



Σχολή Επιστημών Τροφίμων

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**<<Μελέτη του σχηματισμού βιοφίλμ από μικροοργανισμούς
σε παραγωγικές μονάδες>>.**

MSc Thesis

<<Study of biofilm formation from microorganisms in production units>>.

Διευθυντής

Καθ. Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων (ΠΑ.Δ.Α) Ιωάννης Τσάκνης

Όνομα φοιτητή: **Νικολίτσα Αλεξοπούλου**

Name of student: **Nikolitsa Alexoroulou**

Όνομα εισηγητή: Δρ. Ανθιμία Μπατρίνου

Name of supervisor: **Dr. Anthimia Batrinou**

Αιγάλεω

Μάιος 2021



Faculty of Food Sciences

Department of Food Science and Technology

Master of Science

FOOD INNOVATION, QUALITY AND SAFETY

MSc Thesis

<<Study of biofilm formation from microorganisms in production units>>.

Nikolitsa Alexopoulou

Registration number: 19002

Email: nikalfoodtech@gmail.com

Supervisor: **Dr. Athimia Batrinou**

Aigaleo

May 2021

Έγινε δεκτή

Ο διευθυντής του ΠΜΣ:

Οι υπογράφωντες δηλώνουμε ότι έχουμε εξετάσει την μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία (master thesis) με τίτλο ‘Μελέτη του σχηματισμού βιοφίλμ από μικροοργανισμούς σε παραγωγικές μονάδες’ που παρουσιάστηκε από την Νικολίτσα Αλεξοπούλου, υποψήφιας για τον μεταπτυχιακό τίτλο σπουδών ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ και βεβαιώνουμε ότι γίνεται δεκτή.

Ημερομηνία Όνομα Επιβλέποντος Ανθιμιά Μπατρίνου

Ημερομηνία Όνομα Μέλους Επιτροπής Κοντελής Σπυρίδων

Ημερομηνία Όνομα Μέλους Επιτροπής Λαμπροπούλου Κυριακή

ΔΗΛΩΣΗ ΣΥΓΓΡΑΦΕΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΥ ΝΙΚΟΛΙΤΣΑ του ΠΑΝΑΓΙΩΤΗ, με αριθμό μητρώου 19002 φοιτήτρια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ, ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων της Σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της, είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος.

Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Η Δηλούσα



Ευχαριστίες

Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέβαλλαν στην εκπόνησή της. Ευχαριστώ θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια μου, κυρία Ανθιμία Μπατρίνου Λέκτορα του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε εξ' αρχής, αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο θέμα, την επιστημονική της καθοδήγηση, τη συμπαράστασή της, τη συνεχή της υποστήριξη και το αμείωτο ενδιαφέρον που έδειξε από την αρχή μέχρι το τέλος. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τον καθηγητή και μέντορα μου, κύριο Ευμορφόπουλο Ευάγγελο Κτηνίατρο (Ph.D.) για τις υποδείξεις του, την επιμονή του, το αμείωτο ενδιαφέρον του και την υποστήριξη του. Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Λέκτορα Εφαρμογών του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής κύριο Κουλούρη Σπυρίδων , για τις εποικοδομητικές τους υποδείξεις και την πολύτιμη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας μου. Τέλος, θα ήθελα εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου και το σύζυγό μου Βασίλη για όλη τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους, καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η μελέτη της δομής και της σύστασης των βιομεμβρανών αποτελούσε, αποτελεί και θα αποτελεί έναν διαρκώς αναπτυσσόμενο επιστημονικό πεδίο καθώς σχετίζεται με ένα ευρύ κλάδο εφαρμογών συμπεριλαμβανομένου και αυτού των τροφίμων. Η σημαντικότητα των βιομεμβρανών στις βιομηχανίες τροφίμων είναι ιδιαίτερη καθώς σχετίζεται τόσο με θέματα που αφορούν την ασφάλεια των παραγόμενων προϊόντων όσο και με θέματα που αφορούν οικονομικά και άλλα κριτήρια. Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότερες βιομεμβράνες εμφανίζουν αυξημένη αντοχή σε αντιμικροβιακούς παράγοντες γεγονός που δυσχεραίνει τις υπάρχουσες διαδικασίες καθαρισμού. Μεταξύ των άλλων, τα στρώματα που δημιουργούνται στις επιφάνειες των τροφίμων ευθύνονται για σημαντικό μέρος των θερμικών απωλειών, της μειωμένης απόδοσης και σε κάποιες περιπτώσεις την διάβρωση του εξοπλισμού. Ακόμη, προάγουν τη δημιουργία πιο σύνθετων μικροβιακών κοινοτήτων συμπεριλαμβανομένων σημαντικών παθογόνων μικροοργανισμών οι οποίες χαρακτηρίζονται από έναν διαφορετικό φαινότυπο.

Σύμφωνα και με τα πιο πρόσφατα επιστημονικά δεδομένα, ο όρος βιοφίλμ ή σε κάποιες περιπτώσεις βιολογικό υμένιο χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει μια μικροβιακή κοινότητα από κύτταρα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους ή μέσω μιας επιφάνειας-υποστρώματος που βρίσκονται ενσωματωμένα σε μια εξωκυττάρια μήτρα δομημένη από πολυμερείς ουσίες που οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί έχουν παράξει (Extracellular Polymeric Substances, EPS). Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι: (α) η σε βάθος βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τους παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό βιοφίλμ στις βιομηχανίες τροφίμων, (β) η διερεύνηση τους είδους των μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε αυτά τα βιοφίλμ και (γ) η ανάδειξη της αναγκαιότητας εύρεσης νέων αποτελεσματικών μεθόδων καθαρισμού αλλά και προληπτικών μέτρων. Φαίνεται ότι από τις βασικότερες προϋποθέσεις για το σχηματισμό βιομεμβρανών αποτελούν η ύπαρξη μικροβιακών κοινοτήτων στην ελεύθερη τους μορφή (planktonic), η ύπαρξη μιας σχετικά υγρής επιφάνειας, η επαρκής διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά αλλά και η ανάπτυξη ενός πολυεπίπεδου συστήματος επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και του περιβάλλοντος.

Γενικά, οι βιομεμβράνες απαντώνται στα περισσότερα οικοσυστήματα και έτσι υπό προϋποθέσεις μπορούν να ανιχνευθούν και στις βιομηχανίες τροφίμων. Ο σχηματισμός τους περιλαμβάνει πέντε στάδια, ξεκινώντας από τη προσκόλληση των ελεύθερων κυττάρων στην επιφάνεια ενώ σε δεύτερο επίπεδο σχηματίζονται οι χημικές βαθμίδες και κατ' επέκταση η παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας. Κατόπιν, σταδιακά δημιουργούνται μικροαποικίες

εντός του συστήματος της βιομεμβράνης ενώ ακολουθεί η ωρίμανση του βιοφίλμ κατά την οποία ελάχιστες φυσικοχημικές μεταβολές λαμβάνουν πλέον χώρα. Τέλος από τη στιγμή που ο σχηματισμός βιομεμβρανών μπορεί να θεωρηθεί μια κυκλική διαδικασία, ως τελευταίο στάδιο ορίζεται η διασπορά του συστήματος η οποία αφορά το νέο κύκλο ζωής μιας βιομεμβράνης μέσω της απελευθέρωσης ελεύθερων (πλαγκτονικών) κυττάρων. Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς οι οποίοι μπορούν να εμπλακούν στο σχηματισμό βιομεμβρανών παρατηρούνται τόσο απλά όσο και σύνθετα βιοφίλμ. Φαίνεται επίσης πως υπάρχει άμεση συσχέτιση μεταξύ του είδους του τροφίμου (άρα και του υποστρώματος) και της τυπικής αλλοιογόνου χλωρίδας.

Σημαντικές ωστόσο θεωρούνται και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικροοργανισμών οι οποίες μπορούν είτε να προάγουν είτε να αποτρέψουν το σχηματισμό βιομεμβρανών. Για παράδειγμα στις βιομηχανίες κρέατος, έχει βρεθεί ότι το *Acinetobacter calcoaceticus* ευνόησε το σχηματισμό *E. coli*. Σε άλλη έρευνα που αφορούσε γαλακτοκομικά προϊόντα φάνηκε πως ένας συνδυασμός *P. fluorescens* με *B. cereus* ήταν έως και πέντε φορές μεταβολικά ενεργός απ' ότι τα αντίστοιχα μονοποικιλιακά βιοφίλμ τους. Παρόμοια είναι και τα ευρήματα που προέρχονται από προϊόντα ιχθυηρών στα οποία στελέχη του γένους *Vibrio* ευνόησαν το σχηματισμό άλλων ειδών βιοφίλμ όπως το *P. aeruginosa*. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις οφείλονται σε μεγάλο σε ρυθμιστές απόκρισης σημάτων και κατ' επέκταση του πολυεπίπεδου συστήματος κυτταρικής επικοινωνίας.

Σύμφωνα με όλα τα παραπάνω, είναι αναγκαία η εύρεση επιπλέον λύσεων αναφορικά με αποτελεσματικές στρατηγικές πρόληψης και απομάκρυνσης των βιομεμβρανών. Οι περισσότεροι ερευνητές αναφέρουν πως κάθε περίπτωση μπορεί να είναι μοναδική καθώς επηρεάζεται από ένα σύνολο παραγόντων που αφορούν το ίδιο το τρόφιμο (είδος-θρεπτικό υπόστρωμα), τους εμπλεκόμενους μικροοργανισμούς (μορφολογία, αλληλεπιδράσεις) και το περιβάλλον (τύπος επιφάνειας, φυσικοχημικές παράμετροι). Σε γενικές γραμμές, εξαιτίας της ανθεκτικότητας των βιομεμβρανών σε αρκετούς χημικούς παράγοντες παρατηρείται η τάση εφαρμογής εναλλακτικών προληπτικών στρατηγικών και καθαρισμούς οι οποίες αφενός θα είναι αποτελεσματικές αλλά αφετέρου θα χαρακτηρίζονται και από μια σειρά πλεονεκτημάτων όπως τη φιλικότερη προσέγγιση τους προς το περιβάλλον, τη χαμηλότερη τοξικότητα τους, το χαμηλότερο κόστος και την υψηλότερη εκλεκτικότητα τους.

Abstract

The study of the structure and composition and biofilms has been, is and will be an ever-evolving scientific field as is related to a wide range of applications including the food industry. The importance of biofilms in the food industry is unique as it relates both to issues associated to the safety of products produced and to issues related to economic and other criteria. More specific, most biomembranes show increased resistance to antimicrobial agents, which complicates existing cleaning process. Among the other things, the layers that form on the surfaces of food are responsible for a significant part of heat loss, reduced efficiency and in some cases corrosion of the equipment. They also promote the formation of more complex microbial communities including important pathogenic microorganisms characterized by a different phenotype.

According to the latest scientific data, the term of biofilm or in some cases biological film is used to describe a microbial community of cells that are intero-connected or through a substrate-surface embedded in an extracellular matrix composed of polymeric substances that the microorganisms themselves have produced (Extracellular Polymeric Substances, EPS). The aim of this master thesis is: (a) an in depth literature review on the factors that affect the formation of biofilms in the food industry, (b) the investigation of the species of microorganisms involved in these biofilms and (c) the promotion of the need to find new effective cleaning methods and preventive measure. It seems that one of the main conditions for the formation of biomembranes are the existence of microbial communities in their free form (planktonic), the existence of a relatively moist surface, the adequate availability of nutrients and the development of a multilevel communication system between cells and the environment.

In general, biomembranes are found in most ecosystems and thus, under certain conditions can be detected in food industry. Their formation includes five stages, starting from the attachment of free cells to the surface while in the second level the chemical steps are formed and consequently the production of the extracellular matrix. Then, microcolonies are gradually created with the biofilm system followed by the maturation of the biofilm during which, minimal physicochemical changes are taking place. Finally, since the formation of biomembranes can be considered a cyclic process, the last step is defined as the dispersion of the system which refers to the new life cycle of a biomembranes through the release of free (planktonic) cells. As far the microorganisms that can be involved in the formation of biofilm is concerned, both simple and complex biofilms are observed. It also seems that there is a

direct correlation between the type of food and the typical allogeneic flora. However, interactions between microorganisms that can either promote or prevent the formation of biofilms are also considered important. For example, in the meat industry, *Acinetobacter* has been found to promote the formation of *E. Coli*. Another dairy study found that a combination of *P. Fluorescens* with *B. Cereus* was up to five times more metabolically active than their respective single-variety biofilms. Similar were the findings from a fishery study in which, strains of the genus *Vibrio* favored the formation of other biofilm species such as *P. Aeruginosa*. These interactions are due to signal response modulators and consequently the multilevel cellular communication system (quorum-sensing).

In view of all the above, it is necessary to find additional solutions regarding effective strategies for the prevention and removal of biomembranes. Most researchers say that each case of biofilm formation can be unique as it is influenced by a set of different factors related to the food itself (type and substrate), the involved microorganisms (morphology and interactions) and the environment (surface type and other physicochemical parameters). In general, due to the resistance of biofilms to several chemical and antimicrobial agents, there is a tendency to implement alternative preventive strategies and cleaning methods which on the one hand will be effective but on the other hand will be characterized by a number of advantages such as their friendlier approach to the environment, their lowest toxicity and cost and their higher selectivity.

Περιεχόμενα	
Δήλωση περί λογοκλοπής/copyright.....	4
Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Abstract.....	8
Κατάλογος Πινάκων.....	11
Κατάλογος Εικόνων.....	11
Κεφάλαιο 1: Βιομεμβράνες.....	15
1.1 Σχηματισμός βιομεμβρανών.....	17
1.1.1 Gram θετικά βακτήρια και πορεία σχηματισμού.....	19
1.1.2 Gram αρνητικά βακτήρια και πορεία σχηματισμού.....	21
1.2 Δομή βιομεμβρανών.....	22
1.3 Σύσταση βιομεμβρανών.....	23
1.4 Εξωκυττάρια μήτρα και πολυμερείς ουσίες (Extracellular Polymeric Substances, EPS).....	24
1.4.1 Σύσταση της εξωκυττάριας πολυμερούς μήτρας.....	25
1.4.1.1 Έξω-πολυσακχαρίτες (Exopolysaccharides).....	25
1.4.1.2 Εξωκυτταρικές πρωτεΐνες (Extracellular proteins).....	26
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό βιομεμβρανών.....	27
1.5.1 Περιβάλλον ανάπτυξης του βιοφίλμ.....	28
1.5.2 Επιφάνεια προσκόλλησης.....	28
1.5.3 Βακτηριακά κύτταρα.....	29
1.5.3.1 Μορφολογία βακτηριακών κυττάρων.....	29
1.5.3.2 Κύτταρο-κυτταρική επικοινωνία (quorum sensing).....	30
1.5.3.3 Νέος φαινότυπος.....	31
1.6 Γενικές επιπτώσεις βιομεμβρανών.....	31
1.7 Αξιοποίηση σχηματισμού βιομεμβρανών.....	33
Κεφάλαιο 2: Μικροοργανισμοί και βιομεμβράνες.....	34
2.1 <i>Salmonella spp</i>	34
2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση.....	34
2.1.2 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	35
2.1.3 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	36
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	38
2.2.1 Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση.....	38

2.2.2	Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	40
2.2.3	Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	41
2.3	<i>Campylobacter jejuni</i>	43
2.3.1	Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση.....	43
2.3.2	Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	44
2.3.3	Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	46
2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	47
2.4.1	Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση.....	47
2.4.2	Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	47
2.4.3	Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	49
2.5	<i>Escherichia coli</i>	49
2.5.1	Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση.....	49
2.5.2	Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες.....	50
2.5.3	Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά.....	51
	Κεφάλαιο 3: Σχηματισμός βιομεμβρανών και βιομηχανίες τροφίμων.....	53
3.1	Βιομηχανίες επεξεργασίας κρέατος.....	53
3.1.1	Αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών.....	54
3.1.2	Αλληλεπιδράσεις εμπλεκόμενων μικροοργανισμών στις κρεατοβιομηχανίες κατά το σχηματισμό βιοφίλμ.....	55
3.2	Βιομηχανίες γάλακτος.....	57
3.2.1	Αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών.....	57
3.2.2	Αλληλεπιδράσεις εμπλεκόμενων μικροοργανισμών στις βιομηχανίες γάλακτος κατά το σχηματισμό βιοφίλμ.....	60
3.3	Βιομηχανίες επεξεργασίας ιχθυηρών.....	61
3.3.1	Αλληλεπιδράσεις εμπλεκόμενων μικροοργανισμών στις βιομηχανίες ιχθυηρών κατά το σχηματισμό βιοφίλμ.....	62
3.4	Βιομηχανίες επεξεργασίας λαχανικών.....	65
3.4.1	Αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών.....	65
3.4.2	Αλληλεπιδράσεις εμπλεκόμενων μικροοργανισμών στις βιομηχανίες μικροοργανισμών κατά το σχηματισμό βιοφίλμ.....	66
	Κεφάλαιο 4 Σχηματισμός βιομεμβρανών και η σημασία τους στα συστήματα κυκλοφορίας νερού.....	68
4.1	Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού και η επίδραση τους στην ποιότητα του και τον εξοπλισμό.....	68

4.2 Αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών στα συστήματα κυκλοφορίας νερού.....	69
4.2.1 Ανθρώπινοι χειρισμοί και απόβλητα.....	69
4.3 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά νερού.....	70
4.3.1 Εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί κατά το σχηματισμό βιομεμβρανών σε συστήματα ύδρευσης βιομηχανιών τροφίμων.....	71
4.4 Βιοδιάβρωση συστημάτων κυκλοφορίας νερού και βιομεμβράνες.....	72
4.4.1 Παραπροϊόντα του μεταβολισμού των βακτηρίων.....	74
Κεφάλαιο 5: Στρατηγικές πρόληψης και αντιμετώπισης σχηματισμού βιομεμβρανών στις βιομηχανίες τροφίμων.....	75
5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τις στρατηγικές καθαρισμού.....	76
5.2 Φυσικός καθαρισμός.....	77
5.2.1 Μηχανικές μέθοδοι καθαρισμού (Τριβή).....	78
5.3 Απολύμανση.....	79
5.3.1 Φυσικές μέθοδοι απολύμανσης.....	79
5.3.1.1 Θέρμανση και ακτινοβολίες.....	79
5.3.1.2 Υπέρηχοι.....	80
5.3.2 Χημικές μέθοδοι απολύμανσης.....	81
5.3.2.1 Χλώριο.....	81
5.3.2.2 Ιώδιο.....	82
5.3.2.3 Τεταρτοταγές αμμώνιο.....	82
5.4 Παραδείγματα απομάκρυνσης βιομεμβρανών στις βιομηχανίες τροφίμων.....	83
5.4.1 Βιομηχανίες επεξεργασίας και παραγωγής γάλακτος.....	83
5.4.2 Βιομηχανίες επεξεργασίας και παραγωγής ιχθυηρών.....	85
5.5 Εναλλακτικές προσεγγίσεις πρόληψης και αντιμετώπισης σχηματισμού βιομεμβρανών.....	86
5.5.1 Χρήση ενζύμων.....	86
5.5.1.1 Δεόξυ-ρυβονουκλεάσες (DNάσες).....	87
5.5.1.2 Ένζυμα αποικοδόμησης πολυσακχαριτών.....	87
5.5.1.3 Πρωτεολυτικά ένζυμα.....	88
5.5.1.4 Ένζυμα που στοχεύουν τη διακυτταρική επικοινωνία (quorum sensing) των μικροοργανισμών.....	88
5.5.2 Χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών-αντιμικροβιακών.....	89
5.5.3 Βακτηριοφάγοι.....	89
Κεφάλαιο 6: Συμπεράσματα.....	91

Κεφάλαιο 7 Βιβλιογραφία.....	93
7.1 Ξενόγλωσση.....	93
7.2 Ελληνική.....	103
7.3 Ηλεκτρονική.....	103

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1: Χημική σύσταση βιομεμβράνης.....	23
Πίνακας 1.2: Κυριότερα παραδείγματα προβλημάτων λόγω του σχηματισμού βιομεμβρανών.....	32
Πίνακας 3.1: Εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί στα διάφορα προϊόντα κρέατος	56
Πίνακας 3.2: Υλικά επιφάνειας και συσχέτιση τους με συγκεκριμένες εστίες-τεχνολογίες παραγωγής που ευνοούν το σχηματισμό βιομεμβρανών.....	59
Πίνακας 3.3: Εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί και δυνατότητα σχηματισμού βιοφίλμ σε βιομηχανίες επεξεργασίας λαχανικών.....	66
Πίνακας 5.1: Εφαρμογή συστημάτων καθαρισμού σε θερμαινόμενες ή μη επιφάνειες γαλακτοβιομηχανιών.....	84

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1.1: Επιχρίσματα πτυέλων με κηλίδες από <i>P. Aeruginosa</i> σε ασθενείς με κυστική ίνωση.....	16
Εικόνα 1.2: Απεικόνιση μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σχηματισμού βιομεμβράνης του βακτηρίου <i>P. Aeruginosa</i>	18
Εικόνα 1.3: Βασικά στάδια σχηματισμού βιομεμβράνης.....	19
Εικόνα 1.4: Ρόλος των έξω-πολυσακχαριτών της EPS μήτρας στα διάφορα στάδια σχηματισμού των βιομεμβρανών.....	25
Εικόνα 1.5: Απεικόνιση σμηρίγγων και κροισσών σε ένα gram αρνητικό βακτήριο.....	30
Εικόνα 2.1: Απεικόνιση <i>Salmonella srr</i> σε ένα ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	36
Εικόνα 2.2: Απεικόνιση αποικιών στελέχους <i>L. Monocytogenes</i>	40
Εικόνα 2.3: Σάρωση εικόνας μικροσκοπίου του <i>C. jejuni</i>	44
Εικόνα 2.4: Απεικόνιση χαρακτηριστικών αποικιών του <i>S. Aureus</i> σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.....	48
Εικόνα 2.5: Απεικόνιση βακτηριακού στελέχους <i>E. Coli</i> 0157:H7.....	51
Εικόνα 4.1: Διαβρωμένος σωλήνας δικτύου διανομής νερού από βιοφίλμ.....	73

Κεφάλαιο 1 Βιομεμβράνες

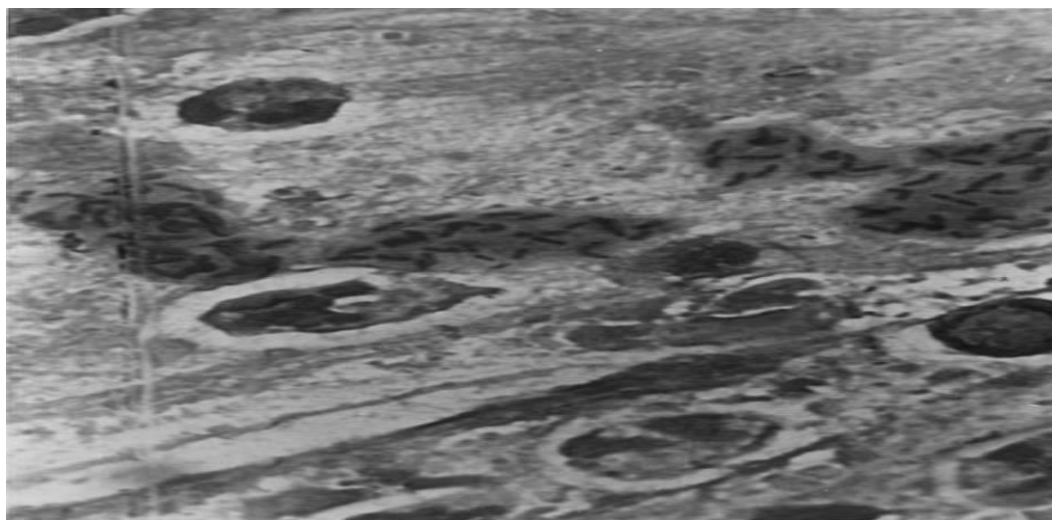
Τα παλαιότερα χρόνια υπήρχε η αντίληψη πως οι μικροοργανισμοί είχαν πολύ απλή δομή σε σύγκριση με άλλους ανώτερους οργανισμούς. Ωστόσο, η μελέτη της μικροβιακής τους ανάπτυξης με σύγχρονα μέσα και μεθόδους, φανέρωσε ότι οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι ικανοί να επικοινωνούν και να συντονίζουν τη συμπεριφορά τους μέσω σηματοδοτούμενων μορίων, σχηματίζοντας πολύπλοκες δομές με πολυδύναμες διαφορετικές συμπεριφορές. Πλέον, στη Κλασική Μικροβιολογία είναι γνωστό ότι τα βακτήρια παρουσιάζουν δύο τρόπους ανάπτυξης: (α) του ελεύθερου μετεωρισμού ή πλαγκτονική (planktonic) και (β) την προσκολλημένη (sessile) μέσα σε βιομεμβράνες [1]. Γενικά, βιομεμβράνες μπορούν να σχηματιστούν σε οποιαδήποτε επιφάνεια η οποία έρχεται σε επαφή με το νερό ή και άλλα υγρά. Έτσι λοιπόν, σε μια βιομηχανία τροφίμων βιομεμβράνες μπορούν να σχηματιστούν σε όλες τις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων αλλά πολύ περισσότερο σε μηχανολογικό εξοπλισμό του οποίου η καθαριότητα είναι δυσκολότερη (εσωτερικό μέρος μηχανημάτων κοπής κρεάτων, καταψύκτες κ.α). Γενικότερα ο σχηματισμός βιομεμβρανών είναι πολύ διαδεδομένος στα φυσικά περιβάλλοντα συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπινου οργανισμού στον οποίο ωστόσο ευθύνεται για τη δημιουργία σοβαρών λοιμώξεων. Χαρακτηριστικά παραδείγματα να αποτελούν η οδοντική πλάκα, η γλιστερή επιφάνεια στα βράχια (βρύα) και το υμένιο στο εσωτερικό των βάζων που διατηρούνται λουλούδια για μεγάλο χρονικό διάστημα.

Κατά καιρούς από πολλούς ερευνητές υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με τη πολυπλοκότητα, το τρόπο σχηματισμού, το τρόπο ανάπτυξης και την σημαντικότητα των βιομεμβρανών. Τέτοια πολυδύναμα συστήματα μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά όχι μόνο την ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων αλλά και άλλες διαδικασίες παραγωγής ή και το περιβάλλον. Για παράδειγμα, η ανάπτυξη τους σε ένα δίκτυο νερού επηρεάζει την ποιότητα και τη ταχύτητα ροής του, ενώ στα ύφαλα των πλοίων αυξάνει την κατανάλωση καυσίμων και επηρεάζει τη τελική τους ταχύτητα [2]. Έτσι λοιπόν, παρουσιάζεται η ανάγκη για μια περαιτέρω ενδοσκόπηση σε βάθος τόσο των μηχανισμών σχηματισμού τους όσο και της δράσης τους.

Στα τρόφιμα, η μελέτη αυτή, είναι ιδιαίτερα απαιτητική και πολύπλοκη καθώς διάφοροι δυνητικά επικίνδυνοι μικροοργανισμοί μπορούν να συμμετάσχουν στο σχηματισμό των βιομεμβρανών και παράλληλα να αλληλοεπιδρούν με το υπάρχον φυσικώς απαντώμενο μικροβίωμα κάθε τροφίμου. Η βαθύτερη αυτή γνώση της δομής και της λειτουργίας των βιομεμβρανών θα βοηθήσει τον άνθρωπο να αξιοποιήσει την παρουσία τους προς όφελος του, με ήδη σημαντικά βήματα να γίνονται προς αυτή τη κατεύθυνση.

Κατά καιρούς διάφοροι ορισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί για να εξηγήσουν πλήρως τι ακριβώς είναι οι βιομεμβράνες. Ήδη πριν από δυο αιώνες υπήρχαν οι ενδείξεις ότι τα βακτήρια μπορούσαν να αναπτυχθούν σε βιολογικές ή μη επιφάνειες χωρίς ωστόσο αυτό να είναι σαφές εξαιτίας των περιορισμένων μέσων ανίχνευσης που ήταν διαθέσιμα εκείνη την εποχή. Στις πρώτες προσπάθειες του, ο Leeuwenhoek με ένα πολύ απλό μικροσκόπιο, παρατήρησε την ύπαρξη μικροοργανισμών στην οδοντική πλάκα [3]. Μερικά χρόνια αργότερα, ο Pasteur παρατήρησε και σκιαγράφησε συσσωματώματα βακτηρίων ως τη βασική αιτία που το κρασί μετατρέπεται σε ξύδι [4]. Με την πρόοδο της τεχνολογίας και καθώς τα πρώτα ηλεκτρονικά μικροσκοπία έκαναν την εμφάνιση τους, το ενδιαφέρον για το σχηματισμό των βιομεμβρανών αυξήθηκε καθώς από πολλούς επιστήμονες, οι βιομεμβράνες συσχετίστηκαν με την εμφάνιση σοβαρών λοιμώξεων στον άνθρωπο.

Έτσι λοιπόν, αρχικά το 1969 για πρώτη φορά σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε σε μονάδα επεξεργασίας αποβλήτων υπογραμμίστηκε ο σημαντικός ρόλος που παίζει ένας πολυσακχαρίτης γνωστός ως γλυκοκάλυκας στην αλληλεπίδραση επιφάνειας και μικροοργανισμών [5]. Λίγα χρόνια αργότερα (1977-78), ο Costerton δημοσίευσε τη πρώτη εικόνα (Εικόνα 1.1) μιας μικροβιακής κοινότητας που είχε προσκολληθεί στα πτύελα ασθενών που έπασχαν από χρόνια λοίμωξη (κυστική ίνωση) στους πνεύμονες από *P. aeruginosa* ενώ σε παρόμοια έρευνα του αντικατέστησε τον όρο γλυκοκάλυκας με τον όρο biofilms ή βιομεμβράνες [6].



Εικόνα 1.1: Επιχρίσματα πτυέλων με κηλίδες από *P. aeruginosa* σε ασθενείς με κυστική ίνωση (Πηγή: Hoiby N., 1977)

Σύμφωνα και με τα τελευταία επιστημονικά δεδομένα, όρος βιοφίλμ ή βιολογικό υμένιο χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει μια μικροβιακή κοινότητα από κύτταρα τα οποία συνδέονται μεταξύ τους ή μέσω μιας επιφάνειας-υποστρώματος που βρίσκονται ενσωματωμένα σε μια μήτρα με εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (Extracellular Polymeric

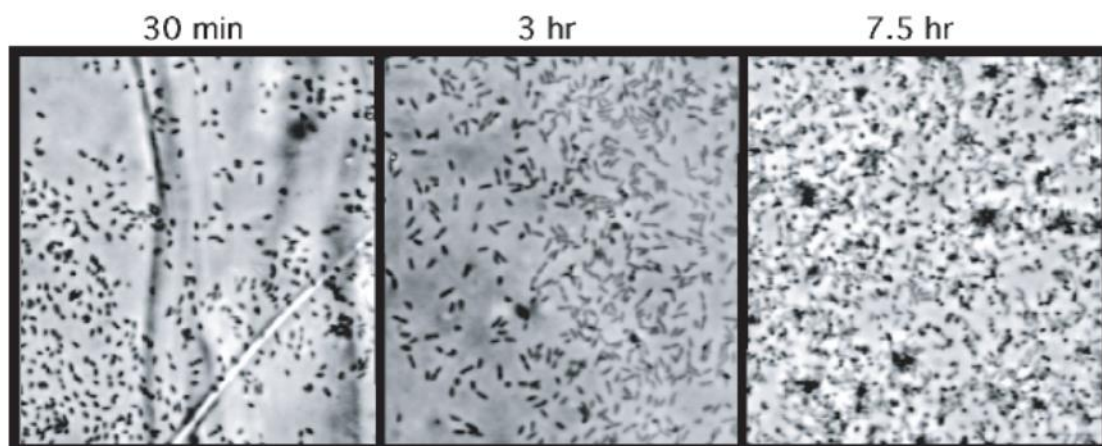
Substances, EPS) που οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί έχουν παράξει [7]. Η περαιτέρω μελέτη του σχηματισμού και της δομής των βιομεμβρανών είναι απαραίτητη καθώς οι βιομεμβράνες χαρακτηρίζονται από έναν διαφορετικό φαινότυπο ο οποίος είναι υπεύθυνος για τις διαφορετικές ιδιότητες που αυτές παρουσιάζουν. Αυτό σχετίζεται άμεσα και με τα τρόφιμα διότι τέτοιου είδους μικροβιακές κοινότητες παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στα διάφορα απολυμαντικά αλλά και αντιβιοτικά ενώ χαρακτηρίζονται και από διαφορετικούς ρυθμούς ανάπτυξης και ανταλλαγής γενετικού υλικού [8-9]. Στις μέρες μας, το ερευνητικό αλλά και πρακτικό ενδιαφέρον εστιάζει στη κατανόηση του σχηματισμού τους συμπεριλαμβανομένων της μελέτης για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που δημιουργούν σε βιομηχανίες και συστήματα ύδρευσης καθώς και του ρόλου που μπορούν να διαδραματίσουν σε εν δυνάμει ωφέλιμες εφαρμογές για τον άνθρωπο και το περιβάλλον.

1.1 Σχηματισμός βιομεμβρανών

Ένας συνδυασμός γενετικών και μοριακών τεχνικών, παράλληλα με την άμεση μικροσκοπική οπτικοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί για την έρευνα των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται και ρυθμίζουν-ελέγχουν τον σχηματισμό και την ανάπτυξη των βιοφίλμ. Κατά γενική ομολογία, η ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ δεν είναι μόνο ένα κοινό χαρακτηριστικό διάφορων μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων των μονοκύτταρων μικροοργανισμών όπως οι ζύμες, αλλά έχει επίσης αναγνωριστεί ως ο κυρίαρχος τρόπος ανάπτυξης βακτηρίων στη φύση [10]. Ο σχηματισμός βιοφίλμ ξεκινά από τη στιγμή που τα βακτήρια είναι ικανά να ανιχνεύσουν περιβαλλοντικές συνθήκες οι οποίες μπορούν να υποστηρίξουν τη μετάβαση ζωής σε μια επιφάνεια. Απαραίτητες προϋποθέσεις για το σχηματισμό βιομεμβρανών είναι: (α) η ύπαρξη μικροβιακών κυττάρων (πλαγκτονικά), (β) η ύπαρξη μια σχετικά υγρής επιφάνειας (γ) η επαρκής διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά αλλά και (δ) η ανάπτυξη ενός πολυεπίπεδου συστήματος επικοινωνίας μεταξύ των κυττάρων και του περιβάλλοντος.

Η προσκόλληση των μικροοργανισμών στη επιφάνεια γίνεται σε δυο στάδια: αυτό της αναστρέψιμης και της μη αναστρέψιμης προσκόλλησης [11]. Κατά τη διάρκεια της αναστρέψιμης φάσης, η δομή του βιοφίλμ είναι ασταθής και διαρκώς μεταβάλλεται. Βασικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με την προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων στην επιφάνεια περιλαμβάνουν την απώλεια γονιδίων που σχετίζονται με τη παραγωγή μαστιγίων, τη παραγωγή συστατικών που αφορούν την εξωκυτταρική μήτρα της βιομεμβράνης και την επαγωγή μηχανισμών αντοχής στα αντιβιοτικά [12]. Τα επιμέρους στάδια που εμπλέκονται στη διαδικασία σχηματισμού βιοφίλμ χαρακτηρίζονται από αυστηρά ρυθμιζόμενη αλληλουχία η οποία αντιστοιχεί σε μοναδικά μοτίβα παραγωγής πρωτεϊνών και εν γένει γονιδιακής έκφρασης. Ο σχηματισμός ξεκινάει με την επιφανειακή

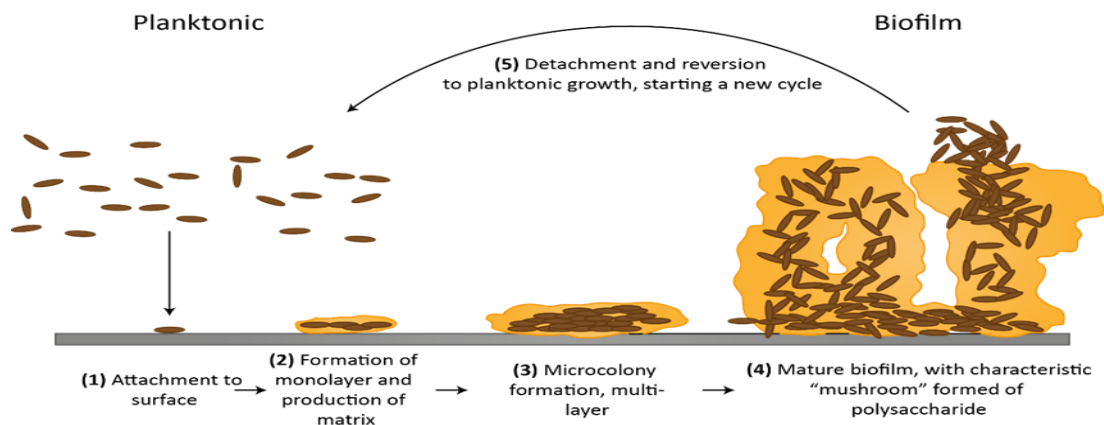
προσκόλληση στην επιφάνεια μερικών πλαγκτονικών κυττάρων μέσω ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων ενώ με τη πάροδο του χρόνου παρατηρείται συσσώρευση κυττάρων η οποία εν τέλει θα οδηγήσει στη δημιουργία μιας σταθερής μικροβιακής κοινότητας (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σχηματισμού βιομεμβράνης του βακτηρίου *P. Aeruginosa* (O' Toole G. et al., 2000)

Ο σχηματισμός βιοφίλμ μπορεί να θεωρηθεί μια κυκλική φυσικοχημική διαδικασία η οποία περιλαμβάνει διάφορα στάδια ανάπτυξης ξεκινώντας από πλαγκτονικούς οργανισμούς (Εικόνα 1.3). Στην πράξη, αυτά τα στάδια διακρίνονται:

- Στην έναρξη μέσω της προσκόλλησης στην επιφάνεια (attachment to surface)
- Στον σχηματισμό χημικών βαθμίδων και την παραγωγή της εξωκυττάριας μήτρας (formation of monolayer and production of matrix)
- Στη δημιουργία μικροαποικιών εντός του συστήματος της βιομεμβράνης (microcolony formation)
- Στην ωρίμανση (maturation) του βιοφίλμ όπου πλέον δεν υφίσταται άλλες φυσικοχημικές μεταβολές
- Στην διασπορά (detachment/dispersion) της δομής σε πλαγκτονικά κύτταρα έτσι ώστε να αρχίσει ένας νέος κύκλος ζωής [14].



Εικόνα 1.3: Βασικά στάδια σχηματισμού βιομεμβράνης (Πηγή: Vasudevan R. et al., 2014)

Κατά τη διάρκεια του μη αναστρέψιμου σταδίου που αφορά τη προσκόλληση των πλαγκτονικών πραγματοποιείται παράλληλα με σημαντικές διαφοροποιήσεις στη γονιδιακή έκφραση και λαμβάνει χώρα μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου σταδίου ανάπτυξης και σχηματισμού της βιομεμβράνης [15]. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα κύτταρα του βιοφίλμ να εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά και συμπεριφορές σε σχέση με τα αντίστοιχα πλαγκτονικά κύτταρα. Αυτό διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στην αυξημένη αντοχή των βιοφίλμ στο stress, τους αντιμικροβιακούς παράγοντες (αντιβιοτικά-αντιοξειδωτικά κ.α), της έλλειψης θρεπτικών συστατικών (starvation), της αφυδάτωσης, την υπεριώδη ακτινοβολία (UV-light), της επιβίωσης σε ανταγωνιστικά περιβάλλοντα αλλά και της αυξημένης παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών που σχετίζονται με τη δομή της εξωκυττάριας μήτρας [16]. Αντίθετα, κατά τη διάρκεια του σταδίου της ωρίμανσης της βιομεμβράνης, φαίνεται ότι οι περισσότερες φυσικοχημικές διεργασίες έχουν ολοκληρωθεί και η βιομεμβράνη πλέον χαρακτηρίζεται από συγκεκριμένη δομή, μέγεθος και σχήμα. Ωστόσο όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό ο σχηματισμός βιοφίλμ και οι μηχανισμοί που εμπλέκονται ποικίλουν ανάλογα με το είδος ή τα είδη που συμμετέχουν στο σχηματισμό.

1.1.1 Gram θετικά βακτήρια και πορεία σχηματισμού

Η ποικιλομορφία που παρουσιάζουν οι διάφοροι μικροοργανισμοί έχει κάνει πολλούς ερευνητές και μικροβιολόγους να πιστεύουν ότι ανάμεσα στα διάφορα είδη παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στα στάδια ανάπτυξης και σχηματισμού βιομεμβρανών. Όσον αφορά τα Gram θετικά βακτήρια, τα στάδια σχηματισμού βιοφίλμ διαφοροποιούνται ελαφρώς από το γενικό μοτίβο που παρουσιάστηκε νωρίτερα. Έτσι λοιπόν ο σχηματισμός ξεκινάει με την πρώιμη πρόσφυση στην επιφάνεια, συνεχίζει με την ενδοκυτταρική συσσωμάτωση και ολοκληρώνεται με την ωρίμανση και έπειτα λύση της βιομεμβράνης [17].

Η πρώιμη προσκόλληση μπορεί να γίνει τόσο σε βιοτικές όσο και αβιοτικές επιφάνειες και η σύζευξη τους βασίζεται σε δυνάμεις αλληλεπίδρασης. Σημαντικό ρόλο στην

αρχική προσκόλληση των μικροοργανισμών διαδραματίζουν συγκεκριμένες πρωτεΐνες που το κάθε είδος κατέχει. Αυτές οι πρωτεΐνες βοηθούν στη προσκόλληση κάτω από υγροποιημένες ή και ημι-βυθισμένες συνθήκες λειτουργώντας ως ένα “πλωτό χαλί” πάνω σε υγρές επιφάνειες [18]. Αυτό ενισχύει τα μέσα κίνησης που διαθέτουν τα Gram θετικά βακτήρια (μαστίγια και κροσσοί) τα οποία θα έρθουν πιο εύκολα σε επαφή με την αντίστοιχη επιφάνεια. Μελέτες στον *S. epidermidis* έδειξαν ότι η παρουσία πρωτεϊνών όπως η accumulation-associated protein (Aap) και η αυτολυσίνη AltE μεσολαβούν της σύνδεσης και προάγουν την περαιτέρω ανάπτυξη και διαίρεση των κυττάρων [19]. Επιπρόσθετα, από την ίδια μελέτη, τεκμηριώνεται ο ρόλος της DNAάσης τύπου I στην ενεργοποίηση της προσκόλλησης των βακτηριακών κυττάρων σε επιφάνειες όπως το γυαλί και το πλαστικό.

