

Στο περιβάλλον της βιομηχανίας, οργανικά μαζί με άλλα ανόργανα μόρια, όπως πρωτεΐνες από το γάλα και το κρέας προσροφούνται στις επιφάνειες σχηματίζοντας μία μεμβράνη (conditioning film). Η συσσώρευση των μορίων από τη μία πλευρά οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών έναντι της ρευστής φάσης και από την άλλη πλευρά μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ίδιας της επιφάνειας, γεγονός που επηρεάζει τη μικροβιακή προσκόλληση. Επίσης, ανάλογα με τις βιομηχανικές συνθήκες και την ηλικία του υλικού μπορεί να έχει ραγίσματα με αποτέλεσμα η δομή του αυτή να προσελκύει τους μικροοργανισμούς (Wirtanen et al., 1996). Τα διάφορα είδη των μικροοργανισμών που αποτελούν ένα βιο-υμένιο αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και μπορεί να εμφανίσουν συνεργιστικές ή και ανταγωνιστικές συμπεριφορές, στην προσπάθεια αποίκησης μιας επιφάνειας και δημιουργίας βιο-υμενίου πάνω σε αυτήν. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών μπορεί να επηρεάζουν τόσο την ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου των επιμέρους ειδών, όσο και την ανθεκτικότητά τους στις αντιμικροβιακές μεταχειρίσεις. Όταν οι συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον είναι κατάλληλες, οι μικροοργανισμοί χρησιμοποιώντας ένα μοναδικό «όπλο» που διαθέτουν, δηλαδή το μεγάλο ρυθμό αύξησή τους (για ορισμένα είδη μικροοργανισμών και υπό τις βέλτιστες συνθήκες ανάπτυξης, μία κυτταρική διαίρεση μπορεί να λαμβάνει χώρα ακόμα και σε 20 μόνο λεπτά), έχουν τη δυνατότητα να αποικίζουν μια επιφάνεια. Οι βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν το μεταβολισμό και κατ'επέκταση τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων είναι τα θρεπτικά συστατικά του τροφίμου ή του υποστρώματος, το νερό, η θερμοκρασία, το pH, το οξυγόνο, οι παρεμποδιστές και ο χρόνος. Οι περιβαλλοντικοί αυτοί παράγοντες, ασκούν καθοριστική επίδραση στην προσκόλληση των βακτηρίων πάνω σε μία επιφάνεια. Έχει αποδειχτεί πως η μέγιστη προσκόλληση πάνω σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα στους 30 °C συμβαίνει σε pH 7.0 για τη *Listeria monocytogenes* και σε pH 8.0-9.0 για τη *Y. enterocolytica* (Bos et al., 2000). Παρακάτω αναφέρεται η επίδραση μερικών παραγόντων αναλυτικότερα.

Ο παράγοντας θερμοκρασία επιδρά όπως είναι γνωστό σημαντικά στην ανάπτυξη, στον πολλαπλασιασμό και στο θάνατο των μικροβιακών πληθυσμών που υπάρχουν μέσα στο βιο-υμένιο. Όλοι οι μικροοργανισμοί αναπτύσσονται σε ένα συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών, έξω από το οποίο ο ρυθμός μεταβολισμού καταστέλλεται και έχουμε το θάνατο των κυττάρων. Αντίστοιχα, οι μικροοργανισμοί σχηματίζουν βιο-υμένια σε συγκεκριμένο εύρος θερμοκρασιών. Από μελέτες που έχουν κατά καιρούς διεξαχθεί, φαίνεται η επίδραση της θερμοκρασίας στο πάχος του βιο-υμενίου. Χαρακτηριστικά αναφέρεται πως το πάχος του βιο-υμενίου αυξάνεται από 150 μm σε 250 μm (περίπου 70%) μέσα σε 7-8 ημέρες, με μια αύξηση της θερμοκρασίας της τάξης των 5 °C, ενώ γίνεται μέγιστο μετά από μία περίοδο 7-8 ημερών (αναφορά). Αντίστοιχα, ένα ουδέτερο pH είναι ιδανικό για την ανάπτυξη των περισσότερων βιο-υμενίων, παρόλο που, μετά τη δημιουργία τους, μπορεί να επιζήσουν και σε πιο ακραίες τιμές pH. Τα συνήθη μέτρα αντιμικροβιακής προστασίας είναι αρκετά δραστικά, ώστε αν εφαρμοσθούν σωστά, το βιο-υμένιο να μην δημιουργείται. Άπαξ όμως και δημιουργηθεί, αντιμετωπίζεται πλέον πολύ δύσκολα.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου μέσα στο βιο-υμένιο, αποδεικνύει την ταχύτατη μείωση της ποσότητας του οξυγόνου που είναι διαθέσιμο στους μικροοργανισμούς καθώς προχωράμε προς το κατώτερο επίπεδο αυτής της δομής και μάλιστα έχει υπολογιστεί ότι όταν το βιο-υμένιο αποκτά 8-10 βακτηριακά κύτταρα, τότε μπορούν να

αναπτυχθούν αναερόβιες συνθήκες στη μεσεπιφάνεια βιο-υμένιο – στερεό υλικό προσκόλλησης (αναφορά).

Ένας ακόμα παράγοντας που ασκεί την δικιά του επιρροή είναι η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών. Οι απόψεις των ερευνητών δίστανται όσον αφορά στη θετική ή αρνητική επίδραση που ασκεί η συγκέντρωση των θρεπτικών συστατικών στην προσκόλληση των κυττάρων. Κάποιες μελέτες απέδειξαν πως η αύξηση των θρεπτικών συστατικών συνδέεται με την αύξηση του αριθμού των κυττάρων που προσκολλώνται σε μία επιφάνεια (Cowan et al., 1991). Ωστόσο, αυτό δεν ισχύει σε όλες τις περιπτώσεις, καθώς έχει βρεθεί πως αρκετά χαμηλή συγκέντρωση θρεπτικών ουσιών είναι επαρκής μερικές φορές για την ανάπτυξη του βιο-υμενίου (Prakash et al., 2003).

Στα πλαίσια αυτού του έργου μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και της στέρησης θρεπτικών συστατικών στην προσκόλλησης και το σχηματισμού βιο-υμενίου πάνω σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα και σε μικροπλακίδια πολυστυρενίου από μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες στελεχών *Salmonella enterica* και *Staphylococcus aureus*.

Συζήτηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα στελέχη εξετάστηκαν για τη δυνατότητα τους να προσκολλώνται πάνω σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα (Α.Χ.). Η μικροβιακή προσκόλληση πάνω σε μια επιφάνεια είναι το πρώτο βήμα στο σχηματισμό ενός βιο-υμενίου, με τους μικροοργανισμούς που αρχικά προσκολλώνται να αποτελούν το «σύνδεσμο» μεταξύ της επιφάνειας και του «ώριμου» βιο-υμενίου. Τα αποτελέσματα της προσκόλλησης απεικονίζονται στο **Γράφημα Α1** για τα στελέχη *S. enterica* και στο **Γράφημα Α2** για τα στελέχη *S. aureus*. Σ' αυτές τις γραφικές παραστάσεις η προσκόλληση έχει εκφραστεί σαν ποσοστό (%) των κυττάρων που προσκολλήθηκαν στην επιφάνεια (μετά από τρία ώρες επώασης στους 15 °C) ($\log \text{cfu/cm}^2$) προς τον αρχικό πληθυσμό πλαγκτονικών κυττάρων μέσα στα οποία επωάστηκε η επιφάνεια ($\log \text{cfu/ml}$), προκειμένου να λάβει χώρα προσκόλληση. Κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει τη μέση τιμή \pm τυπική απόκλιση (οι μέσες τιμές με τουλάχιστον ένα κοινό νούμερο μεταξύ τους δεν είναι σημαντικές διαφορετικές σ' επίπεδο σημαντικότητας 95%). Τα ποσοστά προσκόλλησης των 8 στελεχών *S. enterica* ήταν από 53.6 έως 64.1%, ενώ τα τρία στελέχη *S. aureus* παρουσίασαν αρκετά μεγάλα ποσοστά προσκόλλησης (από 69 έως 71.6%). Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) των αποτελεσμάτων της προσκόλλησης για κάθε βακτηριακό είδος επιβεβαίωσε πως ο αριθμός των κυττάρων που προσκολλώνται πάνω στα τεμάχια Α.Χ. επηρεάζεται σημαντικά ($p < 0.05$) από τον παράγοντα στέλεχος (εκτός από την περίπτωση του *S. aureus*, όπου ο αριθμός των υπό εξέταση στελεχών ήταν αρκετά περιορισμένος, 3).

