

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ:

**«Παρακολούθηση ανάπτυξης βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* σε
μεταλλικές επιφάνειες με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου»**

Παπαϊωάννου Κ. Ελένη

ΒΟΛΟΣ 2012

**«Παρακολούθηση ανάπτυξης βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές
επιφάνειες με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

- 1) **Μποζιάρης Ιωάννης**, Επίκουρος Καθηγητής, Υγιεινή και Συντήρηση Ιχθυηρών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Επιβλέπων***,
- 2) **Κορμάς Κωνσταντίνος**, Αναπληρωτής Καθηγητής, Οικολογία Υδρόβιων Μικροοργανισμών, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***,
- 3) **Παναγιώτης Βερίλλης**, Λέκτορας, Χρήση Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και Ανάλυσης Εικόνας στην Ιστολογία, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, ***Μέλος***.

Αφιερώνεται

Στην οικογένειά μου,

Κωνσταντίνο,

Ευαγγελία, Δημήτρη

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Αειφορική Διαχείριση Υδατικού Περιβάλλοντος» του Τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας & Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Το θέμα της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν «Παρακολούθηση ανάπτυξης βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου».

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής Επίκουρο Καθηγητή κ. Ιωάννη Μποζιάρη για την πολύτιμη βοήθειά του, την υποστήριξη και καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια όλων των σταδίων της εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής, τόσο κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Κορμά, καθώς και τον Λέκτορα κ. Παναγιώτη Βερίλλη για την καλή διάθεση, το χρόνο που διέθεσαν και τις πολύτιμες συμβουλές που μου προσέφεραν στη διεξαγωγή των πειραμάτων και στη συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή κ. Χρήστο Νεοφύτου για τις συμβουλές του και τις παρεμβάσεις του κατά τη συγγραφή της εργασίας.

Επίσης, οι θερμές ευχαριστίες μου αποτείνονται στην υποψήφια Διδάκτορα Φωτεινή Παρλαπάνη για την αμέριστη υποστήριξη και καθοδήγησή της κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων μου.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διευθυντή του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Καθηγητή κ. Νυχά Ιωάννη για την παροχή των μικροοργανισμών, καθώς και την εταιρεία ΔΙΑΣ Ιχθυοκαλλιέργειες ΑΕ για την προμήθειά μας με χημικές ουσίες καθαρισμού και απολύμανσης.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, διεξήχθη στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Γεωπονίας Ιχθυολογίας κα Υδάτινου Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Σκοπός της διατριβής ήταν η παρακολούθηση της ανάπτυξης βιοϋμενίου του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες, προσομοιώνοντας το πραγματικό περιβάλλον που είναι οι επιφάνειες μιας μονάδας επεξεργασίας αλιευμάτων.

Προκειμένου να επιτευχθεί ο σκοπός, χρησιμοποιήθηκε θρεπτικός ζωμός από σάρκα τσιπούρας που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο από τσιπούρες υδατοκαλλιέργειας και αποτέλεσε το θρεπτικό μέσο ανάπτυξης του βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες (κουπόνια) ανοξείδωτου χάλυβα διαστάσεων (3x1 mm) τύπου AISI-304, 3 × 0,8 × 0,1 cm, που χρησιμοποιείται για κατασκευή εξοπλισμού που έρχεται σε επαφή με τα τρόφιμα. Από κάθε τσιπούρα χρησιμοποιήθηκε μόνο το φιλέτο, το οποίο μαζί με απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1, ομογενοποιήθηκαν, ακολούθησε φιλτράρισμα, βρασμός και τέλος ο ζωμός μοιράστηκε σε δοκιμαστικούς σωλήνες με τα κουπόνια όπου και εμβολιάστηκε ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*.

Η συνολική διάρκεια ανάπτυξης του βιοϋμενίου ήταν δέκα μέρες, σε θερμοκρασία 15 °C, συνήθης μέση θερμοκρασία στις εγκαταστάσεις μεταποίησης αλιευτικών προϊόντων. Η παρακολούθηση του πληθυσμού των κυττάρων του μελετηθέντος είδους στο βιοϋμένιο πραγματοποιήθηκε με απόξεση των κυττάρων από τις μεταλλικές επιφάνειες με χρήση γυάλινων σφαιριδίων διαμέτρου 1,5 mm και θρεπτικά υλικά Tryptone Soy Agar (TSA) και Palcam μετά από επώαση 24-48 h στους 37 °C.

Εξαιτίας του γεγονότος ότι στη φύση κανένας μικροοργανισμός δε βρίσκεται μόνος του αλλά συνυπάρχει και με άλλους, επιλέχθηκε ο οργανισμός *Pseudomonas* sp. προκειμένου να αναπτυχθούν μεικτές καλλιέργειες βιοϋμενίων των δύο οργανισμών. Ο πληθυσμός των κυττάρων του βιοϋμενίου *Pseudomonas* sp. απαριθμήθηκε σε θρεπτικά υλικά TSA και CFC μετά από επώαση 24 h στους 25 °C.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός - απολύμανση της *Listeria monocytogenes* με χρήση χημικών καθαριστικών και απολυμαντικών που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων, προκειμένου να παρατηρηθεί κατά πόσο και αν μπορεί να καταπολεμηθεί το βιοϋμένιο που σχηματίζεται στις μεταλλικές επιφάνειες.

