τη μείωση του αριθμού των παθογόνων κυττάρων βιοφίλμ ήταν η συνδυασμένη επεξεργασία ατμού και ιωδοφόρου ατμού (reviewed by Yuan et al (2020)).

#### **Παραδείγματα μεθόδων και ουσιών για την καταπολέμηση των βιοφίλμ:**

- Η επεξεργασία με υπερήχους είναι μια μη χημική και φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία για τη διάσπαση της δομής του βιοφίλμ, η οποία απελευθερώνει τα κύτταρα στην πλαγκτονική τους κατάσταση ή ακόμη και αδρανοποιεί τους μικροοργανισμούς (Yu et al. (2020), reviewed by Yuan et al (2021)).
- Ως διαλύματα καθαρισμού χρησιμοποιήθηκε καυστική σόδα (0,5% κ. β. NaOH), υποχλωριώδες νάτριο (0,018% v/v NaOCl) και έξι διαφορετικά αλκαλικά απορρυπαντικά του εμπορίου που χρησιμοποιούνται συνήθως σε γαλακτοπαραγωγικές μονάδες και σε συγκεντρώσεις που συνιστώνται από τους κατασκευαστές (Ostrov et al (2019), reviewed by Giaouris et al 2020)).
- Αερολύσιμο: μέθοδος απολύμανσης με διαφορετικά απολυμαντικά που εφαρμόζονται σε περιοχές εργασίας με κονιοποίηση σε σκόνη. Αρκετοί συγγραφείς (Gironés and Simmons

(2016)) έχουν δείξει την αποτελεσματικότητά της ως μέσο ελέγχου του βιοφίλμ στη βιομηχανία τροφίμων και στα νοσοκομεία (reviewed by Carrascosa. et al. (2021)).

- Έτσι, διάφορα εναλλακτικά προϊόντα στα κλασικά απολυμαντικά (χλώριο, τεταρτοταγές αμμώνιο κ.λπ.), όπως, αντιμικροβιακές ουσίες φυτικής προέλευσης (αιθέρια έλαια: πορτοκάλι-δάφνη, λεμόνι, λεβάντα, χαμομήλι, μέντα, ρίγανη), με τη θυμόλη και την καρβακρόλη να είναι οι ενώσεις που εμφανίζουν σημαντικότερη αντιμικροβιακή δράση σε μικρότερους χρόνους δράσης (Carrascosa. et al.(2021)).
- Η υψηλότερη αποδοτικότητα από τις επικαλύψεις διαμαντένιου άνθρακα στην αδρανοποίηση του *E. coli* υποδεικνύει ότι αυτές οι επιφάνειες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κρίσιμα σημεία της επεξεργασίας τροφίμων όπου η προσκόλληση βακτηρίων είναι πιθανότερο να συμβεί και η απολύμανση είναι δύσκολη (Gomes et al. (2018), reviewed by Yuan et al (2020)).
- Μη θερμικά ατμοσφαιρικά πλάσμα έχουν γίνει αντικείμενο μεγάλης προσοχής, καθώς έχουν αποδείξει υψηλή απολυμαντική ικανότητα έναντι σε βιοφίλμ ευρέου φάσματος μικροοργανισμών και προσφέρουν μια σειρά πλεονεκτημάτων σε σχέση με τη συμβατική χημική απολύμανση, όπως η ταχεία, η χωρίς επαφή και χωρίς νερό (Pignata et al. 2017, reviewed by Yuan et al (2020)).
- Άλλες τεχνολογίες απολύμανσης φυσικών επιφανειών που έχουν αναπτυχθεί ή διερευνηθεί τα τελευταία χρόνια για την αδρανοποίηση μικροοργανισμών εντός βιοϋμενίων είναι η θέρμανση με ατμό (Ban and Kang 2016), η επεξεργασία με όζον (Varga and Szigeti 2016) και η υπεριώδης ακτινοβολία C (Jahid et al. (2014), reviewed by Yuan et al (2020)).
- Κατά την επεξεργασία με ατμό, η συμπύκνωση του ατμού στις επιφάνειες (coupons) παράγει μεταφορά θερμικής ενέργειας, η οποία προκαλεί ταχεία θέρμανση της επιφάνειας του κομματιού και είναι σε θέση να διεισδύσει αποτελεσματικά σε κοιλότητες, ρωγμές και πτυχές φτερών (feather follicles) που μπορεί να παρέχουν προστασία για τα βακτήρια που προσκολλώνται στην επιφάνεια, καταστρέφοντας έτσι αποτελεσματικά κάθε παθογόνο βιοϋμένιο το οποίο διαφορετικά είναι δύσκολο να εξαλειφθεί (Ban and Kang (2016), reviewed by Yuan et al (2021)).
- Διαπιστώθηκε ότι όλα τα εξεταζόμενα στελέχη LAB ήταν σε θέση να απομακρύνουν τα παθογόνα βιοφίλμ, ενώ δύο από αυτά (*L. rhamnosus* ATCC 7469 και *L. plantarum* 2/37) μπορούσαν επίσης να σχηματίσουν τα δικά τους βιοϋμένια στη θέση των παθογόνων (Wallis et al (2019), reviewed by Giaouris et al (2020)).

Η πρόληψη του σχηματισμού βιοφίλμ μπορεί να επιτευχθεί με συχνό καθαρισμό (Venø, Lena. (1999)).

Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την πρόληψη σχηματισμού του βιοϋμενίου είναι η επιλογή συνθηκών διεργασίας που διαφέρουν από τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Ο καθαρισμός πρέπει να γίνεται συχνά, περίπου κάθε 8 ώρες (Venø, Lena. (1999)). Ένα παράδειγμα είναι

η σύσταση για τον έλεγχο του εξοπλισμού και των διεργασιών: "Ραφές στις επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα πρέπει να συγκολλούνται ομαλά ή να διατηρούνται για να μειωθεί η συσσώρευση των σωματιδίων τροφίμων, της ρύπανσης και της οργανικής ύλης και έτσι να ελαχιστοποιείται η δυνατότητα ανάπτυξης μικροοργανισμών" (González and Keshavan,(2006), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Τα παρεμβύσματα στον εξοπλισμό διεργασιών παρέχουν ευνοϊκές θέσεις για το σχηματισμό βιοφίλμ, επειδή η βρωμιά και τα οργανικά υλικά συσσωρεύονται στο υλικό του παρεμβύσματος. Όπως συμβαίνει και με τα παρεμβύσματα, οι βαλβίδες παρέχουν επίσης καλές θέσεις για μικροβιακή ανάπτυξη (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992)). Λόγω της θέσης τους στο σύστημα διεργασίας, τα παρεμβύσματα είναι πολύ εκτεθειμένα στη φθορά. Επομένως, είναι σημαντικό να ανανεώνονται όταν έχει παρέλθει η διάρκεια ζωής τους (η διάρκεια ζωής καθορίζεται εν μέρει από τη θερμοκρασία της διεργασίας). Σε δοκιμές με ελαστικό και τεφλόν ως υλικό παρεμβύσματος, αποδείχθηκε ότι το καουτσούκ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας από τους μικροοργανισμούς (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992)). Όπως και με τα παρεμβύσματα και τις βαλβίδες, τα αδιέξοδα σε ένα σύστημα σωλήνων παρέχουν επίσης ευνοϊκές θέσεις για την ανάπτυξη μικροβίων (reviewed by Venø, Lena (1999)). Οι Bang et al. (2014) παρατήρησαν ότι η επιφάνεια του ανοξείδωτου χάλυβα είναι εύκολη να απολυμανθεί και ακολουθούν το γυαλί, το πλαστικό και το ξύλο (reviewed by Yuan et al (2021)). Οι περισσότερες βιομηχανικές επιφάνειες στις οποίες σχηματίζονται βιοϋμένια, όπως οι σωληνώσεις ή τα συστήματα μεμβρανών, είναι δύσκολο να προσεγγιστούν και να αναλυθούν. Ωστόσο, ορισμένοι συγγραφείς έχουν προσπαθήσει να αναπτύξουν επί τόπου αισθητήρες για μη καταστροφική παρακολούθηση της επιφανειακής ρύπανσης σε πραγματικό χρόνο, επιτρέποντας την έγκαιρη ανίχνευση και τον εντοπισμό των βιοϋμενίων στις βιομηχανίες τροφίμων. Με αυτόν τον στόχο, αναπτύχθηκε ένας οπτικός αισθητήρας εναπόθεσης που βασίζεται στην ανάλυση πολλαπλού φθορισμού σε πλέγμα διέγερσης/εκπομπής, η οποία ανιχνεύει τον αυτοφθορισμό των αμινοξέων ως δείκτη της μικροβιακής βιομάζας (Strathmann et al. (2013), reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)). Έτσι, συμπερασματικά φαίνεται ότι το σωστό και τακτικό πλύσιμο για απομάκρυνση όλων των ιχνών υπολειμμάτων τροφίμων από τις επιφάνειες επιτρέπει την άμεση επαφή του απολυμαντικού και των βακτηρίων-στόχων, η οποία είναι απαραίτητη για την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών (Yuan et al. (2021)).

Τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αποικοδόμηση του βιοφίλμ, αλλά λόγω της ετερογένειας των εξωκυτταρικών πολυσακχαριτών στο βιοφίλμ, μπορεί να είναι απαραίτητο ένα μείγμα ενζυμικών δραστηριοτήτων για την επαρκή αποικοδόμηση του βακτηριακού βιοφίλμ (Johansen et al (1997), reviewed by Venø, Lena (1999)). Τα ένζυμα που παρουσιάζουν λυτική δράση έναντι άλλων συστατικών του εξωκυτταρικού πλέγματος του βιοφίλμ έχουν προταθεί ως δυνητικοί υποψήφιοι για χρήση στο πλαίσιο στρατηγικών ελέγχου του βιοφίλμ. Αυτό ισχύει για τις πρωτεάσες, όπως η πρωτεϊνάση K (Nguyen & Burrows 2014), οι λιπάσες (Seghal Kiran et al. 2014) και τα ένζυμα αποικοδόμησης υδατανθράκων, όπως η β-γλυκανάση και η α-αμυλάση (Araújo et al. 2017), reviewed

by Alvarez-Ordóñez et al (2019)) . Ωστόσο, τα μειονεκτήματα της χρήσης ενζύμων είναι το σχετικά υψηλό κόστος και η χαμηλή εμπορική προσβασιμότητα των διαφόρων ενζύμων. Επιπλέον, η δραστηριότητα και η αποδοτικότητα των ενζύμων επηρεάζονται σημαντικά από πολλές σύνθετες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοκρασία, pH, σκληρότητα νερού, υπόστρωμα, υπολείμματα τροφίμων και ποικιλίες επιφανειών επεξεργασίας τροφίμων) στη βιομηχανία τροφίμων (Nahar et al. (2018), reviewed by Yuan et al (2021)). Σε βιομηχανικές συνθήκες, οι ενζυμικές επεξεργασίες έχουν προταθεί ως ένας αποτελεσματικός και φιλικός προς το περιβάλλον τρόπος για την αποικοδόμηση των συστατικών του πλέγματος και τη διευκόλυνση της διείδυσης των παραγόντων καθαρισμού και απολύμανσης στα κύτταρα του βιοφίλμ σε βαθύτερα στρώματα (Nahar et al. 2018). Παρ' όλα αυτά, η μεμονωμένη χρήση ενζύμων για την εξάλειψη των βιοϋμενίων στο βιομηχανία τροφίμων γενικά δεν διαθέτουν βιοκτόνο δράση, γεγονός που τα καθιστά ακατάλληλα για βακτηριοκτόνο σκοπό (reviewed by Yuan et al (2021)). Τα ενζυμικά απορρυπαντικά αντικατέστησαν τα παραδοσιακά αλκαλικά και όξινα απορρυπαντικά, επειδή τα ένζυμα (πρωτεάσες, λιπάσες, αμυλάσες) μπορούν να απομακρύνουν τα βιοϋμένια στη βιομηχανία τροφίμων [Peña et al (2014)], καθώς τα ένζυμα μειώνουν τη φυσική ακεραιότητα των PS αποδυναμώνοντας τους δομικούς δεσμούς των λιπιδίων, των πρωτεϊνών και των υδατανθράκων που σχηματίζουν τη δομή του [Furukawa et al (2010)]. Άλλα πλεονεκτήματα έναντι των απορρυπαντικών περιλαμβάνουν χαμηλή τοξικότητα και βιοδιασπασιμότητα, αλλά το κόστος εφαρμογής και οι απαιτήσεις (θερμοκρασία, χρόνος) είναι υψηλότερες από τα απορρυπαντικά (reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Αν και πρέπει να διερευνηθούν πολλά ακόμη προκειμένου να αξιοποιηθούν οι δυνατότητες αυτής της στρατηγικής, οι αναστολές quorum sensing (QSI) έχουν αξιολογηθεί ως πολλά υποσχόμενοι παράγοντες κατά του βιοφίλμ. Οι στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη του σχηματισμού βιοφίλμ με στόχο το σύστημα QS βασίζονται στην αναστολή της επικοινωνίας μεταξύ κυττάρων, η οποία μπορεί να εκτελεστεί με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της αναστολής της σύνθεσης των αυτοενεργών επαγωγέων ή της αποδόμησης των αυτοενεργών επαγωγέων, την παρεμπόδιση της πρόσδεσης πεπτιδίων-υποδοχέων σηματοδότησης ή την αναστολή των μονοπατιών καταγωγής μεταγωγής σήματος (Yuan et al. (2018b), reviewed by Yuan et al.(2020)). Ωστόσο, οι QSI έχουν το μειονέκτημα ότι είναι αρκετά εξειδικευμένοι και, συνεπώς, ένα μείγμα QSI μπορεί να απαιτείται για την αναστολή του σχηματισμού βιοφίλμ μιας μικτής κοινότητας (Yuan et al (2020)). Σε γενικές γραμμές, υπάρχουν τέσσερις τύποι ενζύμων συγκεκριμένου ενδιαφέροντος για την απομάκρυνση του βιοφίλμ: ένζυμα anti-QS, οξειδωτικά ένζυμα, ένζυμα αποικοδόμησης πολυσακχαριτών και πρωτεολυτικά ένζυμα. (Meireles et al. 2016). Η επιτυχής απομάκρυνση των βιοφίλμ συνήθως απαιτεί συνδυασμό διαφορετικών ενζύμων ικανών να αποδομούν το DNA, τους πολυσακχαρίτες, τις πρωτεΐνες και τα μόρια QS και αυξάνοντας το εύρος δράσης ενός ενζυμικού καθαριστικού κατά των βιοϋμενίων μικτών ειδών (Nahar et al. 2018- Lequette et al. 2010). Η χρήση των ενζύμων ως "πράσινα χημικά", ή σε συνδυασμό με βιοκτόνα, μπορεί να χρησιμεύσει ως εναλλακτικό βιοφίλμ λόγω της ικανότητάς τους να αποικοδομούν το EPS, διευκολύνουν τη διείδυση των παραγόντων καθαρισμού και απολύμανσης, διακόπτουν τα γεγονότα σηματοδότησης μεταξύ

κύτταρων που διέπουν το σχηματισμό και τη διατήρηση του βιοφίλμ και θα μπορούσαν επίσης να συμβάλουν στη μείωση της χρήσης χημικών παραγόντων, της κατανάλωσης νερού και του ενεργειακού κόστους (Nahar et al. (2018), Rodriguez-Lopez et al. (2017), reviewed by Yuan et al (2020)).

Η χρήση κοκτέιλ φάγων, τροποποιημένων φάγων, συνδυασμού φάγων με άλλα αντιμικροβιακά, εκτός από την εφαρμογή καθαρών ενζύμων φάγων, π.χ. ενδολυσίνες θα μπορούσαν να αποτελέσουν αποτελεσματικές στρατηγικές (Bardy et al. (2016), reviewed by Yuan et al (2020)). Όταν οι φάγοι είναι πλήρεις, λύνουν τα κύτταρα, πράγμα που σημαίνει ότι η μόλυνση από βακτηριοφάγους μπορεί να καταστρέψει ολόκληρη την αποικία (Greer (2011), Soni and Nannapaneni (2010), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)).

Τα αιθέρια έλαια είναι φυσικές ενώσεις, οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να χρησιμεύσουν ως εναλλακτικά φυσικά απολυμαντικά κατάλληλα για τον έλεγχο του βιοφίλμ (Yuan et al (2021)). Επιπλέον, οι Cui, Ma και Lin (2016) παρατήρησαν μια συνεργιστική επίδραση στην απομάκρυνση των βιοϋμενίων που σχηματίζονται από το *E.coli* O157:H7 σε μαρούλι ως αποτέλεσμα της συνδυασμένης επίδρασης των 1 mg/ml γαρυφαλέλαιου και πλάσματος ψυχρού αζώτου 400 W, χωρίς να προκαλείται αρνητική επίδραση στην ποιότητα του μαρουλιού (reviewed by Yuan et al (2021)).

Στο περιβάλλον της ζυθοποιίας, η ανάπτυξη των παθογόνων βακτηρίων δεν έχει αναφερθεί. Η μύρα είναι γνωστή ως εχθρικό περιβάλλον για τους περισσότερους μικροοργανισμούς εξαιτίας του χαμηλού pH, της συγκέντρωσης του λυκίσκου και την περιεκτικότητα σε αιθανόλη και CO<sub>2</sub> (Jespersen, and Jakobsen (1996), reviewed by Wagner et al 2021). Ο λυκίσκος χρησιμοποιείται στην παραγωγή μύρας για να προσδώσει επιθυμητές γεύσεις και αρώματα, αλλά και για να καταστείλει βακτηριακή ανάπτυξη (Bokulich and Bamforth (2013)). Ως εκ τούτου, αναμέναμε να δούμε σημαντικά μικρότερη βακτηριακή ποικιλότητα στις μύρες με υψηλότερη περιεκτικότητα σε λυκίσκο (EPA και IPA), κάτι που δεν συνέβη (Bose et al 2021).