Αντίστοιχα, οι αριθμοί των βιο-υμενικών κυττάρων ($\log \text{cfu/cm}^2$) που ανακτήθηκαν από τις επιφάνειες Α.Χ. (μέσω της μεθόδου στροβιλισμού με τα σφαιρίδια), μετά από 6 ημέρες επώασης μέσα σε θρεπτικό ζυμό τρυπτόνης-σόγιας (TSB) στους 15 °C, απεικονίζονται στο **Γράφημα Α3** (στελέχη *S. enterica*) και στο **Γράφημα Α4** (στελέχη *S. aureus*). Ο σχηματισμός βιο-υμενίου από τα 8 στελέχη *S. enterica* αυτό κυμαίνονταν από 4.63 έως 5.64 $\log \text{cfu/cm}^2$. Αξιοσημείωτα στην περίπτωση των 3 στελεχών *S. aureus*, ο πληθυσμός των βιο-υμενικών κυττάρων (από 4.71 έως 5.42 $\log \text{cfu/cm}^2$) ήταν χαμηλότερος από τον πληθυσμό των κυττάρων που είχαν αρχικά προσκολληθεί πάνω στα τεμάχια Α.Χ. ($\log \text{cfu/cm}^2$). Ανάλυση διακύμανσης κατά έναν παράγοντα (one-way ANOVA) των αποτελεσμάτων του σχηματισμού βιο-υμενίων για κάθε βακτηριακό είδος επιβεβαίωσε ότι ο παράγοντας στέλεχος δε βρέθηκε να είναι σημαντικός ($p > 0.05$) για τα είδη των *S. enterica* και *S. aureus*.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα της καλλιέργειας κάθε στελέχους που πραγματοποιήθηκε στο πρώτο μέρος των πειραμάτων, έγινε η επιλογή των τριών στελεχών που χρησιμοποιήθηκαν για τις μικτές καλλιέργειες (**Πίνακας Α1**). Η προσκόλληση των κυττάρων και των τριών στελεχών *S. enterica* πραγματοποιήθηκε στους 15 και 30 °C για το χρονικό διάστημα των τριών ωρών. Ο σχηματισμός του βιο-υμενίου μελετήθηκε στους 15 και στους 30 °C και σε δύο θρεπτικά μέσα, TSB και 1/10 TSB. Τα αποτελέσματα της προσκόλλησης απεικονίζονται στο **Γράφημα Α5**. Από τα αποτελέσματα αυτά, φάνηκε ότι τα ποσοστά προσκόλλησης της μονοκαλλιέργειας των τριών στελεχών του είδους *S. enterica* το ποσοστό των κυττάρων που προσκολλήθηκαν στους 30 °C ήταν μεγαλύτερο από το ποσοστό προσκόλλησης των κυττάρων στους 15 °C.

Αντίστοιχα, οι πληθυσμοί των πλαγκτονικών κυττάρων (log cfu/ml) καθώς και των βιο-υμενικών κυττάρων (log cfu/cm²) που ανακτήθηκαν από τις επιφάνειες Α.Χ., μετά από 2 ή/και 6 ημέρες επώασης στις δύο θερμοκρασίες επώασης (15 και 30 °C) και στις δύο συνθήκες σύνθεσης του θρεπτικού μέσου (TSB, 1/10 αραιωμένο TSB), απεικονίζονται στο **Γράφημα Α6**. Σε κάθε γραφική παράσταση ξεχωριστά, οι μέσες τιμές με τουλάχιστον ένα κοινό κεφαλαίο γράμμα μεταξύ τους δεν είναι σημαντικά διαφορετικές, ενώ για κάθε περίοδο επώασης ξεχωριστά (2 ή 6 ημέρες), οι μέσες τιμές με τουλάχιστον ένα κοινό μικρό γράμμα μεταξύ τους δεν είναι σημαντικά διαφορετικές. Οι διαφορές όπου υπάρχουν εκφράζονται σ' επίπεδο σημαντικότητας 95%.

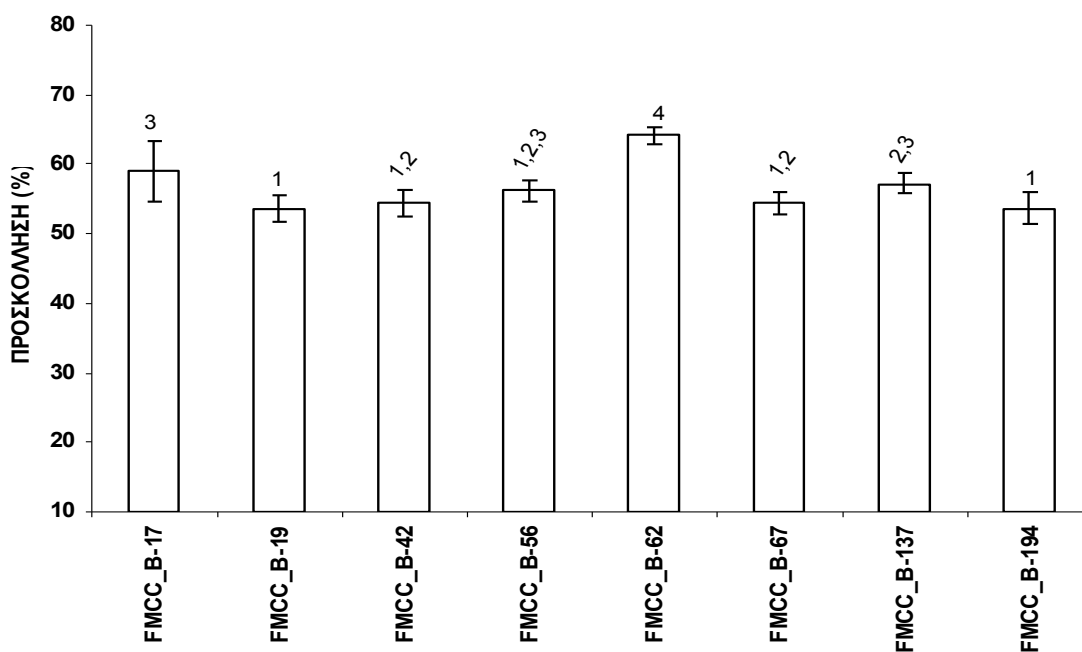
Από τη παρατήρηση των γραφημάτων, βλέπουμε πως ο πληθυσμός των πλαγκτονικών κυττάρων κυμαίνεται γενικά σε υψηλές τιμές (10⁸-10⁹ cfu/ml), χωρίς όμως να παρατηρούμε ιδιαίτερες διαφορές. Τέλος, στην ποσότητα του βιο-υμενίου παρατηρήθηκαν κάποιες μικρές διαφορές. Στους 15 °C και στα δυο θρεπτικά μέσα, το ποσοστό του βιο-υμενίου την έκτη ημέρα της επώασης ήταν περισσότερο σε σύγκριση με εκείνο της δεύτερης ημέρας.

Τα αποτελέσματα της έμμεσης ποσοτικοποίησης (μέσω των μετρήσεων απορρόφησης στα 575 nm) των σχηματισθέντων βιο-υμενίων πάνω στα μικροπλακίδια πολυστυρενίου για τις δύο θερμοκρασίες (15 και 30 °C) και για τα δύο θρεπτικά μέσα (TSB και 1/10 αραιωμένο TSB) απεικονίζονται στο **Γράφημα Α7** (στελέχη *S. enterica*), στο **Γράφημα Α8** (στελέχη *S. aureus*). Όλα τα στελέχη *S. enterica* (εκτός από το στέλεχος FMCC_B-62) σχημάτισαν σημαντικά ($p < 0.05$) περισσότερο βιο-υμένιο όταν αυτά επώαστηκαν σε 1/10 αραιωμένο TSB σε σχέση με το πλήρες TSB, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία επώασης (15 ή 30 °C). Τα 3 στελέχη *S. aureus* σχημάτισαν αρκετά χαμηλές ποσότητες βιο-υμενίου πάνω στα μικροπλακίδια πολυστυρενίου, υπό τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες. Η πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης με αλληλεπιδράσεις (factorial ANOVA) των αποτελεσμάτων του σχηματισμού βιο-υμενίων για κάθε βακτηριακό είδος έδειξε ότι στην περίπτωση των στελεχών *S. enterica* η αλληλεπίδραση θερμοκρασίας - θρεπτικού μέσου δε βρέθηκε να είναι σημαντική ($p > 0.05$), ενώ στην περίπτωση των στελεχών *S. aureus* ο παράγοντας θρεπτικό μέσο δε βρέθηκε να είναι σημαντικός ($p > 0.05$).