Σε κάθε ένα από τα πειράματα, εκτός από την παρακολούθηση του πληθυσμού των κυττάρων του βιοϋμενίου, έγινε παρατήρηση του βιοϋμενίου που σχηματίστηκε στις μεταλλικές επιφάνειες, με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου.

Οι αρχικοί πληθυσμοί των κυττάρων του βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes*, μετά την προσκόλληση ήταν περί τα 10^4 cfu/cm², ενώ οι μέγιστοι πληθυσμοί ήταν 10^6 cfu/cm² οι οποίοι παρατηρήθηκαν μετά από παρέλευση οχτώ ημερών. Για τον πληθυσμό των κυττάρων του βιοϋμενίου *Pseudomonas* sp. οι τιμές κυμάνθηκαν από 10^4 (αρχικός πληθυσμός) ως 10^7 cfu/cm² (μέγιστος πληθυσμός) με το μέγιστο πληθυσμό να παρατηρείται μετά από 10 ημέρες. Η συγκαλλιέργεια των δύο παθογόνων μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp., έδειξε ότι ο *Pseudomonas* sp. αναστέλλει την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* ενώ αντίθετα ευνοείται η δικιά του ανάπτυξη, με αποτέλεσμα ο μέγιστος πληθυσμός της *Listeria* να φτάνει στο επίπεδο των 10^5 cfu/cm², ενώ ο μέγιστος πληθυσμός του *Pseudomonas* (10^7 cfu/cm²) να παρατηρείται μετά από παρέλευση τριών ημερών σε αντίθεση με τις 10 ημέρες ως μεμονωμένη καλλιέργεια. Τέλος, στο πείραμα του καθαρισμού –

απολύμανσης του βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes* παρατηρήθηκε πτώση του πληθυσμού κατά τρεις λογαρίθμους από την επίδραση των καθαριστικών-απολυμαντικών ουσιών.

Η παρατήρηση του βιοϋμενίου των παθογόνων μικροοργανισμών με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο έδωσε μια πιο εμπεριστατωμένη όψη της κατάστασης, καθώς τα επίπεδα του πληθυσμού εκφρασμένα σε αριθμούς μετατράπηκαν σε εικόνες.

Λέξεις κλειδιά: βιοϋμένιο, *Listeria monocytogenes*, ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, ζωμός ιχθύος.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
1.1	<i>Listeria monocytogenes</i>	4
1.1.1	Χαρακτηριστικά.....	4
1.1.2	Πρόκληση ασθενειών.....	7
1.2	Βιοϋμένια	8
1.2.1	Χαρακτηριστικά.....	8
1.2.2	Μηχανισμοί προσκόλλησης κυττάρων βιοϋμενίων.....	10
1.2.3	Εξωπολυσακχαριτικό στρώμα (EPS).....	12
1.3	Απομάκρυνση, απολύμανση βιοϋμενίου	12
1.3.1	Απολυμαντικές ουσίες.....	14
1.3.2	Αντιστάσεις στις απολυμαντικές ουσίες.....	16
1.4	Σκοπός της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.....	16
2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1	Θρεπτικά Υλικά.....	18
2.1.1	Tryptone Soy Agar (TSA).....	18
2.1.2	Tryptic Soy Broth (TSB).....	19
2.1.3	Palcam Agar Base.....	21
2.1.4	Cephaloridine Fucidin Ceftrimide (CFC) Agar.....	23
2.2	Προετοιμασία θρεπτικού ζωμού ιχθύος.....	24

2.3 Προετοιμασία εμβολίου μικροοργανισμών.....	25
2.4 Σχηματισμός και καταμέτρηση βακτηριακού πληθυσμού στο βιοϋμένιο.....	26
2.4.1 Εμβολιασμός μικροοργανισμών σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος.....	26
2.5 Καθαρισμός-απολύμανση βιοϋμενίου.....	30
2.6 Προετοιμασία δειγμάτων για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο	31
2.6.1 Παρασκευή διαλύματος 0,1 M κακοδυλικού νατρίου (sodium cacodylate)...	31
2.6.2 Παρασκευή διαλύματος 2,5 % γλουταρδεϋδης (glutaraldehyde).....	31
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	33
3.1 Αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού βιοϋμενίου.....	33
3.1.1 Αύξηση βιοϋμενίου <i>Listeria monocytogenes</i> σε μεταλλικές επιφάνειες.....	33
3.1.2 Αύξηση βιοϋμενίου <i>Pseudomonas</i> sp. σε μεταλλικές επιφάνειες.....	35
3.1.3 Σύγχρονη ανάπτυξη βιοϋμενίου <i>Listeria monocytogenes</i> και <i>Pseudomonas</i> sp. σε μεταλλικές επιφάνειες.....	37
3.1.4 Καθαρισμός - Απολύμανση βιοϋμενίου της <i>Listeria monocytogenes</i>	41
3.2 Παρατήρηση δημιουργίας βιοϋμενίου με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.....	45
3.2.1 Ζωμός ιχθύος στις μεταλλικές επιφάνειες.....	45
3.2.2 Δημιουργία βιοϋμενίου της <i>Listeria monocytogenes</i> σε μεταλλικές επιφάνειες.....	46