Μια από τις πιο κρίσιμες παράμετρος που σχετίζονται με τη ενδοκυτταρική συσσωμάτωση είναι ο εξωκυτταρικός πολυσακχαρίτης προσκόλλησης PIA (polysaccharide intercellular adhesin) ο οποίος είναι παρόμοιος με τον πολυσακχαρίτη N-ακετυλογλυκοζαμίνη [20]. Η έκφραση των γονιδίων του οπερονίου icaADBC ευνοεί τη βιοσύνθεση του PIA ο οποίος με τη σειρά του ελέγχεται και ρυθμίζεται από ένα πολυεπίπεδο σύστημα επικοινωνίας. Άλλες μελέτες συσχετίζουν τις πρωτεΐνες που αναφέρθηκαν παραπάνω, με τη δημιουργία ενός πολύπλοκου δικτύου (matrix), πρωτεϊνών και πολυσακχαριτών. Πιο πρόσφατες μελέτες φανέρωσαν την σημασία μιας από αυτές τις πρωτεΐνες δέσμευσης της εξωκυτταρικής μήτρας γνωστή και ως Embp (extracellular matrix binding protein), στο σχηματισμό των βιοφίλμ [21].

Οι μηχανισμοί που σχετίζονται με την ωρίμανση των βιοφίλμ των Gram θετικών βακτηρίων δεν έχουν ακόμη πλήρως διαλευκανθεί. Παρόλα αυτά πιστεύεται ότι εμπλέκονται αρκετά πεπτιδία. Κατά το στάδιο της ωρίμανσης η δομή είναι πλήρως σταθερή και ακέραιη. Στη πραγματικότητα, η τρισδιάστη δομή που παρουσιάζουν οι βιομεμβράνες είναι αποτέλεσμα των υδάτινων καναλιών που σχηματίζονται κατά τη πρώιμη προσκόλληση της βιομεμβράνης. Μεταξύ των άλλων σε αυτό το στάδιο (ωρίμανση) παρατηρείται αυξημένη διακυτταρική ενδοεπικοινωνία γνωστή και ως quorum sensing η οποία ρυθμίζεται από συγκεκριμένες ενώσεις γνωστές ως φαινολ-διαλυτές-μοντουλίνες (phenol-soluble-modulins, PSMs) [22]. Από μερικούς πιστεύεται ότι αυτές οι μοντουλίνες και κυρίως ο β τύπος τους (b type of PSMs) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό των καναλιών (υδατικών και μη) κατά την ωρίμανση.

Το τελευταίο στάδιο ενός βιοφίλμ αφορά την απελευθέρωση <<ώριμων>> πλέον βακτηριακών κυττάρων ξανά στο περιβάλλον έτσι ώστε να ξεκινήσει ένας νέος κύκλος ζωής και σχηματισμού βιοφίλμ [23]. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται αποκόλληση ή διασπορά

(detachment/dispersion). Η έναρξη του σταδίου μπορεί να οφείλεται σε πολλούς παράγοντες όπως η μηχανική καταπόνηση του βιοφίλμ από εξωτερικούς παράγοντες (τρίψιμο, απόξεση ή διάβρωση). Ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις η ίδια η βιομεμβράνη δίνει το τελικό σήμα για μετάβαση των βακτηριδίων σε άλλες περιοχές για αποικισμό. Αυτό σχετίζεται με αλλαγές στις συνθήκες του υπάρχοντος περιβάλλοντος όπως η μειωμένη παροχή θρεπτικών συστατικών, η αυξημένη παραγωγή παραπροϊόντων του δευτερογενούς μεταβολισμού (οξέα που μειώνουν το pH κ.α).

1.1.2 Gram αρνητικά βακτήρια και πορεία σχηματισμού

Στη προηγούμενη ενότητα αναφέρθηκαν μερικές μικρές διαφοροποιήσεις στο τρόπο σχηματισμού ενός βιοφίλμ από Gram θετικά βακτήρια. Τα Gram αρνητικά βακτήρια τείνουν περισσότερο προς την αρχική παραδοχή της αρχικά αναστρέψιμης πρόσδεσης στην επιφάνεια και αργότερα της μη αναστρέψιμης. Έτσι λοιπόν τα επιμέρους στάδια διακρίνονται σε: (α) την αρχική επαφή με την επιφάνεια, (β) την αναστρέψιμη προσκόλληση, (γ) τη μη αναστρέψιμη προσκόλληση (δ) την ωρίμανση του βιοφίλμ και (ε) την περαιτέρω λύση του για την έναρξη ενός νέου κύκλου ζωής [24].

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την αρχική επαφή με την επιφάνεια ως συνέπεια παθητικής κίνηση που οφείλεται σε βαρυτικές δυνάμεις. Παρόμοιοι είναι οι μηχανισμοί προσκόλλησης όπως και στα Gram θετικά βακτήρια. Παθογόνα Gram αρνητικά βακτήρια όπως η *E. coli* και η *Salmonella* βασίζονται στα μαστίγια που διαθέτουν έτσι ώστε να προσκολληθούν στις διάφορες επιφάνειες [25]. Σε αυτό το σημείο πρέπει να αναφερθεί ότι η απουσία κινητικότητα σε ορισμένα βακτήρια δεν αποτελεί αποτρεπτικό παράγοντα προσκόλλησης καθώς από έρευνες φαίνεται ότι και μη κινητά βακτήρια είναι εξίσου ικανά στο σχηματισμό βιοφίλμ. Άλλες μελέτες έχουν διερευνήσει τη σημασία του συζευγμένου πλασμιδίου και έχουν επιβεβαιώσει το ρόλο του υπέρ του παθογόνου. Στην ουσία, οι παραπάνω έρευνες αναδεικνύουν τη μεγαλύτερη σημασία έχουν τα πλασμίδια κατά το σχηματισμό των βιομεμβρανών παρά τα μαστίγια.

Παρόλο που η κινητικότητα των μαστιγίων θεωρείται δεδομένη, κατά την αναστρέψιμη προσκόλληση σημαντικότερο ρόλο διαδραματίζουν οι φυσικοχημικές και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των βακτηριακών κυττάρων και του υποστρώματος της επιφάνειας. Φαίνεται ότι η αναστρέψιμη προσκόλληση είναι ένα αποτέλεσμα των δυνάμεων που αναπτύσσονται ανάμεσα στη μικροβιακή κοινότητα και την επιφάνεια. Σημαντικό να τονιστεί είναι ότι κατά την αναστρέψιμη φάση τα βακτηριακά κύτταρα βρίσκονται ακόμη στην ελεύθερη υγρή τους κατάσταση (planktonic). Σε αυτό το στάδιο, σημαντικοί περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH αλλά και οι

ιδιότητες της ίδιας της επιφάνειας, επηρεάζουν τη μετέπειτα πορεία του σχηματισμού της βιομεμβράνης.

Κατά τη μη αναστρέψιμη φάση σχηματισμού του βιοφίλμ των περισσότερων Gram αρνητικών βακτηρίων σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν οι κροσσοί ή αλλιώς *fimbriae* [26]. Οι κροσσοί είναι ουσιαστικά εξαρτήματα που προεξέχουν από τα βακτηριακά κύτταρα και βοηθούν στη πρόσδεση σε επιφάνειες. Παρότι μοιάζουν με τα μαστίγια η μορφολογία τους και ο ρόλος τους είναι διαφορετική. Διαφορετικού τύπου κροσσοί είναι υπεύθυνοι για την αντίστοιχη πρόσδεση σε διαφορετικές επιφάνειες.

Κατά τη μελέτη του σχηματισμού βιοφίλμ των Gram αρνητικών βακτηρίων παρατηρήθηκε ότι όλα τα στάδια λάμβαναν χώρα εντός της εξωκυττάριας μήτρας. Η φάση της ωρίμανσης του βιοφίλμ εμφανίζεται μόλις ολοκληρωθεί η τρισδιάστη μορφή του και πλέον η μη αναστρέψιμη προσκόλληση είναι μόνιμη [23]. Όταν ο πληθυσμός των κυττάρων γίνει πολύ υψηλός ή υπάρχουν συνθήκες οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν τη δομή του βιοφίλμ, τότε τα μικροβιακά κύτταρα αποσπώνται και διασκορπίζονται στο περιβάλλον στη πλαγκτονική τους μορφή. Αυτός ο μηχανισμός είναι κυκλικός αφού τα ώριμα πλαγκτονικά κύτταρα συνδεθούν με νέες επιφάνειες και η ίδια διαδικασία ακολουθηθεί ξανά.

1.2 Δομή βιομεμβρανών

Μέχρι και την ολοκλήρωση του σταδίου της ωρίμανσης της βιομεμβράνης παρατηρούνται αλλαγές στη δομή της, οι οποίες σχετίζονται με το μέγεθος, τη ποσότητα και το είδος των μικροοργανισμών που συμμετάσχουν στο σχηματισμό καθώς και την αλληλεπίδραση με το περιβάλλον μέσω της επαφής με τη προσκολλημένη επιφάνεια. Έτσι λοιπόν, παρατηρείται συσσώρευση μη μικροβιακών συστατικών από το περιβάλλον και όσο η δομή πυκνώνει δημιουργείται ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη κύτταρο-κυτταρικής επικοινωνίας και ανταλλαγής γονιδίων. Αυτό συνεπάγεται αρχικά τη δημιουργία της εξωκυττάρια μήτρας και αργότερα της τρισδιάστατης δομής της βιομεμβράνης η οποία ολοκληρώνεται κατά το στάδιο της ωρίμανσης. Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου έχουν παρατηρηθεί μη δομημένες και επίπεδες βιομεμβράνες. Παρόλα αυτά οι περισσότερες εξ αυτών εμφανίζουν δομές τύπου μανιταριού ή τύπου πυλώνα ή τύπου πυραμίδας και χαρακτηρίζονται από συσσωματωμένες μικροαποικίες ανάμεσα στις οποίες δημιουργούνται κανάλια υδάτινης κυρίως φύσεως [27]. Η σημασία των καναλιών αυτών είναι πολύ μεγάλη καθώς δημιουργείται ένα πλωτό δίκτυο μεταφοράς θρεπτικών συστατικών, οξυγόνου, εξωγενών ουσιών αλλά και σημάτων επικοινωνίας σε όλο το μήκος και πλάτος του βιοφίλμ [28].

Μεγάλη φαίνεται να είναι η διαφοροποίηση της δομής των βιομεμβρανών ανάλογα με τη φύση της επιφάνειας αλλά και το περιβάλλον στο οποίο αναπτύχθηκαν. Φαίνεται ότι

βιομεμβράνες που αναπτύχθηκαν σε φυσικά περιβάλλοντα εμφάνισαν μεγαλύτερη πολυπλοκότητα από ότι αντίστοιχες που αναπτύχθηκαν σε πιο απομονωμένα περιβάλλοντα [29]. Όσον αφορά το μέγεθος τους αυτό ποικίλει ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται. Εάν το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται παρέχει επάρκεια θρεπτικών συστατικών για μεγάλο χρονικό διάστημα τότε σχηματίζονται μεγαλύτερες βιομεμβράνες σε μέγεθος απ' ότι σε λιγότερο πλούσια περιβάλλοντα.

1.3 Σύσταση βιομεμβρανών

Το πολυδύναμο οικοδόμημα ενός βιοφίλμ αποτελείται κυρίως από βακτηριακά κύτταρα, το στρώμα του εξωκυττάριου πολυμερούς και την επιφάνεια προσκόλλησης. Όπως φαίνεται και στο πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 1) το 5-10 % περίπου του όγκου της βιομεμβράνης αποτελείται από κύτταρα των βακτηρίων. Από πολλούς ερευνητές τα βιοφίλμ αντιμετωπίζονται ως μικροβιακές κοινότητες που περιέχουν παραπάνω από ένα είδος μικροοργανισμών. Μεγάλο μέρος αυτού του υπολειπόμενου ποσοστού αφορά την εξωκυττάρια μήτρα η οποία περικλείει τα βακτηριακά κύτταρα η οποία συγκρατεί μεγάλες ποσότητες νερού που μπορούν να φτάσουν έως και 90-95 % κάνοντας την επιφάνεια που καλύπτεται από τη βιομεμβράνη ζελατινώδη και γλιστερή [30].

Όσο πιο μεταξύ των άλλων η σύσταση της βιομεμβράνης περιλαμβάνει επιμέρους ενώσεις οι οποίες προσδίδουν η κάθε μια διαφορετικό ρόλο στη δομή και τη λειτουργία της. Για παράδειγμα μόρια DNA και RNA (1-2%) σχετίζονται με την αυξημένη γονιδιακή έκφραση και τον διαφορετικό φαινότυπο που τα βιοφίλμ παρουσιάζουν, συμπεριλαμβανομένης και της αυξημένης αντοχής στα αντιβιοτικά. Σημαντική θεωρείται και η συμβολή των πολυσακχαριτών από τους οποίους είναι κυρίως δομημένη η εξωκυττάρια μήτρα της βιομεμβράνης καθώς είναι υπεύθυνοι για τη συγκράτηση των μεγάλων ποσοτήτων νερού.

Πίνακας 1.1 Χημική σύσταση βιομεμβράνης (Πηγή: Timothy K. et al., 2007)

Συστατικά	% του όγκου της βιομεμβράνης
Μικροβιακά κύτταρα	2-5%
DNA-RNA	1-2%
Πολυσακχαρίτες	1-2%
Πρωτεΐνες	1-2% (συμπεριλαμβανομένων ενζύμων)
Νερό	90-95%

Όπως γίνεται εύκολα αντιληπτό η χημική σύσταση της βιομεμβράνης επηρεάζεται από το είδος των βακτηριακών που απαρτίζουν τη μικροβιακή κοινότητα, την εξωκυττάρια μήτρα και τη παρουσία θρεπτικών συστατικών. Πιο συγκεκριμένα φαίνεται ότι η μήτρα που

περικλείει το βιοφίλμ παρουσιάζει ξεχωριστή δομή η οποία ωστόσο είναι μείζονος σημασίας για τις διάφορες λειτουργίες που επιτελούνται.

1.4 Εξωκυττάρια μήτρα και πολυμερείς ουσίες (Extracellular polymeric substances, EPS)

Ο ρόλος της εξωκυττάριας πολυμερούς μήτρας μέσα σε μια βιομεμβράνη είναι πολλαπλός. Σε πρώιμο στάδιο (αναστρέψιμη σύνδεση) ενώσεις που παράγονται από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς και διοχετεύονται στη μήτρα ενδέχεται να επηρεάσουν το σχηματισμό του βιοφίλμ. Τέτοιες ενώσεις μπορεί να είναι πρωτεϊνικής κολλώδους προέλευσης που απαντώνται σε ορισμένα εντεροβακτηριοειδή. Η δράση τους στο σχηματισμό ποικίλει και ενδεχομένως ευθύνεται κυρίως με το τρόπο προσκόλλησης στην επιφάνεια. Από μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κυρίως σε στελέχη της εντεροαιμοραγικής *E. coli* φαίνεται ότι η παραγωγή τους έδρασε ευεργετικά στο σχηματισμό βιοφίλμ στο ανοξείδωτο ατσάλι και το πολυεστυρένιο.

Όσο μελετάται σε βάθος η δομή και η σύσταση των βιομεμβρανών τόσο πιστεύεται ότι αυτή η εξωκυττάρια μήτρα αποτελεί τα θεμέλια πάνω στα οποία σχηματίζεται η τρισδιάστατη δομή του βιοφίλμ κατά τη φάση της μη αναστρέψιμης προσκόλλησης και της ωρίμανσης [32]. Η διαθρωτική υποστήριξη και η απαραίτητη δομική ακεραιότητα που παρέχει, επιτυγχάνεται μέσω του εγκλωβισμού θρεπτικών συστατικών και άλλων οργανικών ενώσεων τα οποία αποτελεσματικά συγκρατεί με το νερό μέσω δεσμών υδρογόνου. Αν και οι ιδιότητες του εξωκυτταρικού πολυμερούς ποικίλουν ανάλογα τη σύνθεση, το στάδιο της ωρίμανσης της βιομεμβράνης και το περιβάλλον ο βασικός στόχος παραμένει ο ίδιος και δεν είναι άλλος από την ακινητοποίηση των βακτηριακών κυττάρων κρατώντας τα σε κοντινή επαφή μεταξύ τους επιτρέποντας έντονες αλληλεπιδράσεις.

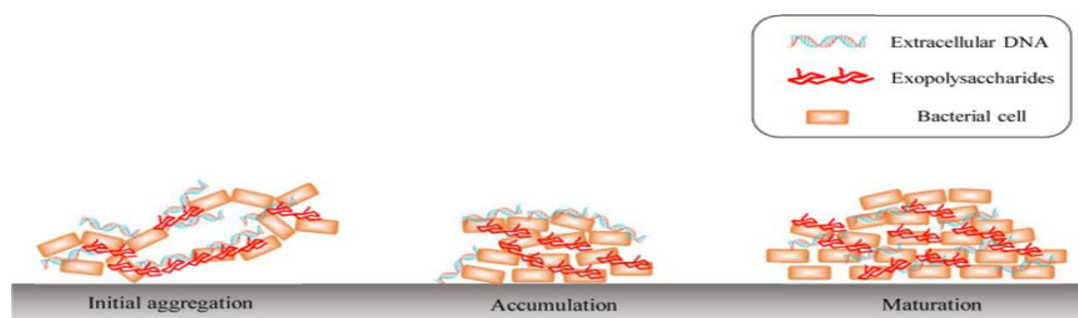
Αυτή η βασική λειτουργία της μήτρας πυροδοτεί και μια σειρά από βιοχημικές και μεταβολικές αντιδράσεις οι οποίες είναι εξίσου σημαντικές. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η κύτταρο-κυτταρική επικοινωνία (quorum sensing) και άλλοι μηχανισμοί συνεργηστικής μικροσύνδεσης. Λόγω της κατακράτησης εξωκυτταρικών ενζύμων δημιουργείται ένα ευέλικτο εξωτερικό πεπτικό σύστημα το οποίο είναι ικανό να απομονώνει διαλυμένα ή μη θρεπτικά συστατικά επιτρέποντας τα να χρησιμοποιηθούν ως ενεργειακές πηγές. Το ίδιο σύστημα επίσης λειτουργεί ως ένα κέντρο ανακύκλωσης διατηρώντας όλα τα συστατικά των κυττάρων που έχουν υποστεί λύση [33]. Αυτό είναι εξαιρετικά σημαντικό καθώς περιλαμβάνει και το DNA το οποίο μπορεί να αντιπροσωπεύει μια δεξαμενή γονιδίων και να σχετίζεται με την αυξημένη ανθεκτικότητα σε διάφορους παράγοντες που οι βιομεμβράνες παρουσιάζουν.

1.4.1 Σύσταση της εξωκυττάριας πολυμερούς μήτρας

Σύμφωνα με κάποιες έρευνες η εξωκυττάρια μήτρα ονομάστηκε ως «σκοτεινή ύλη των βιοφίλμ» εξαιτίας του μεγάλου αριθμού και μήκους των βιοπολυμερών της, στοιχεία που καθιστούν την περαιτέρω ανάλυση της δύσκολη [34]. Η σύσταση της μήτρας ποικίλει σημαντικά ανάλογα με τους εμπλεκόμενους μικροοργανισμούς, τις υφιστάμενες δυνάμεις συγκράτησης, τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών. Οι πρώτες αναφορές περιέγραφαν αυτή τη μήτρα ως εξωκυτταρικό πολυσακχαρίτη ή κοινώς γλυκοκάλυκα, κάτι που ωστόσο άλλαξε δεδομένου ότι περιέχει πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια και άλλα βιομερή, καθένα από τα οποία εξυπηρετεί συγκεκριμένες λειτουργίες.

1.4.1.1 Έξω-πολυσακχαρίτες (Exopolysaccharides)

Οι πολυσακχαρίτες αποτελούν ένα σημαντικό μέρος της EPS μήτρας. Κατά κύριο λόγο είναι μεγάλα σε μήκος (μακρομόρια), γραμμικά ή διακλαδισμένα και μοριακή μάζα που μπορεί να ξεπεράσει ακόμη και τα $2 \cdot 10^6$ Daltons [35]. Σύμφωνα από τις παρατηρήσεις που προκύπτουν από ηλεκτρονικά μικροσκόπια εντοπίζονται τυλιγμένα ως λεπτές κλωστές γύρω από τις κυτταρικές επιφάνειες με τις οποίες όσο η βιομεμβράνη ωριμάζει, αναπτύσσουν ολοένα και πιο σύνθετα δίκτυα (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Ρόλος των εξω-πολυσακχαριτών της EPS μήτρας στα διάφορα στάδια σχηματισμού των βιομεμβρανών (Πηγή: Peng N et al., 2020)

Παρατηρείται ότι περισσότεροι από αυτούς είναι έτερο-πολυσακχαρίτες παρά όμο-πολυσακχαρίτες, συμπεριλαμβανομένων των φρουκτανών, των γλυκανών και της κυτταρίνης που παράγονται από διάφορα βακτήρια όπως αυτά που ανήκουν στην οικογένεια των στρεπτόκοκκων και των εντεροβακτηριοειδών [36]. Μια σημαντική παρατήρηση αφορά τη πολικότητα τους καθώς παρουσία ουρονικών οξέων (αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις πυροσταφυλικού) μπορούν να αποτελούνται τόσο από ουδέτερα όσο και φορτισμένα τμήματα γλυκοζών και μπορούν να περιέχουν οργανικά ή και ανόργανα συστατικά τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τις ιδιότητες τους.

Η σύσταση τους διαφοροποιείται ακόμη και ανάμεσα σε στελέχη του ίδιου είδους και περιλαμβάνει κατά κύριο λόγο το αλγινικό, τη ξανθάνη και το κολλανικό οξύ [37]. Το αλγινικό θεωρείται από τους πιο μελετημένους έξω-πολυσακχαρίτες καθώς απαντάται στις περισσότερες μήτρες βιομεμβρανών. Ο συγκεκριμένος πολυσακχαρίτης εμπλέκεται στην εγκαθίδρυση των μικροαποικιών στα πρώιμα στάδια του σχηματισμού βιοφίλμ αλλά είναι επίσης υπεύθυνος για τη δομική σταθερότητα των ώριμων βιοφίλμ. [38]

Παρόλα αυτά σε κάποιες περιπτώσεις είτε λόγω απουσίας ουρονικών οξέων είτε λόγω απουσίας των γονιδίων της σύνθεσης του αλγινικού οι έξω-πολυσακχαρίτες σε μορφή pellet (pellicle polysaccharides, Pel) και τοπικής σύνθεσης (polysaccharides synthesis locus, Psl) είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό των βιομεμβρανών [39]. Οι Pel είναι πολυσακχαρίτες πλούσιοι σε γλυκόζη ενώ οι Psl αποτελούνται από επαναλαμβανόμενους πεντο-σακχαρίτες d-μαννόζης, d-γλυκόζης και l-ραμνόζης. Οι Pel είναι απαραίτητοι κατά τη δημιουργία καναλιών υγρού-βιοφίλμ ενώ οι Psl εμπλέκονται με την προσκόλληση του βιοφίλμ στις βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες αλλά και στη διατήρηση της τρισδιάστατης δομής τους [40].

1.4.1.2 Εξωκυτταρικές πρωτεΐνες (Extracellular proteins)

Στις εξωκυτταρικές πρωτεΐνες περιλαμβάνονται γενικά: (α) τα ένζυμα, (β) τα ένζυμα που αφορούν τη λειτουργία της EPS μήτρας αλλά και (γ) δομικές πρωτεΐνες. Κατά καιρούς έχουν ανιχνευθεί στα βιοφίλμ διάφορα εξωκυττάρια ένζυμα τα οποία εμπλέκονται κυρίως στην αποδόμηση βιο-πολυμερών. Τα υποστρώματα αυτών των ενζύμων περιλαμβάνουν υδατοδιαλυτά πολυμερή (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, και νουκλεϊκά οξέα) και αδιάλυτες στο νερό ενώσεις (κυτταρίνη, χιτίνη και λιπίδια) όπως επίσης και οργανικά ενώσεις που εγκλωβίζονται στη μήτρα [41].

Όπως ήδη αναφέρθηκε αυτά τα ένζυμα δημιουργούν ένα πολυδύναμο πεπτικό σύστημα το οποίο εξυπηρετεί τις ενεργειακές ανάγκες του βιοφίλμ. Παρόλα αυτά κάποια επίσης εμπλέκονται στην αποικοδόμηση της ίδιας της EPS της μήτρας όπου απαιτείται έτσι ώστε να διευκολυνθεί η προσκόλληση της με την επιφάνεια. Εξαιρετικά σημαντικό για το σχηματισμό και την επιβίωση ενός βιοφίλμ θεωρείται και η ικανότητα αυτών των ενζύμων να διασπούν συνθετικά πολυμερή όπως διάφοροι πλαστικοποιητές (φθαλικά) τα οποία σχετίζονται με την φύση της επιφάνειας προσκόλλησης [42]. Τέλος, στην περίπτωση σχηματισμού βιοφίλμ σε ένα ξενιστή όπως ο άνθρωπος, μερικά από αυτά τα ένζυμα αποτελούν μολυσματικό παράγοντα κατά τη διάρκεια της μόλυνσης.

Τα ένζυμα που αφορούν τη λειτουργία της EPS μήτρας έχουν κυρίως προστατευτικό ρόλο. Σε ιδιαίτερες περιπτώσεις όπως για παράδειγμα έλλειψης θρεπτικών συστατικών,

μπορούν ενδεχομένως να διασπάρουν ενώσεις της μήτρας στοχεύοντας κυρίως σε ενώσεις που έχουν παραχθεί από τους μικροοργανισμούς και βρίσκονται αποθηκευμένες σε αυτή [43]. Τέτοια παραδείγματα ενζύμων είναι η δεξτράνη και η ινουλίνη. Οι πολυσακχαρίτες του βιοφίλμ φαίνεται να διασπώνται κυρίως από υδρολάσες και λυάσες αλλά η αποικοδόμηση τους είναι σχετικά αργή.

Η τελευταία κατηγορία πρωτεϊνών που περιέχονται στην EPS μήτρα αφορά αυτές της μη ενζυμικής φύσεως. Βασικότερες εξ αυτών θεωρούνται οι πρωτεΐνες που προσδένονται σε πολυσακχαρίτες οι οποίες ονομάζονται λεκτίνες [44]. Οι λεκτίνες διαδραματίζουν σπουδαίο ρόλο στο σχηματισμό και τη σταθερότητα του του οικοδομήματος που δημιουργείται κυρίως από τους έξω-πολυσακχαρίτες και στην ουσία αποτελούν το μέσο σύνδεσης μεταξύ των βακτηριακών επιφανειών και της EPS μήτρας. Άλλη μια ομάδα εξωκυτταρικών πρωτεϊνών είναι αυτές που σχετίζονται με τη προσκόλληση σε επιφάνειες. Τέτοιες μπορεί να είναι οι πρωτεΐνες προσκόλλησης που διαθέτει ο *S. aureus* (Bar proteins). Γενικά, πρόκειται για πρωτεΐνες μεγάλου μοριακού βάρους οι οποίες ενισχύουν το σχηματισμό βιοφίλμ σε πολλά είδη βακτηρίων [45]. Ακόμη μια κατηγορία πρωτεϊνικής φύσεως είναι τα αμυλοειδή. Αν και ο ρόλος των αμυλοειδών δεν έχει διευκρινιστεί πιστεύεται ότι εμπλέκονται στη πρόσφυση σε αβιοτικές κυρίως επιφάνειες αλλά και ευθύνονται για ένα είδος κυτταροτοξικότητας [46].

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό βιομεμβρανών

Όπως είναι προφανές ο σχηματισμός βιοφίλμ είναι μια φυσικοχημική διαδικασία η οποία μπορεί να επηρεαστεί από πολλούς παράγοντες γεγονός που δεν επιτρέπει γενικεύσεις ως προς την ερμηνεία των εμπλεκόμενων μηχανισμών. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να χωρισθούν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες και αφορούν: (α) το περιβάλλον ανάπτυξης του βιοφίλμ, (β) την επιφάνεια προσκόλλησης και (γ) το είδος των βακτηριακών κυττάρων. Από τους πλέον σημαντικότερους θεωρούνται οι ιδιότητες της επιφάνειας προσκόλλησης και η εναπόθεση οργανικού υλικού πριν την πρόσφυση [47-48].

Ωστόσο, όσον αφορά τα τρόφιμα, οι παράγοντες που επηρεάζουν το σχηματισμό των βιομεμβρανών είναι περισσότερο πολύπλοκοι δυσχεραίνοντας την κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών σχηματισμού βιοφίλμ. Πιο συγκεκριμένα, πέραν των παραγόντων που ήδη αναφέρθηκαν, στα επόμενα κεφάλαια θα αναλυθούν περαιτέρω ο ρόλος, η φύση και το είδος των τροφίμων τα οποία υπό μια έννοια δρουν ως και εν δυνάμει υποστρώματα ανάπτυξης των βιομεμβρανών, της εμπλεκόμενης μικροχλωρίδας που απαρτίζει κάθε κατηγορία προϊόντων αλλά και των ιδιοτεροτήτων που χαρακτηρίζουν τη βιομηχανία τροφίμων και αφορούν τόσο τις τεχνολογίες παραγωγής όσο και τις τεχνικές καθαρισμού.

1.5.1 Περιβάλλον ανάπτυξης του βιοφίλμ

Ανάμεσα στους παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα σχηματισμού αλλά και τη δομή βιομεμβρανών είναι η θερμοκρασία, το pH, η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά, το ποσοστό υγρασίας και η ροή του. Η διαθεσιμότητα σε θρεπτικά συστατικά μπορεί να αποτελέσει σε αποτρεπτικό παράγοντα για τον σχηματισμό ή μπορεί να είναι ένα αίτιο πρόωρης διασποράς των ώριμων κυττάρων. Παράμετροι όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα, η οξύτητα και το ποσοστό υγρασίας σχετίζονται άμεσα με το είδος των μικροοργανισμών που πρόκειται να προσδεθούν στην επιφάνεια [49].

Παρόλα αυτά, επειδή οι περισσότερες μικροβιακές κοινότητες βιοφίλμ χαρακτηρίζονται από πολλά διαφορετικά βακτηριακά είδη και αυξημένη αντοχή σε πολλούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, έρευνες δείχνουν ότι ο σχηματισμός τους ευνοείται όσο αυξάνεται η ταχύτητα ροής του υγρού μέσου, η θερμοκρασία του και η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών σε αυτό [50]. Όσον αφορά τη δομή της βιομεμβράνης, υψηλές ταχύτητες του υγρού οδηγούν σε λεπτότερες και περισσότερο συμπαγείς δομές, ενώ οι χαμηλές ταχύτητες, η αυξημένη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών και η παρουσία ετερογενών πληθυσμών μικροοργανισμών, σε παχύτερες βιομεμβράνες.

1.5.2 Επιφάνεια προσκόλλησης

Φαίνεται ότι οι φυσικοχημικές και τοπογραφικές ιδιότητες της επιφάνειας επηρεάζουν είτε καθορίζουν τη δομή και το σχηματισμό βιομεμβρανών αλλά και την απορρόφηση και διανομή οργανικών ενώσεων [51]. Ιδιότητες όπως η τραχύτητα, το υλικό κατασκευής, το ποσοστό υγρασίας (το οποίο καθορίζει και την υδροφοβικότητα), η ευπάθεια στη φθορά και η ευκολία ή όχι καθαρισμού επηρεάζουν την ικανότητα των βακτηριακών κυττάρων να προσκολλώνται ή όχι σε αυτές καθορίζοντας έτσι και το επίπεδο υγιεινής τους. Συνοπτικά μπορεί να λεχθεί ότι η προσκόλληση επιτελείται ευκολότερα σε επιφάνειες τραχείες, υδρόφοβες και καλυμμένες με το οργανικής φύσης στρώμα από το περιβάλλον. Αυτό έχει τεράστια σημασία κατά το σχηματισμό βιοφίλμ στις διάφορες βιομηχανίες τροφίμων οι οποίες με τα κατάλληλα μέσα θα μπορούσαν να περιορίσουν τέτοια φαινόμενα. Κάθε μικροοργανισμός αντιδρά και αναπτύσσεται διαφορετικά σε μια επιφάνεια. Λαμβάνοντας υπόψη και την πολλές φορές άμεση επαφή των τροφίμων στις επιφάνειες αυτές ο σχηματισμός βιομεμβρανών γίνεται ακόμη πιο περίπλοκος να ερμηνευθεί.

Τα υλικά που χρησιμοποιούνται κυρίως στις βιομηχανίες τροφίμων περιλαμβάνουν το ανοξείδωτο ατσάλι, το πλαστικό και το γυαλί. Κάθε υλικό φαίνεται να αλληλοεπιδρά

διαφορετικά με τα διάφορα είδη βακτηρίων γεγονός που ευθύνεται κυρίως στο ποσοστό τραχύτητας των επιφανειών. Για παράδειγμα, *E. coli*, *L. monocytogenes* και *Y. enterocolitica* φαίνεται να αναπτύσσονται πιο εύκολα σε λείες επιφάνειες όπως είναι το ανοξειδωτο ατσάλι [52]. Σε μια άλλη μελέτη στην οποία πραγματοποιήθηκε τριάντα συνεχόμενες φορές καθαρισμός σε επιφάνεια από ανοξειδωτο ατσάλι φανέρωσε την συσσώρευση οργανικού υλικού αναδεικνύοντας ότι σημαντική παράμετρος κατά τον έλεγχο ανάπτυξης βιομεμβρανών είναι ο αποτελεσματικός καθαρισμός.

1.5.3 Βακτηριακά κύτταρα

Όπως ήδη έχει αναφερθεί οι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί επηρεάζουν άμεσα τη δομή και το σχηματισμό της βιομεμβράνης ενώ σχετίζονται και με μια σειρά από διαφορετικές ιδιότητες-πλεονεκτήματα. Κυριότερες παράμετροι εκτός του είδους το οποίο αναλύθηκε λεπτομερώς προηγουμένως, αφορούν τη μορφολογία τους (κινητικότητα), τον τρόπο επικοινωνίας τους αλλά και τον διαφορετικό φαινότυπο [52]. Σύμφωνα με τα έως τώρα επιστημονικά δεδομένα από το χώρο της τεχνολογίας και παραγωγής των τροφίμων όσο και από άλλες επιδημιολογικές μελέτες, κυριότερος «εκφραστής» του σχηματισμού βιομεμβρανών είναι η *Listeria monocytogenes* με μεγάλη έμφαση να δίνεται σε συγκεκριμένες μεθόδους καθαρισμού που αφορούν τα λεγόμενα “void spaces” ή αλλιώς κενούς χώρους. Άλλοι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί αφορούν την εκάστοτε αλλοιογόνο χλωρίδα και τα φυσικώς απαντώμενα βακτήρια που εντοπίζονται σε κάθε τρόφιμο, των οποίων η βιβλιογραφική ανασκόπηση πραγματοποιείται στο επόμενο κεφάλαιο ή περιγράφεται αναλυτικότερα στις εμπλεκόμενες αλληλεπιδράσεις μεταξύ μικροοργανισμών (Κεφάλαια 2-3).

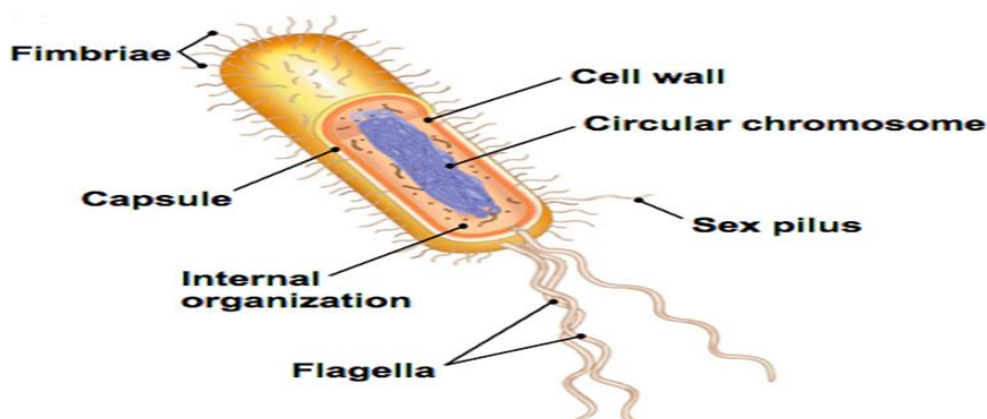
1.5.3.1 Μορφολογία βακτηριακών κυττάρων

Το σχήμα, το μέγεθος και δομή των διάφορων βακτηριακών κυττάρων φαίνεται ότι επηρεάζουν σε μικρό βαθμό το σχηματισμό της βιομεμβράνης και τις ιδιότητες της. Ωστόσο, η κινητικότητα κάθε είδους και η μορφολογία των επιφανειακών του αποφύσεων φαίνεται ότι έχουν μεγάλο αντίκτυπο ιδιαίτερα στα πρώιμα στάδια της προσκόλλησης των βακτηριακών κυττάρων στην επιφάνεια. Η κίνηση των βακτηρίων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω κινούμενων επιφανειακών αποφύσεων όπως τα εξωτερικά μαστίγια ή τα περιπλασματικά μαστίγια (αξονικά ινίδια) αλλά και με μη κινούμενες επιφανειακές αποφύσεις όπως είναι οι σμήριγγες (pili), οι κροσσοί (fimbriae) και προσθήκες [53].

Τα μαστίγια βοηθούν τα βακτήρια στη κίνηση ή και τη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων. Από πολλούς θεωρούνται σημαντικά κατά το πρώτο στάδιο της επαφής/πρόσδεσης έτσι ώστε να προσεγγιστεί ευκολότερα η επιφάνεια προσκόλλησης

ξεπερνώντας τις απωθητικές δυνάμεις που δημιουργούνται. Εκτός των άλλων η κινητικότητα που προσδίδουν σε όλη τη δομή της βιομεμβράνης βοηθά στη διεύρυνση του μεγέθους της και της εν γένει ανάπτυξης της. Όσον αφορά τα περιπλασματικά μαστίγια, αυτά βρίσκονται εσωτερικά του κυτταρικού τοιχώματος και της εξωτερικής μεμβράνης σε Gram θετικά βακτήρια ενώ η κινητικότητα τους οφείλεται σε κυματοειδείς συστολές ή στροφές [54].

Στη περίπτωση των βακτηρίων που διαθέτουν περιορισμένη κινητικότητα ενεργοποιούνται μη κινούμενες επιφανειακές αποφύσεις έτσι ώστε να διευκολυνθεί η πρόσδεση με την επιφάνεια [55]. Οι σμήριγγες (pili) είναι τριχοειδείς εκφύσεις στην επιφάνεια μερικών αρνητικών Gram βακτηρίων με κυλινδρική δομή και εσωτερικό αυλό ενώ δομούνται κυρίως από πιλίνη, υδατάνθρακες και φωσφορικά άλατα. Αντίθετα, οι κροσσοί (fimbriae) ανιχνεύονται τόσο σε Gram αρνητικά βακτήρια όσο και Gram θετικά και περισσότερα σε αριθμό τα fimbriae είναι μικρότερα σε μέγεθος και μήκος από τα pili (Εικόνα 1.5). Ο ρόλος κάθε μιας από αυτές τις μη κινούμενες αποφύσεις είναι διαφορετικός και στις μεν σμήριγγες (στα Gram αρνητικά) σχετίζεται με τη σύζευξη ενώ οι κροσσοί με τη προσκόλληση [56].



Εικόνα 1.5: Απεικόνιση σμηρίγγων και κροισσών σε ένα Gram αρνητικό βακτήριο (Πηγή: <https://microbiologynotes.com/differences-between-fimbriae-and-pili/>, τελευταία πρόσβαση: 6/12/2020)

1.5.3.2 Κυτταρο-κυτταρική επικοινωνία (quorum sensing)

Κατά τη διάρκεια του σχηματισμού της βιομεμβράνης εκτός των δομικών διαφοροποιήσεων και της αυξημένης γονιδιακής έκφρασης παρατηρείται και αυξημένη επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων μέσα από μηχανισμούς χημικών σημάτων. Τα σήματα αυτά συγκεντρώνονται τοπικά, έξω από το κύτταρο και όταν η συγκέντρωσή τους φθάσει ένα οριακό σημείο, τότε γίνεται «αντιληπτό» από τα κύτταρα ότι ο πληθυσμός έχει φθάσει σε μια ελάχιστη πυκνότητα (quorum) και αρχίζει η διαδικασία τροποποίησης της έκφρασης γονιδίων [57]. Η ανίχνευση

και μορίων και των αντίστοιχων σημάτων γίνεται με συγκεκριμένο τρόπο από ειδικά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους που ονομάζονται αυτοεπαγωγείς [58].

Όταν αυξηθεί ο αριθμός (πυκνότητα) των μικροβιακών κυττάρων τότε αυξάνεται και η συγκέντρωση του αυτοεπαγωγέα τόσο εξωτερικά όσο και μέσα στο κύτταρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την σύνδεση του αυτοεπαγωγέα με συγκεκριμένους μεταγραφικούς παράγοντες του γονιδιώματος του κυττάρου σχηματίζοντας ένα σύμπλεγμα. Από αυτή τη στιγμή και έπειτα πυροδοτείται η αυξημένη γονιδιακή έκφραση η οποία σχετίζεται με την αυξημένη αντοχή στα αντιβιοτικά αλλά και την αυξημένη μολυσματικότητα [59]. Ανάλογα με το είδος του βακτηρίου (Gram θετικά ή αρνητικά) παρατηρούνται διαφορές σε αυτή τη διακυτταρική επικοινωνία.

Τα μόρια που ευθύνονται για τη μεταφορά αλλά και τον εντοπισμό σημάτων στα μεν Gram θετικά βακτήρια ονομάζονται φερομόνες ενώ στα Gram αρνητικά βακτήρια είναι μόρια λακτόνης [59-60]. Με την βοήθεια αυτών των μορίων για τον εντοπισμό σημάτων, τα βακτήρια είναι σε θέση να αντιληφθούν το σχετικό πλήθος τόσο των ομοειδών αλλά κυρίως των διαφορετικών κυττάρων καθιστώντας τα ανθεκτικά και σε ανταγωνιστικά περιβάλλοντα.