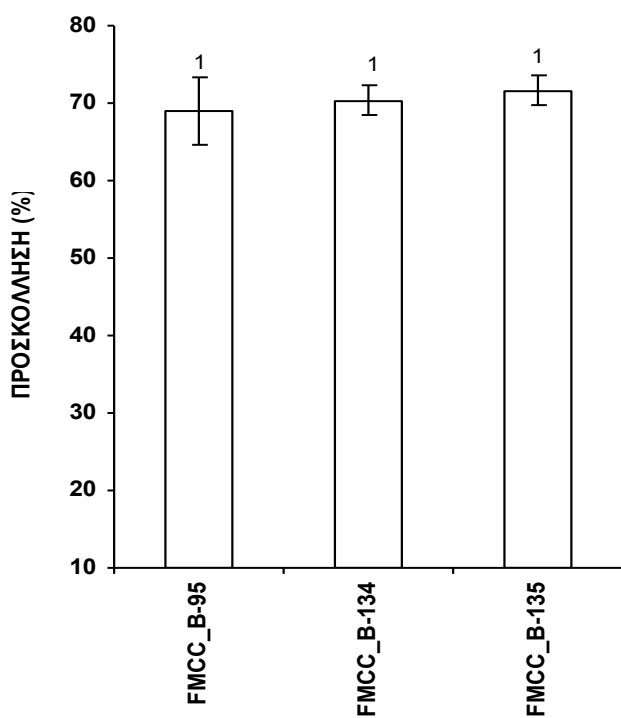
Επιπλέον μελετήθηκε η προσκόλληση και η δημιουργία βιο-υμενίων διαφόρων στελεχών *S. enterica* και ενός στελέχους *S. aureus* MRSA πάνω σε επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα και πολυστυρενίου, υπό διάφορες περιβαλλοντικές συνθήκες, θερμοκρασίας (15 και 30°C), pH (5.5, 6.5 και 7.4) και σύνθεσης θρεπτικού μέσου (Tryptic Soy Broth-TSB και 1/10 TSB). Επιλέχτηκαν, *in vitro* πειραματικές συνθήκες που προσομοιάζουν το περιβάλλον παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων καθώς και στελέχη που έχουν απομονωθεί από διαφορετικές πηγές, όπως κλινικά στελέχη και στελέχη που έχουν απομονωθεί από τρόφιμα και βιομηχανικές επιφάνειες. Με βάση τις μεθόδους προσδιορισμού βιο-υμενίου που εφαρμόστηκαν, τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε log CFU/cm² για την επιφάνεια Α.Χ. και σε απορρόφηση στα 575nm για την επιφάνεια πολυστυρενίου. Διαπιστώθηκε ότι το σύνολο των στελεχών παρουσίασε υψηλά ποσοστά προσκόλλησης (60-70%)

στην επιφάνεια του Α.Χ., με το στέλεχος του *S. aureus* να προσκολλάται σε αυτήν σε ποσοστό που ξεπέρασε το 90% (**Γράφημα Β1**). Ο πληθυσμός των βιο-υμενικών κυττάρων ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) που ανακτήθηκαν από τις επιφάνειες Α.Χ., κατά την επώαση τους για επτά ημέρες σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TSB (pH 6.5) στους 15°C, απεικονίζονται στο **Γράφημα Β2** για τα στελέχη *S. enterica* και στο **Γράφημα Β3** για το *S. aureus* (MRSA). Η πλειοψηφία των στελεχών *S. enterica* που μελετήθηκε σχημάτισε βιο-υμένιο στην επιφάνεια του Α.Χ. ο πληθυσμός του οποίου ξεπέρασε τους 6 $\log \text{CFU}/\text{cm}^2$ μετά από παραμονή του για 96 ώρες στους 15°C. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα της έμμεσης ποσοτικοποίησης, μέσω των μετρήσεων απορρόφησης στα 575 nm, των σχηματισθέντων βιο-υμενίων σε επιφάνειες πολυστυρενίου για τις δύο θερμοκρασίες (15 και 30°C), τις διαφορετικές τιμές pH (5.5, 6.5 και 7.4) και τα διαφορετικά θρεπτικά μέσα (TSB και 1/10 TSB) απεικονίζονται στα **Γραφήματα Β4, Β5 και Β6** για τα στελέχη *S. enterica* και στο **Γράφημα Β7** για το *S. aureus* MRSA. Από τα αποτελέσματα αυτά, φάνηκε ότι στους 30°C, τιμές pH 6.5 και 7.4, και απουσία θρεπτικών συστατικών (1/10 TSB) παρατηρήθηκε σχηματισμός βιο-υμενίου με υψηλές τιμές απορρόφησης στα 575nm για τα ίδια στελέχη. Στο σύνολο των *in vitro* πειραματικών συνθηκών που μελετήθηκαν το στέλεχος *S. aureus* (MRSA) σχημάτισε μεγαλύτερες ποσότητες βιο-υμενίων στην επιφάνεια πολυστυρενίου στους 15°C, ανεξαρτήτως pH και σύστασης θρεπτικού μέσου, ενώ κατά τη διάρκεια συντήρησης των τεμαχίων Α.Χ. στην ίδια θερμοκρασία (15°C) παρατηρήθηκε προοδευτική μείωση του πληθυσμού των βιο-υμενικών κυττάρων.

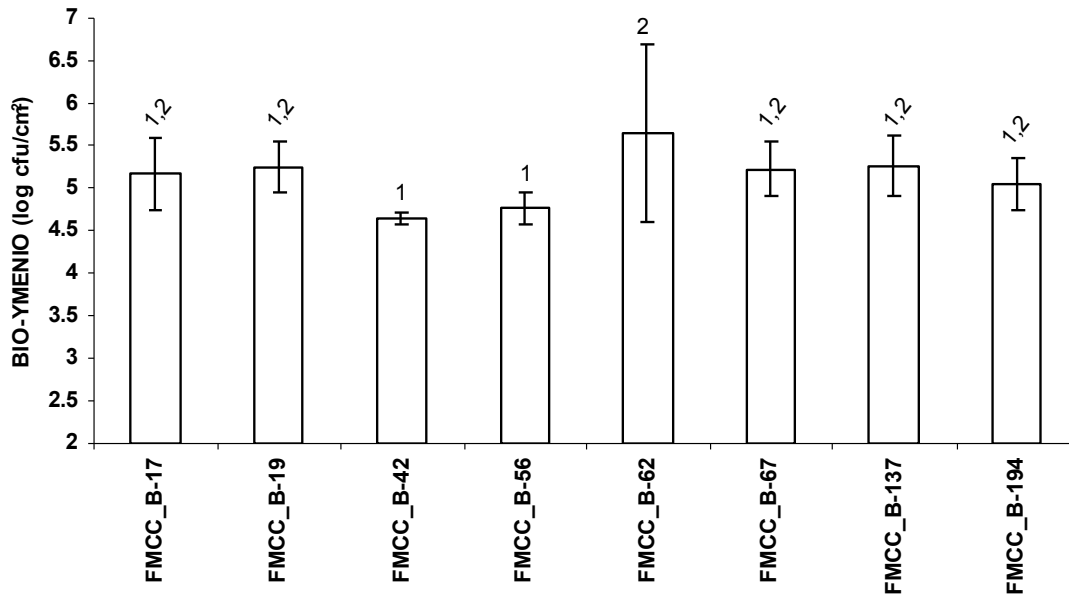
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι - ΓΡΑΦΗΜΑΤΑ