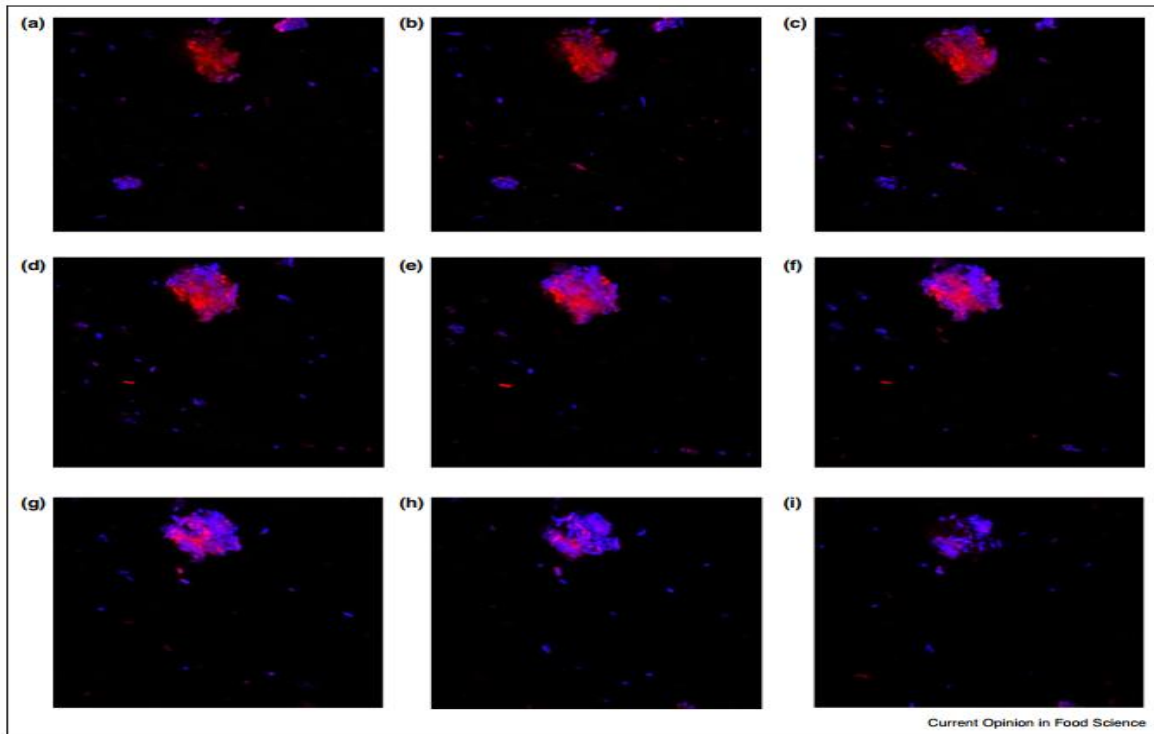
## **2.1. Απολυμαντικά και αντοχή στο βιοϋμένιο**

Τα κύτταρα του βιοφίλμ εκφράζουν ιδιότητες που διαφέρουν από τα πλαγκτονικά, ιδίως την περιβόητη αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες. Έτσι, ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των βιοϋμενίων είναι ότι, αφού αναπτυχθούν, είναι δύσκολο να εξαλειφθούν, ακόμη και όταν εφαρμόζονται τακτικά προσεκτικές διαδικασίες απολύμανσης (Giaouris et al (2020)). Η αντοχή των βακτηρίων στα απολυμαντικά στην πλαγκτονική φάση δύσκολα μπορεί να συγκριθεί με την αντίσταση του βιοφίλμ (Carrascosa. et al.(2021)). Τα βιοϋμένια που σχηματίζονται από παθογόνους μικροοργανισμούς στο περιβάλλον των τροφίμων, είναι πολύ δύσκολο να καταστραφούν ή να απομακρυνθούν πλήρως από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων (Shi and Zhu (2009)). Το φαινόμενο της τεράστιας ανθεκτικότητας απέναντι στα απολυμαντικά από βακτηριακά κύτταρα που βασίζονται σε βιοφίλμ έχει

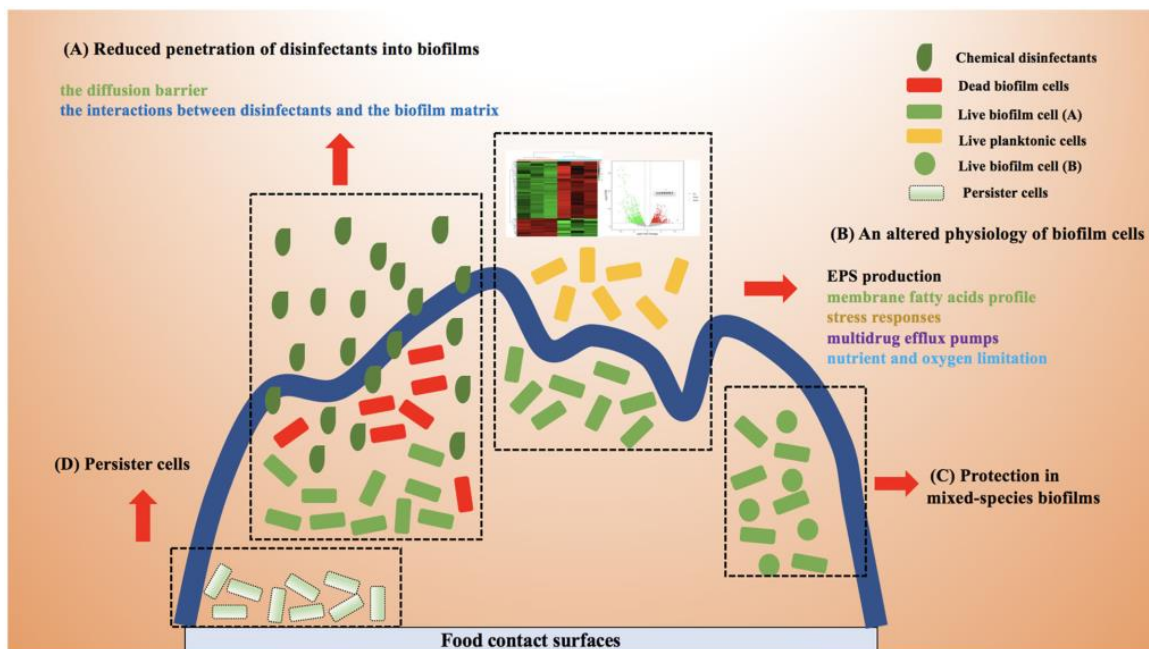
αναφερθεί ευρέως σε ένα ευρύ φάσμα τομέων τροφίμων, συμπεριλαμβανομένης της επεξεργασίας γαλακτοκομικών προϊόντων (Ziech et al.2016), αρτοποιία (Fink et al. 2017), φρέσκα προϊόντα (Bang et al. 2017), την επεξεργασία ψαριών (Papaioannou et al. 2018), και την επεξεργασία κρέατος (Wang et al. (2018), reviewed by Yuan et al (2021)). Για να εξηγήσουν αυτή την αντίσταση, διάφοροι συγγραφείς (Maric and Vraneš (2007)) έχουν προτείνει τρεις πιθανές αιτίες με τρεις υποθέσεις: Η πρώτη βασίζεται στην αργή ή ατελή διάχυση των αντιβιοτικών στα εσωτερικά στρώματα του βιοφίλμ. Η δεύτερη έγκειται στις αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο μικροπεριβάλλον του βιοφίλμ, καθώς ορισμένα βακτήρια του βιοφίλμ πέφτουν σε κατάσταση αργής ανάπτυξης λόγω έλλειψης θρεπτικών ουσιών ή δεδομένης της συσσώρευσης επιβλαβών μεταβολιτών και, ως εκ τούτου, επιβιώνουν (Beveridge et al (1997)). Τέλος, η τρίτη υπόθεση υποδεικνύει έναν υποπληθυσμό κυττάρων στο βιοφίλμ του οποίου η διαφοροποίηση μοιάζει με την διαδικασία σχηματισμού σπορίων. Διαθέτουν έναν μοναδικό και ιδιαίτερα ανθεκτικό φαινότυπο που τα προστατεύει από τις επιδράσεις των αντιβιοτικών, και αποτελούν μια βιολογικά προγραμματισμένη αντίδραση στην άκαμπτη μορφή ζωής του βακτηρίων (Flemming, (1993), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Ο τρόπος ζωής του βιοφίλμ επιτρέπει στα μικρόβια να αντιμετωπίζουν διάφορες συνθήκες στρες, όπως η απολύμανση, η υπερϊώδης ακτινοβολία και η ξήρανση (Flemming and Wingender (2010), reviewed by Wagner et al 2021). Τα περισσότερα από τα στελέχη εξακολουθούσαν να ήταν σε θέση να παράγουν βιοφίλμ παρουσία υπολειμμάτων τροφίμων σε όλες τις συνθήκες που εξετάστηκαν. Ο ρόλος των βιοφίλμ στην ανάπτυξη και τη διάδοση της μικροβιακής αντοχής εντός της βιομηχανίας τροφίμων είναι σίγουρα σημαντικός και πολύπλευρος (Giaouris et al (2020)). Είναι ενδιαφέρον ότι η αυξημένη αντοχή στα απολυμαντικά μπορεί να εμφανιστεί ακόμη και όταν η συνολική παραγωγικότητα ή φυσική κατάσταση, μετρούμενη ως κυτταρική ανάπτυξη, των βιοφίλμ μικτών ειδών μειώνεται (Yuan et al (2020)). Οι πιθανοί μηχανισμοί ενισχυμένης ανθεκτικότητας στα απολυμαντικά μέσα σε βιοφίλμ μικτών ειδών είναι: (α) η αλλαγή της σύνθεσης του πλέγματος και η ενισχυμένη παραγωγή EPS σε βιοφίλμ μικτών ειδών. (β) η ειδική χωρική διάταξη των ορισμένων βακτηριακών ειδών εντός ενός βιοφίλμ, καθώς ορισμένα στελέχη μπορεί να προστατεύονται από ένα βιοκτόνο με τη συσσωμάτωσή τους με άλλα μέσα στη διαφορική τρισδιάστατη δομή- (γ) παροδικές μεταβολές στους κοντινούς γείτονες, καθώς ένα είδος που κατοικεί μέσα σε ένα βιοφίλμ μικτών ειδών μπορεί να μεταβάλει τη φυσιολογία και, συνεπώς, να ενισχύσει την αντίσταση των γειτονικών ειδών μέσω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ειδών (Yuan et al. (2020), reviewed by Yuan et al.,2021)). Η αντοχή των μικροοργανισμών στα απολυμαντικά επηρεάζεται από την ηλικία των βιοφίλμ, κυρίως λόγω των αυξημένων EPS και πάχους του βιοϋμενίου με την πάροδο του χρόνου. Η υπόθεση αυτή υποστηρίζεται από το γεγονός ότι το πλέγμα του βιοφίλμ μπορεί να εμποδίζει τη διείσδυση των αποτελεσματικών απολυμαντικών ενώσεων στα βιοϋμένια (Yuan et al (2021)). Ωστόσο, οι Yang et al. (2009) διαπίστωσαν ότι αυτή η εξαρτώμενη από την ηλικία αντίσταση του βιοφίλμ έναντι των απολυμαντικών μπορεί μόνο να παρατηρηθεί σε λείες επιφάνειες και όχι σε τραχιές επιφάνειες (reviewed by Yuan et al (2021)). Η αντοχή σε ακραίες θερμοκρασίες, φως και ξήρανση ενισχύεται επίσης για τα βακτήρια μέσα σε βιοφίλμ (Dewanti and Wong (1995)). Η αντοχή έναντι των



καθαριστικών παραγόντων και των αντιβιοτικών αυξάνεται με την ηλικία του βιοφίλμ, την κατάσταση του εξωπολυμερούς πλέγματος, του υποστρώματος και των συνθηκών ανάπτυξης (Zottola (1994), Lechevallier et al (1998), reviewed by Venø, Lena (1999)). Η παρουσία αποικοδομητικών ενζύμων όπως οι καταλάσες στο βιοφίλμ του *P. aeruginosa* έχει επίσης αναφερθεί ότι αποτρέπει τη διείσδυση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στα βιοϋμένια, ενώ έχει αναφερθεί ότι τα βιοφίλμ με ανεπάρκεια καταλάσης είναι ευαίσθητα στο υπεροξείδιο του υδρογόνου (Stewart et al. 2000), reviewed by Yuan et al (2021)). Η υψηλή αντοχή των κυττάρων του βιοφίλμ στα απολυμαντικά μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο αποτυχίας της απολύμανσης, οδηγώντας σε σοβαρά προβλήματα υγείας και οικονομικές απώλειες. Σημαντικές μελέτες έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι η αντίσταση του βιοφίλμ στα απολυμαντικά είναι μια πολυπαραγοντική διαδικασία που προκύπτει από διαφορετικούς μηχανισμούς (Σχήμα 7): (α) τη μειωμένη διείσδυση των απολυμαντικών μέσα στο βιοφίλμ, (β) την τροποποιημένη φυσιολογία των κυττάρων του βιοφίλμ, (γ) την προστασία σε βιοφίλμ μικτών ειδών, και (δ) την εμφάνιση των κυττάρων που επιμένουν (Yuan et al (2021)). Μία από τις πιο ανησυχητικές συνέπειες των βιοφίλμ μικτών ειδών είναι ότι γενικά παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή σε διάφορα απολυμαντικά, όπως τα χλωριούχο βενζαλκόνιο, υποχλωριώδες νάτριο, υπεροξικό οξύ και το υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε σύγκριση με τα μονο-είδη βιοφίλμ (Yuan et al (2020)). Η αυξημένη ανοχή απέναντι στα απολυμαντικά δεν αποτελεί καθολικό χαρακτηριστικό για τα βιοφίλμ μικτών ειδών (Iniguez-Moreno et al. (2018), Lemos et al. (2015), Machado et al. (2012), Pang et al. (2019), reviewed by Yuan et al (2020)). Αν και δεν αναγνωρίζεται συχνά, σε μια ανοικτή επιφάνεια, οι ομοιότητες μεταξύ οργανικής/μικροβιακής ρύπανσης και βιοφίλμ μπορούν να γίνουν, όπου ένα πολύπλοκο, ετερογενές πλέγμα από οργανικό υλικό περικλείει τον βακτηριακό πληθυσμό που είναι προσκολλημένος σε μια επιφάνεια (Σχήμα 6) και η παρουσία οργανικών υλικών μπορεί να προστατεύει τα βακτήρια από τα καθαριστικά μέσα με τον ίδιο τρόπο. Η έκθεση σε διαμορφωμένα (conditioned) φιλμ έχει επίσης προταθεί ότι επηρεάζει τη λειτουργία του βιοϋμενίου αυξάνοντας σημαντικά την επιβίωση του *L. monocytogenes* (Hingston et al (2013)), ή να αποτελεί έναν από τους κύριους λόγους για την αποτυχία της απολύμανσης. (Jaglic et al (2012), (reviewed by Whitehead and Verran 2015)). Η παρουσία NaCl στο πλέγμα των τροφίμων (Jensen, et al 2007), η χρήση της αλκοόλης ως απολυμαντικού παράγοντα (Gravesen et al (2005)), ή η παρουσία άλλων βακτηρίων (Carpentier and Chassaing, 2004) μπορεί να ενισχύσει την προσκόλληση και την ωρίμανση του βιοφίλμ (reviewed by Shi and Zhu (2009)). Πρόσφατα, η εμπλοκή των επίμονων κυττάρων έχει προταθεί ως μια άλλη εξήγηση για τη μειωμένη ευαισθησία των βιοφίλμ στα απολυμαντικά, καθώς η υπερβολική χρήση απολυμαντικών μπορεί να δημιουργήσει επιλεκτική πίεση που ευνοεί την εμφάνιση προσαρμοστικών και διασταυρούμενων ανθεκτικότητας και τη μεταφορά τους στη μη ανθεκτική μικροχλωρίδα (Lewis 2010). Τέτοιες απομονώσεις σε σενάρια επεξεργασίας τροφίμων μπορεί να καταστήσουν τον συνήθη καθαρισμό και το καθεστώς απολύμανσης λιγότερο αποτελεσματικό (reviewed by Yuan et al (2021)).



Σχήμα 6: Χρησιμοποιώντας ομοεστιακή μικροσκοπία μπορεί να αποδειχθεί ότι καθώς οπτικοποιούνται τα τροφικά υλικά και τα κύτταρα, η κατανομή των κυττάρων (μπλε) και του οργανικού υλικού (ροζ) σχηματίζει ένα ετερογενές πλέγμα όπου μπορεί να προστατεύει τα κύτταρα. (a-c). Πιο κοντά στην επιφάνεια, το διαμορφωμένο (conditioned) φιλμ είναι πιο διαδομένο, αλλά όταν οπτικοποιείται από την επιφάνεια μέχρι την κορυφή του σωματιδίου τροφής (d-f) τα βακτήρια γίνονται πιο εμφανή. Στην κορυφή του σωματιδίου της τροφής (g-i) κυριαρχούν τα βακτήρια (Whitehead and Verran (2015)).



Σχήμα 7: Οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αντίσταση του βιοφίλμ στα χημικά απολυμαντικά (Yuan et al (2021)).

Γενικά, η απολύμανση κατά των κυττάρων του βιοφίλμ αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης του απολυμαντικού και του χρόνου επαφής (Yuan et al (2021)). Οι πιο υιοθετημένες στρατηγικές για

τον έλεγχο των βιοϋμενίων είναι οι διαδικασίες υγιεινής που συνδυάζουν απορρυπαντικά και απολυμαντικά. Το αλκαλικό απορρυπαντικό εξαλείφει τα οργανικά και ανόργανα όξινα απορρυπαντικά απόβλητα από τις επιφάνειες, ενώ τα απολυμαντικά μειώνουν τους μικροοργανισμούς αλλοίωσης, και μειώνουν ή εξαλείφουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς, σε ασφαλή επίπεδα (Simoes, et al (2010), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Σε πολλές περιπτώσεις μπορεί να είναι ωφέλιμη η χρήση δύο ή περισσότερων μεθόδων για τον καθαρισμό των επιφανειών διεργασιών, επειδή οι μικροοργανισμοί έχουν τότε να υιοθετήσουν όλες τις τεχνικές για να επιβιώσουν (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992)). Η δράση μπορεί να είναι μηχανικό ξέπλυμα ή επεξεργασία με χλώριο ή μονοχλωραμίνη (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992)). Η καταπόνηση των μικροοργανισμών με τη χρήση μιας ανεπαρκούς μέθοδο καθαρισμού ή διαδικασία έκπλυσης μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να προκαλέσει τη δημιουργία βιοϋμενίου, για παράδειγμα, η χλωρίωση προκάλεσε την ανάπτυξη ορισμένων ειδών *Pseudomonas* σε βιοφίλμ (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Genigeorgis (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Παρόμοια με την χρήση της επιλογής αντιβιοτικών για ανθεκτικά βακτήρια, τα απολυμαντικά ή οι απολυμαντικοί παράγοντες που συνήθως εφαρμόζονται σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων μπορούν να επιλέξουν παθογόνους μικροοργανισμούς που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα στις εν λόγω χημικές ουσίες (Shirron et al (2009), reviewed by Bai et al (2021)). Η παρουσία υπολειμμάτων τροφίμων σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα πριν από την απολύμανση επηρεάζει σημαντικά τον καθαρισμό και την απολύμανση, επειδή τα υπολείμματα αυτά προάγουν το σχηματισμό βιοφίλμ και μεταβάλλουν επίσης τις ιδιότητες της επιφάνειας (Møretro et al. 2012). Επιπλέον, η παρουσία οργανικής ύλης μπορεί επίσης να μειώσει την αντιμικροβιακή ιδιότητα των απολυμαντικών (reviewed by Yuan et al (2021)). Η θεραπεία του *P. aeruginosa* αποτελεί πρόκληση επειδή μπορεί να σχηματίζει μολυσματικά βιοϋμένια μετά τη μόλυνση, τα οποία λειτουργούν σαν φράγμα που προστατεύει τα βακτήρια από τη μεσολαβούμενη από το συμπλήρωμα ανοσία και τη φαγοκυττάρωση και μειώνει σημαντικά την προσβασιμότητα των αντιβιοτικών (Donelli (2014)). Ως εκ τούτου, η ολοκληρωμένη γνώση του σχηματισμού βιοφίλμ του *P. Aeruginosa* είναι σημαντική για την πρόληψη και τη θεραπεία ανθεκτικών λοιμώξεων (reviewed by Bai et al (2021)). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα βιοφίλμ μικτών ειδών δεν είναι πάντα λιγότερο ευαίσθητα στα απολυμαντικά και τα αντιμικροβιακά από ό,τι τα βιοφίλμ που αποτελούνται από ένα είδος, όπως η ευαισθησία στα απολυμαντικά μπορεί να αποδοθεί σε πολλούς παράγοντες εκτός από τον αριθμό των ειδών που υπάρχουν (Yuan et al (2020)). Η συμπεριφορά των αδρανών μικροοργανισμών στα απολυμαντικά επηρεάζεται έντονα από τον τύπο των επιφανειών, επειδή πολλοί παράγοντες που σχετίζονται με την επιφάνεια, όπως η δομή, η τοπογραφία, η τραχύτητα και οι ηλεκτρικές ιδιότητες, επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών (Yuan et al (2021)). Ωστόσο, σημαντικές μελέτες έχουν ήδη δείξει ότι η μεμονωμένη χρήση χημικής απολύμανσης αποτυγχάνει να απομακρύνει πλήρως τα κύτταρα του βιοφίλμ στην επιφάνεια επαφής με τρόφιμα, λόγω της αντίστασης των κυττάρων του βιοφίλμ έναντι των απολυμαντικών. Επιπλέον, πολλοί παράγοντες, όπως ο τύπος και η συγκέντρωση των απολυμαντικών, ο χρόνος έκθεσης, οι στοχευόμενοι μικροοργανισμοί, οι τύποι των

επιφανειών στις οποίες εφαρμόζονται τα απολυμαντικά, το pH, τα υπολείμματα τροφίμων, η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία, θα μπορούσαν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών για την εξάλειψη των βιοϋμενίων (Cappitelli et al (2014), reviewed by Yuan et al (2021)). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των απολυμαντικών και του πλέγματος του βιοφίλμ μπορεί να είναι επίσης υπεύθυνες για την αποτυχημένη διείσδυση των αντιμικροβιακών ουσιών στα βαθύτερα στρώματα των βιοϋμενίων (Davison et al (2010), reviewed by Yuan et al (2021)). Το CIP σε ένα ζυθοποιείο δεν μείωσε σημαντικά μικροβιακή μόλυνση στο 52% των δειγμάτων και μάλιστα οδήγησε σε υψηλότερους αριθμούς βακτηρίων στο 24% όλων των δειγμάτων (Parijs and Steenackers 2018, reviewed by Wagner et al 2021). Γενικά, η ποσότητα και η σύνθεση του EPS διαφέρουν από το ένα βακτηριακό είδος στο άλλο, γεγονός που θα μπορούσε να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών (Yuan et al (2021)).