1.5.3.3 Νέος φαινότυπος

Ο νέος φαινότυπος που εμφανίζουν τα βακτήρια μέσω από την ενεργοποίηση συγκεκριμένων γονιδίων σχετίζεται άμεσα και με τη διακυτταρική επικοινωνία. Ο νέος φαινότυπος που οι περισσότερες βιομεμβράνες παρουσιάζουν συνήθως τις καθιστά πιο ανθεκτικές και περισσότερο επικίνδυνες ιδιαίτερα στη περίπτωση που σχετίζονται με λοιμώξεις στον άνθρωπο [61]. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που προσφέρουν στη βιομεμβράνη συμπεριλαμβάνουν:

- Τη χρήση των διάφορων θρεπτικών συστατικών με τον καλύτερο δυνατό τρόπο
- Την καλύτερη προστασία από αντιμικροβιακούς παράγοντες ή αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή
- Την ενίσχυση των μηχανισμών προσκόλλησης και σύζευξης με της ρύθμισης της ανταλλαγής γενετικού υλικού
- Την καλύτερη δόμηση της βιομεμβράνης μέσω της ταχύτερης επικοινωνίας και ανταλλαγής θρεπτικών συστατικών
- Σε ορισμένες περιπτώσεις αρκετών Gram αρνητικών βακτηρίων ενισχύουν τους αμυντικούς μηχανισμούς της ίδιας της βιομεμβράνης μέσω της παραγωγής ενδοτοξινών

1.6 Γενικές επιπτώσεις βιομεμβρανών

Η αναγκαιότητα περαιτέρω μελέτης με στόχο την εύρεση καταλληλότερων μεθόδων καθαρισμού ή και απομάκρυνσης φαίνεται από το γεγονός ότι η ύπαρξη των βιομεμβρανών

σε συνδυασμό με τον διαφοροποιημένο φαινότυπο και τα διαφορετικά χαρακτηριστικά απασχολεί τόσο τις βιομηχανίες τροφίμων όσο και μια σειρά από άλλους διαφορετικούς τομείς συμπεριλαμβανομένων εκείνων της υγείας. Για παράδειγμα τα βιοφίλμ που σχηματίζονται και αναπτύσσονται σε μηχανικές επιφάνειες όπως αυτές των τροφίμων ή και των δικτύων ύδρευσης προκαλούν το φαινόμενο της βιολογικής ρύπανσης (biofouling). Το biofouling στις βιομηχανίες τροφίμων μπορεί να έχει τόσο μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις καθώς σχετίζεται με μειωμένη απόδοση, απώλειες θερμότητας και φθορές σε μηχανολογικό εξοπλισμό όσο και επιπτώσεις στην υγεία καθώς ευνοεί την επιβίωση μικροοργανισμών συμπεριλαμβανομένων και αρκετών παθογόνων όπως η *Listeria*. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό παράδειγμα που επιβεβαιώνει αυτή την ενεργειακή σπατάλη και σχετίζεται με τη παρουσία βιομεμβρανών αποτελούν τα κύττα των πλοίων τα οποία φαίνεται ότι καταναλώνουν έως και 30% παραπάνω καύσιμη ύλη έτσι ώστε να ξεπεραστεί η ιξώδης έλξη που επιβάλλεται από τους ρύπους των μικροοργανισμών [62]. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, το οικονομικό αντίκτυπο που δημιουργεί ο ανεπιθύμητος σχηματισμός των βιομεμβρανών καταδεικνύεται και από το γεγονός ότι οι κυβερνήσεις μαζί με τις βιομηχανίες δαπανούν περισσότερα από έξι εκατομμύρια δολάρια ετησίως για επιδιορθώσεις και προληπτικές δραστηριότητες συντήρησης, στοιχεία που υπογραμμίζουν ακόμη περισσότερο την ανάγκη εύρεσης νέων μεθόδων ελέγχου, πρόληψης και απομάκρυνσης τους. Κατά καιρούς έχει γίνει αναφορά για βιομηχανικά προβλήματα σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς περισσότεροι εκ των οποίων παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2).

Πίνακας 1.2 Κυριότερα παραδείγματα προβλημάτων λόγω σχηματισμού βιομεμβρανών (Πηγή: Μελαμπιανάκη 2007)

Βιομηχανία	Πρόβλημα
Μεταφορά υγρών-δίκτυο ύδρευσης	Απόφραξη-διάβρωση σωλήνων/μειωμένη ροή
Τροφίμων	Επιβίωση μικροοργανισμών
Θέρμανση-Ψύξη	Μειωμένη απόδοση
Παρασκευή αλεύρου-ζάχαρης	Εμπλοκή στη διαδικασία
Υφαλα πλοίων	Αύξηση κατανάλωσης καυσίμων

Ωστόσο, πέραν των βιομηχανιών τροφίμων φαίνεται ότι μεγάλες είναι και οι προκλήσεις που σχετίζονται με το σχηματισμό βιομεμβρανών στη σύγχρονη ιατρική περίθαλψη. Σύμφωνα με ανεξάρτητους φορείς αλλά και με το Εθνικό Σύστημα Υγείας της Αμερικής, τα βιοφίλμ ευθύνονται για περισσότερο από 80% των μικροβιακών λοιμώξεων και περισσότερο από 60% των νοσοκομειακών λοιμώξεων [63-64]. Αυτές οι λοιμώξεις

σχετίζονται με το σχηματισμό βιοφίλμ κυρίως μέσω επιμόλυνσεων σε αποστειρωμένα βιοϊατρικά υλικά και συσκευές (καθετήρες κ.α). Εκτιμάται ότι στην Αμερική, οι κλινικές περιπτώσεις που αφορούν τα διάφορα βιομεμβρανών φθάνουν έως και τα δυο εκατομμύρια με γύρω στις 150 χιλιάδες από αυτές να οδηγούν στο θάνατο, ενώ το κόστος αντιμετώπισης τους σε άμεσες δαπάνες ξεπερνά τα 18 εκατομμύρια δολάρια [65].

1.7 Αξιοποίηση σχηματισμού βιομεμβρανών

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον σχετικά με τους πιθανούς τρόπους κατά τους οποίους θα μπορούσε να αξιοποιηθεί η παρουσία φυσικών κυρίως βιομεμβρανών προς όφελος συγκεκριμένων διαδικασιών. Αυτό το εγχείρημα προϋποθέτει πολύ καλή γνώση τόσο των διαδικασιών που εμπλέκονται στην αξιοποίηση όσο και των μηχανισμών σχηματισμού των βιομεμβρανών. Αρχικά, οι πρώτες προσπάθειες αξιοποίησης βιομεμβρανών αφορούσαν την εξυγίανση νερού ή την επεξεργασία υγρών αποβλήτων με τη βοήθεια βιοαντιδραστήρων. Πολλές από αυτές τις βιομεμβράνες μέσα από κατάλληλες παρεμβάσεις μπορούν να λειτουργήσουν ως «φίλτρα» δέσμευσης και αποτοξικοποίησης, μιας δράσης που από πολλούς παρομοιάζεται με την ικανότητα αποικοδόμησης που παρουσιάζουν τα μανιτάρια στη φύση. Άλλες εφαρμογές αφορούν την απομάκρυνση βαρέων μετάλλων ή την ανάκτηση μετάλλων από χαμηλής ποιότητας μέταλλευμα.

Ένα ακόμη τολμηρό εγχείρημα αφορά τη βιομετατροπή ανεπιθύμητων βιοφίλμ σε «ευεργετικά» η οποία επιτυγχάνεται μέσω του χειρισμού και της ρύθμισης παραγόντων που επηρεάζουν το σχηματισμό τους, όπως οι επιφάνειες πρόσφυσης, των περιβαλλοντικών συνθηκών αλλά και των ενζύμων-γονιδίων στα πλαίσια της κυτταροκυτταρικής επικοινωνίας. Πιο συγκεκριμένα, για την αξιοποίηση των βιομεμβρανών αυτών χρησιμοποιούνται στρατηγικές όπως αυτές που περιλαμβάνουν:

- Επιφάνειες που δεν ευνοούν τη βιολογική ρύπανση (anti-fouling surfaces) όπως το Poly ethylene glycol (PEG)
- Αντιμικροβιακές επιφάνειες εμπλουτισμένες με ενώσεις όπως οι Silver quaternary ammonium compounds (QACs)
- Τροποποιητές επιφανειών όπως οι μεμβράνες πολυεθυλενίου (PE) ή η methoxy-PEG-amine (-PEG-NH₂)

Έτσι λοιπόν, οι έως τώρα κυριότερες στρατηγικές παρέμβασης στο χώρο των τροφίμων και βιοτεχνολογίας για την αξιοποίηση των βιομεμβρανών αφορούν : (α) τη μετατροπή τους σε μικροβιακά καύσιμα (microbial fuel cells, MFCs) με στόχο την καταλληλότερη διαχείριση ακάθαρτων λημμάτων, (β) τη υγιή ανάπτυξη των φυτών μέσω της αναστολής ανάπτυξης φυτο-παθογόνων, (γ) τη δημιουργία ωφέλιμων βιοαντιδραστήρων και (δ) εφαρμογές που

σχετίζονται με το ανθρώπινο εντερικό μικροβίωμα και τη μετατροπή πολύπλοκων δομών σακχάρων στα ευεργετικά λιπαρά οξέα βραχέως αλύσου (SCFAs).

Κεφάλαιο 2 Μικροοργανισμοί και βιομεμβράνες

Όπως ήδη αναφέρθηκε, παρατηρείται μια τεράστια ποικιλομορφία ανάμεσα στους μικροοργανισμούς οι οποίοι μπορούν να σχηματίσουν βιομεμβράνες. Ωστόσο, σκοπός της παρούσας εργασίας είναι να παρουσιάσει τη σημαντικότητα μόνο αυτών οι οποίοι σχετίζονται με τη βιομηχανία τροφίμων. Είναι δε απαραίτητη η γνώση των επιμέρους χαρακτηριστικών τα οποία επιδρούν στο σχηματισμό των βιοφίλμ και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη προσπάθεια ελέγχου και αντιμετώπισης των προβλημάτων που δημιουργούνται. Οι περισσότεροι από αυτούς τους μικροοργανισμούς αφορούν Gram θετικά ή αρνητικά βακτήρια όπου ανάμεσα τους βρίσκονται και μερικά στελέχη τα οποία παρουσιάζουν υψηλή μολυσματικότητα. Αν και σε πολλές περιπτώσεις η βιβλιογραφία δεν προσδιορίζει εκτενώς το ρόλο κάθε μικροοργανισμού ή τη συσχέτιση και την πιθανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών στα τρόφιμα, τα κυριότερα βακτήρια που θα μελετηθούν είναι η *Salmonella*, η *Listeria*, το *Campylobacter jejuni*, ο *Staphylococcus aureus* και το στέλεχος *E. Coli* O157:H7.

2.1 *Salmonella* spp

2.1.1 Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση

Η επιδημιολογική ταξινόμηση του γένους *Salmonella* ταξινομείται σε δυο είδη, στην *Salmonella enterica* (είδη τύπου) και στην *Salmonella bongori* με βάση τις διαφορές στην ανάλυση αλληλουχίας 16S rRNA [66]. Κατά τη ταξινόμηση λαμβάνονται υπόψη και επιδημιολογικά χαρακτηριστικά όπως η δυνατότητα προσβολής του ξενιστή. Τα είδη τύπου περιλαμβάνουν ορότυπους με περιορισμένες επιλογές ξενιστή και προσβάλλουν μόνο τον άνθρωπο όπως ο *S. Typhi*. Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ορότυπους που προσαρμόζονται στο ξενιστή αλλά μπορούν να προκαλέσουν νόσο και σε άλλους ξενιστές όπως ο *S. Pullorum* στα πουλερικά.

Τα είδη τύπου της *S. Enterica* μπορούν να ταξινομηθούν σε έξι περαιτέρω υποείδη με βάση τη γονιδιωματική συγγένεια και τις βιοχημικές τους ιδιότητες. Έτσι λοιπόν υπάρχουν τα είδη: (1) *enterica*, (2) *salamae*, (3) *arizonae*, (4) *diarizonae*, (5) *houtenae* και (6) *indica* [67]. Ανάμεσα σε όλα τα είδη, αυτά που σχετίζονται με τα τρόφιμα αλλά και τον άνθρωπο αφορούν την *S. Enterica* και την *S. Typhimurium*. Τα υπόλοιπα είδη απαντώνται κυρίως στο περιβάλλον και σε ψυχρά ζώα και δε σχετίζονται τόσο με τον άνθρωπο ή τα τρόφιμα. Μιας διαφορετικής μορφής ταξινόμηση αφορά τα κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν τα διάφορα στελέχη. Έτσι λοιπόν η διάκριση αφορά τα τυφοειδή στελέχη της σαλμονέλας και τα μη τυφοειδή.

Επιπρόσθετα, μια ακόμη ταξινόμηση η οποία εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Kaufman και White βασίστηκε σε τρεις αντιγονικούς παράγοντες: (α) τον σωματικό-somatic (O), (β) τον θυλακώδη-capsular (K) και (γ) τα μαστίγια-flagellar (H). Τα θερμοάντοχα σωματικά O αντιγόνα αφορούν κάποιους ολιγοσακχαρίτες από διάφορους λιποπολυσακχαρίτες που εντοπίζονται στην εξωτερική βακτηριακή μεμβράνη. Σημαντικό κατά το σχηματισμό βιομεμβρανών είναι το γεγονός ότι ένας συγκεκριμένος ορότυπος μπορεί να εκφράσει περισσότερα από ένα σωματικά O αντιγόνα [68]. Τα επίσης θερμοάντοχα H αντιγόνα βρίσκονται στα μαστίγια των βακτηρίων και εμπλέκονται στην ενεργοποίηση των υποδοχέων του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή.

Τα περισσότερα είδη σαλμονέλας, περιέχουν δυο διαφορετικά γονίδια τα οποία κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες σε δυο φάσεις. Κάθε ορότυπος εκφράζει συγκεκριμένα H αντιγόνα κατά την πρώτη φάση ενώ κατά τη δεύτερη φάση ίδια αντιγόνα μπορούν να χρησιμοποιούνται από πολλούς διαφορετικούς ορότυπους [69]. Τα αντιγόνα επιφάνειας K, είναι θερμοευαίσθητοι πολυσακχαρίτες που βρίσκονται στην επιφάνεια της βακτηριακής κάψουλας και πρόκειται για τα λιγότερο κοινά αντιγόνα που βρίσκονται στους διάφορους ορότυπους της σαλμονέλας.

2.1.2 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών του φύλλου των πρωτεοβακτηρίων. Πρόκειται για τη μεγαλύτερη οικογένεια μη φωτοσυνθετικών Gram αρνητικών βακτηρίων η οποία περιλαμβάνει σημαντικά γένη που σχετίζονται με τα τρόφιμα όπως η *Escherichia* και σε ορισμένες περιπτώσεις η *Shigella*. Πρόκειται για χημειότροφα βακτήρια και έχουν την ικανότητα να μεταβολίζουν την τροφή τους, τόσο με την αναπνοή όσο και με τη ζύμωση. Τα είδη του γένους διαθέτουν περίτρεχες βλεφαρίδες οι οποίες τα βοηθούν στη κίνηση τους ενώ με βάση τις απαιτήσεις τους σε οξυγόνο χαρακτηρίζονται ως αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια (Εικόνα 2.1). Εξαιρέση αποτελούν οι *S. Typhi*, *S. Paratyphi* και *S. Dublin* οι οποίοι διαθέτουν ειδικό ελυτροειδές περίβλημα αλλά και οι *S. Gallinarum* και *S. Pullorum* οι οποίοι χαρακτηρίζονται από περιορισμένη κινητικότητα [70].



Εικόνα 2.1 Απεικόνιση *Salmonella spp.* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Πηγή: <http://natural-sciences.nwu.ac.za/laboratory-for-electron-microscopy/about-us>)

Οι περισσότεροι ορότυποι της σαλμονέλας, παρουσιάζουν ανάπτυξη σε ένα εύρος θερμοκρασιών μεταξύ 5 και 47°C ωστόσο η βέλτιστη ανάπτυξη των περισσότερων εμφανίζεται μεταξύ 35 με 37°C. Ωστόσο, υπάρχουν και εξαιρέσεις όπου ορισμένοι από αυτούς μπορούν να αναπτυχθούν τόσο σε χαμηλές (2-4°C) όσο και σε υψηλές (50-55°C) θερμοκρασίες [71]. Γενικά, τα περισσότερα είδη σαλμονέλας θεωρούνται θερμοευαίσθητα και καταστρέφονται σχετικά εύκολα από τη θερμοκρασία παστερίωσης (περίπου 70°C). Μεταξύ των άλλων φαίνεται ότι η ανάπτυξη τους και ο σχηματισμός βιοφίλμ πραγματοποιείται σε ενεργότητα ύδατος μεταξύ 0,99 και 0,94. Όσον αφορά το pH, τα διάφορα είδη είναι ικανά να αναπτυχθούν και σε όξινα περιβάλλοντα ανάλογα με τη παρουσία οργανικών που ενδεχομένως υπάρχουν (pH=5.4 για οξικό οξύ ή pH=4.05 για κιτρικό). Παρόλα αυτά η βέλτιστη ανάπτυξη τους ευνοείται σε ουδέτερο pH (6,5-7,5).

Η D-γλυκόζη και άλλοι υδρογονάνθρακες καταβολίζονται προς παραγωγή οξέος και σε κάποιες περιπτώσεις παραγωγής αερίου (υδροθείου) ενώ δεν μπορούν να υδρολύσουν την ουρία. Σημαντικό για τον εντοπισμό και τον έλεγχο τους είναι ότι παρουσιάζουν θετικά αποτελέσματα στις δοκιμές της καταλάσης, του ερυθρού του μεθυλίου και της χρήσης κιτρικών αλάτων. Παράλληλα, είναι αρνητικά στις δοκιμές της οξειδάσης, της ινδόλης και της Voges-Proskauer [72].

2.1.3 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Η δυναμικότητα των λοιμώξεων που προκαλεί η σαλμονέλα στον άνθρωπο ποικίλει ανάλογα τους ορότυπους αλλά και τη γενικότερη κατάσταση της υγείας του ξενιστή. Φαίνεται ότι παιδιά μικρότερα των έξι χρόνων, ηλικιωμένοι και ασθενείς σε ανοσοκαταστολή είναι πιο επιρρεπείς σε τέτοιες λοιμώξεις απ' ό,τι οι υγιείς. Τα περισσότερα από τα στελέχη της

χαρακτηρίζονται ως παθογόνα αφού έχουν την ικανότητα να «εισβάλλουν», να αντιγράψουν και να επιβιώνουν στα ανθρώπινα κύτταρα με αποτέλεσμα την εκδήλωση ασθενειών οι οποίες σε ορισμένες πιθανώς να έχουν ακόμη και θανατηφόρα κατάληξη.

Στις περισσότερες των περιπτώσεων τα βακτήρια αυτά εισέρχονται στο πεπτικό σύστημα μέσω του μολυσμένου νερού ή της τροφής κάτι που σχετίζεται έμμεσα και με το σχηματισμό βιομεμβρανών. Αφού πλέον έχουν εισέλθει στον ανθρώπινο μικροοργανισμό, διεισδύουν περαιτέρω στα επιθηλιακά κύτταρα που συγκροτούν το εντερικό τοίχωμα. Η ικανότητα των στελεχών της σαλμονέλα να παραμένουν προσκολλημένα στα κύτταρα είναι πολύ σημαντική για την παθογένεια, καθώς στελέχη που στερούνται αυτής της ικανότητας είναι μη μολυσματικά [73]. Η ικανότητα της *Salmonella spp.* να εισάγεται σε μη φαγοκυτταρικά κύτταρα ενισχύει τη μολυσματική της δράση. Αυτή η ικανότητα αφορά την κωδικοποίηση ενός συστήματος έκκρισης πρωτεϊνών γνωστό ως σύστημα έκκρισης τύπου III και είναι απαραίτητο για την αποστολή σημάτων τα οποία αποσυντονίζουν τα κύτταρα του ξενιστή και τελικά οδηγούν στην είσοδο των βακτηριακών κυττάρων. Τέτοια ή παρόμοια συστήματα εμφανίζονται επίσης και σε διάφορους άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς της οικογένεια των εντεροβακτηριοειδών όπως τα εντεροαιμοραγικά στελέχη της *E. coli* και κάποια είδη της *Shigella* και της *Yersinia*.

Ανάλογα τα κλινικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζει ο ξενιστής, υπάρχουν τέσσερις διαφορετικές καταστάσεις της νόσου. Αυτές αφορούν την γαστρεντερίτιδα, τον εντερικό (τυφοειδή) πυρετό, την βακτηριαμία και άλλες εξωεντερικές επιπλοκές που σχετίζονται συνήθως με χρόνια νοσήματα [74]. Οι εντερίτιδες είναι γνωστές και ως σαλμονελώσεις με τα συμπτώματά τους να ποικίλουν από ανάλογα τη δριμύτητα της νόσου αλλά και το στέλεχος που ευθύνεται για αυτή. Τα μη τυφοειδή στελέχη εμφανίζουν ταχύτερη επώαση (6-15 ώρες) σε σχέση με τα τυφοειδή των οποίων η περίοδος επώασης μπορεί να φθάσει έως και τα δυο εικοσιτετράωρα. Ανάμεσα στα βασικά συμπτώματα συγκαταλέγονται ο ήπιος πυρετός, η ναυτία, ο εμετός, οι κοιλιακές διαταραχές και η διάρροια τα οποία διαρκούν συνήθως τρεις με τέσσερις ημέρες. Συμπτώματα όπως η διόγκωση των νεφρών ή της σπλήνας αν και δεν είναι τόσο συχνά φαίνεται να εμφανίζονται πιο συχνά σε ασθενείς που έχουν προσβληθεί από τυφοειδή στελέχη.

Η βακτηριαμία είναι μια πολύ σοβαρή ασθένεια που σχετίζεται με την είσοδο των βακτηρίων στο αίμα μετά την προσκόλληση τους στο εντερικό επιθήλιο. Παρόλο που η εμφάνιση της νόσου δεν είναι τόσο συχνή τα περισσότερα στελέχη σαλμονέλας είναι ικανά να οδηγήσουν σε βακτηριαμία με κυριότερα εξ' αυτών να είναι η *S. Dublin* και η *S. Choleraesuis* [75]. Κύριο χαρακτηριστικό της βακτηριαμίας είναι ο υψηλός πυρετός αλλά

χωρίς το σχηματισμό εξανθημάτων που συνήθως παρατηρείται με τον εντερικό πυρετό. Σε αρκετές περιπτώσεις σοβαρών περιστατικών η βακτηριαιμία μπορεί να οδηγήσει σε σηψαιμία με μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας. Τα κλινικά χαρακτηριστικά της συγκεκριμένης νόσου ποικίλουν ανάλογα την έκφραση του γονιδίου μολυσματικότητας το οποίο επηρεάζει τους σχετικούς μηχανισμούς.

Ωστόσο δεν είναι λίγες οι περιπτώσεις στις οποίες διάφοροι ορότυποι καταφέρνουν και προσαρμόζονται ανάλογα με τον ξενιστή τείνοντας να προκαλέσουν συστηματικές νόσους. Στους ανθρώπους υπεύθυνα στελέχη είναι οι τυφοειδείς και παρατυφοειδείς βάκιλοι *S. Typhi* και *S. Paratyphi A, B* και *C* οι οποίοι προκαλούν σηψαιμικές ασθένειες και εντερικό πυρετό.

2.2 *Listeria monocytogenes*

2.2.1 Γενικά στοιχεία και ταξινόμηση

Κάθε χρόνο αρκετές χιλιάδες περιστατικά λιστεριώσεων καταγράφονται παγκοσμίως τα οποία οφείλονται στο παθογόνο βακτήριο *L. monocytogenes*. Οι περισσότερες από τις πρώτες αναφορές περιγράφουν την απομόνωση του από ζώα τα οποία ευθύνονταν για σημαντικά τροφосκάνδαλα. Αν και το βακτήριο της *L. monocytogenes* έχει αναγνωρισθεί ως επικίνδυνο για τον άνθρωπο από τα μέσα του προηγούμενου αιώνα, η ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ και η δυσκολία στον έλεγχο του φανέρωσαν νέα δεδομένα σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι παρά την ανάπτυξη των κλάδων της προληπτικής ιατρικής, της τεχνολογίας και μικροβιολογίας τροφίμων η συχνότητα εμφάνισης της νόσου παραμένει σε υψηλά επίπεδα ενώ το 2013 παρατηρήθηκε αύξηση των κρουσμάτων στην Αμερική αλλά και την Ευρώπη [76].

Πιο συγκεκριμένα, από πολλούς τεχνολόγους και μικροβιολόγους τροφίμων, η *Listeria* θεωρείται ο πλέον σημαντικός και σχετιζόμενος μικροοργανισμός με την ανάπτυξη βιοφίλμ στις βιομηχανίες καθώς ανιχνεύεται τόσο σε μια μεγάλη ποικιλία από διαφορετικά είδη προϊόντων και επιφανειών όσο και εξαιτίας των ιδιαιτεροτήτων που σχετίζονται με την ανάπτυξη της. Για παράδειγμα, υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές όσο και πειραματικές ενδείξεις πως βιοφίλμ λιστέριας μπορούν να ανιχνευθούν σε σωληνώσεις συστημάτων κυκλοφορίας νερού, σε δάπεδα, σε μεταφορικές ταινίες, σε φρεάτια και λοιπό εξοπλισμό από καουτσούκ (rubber seals), ελαστομερή αλλά και κάθε είδους ανοξείδωτο ατσάλι.

Όσον αφορά τους κλάδους των τροφίμων που η λιστέρια «στοχεύει», αφορούν κυρίως νωπά αλλά και έτοιμα προς κατανάλωση γαλακτοκομικά προϊόντα, κρεατοσκευάσματα αλλά και σε κάποιες περιπτώσεις ιχθυρά. Κρίσιμες θεωρούνται επίσης και οι διάφορες τεχνολογίες παραγωγής όπως η κοπή των διάφορων κρεατοσκευασμάτων

σε μηχανές οι οποίες ευνοούν την ανάπτυξη βιομεμβρανών μέσω της δημιουργίας κενών χώρων οι οποίοι δύσκολα καθαρίζονται. Τέλος, εκτός των άλλων, σημαντική θεωρείται και η ικανότητα της λιστέριας να αναπτύσσεται και να σχηματίζει βιοφίλμ σε χαμηλές θερμοκρασίες οι οποίες σχετίζονται με την συντήρηση και αποθήκευση των τροφίμων. Αυτή η ικανότητα ανάπτυξης σε τέτοιες θερμοκρασίες αποτελεί βασικό χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου μικροοργανισμού ωστόσο όσον αφορά ειδικά την ικανότητα σχηματισμού βιοφίλμ του, παρατηρούνται αλλαγές στη σύσταση των λιπαρών οξέων της βακτηριακής μεμβράνης του έπειτα από επίδραση με χαμηλές θερμοκρασίες οι οποίες αυξάνουν την ικανότητα προσαρμογής του και κατ' επέκταση της προσκόλλησης του σε ψυκτικούς θαλάμους και άλλες παρόμοιες ψυχόμενες επιφάνειες.

Ακόμη, η λιστέρια είναι γνωστό ότι απαντάται ευρέως στο φυσικό περιβάλλον με κυριότερες πηγές να αποτελούν το έδαφος, η βλάστηση, τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, κάποια λύματα και τα κόπρανα ανθρώπων και ζώων. Σημαντική παράμετρος τόσο για το σχηματισμό βιομεμβρανών όσο και την πρόκληση της νόσου είναι το γεγονός ότι ο μικροοργανισμός μπορεί να επιβιώσει σε αυτά τα περιβάλλοντα για μεγάλο χρονικό διάστημα αυξάνοντας έτσι τη πιθανότητα μεταφοράς του στις τροφές ανθρώπων και ζώων. Σύμφωνα και με τις πιο πρόσφατες διατροφικές κρίσεις που αφορούν λιστεριώσεις ανά το κόσμο φαίνεται ότι τα πιο συχνώς μολυσμένα τρόφιμα αφορούν κυρίως τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα κρεατοσκευάσματα και κάποια φρέσκα λαχανικά.

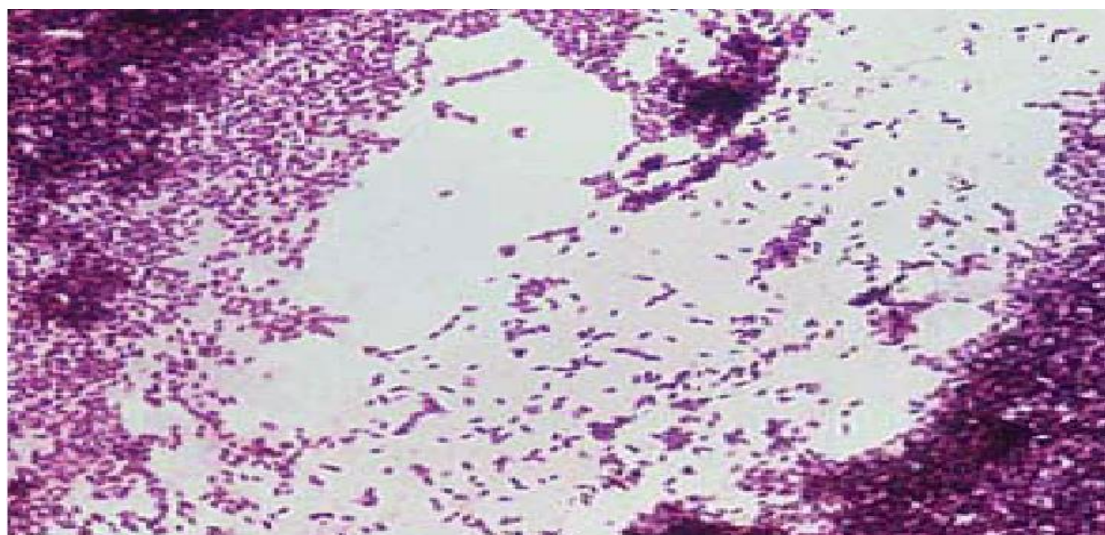
Αρχικά η *Listeria spp.* ταξινομήθηκε στην οικογένεια *Corynebacteriaceae*. Ωστόσο, με την πρόοδο των αναλυτικών και μοριακών τεχνικών παρατηρήθηκε ότι το γένος της λιστέρια μπορεί να αποτελεί μια αυτοτελή οικογένεια με διακριτά χαρακτηριστικά για τα είδη του. Ειδικότερα, κατατάσσεται στο φύλο των Firmicutes στην κλάση των βακίλων. Πιο συγκεκριμένα, φαίνεται ότι η λιστέρια εμφανίζει αρκετά κοινά χαρακτηριστικά με τα γένη *Lactobacillus* και *Brochothrix* ενώ διαφοροποιείται αρκετά από άλλα γένη βακίλων όπως *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* και *Staphylococcus* [77]. Μέχρι στιγμής έχουν αναγνωρισθεί 17 είδη ενώ δυο από αυτά τα στελέχη (*L. monocytogenes* και *L. ivanovii*) χαρακτηρίζονται από έντονη μολυσματική δράση (παθογόνοι).

Ο μικροοργανισμός της λιστέρια, είναι θετικός στην αντίδραση της καταλάσης αλλά αρνητικός στην αντίδραση της οξειδάσης. Είναι ομοζυμωτικός και μέσω των κατάλληλων ενζύμων που διαθέτει (οξειδάση της γλυκόζης και οξειδάσης του NADH) οξειδώνει τη γλυκόζη όπου κάτω από αερόβιες συνθήκες σχηματίζεται κυρίως γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και ακετοΐνη. Αντίθετα για την ανάπτυξη του σε αναερόβιες συνθήκες απαιτείται η παρουσία εξοζών και πεντοζών ενώ δε παράγεται και ακετοΐνη. Τέλος φαίνεται ότι ο καταβολισμός της

γλυκόζης πραγματοποιείται μέσω του βιοχημικού μονοπατιού των Emben-Mayerhof τόσο σε αερόβιες όσο και αναερόβιες συνθήκες και οδηγεί στη παραγωγή οξέων αλλά όχι αερίων [78].

2.2.2 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Πρόκειται για έναν θετικό κατά Gram βάκιλο που ανήκει στην οικογένεια Listeriaceae με τις διαστάσεις του να κυμαίνονται από 0,4-0,5 μm × 0,5-2,0 μm. Είναι μη σπορογόνο προαιρετικά αναερόβιο βακτήριο το οποίο παρουσιάζει ικανότητα κίνησης σε θερμοκρασία δωματίου αλλά στερείται αυτής σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 30°C. Απαντάται είτε υπό τη μορφή μεμονωμένων κυττάρων είτε σε αλυσίδες μικρού μήκους και σύμφωνα με τους περισσότερους μικροβιολόγους οι μικρές αυτές αποικίες του παρομοιάζονται με ράβδους οι οποίες είναι διατεταγμένες σε κοντές αλυσίδες (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2 Απεικόνιση αποικιών στελέχους *L. Monocytogenes* (Πηγή: Keneth, 2004)

Όσον αφορά τη θερμοκρασία ανάπτυξης του αυτή κυμαίνεται από 1-2°C έως και 40-45°C. Πρακτικά πρόκειται για έναν ψυχρότροφο μικροοργανισμό του οποίου η βέλτιστη ανάπτυξη παρατηρείται σε θερμοκρασίες κοντά στους 35 με 37°C. Σημαντικό του πλεονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες ψυγείου κάτι που πολλές φορές προκαλεί πονοκέφαλο στις βιομηχανίες τροφίμων καθώς το εμπόδιο της ψύξης καθίσταται ανεπαρκές για τον έλεγχο του. Έρευνες δείχνουν ότι ο μικροοργανισμός επιβιώνει και σε αρνητικές θερμοκρασίες αν και η μικροβιακή του ανάπτυξη είναι αισθητά πιο αργή (χρόνος διπλασιασμού 100-150 ώρες σε θερμοκρασία 0°C). Σημαντική θεωρείται επίσης και η ανθεκτικότητα του βακτηρίου στη ξηρασία (αφυδάτωση) και την υψηλή συγκέντρωση αλάτων, καθώς είναι σε θέση να αυξάνεται έως και σε 10% χλωριούχο νάτριο και απλά να επιβιώνει σε ακόμη υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Η οξεοανθεκτικότητα της *L. monocytogenes* είναι και αυτός ένας σημαντικός παράγοντας για την επιβίωση της καθώς ανιχνεύεται στο έντερο τόσο ανθρώπων όσο και ζώων. Από μελέτες σε θρεπτικά υποστρώματα ανάπτυξης φαίνεται ότι πολλαπλασιάζεται σε ένα ευρύ pH που κυμαίνεται από 4,5 έως και 9,5 [79]. Παρόλα αυτά στις ακραίες προαναφερθείσες τιμές ο μικροοργανισμός απλώς επιβιώνει ενώ ο πολλαπλασιασμός του σχεδόν αδρανοποιείται. Εκτός της αυξημένης αντοχής της σε όξινα περιβάλλοντα, η *L. monocytogenes* είναι από τα λίγα τροφιμογενή παθογόνα που παρουσιάζουν ικανότητα αύξησης σε ενεργότητα ύδατος μικρότερης του 0,93 ενώ σε κάποιες περιπτώσεις αυτή μπορεί να φθάσει έως και το 0,87. Γενικά το αποδεκτό εύρος της κυμαίνεται από 0,90 έως 0,99 με την βέλτιστη τιμή για την ανάπτυξη της να βρίσκεται κοντά στο 0,97. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι αυτός ο συνδυασμός αυξημένης αντοχής (οξύτητα-ενεργότητα ύδατος) είναι από το βασικότερους παράγοντες που συμβάλλουν στην περιβαλλοντική επιβίωση των στελεχών της *Listeria* [78].

Όσον αφορά τη σύσταση της κυτταρικής μεμβράνης των μικροοργανισμών του γένους *Listeria* αποτελούνται κυρίως από:

- Πεπτιδογλυκάνη η οποία φθάνει έως και το 30 με 35% του ξηρού βάρους ολόκληρου του κυτταρικού τοιχώματος
- Τειχοϊκά οξέα τα οποία αποτελούν σχεδόν το υπόλοιπο ποσοστό του τοιχώματος και συνδέονται με την πεπτιδογλυκάνη μέσω ομοιοπολικών δεσμών με το μουραμικό οξύ
- Λιποτειχοϊκά οξέα τα οποία εμπλέκονται στην πρόσφυση του κυτταρικού τοιχώματος με την πλασματική μεμβράνη

2.2.3 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *L. monocytogenes* είναι σε θέση να εισέρχεται, να επιβιώνει και να πολλαπλασιάζεται τόσο σε φαγοκυτταρικά όσο και σε μη φαγοκυτταρικά συστήματα. Στον ανθρώπινο οργανισμό η προσβολή από λιστέρια πραγματοποιείται με τη πρόσληψη μολυσμένου τροφίμου ή και νερού. Το πρώτο σημαντικό «εμπόδιο» που έχει να αντιμετωπίσει σε πρώτη φάση είναι η πολύ χαμηλή οξύτητα από την οποία χαρακτηρίζεται το στομάχι. Όσα κύτταρα καταφέρνουν και επιβιώσουν από το γαστρικό υγρό, διαπερνούν στο έντερο και ύστερα διεισδύουν στον εντερικό βλεννογόνο όπου μέσω της ενεργούς ενδοκυττάρωσης καταλήγουν εντός των κυττάρων του φραγμού του επιθηλίου [80]. Από εκεί εισέρχονται στους μακροφάγους όπου και ξεκινά ο διπλασιασμός τους. Σε τελικό στάδιο, συσσωρεύονται στα διάφορα όργανα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος. Σημαντικότερες

επιπλοκές της μόλυνσης αποτελούν η μεταφορά στον εγκέφαλο ή των πλακούντα εγκύων μητέρων.

Στα κύτταρα-ξενιστές η λιστέρια μπορεί να εισέλθει είτε παθητικά μέσω φαγοκύτωσης είτε ενεργητικά με την βοήθεια ιντερναλινών. Σημαντικές παράμετροι της παθογένειας του βακτηρίου είναι η αιμολυσίνη (Lysteriolysin O, LLO), η ειδική φωσφολιπάση της φωσφατιδυλο-ινοσιτόλης και η λεκιθινάση [81]. Ο τρόπος εισόδου σε μη-φαγοκυτταρικά κύτταρα και της εξάπλωσης της από κύτταρο σε κύτταρο είναι διαφορετικός και περιλαμβάνει στάδια στα οποία εκτός από τα προαναφερθέντα ένζυμα εμπλέκεται και η δημιουργία ενός τύπου βλεφαρίδας η οποία υλοποιείται χρησιμοποιώντας τους μηχανισμούς του κυττάρου ξενιστή και αποσκοπεί στη προώθηση και μετατόπιση του παθογόνου στη κυτταρική μεμβράνη του κυττάρου-ξενιστή.

Κατά τη διάρκεια εισόδου του παθογόνου και των διάφορων σταδίων που προηγούνται της μολυσματικής του δράσης απαιτείται μια σειρά γονιδίων, τα οποία ονομάζονται γονίδια μολυσματικότητας λόγω της επίδρασης που έχουν στον ξενιστή. Από τις έως τώρα έρευνες φαίνεται ότι για την παθογένεια που εμφανίζει ο μικροοργανισμός ευθύνεται μια νησίδα γονιδίων γνωστή ως *Listeria Pathogenicity Island (LPI-1)* τα οποία αφορούν τη παθογόνο δράση του μικροοργανισμού. Ακόμη, εξέχουσα σημασία στη παθογένεια κατέχουν τα γονίδια της παραγωγής ιντερναλινών που αναφέρθηκαν παραπάνω. Ανάλογα με την ονομασία της εμπλεκόμενης ιντερναλίνης αντίστοιχη είναι και η ονομασία του γονιδίου που εμπλέκεται. Έτσι για παράδειγμα, η ιντερναλίνη A (InIA) και B (InIB) από τις πιο σημαντικές και τις πρώτες που μελετήθηκαν κωδικοποιούνται από τα γονίδια *inLA* και *inLB* αντίστοιχα [82].

Παρόλα αυτά για να προκαλέσει βλάβη η *Listeria*, τα κύτταρα πρέπει να απελευθερωθούν από το φαγόσωμα και να αφεθούν μέσα στο κυτταρόπλασμα του κυττάρου-ξενιστή. Για αυτή τη διαδικασία ευθύνεται ένα άλλο γονίδιο γνωστό ως *hly* το οποίο κωδικοποιεί τη λιστεριολυσίνη το οποίο είναι απαραίτητο για τη προστασία του παθογόνου από τα φαγοκυτταρικά κενοτόπια. Η μετακίνηση και μεταφορά τους οφείλεται στο γεγονός ότι εκμεταλλεύονται τα μόρια ακτίνης του ξενιστή.

Όσον αφορά τη περίοδο επώασης της λιστέρια, εξαρτάται από την ευπάθεια του ξενιστή (κατάσταση της υγείας του) σε συνδυασμό με τη μολυσματική δόση δηλαδή με τον πληθυσμό του μικροοργανισμού που εμπεριέχεται στον μολυσματικό παράγοντα. Γενικά αυτή η περίοδος ποικίλει από μια έως και 4 ημέρες. Εντύπωση προκαλεί το γεγονός ότι οι λιστεριώσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα εμφανίζουν εποχικότητα προς το τέλος του καλοκαιριού και την αρχή της άνοιξης αντίστοιχα [83]. Αν και τα συμπτώματα ποικίλουν,

σε αρχικό στάδιο περιορίζονται σε πυρετό και μυαλγίες και ενίοτε σε συμπτώματα του γαστρεντερικού συστήματος όπως ναυτία και εμετός. Το ανησυχητικό ωστόσο αφορά την επέκταση της λοίμωξης στο νευρικό σύστημα η οποία σχετίζεται με την εμφάνιση συμπτωμάτων κεφαλαλγίας, δυσκαμψίας του αυχένα, σύγχυσης, έλλειψης ισορροπίας αλλά και αποβολής, θνησιγένειας (γέννηση νεκρού νεογνού), πρόωρου τοκετού ή σοβαρής λοίμωξης του νεογνού κατά την εγκυμοσύνη. Πρόκειται για την χειρότερη εξέλιξη της νόσου η οποία μπορεί να οδηγήσει σε σηψαιμία ή μηνιγγίτιδα ακόμη και στο θάνατο. Έρευνες επίσης δείχνουν ότι η άμεση επαφή με το μολυσμένο υλικό πολλές φορές μπορεί να προκαλέσει βλατιδώδη εξανθήματα στα χέρια και τις παλάμες. Στην Ευρώπη αν και έχουν μειωθεί αισθητά τα περιστατικά λιστεριώσεων ευθύνονται για το 4% των νοσηλειών και το 28% των θανάτων από τροφिमογενή νοσήματα [84].