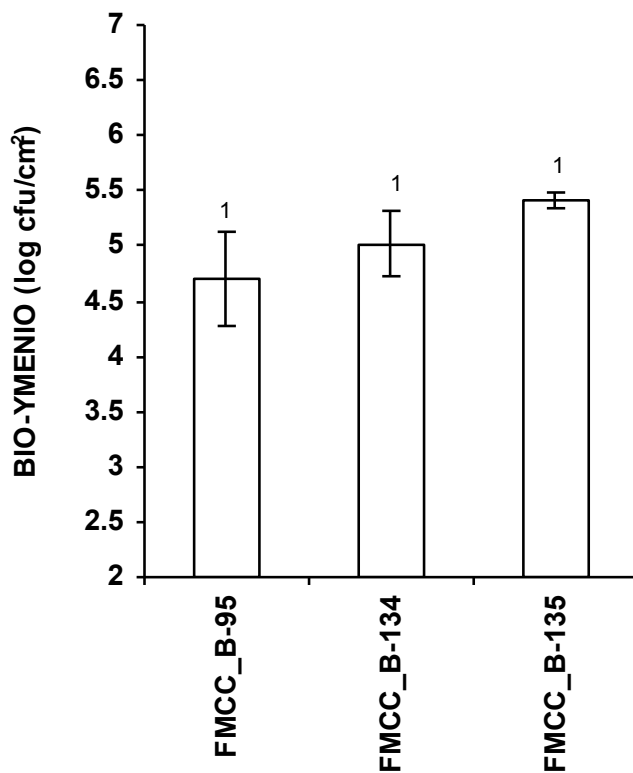
Γράφημα A1. Ποσοστά προσκόλλησης (%) κυττάρων των 8 στελεχών *S. enterica* πάνω στα τεμάχια Α.Χ. μετά από 3 ώρες επώασης στους 15 °C.



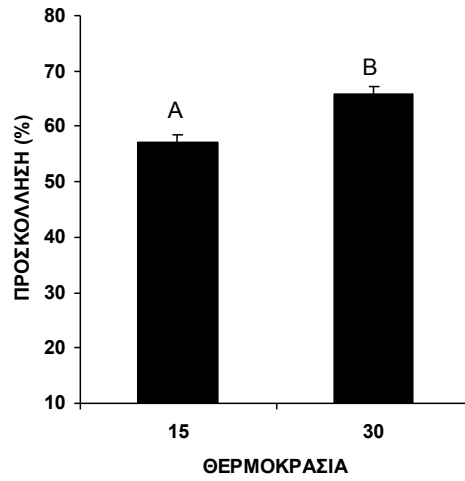
Γράφημα A2. Ποσοστά προσκόλλησης (%) κυττάρων των 3 στελεχών *S. aureus* πάνω στα τεμάχια Α.Χ. μετά από 3 ώρες επώασης στους 15 °C.



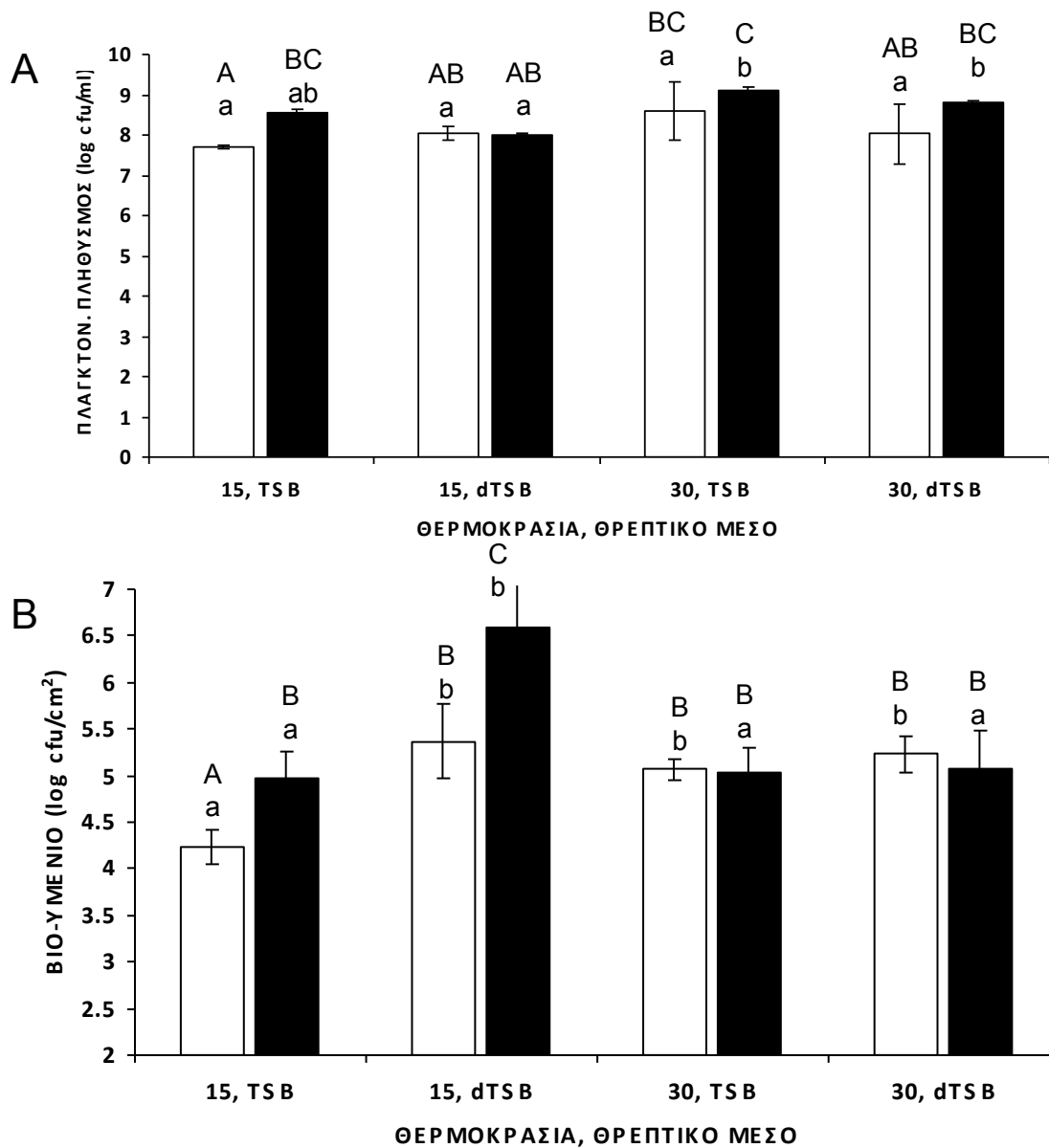
Γράφημα A3. Πληθυσμοί βιο-υμενικών κυττάρων (log cfu/cm²) των 8 στελεχών *S. enterica* πάνω στα τεμάχια Α.Χ., μετά από 6 ημέρες επώασης μέσα σε TSB στους 15 °C.