## 2.2. Τρόποι ανίχνευσης βιοφίλμ

Τα βιοϋμένια που σχηματίζονται σε άλλα (μη αποχετευτικά) βιομηχανικά περιβάλλοντα έχουν επίσης μελετηθεί με μεθοδολογίες ανεξάρτητες από την καλλιέργεια. Για παράδειγμα, η αλληλούχηση της μικροβιακής χλωρίδας του βιοφίλμ που επέζησε από την εξυγίανση ιμάντων μεταφοράς επεξεργασίας σολομού έδειξε ότι το *Pseudomonas* spp. ήταν το κυρίαρχο γένος και ότι το *L. monocytogenes* αντιπροσώπευε μεταξύ 0,1% και 0,01% του πληθυσμού του βιοφίλμ που ανακτήθηκε (Langsrud et al. (2016), reviewed by Alvarez-Ordóñez et al (2019)).

Η εκτίμηση του συνολικού αριθμού των οργανισμών (συνολικός αριθμός βιώσιμων οργανισμών) είναι η πιο διαδεδομένη χρησιμοποιούμενη τεχνική για την εκτίμηση των βιώσιμων κυττάρων του βιοφίλμ. Η καταμέτρηση αυτή γίνεται σε θρεπτικό υλικό άγαρ και το αποτέλεσμα είναι οι μονάδες σχηματισμού αποικιών (CFU). Με βάση την προσέγγιση της σειράς σειριακών αραιώσεων που ακολουθείται για την ποσοτικοποίηση των μικροοργανισμών, η τεχνική αυτή είναι εύκολη και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό [Azeredo et al (2017)]. Τα επιφανειακά δείγματα επιφανειών (coupons) από ανοξείδωτο χάλυβα, πλαστικό, καουτσούκ με βιοϋμένια αναλύονται με μπατονέτα ή με ηχοβολισμό και μεταφέρονται σε πλάκες άγαρ (reviewed by Carrascosa. et al.(2021)). Οι επιφάνειες (coupons) μπορούν στη συνέχεια να χρησιμοποιηθούν για να συμβολίσουν την επιφάνεια, για παράδειγμα, ενός σωλήνα. Μετά τον καθαρισμό τους, οι επιφάνειες (coupons) και το βιοφίλμ μπορούν να διαχωριστούν και η ποσότητα του βιοφίλμ μπορεί να προσδιοριστεί (Jass et al (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)).

Η χρώση των βιοϋμενίων που αναπτύσσονται σε φρεάτια μικροταινιακών πλακών χρησιμοποιείται ευρέως από τους ερευνητές για τον έλεγχο και τη σύγκριση του σχηματισμού βιοφίλμ από διαφορετικά βακτήρια ή υπό διάφορες συνθήκες (Ommen et al (2017)). Από τις μεθόδους που περιγράφονται στη βιβλιογραφία, το κρυσταλλικό ιώδες (αριθμός CAS 931418 92 7) (Stepanovi'c et al (2000)) είναι η πιο διαδεδομένη για την ποσοτικοποίηση της βιομάζας βιοφίλμ (Doll et all (2016), Extremina et al (2010)). Αυτή η βασική χρωστική δεσμεύει αρνητικά φορτισμένα μόρια και, ως εκ τούτου, οι ουσίες είναι σε θέση να βάφουν τόσο τα βακτήρια όσο και το περιβάλλον πλέγμα του βιοφίλμ. Η χρώση με σαφρανίνη

μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για τη ποσοτικοποίηση της βιομεμβράνης της βιομάζας [Ommen et al (2017), Stiefel, et al (2016)], αλλά οδηγεί σε χαμηλότερες οπτικές πυκνότητες από την χρώση του κρυσταλλικού ιώδους και, ως εκ τούτου, μπορεί να μην είναι τόσο ευαίσθητη για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων βιοϋμενίου (Ommen et al (2017), reviewed by Carrascosa. et al.(2021)). Η Χρώση Crystal Violet (CV) είναι μια μέθοδος υψηλής απόδοσης για την ποσοτικοποίηση της ικανότητας προσκόλλησης και σχηματισμού βιοϋμενίου από μεγάλο αριθμό βακτηριακών ειδών υπό διαφορετικές συνθήκες (Yuan et al. (2018a), reviewed by Yuan et al (2020)).

Μπορούν να ακολουθηθούν διαφορετικές μέθοδοι για την οπτικοποίηση και τη διαφοροποίηση κυττάρων και οργανικής ύλης. Επισημαίνονται οι τεχνικές χρώσης για τη μέτρηση της επιφανειακής κάλυψης από τις δύο χρώσεις με ανάλυση εικόνας (Verran and Whitehead (2006)) με χρήση DAPI και ροδαμίνης Β, DAPI και φλουορεσκεΐνη, ή μη ειδικές χρώσεις, όπως το πορτοκαλί της ακριδίνης, και είναι επίσης διαθέσιμες και εξιδικευμένες για συγκεκριμένη οργανική ύλη (Verran and Whitehead (2006)) ή και για μικροοργανισμούς (Declercq et al (2003), reviewed by Carrascosa et al (2021)).

Μοριακές τεχνολογίες όπως η ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (qPCR), μικροσυστοιχίες DNA και ο τομέας της προσέγγισης των omics συμβάλλουν στην ταυτοποίηση της γονιδιακής ρύθμισης και της ιογένεσης των βιοφίλμ μικτών ειδών σε συγκεκριμένες τροφικές κόγχες. (Machado et al (2013), reviewed by Yuan et al (2020)).

Πιο πρόσφατα, οι ευαίσθητες τεχνικές για την ανίχνευση γνωστών μικροβίων αλλοίωσης που χρησιμοποιούν είτε κυτταρομετρία εικόνας (Hodgkin et al (2020)), αλυσιδωτές αντιδράσεις πολυμεράσης (PCR) (Janagama et al (2018)), βιοφωταύγεια (Takahashi et al (2019)) ή μοριακούς ανιχνευτές (Paradh et al (2014), reviewed by Bose. et al (2021)).

Ορισμένες μέθοδοι απαιτούν η επιφάνεια του βιοφίλμ να διαταράσσεται (μέθοδοι με βάση το άγαρ) (Lappin-Scott et al (1993)). Άλλες μέθοδοι όπου η επιφάνεια δεν χρειάζεται να έχει επίσης σχεδιαστεί. Μεταξύ αυτών είναι: Φασματομετρία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR) (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Lappin-Scott et al (1993)), φασματοσκοπία (Costerton et al (1995), Lappin-Scott et al (1993)), αντίδραση χρώσης (χρώση κατά Gram) (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Costerton et al (1995)), συνεστιακή μικροσκοπία λέιζερ σάρωσης (CLSM) (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992); Genigeorgis (1995); Costerton et al (1995), Lappin-Scott et al (1993)), πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (NMR) (Mattila-Sandholm and Wirtanen (1992), Costerton et al (1995), Lappin-Scott et al (1993)) και μικροσκοπία φθορισμού (χρήση ανιχνευτών φθορισμού) (Genigeorgis (1995), Costerton et al (1995), reviewed by Venø, Lena (1999)). Οι μελέτες φασμάτων Raman χαρακτηρίζονται από υψηλή ειδικότητα και αποκαλύπτουν συνήθως πιο σαφείς ζώνες από ό,τι τα φάσματα IR, και μικρό υπόβαθρο νερού (Carrascosa. et al.(2021)).

Σήμερα, η συνεστιακή μικροσκοπία είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη της δομής των βιοϋμενίων χάρη στην εξαιρετική δυνατότητα απεικόνισης σε πραγματικό χρόνο πλήρως ενυδατωμένων ζωντανών δειγμάτων. Ο περιορισμός της χωρικής ανάλυσης της φωτεινής μικροσκοπίας βελτιώνεται με μια τεχνική φθορισμού και με τη σύζευξη του CLSM με άλλες τεχνικές απεικόνισης

(Pantanella et al (2013)). Η PNA FISH και η CLSM επιτρέπει τη χωρική οργάνωση και τις αλλαγές σε συγκεκριμένα μέλη πολύπλοκων μικροβιακών πληθυσμών να μελετηθούν χωρίς να διαταραχθεί η δομή του βιοφίλμ (Dige, et al (2009), Malic et al (2009), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)). Η συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (CLSM) είναι ένα οπτικό μικροσκόπιο εξοπλισμένο με μια ακτίνα λέιζερ που είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την εξέταση παχίων δειγμάτων όπως τα μικροβιακά βιοφίλμ (Carrascosa. et al.(2021)). Η CLSM είναι το εργαλείο που χρησιμοποιείται για τη διαφοροποίηση μεταξύ διαφορετικών ειδών σε μικτά βιοϋμένια όταν συνδυάζεται με δείκτες φθορίζουσας πρωτεΐνης (Habimana et al. 2010) ή φθορίζοντος υβριδισμού in situ (FISH) (Liu et al. 2018), επειδή επιτρέπει την άμεση διερεύνηση των δομών του βιοφίλμ με υψηλή ανάλυση, την εξάλειψη της θολής απόκλισης και την εξάλειψη της ποσοτικής απεικόνισης δισδιάστατων, τρισδιάστατων και τετραδιάστατων ανακατασκευών του βιοφίλμ (reviewed by Yuan et al (2020)). Τεχνικές μικροσκοπίας, όπως ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), συνεστιακή μικροσκοπία σάρωσης με λέιζερ (CLSM), υβριδισμός με φθορισμό in situ (FISH), συνεχής βελτιστοποιούμενη συνεστιακή μικροσκοπία ανάκλασης (COCRM), φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό με λέιζερ (LAESI-MS) και η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM), παρέχουν καλύτερη κατανόηση της πολύπλοκης δομής των βιοϋμενίων (Alhede et al. (2012), reviewed by Yuan et al (2020)).

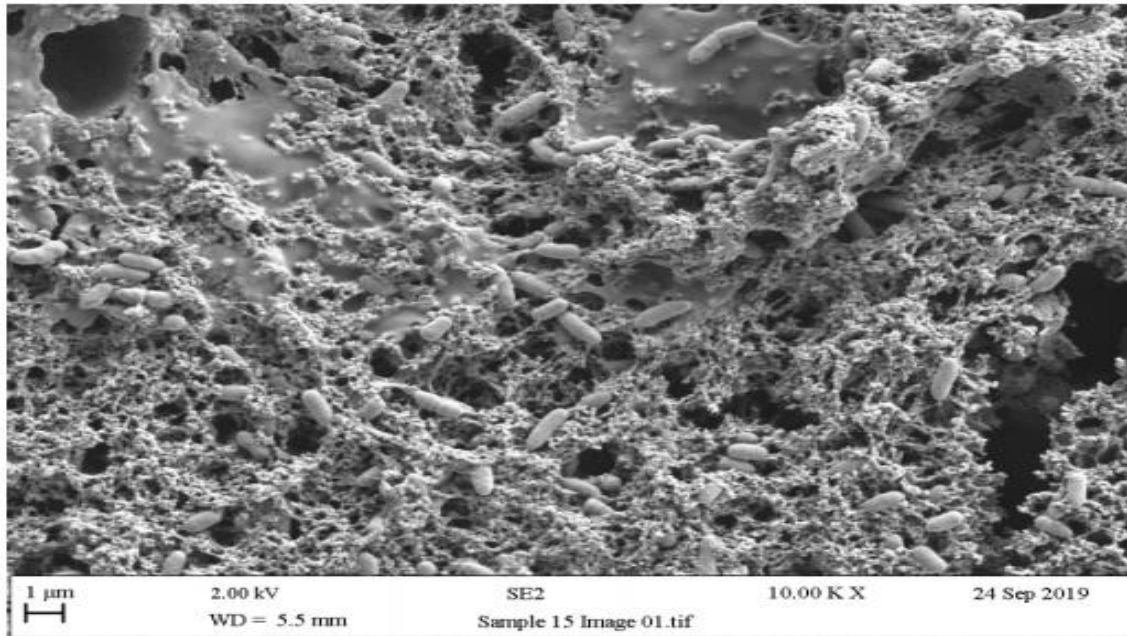
Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες για να εξεταστεί κατά πόσον η παρουσία ορισμένων μελών του μόνιμου μικροβιόκοσμου παρουσιάζει μια σημαντική συσχέτιση (είτε θετική είτε αρνητική) με την εμφάνιση του *L. monocytogenes* σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας τροφίμων. Πρόσφατες εξελίξεις στην αλληλουχία υψηλής απόδοσης (HTS) είχαν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μεγάλου όγκου δεδομένων σχετικά με την σχετική σύνθεση των μικροβιακών κοινοτήτων, κυρίως μέσω μελετών αλληλούχισης του γονιδίου 16S rRNA. [De Filippis et al (2018)] .Οι μέθοδοι είναι αρκετά ευαίσθητες ώστε να επιτρέπουν την ανίχνευση των μη κυρίαρχων μελών μιας κοινότητας που μπορεί να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο σε ένα συγκεκριμένο οικοσύστημα (reviewed by Fagerlund et al (2021)).

Όπως και με άλλες τεχνικές που αναφέρθηκαν προηγουμένως, η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος πόρος για επιβεβαίωση της παρουσίας βακτηρίων και του πλέγματος εξωπολυσακχαριτών κατά τη μελέτη βιοϋμενίων (Σχήμα 8-10). Οι μελέτες αυτές λαμβάνουν συνήθως αποτελέσματα SEM και συμπληρώνονται με τα αποτελέσματα άλλων τεχνικών όπως η ομοεστιακή (Hu, et al (2015), Mohmmmed et al (2017)), η φασματοσκοπία επιφανειακά ενισχυμένης σκέδασης Raman (SERS) (Bodelón et al (2017)), η μικροσκοπία επιφθορισμού (DAPI/Rhodamine B) και η πλάκες επαφής (Whitehead et al (2019), reviewed by Carrascosa. et al. (2021)).

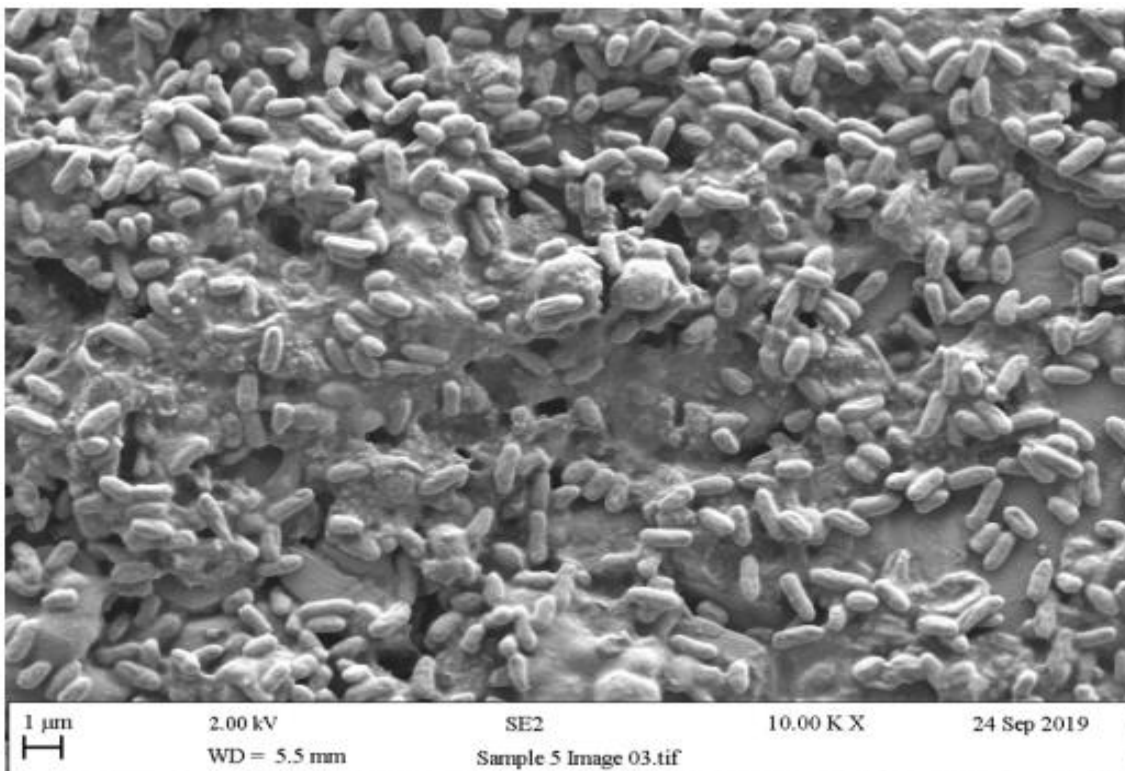
Οι τεχνικές αυτές παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τον τρόπο με τον οποίο τα συμμετέχοντα μέλη συνεργάζονται και ανταγωνίζονται για τους πόρους και πώς κατανέμονται οι μεταβολικές δραστηριότητες μεταξύ των μελών της κοινότητας (Verastegui et al. (2014), Nakamura et al. (2016), Herschend et al. (2017), reviewed by Yuan et al (2020)).

Επομένως, ανάλογα με τους στόχους που έχουμε θέσει, δηλαδή το τι θέλουμε να επιτύχουμε με το βιοφίλμ, θα πρέπει να επιλέξουμε μια τεχνική σύμφωνα με τη μελέτη μας. Δεν είναι όλες οι τεχνικές

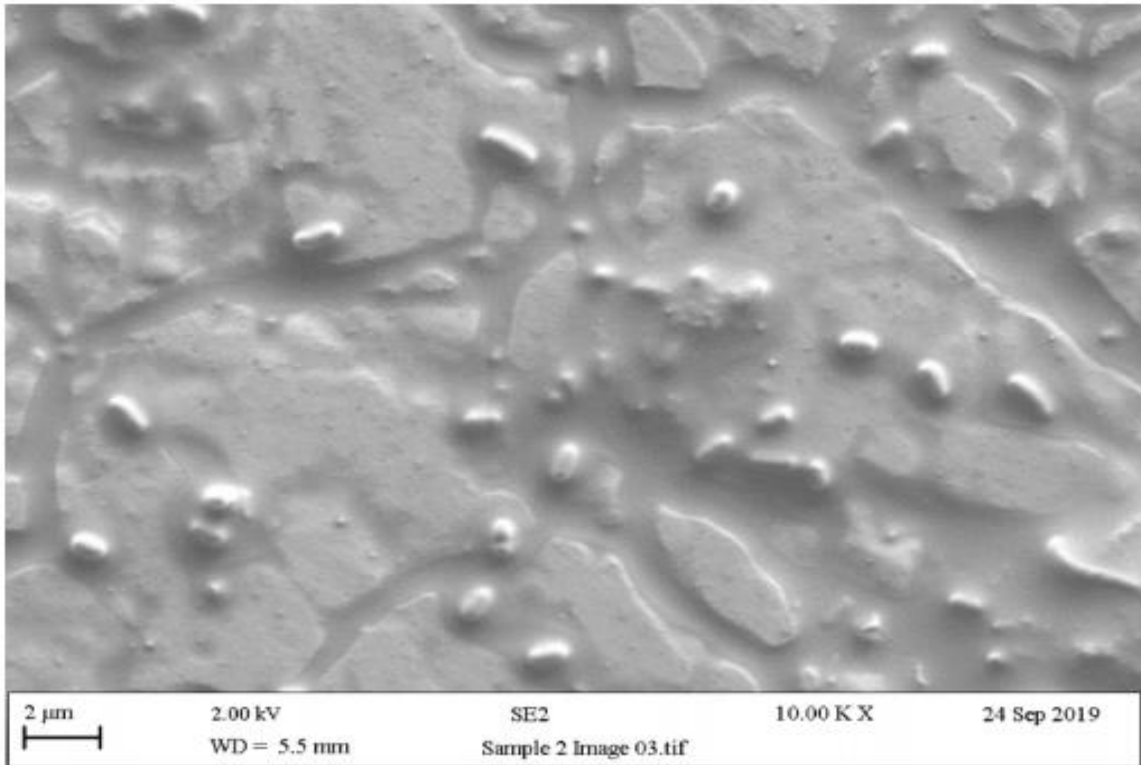
κατάλληλες για έναν συγκεκριμένο σκοπό, αλλά μπορεί να είναι συμβατές. Έτσι, ορισμένες μέθοδοι είναι κατάλληλες για ποσοτικοποίηση του πλέγματος του βιοφίλμ, ενώ άλλες είναι σε θέση να αξιολογήσουν τόσο τα ζωντανά όσο και τα νεκρά κύτταρα, ή να ποσοτικοποιούν αποκλειστικά τα βιώσιμα κύτταρα στα βιοϋμένια (Carrascosa. et al.(2021)).