3.2.3 Δημιουργία βιοϋμενίου του <i>Pseudomonas</i> sp.. σε μεταλλικές επιφάνειες.....	49
3.2.4 Καθαρισμός – Απολύμανση της <i>Listeria monocytogenes</i>	50
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	55
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	63
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	64
7. ABSTRACT.....	69

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. *Listeria monocytogenes*

1.1.1. Χαρακτηριστικά

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι ένα Gram⁺ βακτήριο, προαιρετικά αναερόβιο, μη σπορογόνο, με ραβδοειδή μορφή (βάκιλλος) (Εικ. 1). Η βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξής του κυμαίνεται στους 30°C με 37°C. Σε αντίθεση με πολλά άλλα μεσόφιλα βακτήρια, μπορεί να αναπτυχθεί ακόμα και σε χαμηλές θερμοκρασίες από -4 ως 10°C (ψυχρότροφος) (Lorber 2007). Γενικά το θερμοκρασιακό εύρος ανάπτυξής του, κυμαίνεται από -4 ως 45°C (Hanna & Wang 2007). Αναπτύσσεται και επιβιώνει σε ένα μεγάλο εύρος ακραίων περιβαλλόντων, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες, υψηλές οσμωτικές συνθήκες (10 – 11 % NaCl) και τιμές pH από 4 ως 9, συνθήκες οι οποίες αναστέλλουν την ανάπτυξη των περισσότερων βακτηρίων (Chae & Schraft 2001, Hanna & Wang 2007, Hansen & Vogel 2011).



Εικόνα 1 : Φωτογραφία της *Listeria monocytogenes* από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). (<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Listeria.html> 15/1/2012)

Το γένος *Listeria* αποτελείται από τα είδη *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, δύο νέα είδη τα οποία πρωτοαναφέρθηκαν το 2009, τα *L. marthii* και *L. rocourtiae* και από τη *L. grayi* η οποία έχει μακρινή συγγένεια με τα υπόλοιπα είδη *Listeria*. Η *Listeria monocytogenes* μαζί με το *L. ivanovii*, φαίνεται ότι αποτελεί παθογόνο για τα θηλαστικά, ενώ το δεύτερο εμφανίζεται σπάνια και κατά κύριο λόγο προκαλεί ασθένειες και στα μηρυκαστικά (Duarte *et al.* 1999, Orsi *et al.* 2011). Η *Listeria monocytogenes* αντιπροσωπεύει το είδος που σχετίζεται τόσο με ασθένειες στα ζώα όσο και στους ανθρώπους. Ως δυνητικά σαπροτροφικό βακτήριο μπορεί να ζήσει στο χώμα και σε βλάστηση που βρίσκεται σε αποσύνθεση, όμως όταν διαπεράσει τον οργανισμό ανθρώπων και ζώων μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ασθένειες (Orsi *et al.* 2011).

Μέχρι τη δεκαετία του '80 η επίδρασή του στον ανθρώπινο οργανισμό ήταν αβέβαιη. Έπειτα από διάφορα επεισόδια λιστερίωσης στη Βόρεια Αμερική, οι μελέτες έδειξαν ότι τα αίτια οφείλονταν σε τροφές. Μετά την απομόνωση και τη μελέτη της *Listeria monocytogenes* από κλινικές και τροφικές πηγές, διαπιστώθηκε ότι έχει την ικανότητα να αποικίζει τις επιφάνειες σε μονάδες επεξεργασίας τροφίμων με επακόλουθη επιμόλυνση των τροφίμων προς κατανάλωση (Harvey *et al.* 2007).

Οι κανόνες υγιεινής στην παραγωγή τροφίμων ολοένα και βελτιώνονται. Όμως, έχει διαπιστωθεί ότι ακόμα και αν λαμβάνονται υψηλά μέτρα υγιεινής και τρόποι απολύμανσης, προκειμένου τα διάφορα είδη *Listeria* να μειωθούν στο ελάχιστο, κάποια στελέχη με ιδιαίτερη αντοχή παραμένουν στο χώρο για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ιδιαίτερα στον εξοπλισμό και το χώρο που χρησιμοποιείται στην παραγωγική διαδικασία (Chae & Schraft 2000). Εκτιμάται ότι η δημιουργία βιοϋμενίου από τη *Listeria monocytogenes* σε επιφάνειες όπου πραγματοποιείται η παραγωγική διαδικασία

τροφίμων, ίσως είναι ένας σημαντικός λόγος για την επιβίωση των στελεχών (Harvey *et al.* 2007).

Το βακτήριο *Listeria monocytogenes* μπορεί να απομονωθεί από διάφορα περιβάλλοντα, ειδικά από αυτά που σχετίζονται με τροφές. Έχει απομονωθεί από πολλά προϊόντα περιλαμβανομένων λαχανικών, γάλατος, τυριών, ψαριών και κρεατικών, καθώς και έτοιμων φαγητών προς κατανάλωση (Norwood & Gilmour 1999). Επίσης, από επιφανειακά νερά, από το έδαφος, από ζωοτροφές που βρίσκονται σε αποθήκες φύλαξης, από φυτά σε αποσύνθεση, από κόπρανα θηλαστικών, από το 5% από υγιείς ενήλικες (Huss *et al.* 2000, Lorber 2007, Belessi *et al.* 2011). Σε εργαστήρια γαλακτοκομικών προϊόντων έχει βρεθεί ότι έχει επιζήσει για επτά συνεχόμενα χρόνια (Simoes *et al.* 2010). Στα αλιεύματα τα οποία ευνοούν την ανάπτυξη μικροοργανισμών εξαιτίας του υψηλού pH (6,5) (Gram and Huss 1996), μπορεί να βρεθεί τόσο στο δέρμα τους όσο και εσωτερικά, κυρίως στα βράγχια (Galaviz-Silva 2009).