2.3 Καμπυλοβακτηρίδιο-*Campylobacter jejuni*

2.3.1 Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση

Το καμπυλοβακτηρίδιο έκανε την εμφάνιση του σε βοοειδή τα οποία παρουσίασαν εντερικές διαταραχές όπου οι ερευνητές-микροβιολόγοι Jones και Little τις απέδωσαν στα «άγνωστα δονάκια» [85]. Οι ίδιοι ήταν που συσχέτισαν την εκλεκτική θέση των δονακίων με τη νήστη (*jejunum*) του λεπτού εντέρου. Αυτό το δονάκιο αρχικά ονομάστηκε *Vibrio jejuni* και αργότερα *Vibrio Coli*. Η μετατροπή της ονομασίας του στη τωρινή του μορφή πραγματοποιήθηκε στα τέλη της δεκαετίας του 1970 όταν ο Dekeyser και η ομάδα του απομόνωσαν μικροαερόφιλα βακτήρια σε καμπυλωτό σχήμα (*campylobacter*), στηριζόμενοι σε τεχνικές εναιώρησης και διήθησης κοπράνων από ασθενείς με συμπτώματα γαστρεντερίτιδας [86].

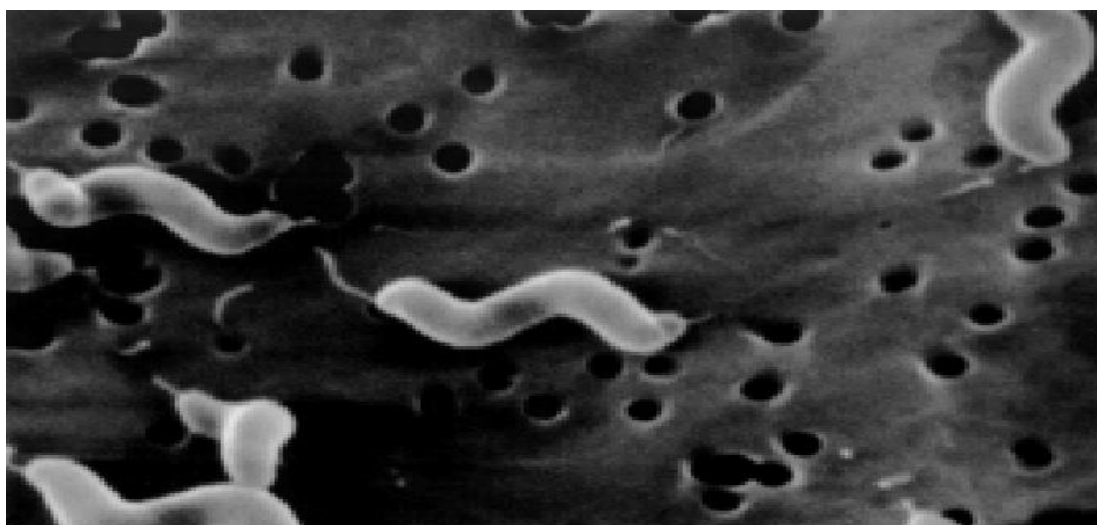
Κατά τη ταξινόμηση του μικροοργανισμού υπήρξαν διαφορετικές απόψεις. Πολλές από αυτές απορρίφθηκαν με την πάροδο των ετών εξαιτίας της εξέλιξης των αναλυτικών και μοριακών τεχνικών ανάλυσης. Αρχικά, όσο ακόμη η ονομασία του δονακίου παρέπεμπε σε στέλεχος *Vibrio* έγινε ο διαχωρισμός του από το κλασικό *Vibrio cholerae* και το αλόφιλο *Vibrio parahemolyticus* ενώ ως αντιπροσωπευτικό είδος του γένους καθορίστηκε το *Campylobacter fetus* το οποίο παλαιότερα και αυτό λεγόταν *Vibrio fetus*.

Πλέον, σύμφωνα και με τα τελευταία επίσημα στοιχεία της Διεθνούς Επιτροπής Συστηματικής Βακτηριολογίας το *Campylobacter* και τα συγγενή σε αυτό βακτηρίδια κατατάσσονται σε μια αυτόνομη, ετερογενή παρόλα αυτά φυλογενετικώς διακριτή ομάδα της οικογένειας των καμπυλοβακτηριοειδών (*Campylobacteriace*). Πρόκειται για μια μεγάλη οικογένεια που περιλαμβάνει τρία γένη ομολογίας: 1) *Campylobacter* και *Bacteroides ureolyticus*, 2) *Arcobacter* και 3) *Helicobacter* και *Wollinella succinogenes*. Τα δυο πρώτα γένη

ομολογίας χαρακτηρίζονται από υψηλή συγγένεια βάση της ομολογίας των rRNA. Όσον αφορά το γένος *Campylobacter*, αυτό υπάγονται περίπου είκοσι είδη και υποείδη. Σημαντικότερα εξ αυτών είναι τα θερμοφιλά όπως τα *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* και *Campylobacter coli* [87].

2.3.2 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Τα διάφορα είδη του *Campylobacter* είναι αρνητικοί κατά Gram βάκιλοι με κυρτό (καμπυλωτό) ή ελικοειδές σχήμα και για αυτό η αρχική του ταξινόμηση χαρακτηριζόταν ως δονάκια (Εικόνα 2.3). Πρόκειται για μη σπορογόνα και μικροαρόφιλα βακτήρια που το μήκος τους κυμαίνεται από 0,5 έως 0,8 μm και το πάχος τους από 0,2 έως 0,5 μm ανάλογα με το στάδιο της ανάπτυξης τους [88]. Τα μικροβιακά κύτταρα στα άκρα τους φέρουν μια ή δυο γυμνές πολικές βλεφαρίδες (μονότριχα ή αμφίτριχα αντίστοιχα). Χαρακτηριστικό είναι και το σιγμοειδές σχήμα τους όταν ενώνονται δυο κύτταρα. Η κίνηση του είναι χαρακτηριστική κοχλιοειδής (ελικοειδής) και απότομη προωθητική, στοιχεία που του δίνουν τη δυνατότητα να ξεχωρίζει από τα άλλα βακτήρια και να διακρίνεται ευκολότερα κατά την απεικόνιση του σε διαφόρων ειδών μικροσκόπια.



Εικόνα 2.3 Σάρωση εικόνας μικροσκοπίου του *C. jejuni* (Πηγή: Sean F., 1999)

Το καμπυλοβακτηρίδιο είναι ένας χημειότροφος μικροοργανισμός με μεταβολικές ιδιότητες που το κάνουν να ξεχωρίζει από άλλα εντεροπαθογόνα. Το πιο σημαντικό είναι ο περιορισμένος καταβολισμός υδατανθράκων. Αρκετές μελέτες που εξέτασαν την ικανότητα ανάπτυξης του *jejuni* σε υποστρώματα γλυκόζης και άλλων υδατανθράκων όπως διάφορες εξόζες και πεντόζες φανέρωσαν την ανικανότητα του να αναπτυχθεί σε αυτά καθιστώντας το ένα μη-σακχαρολυτικό βακτήριο [89]. Επιπρόσθετα σημαντικό ρόλο στη φυσιολογία του *Campylobacter* φαίνεται να διαδραματίζει ο καταβολισμός των αμινοξέων. Αρκετές μελέτες με διαφορετικές αναλυτικές προσεγγίσεις η κάθε μια (API test, ανίχνευση διοξειδίου κ.α),

φανερώνουν ότι ο μικροοργανισμός είναι ικανός να καταβολίσει οργανικά οξέα όπως το γαλακτικό, το πυροσταφυλικό, το οξικό, κάποια ενδιάμεσα παράγωγα του κύκλου του Krebs (TCA cycle) όπως και έναν περιορισμένο αριθμό αμινοξέων [90-91].

Όσον αφορά τη θερμοκρασία ανάπτυξης του, η βέλτιστη τιμή φθάνει τους 42°C. Παρόλα αυτά φαίνεται ότι είναι ικανό να αναπτυχθεί και σε θερμοκρασίες έως τους 30°C. Ενδιαφέρον αποτελεί ότι ενώ πρόκειται για έναν μικροοργανισμό που προτιμά τις ζεστές επιφάνειες, παρουσιάζει καλύτερη επιβίωση σε θερμοκρασίες συντήρησης παρά σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος. Κατά γενική ομολογία, αν και το καμπυλοβακτηρίδιο ευθύνεται για ένα σημαντικό ποσοστό τροφολοιμώξεων, η επικινδυνότητα και η πιθανότητα ανάπτυξης βιομεμβρανών είναι σημαντικά μικρότερη σε σύγκριση με άλλους μικροοργανισμούς όπως για παράδειγμα της λιστέριας. Ακόμη, τα δεδομένα που αφορούν τις διάφορες κατηγορίες τροφίμων είναι αντικρουόμενα καθώς φαίνεται ότι το βακτήριο δεν επιβιώνει στους διάφορους συνδυασμούς της παστερίωσης κάτι που ωστόσο στη περίπτωση σχηματισμού βιομεμβρανών ίσως και να μην είναι απόλυτο από τη στιγμή που παρατηρούνται θερμικές απώλειες.

Σε γενικές γραμμές το βέλτιστο pH του *Campylobacter* κυμαίνεται από 6,5 έως 7,5 χωρίς ωστόσο να λείπουν και τιμές στο εύρος 5,0 με 8,0. Έρευνες όμως δείχνουν ότι μερικές φορές η χαμηλή οξύτητα από μόνη δεν οδηγεί στην αδρανοποίηση του βακτηρίου παρά μόνο όταν αυτή συνδυαστεί με τη κατάλληλη θερμοκρασία [92]. Επιπρόσθετα, όπως τα περισσότερα Gram αρνητικά βακτήρια επηρεάζεται από την υγρασία και έχει σχετικά υψηλές απαιτήσεις ενεργότητας ύδατος (0,96) ενώ είναι ευαίσθητο και στο ξηρό περιβάλλον. Μικρή μείωση του διαθέσιμου ελεύθερου νερού προκαλεί ταχύτατη μείωση του αριθμού των καμπυλοβακτηριδίων. Η ενεργότητα ύδατος είναι υψίστης σημασίας για προϊόντα όπως τα διάφορα κρεατοσκευάσματα και μπορεί να επηρεάσει το σχηματισμό βιοφίλμ στις αντίστοιχες επιφάνειες.

Ενθαρρυντικό είναι το γεγονός ότι το συγκεκριμένο βακτηρίδιο για να αναπτυχθεί ή να επιβιώσει χρειάζεται ατμόσφαιρα μειωμένη σε οξυγόνο (5% οξυγόνο, 10% διοξείδιο του άνθρακα και 85% άζωτο). Η ιδιότητα της μικροαερόφιλης ανάπτυξης του μπορεί να οφείλεται στην ανικανότητα του βακτηριδίου να συνθέσει ή να δεσμεύσει σιδηρούχες ενώσεις σε επαρκείς ποσότητες. Η παρουσία άλλων μικροοργανισμών στα τρόφιμα επιφέρει ελάττωση του πληθυσμού των καμπυλοβακτηριδίων η οποία πιθανόν οφείλεται στη παραγωγή διάφορων οργανικών οξέων από το ανταγωνιστικό μικροβίωμα που καθιστά το περιβάλλον ακατάλληλο για την ανάπτυξη του.

2.3.3 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Η μεγάλη κινητικότητα που παρουσιάζει το καμπυλοβακτηρίδιο και το σπειροειδές του σχήμα είναι βασικά στοιχεία της παθογένειας του καθώς του δίνουν τη δυνατότητα να διαπερνά με ευκολία το παχύρρευστο στρώμα βλέννης που επαλείφει εσωτερικά τον κεντρικό σωλήνα και να εγκαθίστανται στα επιθηλιακά κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου, στα οποία εν τέλει επιβιώνει και πολλαπλασιάζεται. Σε αυτή τη διείδυση βοηθού και ορισμένες πρωτεΐνες της μικροκάψας της εξωτερικής κυτταρικής μεμβράνης του *C. jejuni* συμβάλλοντας έτσι και στην ταχύτερη έναρξη της νόσου.

Μεγάλο ρόλο στη παθογένεια και μολυσματικότητα του μικροοργανισμού διαδραματίζει η συγκέντρωση ή όχι σιδήρου. Φαίνεται ότι παρουσία περίσσειας σιδήρου τα βακτήρια αυξάνουν τη μολυσματική τους δράση ενώ απουσία αυτού φαίνεται ότι τοξιγόνα στελέχη μεταπίπτουν σε μη τοξιγόνα. Οι διάφοροι τύπου τοξινών που παράγονται από στελέχη του *C. jejuni* καθορίζουν και την παθογόνο δράση τους με αποτέλεσμα μια μεγάλη ποικιλία από κλινικά συμπτώματα. Οι εντεροτοξίνες αυτές εμφανίζουν παρόμοια δράση με εκείνες της *E. Coli* και της χολέρας, είναι θερμοευαίσθητες και μετουσιώνονται σε θερμοκρασίες άνω των 55°C.

Σε γενικές γραμμές, οι λοιμώξεις που προκαλούνται από το καμπυλοβακτηρίδιο είναι οξείες αλλά αυτοπεριοριζόμενες και χαρακτηρίζονται από διάρροια, πυρετό και κοιλιακές κράμπες. Η διάγνωση της είναι εύκολη ωστόσο δε διαφέρει τόσο από εκείνες που προκαλούν άλλοι παθογόνοι και ως εκ τούτου απαιτείται μοριακή ταυτοποίηση. Ο τύπος διάρροιας ανάλογα το είδος μπορεί να είναι αραιός και υδαρής ή χονδροειδής και αιματηρός. Παρόλα αυτά υπάρχουν και περιπτώσεις που η διάρροια είναι ελάχιστη και οι κοιλιακές κράμπες και τα άλγη είναι τα κυρίαρχα συστατικά. Τα συμπτώματα συνήθως διαρκούν έως και μια βδομάδα ενώ η φαρμακευτική αγωγή δεν κρίνεται απαραίτητη παρά μόνο σε δυσκολότερες περιπτώσεις που αφορούν τη διασπορά του παθογόνου σε άλλα όργανα προκαλώντας χολοκυστίτιδα, παγκρεατίτιδα, περιτονίτιδα και μαζική γαστρεντερική αιμορραγία ή αντιδραστικής αρθρίτιδας σε άτομα που φέρουν το αντιγόνο ιστοσυμβατότητας HLA-B27.

Όμως, η σημαντικότερη επιπλοκή είναι μεταλοιμωξιακή και αφορά το σύνδρομο Guillain-Barre (GBS). Το GBS είναι μια οξεία απομυελινωτική νόσος που επηρεάζει το περιφερειακό νευρικό σύστημα. Σύμφωνα με το κέντρο πρόληψης και ελέγχου νοσημάτων, η πιθανότητα εμφάνισης του είναι μικρή και αφορά συγκεκριμένους ορότυπους του *Campylobacter*. Παρόλα αυτά, οι βλάβες που δημιουργεί είναι εκτεταμένες και τις

περισσότερες φορές μη αναστρέψιμες για αυτό και πάντα όλοι οι φορείς υγείας και τροφίμων παραμένουν σε εγρήγορση σχετικά με τα πρωτόκολλα ασφάλειας.

2.4 Staphylococcus aureus

2.4.1 Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση

Παρόλο που το πρόβλημα δημόσιας υγείας σχετικά με τον παθογόνο μικροοργανισμό *Staphylococcus aureus* δεν είναι καινούριο, τις τελευταίες δεκαετίες όλο και περισσότεροι προειδοποιήσεις γίνονται από τους ειδικούς σχετικά με τα αυξημένα επιδημιολογικά ρίσκα που προκύπτουν εξαιτίας κυρίως των αυξημένων στελεχών στα αντιβιοτικά. Οι σταφυλόκοκκοι είναι άμεσα συνδεδεμένοι με τον ανθρώπινο οργανισμό καθώς πρόκειται για μικρόβια που βρίσκονται πολύ συχνά στη ρινική κοιλότητα, στο φάρυγγα και το δέρμα. Επίσης βρίσκονται τόσο στο έδαφος όσο και στον αέρα ενώ σε κάποιες περιπτώσεις απαντώνται και στα τρόφιμα προκαλώντας λοιμώξεις στον οργανισμό.

Οι πρώτες αναφορές της αναγνώρισης των σταφυλόκοκκων έρχονται από αρκετά παλιά όπου σύμφωνα με τη βιβλιογραφία οι επιστήμονες περιέγραφαν τον μικροοργανισμό ως «μάζα που μοιάζει με τσαμπί από σταφύλια» [93]. Αργότερα με ένα σχετικά απλό χρωματικό τεστ τα βακτήρια διαφοροποιήθηκαν σε *Staphylococcus aureus* (aurum που σημαίνει χρυσός), σε *Staphylococcus albus* (που σημαίνει λευκός) ο οποίος αργότερα ονομάστηκε *Staphylococcus epidermidis* εξαιτίας της παρουσίας του στο ανθρώπινο δέρμα. Εκτός του χρώματος των αποικιών για τη ταξινόμηση τους κατά καιρούς έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες ιδιότητες τους όπως η πήξη ή όχι του πλάσματος.

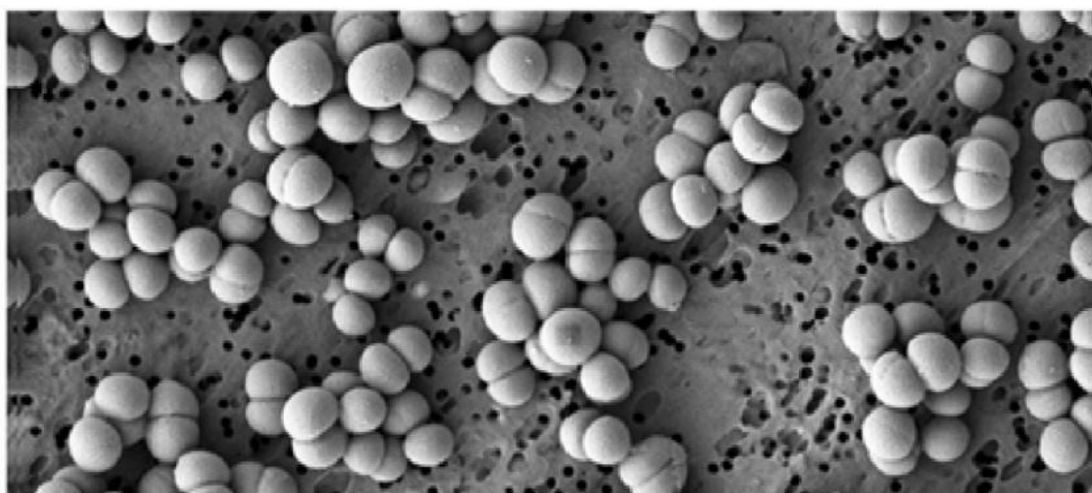
Η ικανότητα των στελεχών να προσαρμόζονται και να αναπτύσσουν αντοχή στα αντιβιοτικά είχε παρατηρηθεί ήδη μερικά χρόνια της ανακάλυψης της πενικιλίνης ενώ πλέον ήδη από τα μέσα του προηγούμενου αιώνα η πενικιλίνη έπαψε πλέον να αποτελεί ένα αποτελεσματικό μέσο θεραπείας των σταφυλοκοκκικών λοιμώξεων εξαιτίας της ικανότητας της να παράγει στελέχη β-λακταμάσης [94]. Το ίδιο φαινόμενο παρατηρήθηκε και με άλλα νέα αντιβιοτικά όπως η μεθικιλίνη. Έκτοτε, λαμβάνοντας υπόψη τις διαπιστευμένες μοριακές τεχνικές (υβριδοποίηση και αλληλούχιση του DNA), οι σταφυλόκοκκοι ταξινομούνται στο φύλο των Firmicutes, στην κλάση των Bacilli, στην τάξη των Bacillales στην οικογένεια *Staphylococcaceae*, απεριθμώντας διάφορα είδη μέσα στα οποία και ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος (*Staphylococcus aureus*). Πλέον, έχουν επίσημα αναγνωριστεί 32 είδη και 8 υποείδη του συγκεκριμένου γένους.

2.4.2 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Ο μεταβολισμός των διάφορων στελεχών μπορεί να είναι οξειδωτικός είτε ζυμωτικός δηλαδή ζυμώνουν τη γλυκόζη τόσο αερόβια όσο και αναερόβια παράγοντας κυρίως γαλακτικό οξύ.

Χαρακτηρίζονται επίσης από την ικανότητα ζύμωσης της μανιτόλης εμφανίζοντας γύρω από τις αποικίες τους μια κίτρινη ζώνη η οποία είναι χαρακτηριστική της ταυτοποίησης τους σε επωαστικά τρυβλία. Μεταξύ των άλλων δίνουν θετική αντίδραση καταλάσης, μια βιοχημική δοκιμή (test) η οποία πραγματοποιείται για το διαχωρισμό τους από τους υπόλοιπους Gram θετικούς κόκκους.

Οι σταφυλόκοκκοι είναι θετικοί κατά Gram κόκκοι με διάμετρο 0,5 έως και 1,5 μm με τα περισσότερα στελέχη να είναι αερόβια ή προαιρετικά αναερόβια. Η ονομασία τους είναι χαρακτηριστική των δομών που σχηματίζουν και προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις «σταφύλι» και «κόκκος» (Εικόνα 2.4). Πρόκειται για βακτήρια με περιορισμένη κινητικότητα καθώς δε διαθέτουν βλεφαρίδες ούτε έλυτρα ενώ επίσης δεν σχηματίζουν σπόρια [95]. Είναι δε ικανοί να παράγουν αιμολυσίνες οι οποίες καταστρέφουν τα λευκά αιμοσφαίρια, εντεροτοξίνες οι οποίες είναι θερμοάντοχες και προκαλούν τροφικές δηλητηριάσεις.



Εικόνα 2.4: Απεικόνιση χαρακτηριστικών αποικιών του *S. aureus* σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο (Πηγή: Aldujaily A., 2019)

Αν και η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης φαίνεται να ποικίλει ανάλογα το στέλεχος, κυμαίνεται μεταξύ 35 και 37°C. Παρόλα αυτά οι σταφυλόκοκκοι θεωρούνται μεσόφιλοι μικροοργανισμοί που αναπτύσσονται και σε θερμοκρασίες μεταξύ 10-45°C. Οι εντεροτοξίνες δε που παράγει είναι εξαιρετικά ανθεκτικές και φαίνεται να επιβιώνουν στους 100°C για 30 λεπτά. Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος παρουσιάζει ανθεκτικότητα σε χαμηλή ενεργότητα ύδατος (0,86), υψηλή αλατότητα (20%), σε διάφορα αντιβιοτικά όπως ήδη αναφέρθηκε αλλά και σε κάποια συντηρητικά του κρέατος όπως τα νιτρώδη και τα νιτρικά [96].

Όσον αφορά το pH, αν και η ανάπτυξη του πραγματοποιείται από 4,2 έως και 9,3 ο μικροοργανισμός αναπτύσσεται ταχύτερα σε pH 6,0 με 7,0. Από την άλλη μεριά, ο σταφυλόκοκκος δεν αποτελεί καλό ανταγωνιστή κάτι που σχετίζεται με τη μειωμένη

εμφάνιση του στα συστήματα βιομεμβρανών. Αν και εφόσον παρατηρηθεί στη σύσταση τέτοιων μικροβιακών κοινοτήτων αυτών συνεπάγεται μια σειρά από παραλείψεις και λάθη που αφορούν κυρίως την υγιεινή του προσωπικού και τους χειρισμούς των τροφίμων ή των καταναλωτών.

2.4.3 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Η παθογόνος δράση του των σταφυλόκοκκων εξαρτάται τόσο από την ικανότητα τους να αποφεύγουν τη φαγοκυττάρωση παράγοντας επιφανειακές τοξίνες που ευθύνονται για τη προσκόλληση των βακτηρίων στους ιστούς όσο και την ικανότητα παραγωγής ειδικών εντεροτοξινών και υδρολυτικών ενζύμων. Τα είδη του γένους *S. aureus* παράγουν επτά διαφορετικές εντεροτοξίνες γνωστές ως A, B, C₁, C₂, C₃, D και E, οι οποίες διαφέρουν ως προς την τοξικότητα τους και της αντιγονικής του διαφοράς [97]. Οι εντεροτοξίνες αυτές είναι πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 25.000 με 30.000. Η παραγωγή τοξίνης είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη μολυσματική δόση και φαίνεται ότι για τη πρόκληση τροφιοτοξίνωσης απαιτούνται >10⁵ εντεροτοξιγενείς σταφυλόκοκκους/g ή mL τροφίμου (1ng τοξίνης/g ή mL). Οι τροφικές δηλητηριάσεις σχετίζονται κυρίως με την εντεροτοξίνη A ενώ οι εντεροτοξίνες της κατηγορίας C και D σχετίζονται με συγκεκριμένες κατηγορίες τροφίμων όπως τα μολυσμένα γαλακτοκομικά. Η εντεροτοξίνη B και αυτή εμφανίζεται σε διάφορες τροφικές δηλητηριάσεις και ευθύνεται για την εμφάνιση σταφυλοκοκκικής ψευδομεμβρανώδους εντεροκολίτιδας.

Ο χρόνος και η σοβαρότητα της εμφάνισης των τροφικών δηλητηριάσεων εξαρτάται από το πληθυσμό του βακτηρίου που υπάρχει στο μολυσμένο τρόφιμο και από το εάν έχει παραχθεί ή όχι η αντίστοιχη τοξίνη. Όταν η τοξίνη έχει ήδη αναπτυχθεί στα τρόφιμα τότε ο χρόνος εμφάνισης συμπτωμάτων είναι πολύ μικρός και σε γενικές γραμμές κυμαίνεται από τρεις έως έξι ώρες. Τα κυριότερα συμπτώματα της νόσου είναι ναυτία, εμετός, ζάλη, ίλιγγος, υπνηλία ή και συμπτώματα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Στη χώρα μας, φαίνεται ότι οι περισσότερες από αυτές τις σταφυλοκοκκικές δηλητηριάσεις είναι ομαδικές και ευθύνονται συγκεκριμένες ομάδες τροφίμων όπως τα κόλλυβα, οι κρέμες αλλά τελευταία το ρύζι το οποίο αν και έχει καλά μαγειρευτεί, παραμένει σε υψηλή θερμοκρασία δίνοντας την δυνατότητα στις τοξίνες να ασκήσουν τη δράση τους [98].

2.5 *Escherichia coli*

2.5.1 Γενικά χαρακτηριστικά και ταξινόμηση

Ο συγκεκριμένος μικροοργανισμός ήταν από τους πρώτους που μελετήθηκαν εκτενώς και το όνομα του το οφείλει στο Γερμανό βακτηριολόγο Theodor Escherich που για πρώτη φορά τον απομόνωσε το 1885. Πρόκειται για έναν μικροοργανισμό ο οποίος αν και αποτελεί μόνο ένα μικρό μέρος του συνολικού εντερικού μικροβιόκοσμου, είναι ο κυρίαρχος αναερόβιος

μικροοργανισμός. Αν και σε γενικές γραμμές θεωρείται αβλαβής και συμβιώνει αρμονικά με το υπόλοιπο δυναμικό οικοσύστημα, μπορεί κάτω από ορισμένες συνθήκες να μετατραπεί σε έναν εν δυνάμει παθογόνο μικροοργανισμό προκαλώντας διάφορες μολύνσεις οι οποίες μοιάζουν αρκετά με αυτές που προκαλούν άλλα Gram αρνητικά βακτήρια [99].

Στα μέσα της προηγούμενης δεκαετίας μεγάλη βαρύτητα είχε δοθεί για την ταξινόμηση των διάφορων στελεχών της *E. coli* καθώς αρκετά περιστατικά γαστρεντερίτιδας με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά έκαναν ολοένα και συχνότερη την εμφάνιση τους. Γενικά, το γένος της *E.coli* κατατάσσεται στα εντεροβακτηριοειδή μαζί με τη σιγκέλα και τη σαλμονέλα. Όσον αφορά τα διάφορα στελέχη της, γνωρίζοντας παραπάνω πληροφορίες το τρόπο δράση τους αλλά και τη κλινική εικόνα των ασθενών αυτά κατατάχθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες:

- Εντεροπαθογόνα στελέχη *E. coli* (enteropathogenic *E. coli*-EPEC)
- Εντεροαιμοραγικά στελέχη *E. coli* (enterohemorrhagic *E. coli*-EHEC)
- Εντεροδιεισδυτικά στελέχη *E. coli* (enteroinvasive *E. coli*-EIEC)
- Εντεροτοξικογόνα στελέχη *E. coli* (enterotoxigenice *E. coli*-ETEC)

Όσον αφορά τα τρόφιμα, ανάμεσα στα εντεροαιμοραγικά στελέχη συγκαταλέγεται ο ορότυπος O157:H7, ο οποίος έχει αναγνωριστεί ως αίτιο επιδημιολογικών εξάρσεων αιμορραγικής κολίτιδας. Παρόλο που τα ετήσια κρούσματα στην Ευρώπη έχουν σταθεροποιηθεί και κυμαίνονται σε σχετικά χαμηλά επίπεδα, ο μικροοργανισμός φαίνεται να επηρεάζει πρωτίστως τα παιδιά γεγονός που διαρκώς αναβαθμίζει τις υγειονομικές απαιτήσεις των βιομηχανιών τροφίμων [100].

2.5.2 Μορφολογία και χαρακτηριστικές ιδιότητες

Όπως όλα τα εντεροβακτηριοειδή έτσι και η *E. coli* είναι ένα Gram αρνητικό, προαιρετικά αναερόβιο, σποριογόνο βακτήριο. Πρόκειται για βακτήριο με μήκος περίπου 2μm και 0,5μm διάμετρο του οποίου η κίνηση υποβοηθάται από περίτριχα μαστίγια που βρίσκονται εξωτερικά της κυτταρικής του μεμβράνης (Εικόνα 2.5). Όσον αφορά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ορότυπων αυτά διαφέρουν με βασικά κριτήρια να αποτελούν ένας σωματικός πολυσακχαρίτης O και τα μαστίγια H. Ο μικροοργανισμός φαίνεται να είναι ικανός να αναπτυχθεί σε μια πληθώρα υποστρωμάτων, ενώ υπό αναερόβιες συνθήκες παράγει κυρίως γαλακτικό και οξικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα. Όσον αφορά τις διάφορες δοκιμές που χρησιμοποιούνται για τη ταυτοποίηση της, η *E. coli* δίνει θετική αντίδραση καταλάσης και αρνητική αντίδραση οξειδάσης [101].



Εικόνα 2.5: Απεικόνιση βακτηριακού στελέχους *E. coli* O157:H7 (Πηγή: Nguyen U., 2015)

Από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη της *E. coli* είναι η θερμοκρασία. Η *E. coli* είναι ένα χαρακτηριστικό μεσόφιλο βακτήριο του οποίου η ανάπτυξη μπορεί να πραγματοποιηθεί από 7 έως και 50°C με τη βέλτιστη να εντοπίζεται γύρω στους 37°C. Ακόμη, το ελάχιστο pH το οποίο μπορεί να αναπτυχθεί κυμαίνεται από 4,0 έως 4,5 με τη βέλτιστη τιμή ωστόσο να εντοπίζεται σε ουδέτερης οξύτητας περιβάλλον. Στα όξινα τρόφιμα δε φαίνεται ότι μπορεί και επιβιώνει για αρκετές εβδομάδες όταν όμως αυτά αποθηκεύονται σε θερμοκρασίες ψύξης. Τέλος, σύμφωνα με μελέτες, η ελάχιστη ενεργότητα ύδατος για την ανάπτυξη των κυττάρων του *E. coli* είναι περίπου 0,98 [102].

2.5.3 Παθογένεια και κλινικά χαρακτηριστικά

Το στέλεχος O157:H7 αναγνωρίστηκε ως παθογόνο για πρώτη φορά το 1987 όταν και συσχετίστηκε με δυο κρούσματα (γαστρεντερικών νόσων) τα οποία αφορούσαν την κατανάλωση ελαφρώς μαγειρεμένων μπιφτεκιών στις Ηνωμένες Πολιτείες. Λίγο νωρίτερα, μελέτες είχαν φανερώσει ότι μερικά στελέχη της κατηγορίας των διαρροϊκού παθογόνου της *E. Coli* παρήγαγαν μια ισχυρή τοξίνη που προκαλούσε νεφρική ανεπάρκεια στα κύτταρα του αφρικανικού πράσινου πιθήκου γνωστά και ως κύτταρα Vero (Verotoxin producing *E. coli*-VTEC). Αργότερα, παρατηρήθηκε ότι αυτές οι τοξίνες παρουσίασαν ανοσολογικές και λειτουργικές ομοιότητες με τις τοξίνες που παράγει ένα άλλο εντεροβακτηριοειδές η σιγκέλα γεγονός που ευθύνεται για την μετονομασία των βεροτοξινών σε Shiga-toxins [103].

Αυτού του είδους οι τοξίνες θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς λοιμογόνους παράγοντες και διακρίνονται σε δυο κατηγορίες: (α) την Shiga-toxin 1 (stx1) και την Shiga-toxin 2 όπου ένα μεγάλο μέρος της αλληλουχίας των αμινοξέων της παραμένει ίδιο με της stx1. Υποδιαίρεση της πρώτης αποτελούν οι υπομάδες A και B, με τις B να είναι δομικά

εντελώς ίδιες με τις αντίστοιχες της τοξίνης που παράγει η σιγκέλα. Ο ρόλος των Β είναι πολύ σημαντικός καθώς προσκολλώνται στο δέκτη των γλυκολιπιδίων της επιφάνειας των ευκαρυωτικών κυττάρων όπου από εκεί η τοξίνη εισέρχεται εντός του κυττάρου με ενδοκύτωση [104].

Σε γονιδιακό επίπεδο, οι πληροφορίες παραγωγής των παραπάνω τοξινών εντοπίζονται στο γονιδίωμα του λαμβδοειδή προφάγου ο οποίος είναι ενσωματωμένος στο χρωμόσωμα του STEC/EHEC. Τα περισσότερα στελέχη όταν εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό, αποικίζουν τον βλεννογόνο του εντέρου με έναν μηχανισμό που υπονομεύει τη λειτουργία των επιθηλιακών κυττάρων και προκαλεί χαρακτηριστικές παθολογικές αλλοιώσεις. Τέτοιες μπορεί να είναι η εξάλειψη των μικρολαχνών με ταυτόχρονη προσκόλληση ακτίνης στα επιθηλιακά κύτταρα οι οποίες σχετίζονται με τα διαρροϊκά συμπτώματα. Μεταξύ των άλλων φαίνεται επίσης ότι το στέλεχος O157:H7 διαθέτει και ένα αρκετά μολυσματικό πλασμίδιο το οποίο ευθύνεται για τη παραγωγή εντεροαιμολυσίνης [105].

Η προσβολή από το παθογόνο στέλεχος O157:H7 μπορεί να έχει πολλά πιθανά αποτελέσματα από μια ασυμπτωματική και αυτοπεριοριζόμενη λοίμωξη μέχρι και θάνατο. Κύρια εστία μόλυνσης θεωρείται το παχύ έντερο και τα άνω τμήματα του εντερικού σωλήνα πάνω στα οποία προσκολλώνται τα βακτήρια. Η προσκόλληση αυτή διευκολύνει των απορρόφηση τοξινών και την είσοδο τους σε τριχοειδή αγγεία όπου συνδέονται στους Gb3-υποδοχείς. Οι φλεγμονές που προκαλούνται από τις αντίστοιχες τοξίνες θεωρούνται ως το βασικό αίτιο της αιμορραγικής κολίτιδας.

Πολλές φορές τα συμπτώματα είναι αιφνίδια, και χαρακτηρίζονται από την έναρξη κοιλιακού άλγους, σοβαρών και έντονων κραμπών που συνοδεύονται (μετά από 1-2 ημέρες) από διάρροια που μπορεί να μετατραπεί σε αιμορραγική. Η λοίμωξη προχωρά αργά και τα πρώτα συμπτώματα μπορούν να εμφανιστούν μέσα σε 1 ή ακόμη και μετά από 5 ημέρες. Όσο η λοίμωξη εξελίσσεται τα συμπτώματα μεταβάλλονται και φαίνεται η διάρροια να γίνεται υδαρής και στη συνέχεια να μετατρέπεται σε έντονα αιμορραγική συνοδευόμενη από συχνούς εμετούς και πυρετό. Τέλος, σοβαρή επιπλοκή της λοίμωξης θεωρείται η εμφάνιση του αιμολυτικού ουραιμικού συνδρόμου που χαρακτηρίζεται από νεφρική ανεπάρκεια και χαμηλό αριθμό αιμοπεταλίων.

Κεφάλαιο 3 Σχηματισμός βιομεμβρανών και βιομηχανίες τροφίμων

Στις μέρες μας, φαίνεται ότι ο σχηματισμός ανθεκτικών βιοφίλμ και η αλληλεπίδραση που αυτά μπορεί να έχουν με τα τρόφιμα, αποτελεί εκτός από ερευνητικό αντικείμενο και μια σημαντική παράμετρο η οποία λαμβάνεται υπόψη σε πολλά στάδια των παραγωγικών διαδικασιών. Μια γενική κατ' εκτίμηση εικόνα που έχει διαμορφωθεί τη τελευταία δεκαετία δείχνει ότι το 1/3 των συνολικών παραγόμενων προϊόντων τροφίμων προς ανθρώπινη κατανάλωση σπαταλάται ή καταλήγει να είναι ακατάλληλο. Αυτές οι απώλειες σχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με το σχηματισμό βιομεμβρανών καθώς αυξάνονται οι πιθανότητες επιμόλυνσης και αλλοίωσης των τροφίμων ή δυσχεραίνονται σημαντικά οι διαδικασίες παραγωγής τους.

Εκτός των όσων ήδη αναφέρθηκαν στην επίδραση του σχηματισμού βιομεμβρανών σημαντική παράμετρο αποτελούν και τα ίδια τα τρόφιμα καθώς κάθε κατηγορία τροφίμων χαρακτηρίζεται από ένα μοναδικό μικροβίωμα. Έτσι λοιπόν, για την καλύτερη ανάλυση των βιομεμβρανών και των αλληλεπιδράσεων τους με τα τρόφιμα απαιτείται η περαιτέρω κατηγοριοποίηση των τροφίμων σε γενικότερες υποομάδες. Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας θα μελετηθούν βιομηχανίες που σχετίζονται με: τα διάφορα προϊόντα κρέατος, τα ιχθυηρά, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα φρούτα και τα λαχανικά αλλά και το νερό.

3.1 Βιομηχανίες επεξεργασίας κρέατος

Από βακτηριακής απόψεως ο σχηματισμός βιοφίλμ μπορεί να παρέχει και κάποια πλεονεκτήματα σε ορισμένες περιπτώσεις. Για παράδειγμα, σημαντικό μέρος της συνολικής παραγωγής καταλαμβάνουν τα διάφορα ζυμώμενα κρεατοσκευάσματα όπως τα διάφορα τύπου σαλάμια τα οποία των οποίων η παραγωγή φαίνεται να επηρεάζεται θετικά από το σχηματισμό βιοφίλμ εξαιτίας της ενίσχυσης της ζύμωσης αλλά κυρίως εξαιτίας του ανταγωνιστικού περιβάλλοντος που δημιουργούν έναντι άλλων βιομεμβρανών [107]. Παρόλα αυτά, τα πλεονεκτήματα αυτά μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε προβλήματα τόσο από τεχνολογικής απόψεως όσο και υπό το πρίσμα της ασφάλειας των τροφίμων.

Η ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται σε αβιοτικές επιφάνειες και δη των παθογόνων σχηματίζοντας βιομεμβράνες είναι μια ανησυχητική διαδικασία για πολλές βιομηχανίες τροφίμων συμπεριλαμβανομένων των βιομηχανιών επεξεργασίας κρέατος [108]. Η ανησυχία αυτή αφορά δυο από τα βασικότερα χαρακτηριστικά που δυσχεραίνουν τον έλεγχο τους και αφορούν: (α) την αντοχή των βιομεμβρανών ενάντια στα μέσα καθαρισμού (τριβή και αντιμικροβιακοί παράγοντες) αλλά και (β) τη δυσκολία ιχνηλάτησης

τους μέσα σε μια βιομηχανία επεξεργασίας. Λόγω της πολυπλοκότητας των τροφίμων φαίνεται ότι στις μικροβιακές κοινότητες που δημιουργούνται συμμετέχουν αρκετά διαφορετικά είδη μικροοργανισμών τα οποία ενισχύουν ακόμη περισσότερο την ήδη αυξημένη αντοχή των βιομεμβρανών σε διάφορους παράγοντες και διεργασίες.

3.1.1 Αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών

Οι σύγχρονες μέθοδοι επεξεργασίας των τροφίμων υποστηρίζουν σημαντικά την ανάπτυξη βιοφίλμ ενώ ανάλογα το είδος και τα μέσα φαίνεται ότι ουσιαστικά καθορίζουν και τις ομάδες μικροοργανισμών που μπορούν να συμμετέχουν σε αυτά. Κυριότερα αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών γενικότερα θεωρούνται οι ακατάλληλα καθαρισμένες επιφάνειες, η πολυπλοκότητα του μηχανικού εξοπλισμού η οποία δυσχεραίνει το καθαρισμό του, η ελλιπής εκπαίδευση του προσωπικού σε θέματα χειρισμού τροφίμων και προσωπικής υγιεινής αλλά και η υγιεινή κατάσταση των ζώων. Αυτό, πολλές φορές έχει ως αποτέλεσμα την εναπόθεση πλούσιων θρεπτικών μέσω του σχηματισμού στερεών υπολειμμάτων (ανάλογα το τρόφιμο) τα οποία παρουσία νερού, αποτελούν ένα ιδανικό περιβάλλον ανάπτυξης και έτσι συμβάλλουν/προάγουν στην ανάπτυξη βακτηριακών φίλμ.

Η προσκόλληση των βακτηρίων ενδεχομένως επηρεάζεται από το υπόστρωμα των τροφίμων καθώς σε αυτό υπάρχει ένα φυσικώς απαντώμενο μικροβίωμα καθώς εκτός των παθογόνων που σχετίζονται ή υπάρχουν στα τρόφιμα (foodborne) εμπλέκονται και άλλα σημαντικά βακτηριακά γένη. Αυτά τα γένη συμβάλλουν στην αλλοίωση φρέσκων ή έτοιμων προς κατανάλωση προϊόντων κρέατος και είναι ικανά να προσκολλώνται σε επιφάνειες επαφής με τρόφιμα και να σχηματίζουν βιοφίλμ. Τέτοια είναι τα στελέχη *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *B. Thermosphacta*, *Lactobacillus* και *Leuconostoc* [109-113].