Σχήμα 8: Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) ανοξείδωτου χάλυβα από βιοφίλμ 3 ημερών που σχηματίστηκαν από *Pseudomonas fluorescens* (Carrascosa. et al. (2021))



Σχήμα 9: Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) από ανοξείδωτο χάλυβα με βιοφίλμ 7 ημερών που σχηματίστηκαν από *Pseudomonas fluorescens* (Carrascosa. et al. (2021))



Σχήμα 10: Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) από ανοξείδωτο χάλυβα με βιοφίλμ 7 ημερών που σχηματίστηκαν από *Pseudomonas fluorescens* μετά από επεξεργασία με υπεροξικό οξύ (250 ppm) για 15 λεπτά (Carrascosa. et al. (2021)) .

### Κεφάλαιο 3: Πειραματικό μέρος

#### 3.1 Σκοπός πειράματος

Σκοπός αυτής της πτυχιακής εργασίας είναι η κατανόηση της ανθεκτικότητας των βιοφίλμ σε διάφορες επιφάνειες επαφής με τρόφιμα, ενάντια σε συμβατικά απολυμαντικά, χρησιμοποιώντας μία χρωστική (TBF300) παραχώρηση της εταιρείας Rolco) και η σύγκριση της ανθεκτικότητας αυτής με τη βοήθεια στατιστικών πακέτων. Δημιουργήθηκε ένας δείκτης σχηματισμού βιοφίλμ και εξετάστηκε η υπόθεση ότι στις γωνίες το βιοφίλμ σχηματίζεται πιο εύκολα σε σχέση με τις λείες επιφάνειες και επομένως ο δείκτης σχηματισμού βιοφίλμ θα είναι μεγαλύτερος.



## Αρχή μεθόδου-Πειραματική διαδικασία

Το TBF300 είναι ένα γρήγορο τεστ ανίχνευσης μικροβιακών βιοφίλμ σε επιφάνειες. Είναι κατάλληλο για την αξιολόγηση παρουσίας βιοφίλμ σε επιφάνειες μετά από τις διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης. Περιέχει βιολογικούς παράγοντες βαφής, επιλεγμένους για την ικανότητά τους να χρωματίζουν βιοφίλμ που σχηματίζονται από διαφορετικά είδη βακτηρίων. Η βασική χρωστική που περιέχει το σκεύασμα TBF300 είναι η ροδαμίνη, η οποία δεσμεύεται από τα βιοφίλμ και προσδίδει αυτόν τον ροζ χρωματισμό. Ο χρωματισμός των βιοφίλμ είναι ορατός με μια ματιά, δεν απαιτείται ειδικός εξοπλισμός ή εξειδικευμένο προσωπικό. Χρωματίζει επιλεκτικά τα βιοφίλμ

που σχηματίζονται από βακτήρια όπως *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* και *Listeria Monocytogenes*, μεταξύ άλλων. Δεν εξαρτάται από τα είδη βακτηρίων στο βιοφίλμ. Υπολείμματα τροφίμων, όπως γάλα, λίπος, και άπαχο κρέας, δεν χρωματίζονται. Το TBF300 περιέχει επίσης επιφανειοδραστικές, πηκτικές ουσίες και σταθεροποιητές για ευκολότερη εφαρμογή και μεγαλύτερο χρόνο πρόσφυσης. Είναι υδατοδιαλυτό, και εύκολο να ξεπλυθεί με νερό εκτός από περιπτώσεις σχηματισμού κηλίδων βιοφίλμ.

Χάρη στην ευκολία χρήσης του, το TBF300 είναι κατάλληλο για τον τακτικό έλεγχο της υγιεινής επιφανειών, σε συνδυασμό και με άλλες εφαρμοζόμενες τεχνικές (π.χ. μέτρηση βιοφωταύγειας). Εφαρμογή του TBF300 έπεται από διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης, καθιστούν δυνατή την ταυτοποίηση των κηλίδων βιοφίλμ που απαιτούν ειδική διαδικασία απολύμανσης. Το TBF300 πρέπει να εφαρμόζεται σε οριζόντιες επιφάνειες από μη πορώδη υλικά (ανοξείδωτος χάλυβας, αλουμίνιο, κλπ.) (Τεχνικό Φυλλάδιο TBF 300S (2019)).







Εικόνα 1: Σκεύασμα χρωστικής βιοφίλμ, TBF300 ([https://biofilmtest.com/en\\_gb/deteccion-y-eliminacion-de-biofilms/](https://biofilmtest.com/en_gb/deteccion-y-eliminacion-de-biofilms/))

### Διεργασία ελέγχου (σχήμα 11):

1. Επιλογή επιφάνειας που πρόκειται να αναλυθεί και εφαρμογή του προϊόντος σε μια οριζόντια επιφάνεια περίπου 10 cm<sup>2</sup>.
2. Αναμονή του προϊόντος ώστε να δράσει για τουλάχιστον 5 λεπτά.
3. Ξέπλυμα της περιοχής με νερό για απομάκρυνση του αφρού.
4. Έλεγχος για την παρουσία ροζ χρώματος που παραμένει στην επιφάνεια μετά το ξέβγαλμα και κατάταξη σε μία κλίμακα 0 ως και 3 ανάλογα με το τελικό χρώμα (πίνακας 1)
5. Υπολειπόμενος (ροζ/φούξια) χρωματισμός στην επιφάνεια δοκιμής υποδεικνύει την

παρουσία βιοφίλμ. Σε αυτήν την περίπτωση συνιστάται καθαρισμός και απολύμανση της επιφάνειας χρησιμοποιώντας προϊόντα απομάκρυνσης βιοφίλμ και επανάληψης της διεργασίας ελέγχου (Τεχνικό Φυλλάδιο TBF 300S (2019)).

Πίνακας 1 Βαθμολογία και εμφάνιση της χρώσης TBF300





Φωτογραφία				
Χρώση	Καθόλου ροζ	Απαλό ροζ	Λιγότερο έντονο ροζ	Έντονο ροζ
Βαθμός	0	1	2	3



Χρήση και εφαρμογή του TBF® 300

Σχήμα 11: Πρωτόκολλο εφαρμογής TBF300 ([https://biofilmtest.com/en\\_gb/deteccion-y-eliminacion-de-biofilms/](https://biofilmtest.com/en_gb/deteccion-y-eliminacion-de-biofilms/))

Πίνακας 2: Παράδειγμα διεργασίας ελέγχου βιοφίλμ με το TBF300S

			
<b>Ψεκάσμος 1<sup>ης</sup> εφαρμογής σε φούρνο μικροκυμάτων</b>	<b>Αποτέλεσμα 1<sup>ης</sup> εφαρμογής σε φούρνο μικροκυμάτων</b>	<b>Ψεκάσμος 2<sup>ης</sup> εφαρμογής σε φούρνο μικροκυμάτων</b>	<b>Αποτέλεσμα 2<sup>ης</sup> εφαρμογής σε φούρνο μικροκυμάτων</b>

Για τις επιμολύνσεις χρησιμοποιήθηκαν καλλιέργειες *Saccharomyces cerevisiae* και *Bacillus subtilis* και ακολούθησε η παρακάτω διαδικασία:

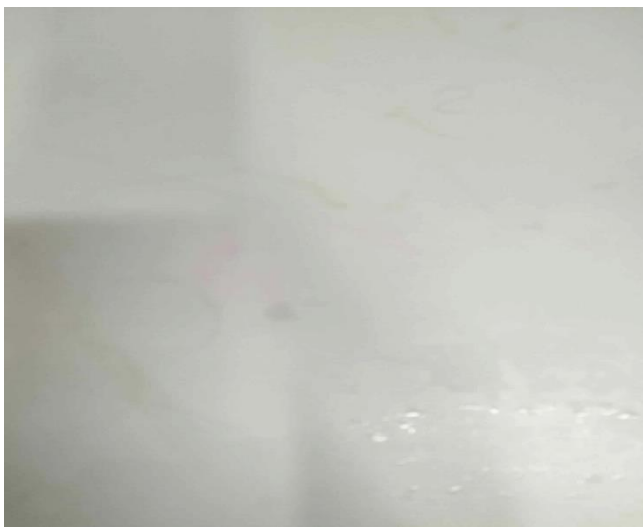
1. Παραλαβή καλλιέργειας και επίστρωση σε σεσημασμένη περιοχή (πάγκο ή γωνία).
2. Αναμονή 20 λεπτών για προσκόλληση στην επιφάνεια.
3. Εφαρμογή πρωτοκόλλου TBF300 για έλεγχο βιοφίλμ.



Εικόνα 3: Επιφάνεια (πάγκος) επιμολυσμένη με *Saccharomyces cerevisiae* στο εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.



Εικόνα 2: Γωνία επιμολυσμένη με *Saccharomyces cerevisiae* στο εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

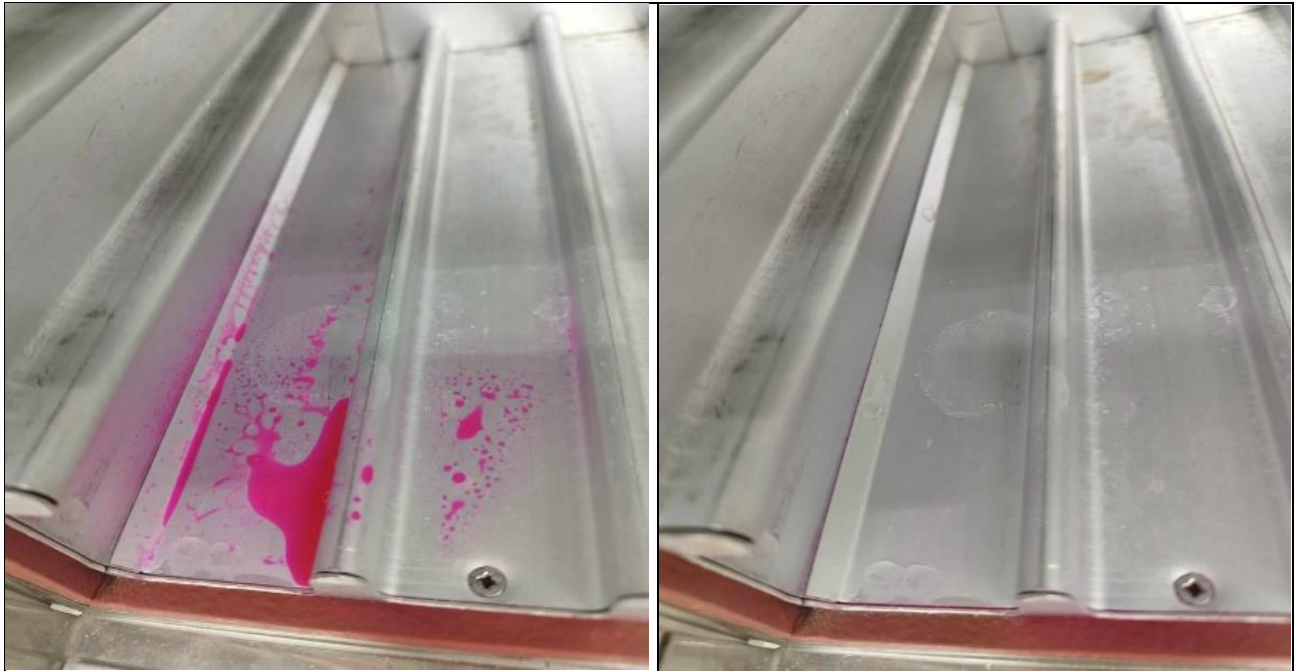


Εικόνα 5: Επιφάνεια (πάγκος) 2 επιμολυσμένη με *Saccharomyces cerevisiae* στο εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

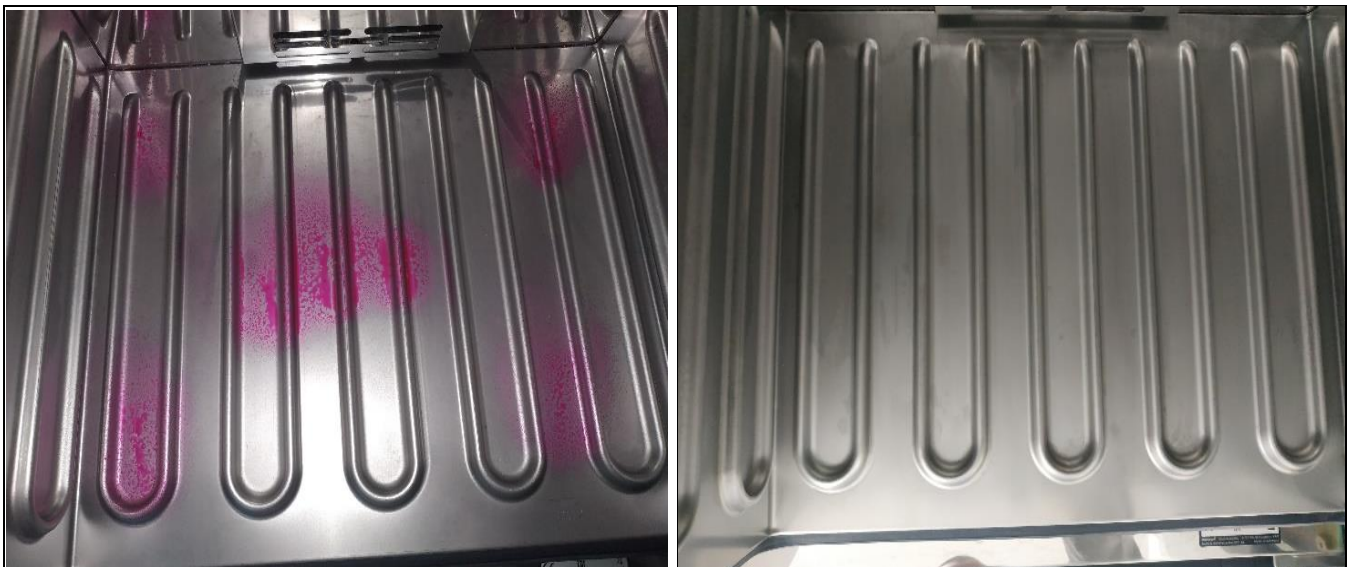


Εικόνα 4: Γωνία 2 επιμολυσμένη με *Saccharomyces cerevisiae* στο εργαστήριο οινολογίας Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.

## Εικόνες



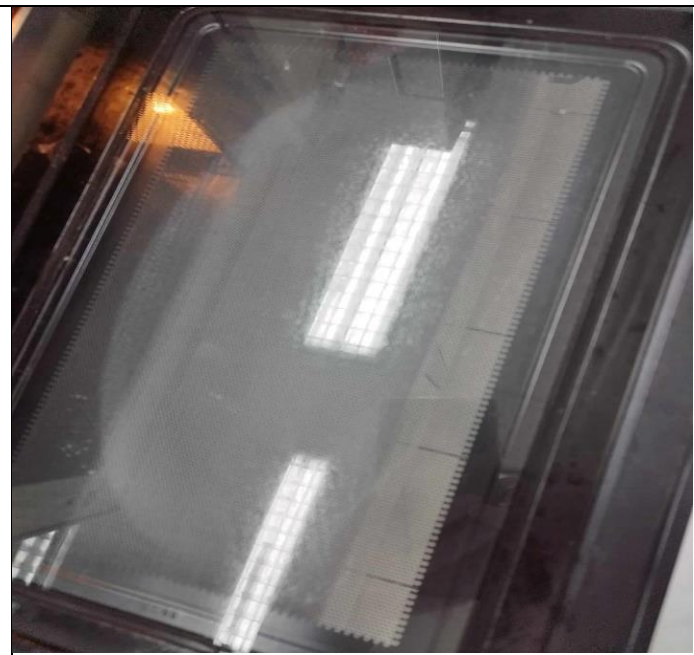
Εικόνα 6: Κλίβανος 1, εργαστήριο μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



Εικόνα 7: Κλίβανος 2, εργαστήριο μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



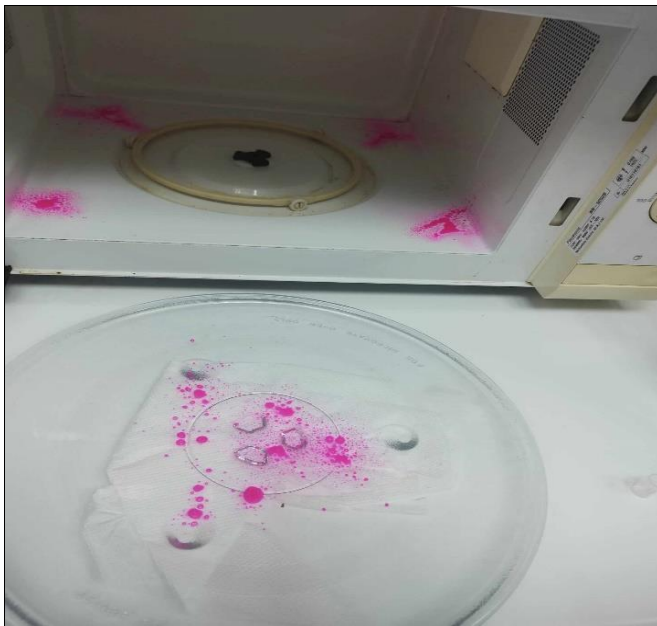
Εικόνα 8: Φούρνος μικροκυμάτων 1 (εσωτερικό), εργαστήριο μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



Εικόνα 9: Φούρνος μικροκυμάτων 1 (εσωτερικό πόρτας), εργαστήριο μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



Εικόνα 10: Φούρνος μικροκυμάτων 1 (πιάτο), εργαστήριο μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



Εικόνα 11: Φούρνος μικροκυμάτων 2 (πιάτο), εργαστήριο μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



Εικόνα 12: Ψυγείο 1, εργαστήριο μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



Εικόνα 13: Ψυγείο 2, εργαστήριο μικροβιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



*Εικόνα 14: Αποστειρωτήρας, εργαστήριο επεξεργασίας τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής*



*Εικόνα 15: Παστεριωτήρας, εργαστήριο επεξεργασίας τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής*