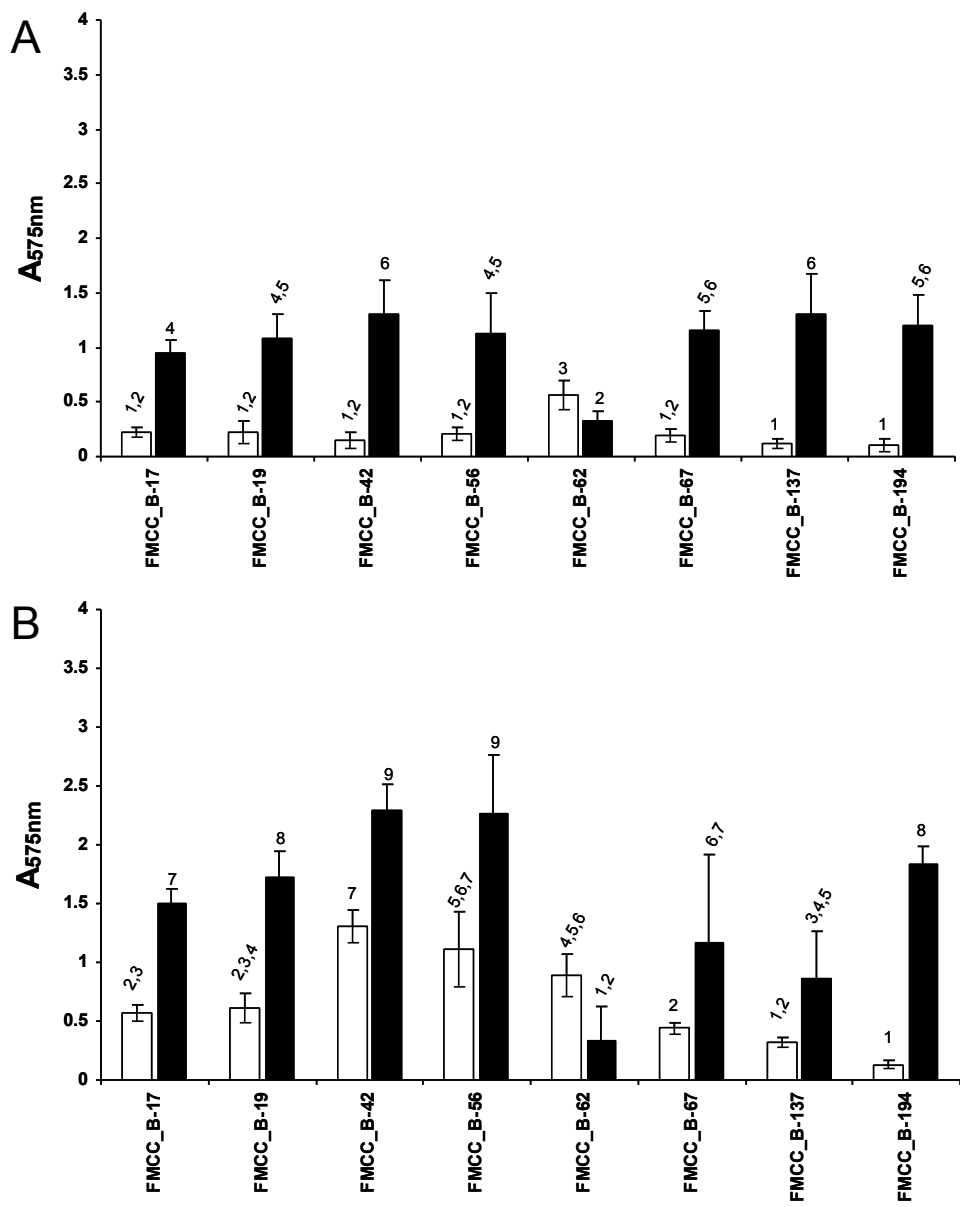
Γράφημα A4. Πληθυσμοί βιο-υμενικών κυττάρων (log cfu/cm²) των 3 στελεχών *S. aureus* πάνω στα τεμάχια Α.Χ., μετά από 6 ημέρες επώασης μέσα σε TSB στους 15 °C.



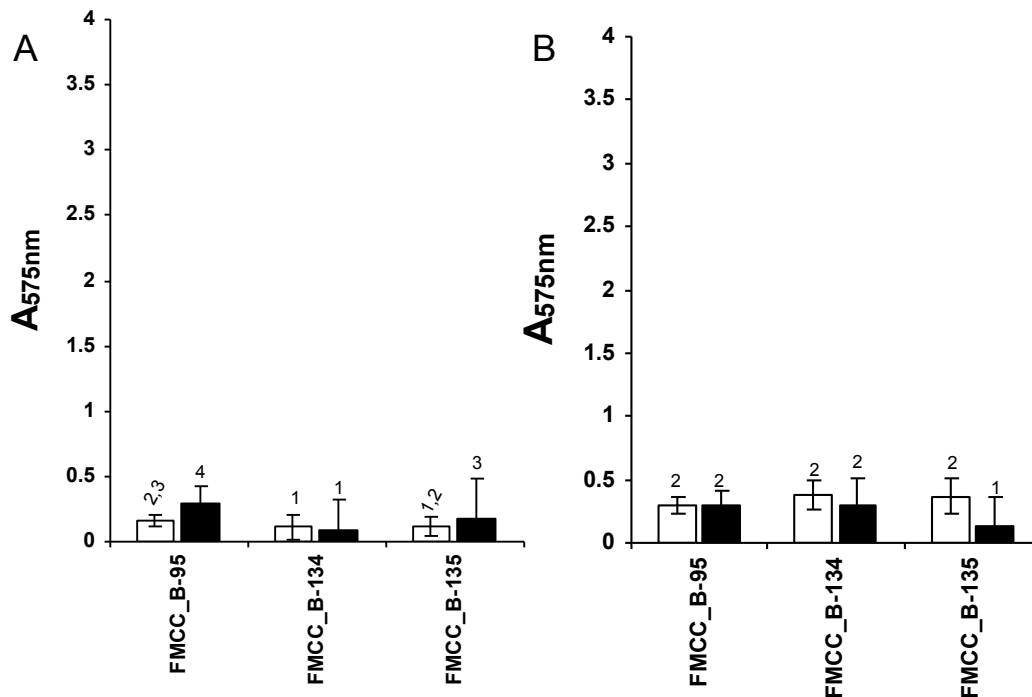
Γράφημα A5. Ποσοστά προσκόλλησης (%) κυττάρων *S. enterica* πάνω στα τεμάχια A.X. μετά από 3 ώρες επώασης στους 15 °C και 30 °C.



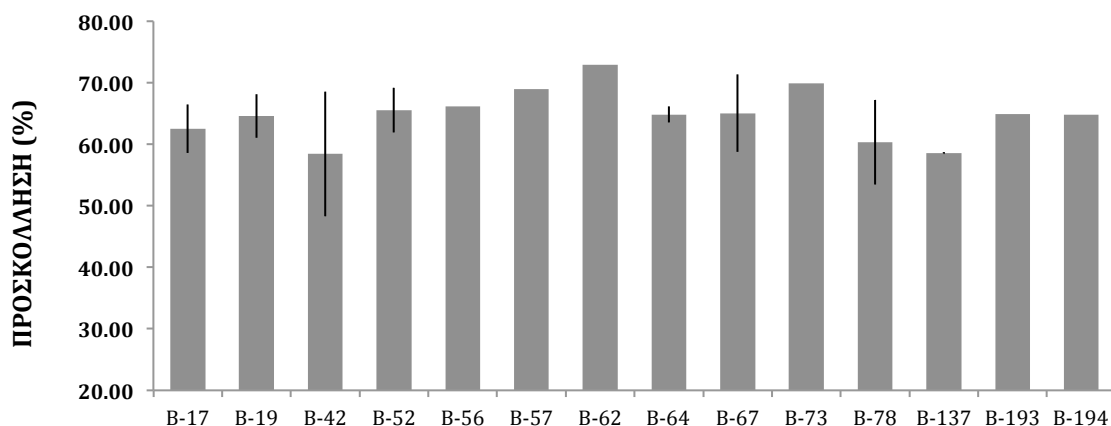
Γράφημα Α6. Πληθυσμοί πλαγκτονικών (log cfu/ml) (A) και βιο-υμενικών κυττάρων (log cfu/cm²) (B) *S. enterica* την 2^η (□) και 6^η (■) ημέρα επώασης, υπό τις εκάστοτε κάθε φορά συνθήκες θερμοκρασίας (15 °C, 30 °C) και σύνθεσης θρεπτικού μέσου (TSB, 1/10 αραιωμένο TSB).