Η εμπλοκή της ήδη υπάρχοντος φυσικώς απαντώμενης μικροχλωρίδας των τροφίμων αφενός ενισχύει τη πιθανότητα διασταυρούμενης επιμόλυνσης των επιφανειών, των προϊόντων και του εξοπλισμού και αφετέρου δυσχεραίνει ακόμη περισσότερο τον τρόπο που αλληλεπιδρούν οι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί. Η διασταυρούμενη επιμόλυνση των τροφίμων διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο στη σποραδική αλλά κάποιες φορές και στην επιδημική εκδήλωση τροφολοιμώξεων και θεωρείται από τους σημαντικότερους κινδύνους τόσο από τους καταναλωτές όσο και από τις βιομηχανίες [114]. Το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό των κυττάρων των βιοφίλμ για τις βιομηχανίες αφορά το τελευταίο στάδιο του κύκλου ζωής των βιοφίλμ δηλαδή της μερικής διασποράς των κυττάρων. Η μερική αποδέσμευση και επαναφορά κυττάρων στη πλαγκτονική τους κατάσταση ευνοεί την πρόσδεση τους σε γειτονικές επιφάνειες για τον εκ νέου σχηματισμό βιοφίλμ.

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τόσο τη πιθανότητα όσο και την έκταση της επιμόλυνσης είναι:

- Η χημική σύσταση των τροφίμων
- Η δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες των επιφανειών
- Ο χρησιμοποιούμενος μηχανολογικός εξοπλισμός
- Οι μικροοργανισμοί
- Οι περιβαλλοντικές συνθήκες

Η χημική σύσταση του κρέατος διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο κατά τη μεταφορά και προσκόλληση των κυττάρων στις επιφάνειες και κυρίως σχετίζεται με το ποσοστό υγρασίας και λίπους [115]. Όσον αφορά τον εξοπλισμό, θεωρείται από τους σημαντικότερους παράγοντες που ενισχύουν τη πιθανότητα εμφάνισης διασταυρούμενης επιμόλυνσης κατά μήκος της αλυσίδας παραγωγής. Έρευνες κατά καιρούς έχουν απομονώσει διάφορους μικροοργανισμούς σε διαφορετικού τύπου επιφάνειες και μηχανολογικό εξοπλισμό επαληθεύοντας έτσι την αυξημένη κινητικότητα που εμφανίζουν οι βιομεμβράνες. Τέλος, όπως αρκετοί μικροβιολόγοι υποστηρίζουν απαιτείται να γίνει ένας διαχωρισμός της διασταυρούμενης επιμόλυνσης που σε βιομεμβράνες με την αντίστοιχη που οφείλεται σε φυσικά αίτια όπως το περιβάλλον όσο και οι λανθασμένοι χειρισμοί κατά την παραγωγή ή από τους καταναλωτές [116].

3.1.2 Αλληλεπιδράσεις εμπλεκόμενων μικροοργανισμών στις κρεατοβιομηχανίες κατά το σχηματισμό βιοφίλμ

Τα τελευταία χρόνια η μελέτη των βιομεμβρανών που συγκροτούνται από περισσότερα είδη μικροοργανισμών οδήγησε στη καλύτερη κατανόηση των δυναμικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ επιφάνειας, μικροοργανισμών και τροφίμων υπό συνθήκες όμοιες με αυτές που επικρατούν στη βιομηχανία τροφίμων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αφορούν τον ανταγωνισμό για τις πηγές θρεπτικών συστατικών που βρίσκονται σε έλλειψη ή την παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων ειδών. Βακτήρια που εκκρίνουν βιοεπιφανειοδραστικές ενώσεις, πολυσακχαρίτες ή ένζυμα όπως νουκλεάσες και πρωτεάσες μπορούν να αποδυναμώσουν τις αλληλεπιδράσεις βακτηρίου-επιφάνειας και βακτηρίου-βακτηρίου και ενδεχομένως να μειώσουν εν τέλει τη πιθανότητα αποικισμού/σχηματισμού κοινοτήτων [117].

Παρατηρώντας κανείς τη βιβλιογραφία παρατηρεί ότι η πολυπλοκότητα της αλληλεπίδρασης των τροφίμων με βιομεμβράνες δεν εστιάζει γενικά στη βιομηχανία κρεάτων αλλά επικεντρώνονται σε συγκεκριμένα προϊόντα. Κάθε μικροβιακή κοινότητα που δημιουργείται θεωρείται μοναδική και δύσκολα συγκρίνεται με κάποια παρόμοια της ακόμη

και όταν αφορά τους ίδιους μικροοργανισμούς και το ίδιο προϊόν. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 3.1) γίνεται μια προσπάθεια κατηγοριοποίησης των πιθανών εμπλεκόμενων μικροοργανισμών που σχηματίζουν βιομεμβράνες στα διάφορα προϊόντα κρέατος.

Πίνακας 3.1 Εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί στα διάφορα προϊόντα κρέατος

Μικροοργανισμοί	Προϊόντα/Διαδικασία Παραγωγής	Αναφορά
<i>S. aureus</i> - <i>E. coli</i>	Τεμαχισμός χοιρινού	[118]
<i>L. monocytogenes</i>	Αλλαντικά	[119]
<i>L. monocytogenes</i> - <i>S. Enterica</i>	Καμπυλωτές λεπίδες κοπής βόειου	[120]
<i>E. coli</i>	Μονάδα παραγωγής μπιφτεκιών	[121]
Lactic acid Bacteria	Ολόκληρα σφάγια	[121]

Γενικά, οι έως τώρα μελέτες εμφανίζουν αντικρουόμενα αποτελέσματα σχετικά με το τρόπο που παθογόνοι μικροοργανισμοί και το φυσικώς απαντώμενο μικροβίωμα αλληλεπιδρούν έτσι ώστε να δημιουργηθούν μικροβιακές κοινότητες. Θεωρητικά, ο σχηματισμός βιοφίλμ σε επιφάνειες σχετικές με την επεξεργασία κρεάτων μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταξύ διαφορετικών μικροοργανισμών. Στη πράξη όμως, είναι πιο πιθανό ένα συγκεκριμένο παθογόνο στέλεχος να σχηματίσει βιοφίλμ με το τυπικώς απαντώμενο μικροβίωμα το οποίο επικρατεί στο περιβάλλον. Εκτός του ανταγωνιστικού περιβάλλοντος που μπορεί να λειτουργεί ως ένα αποτρεπτικός παράγοντας δημιουργίας βιοφίλμ, μια σειρά από άλλες αλληλεπιδράσεις μπορεί να ευνοεί τον αντίστοιχο σχηματισμό. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις σχετίζονται με το quorum sensing που ήδη αναλύθηκε αλλά και με τις EPS που παράγονται.

Για παράδειγμα, φαίνεται ότι αν και η λιστέρια όταν βρίσκεται σε επιφάνειες τροφίμων δεν συνηθίζει να δημιουργεί πολυποίκιλα βιοφίλμ. Ωστόσο όταν βρεθεί σε επιφάνειες τροφίμων που ήδη υπάρχουν άλλες μικροβιακές κοινότητες, αυξάνεται η ικανότητα προσκόλλησης της σε αυτές για το σχηματισμό βιοφίλμ [122]. Σύμφωνα με τη παραπάνω έρευνα για αυτό φαίνεται να ευθύνεται ένα στέλεχος του *L. acidophilus* το οποίο ενίσχυσε την έκφραση των επιφανειακών προσκολλητικών πρωτεϊνών της *E. coli*. Βασιζόμενοι σε αυτό το εύρημα όταν κάποιοι άλλοι ερευνητές δοκίμασαν το παραπάνω στέλεχος για την ενίσχυση του σχηματισμού βιοφίλμ άλλων παθογόνων όπως η *S. Enterica*, *S. Typhimurium*, *Y. enterocolitica* και *P. aeruginosa*, τα αποτελέσματα ωστόσο δεν φανέρωσαν το ίδιο μοτίβο δράσης [123].

Κατά καιρούς έχουν απομονωθεί διάφορα βακτηριακά στελέχη από στάδια παραγωγής βιομηχανιών επεξεργασίας κρέατος και με αυτό το τρόπο ερευνάται η ικανότητα ενίσχυσης ή όχι του σχηματισμού βιοφίλμ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί του *Acinetobacter calcoaceticus* το οποίο απομονώθηκε από το περιβάλλον βιομηχανίας επεξεργασίας κρέατος το οποίο όπως φάνηκε ευνόησε το σχηματισμό βιοφίλμ *E. coli* [124]. Πλέον, για την εκτίμηση της πιθανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών χρησιμοποιούνται και αρκετά εμπειρικά μοντέλα τα οποία προσδιορίζουν και εν μέρει υπολογίζουν την δυνατότητα μεταφοράς και προσκόλλησης των μικροοργανισμών. Από αυτά τα δεδομένα έχουν ήδη εξαχθεί χρήσιμα συμπεράσματα τα οποία μπορούν να αποδειχθούν ένα χρήσιμο εργαλείο για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό συστημάτων ανάλυσης κινδύνων. Τα βασικότερα εξ' αυτών είναι: (α) η δυνατότητα των τροφίμων να αποτελούν τα ίδια τις ιδανικές επιφάνειες ανάπτυξης μικροβιακών κοινοτήτων και (β) η σε βάθος κατανόηση των μηχανισμών που αφορούν τη μεταφορά-μετανάστευση.

3.2 Βιομηχανίες γάλακτος

Το νωπό γάλα αποτελεί ένα ιδανικό υπόστρωμα ανάπτυξης ποικίλων μικροοργανισμών εξαιτίας της πλούσιας σύστασης του σε θρεπτικά συστατικά και των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων. Κατά τη διαδρομή του από την παραγωγή προς το καταναλωτή, το γάλα έρχεται σε επαφή με τα τοιχώματα στα οποία επεξεργάζεται, αποθηκεύεται και μεταφέρεται αυξάνοντας τη πιθανότητα πιθανών σχηματισμών βιομεμβρανών και ως συνέπεια του πρώτου τη μικροβιακή αλλοίωση του. Για το λόγο αυτό και σύμφωνα με τις διατάξεις που καθορίζουν τις προδιαγραφές των υλικών συσκευασίας και εξοπλισμού τις τελευταίες δεκαετίες φαίνεται να έχουν περιοριστεί αρκετά τα διάφορα υλικά που έως τότε χρησιμοποιούνταν, με τα πλέον κατάλληλα να θεωρούνται κυρίως το ανοξείδωτο ατσάλι και σε κάποιες περιπτώσεις το πλαστικό ή το χαρτόνι. Έτσι, διασφαλίζεται ότι τα υλικά είναι χημικά, βακτηριολογικά και οργανοληπτικά ουδέτερα ενώ καθαρίζονται εύκολα και είναι ανθεκτικά σε πιθανές διαβρώσεις.

Όμως, παρόλο που οι επιφάνειες και ο εξοπλισμός καλύπτουν τις παραπάνω προδιαγραφές, φαίνεται ότι επιμολύνονται από διάφορους μικροοργανισμούς ακόμη και μετά από εκτενή και εξαντλητική καθαριότητα. Αυτό, πέραν το διάφορων αιτιών οφείλεται κυρίως στην ικανότητα αυτών των μικροοργανισμών να δημιουργούν πιο σύνθετες δομές όπως αυτές των βιοφίλμ. Βέβαια σε πολλές περιπτώσεις μεγαλύτερο βακτηριακό φορτίο που προέρχεται από ακατάλληλες πρώτες ύλες ή λάθος χειρισμούς (ατελής καθαρισμός, ελλιπής ατομική υγιεινή) διευκολύνει σημαντικά το σχηματισμό.

3.2.1 Αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών

Η προσκόλληση αυτή των βακτηρίων με επακόλουθη ανάπτυξη βιοφίλμ σε περιβάλλοντα επεξεργασίας γάλακτος είναι μια σημαντική πηγή επιμόλυνση των τελικών προϊόντων που μπορεί να μειώσει τη διάρκεια ζωής ή να διευκολύνει τη μετάδοση ασθενειών στον άνθρωπο οι οποίες σχετίζονται με σημαντικές τροφολοιμώξεις [125]. Στις γαλακτοβιομηχανίες αν και η επίδραση της τραχύτητας της επιφάνειας και των παρεμφερών σε αυτή ιδιοτήτων της δεν έχει πλήρως αποσαφηνιστεί, πιστεύεται ότι αποτελεί ένα από τα κυριότερα αίτια σχηματισμού. Γενικά, σύμφωνα με τις νομοθετικές διατάξεις προτιμώνται επιφάνειες με ελάχιστες ρωγμές και σκασίματα έτσι ώστε να μειωθεί η δυνατότητα προσκόλλησης βακτηρίων και τελικά η ανάπτυξη βιοφίλμ αλλά και να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού [126].

Ωστόσο η φύση του εξοπλισμού επεξεργασίας του γάλακτος είναι τέτοια που περιορίζει σημαντικά την αποτελεσματικότητα του καθαρισμού και ευνοεί την προσκόλληση των βακτηρίων. Κρυφές γωνίες, ρωγμές ή εσοχές, βαλβίδες αλλά και όλων των ειδών τα εξαρτήματα τα οποία δυσχεραίνουν το καθαρισμό αποτελούν πιθανά σημεία για το σχηματισμό βιοφίλμ. Από τη στιγμή που εγκατασταθούν σε τέτοια σημεία, οι βιομεμβράνες επιτυγχάνουν τη διάβρωση αλλά και σε πολλές περιπτώσεις την αλλοίωση των επιφανειών.

Σε άλλη έρευνα, οι μικρογραφίες ηλεκτρονικής σάρωσης αποκάλυψαν ότι οι τροφιμογενής και αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να συσσωρευτούν σε στεγανά αλουμινίου, ανοξειδωτου ατσάλιου και τεφλόν τα όποια χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιβάλλοντα επεξεργασίας γάλακτος [127]. Σε αυτό ωστόσο διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο και οι διάφορες τεχνολογικές διαδικασίες για τη παραγωγή παρεμφερών προϊόντων. Τέτοια μπορεί να είναι η παστερίωση κατά την οποία αρκετές πρωτεΐνες μετουσιώνονται και συσσωματώνονται ευνοώντας τη προσκόλληση των βακτηριακών κυττάρων σε αυτές. Αυτή η προσκόλληση μπορεί να αλλάξει τις επιφανειακές ιδιότητες του ανοξειδωτου χάλυβα δημιουργώντας ένα περιβάλλον που ενθαρρύνει τη βακτηριακή προσκόλληση σε σημαντικό βαθμό τέτοιο που όπως φανέρωσε μια μελέτη ήταν έως και 10 φορές ευκολότερη στη περίπτωση του *G. stearothermophilus* [128].

Όμως παρόλες τις διάφορες παραμέτρους που αυξάνουν τη βακτηριακή προσκόλληση όπως η αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών, οι επιφάνειες και η φύση των προϊόντων, η φυσικής παρουσία των μικροοργανισμών είναι αυτή που θα οδηγήσει εν τέλει σε αυξημένες πιθανότητες σχηματισμού βιοφίλμ. Ο εξοπλισμός αρμέγματος για παράδειγμα είναι επιρρεπής στη μόλυνση από αλλοιογόνους ή παθογόνους μικροοργανισμούς οι οποίοι εύκολα μπορούν να εισέλθουν στις εγκαταστάσεις μέσω της αλυσίδας παραγωγής. Ακόμη,

άλλοι πιθανοί κίνδυνοι που σχετίζονται με το σχηματισμό βιοφίλμ, αφορούν τη συσσώρευση υπολειμμάτων επεξεργασίας σε αγωγούς γάλακτος, δεξαμενές αποθήκευσης και σιλό καθώς και εναλλάκτες θερμότητας.

Επίσης, συχνά παρατηρείται και η επιμόλυνση των τροφίμων και του εξοπλισμού από το νερό έκπλυσης το οποίο σε κάποιες περιπτώσεις εγκυμονεί κινδύνους οι οποίοι δύσκολα εντοπίζονται [129]. Οι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με ακατάλληλο νερό έκπλυσης αφορούν κυρίως είδη των γενών *Pseudomonas*, *Aeromonas* και *Legionella* των οποίων ο σχηματισμός θεωρείται ιδιαίτερα εύκολος και γρήγορος ενώ η αντιμετώπιση τους ιδιαίτερα δύσκολη. Εκτός των άλλων φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα είδη αποτελούν και ιδανικό χώρο για την προσέλκυση και άλλων μικροοργανισμών οι οποίοι είναι λιγότερο επιρρεπείς στο σχηματισμό βιοφίλμ [130]. Κατά καιρούς, διάφορες μελέτες έχουν συσχετίσει τη παραγωγή βιοφίλμ με συγκεκριμένα είδη επιφανειών αλλά και συγκεκριμένες εστίες στην οποία παρατηρείται το φαινόμενο. Μια προσπάθεια ανασκόπησης πραγματοποιείται στο πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2 Υλικά επιφάνειας και συσχέτιση τους με συγκεκριμένες εστίες-τεχνολογίες παραγωγής που ευνοούν το σχηματισμό βιομεμβρανών (Πηγή: Wirtaten et al., 2006)

Εστίες που ευνοούν το σχηματισμό	Υλικό επιφάνειας
Διάφορων ειδών βαλβίδες	Ανοξείδωτος χάλυβας
Πλαστικές ταινίες παραγωγής	Πλαστικό
Δεξαμενές αποθήκευσης	Ανοξείδωτος χάλυβας
Πληρωτικοί σωλήνες	Πλαστικό
Μεμβράνες υπερδιήθισης	Ανοξείδωτος χάλυβας
Μηχανήματα πακεταρίσματος	Πλαστικό

Περιβάλλοντα τα οποία επιλέγουν βιοφίλμ ενός είδους όπως αυτά των θερμοφίλων βακίλων στα εργοστάσια επεξεργασίας γαλακτοκομικών σχετίζονται με επιμέρους τμήματα που χαρακτηρίζονται από αυξημένες θερμοκρασίες. Κυριότερα παραδείγματα αποτελούν: η προθέρμανση και εξάτμιση σκονών γάλακτος, η παστερίωση που πραγματοποιείται μέσω εναλλακτών θερμότητας και οι διάφορες φυγοκεντρίσεις που λειτουργούν σε ζεστές θερμοκρασίες για την ομογενοποίηση του βουτύρου [131]. Ένα ακόμη παράδειγμα που σχετίζεται με τεχνολογίες που χρησιμοποιούν υψηλές θερμοκρασίες αφορά στελέχη του γένους *Anoxybacillus*, *Flavithermus* και *Geobacillus*. Τα σπόρια αυτών των οργανισμών είναι πολύ ανθεκτικά στη θερμότητα και είναι ικανά να αναπτυχθούν σε θερμοκρασίες έως και 65°C. Το παράδοξο είναι ότι αυτά τα βακτήρια βρίσκονται συνήθως σε χαμηλά επίπεδα στο

νωπό γάλα, όμως μετά από 15-20 συνεχούς παραγωγής και μέσω του σχηματισμού βιοφίλμ ο πληθυσμός του μπορεί να φθάσει έως και τα 10^5 cfu/g στα τελικά προϊόντα.

3.2.2 Αλληλεπιδράσεις εμπλεκόμενων μικροοργανισμών στις βιομηχανίες γάλακτος κατά το σχηματισμό βιοφίλμ

Εκτενείς μελέτες σε βιομηχανίες γάλακτος έδειξαν ότι η βακτηριακή προσκόλληση και ο σχηματισμός βιοφίλμ λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά στάδια. Πιο συγκεκριμένα παρά τα στάδια σχηματισμού βιοφίλμ που αναλύθηκαν σε προηγούμενες ενότητες εξαιρετικής σημασίας φαίνεται να είναι και ο σχηματισμός ενός στρώματος ρύθμισης πριν τη βακτηριακή πρόσφυση [132]. Αυτό το στρώμα ρύθμισης χαρακτηρίζεται από μια μεμβράνη προστασίας η οποία αποτελείται κυρίως από βιολογικά συστατικά του γάλακτος τα οποία βρίσκονται στις επιφάνειες είτε ως υπολείμματα καθαρισμού είτε ως στρώματα από αλληπάλληλους κύκλους παραγωγής. Αυτό το πρώιμο στάδιο αρχίζει σχεδόν αμέσως μετά τη τοποθέτηση μιας κατά τα άλλα καθαρής επιφάνειας σε υγρό περιβάλλον όπου στη προκειμένη περίπτωση μπορεί να είναι το γάλα [133]. Ο τρόπος δράσης του στρώματος αυτού είναι πολύ σημαντικός καθώς διαμορφώνει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας (διαθέσιμη ενέργεια, υδροφοβικότητα και ηλεκτροστατικότητα) ανάλογα με τις απαιτήσεις που προκύπτουν μέσα από την ανταλλαγή σημάτων με τα εμπλεκόμενα βακτήρια.

Ανάλογα λοιπόν με τη μέθοδο επεξεργασίας αλλά και το προϊόν, διαφορετικοί μικροοργανισμοί εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοφίλμ. Επί του παρόντος και σύμφωνα με τις περισσότερες μελέτες, φαίνεται ότι το επικρατέστερο gram αρνητικό βακτήριο σε παστεριωμένα γάλατα που συντηρούνται στους 4°C αφορά το γένος *Pseudomonas* με επικρατέστερα είδη τα *P. fluorescens* και *P. fragi* [134]. Τα είδη αυτά σχηματίζοντας βιομεμβράνες είναι ικανά να παράξουν θερμοσταθερές εξωκυτταρικές λιπάσες, πρωτεάσες και λεκιθινάσες οι οποίες συμβάλλουν στις διάφορες μικροβιακές αλλοιώσεις του γάλακτος.

Σε άλλη έρευνα παρατηρήθηκε ότι στον εξοπλισμό συγκράτησης (αποθήκευσης) νωπού γάλακτος δυο ξεχωριστές αλλά συνάμα συνδεδεμένες φάσεις για μικροβιακή ανάπτυξη και σχηματισμό βιοφίλμ είναι διαθέσιμες: (α) η υγρή φάση στην οποία τα πλαγκτονικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται και (β) η στερεά/υγρή διεπαφή (π.χ τοίχοι δεξαμενής, τοίχοι ψύξεως) όπου τα κύτταρα μπορούν να προσκολληθούν και να σχηματίσουν εν τέλει πιο σύνθετες δομές [135].

Κατά γενική ομολογία, τα στελέχη του *Pseudomonas* σχηματίζουν βιοφίλμ που περιλαμβάνουν αρκετά διαφορετικά είδη μικροοργανισμών και εντοπίζονται κυρίως σε δεξαμενές ψύξης. Ωστόσο, δεν αποκλείεται και ο σχηματισμός μονοποικιλιακών βιοφίλμ από θερμοάντοχα είδη όπως το *S. bovis* και *S. thermophilus* στις περιπτώσεις όπου πολλοί

μικροοργανισμοί θανατώνονται μετά τη παστερίωση. Σημαντικά είναι επίσης και τα ευρήματα που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις των μικροοργανισμών. Σε συνέχεια του προηγούμενου πίνακα (Πίνακας 3.2), φαίνεται ότι οι κυριότεροι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τις συγκεκριμένες επιφάνειες φορούσαν τα γένη: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, Lactic Acid bacteria (LAB), *Enterobacteriaceae* και *Listeria*.

Σε μια άλλη έρευνα, ένας συνδυασμός *P. fluorescens* και *B. Cereus* ήταν έως και πέντε φορές πιο μεταβολικά ενεργός απ' ότι τα αντίστοιχα μονοποικιλιακά βιοφίλμ τους [136]. Αντίστοιχα φαινόμενα φαίνεται να παρατηρήθηκαν και σε μια άλλη έρευνα που αφορούσε ανάμικτα βιοφίλμ *P. fluorescens* και *L. Lactis* [109]. Εκτός των άλλων φαίνεται ότι ο συγκεκριμένος τύπος βιοφίλμ οδήγησε στην ανάπτυξη πιο σύνθετων δομών. Στο ίδιο μοτίβο μήκος κύματος κυμάνθηκε και μια άλλη μελέτη στην οποία απομονώθηκε βιοφίλμ το οποίο αποτελούταν από είδη *P. fragis* και *L. Monocytogenes*, με το πρώτο να ευνοεί την ανάπτυξη του δεύτερου σε επιφάνειες γυαλιού στο οποίο συσκευαζόταν φρέσκο γάλα [136]. Παρόμοια ήταν και η συμπεριφορά ως προς την ικανότητα προσκόλλησης ενός είδους του γένους *Flavobacterium* [137]. Και στις δυο περιπτώσεις η πιθανότερη εξήγηση αφορούσε τη δράση την ικανότητα των *P. fragis* και *Flavobacterium* να δρουν ως πρωτογενείς αποικιστές της επιφάνειας, διευκολύνοντας τη μετέπειτα προσκόλληση της λιστέρια.

Ο Lindsay και η ομάδα του έδειξαν την ενίσχυση της προσκόλλησης των κυττάρων *B. cereus* σε δυαδικό σχηματισμό βιοφίλμ στο οποίο συμμετείχε και το *P. fluorescens* επιβεβαιώνοντας και τις παραπάνω μελέτες ότι πρόκειται για το κυρίαρχο gram αρνητικό βακτήριο [138]. Ακόμη, σε αυτή την αμοιβαία αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε ότι ο *B. Cereus* προστάτευσε σημαντικά το *P. fluorescens* από διαφορετικών ειδών καθαριστικά που χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα μελέτη. Σημαντική είναι η συσχέτιση των σχηματιζόμενων βιοφίλμ που αναλύθηκαν με την απελευθέρωση ενζύμων η οποία θεωρείται από τους σημαντικότερους κινδύνους καθώς το φαινόμενο δεν προϋποθέτει το στάδιο της βακτηριακής αποκόλλησης (διασποράς) κάνοντας έτσι την επιμόλυνση να περάσει απαρατήρητη μέχρι να προκύψουν προβλήματα με τη διάρκεια ζωής των θερμικά επεξεργασμένων γαλακτοκομικών προϊόντων. Για το λόγο αυτό απαιτείται σχολαστικός και τακτικός έλεγχος για το σχηματισμό βιοφίλμ σε όλα τα στάδια παραγωγής των διάφορων γαλακτοκομικών προϊόντων αλλά και σε προληπτικό επίπεδο αποτελεσματικός καθαρισμός.

3.3 Βιομηχανίες επεξεργασίας ιχθυηρών

Τα βιοφίλμ στα οποία συμμετέχουν παθογόνα στελέχη συνήθως αποικίζουν ή σχετίζονται με συγκεκριμένα προϊόντα ιχθυηρών. Η συσχέτιση θαλασσινών και των βιομηχανιών που

σχετίζονται με αυτά κέντρισε το ενδιαφέρον αρκετών ερευνητών με αρκετές μελέτες να έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία πέντε με δέκα χρόνια προσπαθώντας να καλύψουν το σχετικά μεγάλο βιβλιογραφικό κενό που υπάρχει. Όσο και αν φαίνεται άσχετο, τόσο η επικινδυνότητα όσο και η σημασία σχηματισμού βιομεμβρανών επηρεάζεται σημαντικά από τα διατροφικά ήθη και έθιμα τα οποία ποικίλουν ανάλογα των διαφορετικών κουλτουρών που κάθε χώρα-ήπειρος διαθέτει. Αυτό σχετίζεται άμεσα με το γεγονός ότι αρκετοί άνθρωποι, συνηθίζουν να τρώνε τόσο έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα όσο και ωμά θαλασσινά προϊόντα μεταξύ των οποίων διάφορα είδη μαλακίων, ψαριών, καρκινοειδών και αυγών ψαριών [139]. Γενικά, η χημική σύσταση των περισσότερων θαλασσινών αποτελείται από πρωτεΐνες υψηλής βιολογικής αξίας, ωμέγα-3 λιπαρά οξέα, μακροθρεπτικά συστατικά, μέταλλα και βιταμίνες γεγονός που αφετέρου τα καθιστά μια υγιεινή διατροφική επιλογή και αφετέρου ευνοεί την ανάπτυξη, αλλοίωση και κατ' επέκταση το σχηματισμό βιομεμβρανών.

Πρόσφατα ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας δημοσίευσε ότι οι Ασιατικές χώρες (Κίνα-Ιαπωνία) και η Αμερική καταναλώνουν αλλά και παράγουν τις μεγαλύτερες ποσότητες ιχθυηρών [140]. Αυτό το δίπολο που υπάρχει, έχει δημιουργήσει ένα τεράστιο δίκτυο εφοδιαστικής αλυσίδας σε όλο το κόσμο καθιστώντας τα θαλασσινά τα τρόφιμα με τις περισσότερες αποστολές σε μεγάλες αποστάσεις. Αυτό ωστόσο, λαμβάνοντας υπόψη τα πολύωρα ταξίδια και τις ιδιαιτερότητες της συντήρησης και της αποθήκευσης τέτοιων προϊόντων σε συνδυασμό με την αυξημένη ζήτηση έφερε στην επιφάνεια και την εμφάνιση περισσότερων τροφολοιμώξεων ευαισθητοποιώντας έτσι την ερευνητική κοινότητα [141]. Τέλος φαίνεται ότι τη τελευταία δεκαετία προϊόντα σχετικά με τα ιχθυηρά συσχετίστηκαν με πάνω από πέντε χιλιάδες περιπτώσεις διαφόρων τύπου τροφολοιμώξεων και με ακόμη 657 παροδικού τύπου εξάρσεις [142].

3.3.1 Αλληλεπιδράσεις εμπλεκόμενων μικροοργανισμών στις βιομηχανίες ιχθυηρών κατά το σχηματισμό βιοφίλμ

Όπως και τα περισσότερα είδη τροφίμων και εγκαταστάσεων, μπορούν να μολυνθούν με πολλούς τρόπους. Οι λοιμώξεις που σχετίζονται με θαλασσινά προκαλούνται από μια ευρεία ποικιλία βακτηρίων, ιών και παρασίτων. Αν και το μεγαλύτερο ποσοστό αυτών των λοιμώξεων οφείλεται σε ιούς, αυτές που χρήζουν νοσοκομειακής περίθαλψης σχετίζονται με βακτηριακούς παράγοντες [143]. Το ανησυχητικό όπως αναφέρουν αρκετοί επιστήμονες είναι πως παρά την αυξημένη ευαισθητοποίηση και τις πρωτοπόρες μεθόδους ελέγχου της ανάπτυξης και σχηματισμού μικροβιακών κοινοτήτων, οι σποραδικές ή επιδημιολογικές εξάρσεις συνεχίζουν να παραμένουν υψηλές.

Κατά καιρούς διάφορα προϊόντα έχουν συσχετιστεί με συγκεκριμένους μικροοργανισμούς ή επιφάνειες αναδεικνύοντας για μια ακόμη φορά τη πολυπλοκότητα του φαινομένου σχηματισμού βιομεμβρανών. Πολύ σημαντικό για τα ιχθυηρά θεωρείται το γένος *Vibrio* το οποίο περιλαμβάνει είδη όπως το *V. parahemolyticus*, το *V. cholerae* και το *V. vulnificus*. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι εμπλέκονται και άλλα παθογόνα στελέχη όπως η *Salmonella*, τα *C. perfigens* και *C. botulinum*, η *Listeria* και σε κάποιες περιπτώσεις το *Campylobacter*. Για παράδειγμα, σε μια έρευνα του ο Thigee απομόνωσε τη λιστέρια από καπνιστά μύδια και σολομό ενώ ο Jackson απομόνωσε σαλμονέλα από σουσι [144-145]. Φαίνεται ότι για να σχηματίσουν βιοφίλμ οι περισσότεροι παθογόνοι μεταφέρονται (υπό τη μορφή πλαγκτονικών κυττάρων) μέσω της παροχής νερού, των ίδιων των πρώτων υλών ή του περιβάλλοντος.

Σημαντικό ρόλο στην αλληλεπίδραση μεταξύ των μικροοργανισμών και σε αυτή τη κατηγορία προϊόντων διαδραματίζει το quorum sensing και ιδιαίτερα των στελεχών του γένους *Vibrio* τα οποία απαντώνται στα περισσότερα υδρόβια οικοσυστήματα. Φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα είδη που αναφέρθηκαν παραπάνω, προάγουν το σχηματισμό βιοφίλμ ευνοώντας και άλλα είδη όπως το *P. aeruginosa* [146]. Αυτό συμβαίνει μέσω ενός ρυθμιστή απόκρισης σημάτων (HarR) ο οποίος με τη σειρά του προκαλεί τη μεταγραφή του *harA* το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που σχετίζεται με αυξημένη μολυσματικότητα, μειώνοντας έτσι το ανταγωνιστικό περιβάλλον κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του συγκεκριμένου τύπου βιοφίλμ.

Ένας άλλος εμπλεκόμενος μικροοργανισμός που αποτελεί συνηθισμένο αλλοιογόνο θαλασσινών είναι ο *A. hydrophila* ο οποίος απομονώθηκε τόσο από ανεπεξέργαστα όσο και από επεξεργασμένα προϊόντα [147]. Οι ίδιοι ερευνητές ανέφεραν ως κύρια πηγή της επιμόλυνσης τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας χωρίς ωστόσο να τις συσχετίζουν με συγκεκριμένες τεχνολογίες ή επιφάνειες παραγωγής. Παρόλα αυτά σε έρευνα που προηγήθηκε, ο Lynch και η ομάδα του παρατήρησαν την ευκολία του συγκεκριμένου μικροοργανισμού να καλύπτει γρήγορα έως και το 50% των επιφανειών ανοξείδωτου χάλυβα [148].

Ένας ακόμη σημαντικός μικροοργανισμός είναι το αλόφιλο, gram αρνητικό στέλεχος *V. parahemolyticus*. Αν και βρίσκεται και αυτός στα περισσότερα υδρόβια οικοσυστήματα, η συχνότητα εμφάνισης του δεν είναι τόσο μεγάλη με εξαίρεση να αποτελούν τα μερικώς μαγειρεμένα ή ωμά προϊόντα [149]. Το ερευνητικό ενδιαφέρον παραμένει ωστόσο μεγάλο εξαιτίας της παθογένειας του, της σοβαρότητας και επικινδυνότητας των συμπτωμάτων των που σχετίζονται με τον άνθρωπο καθώς προκαλεί σοβαρές γαστρεντερικές και σπανιότερα

ανοσολογικές διαταραχές [150]. Κυριότερα σημεία μετάδοσης, εμφάνισης και σχηματισμού βιομεμβρανών θεωρούνται οι τοπικές αγορές, που συνήθως χαρακτηρίζονται από υποβαθμισμένα πρότυπα ασφάλειας τροφίμων, τα ξενοδοχεία και τα εστιατόρια αλλά επίσης και οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας με κακές βιομηχανικές πρακτικές και έλλειψης συνθηκών υγιεινής [151].

Η σαλμονέλα της οποίας η παθογένεια έχει ήδη αναφερθεί προηγουμένως, έχει και αυτή συσχετιστεί με αρκετές τροφολοιμώξεις που οφείλονται σε θαλασσινά. Η παρουσία της και ο σχηματισμός βιομεμβρανών στις βιομηχανίες επεξεργασίας ιχθυηρών είναι το αποτέλεσμα μιας σειράς περιβαλλοντικών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένων των ελλειπών μέτρων καθαρισμού, της έλλειψης χωριστού δικτύου ποσίμου νερού και η έλλειψη συστημάτων ποιότητας που εξασφαλίζουν ότι παράγονται ασφαλή τρόφιμα [152]. Για παράδειγμα, η επιμόλυνση από σαλμονέλα θαλασσινών όπως η γαρίδα μπορεί να συμβεί ακόμη και υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας ή θερμοκρασιών εξαιτίας της εξάπλωσης μη υγιεινών πρακτικών κατά το χειρισμό, την επεξεργασία, την παρασκευή και το λιαν εμπόριο [153]. Σε άλλη έρευνα του Panisello και της ομάδας του παρατηρήθηκε η επιμόλυνση και ο σχηματισμός βιοφίλμ σαλμονέλας σε μονάδα επεξεργασίας χειρισμού οστρακοειδών [154]. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η πιθανότητα σχηματισμού βιοφίλμ ήταν αυξημένη κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, του χειρισμού και της επεξεργασίας ή μέσω της έκθεσης σε μολυσμένο νερό. Όσον αφορά τις επιφάνειες ανάπτυξης της *Salmonella*, είναι ευκολότερη σε ανοξείδωτο χάλυβα παρά σε αποστειρωμένα φύλλα γυαλιού ή τον πάγο ο οποίος αποτελεί ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο για τις βιομηχανίες επεξεργασίας θαλασσινών [155].

Η επικινδυνότητα της *Listeria* ως ένα τροφιμογενές παθογόνο είναι ήδη γνωστή ωστόσο μέχρι και τις αρχές των προηγούμενων δεκαετιών δεν είχε συσχετιστεί τόσο στενά με το σχηματισμό βιομεμβρανών με προϊόντα θαλασσινών. Πλέον, έχει απομονωθεί από ψάρια του γλυκού νερού, γατόψαρα και γαρίδες [156] ενώ έχει επίσης ανιχνευθεί σε διάφορα καπνιστά προϊόντα ή έτοιμα προς κατανάλωση γεύματα και μαλακά οστρακοειδή [157]. Σε ότι έχει να κάνει με τα ψάρια του γλυκού νερού, η ύπαρξη της είναι φυσιολογική καθώς φυσικώς απαντάται σε τέτοια περιβάλλοντα. Ο οργανισμός έχει αποδειχθεί επίσης ότι μολύνει συσκευές επεξεργασίας, τροφίμων, πρώτες ύλες, υπαλλήλους και τα διάφορα τμήματα της εφοδιαστικής αλυσίδας [158]. Η ανθεκτικότητα της σε πολλούς περιβαλλοντικούς και αντιμικροβιακούς παράγοντες ευνοεί την εξάπλωση της στα τρόφιμα και εν γένει το σχηματισμό βιοφίλμ [159]. Σε μια έρευνα, το στέλεχος ATCC 19111 προσκολλήθηκε με μεγάλη ευκολία σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα οι οποίες ήταν εμπλουτισμένες με θρεπτικό μέσο όμοιο με αυτό των περισσότερων θαλασσινών [160]. Σε

μια ξεχωριστή μελέτη που περιλάμβανε ωμά προϊόντα θαλασσινών έτοιμων προς κατανάλωση, τα αποτελέσματα σχηματισμού βιομεμβρανών *L. monocytogenes* ήταν αντικρουόμενα υποδεικνύοντας ότι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν έντονα την κινητικότητα της να σχηματίσει βιοφίλμ [157]. Τέλος παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα απομόνωσης *L. monocytogenes* από μονάδες επεξεργασίας μυδιών, τα οποία φανέρωσαν το σχηματισμό ισχυρών, μέτριων και χαμηλών επιπέδων βιοφίλμ [160].

3.4 Βιομηχανίες επεξεργασίας λαχανικών

Φυλλώδη λαχανικά όπως το σέλινο (celery), το λάχανο (cabbage) και το μαρούλι (lettuce) χρησιμοποιούνται σε μικτά προϊόντα τύπου σαλάτας και αναφέρονται από τις βιομηχανίες τροφίμων ως ελάχιστα επεξεργασμένα λαχανικά (minimally processed vegetables) αλλά και φρεσκοκομμένα λαχανικά. Λαμβάνοντας υπόψη το γρήγορο σύγχρονο τρόπο ζωής, τέτοια προϊόντα έτυχαν μεγάλης αναγνώρισης του καταναλωτικού κοινού και οι σχετικοί κλάδοι γνώρισαν μεγάλη ανάπτυξη κάτι που αποδεικνύεται και από τα στατικά διάφορων μελετών, τα οποία δείχνουν πως αυτά τα προϊόντα πλέον αποτελούν το 50% ή και παραπάνω του συνολικού όγκου λαχανικών που πωλούνται στα σούπερ μάρκετ [161]. Αυτή η ελάχιστη επεξεργασία των λαχανικών περιλαμβάνει το πλύσιμο, το κόψιμο, το ξεφλούδισμα, τον τεμαχισμό, την απολύμανση και ένα σύστημα αυτόματης παραλαβής έτσι ώστε να ελαχιστοποιείται ο χειρισμός, να διατηρείται η φρεσκάδα και η ποιότητα και να διασφαλίζεται ο μέγιστος χρόνος ζωής (shelf life).

3.4.1 Αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών

Η ασφάλεια των τροφίμων και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων που αναφέρθηκαν και κατ' επέκταση των λαχανικών και του σχηματισμού βιομεμβρανών εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματική εφαρμογή πρακτικών υγιεινής επεξεργασίας και χειρισμού σε όλη την αλυσίδα διανομής συμπεριλαμβανομένης της συλλογής, της επεξεργασίας, της λιανικής εμπορίας και της αποθήκευσης σε επίπεδο καταναλωτών. Ανεξάρτητα ωστόσο από αυτές τις προσεγγίσεις, το μικροβιακό φορτίο στα περισσότερα λαχανικά είναι υψηλό και το μικροβίωμα ποικίλει, γεγονός που οφείλεται κυρίως σε περιβαλλοντικούς παράγοντες και κυρίως της άμεσης ή έμμεσης επαφής με το χώμα, το μολυσμένο νερό ή τα ζώα. Σημαντική θεωρείται και η παράμετρος της θερμοκρασίας η οποία μπορεί να ευνοήσει το σχηματισμό βιομεμβρανών ή την επιμόλυνση των προϊόντων και του εξοπλισμού. Φαίνεται ότι σε πολλές περιπτώσεις κατά τον έλεγχο της θερμοκρασίας, η ψυκτική αλυσίδα υπόκειται σε διακυμάνσεις που μπορούν να θέσουν σε κίνδυνο την ακεραιότητα των προϊόντων ιδίως κατά τη μεταφορά ή την λιανική παραλαβή [162].

Έτσι λοιπόν, οι ακατάλληλες γεωργικές πρακτικές ενδέχεται να προκαλέσουν μόλυνση των λαχανικών με τροφιμογενή παθογόνα από το περιβάλλον. Τα παθογόνα *L. Monocytogenes* και *Salmonella* είναι γνωστό ότι σχετίζονται με ζωικά λύματα και κυρίως περιπτώματα ζώων για αυτό και από αρκετούς θεωρούνται ως δείκτης κοπρανώδους επιμόλυνσης. Η ελάχιστη επεξεργασία μπορεί να μειώσει τη συχνότητα εμφάνισης παθογόνων σε φυτικά προϊόντα, ωστόσο η διασταυρούμενη επιμόλυνση μπορεί επίσης να συμβεί κατά τη διέλευση μέσω του συστήματος έκπλυσης, του εξοπλισμού επεξεργασίας και των χειρισμών. Οι υγιεινές πρακτικές πρέπει επομένως να είναι αποτελεσματικές τόσο στον αγρό όσο και στο εργοστάσιο.