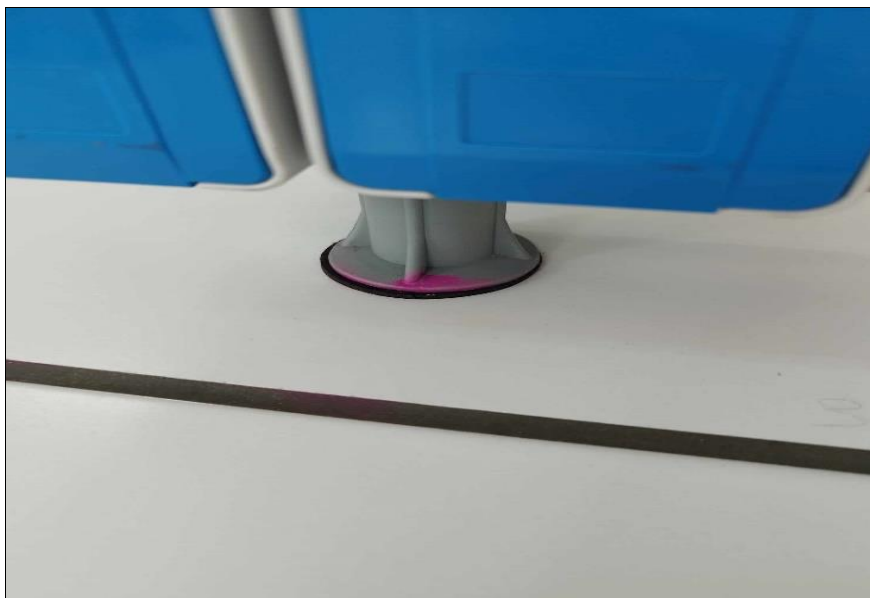


*Εικόνα 16: Καταψύκτης, εργαστήριο επεξεργασίας τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής*





*Εικόνα 17: Γεννήτρια, εργαστήριο επεξεργασίας τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής*



*Εικόνα 18: Πρίζα (γωνία), εργαστήριο χημικής σύστασης, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής*



Εικόνα 19: Βρύση (γωνία), εργαστήριο χημικής σύστασης, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



Εικόνα 20: Επιφάνεια 1, εργαστήριο οιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής



Εικόνα 21: Γωνία 1, εργαστήριο οιολογίας, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής

## Συζήτηση

- Στο πειραματικό μέρος πραγματοποιήθηκαν 144 έλεγχοι βιοφίλμ (μετρήσεις). Μετά από την πειραματική διαδικασία κατανεμήθηκαν οι μετρήσεις με κριτήριο το σύνολο βαθμολογίας (0-3) και υπολογίστηκαν τα score όπως περιγράφεται στην επόμενη παράγραφο. Το ίδιο έγινε για την πρώτη και τη δεύτερη εφαρμογή. Έπειτα, τα score κατανεμήθηκαν με κριτήριο τα είδη των επιφανειών και δημιουργήθηκαν γραφήματα

για την εικονική σύγκριση αυτών. Τέλος, επεξεργάστηκαν τα δεδομένα πάγκων-γωνιών με επιμόλυνση και χωρίς στο στατιστικό πακέτο SPSS, ώστε να βρεθεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά. Το σκορ ή δείκτης σχηματισμού βιοφίλμ (ΔΣΒ), που κατασκευάσαμε, είναι το κριτήριο που δείχνει πόσο επιρρεπής είναι μία επιφάνεια στον σχηματισμό και την αντοχή του βιοφίλμ, δηλαδή όσο μεγαλύτερο είναι το score τόσο πιο ευαίσθητη είναι η επιφάνεια στην εμφάνιση του βιοφίλμ, καθώς και τόσο πιο δύσκολη είναι η απομάκρυνση του. Υπολογίζεται με τον τύπο:

$$\text{score} = \Delta\text{ΣΒ} = \frac{(0 \times \text{ΣΥΝΟΛΟ "0"}) + (1 \times \text{ΣΥΝΟΛΟ "1"}) + (2 \times \text{ΣΥΝΟΛΟ "2"}) + (3 \times \text{ΣΥΝΟΛΟ "3"})}{\text{ΣΥΝΟΛΟ ΕΦΑΡΜΟΓΗΣ}}$$

- Ο δείκτης σχηματισμού βιοφίλμ έχει τιμές από 0 (καθόλου βιοφίλμ) ως 3 (έντονος σχηματισμός βιοφίλμ). Όσο μεγαλύτερος είναι ο δείκτης (το σκορ) σε μία εξεταζόμενη επιφάνεια τόσο μεγαλύτερη είναι η δυσκολία απομάκρυνσης του βιοφίλμ.
- Εξετάστηκε η υπόθεση ότι στις γωνίες το βιοφίλμ σχηματίζεται πιο εύκολα σε σχέση με τις λείες επιφάνειες και επομένως ο δείκτης σχηματισμού βιοφίλμ θα είναι μεγαλύτερος.
- Δημιουργήθηκαν οι πίνακες 6 και 7 και το διάγραμμα 5 για να εξετάσουμε μεμονωμένα την υπόθεση αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα score (ΔΣΒ) λείων επιφανειών (πάγκοι) με τις γωνίες. Ασχοληθήκαμε μόνο με τις επιμολυσμένες επιφάνειες με *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3. Αποτελέσματα

Πίνακας 3: Μετρήσεις και score 1<sup>ης</sup> εφαρμογής TBF300

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΤ	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	1η ΕΦΑΡΜΟΓΗ						score
		καθόλου ροζ	απαλό ροζ	λιγότερο έντονο ροζ	έντονο ροζ			
		ΣΥΝΟΛΟ "0"	ΣΥΝΟΛΟ "1"	ΣΥΝΟΛΟ "2"	ΣΥΝΟΛΟ "3"	ΣΥΝΟΛΟ 1η ΕΦΑΡΜΟΓΗ		
ΚΛΙΒΑΝΟΣ	ΟΧΙ	20	4	2	0	26	0,31	
ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ	ΟΧΙ	4	0	0	0	4	0,00	
ΨΥΓΕΙΟ	ΟΧΙ	2	4	0	0	6	0,67	
MICRO-WAVE	ΟΧΙ	14	4	1	2	21	0,57	
ΠΑΓΚΟΣ	ΟΧΙ	13	6	2	2	23	0,70	
ΓΩΝΙΑ	ΟΧΙ	2	2	5	5	14	1,93	
ΚΑΤΑΨΥΚΤΗΣ	ΟΧΙ	0	0	0	2	2	3,00	
ΠΑΣΤΕΡΙΩΤΗΡΑΣ	ΟΧΙ	1	0	0	0	1	0,00	
ΓΕΝΝΗΤΡΙΑ	ΟΧΙ	0	0	0	1	1	3,00	
ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΤΗΡΑΣ	ΟΧΙ	0	0	1	0	1	2,00	
ΝΕΡΟΧΥΤΗΣ	ΟΧΙ	1	0	0	0	1	0,00	
ΠΑΓΚΟΣ	ΖΥΜΗ	11	7	2	0	20	0,55	
ΓΩΝΙΑ	ΖΥΜΗ	5	3	7	3	18	1,44	
ΠΑΓΚΟΣ	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	3	0	0	0	3	0,00	
ΓΩΝΙΑ	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	2	0	0	1	3	1,00	

Πίνακας 4: Μετρήσεις και score<sup>2ης</sup> εφαρμογής TBF300

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	2η ΕΦΑΡΜΟΓΗ					
		καθόλου ροζ	απαλό ροζ	λιγότερο έντονο ροζ	έντονο ροζ		
		ΣΥΝΟΛΟ "0"	ΣΥΝΟΛΟ "1"	ΣΥΝΟΛΟ "2"	ΣΥΝΟΛΟ "3"	ΣΥΝΟΛΟ 2η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	score
ΚΛΙΒΑΝΟΣ	ΌΧΙ	21	5	0	0	26	0,19
ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ	ΌΧΙ	4	0	0	0	4	0,00
ΨΥΓΕΙΟ	ΌΧΙ	2	4	0	0	6	0,67
MICRO-WAVE	ΌΧΙ	14	5	0	2	21	0,52
ΠΑΓΚΟΣ	ΌΧΙ	18	3	1	1	23	0,35
ΓΩΝΙΑ	ΌΧΙ	3	6	5	0	14	1,14
ΚΑΤΑΨΥΚΤΗΣ	ΌΧΙ	0	0	0	2	2	3,00
ΠΑΣΤΕΡΙΩΤΗΡΑΣ	ΌΧΙ	1	0	0	0	1	0,00
ΓΕΝΝΗΤΡΙΑ	ΌΧΙ	0	0	0	1	1	3,00
ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΤΗΡΑΣ	ΌΧΙ	0	1	0	0	1	1,00
ΝΕΡΟΧΥΤΗΣ	ΌΧΙ	1	0	0	0	1	0,00
ΠΑΓΚΟΣ	ΖΥΜΗ	17	3	0	0	20	0,15
ΓΩΝΙΑ	ΖΥΜΗ	5	12	1	0	18	0,78
ΠΑΓΚΟΣ	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	3	0	0	0	3	0,00
ΓΩΝΙΑ	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	2	0	0	1	3	1,00

Πίνακας 5: Πίνακας των score με διαφοροποίηση στα είδη των επιφανειών

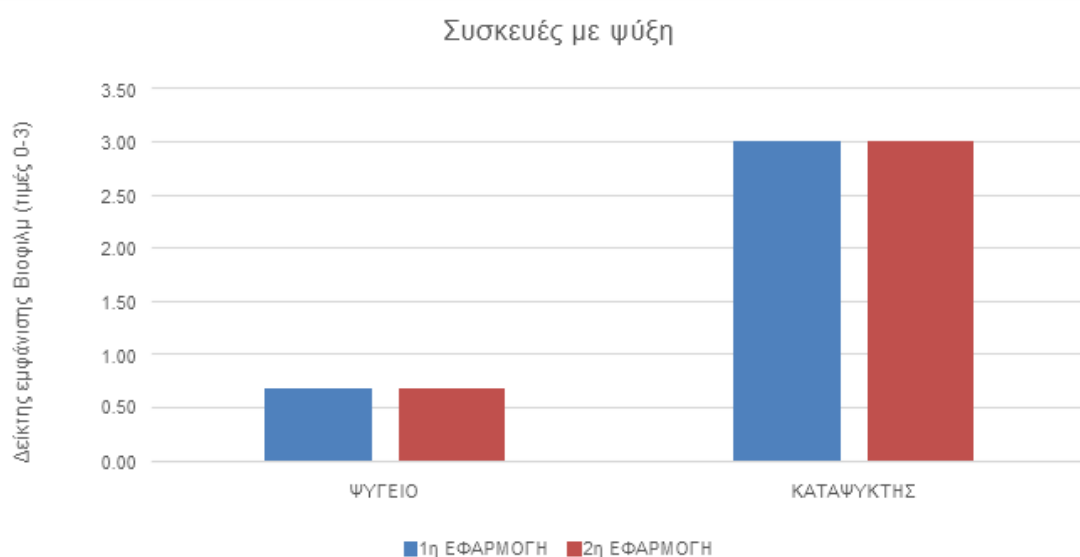
ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΜΕ ΘΕΡΜΑΝΣΗ	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	1η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	2η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ
ΚΛΙΒΑΝΟΣ	ΌΧΙ	0,31	0,19	26
ΥΔΑΤΟΛΟΥΤΡΟ	ΌΧΙ	0,00	0,00	4
MICRO-WAVE	ΌΧΙ	0,57	0,52	21
ΠΑΣΤΕΡΙΩΤΗΡΑΣ	ΌΧΙ	0,00	0,00	1
ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΤΗΡΑΣ	ΌΧΙ	2,00	1,00	1
ΓΕΝΝΗΤΡΙΑ	ΌΧΙ	3,00	3,00	1
ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΜΕ ΨΥΞΗ	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	1η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	2η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ
ΨΥΓΕΙΟ	ΌΧΙ	0,67	0,67	6
ΚΑΤΑΨΥΚΤΗΣ	ΌΧΙ	3,00	3,00	2
ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	1η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	2η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ
ΠΑΓΚΟΣ	ΌΧΙ	0,70	0,35	23
ΓΩΝΙΑ	ΌΧΙ	1,93	1,14	14
ΝΕΡΟΧΥΤΗΣ	ΌΧΙ	0,00	0,00	1
ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ ΜΕ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	1η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	2η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	ΣΥΝΟΛΟ ΜΕΤΡΗΣΕΩΝ
ΠΑΓΚΟΣ Ζ	ΖΥΜΗ	0,55	0,15	20
ΓΩΝΙΑ Ζ	ΖΥΜΗ	1,44	0,78	18
ΠΑΓΚΟΣ Β	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	0,00	0,00	3
ΓΩΝΙΑ Β	ΒΑΚΤΗΡΙΑ	1,00	1,00	3

\*Όπου ΠΑΓΚΟΣ Ζ και ΓΩΝΙΑ Ζ, οι πάγκοι και οι γωνίες που έχουν επιμολυνθεί με *Saccharomyces cerevisiae*

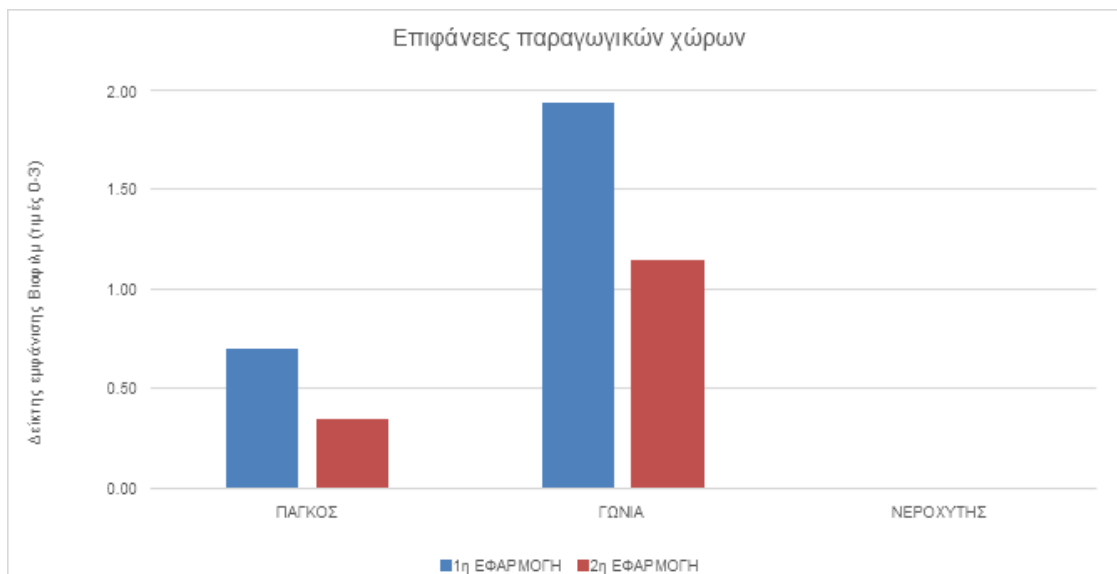
\*\*Όπου ΠΑΓΚΟΣ Β και ΓΩΝΙΑ Β, οι πάγκοι και οι γωνίες που έχουν επιμολυνθεί με *Bacillus subtilis*



**Διάγραμμα 1: Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής σε συσκευές με θέρμανση**



**Διάγραμμα 2: Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής σε συσκευές με ψύξη**



Διάγραμμα 3: Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής σε επιφάνειες παραγωγικών χώρων



Διάγραμμα 4: Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής σε επιφάνειες με επιμόλυνση

Πίνακας 6: Μετρήσεις και score 1ης εφαρμογής TBF300 (μόνο για πάγκους και γωνίες)

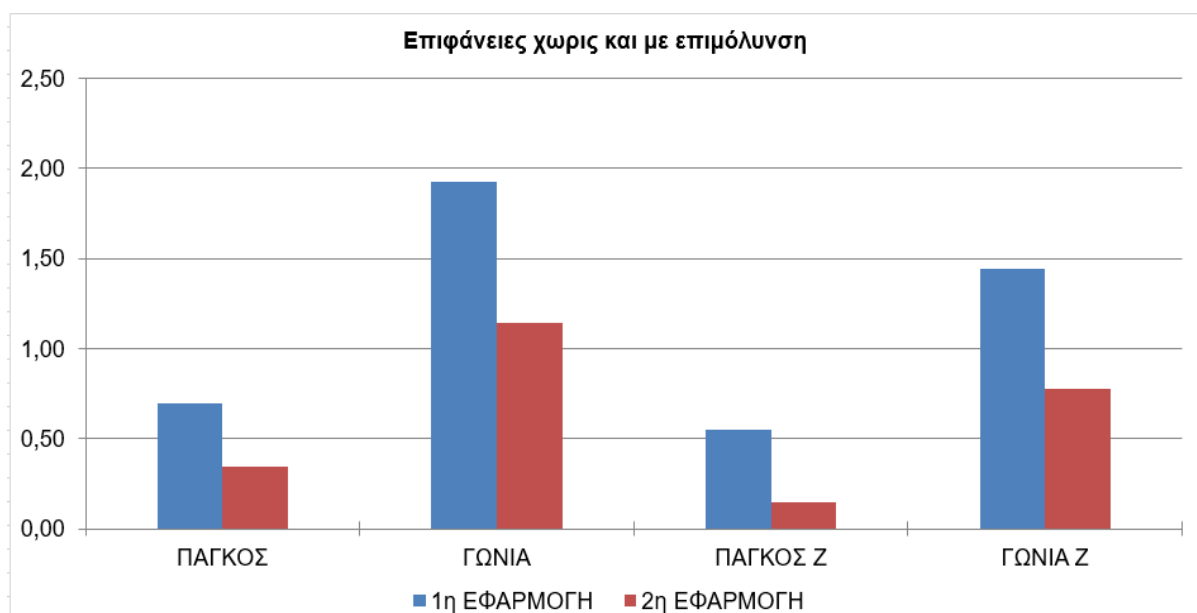
ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	1η ΕΦΑΡΜΟΓΗ				ΣΥΝΟΛΟ 1η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	score
		καθόλου ροζ	απαλό ροζ	λιγότερο έντονο ροζ	έντονο ροζ		
		ΣΥΝΟΛΟ "0"	ΣΥΝΟΛΟ "1"	ΣΥΝΟΛΟ "2"	ΣΥΝΟΛΟ "3"		
ΠΑΓΚΟΣ	ΌΧΙ	13	6	2	2	23	0,70
ΓΩΝΙΑ	ΌΧΙ	2	2	5	5	14	1,93
ΠΑΓΚΟΣ Ζ	ΖΥΜΗ	11	7	2	0	20	0,55
ΓΩΝΙΑ Ζ	ΖΥΜΗ	5	3	7	3	18	1,44

\*Όπου ΠΑΓΚΟΣ Ζ και ΓΩΝΙΑ Ζ, οι πάγκοι και οι γωνίες που έχουν επιμολυνθεί με *Saccharomyces cerevisiae*

Πίνακας 7: Μετρήσεις και score 2<sup>ης</sup> εφαρμογής TBF300 (μόνο για πάγκους και γωνίες)

ΕΠΙΦΑΝΕΙΑ	ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗ	2η ΕΦΑΡΜΟΓΗ				ΣΥΝΟΛΟ 2η ΕΦΑΡΜΟΓΗ	score
		καθόλου ροζ	απαλό ροζ	λιγότερο έντονο ροζ	έντονο ροζ		
		ΣΥΝΟΛΟ "0"	ΣΥΝΟΛΟ "1"	ΣΥΝΟΛΟ "2"	ΣΥΝΟΛΟ "3"		
ΠΑΓΚΟΣ	ΌΧΙ	18	3	1	1	23	0,35
ΓΩΝΙΑ	ΌΧΙ	3	6	5	0	14	1,14
ΠΑΓΚΟΣ Ζ	ΖΥΜΗ	17	3	0	0	20	0,15
ΓΩΝΙΑ Ζ	ΖΥΜΗ	5	12	1	0	18	0,78

\*Όπου ΠΑΓΚΟΣ Ζ και ΓΩΝΙΑ Ζ, οι πάγκοι και οι γωνίες που έχουν επιμολυνθεί με *Saccharomyces cerevisiae*



Διάγραμμα 5: Σκορ 1ης και 2ης εφαρμογής (μόνο για πάγκους και γωνίες)

Πίνακας 8: Αποτελέσματα SPSS για πάγκους και γωνίες χωρίς επιμόλυνση.

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ΠΡΩΤΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ TBF	Between Groups	13.229	1	13.229	12.934	<.001
	Within Groups	35.798	35	1.023		
	Total	49.027	36			
ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ TBF	Between Groups	5.501	1	5.501	9.198	.005
	Within Groups	20.932	35	.598		
	Total	26.432	36			

Πίνακας 9: Αποτελέσματα SPSS για πάγκους και γωνίες με επιμόλυνση ζύμης (*Saccharomyces cerevisiae*).