Έρευνες που έγιναν στις Ηνωμένες Πολιτείες σε βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων, έδειξαν για τις διάφορες περιοχές της βιομηχανίας, ότι το 87% των περιοχών που ευνόησαν την ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* ήταν υγρές, έναντι ενός ποσοστού 13% των περιοχών που ήταν ξηρές. Γίνεται αντιληπτό, ότι η υγρασία διαδραματίζει καθοριστικό παράγοντα στην ανάπτυξή της (Jeong & Frank 1994, Αρβανιτογιάννης και συν. 2001).

Η *Listeria monocytogenes* έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών διαφορετικών κλάδων, κυρίως, εξ' αιτίας των βιολογικών διαδικασιών της που ποικίλουν ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται και τις λοιμώξεις που προκαλεί στα ζώα αλλά και στον άνθρωπο. Όταν ένα κύτταρο του ξενιστή επιμολυνθεί εξαπλώνεται και στα άλλα

κύτταρα, ενώ μέσα σε 8 ώρες περίπου μπορούν να επιμολυνθούν άλλα 10 κύτταρα (Portnoy 2007).

1.1.2. Πρόκληση ασθενειών

Η *Listeria monocytogenes* δεν είναι ένας συνήθης οργανισμός που προκαλεί ασθένεια στο σύνολο του πληθυσμού. Παρόλ' αυτά, σε ορισμένες ομάδες ανθρώπων όπως νεογέννητα, έγκυες, ηλικιωμένοι, άτομα που βρίσκονται σε υποκείμενη νόσο ή σε ανοσοκαταστολή, μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα όπως βακτηριαιμία και μηνιγγοεγκεφαλίτιδα. Η μόλυνση τροφίμων με *Listeria monocytogenes* και η πρόκληση λιστερίωσης, μπορεί να επιφέρει πυρετό και γαστρεντερίτιδα. Η λιστερίωση στους ανθρώπους τυπικά συμβαίνει από την κατάποση του *Listeria monocytogenes* από τα τρόφιμα. Υπάρχουν όμως και άλλοι τρόποι, όπως ο κατακόρυφος (από τη μητέρα στο παιδί), ο ζωο-νοσογόνος (από την επαφή των ζώων με τον άνθρωπο), και ο νοσοκομειακός (Low and Donachie 1997, Churchill *et al.* 2006, Lorber 2007).

Η ικανότητα της *Listeria monocytogenes* να προκαλεί προβλήματα στην υγεία των ανθρώπων, έγκειται στην παραγωγή της λιστεριολυσίνης, ενός ενζύμου που προκαλεί λύση των κυττάρων του αίματος. Η ακριβής μολυσματική δόση είναι άγνωστη και ποικίλει για τις διάφορες κατηγορίες ανθρώπων. Συνεπώς η πιθανότητα να νοσήσει κάποιος, εξαρτάται από τη λοιμογόνο δύναμη του παθογόνου, των αριθμό των κυττάρων κατά την κατάποση, την υγεία του ανθρώπου (FAO 2004). Αν και η ανάμειξη της *Listeria monocytogenes* στις τροφικές δηλητηριάσεις υστερεί σε σχέση με αυτές που προκαλούνται από τα είδη της *Salmonella*, *Campylobacter* κ.α. τα οποία παραμένουν μόνιμοι κίνδυνοι στην ασφάλεια τροφίμων, η *Listeria monocytogenes*

αποτελεί έναν ιδιαίτερο μικροοργανισμό για έρευνα, εξ' αιτίας του υψηλού ρυθμού θνησιμότητας που προκαλεί, ο οποίος έχει εύρος από 20-35% (Agle 2007).