3.4.2 Αλληλεπιδράσεις εμπλεκόμενων μικροοργανισμών στις βιομηχανίες ιχθυηρών κατά το σχηματισμό βιοφίλμ

Ο βακτηριακός αποικισμός στις επιφάνειες των φυτών είναι ένα φυσικό φαινόμενο κατά την ανάπτυξη και τη φθορά των φυτών. Τα λαχανικά φαίνεται να είναι ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξη ενός ευρέος φάσματος μικροοργανισμών λόγω της υψηλής περιεκτικότητας τους σε θρεπτικά συστατικά, υγρασίας και το σχεδόν ουδέτερο pH. Στο παρακάτω πίνακα (πίνακας 3.3.) φαίνονται οι κυριότεροι εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί και ποια συνήθως προϊόντα αφορούν.

Πίνακας 3.3 Εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί και δυνατότητα σχηματισμού βιοφίλμ σε βιομηχανίες επεξεργασίας λαχανικών

Μικροοργανισμός	Προϊόν	Αναφορά
<i>B. cereus</i>	Μπρόκολο, κουνουπίδι, σέλερι, σπανάκι	[164]
<i>C. jejuni</i>	Κρεμμύδια, πιπεριές, αγγούρια	[164]
<i>C. botulinum</i>	Λάχανο, πιπεριές, μανιτάρια	[165]
<i>E. coli</i> 0157:H7	Μαρούλι, μελιτζάνα, ραπανάκι, ραδίκια	[165]
<i>L. monocytogenes</i>	Σαλάτα λαχανικών, τομάτες, αγγούρι	[166]
<i>Salmonella</i>	Μαϊντανός, καρότο, κρεμμύδια, σπανάκι	[166]

Γενικά, βακτήρια από τις οικογένειες των ψευδομονάδων και των εντεροβακτηριοειδών είναι γνωστό ότι κυριαρχούν στα φυλλώδη λαχανικά ενώ κάποια

στελέχη των *Bacillus*, *Erwinia* και *Pseudomonas* αντιπροσωπεύουν το κύριο μικροβίωμα αλλοίωσης το οποίο ευθύνεται για μεγάλο μέρος των οικονομικών απωλειών των βιομηχανιών λόγω της απόρριψης μεγάλου μέρους των προϊόντων ως χαλασμένα [163].

Υπάρχουν επίσης καταγεγραμμένα στοιχεία ότι τα λαχανικά μπορούν να υποστηρίξουν την ανάπτυξη τροφιμογενών παθογόνων ικανών να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες στον άνθρωπο. Γενικά, όπως και στις άλλες περιπτώσεις βιομηχανιών τροφίμων που εξετάστηκαν, το quorum sensing διαδραματίζει σπουδαίο ρόλο χωρίς ωστόσο να ξεκαθαρίζεται ο ρόλος του. Έως τώρα, φαίνεται ότι το πρώιμο στάδιο για ανάπτυξη βιοφίλμ εντός των βιομηχανιών τροφίμων αφορά τη μεταφορά πλαγκτονικών κυττάρων μέσω των ίδιων των λαχανικών. Παρόλα αυτά, περισσότερες έρευνες θα πρέπει να γίνουν ως προς την αλληλεπίδραση των εμπλεκόμενων μικροοργανισμών.

Κεφάλαιο 4 Βιομεμβράνες σε συστήματα κυκλοφορίας νερού

Το νερό θεωρείται ένας από τους σπουδαιότερους παράγοντες (αν όχι ο σπουδαιότερος) για την ανάπτυξη και διατήρηση της ζωής, είναι ανανεώσιμος φυσικός πόρος και η βιώσιμη διαχείριση του συμβάλει στην προστασία του περιβάλλοντος και της δημόσιας υγείας. Το νερό είναι ένα αγαθό αναντικατάστατο, καθημερινής χρήσεως και ευρείας κατανάλωσης. Ως πόσιμο λοιπόν, πρέπει να είναι ακίνδυνο από κάθε πλευρά, να μην είναι μολυσμένο (να μην περιέχει παθογόνα βακτήρια ή προϊόντα τους) και επίσης να μην περιέχει ρύπους (να μην περιέχει επικίνδυνες χημικές ουσίες). Τα ποιοτικά του χαρακτηριστικά θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ ορισμένων αποδεκτών ορίων, τα οποία καθορίζονται από Κοινή Υπουργική Απόφαση Υ2/2600/2001 που αποτελεί συμμόρφωση της Ελληνικής Νομοθεσίας προς την Ευρωπαϊκή Οδηγία 98/83/ΕΚ. Εάν το νερό δεν είναι απαλλαγμένο από επικίνδυνους μικροοργανισμούς είναι δυνατόν να αποβεί σε μέσο μεταφοράς, διασποράς και μεταδόσεως παθογόνων ή δυνητικά παθογόνων μικροοργανισμών. Αυτό σχετίζεται άμεσα και με το σχηματισμό βιομεμβρανών σε συστήματα κυκλοφορίας νερού των διάφορων επιχειρήσεων τροφίμων.

4.1 Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και η επίδραση τους σε εξοπλισμό και την ποιότητα του νερού

Οι βιομηχανίες τροφίμων είναι υποχρεωμένες να διαθέτουν επαρκή και κατάλληλη τροφοδοσία η οποία πρέπει να πληροί τις προδιαγραφές του πόσιμου νερού έτσι ώστε να θεωρείται ασφαλές για ανθρώπινη κατανάλωση ή χρήση. Τα ποιοτικά αυτά χαρακτηριστικά διακρίνονται σε επιμέρους κατηγορίες οι οποίες αφορούν (α) φυσικοχημικές ιδιότητες, (β) βιοχημικές ιδιότητες και (γ) μικροβιολογικές ιδιότητες του νερού. Στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, επιμέρους ιδιότητες μπορούν να αυξήσουν ή και να ελαττώσουν τη πιθανότητα σχηματισμού βιομεμβρανών. Ανάμεσα τους συγκαταλέγονται η θερμοκρασία, η ενεργός οξύτητα (pH), η αλκαλικότητα, η αγωγιμότητα, η αλατότητα, η θολερότητα, η οσμή, η γεύση, το χρώμα, η σκληρότητα, η συγκέντρωση διάφορων αλάτων, θρεπτικών στοιχείων και βαρέων μετάλλων αλλά και στερεές ουσίες.

Τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του νερού εκτός από την ικανότητα των μικροοργανισμών να σχηματίζουν βιομεμβράνες, επηρεάζουν επίσης όπως είναι αναμενόμενο με ποικίλους τρόπους την ποιότητα του. Μάλιστα, η αγωγιμότητα και η αλατότητα θεωρούνται ως δυο σχετικά αξιόπιστοι δείκτες του μεγέθους της ρύπανσης φυσικών νερών ενώ και τα ολικά αιωρούμενα στερεά θεωρείται ότι δίνουν σημαντικές πληροφορίες για τη θολερότητα του και σε ορισμένες περιπτώσεις (βιολογικά δείγματα) για

το μικροβιακό του φορτίο. Για αυτό σύμφωνα με μελέτες, θεωρείται πολύ σημαντική η συνεχής παρακολούθηση της κατάστασης των σωληνώσεων και της θολότητας του νερού των εγκαταστάσεων έτσι ώστε να προληφθούν διάφορα ανεπιθύμητα φαινόμενα όπως ο σχηματισμός βιομεμβρανών ο οποίος σχετίζεται άμεσα και με τη διάβρωση [167].

Το pH και η θερμοκρασία του νερού επηρεάζουν το είδος των αλάτων και σχετίζονται τόσο με το φαινόμενο της διάβρωσης όσο και με της προσκόλλησης. Επίσης, η αγωγιμότητα, αυξάνει τη θερμοκρασία και ευνοεί την ανάπτυξη μεγαλύτερου βαθμού μικροοργανισμών. Τα άλατα του μαγνησίου αν και δε σχετίζονται άμεσα με το σχηματισμό βιομεμβρανών, εκφράζουν την ολική σκληρότητα του νερού και δύνανται να σχηματίσουν επικαθίσματα τα οποία θα ελαττώσουν τη ροή που ως αποτέλεσμα θα έχει τη συσσώρευση μεγαλύτερων βακτηριακών πληθυσμών και άρα την αύξηση της πιθανότητας σχηματισμού βιομεμβρανών. Όσον αφορά τα ιχνοστοιχεία φαίνεται να είναι σημαντικά για την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηριδίων. Για παράδειγμα, ο σίδηρος αποδεδειγμένα βοηθά στην ανάπτυξη διάφορων μικροοργανισμών ενώ δημιουργεί και εναποθέσεις στις σωληνώσεις. Παρόμοια είναι και η δράση του μαγγανίου, το οποίο και αυτό διευκολύνει την ανάπτυξη μικροοργανισμών με αποτέλεσμα την αύξηση της θολότητας, τη δημιουργία οσμών και αποθέσεων.

4.2 Πηγές μικροβιακής μόλυνσης και αίτια σχηματισμού βιομεμβρανών

Το μικροβιακό φορτίο του νερού και γενικότερα η μικροβιολογική του κατάσταση επιβαρύνεται, όταν αυτό διέρχεται από περιοχές κοντά σε αστικά κέντρα, βιομηχανίες και αγροτικά συγκροτήματα. Εκτός από τα επιφανειακά ύδατα και τα υπόγεια ύδατα μολύνονται με μικροβιακούς ρύπους, ιδιαίτερα στη περίπτωση όπου οι υδροφόροι ορίζοντες βρίσκονται κοντά στις προαναφερθείσες περιοχές. Οι κύριες πηγές μικροβιακής επιμόλυνσης του νερού σχετίζονται με τυχόν απόβλητα που προέρχονται από τις βιομηχανίες, με τη παλαιότητα των συστημάτων κυκλοφορίας των βιομηχανικών τροφίμων αλλά και με τα περιττώματα των ζώων. Ασθένειες που σχετίζονται με μολυσμένο νερό συνήθως οφείλονται στη μόλυνση του από παθογόνους μικροοργανισμούς που υπάρχουν ή δύνανται να συσσωρευθούν στις προαναφερθείσες συνθήκες.

4.2.1 Ανθρώπινα απόβλητα-Περιττώματα

Τα περισσότερο επιφανειακά ύδατα, όπως λίμνες και ποτάμια συχνά ρυπαίνονται με μεγάλο όγκο αποβλήτων και άλλων ειδών απορρίψεων από τα αστικά κέντρα. Η κατάσταση αυτή επιβαρύνει τα νερά με μεγάλο αριθμό μικροοργανισμών και κυρίως παθογόνων οι οποίοι είναι επικίνδυνοι για τη δημόσια υγεία. Σημαντική παράμετρος που διαιωνίζει το πρόβλημα θεωρείται και η ελλιπής επεξεργασία τέτοιων λυμάτων. Πιο συγκεκριμένα, λίγες είναι οι

βιομηχανίες οι οποίες διαθέτουν επαρκή λειτουργία βιολογικού καθαρισμού. Έλλειψη τέτοιων συστημάτων, οδηγεί στη διοχέτευση “επεξεργασμένων” υδάτων στο περιβάλλον με κακή ποιότητα και υψηλό μικροβιακό φορτίο, η οποία εν τέλει θα ανακυκλωθεί μολύνοντας στο πέρασμα της τόσο επιφανειακά ύδατα όσο και υπόγειους υδροφορείς. Επίσης, στις βιομηχανίες η ύπαρξη υπονόμων κοντά στα συστήματα κυκλοφορίας νερού ενδέχεται να εγκυμονεί κινδύνους ειδικά σε περιπτώσεις όπου ενδεχομένως υπάρχουν τυχόν διαρροές.

Ομοίως τα ζώα και κυρίως και τα περιττώματα τους είναι μια σημαντική πηγή μόλυνσης των υδάτων και κυρίως των επιφανειών, καθώς μεταφέρουν παράσιτα, μύκητες, και βακτήρια σε συγκεντρώσεις που υπερβαίνουν κατά πολύ τα φυσιολογικά όρια. Πρέπει να τονισθεί ότι η μόλυνση στις περισσότερες περιπτώσεις είναι μεγάλη ειδικά αν αναφέρεται σε μεγάλες εγκαταστάσεις όπως τα διάφορα εκτροφία ζώων. Οι πιο συχνώς απαντώμενοι μικροοργανισμοί στα περιττώματα των ζώων είναι η *E. coli* O157:H7, το *Campylobacter jejuni* και *Giardia lamblia*.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, ως «πηγή» μόλυνσης θεωρούνται τόσο η ελλιπής όσο και η κακή επεξεργασία του νερού. Γενικά, η επεξεργασία του νερού περιλαμβάνει πολλά στάδια τα οποία είναι πολύ σημαντικά για την τελική του ποιότητα και τη μικροβιολογική του κατάσταση. Έτσι, αν κάποιο στάδιο έχει μειωμένη απόδοση ή παραληφθεί, τότε αυξάνεται σημαντικά τόσο η πιθανότητα επιμόλυνσης του των επόμενων σταδίων όσο και η χρήση μολυσμένου πλέον νερού ή εξοπλισμού. Τέλος, στις διάφορες περιπτώσεις επιμόλυνσης έχει βρεθεί ότι συμβάλλει σημαντικά και η κακή συντήρηση και καθαρισμός των σωληνώσεων και του εξοπλισμού που επεξεργάζεται και διοχετεύει το νερό.

4.3 Μικροβιολογικά χαρακτηριστικά νερού

Οι μικροοργανισμοί απαντώνται σε μεγάλο αριθμό και υπάρχουν παντού στη φύση. Έτσι και το νερό περιέχει αναπόφευκτα πολλά είδη μικροοργανισμών, σε ικανό αριθμό. Στις μέρες μας, παρατηρείται ότι υπάρχει μεγαλύτερη πιθανότητα να αυξηθεί παροδικά αριθμός των μικροοργανισμών και μάλιστα των παθογόνων, εξαιτίας της έντονης βιομηχανικής, αστικής και αγροτικής δραστηριότητας [168]. Είναι φανερό ότι η παρουσία των μικροοργανισμών συνδέεται άμεσα με την ποιότητα και την καταλληλότητα του νερού. Οι μικροοργανισμοί ως γνωστόν, θεωρούνται υπεύθυνοι για αρκετές ασθένειες που προέρχονται από το νερό, για αυτό και οι βιομηχανίες τροφίμων επενδύουν πολύ στον έλεγχο και τη προστασία των συστημάτων ύδρευσης τους από ανεπιθύμητους μικροοργανισμούς.

Εκτός του σχηματισμού βιομεμβρανών σε σωληνώσεις του δικτύου ύδρευσης ή των επιφανειών των τροφίμων σημαντικότερη θεωρείται και η επαφή νερού με σχετικά υψηλό μικροβιακό φορτίο το οποίο χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη σε διάφορες επεξεργασίες.

Ωστόσο, σε καθαρό νερό ή νερό με χαμηλή περιεκτικότητα σε θρεπτικά συστατικά, ο ολικός αριθμός των μικροοργανισμών είναι περιορισμένος αν και δύναται να υπάρξει μεγάλη ποικιλομορφία. Ομοίως, αν η περιεκτικότητα του νερού σε θρεπτικά συστατικά παρατηρείται η τάση της αύξησης του αριθμού των μικροοργανισμών κάτι που όπως είναι αναμενόμενο μειώνει τη ποιότητα του.

4.3.1 Εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί κατά το σχηματισμό βιομεμβρανών σε συστήματα ύδρευσης βιομηχανιών τροφίμων

Το δίκτυο διανομής του πόσιμου νερού αποτελεί ένα ευνοϊκό περιβάλλον για την ανάπτυξη διάφορων μικροοργανισμών. Τα είδη των βακτηρίων στο νερό ποικίλλουν και αυξομειώνονται ανάλογα με τις επικρατούσες συνθήκες. Ο λόγος ύπαρξης των περισσότερων βακτηρίων στο νερό είναι η παρουσία στο νερό ημιτελώς οξειδωμένων ενώσεων μετάλλων, όπως αυτών που αναφέρθηκαν νωρίτερα, οι οποίες αποτελούν πηγή ενέργειας για τα βακτήρια. Το νερό αποικίζεται κυρίως από σαπροφυτικούς ετερότροφους μικροοργανισμούς, όπως βακτήρια, μύκητες, ζύμες, που αναπτύσσονται αποικοδομώντας την υπάρχουσα οργανική ύλη [168]. Σπανιότερα, μπορούν να εντοπιστούν μικροοργανισμοί κοπρανώδους προελεύσεως όπως η *E. coli* ή ακόμη και κάποια πρωτόζωα που ενδεχομένως μπορούν να βρουν τις επιθυμητές συνθήκες ανάπτυξης στο περιβάλλον του νερού. Σχηματίζουν επίσης, βιομεμβράνες με πολύπλοκες δομές, όπου το ποσοστό συμμετοχής του κάθε μικροοργανισμού ποικίλλει. Γενικά, παρατηρείται ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί, παρότι μπορούν να προσκολληθούν σε επιφάνειες ή ήδη σχηματισμένες βιομεμβράνες, στη πλειοψηφία τους δεν έχουν την ικανότητα εκτεταμένης ανάπτυξης μέσα σε αυτή. Αυτό συνήθως οφείλεται στις ιδιαίτερες τροφικές απαιτήσεις τους ή στην αδυναμία τους να ανταπεξέλθουν σε ανταγωνιστικά περιβάλλοντα με τους άλλους αυτόχθονες μικροοργανισμούς [169].

Στις βιομηχανίες τροφίμων άλλα είδη που ενδέχεται να αφορούν τους μικροβιολόγους είναι οι ψευδομονάδες, η λετζιονέλλα, η γερσίνια, η εσερίχια και κάποια κλωστρίδια. Οι ψευδομονάδες είναι gram αρνητικά ραβδόμορφα βακτήρια, τα οποία απαντώνται συνήθως ως ευθείες και άλλοτε ως ελαφρώς καμπυλωμένες ράβδοι. Είναι ιδιαίτερα κινητικά, θετικά στην οξειδάση ενώ αναπτύσσονται σε απλά υποστρώματα χωρίς να έχουν ιδιαίτερες απαιτήσεις σε ανόργανα θρεπτικά συστατικά. Το βακτήριο *Pseudomonas aeruginosa* είναι το πιο διαδεδομένο αυτού του είδους και βρίσκεται συχνά στο νερό. Αναπτύσσεται στους 37-42°C, ανάγει τα νιτρικά και νιτρώδη, παράγει αμμωνία από τη διάσπαση του ακεταμιδίου, ρευστοποιεί τη ζελατίνη, υδρολύει την καζεΐνη και παράγει μια κυανοπράσινη χρωστική [170].

Από τα σημαντικότερα είδη που μπορούν να ανιχνευθούν στο νερό θεωρείται και η *Legionella*. Πρόκειται για ένα gram αρνητικό βακτήριο το οποίο έχει σχήμα βακίλου και τα κύτταρα τους είναι λεπτά με μήκος 2-20μm. Είναι μικροοργανισμοί θετικοί στη καταλάση και αρνητικοί στην ουρεάση και απαιτούν για την ανάπτυξη τους την ύπαρξη ιόντων τρισθενούς σιδήρου. Είναι ευκίνητοι και διαθέτουν μαστίγιο που βοηθά τη κίνηση τους. Αναπτύσσονται σε θερμοκρασιακό εύρος 20-46°C και 36°C. Τα βακτήρια του γένους απαντώνται συχνά στο πόσιμο νερό και στα επιφανειακά ύδατα, καθώς και στο νερό που χρησιμοποιείται στους πύργους ψύξης, στους ψεκαστήρες και στους εναλλάκτες θερμότητας. Κυριότερος εκπρόσωπος του γένους *L. pneumophila* το οποίο προκαλεί πνευμονία (ασθένεια των λεγεωνάριων) και ένα είδος πυρετού [171]. Η ανάπτυξη της νόσου της *Legionella* μέσα στα πρωτόζωα και στις βιομεμβράνες παίζει σημαντικό ρόλο στη μετάδοση της νόσου των λεγεωνάριων, καθώς αυξάνει τη την ικανότητα επιβίωσης τη και την αντοχή της στην υψηλή θερμοκρασία, στην οξύτητα και στα απολυμαντικά.

Ένας άλλος από τους παθογόνους μικροοργανισμούς που αποτελεί μέρος του φυσικού υδάτινου συστήματος είναι η *L. pneumophila*. Πρόκειται για βακτήριο που αναπτύσσεται σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες και φαίνεται ότι ο σχηματισμός βιομεμβρανών του ευνοείται απουσία πρωτοζώων. Αυτό γίνεται αντιληπτό αν ληφθεί υπόψη ότι η *Legionella* επιβιώνει στο νερό και σε υγρά περιβάλλοντα, ως ενδοκυτταρικό παράσιτο των πρωτοζώων. Σημαντική θεωρείται και η ικανότητα της να υπερτερεί έναντι άλλων μικροοργανισμών που συμμετέχουν στις βιομεμβράνες. Πιο συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η *L. pneumophila* σε δίκτυο νερού με πλαστικούς σωλήνες, επικρατεί των άλλων μικροοργανισμών στις βιομεμβράνες, ξεπερνώντας το 50% του ολικού μικροβιώματος της βιομεμβράνης και σε θερμοκρασία 40°C. Φαίνεται δηλαδή να ευνοείται η ανάπτυξη της στις πλαστικές επιφάνειες, ενώ σε χάλκινους σωλήνες παρατηρήθηκε καταστολή της βιοσυσσώρευσης και μειωμένο βακτηριακό φορτίο. Φαίνεται επίσης ότι ο περιορισμός στη συγκέντρωση σιδήρου οδηγεί σε μεγάλη μείωση της μολυσματικότητας της *Legionella*. Αυτό είναι σύμφωνο και με άλλα παρόμοια ευρήματα που έχουν διαπιστώσει αρνητική συσχέτιση του αριθμού των απομονούμενων λεγεωνελλών από συστήματα κυκλοφορίας νερού και της παρουσίας ιόντων χαλκού και θετική συσχέτιση με τη παρουσία ιόντων σιδήρου στο νερό που κυκλοφορεί σε αυτά [172].

4.4 Βιοδιάβρωση συστημάτων κυκλοφορίας και βιομεμβράνες

Η φυσική παρουσία μικροοργανισμών σε μεταλλικές επιφάνειες, καθώς και οι μεταβολικές τους δραστηριότητες, δημιουργούν τη μικροβιολογικά προκαλούμενη διάβρωση ή βιοδιάβρωση (εικόνα 4.1). Η παρουσία των μικροοργανισμών τροποποιεί την απόθεση και

τις ταχύτητες διάλυσης των ανόργανων υλικών και με το μηχανισμό αυτόν επηρεάζει τις ηλεκτροχημικές ιδιότητες των μετάλλων και των κραμάτων [173]. Τα αποτελέσματα της διάβρωσης ενίοτε μπορούν να οδηγήσουν σε επιλεκτική αποδέσμευση μετάλλου από κράματα, σε ρωγμές λόγω ανάπτυξης της τάσης αλλά και σε διασπορά των βιομεμβρανών εντός των εγκαταστάσεων τροφίμων με αυξημένες πιθανότητες διασταυρούμενης επιμόλυνσης.



Εικόνα 4.1 Διαβρωμένος σωλήνας δικτύου διανομής νερού από βιοφίλμ (Πηγή: MSU Center for Biofilm Engineering)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι αποικίες που αναπτύσσονται στις δομές βιομεμβρανών δεν αποτελούνται από ενιαίο μικροβιακό πληθυσμό, και ως εκ τούτου δεν παρουσιάζουν ούτε όμοια δομή ούτε έχουν τις ίδιες μεταβολικές λειτουργίες. Έτσι, στα ανώτερα στρώματα επικρατούν αερόβιες συνθήκες, ενώ κάτω από το στρώμα αυτό η συγκέντρωση οξυγόνου μειώνεται και καταλήγει σε αναερόβιες συνθήκες κοντά στην επιφάνεια επαφής. Η ύπαρξη διαφορετικών συγκεντρώσεων οξυγόνου σε δυο διαφορετικές περιοχές προκαλεί διαφορά ηλεκτρικού δυναμικού και συνεπώς διαβρωτικά ρεύματα. Η περιοχή όπου επικρατούν οι αναερόβιες συνθήκες γίνεται άνοδος και η μη αποικισμένη περιοχή όπου υπάρχει οξυγόνο γίνεται κάθοδος.

Στα κατώτερα στρώματα των βιομεμβρανών δημιουργούνται συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, κατάλληλες για την ανάπτυξη αναερόβιων, όπως τα θειοαναγωγικά βακτήρια. Οι μικροοργανισμοί αυτοί αποτελούν την πλέον συχνή αιτία βιοδιάβρωσης, ανάγοντας τα θειικά σε υδρόθειο, το οποίο αντιδρά με τα μέταλλα και παράγει θειούχα άλατα μετάλλων ως προϊόντα διάβρωσης. Σύνηθες σημείο ανάπτυξης των θειοαναγωγικών βακτηρίων είναι τα τερματικά σημεία του δικτύου, όπου το νερό είναι στάσιμο. Χαρακτηριστικά διάβρωσης

αυτής της κατηγορίας είναι η οσμή υδρόθειου, το μαύρισμα του νερού και οι μαύρες αποθέσεις.

4.4.1 Παραπροϊόντα του μεταβολισμού των βακτηρίων

Τα παραπροϊόντα του μεταβολισμού ορισμένων βακτηρίων αποτελούν μια άλλη αιτία διάβρωσης. Σε αυτή την ομάδα περιλαμβάνονται οι ακόλουθοι μικροοργανισμοί: (α) βακτήρια που παράγουν οξέα, (β) βακτήρια που παράγουν υδρογόνο και (γ) σιδηροβακτήρια. Τα βακτήρια μπορούν να παράγουν διαβρωτικούς μεταβολίτες, όπως τα διάφορα οργανικά και ανόργανα οξέα. Για παράδειγμα, ο *Thiobacillus thiooxidans* παράγει θειικό οξύ και ο *Clostridium aceticum* οξικό οξύ. Τα οξέα που παράγουν τέτοια βακτήρια, επιταχύνουν τη διάβρωση και αυξάνουν τη πιθανότητα διασποράς του σχηματισμού βιομεμβρανών εντός των εγκαταστάσεων των βιομηχανιών τροφίμων [174].

Επίσης, πολλοί μικροοργανισμοί παράγουν αέριο υδρογόνο ως προϊόν ζύμωσης των υδρογονανθράκων. Το υδρογόνο διαχέεται στο μέταλλο, δημιουργώντας εύθραυστα υδρίδια του μετάλλου. Ακόμη, τα βακτήρια που οξειδώνουν το σίδηρο, όπως η *Gallionella*, ο *Sphaerotilus*, ο *Leptothrix* και ο *Crenothrix*. Πρόκειται για αναερόβια νηματοειδή βακτήρια, τα οποία οξειδώνουν το διαλυτό δισθενή σίδηρο στην αδιάλυτη τρισθενή μορφή του. Ο δισθενής σίδηρος μπορεί να προέρχεται είτε από το εισερχόμενο νερό, είτε από την επιφάνεια του μετάλλου. Ο τρισθενής σίδηρος που παράγουν τα βακτήρια έλκει τα ιόντα του χλωρίου και παράγει αποθέσεις τρισθενούς χλωριούχου σιδήρου. Τα σιδηροβακτήρια που αναπτύσσονται σε ανοξείδωτο χάλυβα δημιουργούν αποθέσεις που έχουν τυπικά καφέ ή κόκκινο καφέ χρώμα [175].

Κεφάλαιο 5 Στρατηγικές πρόληψης και αντιμετώπισης σχηματισμού βιομεμβρανών στις βιομηχανίες τροφίμων

Το biofouling είναι ένα μείζον πρόβλημα στα συστήματα επεξεργασίας τροφίμων καθώς προκαλεί μείωση της ροής, της απόδοσης με ό,τι οικονομικές συνέπειες αυτό συνεπάγεται αλλά και απαιτεί την αύξηση της συχνότητας καθαρισμού. Ο προληπτικός έλεγχος για την ύπαρξη μικροοργανισμών ή σχηματισμένων βιοφίλμ στα διάφορα εργοστάσια παραγωγής τροφίμων είναι ιδιαίτερα σημαντικός καθώς αφενός αποτρέπει την εμφάνιση όλων των ανεπιθύμητων προβλημάτων που ήδη αναφέρθηκαν και αφετέρου διασφαλίζει ότι παράγονται ασφαλή και ποιοτικά τρόφιμα. Σε αυτά τα γενικότερα πλαίσια πρόληψης και αποτροπής, απαιτούνται αυστηρά μέτρα ελέγχου σε κάθε στάδιο του πολύπλοκου οικοσυστήματος των τροφίμων [176].

Γενικά, όπως πολλοί μικροβιολόγοι και τεχνολόγοι τροφίμων αναφέρουν, ακόμη και με τη χρήση των πιο αποτελεσματικών μεθόδων και στρατηγικών εάν δεν τηρούνται βασικές αρχές όπως αυτές της ορθής βιομηχανικής πρακτικής (GMP) και υγιεινής (GHP), το πιο πιθανό είναι να μην επιτευχθεί ούτε η επιθυμητή πρόληψη αλλά ούτε η απομάκρυνση των ανεπιθύμητων βιομεμβρανών. Έτσι λοιπόν, ο περιορισμός της διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και νερού είναι απαραίτητος και άμεσα συνυφασμένος με τον ορθό, συχνό και κυρίως αποτελεσματικό καθαρισμό. Ο έλεγχος των συνθηκών του περιβάλλοντος είναι εξίσου σημαντικός και ιδίως στις βιομηχανίες τροφίμων η θερμοκρασία πρέπει να ελέγχεται ενώ πρέπει επίσης να χρησιμοποιείται κατάλληλα σχεδιασμένος εξοπλισμός. Σε πολλές περιπτώσεις η απομάκρυνση βιομεμβρανών από χώρους και επιφάνειες βιομηχανιών τροφίμων μπορεί να αποβεί ιδιαίτερα δύσκολη και απαιτητική καθώς παρατηρείται η γρήγορη προσαρμογή στις επικρατούσες συνθήκες [177].

Τα παλαιότερα χρόνια, οι μέθοδοι και στρατηγικές που χρησιμοποιούνταν τόσο για την καταπολέμηση των ανεπιθύμητων μικροοργανισμών όσο και των βιομεμβρανών που αυτά ενδέχεται να σχηματίσουν ήταν πολύ περιορισμένες ενώ χαρακτηρίζονταν και από σημαντικά μειονεκτήματα. Η χρήση τοξικών χημικών καθαριστικών και απολυμαντικών μπορεί να επιφυλάσσει σημαντικές επιπτώσεις τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον άνθρωπο. Φαίνεται επίσης, ότι αρκετά από αυτά τα μέσα ευθύνονται και για διάφορων τύπου διαβρώσεων του εξοπλισμού (ειδικά όταν αυτός είναι ακατάλληλος). Πλέον στις μέρες, παρατηρείται η τάση για χρήση εναλλακτικών μεθόδων καθαρισμού οι οποίες θα διασφαλίζουν τη προστασία του περιβάλλοντος και του προσωπικού, θα μειώνουν τις ενεργειακές απαιτήσεις ενώ θα παραμένουν το ίδιο και περισσότερο αποτελεσματικές.

Κατά καιρούς, διάφορες απόψεις έχουν λεχθεί και διάφορες στρατηγικές και μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί άλλες περισσότερο και άλλες λιγότερο αποτελεσματικές. Φαίνεται ότι, μια μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά σε ένα συγκεκριμένο είδος βιομηχανίας ή κατηγορίας προϊόντων ίσως να μην είναι το ίδιο αποτελεσματική σε ένα άλλο. Οι κλασσικές μέθοδοι πρόληψης και αποτροπής αφορούν το φυσικό καθαρισμό, τη χρήση χημικών και ενίοτε αντιβιοτικών. Άλλες εναλλακτικές στρατηγικές που είτε ήδη βρίσκουν εφαρμογή είτε εξετάζεται εκτενώς η χρήση τους αφορούν: τη χρήση ενζύμων, τη χρήση διάφορων αιθέριων ελαίων από φυτικά εκχυλίσματα, τη χρήση βακτηριοφάγων, τη χρήση σύγχρονων μέσων όπως το υπερ-κρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα ($scCO_2$), το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ή του όζοντος (O_3). Επίσης, στις περιπτώσεις πολύ ανθεκτικών βιοφίλμ, χρησιμοποιούνται μέθοδοι όπως αυτή των υπερήχων η οποία θα διαταράξει την εσωτερική δομή της εξωκυττάριας ευνοώντας έτσι (συνεργαστική δράση) τη δράση των υπόλοιπων παραγόντων που θα χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια [178].

5.1 Παράγοντες που επηρεάζουν τις στρατηγικές καθαρισμού

Κατά τη διάρκεια σχεδιασμού του πλάνου καθαρισμού πρέπει να ληφθούν υπόψη όλες εκείνες οι παράμετροι οι οποίες αφενός θα διασφαλίσουν την ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων και αφετέρου θα αποτελέσουν την οικονομικότερη επιλογή για τις βιομηχανίες. Βασικοί παράμετροι αποτελούν: ο σχεδιασμός της γραμμής παραγωγής (συνεχής ή διακοπτόμενη, ευθεία ή καμπυλωτή), ο σχεδιασμός του εξοπλισμού (μεγάλος ή όχι αριθμός εξαρτημάτων), οι επιφάνειες των τροφίμων (τραχύτητα, απορροφητικότητα), οι διάφορες μέθοδοι επεξεργασίας (θέρμανση ή ψύξη) αλλά και ενδεχομένως το είδος του προϊόντος που παράγεται. Για παράδειγμα μια κλασσική μέθοδος καθαρισμού σε έναν εναλλάκτη θερμότητας στον οποίο δύνανται να σχηματιστούν ανθεκτικά βιοφίλμ από βακίλους δεν θεωρείται αποτελεσματική. Μια ακόμη παράμετρος η οποία επηρεάζει το είδος καθαρισμού που θα επιλεγεί αφορά τις συνθήκες περιβάλλοντος που επικρατούν οι οποίες σχετίζονται άμεσα και με τις διάφορες τεχνολογικές διεργασίες. Οι βέλτιστες συνθήκες καθαρισμού όπως είναι αναμενόμενο ποικίλουν όχι μονό μεταξύ του διαφορετικού είδους βιομηχανιών αλλά και μεταξύ παρόμοιων προϊόντων άλλης όμως μονάδας παραγωγής καθώς επίσης και με την πάροδο του χρόνου μιας δεδομένης μονάδας [179].

Ακόμη, χαρακτηριστικό των περισσότερων μεθόδων καθαρισμού είναι η μεταβλητότητα που παρουσιάζουν ως προς την ικανότητα τους να εξαλείφουν επιφανειακά προσκολλημένα βακτήρια ή βιομεμβράνες. Αυτή η μεταβλητότητα για τους περισσότερους επιστήμονες ωστόσο δε προκαλεί έκπληξη δεδομένου ότι εκτός από τις προαναφερθείσες παραμέτρους μια σειρά από άλλους παράγοντες οι οποίοι επίσης επηρεάζουν την επιλογή

της κατάλληλης μεθόδου αλλά και την αποτελεσματικότητα της. Η φύση, η σύνθεση και η συγκέντρωση του καθαριστικού παράγοντα αλλά και αντίστοιχα η φύση, η σύνθεση (εμπλεκόμενοι μικροοργανισμοί) και ηλικία του βιοφίλμ καθορίζουν σημαντικά τις στρατηγικές πρόληψης και απομάκρυνσης.

5.2 Φυσικός καθαρισμός

Ο φυσικός καθαρισμός αποτελεί ουσιαστικά τον κλασικό καθαρισμό κατά τον οποίο ενδείκνυται η χρήση διάφορων ξέστρων και βουρτσών αλλά και μέσων όπως το ρεύμα αέρα και κυρίως το νερό υπό επαρκή πίεση. Η στροβιλώδης ροή του νερού είναι πολύ σημαντική όπως και το βούρτσισμα ασκούν μηχανικές πιέσεις οι οποίες απομακρύνουν ανεπιθύμητα υπολείμματα τροφίμων αλλά και διαταράσσουν τη δομή ανθεκτικών βιοφίλμ διευκολύνοντας στη συνέχεια την απομάκρυνση τους με την επίδραση κάποιου χημικού μέσου. Στις μέρες μας, ο φυσικός καθαρισμός φαίνεται ότι από μόνος του δεν είναι τόσο αποτελεσματικός δεδομένης και της ανθεκτικότητας των βιομεμβρανών σε μια σειρά από παράγοντες που ήδη αναφέρθηκαν. Παρόλα αυτά, αποτελεί το ιδανικό πρώτο στάδιο το οποίο μέσω της διαβροχής ή της μηχανικής καταπόνησης (εξαιτίας της ελεγχόμενης πίεσης κατά τη παροχή νερού), διευκολύνοντας το έργο μετέπειτα σταδίων [180].

Πολύ σημαντικό στοιχείο σε αυτό το είδος καθαρισμού είναι το νερό που χρησιμοποιείται. Εκτός των δεδομένων απαιτήσεων (καταλληλότητας ποσίου), πρέπει η θερμοκρασία του να είναι κρύα ή το πολύ χλιαρή. Με τον τρόπο αυτό, εκτός από το ότι περιορίζεται η ενεργειακή κατανάλωση, αποφεύγονται και τυχόν προβλήματα που προκύπτουν από το σχηματισμό επικαθήσεων τα οποία σχετίζονται με τη ζελατινοποίηση του αμύλου ή τη μετουσίωση πρωτεϊνών που το ζεστό νερό δύναται να προκαλέσει. Ακόμη, ο φυσικός καθαρισμός αποτελεί τη καλύτερη επιλογή μετά την εφαρμογή χημικών μέσων καθώς από τη μια απομακρύνει τυχόν υπολείμματα απορρυπαντικού ή από την άλλη παρασύρει πιο εύκολα υπολείμματα βιοφίλμ που κατάφεραν και επιβίωσαν των μεθόδων που χρησιμοποιήθηκαν [181].

Με τη πάροδο των χρόνων έγινε μια προσπάθεια ποιοτικής αναβάθμισης του φυσικού καθαρισμού με στόχο την αντιμετώπιση ενός σημαντικού μειονεκτήματος. Αυτό αφορά το λύσιμο των διάφορων σωληνώσεων ή του εξοπλισμού το οποίο είναι απαραίτητο αυξάνοντας το χρονικό και εργατικό κόστος. Για αυτό το λόγο πλέον εφαρμόζεται ένα πιο εύελκτο σχήμα φυσικού καθαρισμού που αφορά τα συστήματα επιτόπου καθαρισμού (cleaning in place, CIP) το οποίο δεν απαιτεί το λύσιμο των διάφορων συσκευών, είναι ταχύτερο, αποδοτικότερο αλλά και μειώνει τη συχνότητα ολικού καθαρισμού. Κυριότερες εφαρμογές του αφορούν τη κυκλοφορία μέσα σε σωληνώσεις και τα διάφορα στάδια

διαβροχής ή έκπλυσης πριν ή μετά την εφαρμογή χημικών μέσων. Η μέθοδος CIP εφαρμόστηκε αρχικά σε γαλακτοβιομηχανίες για την αντιμετώπιση θερμοάντοχων βιομεμβρανών ωστόσο σήμερα έχει πολύ ευρύτερη χρήση σε περισσότερων ειδών βιομηχανίες. Τέλος, παρόλο που οι διάφορες παραλλαγές της CIP απαιτούν ειδικό εξοπλισμό γεγονός που επιβαρύνει το κόστος θεωρούνται μέθοδοι οι οποίες αντισταθμίζουν και κάνουν γρήγορη απόσβεση του αρχικού κεφαλαίου εξαιτίας των λειτουργικών πλεονεκτημάτων που διαθέτουν [182].

5.2.1 Μηχανικές μέθοδοι καθαρισμού (Τριβή)

Με τον όρο μηχανικές μέθοδοι καθαρισμού ορίζονται όλες εκείνες οι διαδικασίες κατά τις οποίες χρησιμοποιούνται διάφορες βούρτσες, ξέστρα ή συνδυασμός τους με ταυτόχρονη εφαρμογή ρεύματος ατμού (νερό υπό πίεση) ή και απορρυπαντικών. Και οι δυο τύποι καθαρισμού ασκούν μια μηχανική δράση η οποία διαταράσσει τη δομική σταθερότητα των βιομεμβρανών με αποτέλεσμα την ευκολότερη απομάκρυνση τους.

Έχει επίσης βρεθεί ότι για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των διάφορων μηχανικών μεθόδων καθαρισμού συνίσταται αρχικά η χρήση διάφορων απορρυπαντικών ή και σκέτου νερού που σε πρώτο επίπεδο διαβρέχουν και αποκολλούν τους ρύπους δημιουργώντας ένα γαλάκτωμα το οποίο εμποδίζει την εκ νέου απόθεση τους. Αυτά τα μέσα πρέπει ωστόσο να καλύπτουν μια σειρά από απαιτήσεις (να μην είναι διαβρωτικά, να είναι χημικώς αδρανή κ.α) που ορίζονται από τη νομοθεσία έτσι ώστε να διασφαλίζεται η ασφάλεια των τροφίμων. Όσον αφορά την ανάπτυξη βιομεμβρανών, τονίζεται ότι ο φυσικός και χημικός καθαρισμός των εγκαταστάσεων, των επιφανειών και του εξοπλισμού πρέπει να πραγματοποιείται αμέσως μετά τη παραγωγή.

Ακόμη, οι βούρτσες που χρησιμοποιούνται κατά το μηχανικό καθαρισμό θα πρέπει να ταιριάζουν στο σχήματα της επιφάνειας που καθαρίζεται και να μην ενέχουν κίνδυνο για τη διάβρωση της. Φαίνεται ότι σε πάγκους κοπής κρεατοσκευασμάτων καλύτερη απόδοση είχαν βούρτσες που διέθεταν κεφαλή ψεκασμού απ' ότι οι κλασικές. Ανάλογα με το είδος του ρύπου και την επιφάνεια καθαρισμού, οι βούρτσες αυτές μπορεί να είναι μεταλλικές, από ίνες ή νάιλον. Σε κάθε περίπτωση οι βούρτσες από νάιλον θεωρούνται αρκετά δυνατές, εύκαμπτες και ανθεκτικές ενώ οι μεταλλικές είναι ιδανικές για χώρους και εγκαταστάσεις όπου απαιτείται υψηλότερης αντοχής τρίψιμο.

Σε άλλες περιπτώσεις, κατά τον μηχανικό καθαρισμό ενδέχεται να χρησιμοποιούνται και ξέστρες ή σφουγγάρια. Για παράδειγμα, ανάλογα το προϊόν και το είδος του ρύπου οι ξέστρες είναι απαραίτητες καθώς είναι ικανές να απομακρύνουν ανθεκτικές αποθέσεις. Σε άλλες περιπτώσεις, τα σφουγγάρια χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό δεξαμενών όπου

αυτός είναι δυνατός. Τέλος, αν και ο τρόπος με τον οποίο ο μηχανικός καθαρισμός επιδρά στη δομή των βιομεμβρανών κατά την απομάκρυνση τους δεν έχει γίνει εντελώς ξεκάθαρος, η συγκεκριμένη μέθοδος συνεχίζει να αποτελεί κυρίαρχη επιλογή καθώς πρόκειται για μια απλή, εύκολη, γρήγορη και οικονομική μέθοδο η οποία δεν απαιτεί ιδιαίτερη εκπαίδευση και εξοπλισμό. Παρόλα αυτά, σε περιπτώσεις διασταυρούμενης επιμόλυνσης μεγάλης έκτασης ή επίμονων ρύπων και βιομεμβρανών απαιτείται η περαιτέρω απολύμανση των εγκαταστάσεων με στόχο τη ριζική επίλυση των προβλημάτων.