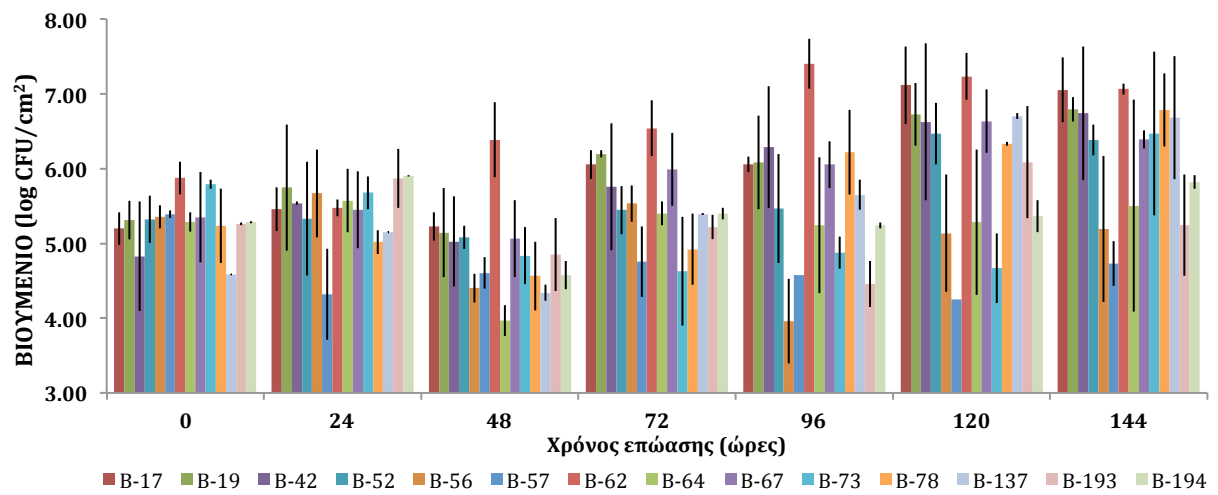
Γράφημα A7. Ποσότητες σχηματισθέντων βιο-υμενίων πάνω στα μικροπλακίδια πολυστυρενίου από τα 8 στελέχη *S. enterica*, όπως αυτές εμμέσως ποσοτικοποιήθηκαν μέσω μετρήσεων απορρόφησης (A_{575nm}). Τα βιο-υμένια αφήθηκαν να σχηματιστούν για 48 ώρες στους 15°C (**A**) και στους 30°C (**B**), μέσα σε TSB (□) και 1/10 αραιωμένο TSB (■).



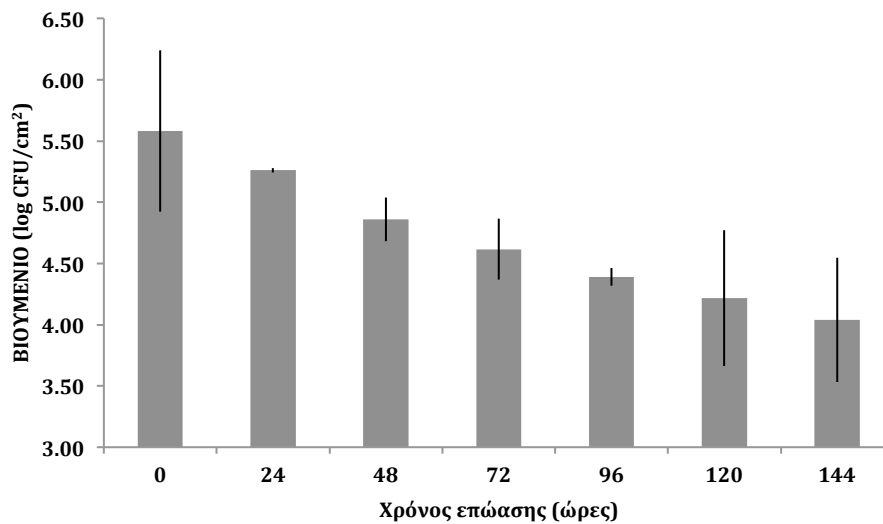
Γράφημα A8. Ποσότητες σχηματισθέντων βιο-υμενίων πάνω στα μικροπλακίδια πολυστυρενίου από τα 3 στελέχη *S. aureus*, όπως αυτές εμμέσως ποσοτικοποιήθηκαν μέσω μετρήσεων απορρόφησης (A_{575nm}). Τα βιο-υμενία αφήθηκαν να σχηματιστούν για 48 ώρες στους 15°C (A) και στους 30°C (B), μέσα σε TSB (□) και 1/10 αραιωμένο TSB (■).



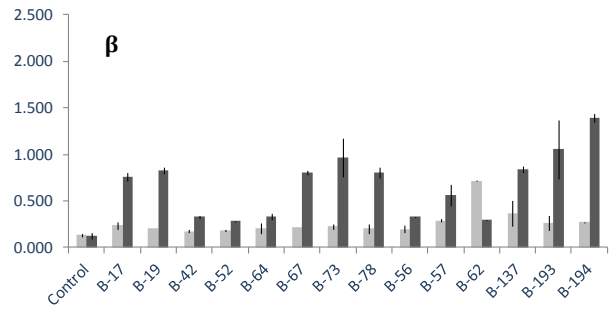
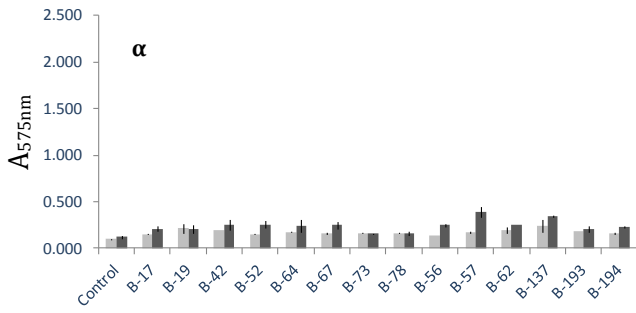
Γράφημα B1. Ποσοστά προσκόλλησης (%) κυττάρων των 14 στελεχών *S. enterica* πάνω στα τεμάχια ανοξείδωτου χάλυβα μετά από 3 ώρες επώασης στους 15°C.



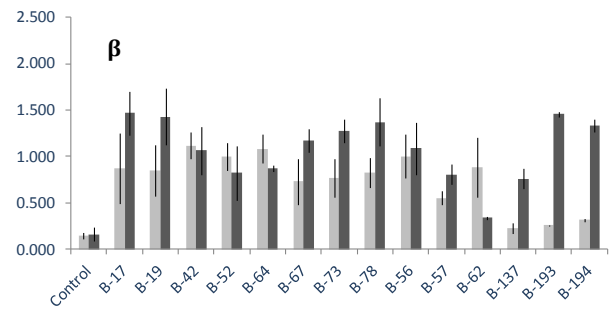
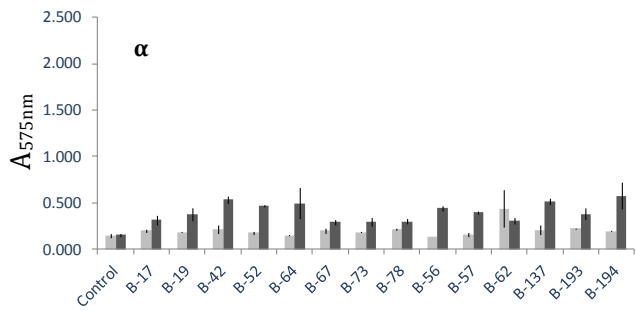
Γράφημα B2. Πληθυσμοί βιουμενικών κυττάρων (log CFU/cm²) των 14 στελεχών *S. enterica* σε τεμάχια ανοξείδωτου χάλυβα κατά την παραμονή τους για επτά ημέρες στους 15°C.



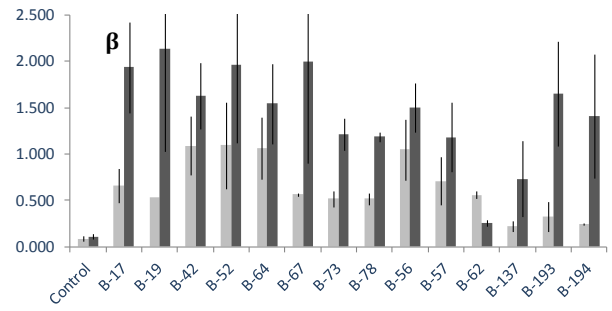
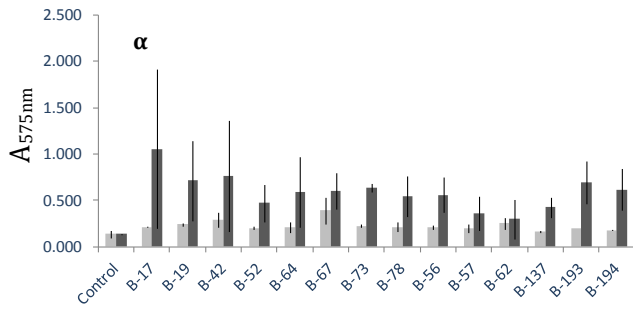
Γράφημα B3. Πληθυσμοί βιουμενικών κυττάρων (log CFU/cm²) του στελέχους *St. aureus* MRSA σε τεμάχια ανοξείδωτου χάλυβα κατά την παραμονή τους για επτά ημέρες στους 15°C.