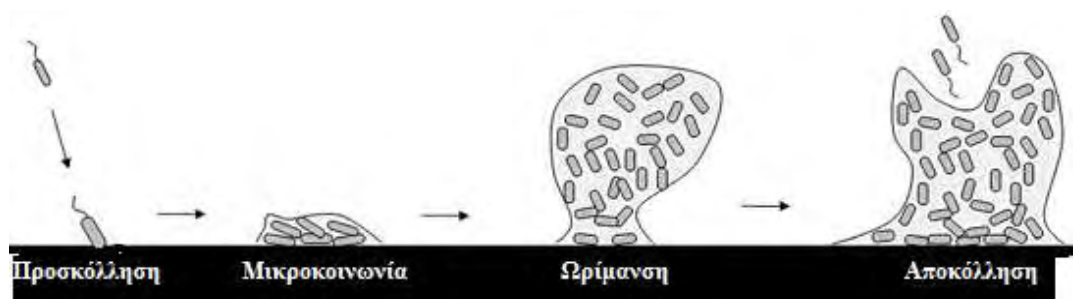
1.2. Βιοϋμένια

1.2.1. Χαρακτηριστικά

Ένα βιοϋμένιο θεωρείται μια κοινότητα μικροοργανισμών αποτελούμενη από κύτταρα, τα οποία, προσκολλώνται σε ένα υπόστρωμα ή το ένα στο άλλο και με το ξέπλυμα δεν μπορούν να απομακρυνθούν. Αυτά τα κύτταρα είναι ενσωματωμένα σε ένα εξωκυτταρικό πολυμερικό στρώμα. Τα κύτταρα στο βιοϋμένιο παρουσιάζουν διαφορετικού είδους ανάπτυξη και γονιδιακή αντιγραφή σε σύγκριση με τα μεμονωμένα κύτταρα (Agle 2007, Lourenco *et al.* 2011). Το βιοϋμένιο μπορεί να σχηματιστεί από κάθε είδους μικροοργανισμού, περιλαμβανομένων αλλοιωγόνων και παθογόνων, υπό κατάλληλες συνθήκες. Ορισμένα βακτήρια έχουν μεγαλύτερη τάση να σχηματίζουν βιοϋμένια όπως συμβαίνει με τα είδη *Pseudomonas* (Poulsen 1999).

Τα βιοϋμένια μπορούν να σχηματιστούν σε κάθε είδους επιφάνεια στα περισσότερα οικοσυστήματα όπου τα θρεπτικά συστατικά είναι άφθονα (Εικ. 2). Έχουν βρεθεί οπουδήποτε όπως στη φύση, σε βιομηχανίες, σε αστικές περιοχές. Στη βιομηχανία τροφίμων η δημιουργία βιοϋμενίου μπορεί να οδηγήσει σε μειωμένη μεταφορά θερμότητας, αυξημένη αντίσταση στη ροή και σε επιμόλυνση των τροφίμων (Vanne *et al.* 1996, Donk and Gaalman 2004, Agle 2007). Αυτό που τους επιτρέπει να σχηματίζονται και να εγκαθίστανται σε διάφορα περιβάλλοντα κάνοντάς τα ανθεκτικά σε συνθήκες στρες (νερό, θρεπτικά συστατικά) αλλά και στα ποικίλα απολυμαντικά και

βιοκτόνα, είναι η δημιουργία της εξωκυτταρικής πολυσακχαριτικής μεμβράνης (Kives 2006).



Εικόνα 2 : Σχηματική αναπαράσταση της δημιουργίας βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes* (Renier *et al* 2011). Αρχικά προσκολλώνται τα μεμονωμένα κύτταρα σε κάποια επιφάνεια, δημιουργείται μια αποικία η οποία με το πέρασμα το χρόνου ωριμάζει και έπειτα κάποια κύτταρα μπορούν να αποκολληθούν και να αποτελέσουν τη βάση για το σχηματισμό ενός νέου βιοϋμενίου.

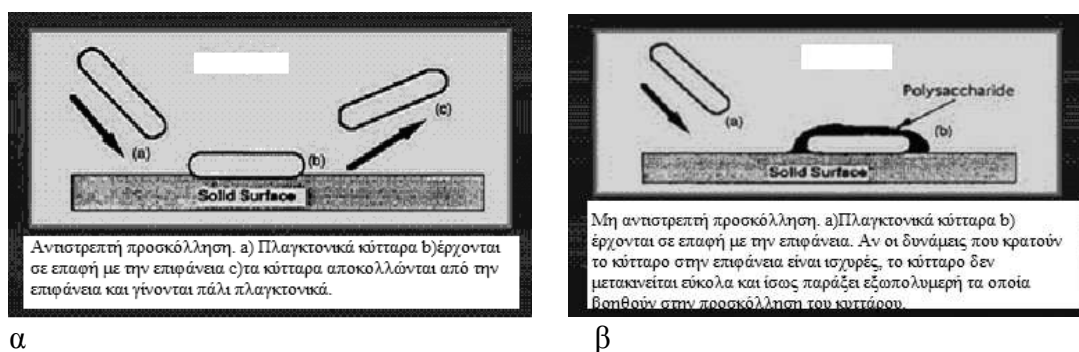
Τα βιοϋμένια δεν είναι ομογενή αποτελούμενα από μία στρώση κυττάρων. Είναι ετερογενή και αποτελούνται από μικροκοινωνίες (Simoes *et al.* 2008). Αποτελούνται κατά 15% από κύτταρα και κατά 85% από ένα στρώμα πολυμερούς. Τα κύτταρα εσωκλείονται μέσα στο στρώμα πολυμερούς και δημιουργούν διάφορους σχηματισμούς. Στα κενά που υπάρχουν μεταξύ των σχηματισμών διαρρέουν κανάλια νερού τα οποία μεταφέρουν διάφορες χρήσιμες ουσίες, όπως θρεπτικά συστατικά και διαλυμένο οξυγόνο. Η ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών, δίνει στο βιοϋμένιο τις ιδιότητες της πυκνότητας και της ελαστικότητας (Agle 2007). Τα ώριμα βιοϋμένια είναι οργανωμένα και δομημένα έτσι ώστε να υπάρχουν κανάλια νερού παντού διασκορπισμένα για να διευκολύνουν την ανταλλαγή θρεπτικών συστατικών, μεταβολιτών αλλά και για την απέκκριση άχρηστων ουσιών – προϊόντων (Shi & Zhu

2009). Κάθε βιοϋμένιο μπορεί να αποτελείται από μία ως και πολλών ειδών κοινωνίες, με τα βιοϋμένια του δεύτερου τύπου να τείνουν να είναι πυκνότερα. Οι κοινότητες μικροβίων μπορεί να διακοπούν κάποια στιγμή και να αποτελέσουν τον 'σπόρο' για τη δημιουργία ενός νέου βιοϋμενίου οπουδήποτε αλλού . Τα βιοϋμένια μπορεί να χρειαστούν πάνω από 10 μέρες για να σχηματιστούν πλήρως. Η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών, το είδος του οργανισμού, αλλά και οι περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, pH, διαλυμένο οξυγόνο, αλατότητα, σίδηρος) επηρεάζουν τη δημιουργία βιοϋμενίου (Agle 2007).