5.3 Απολύμανση

Ενώ ο καθαρισμός γίνεται για την επίτευξη φυσικής και χημικής καθαρότητας, η απολύμανση ορίζεται ως διαδικασία με άμεσο αποτέλεσμα που ως στόχο έχει την πλήρη απομάκρυνση ή καταστροφή βακτηρίων και βιοφίλμ. Η αντοχή που παρουσιάζουν οι διάφοροι μικροοργανισμοί ή οι βιομεμβράνες που αυτοί σχηματίζουν σε απολυμαντικά μέσα ή αντιμικροβιακούς παράγοντες κατέστησε αναγκαία την ανάπτυξη νέων μεθόδων για την καταπολέμηση ανεπιθύμητων φαινομένων. Γενικά, η απολύμανση μπορεί να διακριθεί σε δυο μεγάλες κατηγορίες με την πρώτη να αφορά διάφορες φυσικές μεθόδους ενώ η δεύτερη κατηγορία σχετίζεται με τη χρήση διάφορων χημικών μέσων (χημική απολύμανση).

5.3.1 Φυσικές μέθοδοι απολύμανσης

5.3.1.1 Θέρμανση και ακτινοβολίες

Στις φυσικές μεθόδους απολύμανσης συγκαταλέγονται όλες εκείνες οι τεχνικές που αξιοποιούν φυσικά φαινόμενα ή μεταβολές με την ελάχιστη δυνατή παρέμβαση τόσο από τον άνθρωπο είτε από άλλα μέσα. Οι πιο χρησιμοποιούμενες έως τώρα μέθοδοι αφορούν τη θέρμανση, τις διάφορες ακτινοβολίες και τους υπερήχους. Όσον αφορά τη θέρμανση, αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω της παροχής ζεστού αέρα είτε με μέσω της ροής νερού σε θερμοκρασία κοντά σε αυτή του βρασμού. Ο τρόπος εφαρμογής, ο χρόνος, η ακριβής θερμοκρασία και ενδεχομένως επιπλέον στάδια καθαρισμού ή απολύμανσης που απαιτούνται, στη προκειμένη περίπτωση καθορίζονται από το είδος του μέσου που καθαρίζεται αλλά και τη φύση του ρύπου ή τη σύνθεση του βιοφίλμ.

Τόσο ο αέρας όσο και το νερό χρησιμοποιούνται όπως είναι φανερό για την αποστείρωση μεγάλων χώρων ή επιφανειών (δεξαμενές, περιέκτες, σωλήνες πλήρωσης υλικών κ.α). Σύμφωνα με έρευνες, και για τα δυο μέσα βασικό στοιχείο έτσι ώστε να είναι αποτελεσματικά αποτελεί ο χρόνος δράσεως. Ελλιπής χρόνος δράσης οδηγεί σε ατελή απολύμανση, δίνοντας τη ψευδαίσθηση της επαρκούς αποτελεσματικότητας, κάτι αποτελεί βασικό αίτιο της αποτυχίας αρκετών συστημάτων διασφάλισης της ποιότητας [183].

Οι ακτινοβολίες υπό ορισμένες συνθήκες και προϋποθέσεις δύνανται να έχουν βακτηριογόνο δράση. Βασικό πλεονέκτημα αποτελεί η δυνατότητα εφαρμογής τους τόσο σε τμήματα των εγκαταστάσεων όσο και σε ορισμένα τρόφιμα. Η ακτινοβολίες που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα αφορούν την εκπομπή και διάδοση ενέργειας με τη μορφή κυμάτων. Αν και σύμφωνα με έρευνες οι οποίες πιστοποιούν την ασφάλεια τους, η χρήση τους σε μεγάλο βαθμό είναι ακόμη περιορισμένη εξαιτίας της δυσπιστίας που υπάρχει το ευρύτερο καταναλωτικό κοινό.

Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα τους στην απομάκρυνση βιοφίλμ, είναι αμφιλεγόμενη και επηρεάζεται σημαντικά από τη σύνθεση της βιομεμβράνης που πρόκειται να αντιμετωπιστεί. Σε γενικές γραμμές πάντως η αποτελεσματικότητα τους είναι συζητήσιμη γιατί σύμφωνα με πολλούς ερευνητές παρουσιάζουν περιορισμένη διεισδυτική ικανότητα, γεγονός που παρεμποδίζει τη δράση τους σε μικρή ακτίνα. Πρόκειται για μέθοδο που συνδυάζεται καλά και με άλλες μεθόδους ωστόσο απαιτεί μια σημαντική επένδυση για την εγκατάσταση της [184].

5.3.1.2 Υπέρηχοι

Οι περισσότερες από τις διαδικασίες καθαρισμού και απολύμανσης που περιεγράφηκαν έως τώρα είναι ήδη γνωστές και εφαρμόζονται σε αρκετές βιομηχανίες τροφίμων. Μια λιγότερο γνωστή τεχνική η οποία συνήθως χρησιμοποιείται συνδυαστικά είναι τα διάφορα συστήματα καθαρισμού με υπερήχους. Η χρήση υπερήχων είναι από τις πιο πρόσφατα και πολλά υποσχόμενες μεθόδους καθαρισμού. Πρόκειται ουσιαστικά για μια μορφή ενέργειας που παράγεται από ηχητικά κύματα συχνοτήτων που είναι αρκετές υψηλές για να ανιχνευθούν από το ανθρώπινο αυτί δηλαδή πάνω από 16kHz [185]. Κατά τη διάρκεια εφαρμογής (sonication) δημιουργούνται αλληπάλληλα διαμήκη κύματα τα οποία όταν έρθουν σε επαφή με ένα υγρό μέσο δημιουργούν περιοχές εναλλασσόμενης συμπίεσης και αποσυμπίεσης. Αυτές οι εναλλαγές προκαλούν το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαίωσης δηλαδή της δημιουργίας τοπικών φυσαλίδων οι οποίες έρχονται σε επαφή με το μέσο. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται μέσω των υψηλών πιέσεων που αναπτύσσονται τοπικά και συχνά οδηγούν σε κατάρρευση κάθε είδους δομής.

Ανάλογα με το εύρος και τη συχνότητα κυμάτων που χρησιμοποιούνται, ένας αριθμός φυσικών και βιοχημικών μεταβολών μπορούν να παρατηρηθούν, επιτρέποντας και την ανάλογο εύρος εφαρμογών. Όπως φαίνεται από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί, η απομάκρυνση του βιοφίλμ ή της υφιστάμενης βρωμιάς από τις επιφάνειες επιτυγχάνεται εξαιτίας της επίδρασης μηχανικών ενεργειών που προκαλούνται από τα παραγόμενα κύματα ως αποτέλεσμα χημικών με δημιουργούμενες ελεύθερες ρίζες [186]. Σε άλλη έρευνα,

δοκιμάστηκαν διαφορετικού τύπου (επίπεδη και καμπυλωτή) και συχνότητων συσκευές υπερήχων ως προς την αποτελεσματικότητα απομάκρυνσης σχηματισμένων βιομεμβρανών. Σύμφωνα λοιπόν με τον Oulahaal, με τη χρήση της επίπεδης συσκευής ήταν δυνατή η ολική απομάκρυνση βιοφίλμ στα οποία συμμετείχαν *E. coli* και *S. aureus* κάτι που ωστόσο δεν παρατηρήθηκε με την καμπυλωτή συσκευή [187].

Αυτό αποδεικνύει ότι, η αποτελεσματικότητα καθαρισμού με υπερήχους επηρεάζεται σημαντικά από παραμέτρους που αφορούν την οργανολογία και τη φύση του μέσου που χρησιμοποιείται. Βεβαία στη πράξη, κατά καιρούς έχει αμφισβητηθεί η ικανότητα χρήσης τέτοιων μηχανημάτων σε μεγάλα εργοστάσια παραγωγής εξαιτίας της πολυπλοκότητας του στησίματος παραγωγής (scale-up). Ωστόσο, οι υπέρηχοι θεωρούνται μια αξιόπιστη επιλογή για το καθαρισμό χώρων ή και δεξαμενών γαλακτοκομικών προϊόντων ή αλλαντικών ωρίμανσης.

5.3.2 Χημικές μέθοδοι απολύμανσης

Αναμφίβολα, τα συγκεκριμένα προϊόντα εξαιτίας της αποτελεσματικότητάς τους έχουν κατακτήσει μια πρωτεύουσα θέση στο τομέα της πρόληψης ή της απομάκρυνσης βιομεμβρανών. Ανάλογα τη περίπτωση, τον μικροοργανισμό και τη φύση του προϊόντος που παράγεται επιλέγεται και το κατάλληλο μέσο. Επί του παρόντος, υπάρχει μια τεράστια γκάμα προϊόντων για αυτό και οι απαιτήσεις της νομοθεσίας είναι ιδιαίτερα αυστηρές προσπαθώντας να περιορίσουν ακατάλληλα μέσα. Όσον αφορά το τρόπο δράσης τους αυτός ποικίλλει και επηρεάζεται άμεσα από τις φυσικοχημικές ιδιότητες της φόρμουλας. Ορισμένα προϊόντα αλλοιώνουν τις κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες ενώ άλλα προσβάλλουν ειδικά τμήματα των μικροβιακών κυττάρων που αλλοιώνουν τις μεμβράνες των βακτηρίων, στερώντας τις από λειτουργίες ζωτικής σημασίας. Παραδοσιακά έχουν χρησιμοποιηθεί απολυμαντικά με βάση το χλώριο ενώ σχετικά πιο πρόσφατα έκανα την εμφάνισή τους τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου, ανιονικά οξέα και διάφορα ιωδοφόρα.

5.3.2.1 Χλώριο

Το χλώριο είναι το πιο κλασικό και περισσότερο χρησιμοποιούμενο απολυμαντικό στις βιομηχανίες τροφίμων. Πρόκειται για απολυμαντικό που χρησιμοποιείται τόσο σε υγρή όσο και αέρια μορφή. Ωστόσο, εξαιτίας των κινδύνων χειρισμού που έχει στην αέρια μορφή του η χρήση του περιορίζεται στην αποστείρωση νερού τροφοδοσίας. Για την απολύμανση επιφανειών χρησιμοποιούνται τα παρακάτω παράγωγα χλωρίου: (α) υποχλωριώδες νάτριο (NaClO), (β) Χλωραμίνη T, (γ) Διχλωροϊοκυανουρικό νάτριο και (δ) Τριχλωροϊοκυανουρικό νάτριο. Όλα τα παραπάνω προϊόντα χαρακτηρίζονται από παρόμοιο μηχανισμό δράσης με την παραγωγή υποχλωριώδους οξέος να είναι το βασικότερο χαρακτηριστικό. Το

συγκεκριμένο οξύ ανάλογα τις συνθήκες περιβάλλοντος δίσταται περαιτέρω στο νερό αυξάνοντας έτσι περισσότερο τη δράση του [188].

Το χλώριο είναι αποτελεσματικό απολυμαντικό με εκτεταμένη χρήση. Οι συγκεντρώσεις στις οποίες παρουσιάζει τη μέγιστη δράση του ποικίλλουν αλλά κυμαίνονται περίπου μεταξύ 100 και 200 mg/L για 5-10 λεπτά. Επίσης πρόκειται για μέσο με σχετικά χαμηλό κόστος, γρήγορη δράση και εύκολο στη χρήση. Μοναδικό μειονέκτημα του αφορά τη μερική διάβρωση ελαστικών μερών όταν χρησιμοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις. Τέλος, η αποτελεσματικότητα του έναντι των βιομεμβρανών θεωρείται ικανοποιητική και αυξάνεται όταν σε αυτό προστεθούν επιπλέον χημικοί παράγοντες.

5.3.2.2 Ιώδιο

Το ιώδιο που περιέχεται στα ιωδοφόρα ήταν ήδη γνωστό πολλά χρόνια πριν. Παρόλα αυτά η χρήση του ως απολυμαντικό στις βιομηχανίες τροφίμων πραγματοποιήθηκε αρκετά αργότερα εξαιτίας βασικών μειονεκτημάτων που διαθέτει. Η μικρή του διαλυτότητα σε κρύο νερό, η υψηλή διαβρωτικότητα του για ορισμένα μέταλλα και η τοξικότητα του στην ελεύθερη του μορφή ήταν βασικοί αποτρεπτικοί παράγοντες οι οποίες ωστόσο στις μέρες μας ξεπεράστηκαν. Αυτό έγινε, όταν διαπιστώθηκε πως διάφορες επιφανειακά ενεργές ενώσεις μπορούν να διαλυτοποιήσουν το ιώδιο και να περιορίσουν τα άλλα μειονεκτήματά του. Η σύσταση των ιωδοφόρων αν και ποικίλει αποτελείται κυρίως από μη ιοντικές τασιενεργές ουσίες, φωσφορικό οξύ και ιώδιο.

Βασική προϋπόθεση για να επιτευχθεί η μέγιστη αποτελεσματικότητα τους είναι η χρήση τους σε όξινο περιβάλλον ($pH=4$) και σε θερμοκρασία μικρότερης των $40^{\circ}C$ λόγω πτητικότητας του I_2 . Όσον αφορά την αποτελεσματικότητα του στην απομάκρυνση βιοφίλμ βρέθηκε ότι καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται όταν τα ιωδοφόρα απελευθερώνονται σταδιακά και σε μικρές συγκεντρώσεις παρά όταν γίνεται εξολοκλήρου έκθεση σε μεγάλες συγκεντρώσεις [189].

5.3.2.3 Τεταρτοταγές αμμώνιο

Το τεταρτοταγές αμμώνιο αποτελεί την αιχμή του δόρατος για τη καταπολέμηση ανεπιθύμητων μικροοργανισμών και βιοφίλμ. Ανήκει στην ομάδα των κατιοντικών επιφανειακά ενεργών ουσιών και είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό για τα gram θετικά βακτήρια ενώ ταυτόχρονα είναι απόλυτα αβλαβές για τα υλικά επεξεργασίας. Προτιμάται επίσης επειδή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών καλύπτοντας μια μεγάλη γκάμα παραγόμενων προϊόντων, συνδυάζεται πολύ καλά με μη ιοντικά απορρυπαντικά ενώ είναι και πολύ εύκολο στη χρήση του.

Η αποτελεσματικότητα του είναι υψηλή όσον αφορά gram θετικούς βακίλους ενώ είναι λιγότερη υψηλή ενάντια σε κολοβακτηρίδια και ψυχρότροφους μικροοργανισμούς. Ακόμη, οι διάφορες ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου χαρακτηρίζονται από υπολειμματική δράση δημιουργώντας απόψεις που δίστανται σχετικά με ένα ζήτημα ασφάλειας και ποιότητας που δημιουργείται. Αυτή η υπολειμματική δράση είναι υπεύθυνη για τη δημιουργία ενός φίλμ το οποίο δρα προληπτικά μετά το καθαρισμό που ωστόσο όμως ενδέχεται να εγκυμονεί κινδύνους για την ασφάλεια των προϊόντων. Όσον αφορά τη έναν άλλο gram θετικό μικροοργανισμό, τη λιστέρια, τελευταίες έρευνες δείχνουν ότι ολόένα και αυξάνεται η αντοχή των βιοφίλμ που σχηματίζει κυρίως σε μονάδες ιχθυηρών γεννώντας ερωτηματικά έως πότε θα θεωρούνται ακόμη αποτελεσματικές αυτές οι ενώσεις [190].

5.4 Παραδείγματα απομάκρυνσης στις βιομηχανίες τροφίμων

5.4.1 Γαλακτοβιομηχανίες

Η μελέτη των βιοφίλμ γνωστοποίησε λεπτομέρειες της δομής τους, του τρόπου λειτουργίας τους και της ανθεκτικότητας τους, οι οποίες βοήθησαν στη περαιτέρω εμβάθυνση των προβλημάτων που αντιμετωπίζουν οι βιομηχανίες τροφίμων προσπαθώντας να δώσει στοχευμένες λύσεις όπου απαιτείται. Πλέον, παρατηρείται η τάση ανάπτυξης και εφαρμογής στοχευμένων προληπτικών προγραμμάτων καθαρισμού, τα οποία αναπροσαρμόζονται ανάλογα τις απαιτήσεις της κάθε επιχείρησης. Πιο συγκεκριμένα, στις γαλακτοβιομηχανίες εφαρμόζεται συχνά ένα σύστημα καθαρισμού που ονομάζεται καθαρισμός στο σημείο. Συνήθως αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζεται από τη δυνατότητα καθαρισμού πλήρων αντικειμένων εγκατάστασης ή ανοίγματος του εξοπλισμού και με μικρή ή καθόλου εμπλοκή του χειριστή. Στην ουσία, πρόκειται για κυκλοφορία διάφορων υγρών καθαρισμού μέσω μηχανών και άλλου μέρους του εξοπλισμού.

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στη διέλευση υγρών με υψηλή πίεση δημιουργώντας ένα μηχανικό φαινόμενο που δύναται να αποσπά αποθέματα γάλακτος. Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος καθαρισμού στο σημείο περιλαμβάνει τη διαδοχική πλύση αρχικά με καυστικό νάτριο και έπειτα με οξύ. Συνήθως χρησιμοποιούνται υδροξείδιο του νατρίου και νιτρικό οξύ, χημικές ουσίες δηλαδή οι οποίες επιλέγονται εξαιτίας της ικανότητας τους να αφαιρούν οργανικά (λίπη-πρωτεΐνες) και ανόργανα (φωσφορικό ασβέστιο στρώματα υπολειμμάτων πάνω στα οποία ευνοείται ο σχηματισμός βιομεμβρανών. Ωστόσο φαίνεται ότι αυτή η μέθοδος διαθέτει σημαντικούς περιορισμούς καθώς χρησιμοποιείται μόνο για τη διέλευση υγρών σε σωλήνες, εναλλάκτες θερμότητας, αντλίες και βαλβίδες.

Συνήθεστη της πρώτης μεθόδου καθαρισμού στη βιομηχανία γαλακτοκομικών είναι η τεχνική του ψεκασμού με τη χρήση κατάλληλων απορρυπαντικών στις άνω

επιφάνειες, τα οποία με τη πάροδο του χρόνου θα φθάσουν έως το πυθμένα της δεξαμενής. Όμως και πάλι, σύμφωνα με μελέτες που ερευνούσαν την αποτελεσματικότητα διάφορων τεχνικών καθαρισμού, ο ψεκάσμος συχνά θεωρείται ανεπαρκής κάτι που ωστόσο φαίνεται να διορθώνεται όταν χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες συσκευές ψεκάσμου οι οποίες θα προσδώσουν την απαραίτητη ορμή στο υγρό καθαρισμού.

Η κύρια διαφορά μεταξύ των δυο προαναφερθείσων μεθόδων αφορά τη χρήση του οξέος όπου είναι απαραίτητο στη πρώτη περίπτωση (καθαρισμός στο σημείο), έτσι ώστε να επιτευχθεί πλήρης απομάκρυνση παλαιών υπολειμμάτων πρωτεΐνης και των αλάτων από τις επιφάνειες του εξοπλισμού. Μια ακόμη σημαντική διαφορά των προγραμμάτων καθαρισμού σε γαλακτοβιομηχανίες αφορά την ύπαρξη ή όχι θερμαινόμενων επιφανειών στη γραμμή παραγωγής. Στο παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τυπικά παραδείγματα συστημάτων καθαρισμού και για τις δυο περιπτώσεις.

Πίνακας 5.1 Εφαρμογή συστημάτων καθαρισμού σε θερμαινόμενες ή μη επιφάνειες γαλακτοβιομηχανιών (Πηγή: Bylund, 1995)

Σύστημα καθαρισμού για παστεριωτήρες και άλλο θερμαινόμενο εξοπλισμό	
Βήμα 1	Πλύση με χλιαρό νερό για περίπου 10 λεπτά
Βήμα 2	Εφαρμογή αλκαλικού απορρυπαντικού διαλύματος για 30 λεπτά στους 75°C
Βήμα 3	Έκπλυση του διαλύματος απορρυπαντικού με χλιαρό νερό για 5 λεπτά
Βήμα 4	Εφαρμογή διαλύματος οξέος (νιτρικού) για 20 λεπτά στους 70°C
Βήμα 5	Έκπλυση με κρύο νερό αυτή τη φορά
Βήμα 6	Περαιτέρω πλύσιμο για σταδιακή ψύξη με κρύο νερό για 8 λεπτά
Σύστημα καθαρισμού για σωλήνες πλήρωσης και άλλο μη θερμαινόμενο εξοπλισμό	
Βήμα 1	Πλύση με χλιαρό νερό για 3 λεπτά
Βήμα 2	Εφαρμογή αλκαλικού απορρυπαντικού διαλύματος για 10 λεπτά στους 75°C
Βήμα 3	Έκπλυση του διαλύματος απορρυπαντικού με χλιαρό νερό για 5 λεπτά
Βήμα 4	Απολύμανση με ζεστό νερό 90-95°C για 5 λεπτά
Βήμα 5	Σταδιακή ψύξη με κρύο νερό για περίπου 10 λεπτά

Για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των μεθόδων καθαρισμού που εμπλέκονται στις γαλακτοβιομηχανίες, έχουν αναπτυχθεί επιπλέον προϊόντα τα οποία περιέχουν επιφανειοδραστικά, χηλικές ενώσεις, παράγοντες συμπλοκοποίησης και ενίοτε γαλακτωματοποιητές. Σε άλλη έρευνα, που αφορούσε γαλακτοκομικά προϊόντα, παρατηρήθηκε πως μια τυπική μέθοδος από τις προηγούμενες που αναφέρθηκαν δεν ήταν τόσο αποτελεσματική ως προς την εξάλειψη βιοφίλμ που σχηματίζονταν από θερμοάντοχα σπόρια ή από θερμοάντοχους στρεπτόκοκκους. Παρόλα αυτά, διαπίστωσαν ότι όταν

προστέθηκε καυστικό πρόσθετο (που περιείχε χηλικούς παράγοντες) και μίγμα νιτρικού οξέος (που περιείχε επιφανειοδραστικά), επιτεύχθηκε μια μείωση του πληθυσμού τριών τάξεων.

Σε μια άλλη προσπάθεια δοκιμάστηκε η προσπάθεια καθαρισμού με υπεροξείδιο του υδρογόνου το οποίο ήδη αποδεδειγμένα χρησιμοποιείται για να απομακρύνει βιοφίλμ από νοσοκομειακό εξοπλισμό. Οι ειδικοί παρατήρησαν ότι το απολυμαντικό που ως βάση είχε το υπεροξείδιο, ήταν το πιο αποτελεσματικό έναντι σε βιοφίλμ του γένους *Pseudomonas* όταν η μικροβιολογική του δραστηριότητα μετρήθηκε χρησιμοποιώντας συμβατικές καλλιέργειες. Η επίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου βασίζεται στη παραγωγή ελεύθερων ριζών οι οποίες με τη σειρά τους στοχεύουν στην αποσταθεροποίηση της τρισδιάστατης δομής της εξωκυττάριας μήτρας του βιοφίλμ.

Σε μια άλλη έρευνα όταν δοκιμάστηκε η επίδραση βιοκτόνου με βάση κάποιες αλδεΐδες, τα αποτελέσματα κάθε άλλο παρά ενθαρρυντικά ήταν. Όπως διαπιστώθηκε όχι μόνο δεν είχε κάποιο αποτέλεσμα αλλά μάλλον ευνόησε και τη σταθερότητα των βιομεμβρανών. Περαιτέρω έρευνες φανέρωσαν ότι το φαινόμενο δεν οφείλεται στην ανικανότητα των αλδεϋδών να διεισδύσει εσωτερικά της του βιοφίλμ αλλά στην ικανότητα του δεύτερου να προσαρμόζεται γρήγορα σε αντίξοα περιβάλλοντα. Για αυτό λοιπόν υποστηρίζεται πως γενικά πριν την οποιαδήποτε επίδραση με διάφορους χημικούς παράγοντες, πρέπει με κάποιο τρόπο να διαταράσσεται η δομή (μηχανικά κυρίως).

5.4.2 Βιομηχανίες επεξεργασίας και παραγωγή ιχθυηρών

Στη βιομηχανία ιχθυηρών αρκετές φορές τυγχάνει η αποτροπή σχηματισμού βιοφίλμ να πραγματοποιείται με πολύ απλούς τρόπους οι οποίοι έχουν το πλεονέκτημα ότι χρησιμοποιούνται και για άλλους τεχνολογικούς σκοπούς. Για παράδειγμα, ορισμένες διαδικασίες όπως η εμβάπτιση και η παραμονή σε πάγο φαίνεται να αποτρέπουν έστω και σε μικρό βαθμό το σχηματισμό βιοφίλμ σε προϊόντα οστρακοειδών από το σημείο παραγωγής έως το σημείο πώλησης ή περαιτέρω επεξεργασίας [191]. Λαμβάνοντας υπόψη τους σημαντικότερους μικροοργανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις ή να σχηματίσουν βιοφίλμ, σημαντική θεωρείται η καταπολέμηση διάφορων ειδών του γένους *Vibrio* και ιδίως του *V. vulnificus*, το οποίο συμμετέχει στα περισσότερα είδη βιοφίλμ που σχετίζονται με τα προϊόντα ιχθυηρών. Κατά καιρούς έχουν δοκιμαστεί διάφορες μέθοδοι και μέσα για την καταπολέμηση σχηματισμού βιομεμβρανών σε θαλασσινά με την αποτελεσματικότητά τους να ποικίλει.

Επί του παρόντος, η εφαρμογή υψηλής πίεσης είναι η καλύτερη δυνατή επιλογή για τον έλεγχο των επιπέδων του *V. vulnificus* σε ωμά στρείδια και χρησιμοποιείται κατά κόρων στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής για περισσότερο από μια δεκαετία. Η συγκεκριμένη μέθοδος δοκιμάστηκε και σε άλλα είδη του γένους *Vibrio* με τα αποτελέσματα να είναι εξίσου εντυπωσιακά, ωστόσο χρήση δεν πρέπει να αποτελεί πανάκεια καθώς σε άλλη έρευνα των Lakshmanan και Dalgaard (2004) αποδείχθηκε η αδυναμία απομάκρυνσης βιοφίλμ *L. Monocytogenes* σε σολομό κρύας κάπνισης [192]. Τέλος, άλλοι περιορισμοί της μεθόδου αφορούν τον πιθανό τραυματισμό μαλακών ιστών ορισμένων προϊόντων (μύδια-γαρίδες) αλλά και το σχετικά υψηλό αρχικό κεφάλαιο επένδυσης και τον εξειδικευμένο χειρισμό που απαιτούν οι οποίοι πολλές φορές αποτελούν τροχοπέδη για την χρήση από μικρομεσαίου βεληνεκούς βιομηχανίες.

Έτσι λοιπόν οι βιομηχανίες στράφηκαν και σε άλλες εναλλακτικές λύσεις για την αντιμετώπιση και πρόληψη του σχηματισμού βιομεμβρανών με καινοτομία αιχμής να θεωρείται το υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα ($scCO_2$). Εκτός της ικανότητας του να αποτρέπει το σχηματισμό βιομεμβρανών, το $scCO_2$ αποδεδειγμένα μπορεί να μειώσει και το βακτηριακό φορτίο στις περισσότερες γραμμές παραγωγής αποτελώντας πάντα μια αξιόπιστη και ανάλογα τη περίπτωση και το προϊόν λύση

5.5 Εναλλακτικές προσεγγίσεις πρόληψης-αντιμετώπισης βιομεμβρανών

5.5.1 Χρήση ενζύμων

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση ενζύμων αποτελεί μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική προσέγγιση στο χώρο αντιμετώπισης μικροοργανισμών και βιομεμβρανών η οποία μεταξύ των άλλων είναι και άκρως φιλική προς το περιβάλλον καθώς δε χρησιμοποιούνται καθόλου χημικοί παράγοντες. Σύμφωνα με έρευνες [193], τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται αναδεικνύουν τη δράση τους μέσω τεσσάρων πιθανών τρόπων:

- Αποικοδομώντας διάφορα πολύ κρίσιμα συστατικά της εξωκυττάριας μήτρας του βιοφίλμ
- Προκαλώντας κυτταρική λύση
- Εμποδίζοντας τη διακυτταρική επικοινωνία (quorum sensing)
- Απενεργοποιώντας ή καταλύοντας το σχηματισμό ενώσεων που δρουν προστατευτικά ως προς την αντοχή σε διάφορους αντιμικροβιακούς παράγοντες

Από τον τρόπο δράσης τους γίνεται αντιληπτό ότι τα ένζυμα αυτά στοχεύουν ως επί των πλείστων στη συνοχή και δομική ακεραιότητα που εμφανίζουν τα βιοφίλμ και όχι στη θανάτωση των μικροοργανισμών που συμμετέχουν σε αυτά. Αυτός ο τρόπος δράσης από μόνος του αποτελεί μια εναλλακτική πολλά υποσχόμενη προσέγγιση, η οποία κατά καιρούς

έχει αποτελέσει και αντικείμενο διαμάχης αναφορικά με το επίπεδο προστασίας και αποτελεσματικότητας που προσφέρει. Για την καταπολέμηση των βιοφίλμ υπάρχουν τέσσερις τύποι ενζύμων: α) οι δεοξυ-ρυβονουκλεάσες (γνωστές και ως DNάσες), β) τα ένζυμα αποικοδόμησης πολυσακχαριτών, γ) τα πρωτεολυτικά ένζυμα και δ) διάφορα αντι-qs ένζυμα (anti-quorum sensing).

Λαμβάνοντας υπόψη την εξειδικευμένη δράση που έχει κάθε ένζυμο αλλά και τη πολύπλοκη ετερογενή σύνθεση της μήτρας του βιοφίλμ, εξάγεται το συμπέρασμα ότι για την απομάκρυνση ανθεκτικών βιομεμβρανών απαιτείται η χρήση πολλών ενζύμων που στοχεύουν σε πολλά διαφορετικά συστατικά της μήτρας EPS [194]. Ακόμη, φαίνεται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις πριν τη χρήση ενζύμων, συνίσταται η ανάλυση της εξωκυττάριας μήτρας καθώς αυτή μπορεί να διαφέρει σημαντικά από είδος σε είδος επηρεάζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα των ενζύμων. Ήδη, διάφορα προϊόντα βασιζόμενα σε δράσεις ενζύμων έχουν κυκλοφορήσει στην αγορά καλύπτοντας ανάγκες στους τομείς της υγειονομικής περίθαλψης, των τροφίμων και της βιοϊατρικής.

5.5.1.1 Δεοξυ-ρυβονουκλεάσες (DNάσες)

Μια ένωση που συνήθως αυτά τα ένζυμα στοχεύουν αφορά το εξωκυτταρικό DNA (eDNA). Πρόκειται για βασικό συστατικό της μήτρας σε πολλά είδη βιοφίλμ και επομένως αποτελεί έναν «ελκυστικό» στόχο για τη καταπολέμηση του σχηματισμού και της ανάπτυξης τους. Το eDNA παράγεται μέσω ενεργής έκκρισης ή ελεγχόμενης κυτταρικής λύσης και η ενζυμική αποδόμηση του φαίνεται ότι μπορεί να αποτρέψει α) το σχηματισμό βιοφίλμ, β) να οδηγήσει σε μερική αποκόλληση ήδη σχηματισμένων βιοφίλμ και γ) να αυξήσει σημαντικά την ευαισθησία των βιοφίλμ έναντι σε αντιμικροβιακούς παράγοντες [195]. Έτσι λοιπόν, η DNάση I έχει αναφερθεί ότι μπλοκάρει ή τροποποιεί το σχηματισμό και τη μορφολογία βιομεμβρανών τόσο σε gram θετικά όσο και gram αρνητικά βακτήρια. Κυριότερες δοκιμές που έως τώρα έχουν διεξαχθεί αφορούν τους μικροοργανισμούς *L. Monocytogenes*, τον *S. Aureus*, το *C. jejuni* και το *E. faecalis* [196-197].

5.5.1.2 Ένζυμα αποικοδόμησης πολυσακχαριτών

Ομοίως, οι εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες είναι απαραίτητοι για το σχηματισμό και τη λειτουργία του βιοφίλμ, ως εκ τούτου τα ένζυμα που τους αποικοδομούν έχουν αξιολογηθεί επιτυχώς έναντι των βιοφίλμ, Προϊόντα α-αμυλάσης που διατίθενται στο εμπόριο ήταν ικανά να διασπάσουν γρήγορα βιοφίλμ του γένους *S. Aureus* καθώς και να καταστείλουν την ανάπτυξη του [205]. Αντίστοιχα και η κυτταρινάση ήταν αποτελεσματική στη μερική όμως αναστολή σχηματισμού βιοφίλμ από *P. aeruginosa* σε γυάλινες επιφάνειες υπογραμμίζοντας τη σημασία της σύνθεσης της EPS μήτρας [198]. Φαίνεται ότι από μόνη της η κυτταρινάση δε

μπορεί να οδηγήσει σε πλήρη αναστολή της ανάπτυξης βιοφίλμ για αυτό και συνίσταται ο συνδυασμός της με άλλες συνοδευτικές δράσεις έτσι ώστε να αυξηθεί περαιτέρω η αποτελεσματικότητα της. Άλλα ένζυμα που χρησιμοποιούνται αφορούν την εστεράση της πηκτίνης και τη προπασάση για τα οποία ωστόσο απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να αξιολογηθεί πλήρως το επίπεδο αποτελεσματικότητας τους.

5.5.1.3 Πρωτεολυτικά ένζυμα

Ένας άλλος τύπος ενζύμων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ενάντια στα βιοφίλμ είναι οι πρωτεάσες. Για παράδειγμα, βρέθηκε ότι η K πρωτεΐνάση ήταν αποτελεσματική και ευνόησε τη διασπορά βακτηριακών κυττάρων της *L. Monocytogenes* αλλά και του *S. Aureus*. Σημαντική φαίνεται να είναι και η επίδραση μεταλλοπρωτεϊνών όπως η σερατιοπεπτιδάση. Τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα εντοπίζουν συγκεκριμένες γέφυρες-δεσμούς της πεπτιδογλυκάνης αποδομώντας τις, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την αποσταθεροποίηση της δομής της βιομεμβράνης. Διάφορες πρωτεάσες κατά καιρούς έχουν ελεγχθεί για τις ιδιότητές τους να αναστέλλουν το σχηματισμό βιοφίλμ. Τα περισσότερα εξ' αυτών παρουσίασαν θετικά αποτελέσματα όταν δοκιμάστηκαν σε βιοφίλμ που είχαν σχηματιστεί από *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* και *S. Aureus* [199]. Επιπρόσθετα, σε μια άλλη μελέτη η οποία σύγκρινε τις διάφορες κατηγορίες ενζύμων φάνηκε ότι οι πρωτεάσες παρουσίασαν αποτελεσματικότερη εικόνα απομάκρυνσης βιοφίλμ από ότι οι αμυλάσες [200].

5.5.1.4 Ένζυμα που στοχεύουν τη διακυτταρική επικοινωνία (anti-quorum sensing enzymes)

Με την ανακάλυψη πως τα βακτήρια αναπτύσσουν διακυτταρική επικοινωνία έτσι ώστε να σχηματίσουν βιομεμβράνες, αυτό αποτέλεσε από μόνο του έναν ενδιαφέροντα τρόπο για τον έλεγχο τους. Τρεις είναι οι κυριότερες οδοί που εμπλέκονται στη διαδικασία:

1. Η ακυλο-ομοσερίνη λακτόνη (AHL) για τα gram αρνητικά βακτήρια
2. Το αυτόματο-διεργεμένο πεπτίδιο (AIP) για τα gram θετικά βακτήρια
3. Και το αυτόματο-διεργεμένο πεπτίδιο τύπου 2 τόσο στα gram θετικά όσο και τα gram αρνητικά.

Κατά συνέπεια, χρησιμοποιούνται δυο κύριες ομάδες ενζύμων διάσπασης AHL οι οποίες υδρολύουν το δακτύλιο της λακτόνης σε AHL ακυλάσες οι οποίες εν τέλει θα απελευθερώσουν μια λακτόνη ομοσερίνης και ένα λιπαρό οξύ [201]. Σε άλλη έρευνα καταγράφεται η δράση της οξειδοοδουκτάσης, η οποία είναι σε θέση να απενεργοποιεί σημαντικές λειτουργίες του quorum sensing που αναφέρθηκαν παραπάνω [202]. Άλλες έρευνες συσχετίζουν τέτοιου είδους ένζυμα με μειωμένη πιθανότητα επανασηματισμού βιοφίλμ και χαμηλότερη μολυσματικότητα.

5.5.2 Χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών-αντιμικροβιακών

Στη προσπάθεια αναζήτησης επιπλέον εναλλακτικών στρατηγικών για την καταπολέμηση του σχηματισμού βιομεμβρανών στις βιομηχανίες ιχθυηρών, οι επιστήμονες στράφηκαν προς το αστείρευτο «φαρμακείο» της φύσης. Τα προϊόντα που ήδη κυκλοφορούν στην αγορά θεωρούνται γενικώς ασφαλή και όπως είναι ήδη γνωστό εκτός από αντιοξειδωτική δράση παρουσιάζουν και αντιμικροβιακές ιδιότητες τόσο *in vitro* όσο και *in vivo*. Εκτός των άλλων, παρατηρείται η τάση περαιτέρω αξιοποίησης αυτών των ιδιοτήτων και με άλλες οργανοληπτικές ιδιότητες που μπορούν αυτά τα φυσικά αντιμικροβιακά να παρουσιάσουν όπως η ενίσχυση της γεύσης και του αρώματος.

Σε μια έρευνα του Sandasi και της ομάδας του (2010), παρατηρήθηκε το εντυπωσιακό ποσοστό της 100% μείωσης σε βιοφίλμ λιστέριας σε ανοξειδωτη επιφάνεια χάλυβα όταν χρησιμοποιήθηκαν έλαια από λεμονόχορτο και σιτρονέλα [203]. Επιπρόσθετα φαίνεται ότι και η χρήση αιθέριου ελαίου κανέλλας μείωσε αντίστοιχα βιοφίλμ λιστέριας αν και όχι σε τόσο αποτελεσματικό επίπεδο. Παρόμοια ήταν και τα αποτελέσματα μιας ακόμη μελέτης στην οποία το κύμινο κατάφερε και μείωσε βιοφίλμ λιστέριας πάνω σε σάρκα λευκών ψαριών από τη περιοχή της Κασπίας.

5.5.3 Βακτηριοφάγοι

Πέραν των μηχανικών και χημικών μεθόδων μια άλλη τεχνική απομάκρυνσης αφορά το βιολογικό έλεγχο των μικροοργανισμών χρησιμοποιώντας βακτηριοφάγα τα οποία αναγνωρίζονται ευρέως ως «θηρευτές» μικροοργανισμών παραμένοντας ωστόσο ακίνδυνα για τα κύτταρα των θηλαστικών [204]. Τα περισσότερα εξ' αυτών είναι διαδεδομένα σε φυσικά περιβάλλοντα συμπεριλαμβανομένων των οικοσυστημάτων τροφίμων και παρουσιάζουν εξαιρετική εκλεκτικότητα ως προς τα βακτήρια του ξενιστή. Οι τρόποι με τους οποίους τα βακτηριοφάγα δρουν ενάντια στα παθογόνα που σχετίζονται με τα τρόφιμα είναι πολλοί και ποικίλουν ανάλογα τη δόση και άλλους φυσικοχημικούς παράγοντες που σχετίζονται με το εμπλεκόμενο βιοφίλμ και τρόφιμο.

Πρόσφατες έρευνες ωστόσο έφεραν στο προσκήνιο κάποιες ανεπιθύμητες παρενέργειες που πιθανώς να σχετίζονται με τη μεταβολική τους δραστηριότητα. Η απελευθέρωση ενδοτοξινών είτε κατά την λύση των βακτηρίων-στόχων είτε από τα ίδια βακτηριοφάγα βρίσκονται στο μικροσκόπιο έτσι ώστε να αξιολογηθεί πιθανή μολυσματική δράση. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης εναλλακτικής προσέγγισης είναι εντυπωσιακά. Το 2007 ένα εργαστηριακά κατασκευασμένο βακτηριοφάγο είχε τη δυνατότητα να μειώσει έως και 99% του βιοφίλμ. Παρόμοια αποτελέσματα είχε και η εφαρμογή μικτών βακτηριοφάγων σε γαρίδες για την καταπολέμηση ασθένειας που

προκαλείται από τα περισσότερα είδη μικροοργανισμών του γένους *Vibrio*. Σε άλλη μελέτη που αφορούσε την ανάπτυξη βιοφίλμ λιστέριας σε ανοξείδωτες επιφάνειες, παρατηρήθηκε έως και 5 φορές μείωση του σχηματισμού όταν χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός βακτηριοφάγων [205].

Κεφάλαιο 6 Συμπεράσματα

Σύμφωνα με την παραπάνω βιβλιογραφική ανασκόπηση, ο σχηματισμός βιομεμβρανών στις παραγωγικές μονάδες και ειδικά εκείνες των τροφίμων είναι υψίστης σημασίας καθώς σχετίζεται με θέματα μικροβιολογικής ασφάλειας αλλά και ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων. Κατά το σχηματισμό των βιοφίλμ, λαμβάνουν χώρα σημαντικές βιοχημικές διεργασίες (π.χ η δημιουργία μιας εξωκυττάριας μήτρας) που σε συνδυασμό με τη διαφορετική γονιδιακή έκφραση, ωθούν τους επιστήμονες να προσεγγίσουν και να ερμηνεύσουν διαφορετικά την αντιμετώπιση τους σε σχέση με την κλασσική ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών.

Αυτό όπως φαίνεται έχει ιδιαίτερη βαρύτητα στο χώρο των τροφίμων καθώς οι βιομεμβράνες παρουσιάζουν μια σειρά από ανεπιθύμητα «πλεονεκτήματα» όπως η αντοχή στο μηχανικό stress, η γρήγορη προσαρμογή τους σε ανταγωνιστικά περιβάλλοντα, η ανθεκτικότητα σε πολλούς αντιμικροβιακούς παράγοντες και διάφορες άλλες στρατηγικές απομάκρυνσης. Πρόσφατες μελέτες αναδεικνύουν πως το συγκεκριμένο ζήτημα είναι πολυπαραγοντικό μιας και πρόκειται για μια μοναδική αλληλεπίδραση η οποία επηρεάζεται από το είδος του τροφίμου, τους εμπλεκόμενους μικροοργανισμούς και φυσικά το είδος είδος της επιφάνειας. Παρόλα αυτά, για την ανάπτυξη των βιομεμβρανών σημαντικότερος όλων των παραγόντων θεωρείται ο λανθασμένος ή ελλιπής καθαρισμός συμπεριλαμβανομένων και των κανόνων υγιεινής και ορθής βιομηχανικής πρακτικής.