		ANOVA				
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ΔΕΥΤΕΡΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΒΦ	Between Groups	3.734	1	3.734	17.545	<.001
	Within Groups	7.661	36	.213		
	Total	11.395	37			
ΠΡΩΤΗ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΒΦ	Between Groups	7.579	1	7.579	9.282	.004
	Within Groups	29.394	36	.817		
	Total	36.974	37			

## Συμπεράσματα

- Η ανάπτυξη των βιοφίλμ είναι ένα κρίσιμο πρόβλημα στις βιομηχανίες τροφίμων, λόγω της μεγάλης πολυπλοκότητας των εγκαταστάσεων που επιτρέπουν σε αυτά να μολύνουν ολόκληρη τη γραμμή παραγωγής και να αλλοιώνουν τις παραγωγικές διαδικασίες. Επίσης, μπορούν να αναπτυχθούν σε περιοχές όπου είναι πολύ δύσκολο να καθαριστούν και να απολυμανθούν, όπως είναι γωνίες στις εγκαταστάσεις, λούκια, αυλακώσεις, αλλοιώσεις επικαλύψεων και επιφανειών-γρατζουνιές και παρεμβύσματα μηχανημάτων επεξεργασίας τροφίμων, όπου ίσως απομένουν υπολείμματα.
- Για την πρόληψη και εξάλειψη των βιοφίλμ υπάρχουν μέθοδοι όπως ο κλασικός, συχνός καθαρισμός και απολύμανση, δράση με ένζυμα, βακτηριοφάγους, LAB βακτήρια (και βακτηριοκίνες τους), αναστολής QS και ασηπτικό περιβάλλον. Ο πιο αποτελεσματικός τρόπος για την πρόληψη είναι να επιλέγουμε συνθήκες στις διεργασίες μας που δεν είναι οι βέλτιστες για την ανάπτυξη των βιοφίλμ-μικροοργανισμών (Venø, Lena. ,1999) καθώς και επιλογή υλικών που είναι εύκολα να απολυμανθούν (π.χ. ανοξείδωτος χάλυβας). Όμως θα πρέπει να υπάρχει προσοχή, διότι οι ανεπαρκείς μέθοδοι καθαρισμού μπορεί να δημιουργήσουν βιοφίλμ, καθώς και να ενισχύσουν την αντοχή τους, η οποία μπορεί να αυξηθεί με την παρουσία οργανικής ύλης και με την πάροδο της ηλικίας. Επίσης υπάρχουν κι άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των απολυμαντικών όπως είναι ο τύπος και η συγκέντρωσή του, ο χρόνος έκθεσης, οι στοχευμένοι μικροοργανισμοί, οι τύποι των επιφανειών, το pH, η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία
- Υπάρχουν διάφορες τεχνικές-μέθοδοι που είναι αποτελεσματικές για την εκτίμηση των



βιώσιμων κυττάρων του βιοφίλμ. Μια από τις βασικότερες είναι η εκτίμηση του συνολικού αριθμού των οργανισμών, η οποία είναι η πιο διαδεδομένη χρησιμοποιούμενη τεχνική. Είναι ακριβής, εύκολη στην χρήση και δεν απαιτεί ειδικό εξοπλισμό. Επιπλέον, το κρυσταλλικό ιώδες (CV) είναι μια εξίσου σημαντική. Είναι μια χρώση που δεσμεύει αρνητικά φορτισμένα μόρια και οι ουσίες είναι σε θέση να βάφουν τόσο τα βακτήρια, όσο και το πλέγμα του βιοφίλμ. Είναι μέθοδος υψηλής απόδοσης για την ποσοτικοποίηση της ικανότητας προσκόλλησης και σχηματισμού βιοϋμενίου από μεγάλο αριθμό βακτηριακών ειδών υπό διαφορετικές συνθήκες.

### **Πειραματικό μέρος**

- Στον αποστειρωτήρα, στην γεννήτρια και στον καταψύκτη βρίσκουμε υψηλότερα σκορ, πιθανόν γιατί είναι επιφάνειες που δεν καθαρίζονται τόσο συχνά όσο οι επιφάνειες στο εργαστήριο Μικροβιολογίας Τροφίμων.
- Μεταξύ πάγκων και γωνιών (επιμολυσμένων και μη), βλέπουμε από τους πίνακες 8 και 9 ότι έχουμε στατιστικά σημαντική διαφορά, διότι έχουν σημαντικότητα  $\leq 0,05$ . Επομένως, η υπόθεση ότι στις γωνίες είναι πιο δύσκολο να απομακρυνθεί το βιοφίλμ είναι σωστή, επειδή οι γωνίες έχουν συνολικά μεγαλύτερο ΔΣΒ (δείκτη σχηματισμού βιοφίλμ) και η διαφορά είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο σημαντικότητας  $p \leq 0,05$ . Περιμέναμε αυτό το αποτέλεσμα, καθώς από τη θεωρία ξέρουμε ότι τα βιοφίλμ αναπτύσσονται κυρίως σε γωνίες, αυλακώσεις, σχισμές, ρωγμές και λιγότερο σε λείες επιφάνειες-πάγκους οι οποίοι χρησιμοποιούνται αρκετά και απολυμαίνονται συχνά.

## 6.Βιβλιογραφία

- Abdallah, M.; Khelissa, O.; Ibrahim, A.; Benoliel, C.; Heliot, L.; Dhulster, P.; Chihib, N.E. Impact of growth temperature and surface type on the resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* biofilms to disinfectants. *Int. J. Food Microbiol.* 2015, 214, 38–47.
- Acker, H. V., P. V. Dijck, and T. Coenye. 2014. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in Microbiology* 22 (6):326–33. doi: 10.1016/j.tim.2014.02.001
- Agusti'n Md R, Brugnoli L: Multispecies biofilms between *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* with resident microbiota isolated from apple juice processing equipment. *J Food Saf* 2018, 38:e12499.
- Alonso VPP, Harada AMM, Kabuki DY: Competitive and/or cooperative interactions of *Listeria monocytogenes* with *Bacillus cereus* in dual-species biofilm formation. *Front Microbiol* 2020, 11:177.
- Alonso VPP, Kabuki DY: Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. *Int J Dairy Technol* 2019, 72:472-478.
- Alvarez-Ordóñez Avelino, Laura M. Coughlan, Romain Briandet and Paul D. Cotter 2019'' Biofilms in Food Processing Environments: Challenges and Opportunities'' *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 2019.10:173-195.
- Alvarez-Ordóñez A, Alvseike O, Omer MK, Heir E, Axelsson L, Holck A, Prieto M: Heterogeneity in resistance to food-related stresses and biofilm formation ability among verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Int J Food Microbiol* 2013, 161:220-230.
- Anand, S.; Singh, D.; Avadhanula, M.; Marka, S. Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2014, 13, 18–33.
- Anderson, A., Rog Nner, U. and Granum, P. E. What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? *International Journal of Food Microbiology*, 28, 145-155 (1995)
- Andreani NA, Carraro L, Fasolato L, Balzan S, Lucchini R, Novelli E, et al. Characterisation of the thermostable protease AprX in strains of *Pseudomonas fluorescens* and impact on the shelf-life of dairy products: preliminary results. *Ital J Food Saf.* 2016;5:6175.
- Araújo PA, Machado I, Meireles A, Leiknes T, Mergulhão F, et al. 2017. Combination of selected enzymes with cetyltrimethylammonium bromide in biofilm inactivation, removal and regrowth. *Food Res. Int.* 95:101–7
- Araujo, P. A., F. Mergulhao, L. Melo, and M. Simoes. 2014. The ability of an antimicrobial agent to penetrate a biofilm is not correlated with its killing or removal efficiency. *Biofouling* 30 (6):675–83. doi:10.1080/08927014.2014.904294..
- Azeredo, J.; Azevedo, N.F.; Briandet, R.; Cerca, N.; Coenye, T.; Costa, A.R.; Desvaux, M.; Di Bonaventura, G.; Hébraud, M.; Jaglic, Z.; et al. Critical Review on Biofilm Methods. *Crit. Rev. Microbiol.* 2017, 43, 313–351.
- Back, W. 2003. Biofilme in der Brauerei und Getränkeindustrie. *Brauwelt* 24:1–5
- Bai, Xingjian, Cindy H. Nakatsu, and Arun K. Bhunia. "Bacterial Biofilms and Their Implications in Pathogenesis and Food Safety." *Foods* 10, no. 9 (September 8, 2021): 2117.

<https://doi.org/10.3390/foods10092117>

- Ban, G. H., and D. H. Kang. 2016. Effect of sanitizer combined with steam heating on the inactivation of foodborne pathogens in a biofilm on stainless steel. *Food Microbiology* 55:47–54. doi: 10.1016/j.fm.2015.11.003.
- Bang, H. J., S. Y. Park, S. E. Kim, M. M. F. Rahaman, and S. D. Ha. 2017. Synergistic effects of combined ultrasound and peroxyacetic acid treatments against *Cronobacter sakazakii* biofilms on fresh cucumber. *Lwt - Food Science and Technology* 84:91–8. doi: 10.1016/j.lwt.2017.05.037
- Bang, J., A. Hong, H. Kim, L. R. Beuchat, M. S. Rhee, Y. Kim, and J. H. Ryu. 2014. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on food-contact surfaces by sequential treatments of aqueous chlorine dioxide and drying. *International Journal of Food Microbiology* 191:129–34. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.014
- Berk V, Fong JCN, Dempsey GT, Develioglu ON, Zhuang X, Liphardt J, Yildiz FH, Chu S: Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science* 2012, 337:236-239.
- Beveridge, T.J.; Makin, S.A.; Kadurugamuwa, J.L.; Li, Z. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 1997, 20, 291–303.
- Bodelón, G.; Montes-García, V.; Costas, C.; Pérez-Juste, I.; Pérez-Juste, J.; Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L.M. Imaging bacterial interspecies chemical interactions by surface-enhanced Raman scattering. *ACS Nano* 2017, 11, 4631–4640.
- Bokulich NA, Bamforth CW, Mills DA. 2012. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolshipale. *PLoS One* 7:e35507. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035507>
- Bokulich NA, Bamforth CW. 2013. The microbiology of malting and brewing. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:157–172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00060-12>.
- Bokulich, N. A., J. Bergsveinson, B. Ziola, and D. A. Mills. 2015. Mapping microbial ecosystems and spoilage-gene flow in breweries highlights patterns of contamination and resistance. *Elife* 2015:1–21.
- Bonsaglia ECR, Silva NCC, Fernades Junior A, Araujo Junior JP, Tsunemi MH, Rall VLM: Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control* 2014, 35:386-391.
- Bardy, P., R. Pantuček, M. Benesik, and J. Doskar. 2016. Genetically modified bacteriophages in applied microbiology. *Journal of Applied Microbiology* 121 (3):618–33. doi: 10.1111/jam.13207.
- Brewer's Association Technical Committee. 2019. *Draught Beer Quality Manual*, 4 ed Kirsti Switzer, Boulder, CO, U.S.A.
- Brown HL, Reuter M, Salt LJ, Cross KL, Betts RP, van Vliet AHM. 2014. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(22):7053–60
- Bose, Nikhil, Daniel P Auvil, Erica L Moore, and Sean D Moore. 2021 “Microbial Communities in Retail Draft Beers and the Biofilms They Produce” 9, no. 3 (n.d.).
- Campoccia D, Montanaro L, Arciola CR: A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 2013, 34:8533-8554
- Capita R, Riesco-Pelaez F, Alonso-Hernando A, Alonso-Calleja C: Exposure of *Escherichia coli* ATCC 12806 to sublethal concentrations of food-grade biocides influences its ability to form biofilm, resistance to antimicrobials, and ultrastructure. *Appl Environ Microbiol* 2014, 80:1268-1280.

- Cappitelli, F., A. Polo, and F. Villa. 2014. Biofilm formation in food processing environments is still poorly understood and controlled. *Food Engineering Reviews* 6 (1-2):29–42. doi: 10.1007/s12393-014-9077-8
- Carpentier B, Cerf O: Review - persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *Int J Food Microbiol* 2011, 145:1-8.
- 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.
- Carrascosa, Conrado, Dele Raheem, Fernando Ramos, Ariana Saraiva, and António Raposo. “Microbial Biofilms in the Food Industry—A Comprehensive Review.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18, no. 4 (February 19, 2021): 2014. <https://doi.org/10.3390/ijerph18042014>.
- Chaturongkasumrit Y, Takahashi H, Keeratipibul S, Kuda T, Kimura B: The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. *Food Control* 2011, 22:1893-1899.
- Chen P, Wang JJ, Hong B, Tan L, Yan J, Zhang Z, Liu H, Pan Y, Zhao Y: Characterization of mixed-species biofilm formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. *Front Microbiol* 2019, 10:2543.
- Chmielewski, R.A.N.; Frank, J.F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2003**, 2, 22–32.
- Colagiorgi, A.; Bruini, I.; Di Ciccio, P.A.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Ianieri, A. *Listeria Monocytogenes* Biofilms in the Wonderland of Food Industry. *Pathogens* 2017, 6, 41.
- Corcoran M, Morris D, De Lappe N, O’Connor J, Lalor P, Dockery P, Cormican M: Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Appl Environ Microbiol* 2014, 80:1507-1514.
- Costerton, J. W., Cheng, K-J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. and Marrie, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews of Microbiology*, **41**, 435-464 (1987)
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott, H. M. Microbial biofilms. *Annual Reviews of Microbiology*, **49**, 711-745 (1995)
- Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 1999, 284, 1318–1322.
- Cui, H., C. Ma, and L. Lin. 2016. Synergetic antibacterial efficacy of cold nitrogen plasma and clove oil against *Escherichia coli* O157:H7 biofilms on lettuce. *Food Control* 66:8–16. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.01.035.
- Davison, W. M., B. Pitts, and P. S. Stewart. 2010. Spatial and temporal patterns of biocide action against *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (7):2920–7. doi: 10.1128/AAC.01734-09.
- Declerck, P.; Verelst, L.; Duvivier, L.; Van Damme, A.; Ollevier, F. A detection method for *Legionella* spp. in (cooling) water: Fluorescent in situ hybridisation (FISH) on whole bacteria. *Water Sci. Technol.* 2003, 47, 143–146.
- De Filippis F, Parente E, Ercolini D: Recent past, present, and future of the food microbiome. *Annu Rev Food Sci Technol* 2018,9:589-608.

- de Grandi AZ, Pinto UM, Destro MT: Dual-species biofilm of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* on stainless steel surface. *World J Microbiol Biotechnol* 2018, 34:61.
- Dewanti, R., & Wong, A. C. L. (1995). Influence of culture conditions on biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology*, 26(2), 147-164
- Dhowlaghar N, De Abrew Abeysundara P, Nannapaneni R, Schilling MW, Chang S, et al. 2018. Biofilm formation by *Salmonella* spp. in catfish mucus extract under industrial conditions. *Food Microbiol.* 70:172– 80
- Dhowlaghar, N.; Bansal, M.; Schilling, M.W.; Nannapaneni, R. Scanning electron microscopy of *Salmonella* biofilms on various food-contact surfaces in catfish mucus. *Food Microbiol.* 2018, 74, 143–150. doi: 10.1016/j.fm.2018.03.013.
- Di Bonaventura, G.; Piccolomini, R.; Paludi, D.; D’Orio, V.; Vergara, A.; Conter, M.; Ianieri, A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: Relationship with motility and cell surface hydrophobicity. *J. Appl. Microbiol.* 2008, 104, 1552–1561.
- Dige, I.; Nyengaard, J.R.; Kilian, M.; Nyvad, B. Application of stereological principles for quantification of bacteria in intact dental biofilms. *Oral Microbiol. Immunol.* 2009, 24, 69–75.
- Doll, K.; Jongstaphongpun, K.L.; Stumpp, N.S.; Winkel, A.; Stiesch, M. Quantifying Implant-Associated Biofilms: Comparison of Microscopic, Microbiologic and Biochemical Methods. *J. Microbiol. Methods* 2016, 130, 61–68.
- Donelli, G. *Biofilm-Based Healthcare-Associated Infections: Volume II*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2014; Volume 831, p. 3319097822.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Disease*, 8(9), 881-890
- Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, Geornaras I, Belk KE, Smith GC, Nychas G.-J.E., Sofos JN: Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int J Food Microbiol* 2011, 149:262-268.
- Duanis-Assaf, D., D. Steinberg, Y. Chai, and M. Shemesh. 2016. The LuxS based quorum sensing governs lactose induced biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Microbiology* 6:1517. doi: 10.3389/fmicb.2015.01517
- Dutra, T. V., M. D. S. Fernandes, M. R. F. G. Perdoncini, M. M. dos Anjos, and B. A. D. A. Filho. 2018. Capacity of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* to produce biofilm on stainless steel surfaces in the presence of food residues. *Journal of Food Processing and Preservation* 42 (4):e13574. doi: 10.1111/jfpp.13574.
- Dygico LK, O’Connor PM, Hayes M, Gahan CGM, Grogan H, Burgess CM: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* as a natural antilisterial agent in the mushroom industry. *Food Microbiol* 2019,82:30-35.
- European Hygienic Engineering and Design Group (EHEDG). *Hygienic Design Principles*, 3rd ed.; EHEDG Guidelines; European Hygienic Engineering & Design Group: Naarden, The Netherlands, 2018.
- Extremina, C.I.; Costa, L.; Aguiar, A.I.; Peixe, L.; Fonseca, A.P. Optimization of processing conditions for the quantification of enterococci biofilms using microtitreplates. *J. Microbiol. Methods.* 2010.
- Fagerlund, Annette, Solveig Langsrud, and Trond Møretør. “Microbial Diversity and Ecology of Biofilms in Food Industry Environments Associated with *Listeria Monocytogenes* Persistence.” *Current Opinion in Food Science* 37 (February 2021): 171–78. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.015>.