1.2.2. Μηχανισμοί προσκόλλησης κυττάρων σε επιφάνειες

Τα βιοϋμένια σχηματίζονται σταδιακά. Υπάρχουν δύο ειδών μοντέλα προσκόλλησης των κυττάρων σε κάποια επιφάνεια για το σχηματισμό βιοϋμενίου.

Το πρώτο αφορά το μοντέλο των δύο σταδίων, όπου το πρώτο βήμα περιλαμβάνει τη μεταφορά των βακτηρίων πολύ κοντά στην επιφάνεια έτσι ώστε να μπορούν να προσροφηθούν από την επιφάνεια. Αυτό το στάδιο είναι αναστρέψιμο – τα βακτήρια μπορούν να μετακινηθούν με το απλό πλύσιμο. Αφού προσκολληθούν, το δεύτερο βήμα εξαρτάται από το χρόνο και αφορά την παραγωγή του εξωκυτταρικού υλικού το οποίο προσκολλά τα βακτήρια στην επιφάνεια (Εικ. 3) (Hood & Zottola 1995).



Εικόνα 3 : α) Αντιστρεπτή προσκόλληση, β) Μη αντιστρεπτή προσκόλληση (Stier 2005)

Το δεύτερο μοντέλο, των τριών σταδίων δείχνει τη διαδικασία προσκόλλησης, σε σχέση με την απόσταση των βακτηρίων από την επιφάνεια. Σε απόσταση μεγαλύτερη των 50 nm, μόνο μεγάλου εύρους δυνάμεις λαμβάνουν χώρα και η προσκόλληση είναι αναστρεπτή. Καθώς η απόσταση φτάνει τα 20 nm, μαζί, μεγάλου εύρους δυνάμεις και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις πραγματοποιούνται. Το τρίτο στάδιο συμβαίνει σε αποστάσεις μικρότερες των 15 nm, όπου επιπλέον δυνάμεις εμπλέκονται, όπως η παραγωγή πολυμερών που τελικά οδηγούν στη μη αναστρέψιμη επικόλληση.

Και στα δύο μοντέλα, το τελικό στάδιο εξαρτάται από την ικανότητα του μικροοργανισμού να μεταβολίζει και να παράγει υλικό που μπορεί να κολλήσει στην επιφάνεια (Hood & Zottola 1995).

Η μετάβαση από τις αδύναμες στις ισχυρές αλληλεπιδράσεις με την επιφάνεια οφείλεται κυρίως στη δημιουργία της εξωπολυμερικής ουσίας, η οποία αποτελείται από διαφορετικές σειρές βιοσυνθετικών πολυμερών τα οποία μπορεί να αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και φωσφολιπίδια. Καθώς το βιοϋμένιο ωριμάζει, τα κανάλια και οι πόροι αναπτύσσονται και τα βακτήρια ανακατανέμονται. Τα κύτταρα στο βιοϋμένιο έχουν επίσης την ικανότητα να ανταλλάσσουν γενετικό

στοιχεία με αυξανόμενο ρυθμό. Αυτό ίσως επιτρέψει στις επόμενες γενιές να αποκτήσουν αντιβιοτική αντοχή, τοξικότητα και επιβίωση έναντι των περιβαλλοντικών συνθηκών (Agle 2007).

1.2.3. Εξωπολυσακχαρικό στρώμα (EPS)

Τα μικροβιακά βιοϋμένια χαρακτηρίζονται από την παραγωγή ενός ιδιαίτερα ισχυρού δικτύου EPS, υψηλής υγρασίας. Η παραγωγή του EPS από τα μικρόβια, βοηθά σε πολλές λειτουργίες όπως :

1. διευκόλυνση της αρχικής επικόλλησης ενός μικροβίου σε μια επιφάνεια
2. δημιουργία και διατήρηση της μικροκοινωνίας και του βιοϋμενίου
3. αντίσταση και διατήρηση του βιοϋμενίου στο στρες που προκαλείται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες και από τα αντιμικροβιακά καθεστώτα
4. Το EPS βοηθάει τα βακτήρια στην κατακράτηση θρεπτικών ουσιών.

Το EPS λειτουργεί ως σταθεροποιητής της κατασκευής του βιοϋμενίου και ως ένα εμπόδιο στα εχθρικά περιβάλλοντα, ενώ ποικίλει ανάλογα με το είδος και τη φυσιολογία του οργανισμού (Poulsen 1999). Πολυσακχαρίτες, φωσφολιπίδια, πρωτεΐνες, και ακόμα νουκλεϊκά οξέα, είναι τα κύρια συστατικά του EPS, ενώ σε μερικές ειδικές περιπτώσεις έχουν βρεθεί κρύσταλλα ορυκτών, σωματίδια λάσπης και ενώσεις του αίματος (Shi & Zhu 2009).