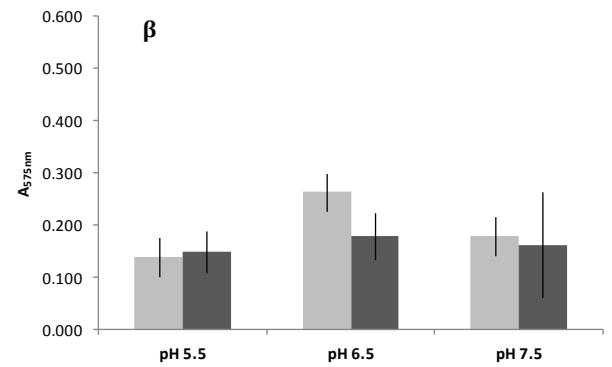
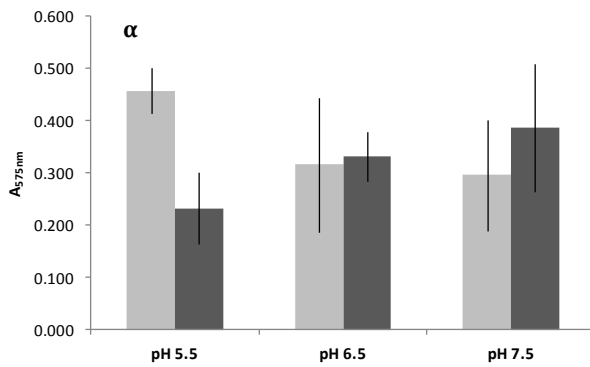
Γράφημα Β4. Σχηματισμός βιουμενίων σε επιφάνειες πολυστυρενίου από τα 14 στελέχη *S. enterica*, όπως ποσοτικοποιήθηκε έμμεσα μέσω μετρήσεων απορρόφησης (A_{575nm}), μέσα σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TSB (☐) και 1/10 TSB (◻) με τιμή pH 5.5, στους 15 (α) και 30°C (β).



Γράφημα Β5. Σχηματισμός βιουμενίων σε επιφάνειες πολυστυρενίου από τα 14 στελέχη *S. enterica*, όπως ποσοτικοποιήθηκε έμμεσα μέσω μετρήσεων απορρόφησης (A_{575nm}), μέσα σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TSB (☐) και 1/10 TSB (◻) με τιμή pH 6.5, στους 15 (α) και 30°C (β).



Γράφημα Β6. Σχηματισμός βιομενίων σε επιφάνειες πολυστυρενίου από τα 14 στελέχη *S. enterica*, όπως ποσοτικοποιήθηκε έμμεσα μέσω μετρήσεων απορρόφησης (A_{575nm}), μέσα σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TSB (☐) και 1/10 TSB (■) με τιμή pH 7.5, στους 15 (α) και 30°C (β).



Γράφημα Β7. Σχηματισμός βιομενίων σε επιφάνειες πολυστυρενίου από το στέλεχος *St. aureus* MRSA, όπως ποσοτικοποιήθηκε έμμεσα μέσω μετρήσεων απορρόφησης (A_{575nm}), μέσα σε θρεπτικό μέσο ανάπτυξης TSB (☐) και 1/10 TSB (■) με τιμή pH 5.5, 6.5 ή 7.5, στους 15 (α) και 30°C (β).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ - ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

(Α)

Προσκόλληση και σχηματισμός βιο-υμενίων πάνω σε ανοξειδωτο χάλυβα

Οι αποστειρωμένες μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτίστηκαν πλήρως μέσα σε 5 ml βακτηριακού εναιωρήματος (αποτελείτο από τα κύτταρα των στελεχών μέσα σε διάλυμα αλάτων 1/4 Ringer, συγκέντρωσης 10^8 cfu/ml, με $A_{600nm}=0.1$) από το κάθε στέλεχος και επωάστηκαν για τρεις ώρες στους 15 °C (χρησιμοποιήθηκαν 4 δοκιμαστικοί σωλήνες για κάθε στέλεχος) χωρίς να αναδεύονται. Ο σκοπός αυτού του σταδίου ήταν η προσκόλληση βακτηριακών κυττάρων πάνω στις επιφάνειες. Μετά την παρέλευση των τριών ωρών, οι μισές επιφάνειες χρησιμοποιήθηκαν για την απαρίθμηση των προσκολλημένων κυττάρων (η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω). Από τις υπόλοιπες μεταλλικές επιφάνειες απομακρύνθηκαν τα ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα των στελεχών (με εμβάπτιση κάθε μεταλλικής επιφάνειας σε 5 ml διαλύματος 1/4 Ringer) και στη συνέχεια οι επιφάνειες τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό ζωμό TSB (τυπική σύνθεση g/l: τρυπτόνη 17, πεπτόνη σόγιας 3, δεξτρόζη 2.5, χλωριούχο νάτριο 5, φωσφορικό κάλιο 2.5) των 5 ml που είχαν εκ των προτέρων αποστειρωθεί σε δοκιμαστικούς σωλήνες. Όλη η διαδικασία της μεταφοράς των επιφανειών γινόταν κάθε φορά με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας. Στη συνέχεια, οι μεταλλικές επιφάνειες, που βυθίστηκαν σε θρεπτικό ζωμό TSB, επωάστηκαν για έξι μέρες στους 15 °C χωρίς ανάδευση για τα στελέχη των *S. enterica* και *S. aureus*. Η θερμοκρασία των 15 °C επιλέχθηκε καθώς αποτελεί μία χαρακτηριστική θερμοκρασία σε χώρους παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων. Υπό τις παραπάνω συνθήκες εξετάστηκε πώς τα ισχυρά προσκολλημένα κύτταρα που βρίσκονταν ήδη πάνω στις μεταλλικές επιφάνειες μπορούν να πολλαπλασιαστούν και να σχηματίσουν βιο-υμένιο. Κατά τη διάρκεια των έξι ημερών γινόταν ανανέωση του θρεπτικού ζωμού TSB με φρέσκο κάθε δύο ημέρες, αφού όμως πρώτα απομακρύνονταν από τις επιφάνειες τα χαλαρά προσκολλημένα κύτταρα (με εμβάπτιση κάθε μεταλλικής επιφάνειας σε 5 ml διαλύματος 1/4 Ringer). Στο τέλος της έκτης ημέρας γινόταν η απαρίθμηση των βιο-υμενικών κυττάρων που βρίσκονταν πάνω στις επιφάνειες ανοξειδωτου χάλυβα, καθώς και των πλαγκτονικών κυττάρων που υπήρχαν στο υγρό θρεπτικό μέσο (TSB) μέσα στο οποίο οι επιφάνειες ήταν εμβαπτισμένες.

Απαρίθμηση προσκολλημένων, πλαγκτονικών και βιο-υμενικών κυττάρων

Για το κάθε στέλεχος χρησιμοποιήθηκαν δύο μεταλλικές επιφάνειες (δηλαδή δύο επαναλήψεις) και το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές χρησιμοποιώντας ανεξάρτητες βακτηριακές καλλιέργειες (**Εικόνα Α1**) κάθε φορά.



Μελέτη προσκόλλησης και σχηματισμού βιο-υμενίου πάνω σε τεμάχια ανοξειδωτού χάλυβα από μικτή καλλιέργεια τριών στελεχών του ίδιου είδους.

Επιφάνειες προσκόλλησης και σχηματισμού βιο-υμενίου

Ο σχηματισμός του βιο-υμενίου πραγματοποιήθηκε αποκλειστικά πάνω σε τεμάχια ανοξειδωτού χάλυβα όπως αναφέρεται παραπάνω.

Βακτηριακά είδη και πειραματικές συνθήκες

Επιλέχθηκαν τρία στελέχη *S. enterica* (Πίνακας A1), σύμφωνα με την ποσότητα βιο-υμενίου που σχημάτισαν στο πρώτο μέρος των πειραμάτων και τα οποία εξετάστηκαν για τη δυνατότητα τους να προσκολλώνται και να σχηματίζουν βιο-υμένιο πάνω σε τεμάχια ανοξειδωτού χάλυβα, υπό μικτή καλλιέργεια τριών στελεχών του είδους.

Τα χαρακτηριστικά των στελεχών, τα θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν για το κάθε είδος, οι συνθήκες ανάπτυξης αλλά και όλα τα στάδια για τη δημιουργία της προκαλλιέργειας περιγράφονται παραπάνω. Για την προετοιμασία των καλλιεργειών εργασίας, 10 ml από τον θρεπτικό ζωμό BHI ενοφθαλμίστηκαν με 10ml προκαλλιέργειας και επωάστηκαν στους 37 °C για 16 ώρες .