- Feyereisen M, Mahony J, O'Sullivan T, Boer V, van Sinderen D. 2020. A Plasmid-Encoded Putative Glycosyltransferase Is Involved in Hop Tolerance and Beer Spoilage in *Lactobacillus brevis*. *Appl Environ Microbiol*
- Fink, R., M. Oder, E. Strazar, and S. Filip. 2017. Efficacy of cleaning methods for the removal of *Bacillus cereus* biofilm from polyurethane conveyor belts in bakeries. *Food Control* 80:267–72. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.05.009
- Flemming, H.C. Biofilms and environmental protection. *Water Sci. Technol.* 1993, 27, 1–10.
- Flemming, H.-C.; Neu, T.R.; Wozniak, D.J. The EPS matrix: The “house of biofilm cells”. *J. Bacteriol.* **2007**, *189*, 7945–7947.
- Flemming, H.-C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (9):623–633. doi:10.1038/nrmicro2415.
- Flemming, H. C., J. Wingender, U. Szewzyk, P. Steinberg, S. A. Rice, and S. Kjelleberg. 2016. Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews. Microbiology* 14 (9):563–75. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94
- Fletcher, M. The physiological activity of bacteria attachment to solid surfaces. *Advances in Microbial Physiology*, 32, 53–85 (1991)
- Fortin, N.D. Regulatory Requirements in the United States on Hygiene Control in the Design, Construction, and Renovation of Food Processing Factories. Chapter 4 in *Hygiene Control in the Design, Construction and Renovation of Food Processing Factories*; Lelieveld, H.L.M., Holah, J., Eds.; Woodhead Publishing Ltd., 2011. Available online: <https://ssrn.com/abstract=2497425> (accessed on 25 November 2020)
- Frank, J. F. And Koffi, R. A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. *Journal of Food Protection*, **53**, 550-554 (1990)
- Friis, A. Hygiejnisk konstruktion af levnedsmiddelmaskiner. *Mikrobiologi nyt*, 1, 13-16 (1998)
- Furukawa, S.; Akiyoshi, Y.; Komoriya, M.; Ogihara, H.; Morinaga, Y. Removing *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms on stainless steel by cleaning-in-place (CIP) cleaning agents. *Food Control* 2010, 21, 669–672.
- Genigeorgis, C. Biofilm: Their significance to cleaning in the meat sector. In: BURT, S. A. AND BAUER, F. (Eds), *New Challenges in Meat Hygiene: Specific problems in cleaning and disinfection, Ecceamst, European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and technology*, pp. 29-47 (1995)
- Giaouris, Efstathios, Manuel Simoes, and Florence Dubois-Brissonnet. “The Role of Biofilms in the Development and Dissemination of Microbial Resistance within the Food Industry.” *Foods* 9, no. 6 (June 21, 2020): 816. <https://doi.org/10.3390/foods9060816>
- Gironés, R.R.G.; Simmons, M.M. Evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products. *EFSA J.* 2016, 14, 4565.
- Gomes, L.C.; Silva, L.N.; Simoes, M.; Melo, L.F.; Mergulhao, F.J. *Escherichia coli* adhesion, biofilm development and antibiotic susceptibility on biomedical materials. *J. Biomed. Mater. Res.* 2015, 103, 1414–1423. doi: 10.1002/jbm.a.35277
- Gomes, L. C., J. Deschamps, R. Briandet, and F. J. Mergulhao. 2018. Impact of modified diamond-like carbon coatings on the spatial organization and disinfection of mixed-biofilms composed of *Escherichia coli* and

- Pantoea agglomerans industrial isolates. *International Journal of Food Microbiology* 277:74–82. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.017.
- Gonzalez JE, Keshavan ND: Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* 2006, 70:859-875.
- González-Rivas, F.; Ripolles-Avila, C.; Fontecha-Umaña, F.; Ríos-Castillo, A.G.; Rodríguez-Jerez, J.J. Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2018, 17, 1261–1276.
- Govaert, M.; Smet, C.; Baka, M.; Janssens, T.; Van Impe, J. Influence of incubation conditions on the formation of model biofilms by *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* on abiotic surfaces. *J. Appl. Microbiol.* 2018, 125, 1890–1900.
- Govaert M, Smet C, Walsh JL, Van Impe JFM: Dual-species model biofilm consisting of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium*: development and inactivation with cold atmospheric plasma (CAP). *Front Microbiol* 2019, 10:2524.
- Gravesen, A., Lekkas, C., & Knøchel, S. (2005). Surface attachment of *Listeria monocytogenes* is induced by sublethal concentrations of alcohol at low temperatures. *Applied Environmental Microbiology*, 71(9), 5601e5603.
- Greer, G.G. Bacteriophage control of foodborne bacteria. *J. Food Prot.* 2011, 68, 1102–1111.
- Grigore-Gurgu, L.; Bucur, F.I.; Borda, D.; Alexa, E.A.; Neagu, C.; Nicolau, A.I. Biofilms Formed by Pathogens in Food and Food Processing Environments. In *Bacterial Biofilms*; IntechOpen: London, UK, 2019.
- Habimana, O., E. Heir, S. Langsrud, A. W. Åsli, and T. Møretro. 2010. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meatprocessing environments. *Applied and Environmental Microbiology* 76 (13):4557–9. doi: 10.1128/AEM.02707-09
- Hall-Stoodley, L.J.; Costerton, W.; Stoodley, P. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, 2, 95–108.
- Herschend, J., Z. B. V. Damholt, A. M. Marquard, B. Svensson, S. J. Sørensen, P. HaGglund, and, and M. Burmølle. 2017. A meta-proteomics approach to study the interspecies interactions affecting microbial biofilm development in a model community. *Scientific Reports* 7:16483. doi: 10.1038/s41598-017-16633-6.
- Hingston PA, Stea EC, Knochel S, Hansen T: Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces. *Food Microbiol* 2013, 36:46-56.
- Hodgkin M, Purseglove SM, Chan LL, Perry J, Bolton J. 2020. A novel image cytometry-based *Lactobacillus* bacterial enumeration method for the production of kettle sour beer. *J Microbiol Methods* 177:106031. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.106031>.
- Houry, A.; Briandet, R.; Aymerich, S.; Gohar, M. Involvement of Motility and Flagella in *Bacillus Cereus* Biofilm Formation. *Microbiology* 2010, 156, 1009–1018.
- Hossain MI, Mizan MFR, Ashrafudoulla M, Nahar S, Joo H-J, Jahid IK, Park SH, Kim K-S, Ha S-D: Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainlesssteel surfaces, and MBECTM biofilm device. *LWT Food Sci Technol* 2020, 118:108864.
- Hsu LC, Fang J, Borca-Tasciuc DA, Worobo RW, Moraru CI. 2013. Effect of micro- and nanoscale topography on the adhesion of bacterial cells to solid surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(8):2703–12

- Hu, H.; Johani, K.; Gosbell, I.B.; Jacombs, A.S.W.; Almatroudi, A.; Whiteley, G.S.; Deva, A.K.; Jensen, S.; Vickery, K. Intensive care unit environmental surfaces are contaminated by multidrug-resistant bacteria in biofilms: Combined results of conventional culture, pyrosequencing, scanning electron microscopy, and confocal laser microscopy. *J. Hosp. Infect.* 2015, 91, 35–44.
- Hussain, M. S., M. Kwon, E. J. Park, K. Seheli, R. Huque, and D. H. Oh. 2019. Disinfection of *Bacillus cereus* biofilms on leafy green vegetables with slightly acidic electrolyzed water, ultrasound and mild heat. *LWT - Food Science and Technology* 116:108582. doi: 10.1016/j.lwt.2019.108582.
- Iniguez-Moreno, M., M. Gutierrez-Lomeli, P. J. Guerrero-Medina, and M. G. Avila-Novoa. 2018. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. *Brazilian Journal of Microbiology* 49 (2):310–9. doi: 10.1016/j.bjm.2017.08.002
- Iniguez-Moreno M, Gutierrez-Lomeli' M, Avila-Novoa MG: Kinetics of biofilm formation by pathogenic and spoilage microorganisms under conditions that mimic the poultry, meat, and egg processing industries. *Int J Food Microbiol* 2019,303:32-41.
- Jagadeesan, B.; Koo, O.K.; Kim, K.P.; Burkholder, K.M.; Mishra, K.K.; Aroonanal, A.; Bhunia, A.K. LAP, an alcohol acetaldehyde dehydrogenase enzyme in *Listeria* promotes bacterial adhesion to enterocyte-like Caco-2 cells only in pathogenic species. *Microbiology* 2010, 156, 2782–2795.
- Jaglic Z, Cervinkova D, Vlkova H, Michu E, Kunova G, Babak V: Bacterial biofilms resist oxidising agents due to the presence of organic matter. *Czech J Food Sci* 2012, 30:178-187
- Jahid IK, Lee N-Y, Kim A, Ha S-D. 2013. Influence of glucose concentrations on biofilm formation, motility, exoprotease production, and quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Prot.* 76(2):239–47
- Jahid, I. K., N. R. Han, S. Srey, and S. D. Ha. 2014. Competitive interactions inside mixed-culture biofilms of *Salmonella Typhimurium* and cultivable indigenous microorganisms on lettuce enhance microbial resistance of their sessile cells to ultraviolet C (UV-C) irradiation. *Food Research International* 55:445–54. doi: 10.1016/j.foodres.2013.11.042
- Janagama HK, Mai T, Han S, Nadala L, Nadala C, Samadpour M. 2018. Dipstick assay for rapid detection of beer spoilage organisms. *J AOAC Int* 101:1913–1919. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0479>.
- Jara J, Perez-Ramos A, del Solar G, Rodriguez JM, Fernandez L, Orgaz B: Role of *Lactobacillus* biofilms in *Listeria monocytogenes* adhesion to glass surfaces. *Int J Food Microbiol* 2020, 334:108804.
- Jass, J., Costerton, J. W. and Lappin-Scott, H. M. Assessment of a chemostat-coupled modified Robbins device to study biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 238-289 (1995)
- Jensen, A., Larsen, M. H., Ingmer, H., Vogel, B. F., & Gram, L. (2007). Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of *Listeria monocytogenes* strains. *Journal of Food Protection*, 70(3), 592-599.
- Jespersen, L., and M. Jakobsen. 1996. Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *Int. J. Food Microbiol.* 33:139–155
- Jindal, S.; Anand, S.; Metzger, L.; Amamcharla, J. A comparison of biofilm development on stainless steel and modified-surface plate heat exchangers during a 17-h milk pasteurization run. *J. Dairy Sci.* 2018, 101,(4):2921–2926. doi: 10.3168/jds.2017-14028.
- Johansen, C., Falholt, P. and Gram, L. Enzymatic Removal and Disinfection of Bacterial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 9, 3724-3728 (1997)



- Jung, S. J., S. Y. Park, and S. D. Ha. 2018. Synergistic effect of X-ray irradiation and sodium hypochlorite against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilms on quail eggshells. *Food Research International* (Ottawa, Ont.) 107:496–502. doi: 10.1016/j.foodres.2018.02.063.
- Kadam SR, den Besten HMW, van der Veen S, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T: Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int J Food Microbiol* 2013,165:259-264.
- Kim, K. Y., & Frank, J. F. (1995). Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *Journal of Food Protection*, 58(1), 24-28.
- Kim, M. J., E. S. Lim, and J. S. Kim. 2019. Enzymatic inactivation of pathogenic and nonpathogenic bacteria in biofilms in combination with chlorine. *Journal of Food Protection* 82 (4):605–14. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-244
- Kives, J., D. Guadarrama, B. Orgaz, A. Rivera-Sen, J. Vazquez, and C. SanJose. 2005. Interactions in biofilms of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *Pseudomonas fluorescens* cultured in cold UHT milk. *Journal of Dairy Science* 88 (12):4165–71. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)73102-7.
- Klausen, M.; Heydorn, A.; Ragas, P.; Lambertsen, L.; Aaes-Jørgensen, A.; Molin, S.; Tolker-Nielsen, T. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol. Microbiol.* 2003, 48, 1511–1524.
- Krysinski, E. P., Brown, L. J. and Marchisello, T. J. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *Journal of Food Protection*, **55**, 246-251 (1992)
- Kuda, T., A. Nakano, H. Takahashi, and B. Kimura. 2016. Effect of the quantities of food residues on the desiccation resistance of spoilage lactic acid bacteria adhered to a stainless steel surface. *Food Control* 68:40–4. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.03.026.
- Kumar, C. G., and S. Anand. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 42(1-2):9–27.
- Langsrud, S.; Moen, B.; Møretro, T.; Løype, M.; Heir, E. Microbial dynamics in mixed culture biofilms of bacteria surviving sanitation of conveyor belts in salmon-processing plants. *J. Appl. Microbiol.* **2016**, 120, 366–378.
- Lappin-Scott, H. M., Jass, J. and Costerton, J. W. Microbial biofilms, Formation and characterization. In: DENYER, S. P., GORMAN, S. P. AND SUSSMAN, M. (Eds), *Microbial biofilms: Formation and Control*, Oxford: Blackwell scientific Publications pp. 1-12 (1993)
- Lechevallier, M. W., Cawthon, C. D. and Lee, R. G. Factors Promoting Survival of Bacteria in Chlorinated Water Supplies. *Applied and Environment Microbiology.* 54(3), 649}654 (1998)
- Lemos, M., I. Gomes, F. Mergulhao, L. Melo, and M. Simoes. 2015. The effects of surface type on the removal of *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single and dual species biofilms. *Food and Bioproducts Processing* 93:234–41. doi: 10.1016/j.fbp.2014.08.009.
- Lequette, Y., G. Boels, M. Clarisse, and C. Faille. 2010. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling* 26 (4):421–31. doi: 10.1080/08927011003699535.
- Lewis, K. 2010. Persister cells. *Annual Review of Microbiology* 64:357–72. doi: 10.1146/annurev.micro.112408.134306
- Li J, Feng J, Ma L, de la Fuente Núñez C, Gözl G, Lu X. 2017b. Effects of meat juice on biofilm formation of *Campylobacter* and *Salmonella*. *Int. J. Food Microbiol.* 253:20–28
- Lianou A, Koutsoumanis KP: Strain variability of the biofilmforming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 2012, 160:171-178.

- Lindsay, D.; von Holy, A. What food safety professionals should know about bacterial biofilms. *Br. Food J.* 2006, 108, 27–37. doi: 10.1108/00070700610637616.
- Lim, E.S.; Koo, O.K.; Kim, M.J.; Kim, J.S. Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite. *Sci. Rep.* 2019, 9, 9920.
- Liu NT, Nou X, Lefcourt AM, Shelton DR, Lo YM: Dual-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 and environmental bacteria isolated from fresh-cut processing facilities. *Int J Food Microbiol* 2014, 171:15-20.
- Liu J, Li L, Li B, Peters BM, Deng Y, Xu Z, Shirliff ME. 2017. First study on the formation and resuscitation of viable but nonculturable state and beer spoilage capability of *Lactobacillus lindneri*. *Microb Pathog* 107: 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.043>.
- Liu, W., J. Russel, M. Burmølle, S. J. Sørensen, and J. S. Madsen. 2018. Micro-scale intermixing: A requisite for stable and synergistic coestablishment in a four-species biofilm. *The ISME Journal* 12 (8):1940–51. doi: 10.1038/s41396-018-0112-2..
- Machado, A., K. K. Jefferson, and N. Cerca. 2013. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and bacterial vaginosis (BV)-associated bacterial species in initial attachment and biofilm formation. *International Journal of Molecular Sciences* 14 (6):12004–12. doi: 10.3390/ijms140612004.
- Machado, I., S. P. Lopes, A. M. Sousa, and M. O. Pereira. 2012. Adaptive response of single and binary *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms to benzalkonium chloride. *Journal of Basic Microbiology* 52 (1):43–52. doi: 10.1002/jobm.201100137.
- Machado SG, Baglinière F, Marchand S, van Coillie E, Vanetti MCD, de Block J, et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Front Microbiol.* 2017;8:302.
- Maes, S., M. Heyndrickx, T. Vackier, H. Steenackers, A. Verplaetse, and K. D. Reu. 2019. Identification and spoilage potential of the remaining dominant microbiota on food contact surfaces after cleaning and disinfection in different food industries. *Journal of Food Protection* 82 (2):262–75. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-226.
- Maifreni M, Frigo F, Bartolomeoli I, Buiatti S, Picon S, Marino M. 2015. Bacterial biofilm as a possible source of contamination in the microbrewery environment. *Food Control* 50:809–814. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.10.032>.
- 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.
- Makovcova, J.; Babak, V.; Kulich, P.; Masek, J.; Slany, M.; Cincarova, L. Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and gramnegative bacteria. *Microb. Biotechnol.* 2017, 10, 819–832.
- Malic, S.; Hill, K.E.; Hayes, A.; Percival, S.L.; Thomas, D.W.; Williams, D.W. Detection and identification of specific bacteria in wound biofilms using peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization (PNA FISH). *Microbiology* 2009, 155, 2603–2611.
- Maric, S.; Vraneš, J. Characteristics and Significance of Microbial Biofilm Formation. *Period. Biol.* 2007, 109, 115–121.
- Mattila-sandholm, t. and Wirtanen, G. Biofilm formation in the industry: A Review. *Food Reviews International*, 8(4), 573-603 (1992)

- Mazaheri, T.; Cervantes-Huamán, B.R.H.; Bermúdez-Capdevila, M.; Ripolles-Avila, C.; Rodríguez-Jerez, J.J. *Listeria monocytogenes* biofilms in the food industry: Is the current hygiene program sufficient to combat the persistence of the pathogen? *Microorganisms* 2021, 9, 181.
- Meireles, A., A. Borges, E. Giaouris, and M. Simoes. 2016. The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry. *Food Research International* 86:140–6. doi: 10.1016/j.foodres.2016.06.006.
- Mcguire, J., & Swartzel, K. R. (1989). The influence of solid-surface energetics on macromolecular adsorption from milk. *Journal of Food Processing and Preservation*, 13(2), 145-160
- Mo SS, Sunde M, Ilag HK, Langsrud S, Heir E. 2017. Transfer potential of plasmids conferring extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 83(12):e00654-17
- Mohammed, S.A.; Vianna, M.E.; Penny, M.R.; Hilton, S.T.; Mordan, N.; Knowles, J.C. Confocal laser scanning, scanning electron, and transmission electron microscopy investigation of *Enterococcus faecalis* biofilm degradation using passive and active sodium hypochlorite irrigation within a simulated root canal model. *Microbiologyopen* 2017, 6, e00455.
- Møretro, T., E. Heir, L. L. Nesse, L. K. Vestby, and S. Langsrud. 2012. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International* 45 (2):532–44. doi: 10.1016/j.foodres.2011.02.002.
- Møretro T, Langsrud S: Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2017, 16:1022-1041.
- Muatapha, A. and Liewen, M. B. Destruction of *Listeria monocytogenes* by sodium hypochlorite and quaternary ammonium sanitizers. *Journal of Food Protection*, 52, 306-311(1989)
- Nadell, C.D.; Drescher, K.; Foster, K.R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat. Rev. Microbiol* 2016, 14, 589–600.
- Nguyen UT, Burrows LL. 2014. DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *Int. J. Food Microbiol.* 187:26–32
- Nguyen HDN, Yang YS, Yuk HG: Biofilm formation of *Salmonella typhimurium* on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT – Food Sci Technol* 2014, 55:383-388.
- Nahar, S., M. F. R. Mizan, A. J. Ha, and S. D. Ha. 2018. Advances and future prospects of enzyme-based biofilm prevention approaches in the food industry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 17 (6):1484–502. doi: 10.1111/1541-4337.12382.
- Nakamura, Y., N. Yamamoto, Y. Kino, N. Yamamoto, S. Kamei, H. Mori, K. Kurokawa, and N. Nakashima. 2016. Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (16):7263–79. doi: 10.1007/s00253-016-7532-6.
- Nesse LL, Sekse C, Berg K, Johannesen KCS, Solheim H, et al. 2014. Potentially pathogenic *Escherichia coli* can form a biofilm under conditions relevant to the food production chain. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(7):2042–49
- Nielsen, A. T., T. Tolker-Nielsen, K. B. Barken, and S. Molin. 2000. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. *Environmental Microbiology* 2 (1):59–68. doi: 10.1046/j.1462-2920.2000.00084.x..

- Nilsson RE, Ross T, Bowman JP: Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *Int J Food Microbiol* 2011, 150:14-24.
- Nivens, D. E., Palmer, R. Jr. and White, D. C. Continuous nondestructive monitoring of microbial biofilms: A review of analytical techniques. *Journal of Industrial Microbiology*, 15, 263-276 (1995)
- Ochiai Y, Yamada F, Mochizuki M, Takano T, Hondo R, Ueda F. 2014. Biofilm formation under different temperature conditions by a single genotype of persistent *Listeria monocytogenes* Strains. *J. Food Prot.* 77(1):133–40
- Ommen, P.; Zobek, N.; Meyer, R.L. Quantification of Biofilm Biomass by Staining: Non-Toxic Safranin Can Replace the Popular Crystal Violet. *J. Microbiol. Methods* 2017, 141, 87–89.
- Ostrov, I.; Paz, T.; Shemesh, M. Robust biofilm-forming *Bacillus* isolates from the dairy environment demonstrate an enhanced resistance to cleaning-in-place procedures. *Foods* 2019, 8, 134.
- Otto M: Staphylococcal biofilms. *Bacterial Biofilms* 2008, 322:207-228.
- Oxaran V, Dittmann KK, Lee SHI, Chaul LT, Fernandes de Oliveira CA, Corassin CH, Alves VF, De Martinis ECP, Gram L: Behavior of foodborne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* in mixed-species biofilms exposed to biocides. *Appl Environ Microbiol* 2018, 84 e02038-02018.
- Pang, X., C. Wong, H. J. Chung, and H. G. Yuk. 2019. Biofilm formation of *Listeria monocytogenes* and its resistance to quaternary ammonium compounds in a simulated salmon processing environment. *Food Control* 98:200–8. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.11.029.
- Pantanella, F.; Valenti, P.; Natalizi, T.; Passeri, D.; Berlutti, F. Analytical Techniques to Study Microbial Biofilm on Abiotic Surfaces: Pros and Cons of the Main Techniques Currently in Use. *Ann. Ig. Med. Prev. E Comunità* 2013, 25, 31–42.
- Papaioannou, E., E. D. Giaouris, P. Berillis, and I. S. Boziaris. 2018. Dynamics of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges. *International Journal of Food Microbiology* 267:9–19. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.020.
- Paradh AD, Hill AE, Mitchell WJ. 2014. Detection of beer spoilage bacteria *Pectinatus* and *Megasphaera* with acridinium ester labelled DNA probes using a hybridisation protection assay. *J Microbiol Methods* 96:25–34. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.10.014>
- Parijs, I., and H. P. Steenackers. 2018. Competitive inter-species interactions underlie the increased antimicrobial tolerance in multispecies brewery biofilms. *ISME J.* 12:2061–2075.
- Patel J, Singh M, Macarasin D, Sharma M, Shelton D. 2013. Differences in biofilm formation of produce and poultry *Salmonella enterica* isolates and their persistence on spinach plants. *Food Microbiol.* 36(2):388–94
- Peña, W.E.L.; Andrade, N.J.; Soares, N.F.F.; Alvarenga, V.O.; Rodrigues Junior, S.; Granato, D.; Zuniga, A.D.G.; de Souza Sant’Ana, A. Modeling *Bacillus cereus* adhesion on stainless steel surface as affected by temperature, pH and time. *Int. Dairy J.* 2014, 34, 153–158.
- Pignata, C., D. D’Angelo, E. Fea, and G. Gilli. 2017. A review on microbiological decontamination of fresh produce with nonthermal plasma. *Journal of Applied Microbiology* 122 (6):1438–55. doi: 10.1111/jam.13412.
- Pinto, M.; Langer, T.M.; Hüffer, T.; Hofmann, T.; Herndl, G.J. The composition of bacterial communities associated with plastic biofilms differs between different polymers and stages of biofilm succession. *PLoS ONE* 2019, 14, e0217165.
- Plieth, W. *Electrochemistry for Materials Science*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2008; Chapter 12.