1.3. Απομάκρυνση, απολύμανση βιοϋμενίου

Η απολύμανση στη βιομηχανία τροφίμων, όπου η μικροβιακή προσκόλληση σε εξοπλισμό και επιφάνειες είναι συνηθισμένη πρακτική (Martinez-Tome *et al* 2000 Egan

et al 2007)), καθίσταται ιδιαίτερος σημαντική, καθώς οι υγρές επιφάνειες προσφέρουν ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Wirtanen 2001).

Όταν ένα βιοϋμένιο εμφανίζεται, απαιτείται άμεση δράση, η οποία μπορεί να είναι είτε έκπλυση, είτε δημιουργία συνθηκών σοκ με χλωρίνη ή μονοχλωραμίνη. Στρεσάροντας τους μικροοργανισμούς με μία μη αποτελεσματική μέθοδο καθαρισμού, μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να ενισχυθεί η δημιουργία του βιοϋμένιου (Poulsen 1999).

Εξαιτίας της ανθεκτικότητας των βιοϋμένων σε σχέση με τα μεμονωμένα κύτταρα, οι διάφορες ουσίες εξόντωσής τους μπορεί να αποδειχτούν αναποτελεσματικές (Longhi *et al.* 2008, Shi & Zhu 2009). Τα βιοϋμένια μπορούν να αποτελέσουν συνεχή πηγή μόλυνσης στη βιομηχανία τροφίμων ακόμα και μετά τη χρήση απολυμαντικών. Αυτό οφείλεται στην εξωκυτταρική μεμβράνη η οποία μπορεί να μην εξαλειφθεί πλήρως, ακόμα και όταν όλα τα κύτταρα του εκάστοτε μικροοργανισμού έχουν καταστραφεί. Αν κάποιο μέρος της παραμείνει θα ευνοήσει την προσκόλληση νέων κυττάρων τα οποία στη συνέχεια θα δημιουργήσουν νέο βιοϋμένιο (Kives 2006). Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί μια από τις πιο κύριες εστίες μόλυνσης (Schothorst 1998, Aarnisalo *et al.* 2006, Burlingame and Pineiro 2007).

Η επιλογή των κατάλληλων απολυμαντικών, εξαρτάται από την κατανόηση της οικοφυσιολογίας του εκάστοτε μικροοργανισμού που δημιουργεί το βιοϋμένιο, από την αποτελεσματικότητά τους, την ασφάλεια και την ευκολία απολύμανσης. Ιδιαίτερη σημασία δίνεται στη διαβρωτική ικανότητα των χημικών συστατικών, και στις μετέπειτα επιπτώσεις στα τελικά προϊόντα (Simoes *et al.* 2010) .

1.3.1. Απολυμαντικές ουσίες

Η απολύμανση έχει ως στόχο την εξάλειψη των μικροοργανισμών αλλά και των πρόσφορων εδαφών που θα τους επιτρέψουν να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν. Συνήθως στη βιομηχανία τροφίμων επιλέγονται οι χημικοί τρόποι απολύμανσης, μερικοί από τους οποίους περιγράφονται παρακάτω.

Χλωρίνη. Η χρήση απολυμαντικών με βάση τους τις ενώσεις χλωρίου όπως υγρή χλωρίνη, υποχλωριώδες, οργανική και ανόργανη χλωραμίνη, είναι πολύ συχνή στη βιομηχανία τροφίμων. Σχετικές έρευνες όμως αποτρέπουν τη χρήση της, εξαιτίας της αντίδρασης της χλωρίνης με οργανικό υλικό που μπορεί να παράγει καρκινογόνα (τρίαλομεθάνια, χλωροφόρμιο, χλωροφαινόλες).

Διοξείδιο του χλωρίου (ClO_2). Το διοξείδιο του χλωρίου χρησιμοποιείται σε αντικατάσταση της χλωρίνης. Η οξειδωτική του τάση ξεπερνά κατά 2.5 φορές αυτή της χλωρίνης, ενώ δεν επηρεάζεται από το pH και το οργανικό υλικό. Συγκεντρώσεις των 200 ppm χρησιμοποιούνται για τον εξοπλισμό στη βιομηχανία τροφίμων, ενώ συγκεντρώσεις 1-5 ppm χρησιμοποιούνται στα φρέσκα φρούτα.

Ιωδιούχες ενώσεις. Τα λεγόμενα ιωδιωφόρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία τροφίμων αλλά περιορισμένα. Χαρακτηριστικά τους όπως, η διαβρωτικότητα, η μειωμένη δράση σε χαμηλές θερμοκρασίες, η χρώση διαφόρων πλαστικών επιφανειών αλλά και τροφίμων που κυρίως περιέχουν άμυλο, αποτρέπει τη χρήση τους. Συγκεντρώσεις 10 – 100 ppm συνιστώνται σε επιφάνειες στη βιομηχανία τροφίμων (Zenki & Omariah 2006).