Πίνακας A1. Τα 3 στελέχη *S. enterica* που επιλέχθηκαν από το πρώτο πειραματικό στάδιο και χρησιμοποιήθηκαν στο δεύτερο και τρίτο κύκλο πειραμάτων.

Βακτηριακό είδος	Πηγή απομόνωσης	Κωδικός
<i>Salmonella enterica</i>	Τρόφιμο	FMCC_B-42
<i>Salmonella enterica</i>	Τρόφιμο(αυγά)	FMCC_B-56
<i>Salmonella enterica</i>	Τρόφιμο(αυγά)	FMCC_B-62

Οι καλλιέργειες των τριών στελεχών (10ml η καθεμία) συμπύχτηκαν σε μία καλλιέργεια των 30 ml. Τα κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 5000g στους 4 °C. Στη συνέχεια ξεπλύθηκαν δύο φορές με διάλυμα αλάτων (1/4 Ringer solution) και επαναιωρήθηκαν σε διάλυμα αλάτων ώστε τα τελικά αυτά βακτηριακά εναιωρήματα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τα πειράματα (προσκόλλησης και σχηματισμού βιο-υμενίου) που ακολούθησαν. Τα τελικά βακτηριακά εναιωρήματα είχαν κυτταρική συγκέντρωση 10^8 - 10^9 cfu/ml, όπως ακριβώς και στο πρώτο στάδιο των πειραμάτων.

Σε αυτό το στάδιο, τόσο για την προσκόλληση, όσο και για το σχηματισμό των βιο-υμενίων εξετάστηκαν 2 θερμοκρασίες (15 και 30 °C) και 2 θρεπτικά μέσα (TSB, 1/10 αραιωμένο TSB). Πιο συγκεκριμένα, απαριθμήθηκαν τα κύτταρα που είχαν προσκολληθεί στα τεμάχια ανοξειδωτού χάλυβα μετά από 3 ώρες επώασης στους 15 και 30 °C, ενώ ακόμα μελετήθηκε κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες το βιο-υμένιο που σχηματίζει η καλλιέργεια και των τριών στελεχών για 6 ημέρες, με ανανέωση θρεπτικού μέσου κάθε 2 ημέρες. Η διαφορετικότητα των πειραμάτων του δεύτερου μέρους σε σχέση με το πρώτο μέρος έγκειται στο ότι παράλληλα με την πρώτη ανανέωση του θρεπτικού μέσου στις 48 ώρες γινόταν και η μέτρηση του βιο-υμενίου και των πλαγκτονικών κυττάρων που είχαν σχηματιστεί μέχρι το συγκεκριμένο χρονικό διάστημα στους 15 και στους 30 °C και στα δύο θρεπτικά μέσα (TSB και 1/10 αραιωμένο TSB).

Το τελικό αποτέλεσμα, που εξήχθη από την απαρίθμηση των αποικιών οι οποίες εμφανίστηκαν στα τρυβλία, εκφράστηκε σε cfu/cm² και cfu/ml αντίστοιχα και αυτό με τη σειρά του μετατράπηκε σε λογαρίθμους για την καλύτερη απεικόνισή του στις γραφικές παραστάσεις.

(B)

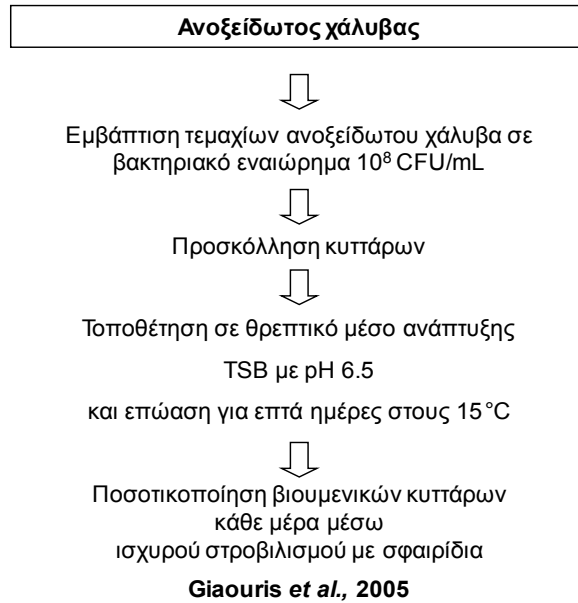
Τα δεκαπέντε στελέχη των οποίων μελετήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιουμενίων σε επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και πολυστυρενίου, υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες παρουσιάζονται παρακάτω (**Πίνακας 1**).

Πίνακας 1. Στελέχη των οποίων μελετήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιουμενίων.

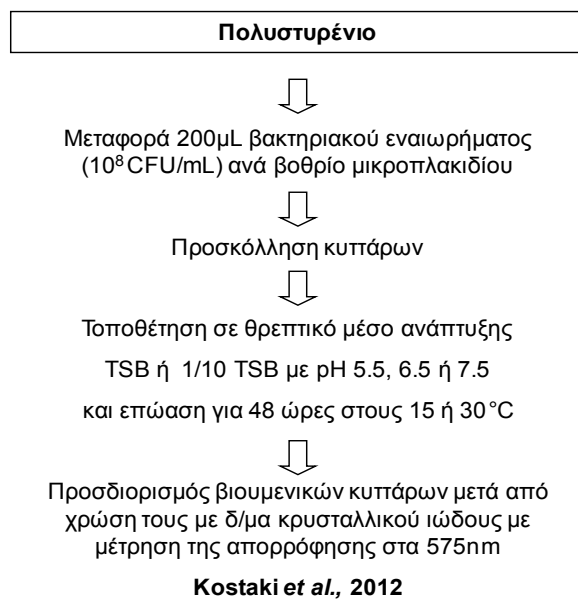
Στέλεχος	Κωδικός FMCC*
<i>Salmonella enterica</i>	B-17
<i>S. enterica</i>	B-19
<i>S. enterica</i> Psk2	B-42
<i>S. enterica</i> Ps1	B-52
<i>S. enterica</i>	B-64
<i>S. enterica</i> Sh0	B-67
<i>S. enterica</i> TSA1	B-73
<i>S. enterica</i> TSA6	B-78
<i>S. enterica</i> serovar Enteritidis PT4	B-56
<i>S. enterica</i> serovar Enteritidis P469815	B-57
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium DSM 554	B-62
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium DT 193	B-137
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium 4/74	B-193
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium JH3298	B-194
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA COL	B-410

***FMCC:** Food Microbiology Culture Collection - Βάση μικροοργανισμών Εργ. Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Για το σχηματισμό βιουμενίου χρησιμοποιήθηκαν επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και πολυστυρενίου. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες που επιλέχθηκαν για τη μελέτη της προσκόλλησης και της δημιουργίας βιουμενίων, καθώς οι μέθοδοι προσδιορισμού αυτών περιγράφονται συνοπτικά στα διαγράμματα που ακολουθούν (**Διαγράμματα 1 και 2**).



Διάγραμμα 1. Διάγραμμα ροής προσδιορισμού βιουμενίου σε επιφάνεια ανοξειδωτου χάλυβα.



Διάγραμμα 2. Διάγραμμα ροής προσδιορισμού βιουμενίου σε επιφάνεια πολυστυρενίου

Βιβλιογραφία

- Bos R., Van der Mei H. C., Gold J., and Busscher H. J., 2000. Retention of bacteria on a substratum surface with micro-patterned hydrophobicity. *FEMS Microbiology Lett.*, 189(2), 311-315.
- Cowan M.M., Warren T.M. and Fletcher M., 1991. *Biofouling*, 3, 23-34.
- Kostaki, M., Chorianopoulos N., Brahou E., Nychas G.-J., and E. Giaouris. 2012. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2586-2595
- Prakash B., Veeregowda B.M. and G. Krishnappa., 2003. Biofilms : A survival strategy of bacteria. *Current Science*, Vol.85.
- Wirtanen G., Husmark U. Mattila – Sandholm, T., 1996. Microbial evaluation of the biotransfer potential from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. *J.Food Prot.* 59, p. 727 – 733.