- Priha, O., M. Raulio, J. Maukonen, A. K. Vehviläinen, and E. Storgårds. 2016. Bacterial populations on brewery filling hall surfaces as revealed by next-generation sequencing. *Biofouling* 32:571–581.
- Puga CH, Dahdouh E, SanJose C, Orgaz B: *Listeria monocytogenes* colonizes *Pseudomonas fluorescens* biofilms and induces matrix over-production. *Front Microbiol* 2018,9:1706
- Rather, Muzamil A., Kuldeep Gupta, Pritam Bardhan, Munmi Borah, Anupama Sarkar, Khalifa S. H. Eldiehy, Shuvam Bhuyan, and Manabendra Mandal. “Microbial Biofilm: A Matter of Grave Concern for Human Health and Food Industry.” *Journal of Basic Microbiology* 61, no. 5 (May 2021): 380–95.
- Ray, B.; Bhunia, A. Microbial attachments and biofilm formation. In *Fundamental Food Microbiology*, 5th ed.; Ray, B., Bhunia, A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2014.
- . Reis-Teixeira, F.B.D.; Alves, V.F.; Martinis, E.C.P.D. Growth, viability and architecture of biofilms of *Listeria monocytogenes* formed on abiotic surfaces. *Brazilian J. Microbiol.* 2017, 48, 587–591.
- Rickard, A. H., R. J. Palmer, Jr., D. S. Blehert, S. R. Campagna, M. F. Semmelhack, P. G. Eglund, B. L. Bassler, and P. E. Kolenbrander. 2006. Autoinducer 2: A concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Molecular Microbiology* 60 (6): 1446–56. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05202.x.
- Sauer, K., Rickard, A. H., & Davies, D. G. (2007). Biofilms and biocomplexity. *American Society for Microbiology*, 2, 347-353
- Riedl, R., N. Dünzer, M. Michel, F. Jacob, and M. Hutzler. 2019. Beer enemy number one: genetic diversity, physiology and biofilm formation of *Lactobacillus brevis*. *J. Inst. Brew.* 125:250–260.
- Rieu A, Briandet R, Habirmana O, Garmyn D, Guzzo J, Piveteau P: *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl Environ Microbiol* 2008, 74:4491-4497.
- Rodríguez-Lopez, P., A. Carballo-Justo, L. A. Draper, and M. L. Cabo. 2017. Removal of *Listeria monocytogenes* dual-species biofilms using combined enzyme-benzalkonium chloride treatments. *Biofouling* 33 (1):45–58. doi: 10.1080/08927014.2016.1261847.
- Rodríguez-Saavedra M, González de Llano D, Moreno-Arribas MV. 2020. Beer spoilage lactic acid bacteria from craft brewery microbiota: microbiological quality and food safety. *Food Res Int* 138:109762. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109762>.
- Rosado-Castro, M.; da Silva Fernandes, M.; Kabuki, D.Y.; Kuaye, A.Y. Biofilm Formation of *Enterococcus Faecium* on Stainless Steel Surfaces: Modeling and Control by Disinfection Agents. *J. Food Process Eng.* 2018, 41, 1–9.
- Rosenberg, M.; Kjelleberg, S. Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. *Adv. Microb. Ecol.* 1986, 9, 353–393.
- Rossi C, Serio A, Chaves-López C, Anniballi F, Auricchio B, Goffredo E, et al. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. *Food Control.* 2018;86:
- Sadiq FA, Flint S, Yuan L, Li Y, Liu T, He G. 2017. Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *Int. J. Food Microbiol.* 262:89–98
- Scatamburlo TM, Yamazi AK, Cavicchioli VQ, Pieri FA, Nero LA. Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *J Dairy Sci.* 2015;98:759–64.
- Schlisselberg DB, Yaron S: The effects of stainless steel finish on *Salmonella typhimurium* attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. *Food Microbiol* 2013, 35:65-72.
- Schneiderbanger, J., M. Grammer, F. Jacob, and M. Hutzler. 2018. Statistical evaluation of beer spoilage bacteria by real-time PCR analyses from 2010 to 2016. *J. Inst. Brew.* 124:173–181.

- Schonewille E, Nesse LL, Hauck R, Windhorst D, Hafez HM, Vestby LK: Biofilm building capacity of *Salmonella enterica* strains from the poultry farm environment. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, 65:360-365
- Seghal Kiran G, Nishanth Lipton A, Kennedy J, Dobson AD, Selvin J. 2014. A halotolerant thermostable lipase from the marine bacterium *Oceanobacillus* sp. PUMB02 with an ability to disrupt bacterial biofilms. *Bioengineered* 5(5):305–18
- Shao X, Fang K, Medina D, Wan J, Lee J-L, Hong SH: The probiotic, *Leuconostoc mesenteroides*, inhibits *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *J Food Saf* 2020, 40:e12750.
- Shi, Xianming, and Xinna Zhu. "Biofilm Formation and Food Safety in Food Industries." *Trends in Food Science & Technology* 20, no. 9 (September 2009): 407–13. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>.
- Shikano, A., T. Kuda, H. Takahashi, and B. Kimura. 2017. Effect of quantity of food residues on resistance to desiccation, disinfectants, and UV-C irradiation of spoilage yeasts adhered to a stainless steel surface. *LWT - Food Science and Technology* 80:169–77. doi: 10.1016/j.lwt.2017.02.020
- Shirron, N.; Kisluk, G.; Zelikovich, Y.; Eivin, I.; Shimoni, E.; Yaron, S. A comparative study assaying commonly used sanitizers for antimicrobial activity against indicator bacteria and a *Salmonella Typhimurium* strain on fresh produce. *J. Food Prot.* 2009, 72, 2413–2417.
- Simoes, M.; Simoes, L.; Vieira, M. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT Food Sci. Technol.* 2010, 43, 573–583.
- Somerton, B., D. Lindsay, J. Palmer, J. Brooks, and S. Flint. 2015. Changes in sodium, calcium, and magnesium ion concentrations that inhibit *Geobacillus* biofilms have no effect on *Anoxybacillus flavithermus* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (15): 5115–22. doi: 10.1128/AEM.01037-15
- Soni, K.A.; Nannapaneni, R. Bacteriophage significantly reduces *L. monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J. Food Prot.* 2010, 73, 32–38.
- Speers, J. G., & Gilmour, A. (1985). The influence of milk and milk components on the attachment of bacteria to farm dairy equipment surfaces. *Journal of Applied Bacteriology*, 59(4),325-332.
- Strathmann M, Mittenzwey K-H, Sinn G, Papadakis W, Flemming H-C. 2013. Simultaneous monitoring of biofilm growth, microbial activity, and inorganic deposits on surfaces with an in situ, online, real-time, non-destructive, optical sensor. *Biofouling* 29(5):573–83
- Stepanovi'c, S.; Vukovi'c, D.; Daki'c, I.; Savi'c, B.; Švabi'c-Vlahovi'c, M. A Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of Staphylococcal Biofilm Formation. *J. Microbiol. Methods* 2000, 40, 175–179.
- Stewart, P. S., F. Roe, J. Rayner, J. G. Elkins, Z. Lewandowski, U. A. Ochsner, and D. J. Hassett. 2000. Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (2):836–8. doi: 10.1128/AEM.66.2.836-838.2000.
- Stiefel, P.; Rosenberg, U.; Schneider, J.; Mauerhofer, S. Is biofilm removal properly assessed? Comparison of different quantification methods in a 96-well plate system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016, 100, 4135–4145.
- Storgårds, E. 2000. Process hygiene control in beer production and dispensing. VTT Biotechnology, Espoo, Finland.
- Storgårds, E., and O. Priha. 2009. Biofilms and Brewing, p. 432–454. In P. M. Fratamico, B. A. Annous, and N. W. Gunther (ed.), *Biofilms in the food and beverage industries*. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK.
- Storgårds, E., K. Tapani, P. Hartwall, R. Saleva, and M. L. Suihko. 2006. Microbial attachment and biofilm formation in brewery bottling plants. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 64:8–15.

- Suzuki K. 2011. 125th anniversary review: microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *The Institute of Brewing & Distilling* 117:131–155. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x>.
- Tang, L.; Pillai, S.; Revsbech, N.P.; Schramm, A.; Bischoff, C.; Meyer, R.L. Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. *Biofouling* 2011, 27, 111–121.
- Tang X, Flint SH, Brooks JD, Bennett RJ. Factors affecting the attachment of micro-organisms isolated from ultrafiltration and reverse osmosis membranes in dairy processing plants. *J Appl Microbiol.* 2009 ;107:443–51.
- Takahashi T, Nakakita Y, Nakamura T. 2019. Rapid Single Cell Detection of Lactic Acid Bacteria in the Beer Using Bioluminescence Method. *Biocontrol Sci* 24:29–37. <https://doi.org/10.4265/bio.24.29>.
- Teh KH, Flint S, Palmer J, Andrewes P, Bremer P, Lindsay D. Biofilm—an unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *Int Dairy J.* 2014 ;34:32–40.
- Téllez, S. Biofilms and their impact on food industry. In *VISAVET Outreach Journal*; Complutense University: Madrid, Spain, 2010.
- ten Cate JM: Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* 2006, 94:1-9.
- Teodosio JS, Silva FC, Moreira JM, Simões M, Melo LF, Alves MA, Mergulhão FJ: Flow cells as quasi-ideal systems for biofouling simulation of industrial piping systems. *Biofouling* 2013, 29:953-966.
- Thiran E, Di Ciccio PA, Graber HU, Zanardi E, Ianieri A, Hummerjohann J. 2017. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus* dairy isolates representing different genotypes. *J. Dairy Sci.* 101(2):1000–12
- Timke, M., N. Q. Wang-Lieu, K. Altendorf, and A. Lipski. 2005. Fatty acid analysis and spoilage potential of biofilms from two breweries. *J. Appl. Microbiol.* 99:1108–1122.
- Timke, M., N. Q. Wang-lieu, K. Altendorf, and A. Lipski. 2005. Community structure and diversity of biofilms from a beer bottling plant as revealed using 16S rRNA gene clone libraries. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:6446–6452.
- Timke, M., N. Q. Wang-Lieu, K. Altendorf, and A. Lipski. 2008. Identity, beer spoiling and biofilm forming potential of yeasts from beer bottling plant associated biofilms. *Antonie Leeuwenhoek* 93:151–161.
- Timke, M., D. Wolking, N. Q. Wang-Lieu, K. Altendorf, and A. Lipski. 2004. Microbial composition of biofilms in a brewery investigated by fatty acid analysis, fluorescence in situ hybridisation and isolation techniques. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66:100–107.
- Toushik, S.H.; Mizan, M.F.R.; Hossain, M.I.; Ha, S.D. Fighting with Old Foes: The Pledge of Microbe-Derived Biological Agents to Defeat Mono- and Mixed-Bacterial Biofilms Concerning Food Industries. *Trends Food Sci. Technol.* 2020, 413–425.
- Varga, L., and J. Szigeti. 2016. Use of ozone in the dairy industry: A review. *International Journal of Dairy Technology* 69 (2):157–68. doi:10.1111/1471-0307.12302.
- Van Houdt, R.; Michiels, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J. Appl. Microbiol.* 2010, 109, 1117–1131.
- Van Meervenne E, De Weirdt R, Van Coillie E, Devlieghere F, Herman L, Boon N. 2014. Biofilm models for the food industry: hot spots for plasmid transfer? *Pathog. Dis.* 70(3):332–38

- Veluz, G. A., S. Pitchiah, and C. Z. Alvarado. 2012. Attachment of Salmonella serovars and Listeria monocytogenes to stainless steel and plastic conveyor belts. *Poultry Science* 91 (8):2004–10. doi: 10.3382/ps.2011-01689.
- Venø, Lena. Poulsen (1999) “Microbial Biofilm in Food Processing” 32, no. 6. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 32, 321-326 (1999).
- Venø, Lena’s personal interview with docent Peter Zeuthen at Department of Biotechnology, The Technical University of Denmark (1998).
- Verran, J.; Whitehead, K.A. Assessment of organic materials and microbial components on hygienic surfaces. *Food Bioprod. Process.* 2006, 84, 260–264.
- Verastegui, Y., J. K. Cheng, D. Engel, S. Kolczynski, J. Mortimer, J. Lavigne, T. Montalibet, M. Romantsov, B. J. Hall, D. R. McConkey, et al. 2014. Multisubstrate isotope labeling and metagenomic analysis of active soil bacterial communities. *mBio* 5 (4):e01157–14. doi: 10.1128/mBio.01157-14.
- Wagner, Eva M., Sarah Thalguter, Martin Wagner, and Kathrin Rychli. “Presence of Microbial Contamination and Biofilms at a Beer Can Filling Production Line.” *Journal of Food Protection* 84, no. 5 (May 2021): 896–902. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-368>.
- Wallis, J.K.; Krömker, V.; Paduch, J.-H. Biofilm challenge: Lactic acid bacteria isolated from bovine udders versus staphylococci. *Foods* 2019, 8, 79.
- Wang, H., L. Cai, Y. Li, X. Xu, and G. Zhou. 2018. Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. *Food Control* 91:397–403. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.04.035.
- Wang J, Ray AJ, Hammons SR, Oliver HF. 2015a. Persistent and transient *Listeria monocytogenes* strains from retail deli environments vary in their ability to adhere and form biofilms and rarely have inlA premature stop codons. *Foodborne Pathog. Dis.* 12(2):151–58
- Weber M, Liedtke J, Plattes S, Lipski A. Bacterial community composition of biofilms in milking machines of two dairy farms assessed by a combination of culture-dependent and–independent methods. *PLOS One.* 2019;14:e0222238.
- Weiler C, Ifland A, Naumann A, Kleta S, Noll M: Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *Int J Food Microbiol* 2013, 161:61-68
- Whitehead KA, Benson P, Smith LA, Verran J: The use of physicochemical methods to detect organic food soils on stainless steel surfaces. *Biofouling* 2009, 25:749-756.
- Whitehead, Kathryn A, and Joanna Verran. “Formation, Architecture and Functionality of Microbial Biofilms in the Food Industry.” *Current Opinion in Food Science* 2 (April 2015): 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.02.003>.
- Whitehead, K.A.; Saubade, F.; Akhidime, I.D.; Liauw, C.M.; Benson, P.S.; Verran, J. The detection and quantification of food components on stainless steel surfaces following use in an operational bakery. *Food Bioprod. Process.* 2019, 116, 258–267.
- Whitehead KA, Verran J: The effect of application method on the retention of *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel, and titanium coated stainless steel of differing topographies. *Int Biodeterior Biodegradation* 2007, 60:74-80.



- Winkelstroter, L. K., F. B. d. R. Teixeira, E. P. Silva, V. F. Alves, and E. C. P. De Martinis. 2014. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microbial Ecology* 68 (1):35–46. doi: 10.1007/s00248-013-0347-4.
- Xue, T., X. Chen, and F. Shang. 2014. Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. *Journal of Dairy Science* 97 (10):6129–34. doi: 10.3168/jds.2014-8344.
- Yamakawa T, Tomita K, Sawai J: Characteristics of biofilms formed by co-culture of *Listeria monocytogenes* with *Pseudomonas aeruginosa* at low temperatures and their sensitivity to antibacterial substances. *Biocontrol Sci* **2018**,23:107-119.
- Yang, H., P. A. Kendall, L. C. Medeiros, and J. N. Sofos. 2009. Efficacy of sanitizing agents against *Listeria monocytogenes* biofilms on highdensity polyethylene cutting board surfaces. *Journal of Food Protection* 72 (5):990–8. doi: 10.4315/0362-028X-72.5.990
- Yaron, S.; Romling, U. Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence. *Microb. Biotechnol.* **2014**, 7, 496–516.
- Yazdi S, Ardekani AM: Bacterial aggregation and biofilm formation in a vortical flow. *Biomicrofluidics* 2012, 6:044114.
- Yu, H., Y. Liu, L. Li, Y. Guo, Y. Xie, Y. Cheng, and W. Yao. 2020. Ultrasound-involved emerging strategies for controlling foodborne microbial biofilms. *Trends in Food Science & Technology* 96:91–101. doi: 10.1016/j.tifs.2019.12.010.
- Yuan, Lei, Faizan A. Sadiq, Ni Wang, Zhenquan Yang, and Guoqing He. “Recent Advances in Understanding the Control of Disinfectant-Resistant Biofilms by Hurdle Technology in the Food Industry.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 61, no. 22 (December 16, 2021): 3876–91. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1809345>.
- Yuan, Lei, Mads Frederik Hansen, Henriette Lyng Røder, Ni Wang, Mette Burmølle, and Guoqing He. “Mixed-Species Biofilms in the Food Industry: Current Knowledge and Novel Control Strategies.” *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 60, no. 13 (July 19, 2020): 2277–93. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1632790>
- Yuan, L.; Sadiq, F.A.; Burmølle, M.; Liu, T.; He, G. Insights into bacterial milk spoilage with particular emphasis on the roles of heat-stable enzymes, biofilms, and quorum sensing. *J. Food Prot.* 2018(a,b), 81,(10): 1651–1660.
- Zhang, S., Kingsley, R. A., Santos, R. L., Andrews-Polymenis, H., Raffatellu, M., Figueiredo, J., et al. (2003). Molecular pathogenesis of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium-induced diarrhea. *Infection and Immunity*, 71(1), 1e12.
- Ziech, R. E., A. P. Perin, C. Lampugnani, M. J. Sereno, C. Viana, V. M. Soares, J. G. Pereira, J. P. d A. N. Pinto, and L. d S. Bersot. 2016. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. *LWT - Food Science and Technology* 68:85–90. doi: 10.1016/j.lwt.2015.12.021.
- Zottola, E. A. Scientific status, summary, Microbial attachment and biofilm formation, a new problem for the food industry. *Food technology*, 48(7), 107-117 (1994)
- Zottola, E. A. And Sasahara, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry-Should they be a concern? *International Journal of Food Microbiology*, **23**, 125-148 (1994)

Τεχνικό Φυλλάδιο TBF 300S (Αναθεώρηση Ιανουάριος 2019) - BETELGEUX-CHRISTEYNS FOOD  
HYGIENE - ES - 46729 Ador - [betelgeux@betelgeux.es](mailto:betelgeux@betelgeux.es), [www.betelgeux.es](http://www.betelgeux.es)