Όσον αφορά τους μικροοργανισμούς που συμμετέχουν σε αυτά τα βιοφίλμ και σχετίζονται με τα τρόφιμα αυτοί μπορεί να διαφέρουν αν αναλογιστεί κανείς τις ιδιαιτερότητες της τεχνολογίας παρασκευής και το είδος του τροφίμου το οποίο φέρει τη δική του μοναδική αλλοιογόνο χλωρίδα. Θεωρείται λοιπόν δεδομένο ότι αυτοί οι μικροοργανισμοί αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους (quorum sensing) καθιστώντας ακόμη δυσκολότερη τη κατανόηση των εμπλεκόμενων μηχανισμών κατά τον σχηματισμό βιομεμβρανών.

Ειδικότερα, από τα βιβλιογραφικά δεδομένα που συλλέχθηκαν φαίνεται ότι το είδος του τροφίμου και της επιφάνειας παίζει σημαντικό ρόλο κατά την ανάπτυξη βιομεμβρανών στα τρόφιμα. Για παράδειγμα, μικρογραφίες ηλεκτρονικής σάρωσης αποκάλυψαν ότι οι τροφιμογενής και αλλοιογόνοι μικροοργανισμοί μπορούν να συσσωρευτούν σε στεγανά αλουμινίου, ανοξείδωτου ατσάλιου και τεφλόν τα όποια χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιβάλλοντα επεξεργασίας γάλακτος. Συμπερασματικά, πιστεύεται ότι μικροοργανισμοί όπως η *E. coli*, η *L. monocytogenes* και η *Y. enterocolitica* φαίνεται να αναπτύσσονται πιο εύκολα σε λείες επιφάνειες όπως είναι το ανοξείδωτο ατσάλι.

Εμβαθύνοντας περισσότερο, παρατηρήθηκε ότι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μικροοργανισμών αφορούσαν συγκεκριμένες κατηγορίες παραγωγικών μονάδων. Πιο συγκεκριμένα, σε παραγωγικές μονάδες κρέατος φάνηκε ότι η παρουσία του *L. Acidophilus* αυξάνει την ικανότητα προσκόλλησης συγκεκριμένων πρωτεϊνών της *E. coli* ενώ παρόμοιος ήταν και ο τρόπος αλληλεπίδρασης του με το *A. calcoaceticus*. Αντίστοιχα, στις γαλακτοβιομηχανίες ένας συνδυασμός *P. fluorescens* και *B. cereus* ήταν έως και πέντε φορές πιο μεταβολικά ενεργός απ' ότι τα αντίστοιχα μονοποικιλιακά τους βιοφίλμ. Παράλληλα, στο ίδιο μοτίβο κυμάνθηκαν και τα αποτελέσματα άλλων μελετών που φανέρωσαν ότι το *P. fragis* ευνόησε το σχηματισμό βιοφίλμ *L. Monocytogenes* σε επιφάνειες γυαλιού που συσκευάζονταν φρέσκο γάλα. Ομοίως, στις παραγωγικές μονάδες ιχθυηρών τα κυρίαρχα στελέχη του γένους *Vibrio* ήταν υπεύθυνα για την έως και 50% ευκολότερη προσκόλληση βιοφίλμ *P. aeruginosa* και *A. hydrophila* σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα.

Γίνεται λοιπόν εύκολα αντιληπτό ότι οι η επιλογή αποτελεσματικών προληπτικών στρατηγικών ή μεθόδων καθαρισμού είναι αναγκαία. Οι κλασικές μέθοδοι που αφορούν τη μηχανική καταπόνηση και την επίδραση εξωτερικής δύναμης (τριβή) σε συνδυασμό με την εφαρμογή ήπιων καθαριστικών και νερού παραμένουν οι πιο απλές και ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι. Ωστόσο, η ανάγκη για μεθόδους οι οποίες θα χρησιμοποιούν λιγότερο τοξικές ουσίες και παράλληλα θα σέβονται το περιβάλλον εξοικονομώντας ενέργεια είναι αναγκαία. Εκτός των άλλων, η ανησυχία των ειδικών είναι μεγάλη σχετικά με την αποτελεσματικότητα που αυτές οι μέθοδοι θα έχουν στο μέλλον μιας και όπως φαίνεται οι βιομεμβράνες διαρκώς εξελίσσονται αυξάνοντας την ήδη μεγάλη ανθεκτικότητά τους σε πολλές από τις υπάρχουσες μεθόδους καθαρισμού και απομάκρυνσης.

Στις μέρες μας, υπάρχουν αρκετές νέες εναλλακτικές και το ίδιο αποτελεσματικές μέθοδοι απομάκρυνσης και καθαρισμού βιομεμβρανών που βρίσκονται είτε σε πειραματικό είτε πιο προχωρημένο επίπεδο. Μεταξύ αυτών, ξεχωρίζει η χρήση διάφορων ενζύμων η οποία βασίζεται στον καθ' αυτό τρόπο που σχηματίζονται οι βιομεμβράνες στοχεύοντας συγκεκριμένα δομικά μέρη τους. Ακόμη, η εφαρμογή διάφορων βακτηριοφάγων στελεχών φαίνεται πως και αυτή έχει θεαματικά αποτελέσματα ωστόσο η χρήση της είναι περιορισμένοι. Τέλος, η χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών και μικροβιακών παραγόντων με στόχο τη πρόληψη ή και εξάλειψη των βιομεμβρανών αποτελεί αυτή τη στιγμή τη μεγαλύτερη πρόκληση καθώς παρά την αποδεδειγμένη αποτελεσματική τους δράση σε πειραματικό επίπεδο εντοπίζονται δυσκολίες κατά το τρόπο εφαρμογής και μαζικής παραγωγής τέτοιων προϊόντων.

Κεφάλαιο 6 Βιβλιογραφία

6.1 Ξένη βιβλιογραφία

1. Kendra P. Rumbaugh and Karin Sauer (2020). "Biofilm dispersion". *Nature Reviews of Microbiology*.
2. Hoiby N. (2017). "A short history of microbial biofilms and biofilm infections". *APMIS*, published by John Wiley and Sons Ltd.
3. Hoiby N. (2014). "A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections". *Pathogens and Disease*, pp 205-211.
4. Giaouris E. et al., (2014). "Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods". *Meat Science*, pp 298-309.
5. Hoiby N et. Al., (2010). "Antibiotic resistance of bacterial biofilms". *International Journal of Antimicrobial Agents* pp 322-332
6. Singh S. et. al., (2017). "Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents". *Open Microbiology Journal*, pp 53-62.
7. Rollet C., Gal L., and Guzzo J., (2008). "Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas Aeruginosa*". *FEMS Microbiol Lett*, pp 135-142.
8. Petrova OE., et. al., (2009). "A novel signaling network essential for regulating *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development".
9. Yun H.K., et. al., (2017). "Spatial transcriptomes within the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm architecture". *Molecular microbiology*, 976-985.
10. O' Toole G., Kaplan H., and Kolter R., (2000). "Biofilm Formation as Microbial Development". *Annual Review of Microbiology*, pp 49-79.
11. Stoodley P., Sauer K., Davies D., and Costerton W (2002). "Biofilms as Complex Differentiated Communities". *Annu. Rev. Microbiol.*, pp 187-209.
12. Petrova OE., Gupta K., Liao J., Goodwine J., and Sauer K. (2017). "Divide and conquer: The *Pseudomonas aeruginosa* two component-hybrid SagS enables biofilm formation and recalcitrance of biofilm cells to antimicrobial agents via distinct regulatory circuits". *Environmental microbiology*, 2005-2024.
13. Goodman A., Marshall K., and Hermansson M., (1994). "Gene transfer among bacteria under conditions of nutrient depletion in simulated and natural aquatic environments". *FEMS Microbiology Ecology*, pp 55-60.
14. Vasudevan R., (2014). "Biofilms: microbial cities of scientific significance". *Journal of Microbiology and Experimentation*, pp 84-98.
15. Percival S., Malic S., Cruz H. and Williams D., (2011). "Introduction to biofilms". *Biofilms and Veterinary Medicine*, pp 41-68.
16. Qin Z., et al., (2007). "Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*". *Microbiology*, pp 2083-2092.
17. Vuong C., et al., (2004). "A Crucial Role for Exopolysaccharide Modification in Bacterial Biofilm Formation, Immune Evasion and Virulence". *Journal of Biological Chemistry*, pp 54881-54886.
18. Linnes C., Ma H., and Bryers J., (2013). "Giant Extracellular Matrix Binding Protein Expression in *Staphylococcus epidermidis* is Regulated by Biofilm Formation and Osmotic Pressure". *Current Microbiology*, pp 627-633.
19. Niba E., et al., (2007). "A genome-wide Approach to identify the genes involved in Biofilm formation in *E. Coli*". *DNA research*, 237-246.

20. Archer N., et al., (2011). "Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation and roles in human disease". *Virulence*, pp 445-459.
21. Beloin C., Roux A., and Ghigo J., (2008). "Escherichia coli biofilms". *Current topics in Microbiology and Immunology*, pp 249-289.
22. Wood T., Barrios A., Herzberg M., and Lee J., (2006). "Motility influences biofilm architecture in *Escherichia Coli*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp 361-367.
23. Petersen C., Tao L., and Scheie A., (2005). "DNA Binding-Uptake System: a Link between Cell-to-Cell Communication and Biofilm Formation". *Journal of Bacteriology*, pp 4392-4400.
24. Bjarnsholt T., et al., (2013). "The in vivo biofilm". *Trends in Microbiology*, pp 466-474.
25. Oliveira A., and Cunha M., (2008). "Bacterial biofilms with emphasis in coagulase-negative staphylococci". *Journal of Venomous Animals and Toxins including tropical diseases*, pp 573
26. Donlan R., (2002). "Biofilms: microbial life on surfaces". *Emerging infectious diseases*, pp 881-890.
27. Da-Wen Sun (2012). "Handbook of Food Safety Engineering". Blackwell publishing Ltd
28. Lu T. and Collins J., (2007). "Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage". *PNAS*, 11197-11202.
29. Karatan E., Watnick P., (2009). "Signals, Regulatory, Networks and Materials that Build and Break Bacterial Biofilms". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, pp 310-347.
30. Flemming H., Thomas R., and Wozniak D. (2007). "The EPS Matrix: House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology*, pp 7945-7947.
31. Lembre P., Lorentz C. and Martino P. (2012). "Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World". *The complex world of Polysaccharides*.
32. Karunakaran E., Mukherje J., Ramalingam B. and Biggs C. (2011). "Biofilmology: a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms". *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp 1869-1881
33. Vanigelgem F., et al., (2004). "Biodiversity of Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus thermophilus* Strains is Reflected in Their Production and Their Molecular and Functional Characteristics". *Applied and Environmental Microbiology*, pp 900-912.
34. Ryder C., Byrd M., and Wozniak D., (2007). "Role of polysaccharides in *Pseudomonas Aeruginosa* biofilm development". *Current Opinion in Microbiology*, pp 644-648.
35. Byrd M., et al., (2009). "Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production". *Molecular Microbiology*, pp 628-638.
36. Ma L., Conover M., Lu H., Parsek MR., Bayles K. and Wozniak D. (2009). "Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix". *PLoS Pathog* 5(3).
37. Flemming H., and Wingender J. (2001). "Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part II: Technical aspects". *Water Science and Technology*, pp 9-16.
38. Busalmen J., Vazquez M., and Sanchez S. (2002). "New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion". *Electrochimica Acta*, pp 1857-1865.
39. Zhang X., and Bishop L., (2003). "Biodegradability of biofilm extracellular polymeric substances". *Chemosphere*, pp 63-69.
40. Lynch D., Fountain L., Mazurkiewicz J., and Banas J. (2007). "Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture". *FEMS Microbiology Letters*, pp 158-165.
41. Lasa I., and Penades J., (2006). "Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation". *Research in Microbiology*, 99-107.
42. Zeng G., et al., (2015). "Functional bacterial amyloid increases *Pseudomonas* biofilm hydrophobicity and stiffness". *Microbial Physiology and Metabolism*

43. Bonsaglia E., Silva N., Junior F., Junior A., Tsunemi M., and Rall V., (2014). "Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures". *Food Control*, pp 386-391.
44. Gazzaniga G., Ottobelli M., Godoy F., and Brambilla E., (2015). "Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: A review of the current literature". *American Journal of Dentistry*, pp 311-320.
45. Whitehead K., and Verran J., (2015). "Formation, architecture and functionality of microbial biofilms in the food industry". *Current Opinion in Food Science*, pp 84-91.
46. Sutherland I., (2001). "The biofilm matrix – an immobilized but dynamic environment". *Trends in Microbiology*, pp 222-227.
47. Houdt R., and Michiels C., (2010). "Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface". *Journal of Applied Microbiology*, pp 1117-1131.
48. Mitchell J., and Kogure K., (2006). "Bacterial mobility: links to the environment and a driving force for microbial physics". *FEMS, Microbiology Ecology*, pp 3-16.
49. Kim T., Briana M., Young G., and Young M., (2008). "Effect of Flagellar Mutations on *Yersinia Enterocolitica* Biofilm Formation". *Applied and Environmental Microbiology*, pp 5466-5474.
50. Houdt R., and Michiels C., (2005). "Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation". *Research in Microbiology*, pp 626-633.
51. Schachter B., (2003). "Slimy business-the biotechnology of biofilms". *Nature Biotechnology*.
52. Bassler B., (1999). "How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing". *Current Opinion in Microbiology*, pp 582-587.
53. Kjelleberg S., and Molin S., (2002). "Is there a role of quorum sensing signals in bacterial biofilms?". *Current Opinion in Microbiology*, pp 254-258.
54. Qazi S., Middleton B., Muharram S., Cockayne A., Hill P., O'Shea P., Chhabra S., Camara M., and Williams P., (2006). "N-Acylhomoserine Lactones Antagonize Virulence Gene Expression and Quorum Sensing in *Staphylococcus aureus*". *Infection and Immunity*, pp 910-919.
55. Santos ALS., et al., (2018). "What are the advantages of living in a community? A microbial biofilm perspective!". *Mem Inst Oswaldo Cruz*, pp 1-7.
56. Fitridge I., Guenther T., and Nys R., (2012). "The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review". *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, pp 649-669.
57. Hauser A., Jain M., Meir M., and McColley S., (2011). "Clinical Significance of Microbial Infection and Adaptation in Cystic Fibrosis". *Clinical Microbiology Reviews*, pp 29-70.
58. Eng S., Pusparajah P., Mutalib N., Ser H., Chan K., and Lee H., (2015). "*Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance". *Frontiers in Life Science*, pp 284-293.
59. Brenner F., Villar G., Angulo J., Tauxe R., and Swamithan B., (2000). "*Salmonella* Nomenclature". *Journal of Clinical Microbiology*, pp 2465-2467.
60. Miliotis M., and Bier J., (2003). "International handbook of foodborne pathogens".
61. Quniston J., Fields P., Tauxe R., and Logsdon J., (2008). "Do *Salmonella* carry spare types?". *Trends in Microbiology*, pp 142-148.
62. Stabel J., Gray P., and Gray J., (2002). "Neutrophil Phagocytosis Following Inoculation of *Salmonella choleraesuis* into Swine". *Veterinary Research Communications*, pp 103-109.
63. Holt J., (1977). "The shorter Bergey's manual of determinative bacteriology".
64. Bakowski M., Braun V., and Brumell J., (2008). "*Salmonella*-Containing Vacuoles: Directing Traffic and Nesting to Grow".
65. Darby J., (2008). "Searching for *Salmonella*".

66. Woods D., et al., (2008). "Rapid multiplex PCR and Real-Time TaqMan PCR Assays for Detection of *Salmonella enterica* and the Highly Virulent Serovars *Choleraesuis* and Paratyphi C". *Journal of Clinical Microbiology*, pp 4018-4022.
67. European Food Safety Authority, EFSA (2013). "Analysis of the baseline on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat food in the EU". *EFSA Journal*, pp 1-75.
68. Parish M., and Higgins D., (1989). "Survival of *Listeria monocytogenes* in Low pH Model Broth Systems". *Journal of Food Protection*, 144-147.
69. Vogel B., Hansen L., Mordhorst H., and Gram L., (2010). "The survival of *Listeria monocytogenes* during long term desiccation is facilitated by sodium chloride and organic material". *International Journal of Food Microbiology*, pp 192-200.
70. Ramaswamy V. et al., (2007). "Listeria – review of epidemiology and pathogenesis". *J Microbiol Immunol Infect*, pp 4-13.
71. Temoin S., Roche S., Grepinet O., Fardini Y., and Velge P., (2008). "Multiple point mutations in virulence genes explain the low virulence of *Listeria monocytogenes* field strains". *Microbiology*, 939-948.
72. Atil E., Ertas H., and Ozbey G., (2011). "Isolation and characterization of *Listeria* spp. from animals, food and environment samples". *Veterinari Medicina*, pp 386-394.
73. Heymann D., (2008). "Control of Communicable Diseases Manual 20TH Edition".
74. Baldrias L., (2013). "Relationship between Multi-Resistance of Philippine Isolates of *Campylobacter jejuni* (Jones et al., 1931), Veron & Chatelain, 1973 (Campylobacteriales: Campylobacteraceae) and Antimicrobial Usage in Poultry.
75. Butzler P., Dereume J., Barbier P., Smenkens L., and Dekeyser J., (1977). "Digestive origin of *Campylobacter septicemias*". *La Nouvelle Presse Medicale*, pp 1033-1035.
76. European Food Safety Authority, EFSA (2005). "The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005".
77. Hofreuter D., (2014). "Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*,
78. Guccione E., Kempis M., Pearson M., Hitchin E., Mulholland F., Diemen M., Stevens M., and Kelly J., (2008). "Amino-acid dependent growth of *Campylobacter jejuni*: key roles for aspartase (AspA) under microaerobic and oxygen-limited conditions and identification of AspB, essential for growth on glutamate". *Molecular Microbiology*, pp 77-93.
79. Rahman H., et al., (2014). "Characterization of a Multi-ligand Binding Chemoreceptor CcmL (Tlp3) of *Campylobacter jejuni*". *PLoS Pathogens*
80. Fletcher B., Albers A., Chen A., and Albertson J., (1983). "Ascorbic Acid Inhibition of *Campylobacter jejuni* Growth". *Applied and Environmental Microbiology*, pp 792-795.
81. Enoch D., Birkett C., and Ludlam H., (2006). "Non-fermentative Gram-negative bacteria". *International Journal of Antimicrobial Agents*, pp 533-541.
82. Chambers H., (2001). "The Changing Epidemiology of *Staphylococcus aureus*?". *Emerging Infectious Diseases*, pp 178-182.
83. Shimoda M., Ohki K., Shimamoto Y., and Kohashi O., (1995). "Morphology of defensin-treated *Staphylococcus aureus*". *Infection and Immunity*, pp 2886-2891.
84. Rollin G., et al., (2017). "Intracellular Survival of *Staphylococcus aureus* in Endothelial Cells: A Matter of growth or Persistence". *Frontiers in Microbiology*.
85. Orwin P., et al., (2003). "Characterization of *Staphylococcus aureus* Enterotoxin L". *Infection and Immunity*, pp 2916-2919.

86. Ortega E., Abriouel H., Rosario L., and Galvez A., (2010). "Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic, Activity and Correlation to Antibiotic resistance". *Toxins*, pp 2117-2131.
87. Blount Z., (2015). "The Natural History of Model Organisms: The unexhausted potential of *E. Coli*". *Microbiology and Infectious Disease, Ecology*.
88. Klein E., et al., (2002). "Shiga-toxin producing *Escherichia coli* in children with diarrhea: a prospective point-of-care study". *The Journal of Pediatrics*, pp 172-177.
89. Lugtenberg B., and Alphen L., (1983). "Molecular architecture and functioning of the outnumber of *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria". *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*, pp 51-115.
90. Gyles C., (2007). "Shiga-toxin producing *Escherichia coli*: An overview". *Journal of Animal Science*, pp 45-62.
91. Sjolting A., et al., (2007). "Comparative study of Phenotypic and Genotypic Methods for Detection and Enterotoxigenic *Escherichia coli* Toxins and Colonization Factors". *Journal of Clinical Microbiology*, pp 3295-3301.
92. Elsas J., Semenov A., Costa R., and Trevors J., (2011). "Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects". *The ISME Journal*, pp 173-183.
93. Chorianopoulos N., Giaouris E., Skandamis P., Haroutounian S., and Nychas E., (2008). "Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers". *Journal of Applied Microbiology*, pp 1586-1596.
94. Chmielewski R., and Frank J., (2003). "Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp 22-32.
95. Guadarrama K., Orgaz B., Sen A., Vazquez J., and SanJose C., (2005). "Interactions in Biofilms of *Lactococcus lactis ssp. Cremonis* and *Pseudomonas fluorescens* Cultured in Cold UHT Milk". *Journal of Dairy Science*, pp 4165-4171.
96. Habimana O., et al., (2010). "Enhanced Surface Colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in Biofilms Formed by *Acinetobacter calcoaceticus* Isolate from Meat-Processing Environments.
97. Chen C., Nguyen L., Paoli G., and Irwin P., (2020). "The complex multicellular morphology of the food spoilage bacteria *Brochothrix Thermosphacta* strains isolated from ground chicken". *Canadian Journal of Microbiology*.
98. Leathers T., and Bschoff K., (2011). "Biofilm formation by strains of *Leuconostoc citreum* and *L. mesenteroides*". *Biotechnology Letters*, pp 517-523.
99. Reij M., et al., (2004). "Recontamination as a source of pathogens in processed foods". *International Journal of Food Microbiology*, pp 1-11.
100. Rendueles O., and Ghigo J., (2015). "Mechanisms of Competition in Biofilm Communities". *Microbiology Spectrum*.
101. Aarnisalo K., Heiskanen S., Jaakkola K., Landor E., and Raaska L., (2007). "Traceability of foods and foodborne hazards". *VTT Research Notes 2395*.
102. Sheen S., and Hwang C., (2010). "Mathematical modeling the cross contamination of *Escherichia coli* O157:H7 on the surface of ready-to-eat meat product while slicing". *Food Microbiology*, pp 37-43.
103. Rodriguez F., Valero A., Todd E., Carrasco E., Gimeno R., and Zurera G., (2007). "Modeling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product". *Meat Science*, pp 692-699.

104. Vorst K., Tood E., and Rysert E., (2006). "Transfer of *Listeria monocytogenes* during mechanical slicing of turkey breast, bologna and salami". *Journal of Food Protection*, pp 619-626.
105. Lin C., et al., (2006). "Cross-contamination between Processing Equipment and Deli Meats by *Listeria monocytogenes*". *Journal of Food Protection*, 71-79.
106. Skinner B., Rogers A., and Megan J., (2018). "Susceptibility of *Escherichia coli* O157:H7 to Disinfectants *In Vitro* and in Simulated Foodbaths Amended with Manure". *Foodborne Pathogens and Diseases*.
107. Hassan A., Birt D., and Frank J., (2004). "Behavior of *Listeria monocytogenes* in a *Pseudomonas putida* Biofilm on a Condensate-Forming Surface". *Journal of Food Protection*, pp 322-327.
108. Kim Y., and Kim S., (2009). "Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7". *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp 324-329.
109. Renier S., Hebraud M., and Desvaux M., (2011). "Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes*: an additional facet on an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen". *Environmental Microbiology*, pp 835-850.
110. Bremer P., Seale B., and Palmer J., (2009). "Biofilms in dairy processing". *Biofilms In the Food and Beverage Industries*, pp 396-431.
111. Sadiq F., et al., (2017). "Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders". *International Journal of Food Microbiology*, pp 89-98.
112. Oliver S., Jayarao B., and Almeida R., (2005). "Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications". *Foodborne Pathogens and Disease*, pp 115-126.
113. Lomander A., Schreudes P., Cohen E., and Ali L., (2004). "Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces". *Bioresource Technology*, pp 275-283.
114. Kokare C., Chakraborty S., Khopade A., and Mahadik K., (2009). "Biofilm: Importance and applications". *Indian Journal of Biotechnology*, pp 159-168.
115. Mittelman M., (1998). "Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations". *Symposium: Biofilms development and control*.
116. Burgess S., Lindsay D., and Flint S., (2010). "Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing". *International Journal of Food Microbiology*, pp 215-225.
117. Marchand S., et al., (2012). "Biofilm formation in milk production and processing environments; Influence on Milk Quality and Safety". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp 133-147.
118. Somers B., Johnson M., and Wong A., (2001). "Biofilm formation and contamination of cheese by nonstarter lactic acid bacteria in the dairy environment". *Journal of Dairy Science*, pp 1926-1936.
119. Sasahara K., and Zottola E., (1993). "Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes* Utilizes a Primary Colonizing Microorganism in Flowing Systems". *Journal of Food Protection*, pp 1022-1028.
120. Bremer P., Monk I., and Osborne C., (2001). "Survival of *Listeria monocytogenes* Attached to Stainless Surfaces in the Presence or Absence of *Flavobacterium spp.*". *Journal of Food Protection*, 1369-1376.
121. Iwamoto M., Ayers T., Mahon B., and Swerdlow D., (2010). "Epidemiology of Seafood-Associated Infections in the United States". *Clinical Microbiology Reviews*, 399-411.

122. Mizan F., Jahid I., and Ha S., (2015). "Microbial biofilms in seafood: A food-hygiene challenge". *Food Microbiology*, pp 41-55.
123. Butt A., Aldridge K., and Sanders C., (2004). "Infections related to the ingestion of seafood Part I: viral and bacterial infections". *The Lancet, Infectious Diseases*, pp 201-212.
124. Adzitey A., and Huda N., (2010). "*Listeria monocytogenes* in foods: incidences and possible control measures". *African Journal of Microbiology Research*.
125. Oermann C., et al., (2015). "Enterovirus D68: A focused review and clinical highlights from the 2014 U.S. outbreak". *Focused Reviews*, pp 775-781.
126. Hammer B., and Bassler B., (2003). "Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*". *Molecular Microbiology*, pp 101-114.
127. Aberoum A., and Jooyandeh H., (2010). "A Review on Occurrence and Characterization of the *Aeromonas* Species from Marine Fishes". *World Journal of Fish and Marine Science*, 519-523.
128. Lynch M., Swift S., Kirke D., Keevil C., Dodd C., and Williams P., (2008). "The regulation of biofilm development by quorum sensing in *Aeromonas hydrophila*". *Environmental Microbiology*.
129. Pillot A., Copin S., Gay M., Malle P., Quilici M., (2010). "Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR". *International Journal of Food Microbiology*, pp 190-197.
130. Xie J., Sun x., Pan Y., and Zhao Y., (2012). "Combining basic electrolyzed water pretreatment and mild heat greatly enhanced the efficacy of acidic electrolyzed water against *Vibrio parahemolyticus* on shrimp". *Food Control*, pp 320-324.
131. Tiruneh M., (2009). "Serodiversity and Antimicrobial Resistance Pattern of *Shigella* Isolates at Gondar University Teaching Hospital, Northwest Ethiopia". *Jpn J Infect Dis*, pp 93-97.
132. Bakr W., Hazzah W., and Abaza A., (2011). "Detection of *Salmonella* and *Vibrio* species in some seafood in Alexandria". *Journal of American Science*, 663-668.
133. Panisello P., Rooney R., Quantick P., and Smith R., (2000). "Application of foodborne disease outbreak data in the development and maintenance of HACCP systems". *International Journal of Food Microbiology*, pp 221-234.
134. Niemira B., and Solomon E., (2005). "Sensitivity of Planktonic and Biofilm-Associated *Salmonella* spp. to Ionizing Radiation". *Applied and Environmental Microbiology*, 2732-2736.
135. Jallewar P., Kurkure N., Pande V., and Barbuddhe S., (2007). "Genotypic characterization of *Listeria* spp. from fresh water fish". *International Journal of Food Microbiology*, pp 120-123.
136. Jami M., Ghanbari M., Zunabovic M., Doming K., and Kneifel W., (2014). "*Listeria monocytogenes* in Aquatic Food Products – A review". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp 798-813.
137. Miya S., Takahashi H., Ishikawa T., Fujii T., and Kimura B., (2010). "Risk of *Listeria monocytogenes* of Raw Ready-to-Eat Seafood Products Available at Retail Outlets in Japan". *Applied and Environmental Microbiology*, pp 3383-3386.
138. Thompson R., Carpenter C., Martini S., and Broadbent J., (2008). "Control of *Listeria monocytogenes* in Read-to-Eat Meats Containing Sodium Levulinate, Sodium Lactate, or a Combination of Sodium Lactate and Sodium Diacetate". *JFS, Food Microbiology and Safety*, pp 239-244.
139. Mai T., and Conner D., (2007). "Effect of temperature and growth media on attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel". *International Journal of Food Microbiology*, pp 120-123.

140. Cruz C., Fletcher G., (2011). "Prevalence and biofilm-forming ability of *Listeria monocytogenes* in New Zealand mussel (*Perna canaliculus*) processing plants". *Food Microbiology*, pp 1387-1393.
141. Carmichael I., Harper I., Coventry M., Taylor P., Wan J., and Hickey M., (1998). "Bacterial colonization and biofilm development on minimally processed vegetables". *Journal of Applied Microbiology*, pp 45-51.
142. Beuchat L., (1996). "Pathogenic Microorganisms Associated with Fresh Procedure". *Journal of Food Protection*, pp 204-216.
143. Sibbille I., Ngando T., Mathieu L., and Block J., (1998). "Protozoan Bacterivory and *Escherichia coli* Survival in Drinking Water Distribution Systems". *Applied and Environmental Microbiology*, pp 197-202.
144. Nguyen C., and Carlin F., (1994). "The Microbiology of Minimally Processed Fresh Fruits and Vegetables". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp 371-401.
145. Aisopou A., Stoianov I., and Graham N., (2012). "In-pipe water quality monitoring in water supply systems under steady and unsteady state flow conditions: A quantitative assessment". *Water Research*, pp 235-246.
146. Little B., and Lee J., (2007). "Microbiologically influenced corrosion". John Wiley & Sons.
147. Giaouris E., and Simoes M., (2018). "Pathogenic Biofilm Formation in the Food Industry and Alternative Control Strategies". *Foodborne diseases*, Handbook of Food Bioengineering.
148. Lelievre C., Legentilhomme P., Gaucher C., Legrand J., Faille C., and Benezech T., (2002). "Cleaning in place: effect of local wall shear stress variation on bacterial removal from stainless steel equipment". *Chemical Engineering Science*, pp 1287-1297.
149. Gibson H., Taylor J., Hall K., and Holah J., (1999). "Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms". *Journal of Applied Microbiology*, pp 41-48.
150. Memisi N., Moracanin S., Milijasevic M., Babic J., and Djukic D., (2015). "CIP cleaning processes in the dairy industry". International 58th Meat Industry Conference "Meat Safety and Quality: Where it goes?".
151. Krivorot M., Kushmaro A., Oren Y., and Giron J., (2011). "Factors affecting biofilm formation and biofouling in membrane distillation of seawater". *Journal of Membrane Science*, pp 15-24.
152. Grinstead D., (2009). "Cleaning and sanitation in food processing environments for the prevention of biofilm formation and biofilm removal". *Biofilm in the Food and Beverage Industries*, pp 331-358.
153. Erriu M., et al., (2014). "Microbial biofilm modulation by ultrasound: Current concepts and controversies". *Ultrasonics Sonochemistry*, pp 15-22.
154. Qulahal N., Gros A., Bonneau M., and Blum L., (2004). "Combined effect of chelating agents and ultrasounds on biofilm removal from stainless steel surfaces. Application to *Escherichia* milk and *Staphylococcus aureus* milk biofilms". *Biofilms*, pp 65-73.
155. Yuan L., Sadiq F., Wang N., Yang Z., and He G., (2020). "Recent advances in understanding the control of disinfectant-resistant biofilms by hurdle technology in the food industry". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, pp 1-16.
156. Wolcott R., Cook R., Johnson E., Jones C., Kennedy J., Simman R., Woo K., Weir D., Schulz G., and Hermans M., (2020). "A review of iodine-based compounds, with a focus on biofilms: results of an expert panel". *Journal of Wound Care*.
157. Quevedo A., Smith J., Rodrick G., and Wright A., (2005). "Ice Immersion as a PostHarvest Treatment of Oysters for the Reduction of *Vibrio Vulnificus*". *Journal of Food Protection*, pp 1192-1197.

158. Cook D., (2003). "Sensitivity of *Vibrio* Species in Phosphate-Buffered Saline and in Oysters to High-Pressure Processing". *Journal of Food Protection*, pp 2276-2282.
159. Meujo D., Kevin D., Peng J., Bowling J., Liu J., Hamann M., (2010). "Reducing oyster-associated bacteria levels using supercritical fluid CO₂ as an agent of warm pasteurization". *International Journal of Food Microbiology*, pp 63-70.
160. Srey S., Jahid I., and Ha S., (2013). "Biofilm formation in food industries: A food safety concern". *Food Control*, pp 572-585.
161. Mah T., (2012). "Biofilm-specific antibiotic resistance". *Future Microbiology*, pp 1061-1072.
162. Nahar S., Mizan F., Ha A., and Ha S., (2018). "Advances and Future Prospects of Enzyme-Based Biofilm Prevention Approaches in the Food Industry". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, pp 1484-1502.
163. Kaplan J., (2018). "Therapeutic Potential of Biofilm-Dispersing Enzymes". *The International Journal of Artificial Organs*, 545-554.
164. Simoes M., Simoes L., and Vieira M., (2010). "A review of current and emergent biofilm control strategies". *Food Science and Technology*, 573-583.
165. Pires P., Melo L., Boas D., Sillankorva S., and Azeredo J., (2017). "Phage therapy as an alternative or complementary strategy to prevent and control biofilm-related infections". *Current Opinion in Microbiology*, pp 48-56.
166. Moltagh A., Bhattacharjee A., and Goel R., (2016). "Biofilm control with natural and genetically-modified phages". *World J Microbiol Biotechnol*, pp 1-10.
167. Azeredo J., and Sutherland W., (2008). "THE Use of Phages for the Removal of Infectious Biofilms". *Current Pharmaceutical Biotechnology*, pp 261-266.
168. Parasion S., et al., (2014). "Bacteriophages as an Alternative Strategy for fighting Biofilm Development". *Polish Journal of Microbiology*, pp 137-145.
169. Szczepanski S., and Lipski A., (2014). "Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation". *Food Control*, pp 224-229.
170. Kerekes E., et al., (2013). "Anti-biofilm forming and anti-quorum sensing activity of selected essential oils and their main components on food-related micro-organisms". *Journal of Applied Microbiology*, 933-942.
171. Sandasi M., Leonard C., and Viljoen A., (2008). "The effect of five common essential oil components on *Listeria monocytogenes* biofilms". *Food Control*, 1070-1075.
172. Mizan F., et al., (2020). "Effect of essential oils on pathogenic and biofilm-forming *Vibrio parahemolyticus* strains, Biofouling". *Biofouling, The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, pp 467-478.
173. Moradi M., and Tajik H., (2017). "Biofilm removal potential of neutral electrolyzed water on pathogen and spoilage bacteria in dairy model systems". *Journal of Applied Microbiology*, pp 1429-1437.
174. Anand S., Singh D., Avadhanula M., and Marka S., (2014). "Development and Control of Bacterial Biofilms on Dairy Processing Membranes". *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18-33.
175. Parisien A., Allain B., Zhang J., Mandeville R., and Lan C., (2007). "Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell walls hydrolases and antimicrobial peptides". *Journal of Applied Microbiology*, pp 1-13.
176. Guether W., Fratamico P., and Annous B., (2009). "Biofilms in the Food and Beverage Industries". *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*, North America
177. Gutierrez D., Rubio L., Martinez B., Rodriguez A., and Garcia P., (2016). "Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry". *Frontiers in Food Microbiology*.

178. Galie S., et al., (2018). "Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods". *Frontiers in Food Microbiology*.
179. Siringan P., Connerton P., Payne R., and Connerton I., (2011). "Bacteriophage-Mediated Dispersal of *Campylobacter jejuni* Biofilms". *Applied and Environmental Microbiology*, pp 3320-3326.
180. Lequette Y., Boels G., Clarisse M., and Faille C., (2010). "Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food industry". *Biofouling, The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, pp 421-431.
181. Meireles A., Borges A., Giaouris E., and Simoes M., (2018). "The current knowledge on the application of anti-biofilm enzymes in the food industry". *Food Research International*, pp 140-146.
182. Poimenidou S., Chrysadaku M., Tzakoniati A., Bikouli V., Nychas G., and Skandamis P., (2016). "Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to paracetic acid and quaternary ammonium compounds". *International Journal of Food Microbiology*, pp 164-171.
183. Korany A., Hua Z., Green T., Hanrahan I., Helmy S., Shinawy E., Kholy A., Hassan G., and Zhu M., (2018). "Efficacy of Ozonated Water, Chlorine, Chlorine Dioxide, Quaternary Ammonium Compounds and Peroxyacetic Acid Against *Listeria monocytogenes* Biofilm on Polystyrene Surfaces". *Frontiers in Food Microbiology*.
184. Presterl E., Suchomel M., Eder M., Reichmann S., Lassnigg A., Graninger W., and Rotter M., (2007). "Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxide on biofilms of *Staphylococcus epidermidis*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, pp 417-420.
185. Mitchell A., et al., (2008). "Resilience of planktonic and biofilm cultures to supercritical CO₂". *The Journal of Supercritical Fluids*, pp 318-325.
186. Mun S., Baek Y., Kim C., Lee Y., and Yoon J., (2012). "Feasibility of supercritical CO₂ treatment for controlling biofouling in the reverse osmosis process". *Biofouling, The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, pp 627-633.
187. Li C., Zhong S., Zhang F., Wang Z., Jiang F., and Wan Y., (2017). "Response of microbial communities to supercritical CO₂ and biogeochemical influences on microbially mediated CO₂-saline-sandstone interactions". *Chemical Geology*, pp 1-9.
188. Peet C., et al., (2015). "Microbial growth under supercritical CO₂". *Journal of Applied Environmental Microbiology*, pp 2881-2892.
189. Sandasi M., Leonard C., and Viljoen A., (2009). "The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*". *Letters in Applied Microbiology*.
190. Chen F., Gao Y., Chen X., Yu Z., and Li X., (2013). "Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection". *International Journal of Molecular Sciences*, pp 17477-17500.
191. Lade H., Paul D., and Kweon J., (2014). "N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing with special reference to use of quorum quenching bacteria in membrane biofouling control". *BioMed Research International*.
192. Suresh M., Biswas R., and Biswas L., (2019). "An update on recent developments in the prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* biofilms". *International Journal of Medical Microbiology*, pp 1-12.
193. Craigen B., Dashiff A., and Kadouri D., (2011). "The Use of Commercially Available Alpha-Amylase Compounds to Inhibit and Remove *Staphylococcus aureus* Biofilms". *The Open Microbiology Journal*, pp 21-31.

194. Dillon M., & Griffith C., (1999). "How to Clean: A management Guide". M.D. Associates, Grimsby, UK

6.2 Ελληνική Βιβλιογραφία

1. Μελαμπινάκη Ζ., Βελονάκης Ε., και Βατόπουλος Α., (2006). «Βιομεμβράνες-Άνθρωπος-Περιβάλλον». Ανασκόπηση, *Archives of Hellenic Medicine*, 411-431.
2. Βλάμης Α. Διάλεξη «Οργάνωσης και δομής των Μικροβιακών Κυττάρων», Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών.
3. Φύτρος Α., (2012). «Μεταφορά και παράμετροι κινητικής του παθογόνου μικροοργανισμού *Salmonella spp.* μετά από προσαρμογή σε διάφορα υπολείμματα τροφίμων και απορρυπαντικών πάνω σε οικιακά σκεύη συντήρησης». Μεταπτυχιακή εργασία του ΜΠΣ «Επιστήμη & Τεχνολογία Τροφίμων & Διατροφή του Ανθρώπου» του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
4. Γιαννούλης Ν., (2019). «Φαινοτυπικός και μοριακός χαρακτηρισμός μικροβιακών στελεχών *Listeria Monocytogenes* απομονωθέντων από βιομηχανίες τροφίμων». Μεταπτυχιακή εργασία του ΜΠΣ «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων», τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
5. Καραπαναγιώτης Γ., (2012). «Απολύμανση-Καθαρισμός-Σύγχρονες απαιτήσεις υγιεινής στη βιομηχανία τροφίμων». Διπλωματική εργασία, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.
6. Τσικάλια Ρ., (2019). «Μοριακός και φαινοτυπικός χαρακτηρισμός μικροβιακών στελεχών *Salmonella spp.* απομονωθέντων από μια Ελληνική βιομηχανική κρέατος». Μεταπτυχιακή Εργασία του ΜΠΣ «Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων» του τμήματος Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
7. Τυπάλδου Μ., (2006). «Το νερό στη βιομηχανία τροφίμων». Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Εμπορίας και Ποιοτικού Ελέγχου Αγροτικών Προϊόντων, Σχολή Τεχν. Γεωπονίας και ΤΕε
8. Γκιαούρης Ε., (2008). «Μελέτη των παραγόντων που επιδρούν στο σχηματισμό βιο-υμενίων από μικροοργανισμούς των τροφίμων». Διδακτορική διατριβή του τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.
9. Παπάζογλου Δ., (2014). «Μελέτη και ποσοτική περιγραφή της ικανότητας σχηματισμού βιο-υμενίου από στελέχη *Salmonella enterica*». Πτυχιακή μελέτη του τμήματος Γεωπονικής Σχολής του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.
10. Τυράκης Θ., και Αποστόλου Α., (2014). «Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας και της αλατότητας στο σχηματισμό βιο-υμενίου πάνω σε γυάλινη επιφάνεια από τροφιμογενή στελέχη *Staphylococcus aureus*». Πτυχιακή Εργασία, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής, Πανεπιστήμιο Αιγαίου.
11. Βιτουλαδίτης Α., (2017). «Σχηματισμός βιο-υμενίου και συμπεριφορά προσκολλημένων κυττάρων *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες». Μεταπτυχιακή εργασία του ΜΠΣ «Ποιότητα, Ασφάλεια Τροφίμων και Υδάτων και Δημόσια Υγεία» του Τμήματος Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

6.3 Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

1. <http://natural-sciences.nwu.ac.za/laboratory-for-electron-microscopy/about-us>
2. <https://microbiologynotes.com/differences-between-fimbriae-and-pili/>