Τεταρτοταγείς ενώσεις του αμμωνίου (Quaternary ammonium compounds-Quats). Τα Quats είναι οργανικές ενώσεις που περιλαμβάνουν τέσσερις λειτουργικές ομάδες (R) ενωμένες ομοιοπολικά σε ένα κεντρικό άτομο αζώτου (Pelczar *et al.* 2009, Tezel

2009). Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση μυκήτων, βακτηρίων και λιπόφιλων ιών, ενώ είναι αναποτελεσματικά με τα σπόρια και τους υδρόφιλους ιούς (Lorian 2005). Ακόμα και αν δεν χρησιμοποιηθούν στις απαιτούμενες ποσότητες που θα θανατώσουν τα μικρόβια, μπορούν να αναστείλουν τη δράση τους (Pelczar *et al.* 2009). Είναι μη διαβρωτικά στις μεταλλικές επιφάνειες (σε αντίθεση με τη χλωρίνη), είναι ενεργά και σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, έχουν χαμηλή τοξικότητα, υψηλή διαλυτότητα στο νερό και δεν επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από το οργανικό υλικό. Στα μειονεκτήματά τους συγκαταλέγονται η περιορισμένη δράση τους υπό αλκαλικές συνθήκες, η δημιουργία υπερβολικού αφρού και η ασυμβατότητά τους με ορισμένα απορρυπαντικά (Zenki & Omarish 2006). Είναι χρήσιμα στη βιομηχανία τροφίμων και ποτών για την απολύμανση σκευών, εξοπλισμού και επιφανειών (Pelczar *et al.* 2009).

Ο τρόπος δράσης των Quats έναντι των βακτηρίων, έγκειται στην εξουδετέρωση της ενέργειας που παράγουν τα ένζυμα, τη μετουσίωση των βασικών κυτταρικών πρωτεϊνών και στη καταστροφή της κυτταρικής μεμβράνης (Lorian 2005). Ο τρόπος δράσης των στα βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει τη διατάραξη της διπλοστιβάδας λιπιδίων της κυττοπλασματικής μεμβράνης και την εξωτερική μεμβράνη όταν πρόκειται για Gram⁻ βακτήρια. Αυτή η ενέργεια οδηγεί σε μία σταδιακή διαρροή των κυττοπλασματικών συστατικών έξω από το κύτταρο. Χαμηλές συγκεντρώσεις δεσμεύουν τις ανιονικές περιοχές που βρίσκονται στην επιφάνεια της μεμβράνης και δημιουργούν στο κύτταρο την ανικανότητα οσμωτικής ρύθμισης, τη διαρροή των ιόντων καλίου και των πρωτονίων. Οι μεσαίες συγκεντρώσεις αναστέλλουν διαδικασίες που σχετίζονται με τη μεμβράνη, όπως αναπνοή, μεταφορά ουσιών, βιοσύνθεση κυτταρικού τοιχώματος. Οι υψηλές συγκεντρώσεις εξοντώνουν τα κύτταρα με την αποσύνθεση των μεμβρανών, την απελευθέρωση κυττοπλασματικών συστατικών και

την πήξη πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Τα Quats συμμετέχουν στην αναστολή της ενζυμικής αναπνοής και στη διάχυση της κινητήριας δύναμης πρωτονίων (PMF) τα οποία επιδρούν στο μικροβιακό μεταβολισμό, στην ενεργό μεταφορά και τη σύνθεση του ATP (Tezel 2009).

1.3.2. Αντιστάσεις στις απολυμαντικές ουσίες

Υπάρχουν υποθέσεις ότι οι μικροοργανισμοί αναπτύσσουν αντιστάσεις στα χημικά σκευάσματα εξαιτίας της έντονης χρήσης τους και έπειτα επιστρέφουν στη φυσιολογική τους κατάσταση, μόλις δηλαδή σταματήσει να επιδρά το ενεργό συστατικό. Η υψηλή αντίσταση στα μικροβιοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την απολύμανση επιφανειών, έχει εμπλακεί και με την έξαρση της *Listeria monocytogenes* στη βιομηχανία τροφίμων (Lorian 2005).

Η χρήση διαφόρων απολυμαντικών ορισμένες φορές είναι αναποτελεσματική, καθώς πολλές φορές έχουν βρεθεί οργανισμοί ακόμα και σε προϊόντα που έχουν υποστεί απολύμανση (το *Pseudomonas* sp. έχει βρεθεί σε συμπυκνωμένα διαλύματα ιωδίου). Τα διάφορα απολυμαντικά θα πρέπει να είναι όσο το δυνατό πιο αποτελεσματικά, ασφαλή και να μην αλλοιώνουν τα χαρακτηριστικά των προϊόντων (Wirtanen 2001).

1.4. Σκοπός της μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας

Ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* είναι ένας παθογόνος που συχνά συναντάται στα τρόφιμα και είναι επικίνδυνος για τη δημόσια υγεία. Η δημιουργία βιοϋμενίων σε επιφάνειες καθιστά τον μικροοργανισμό ισχυρό και αποδυναμώνει τις

προσπάθειες καταπολέμησής του. Σκοπός της διατριβής ήταν η παρακολούθηση της ανάπτυξης βιοϋμενίου του παθογόνου μικροοργανισμού *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες τύπου AISI -304, 3 x 1 x 0,1 cm, προσομοιώνοντας το πραγματικό περιβάλλον που είναι οι επιφάνειες μιας μονάδας επεξεργασίας αλιευμάτων, καθώς και ο καθαρισμός – απολύμανση του βιοϋμενίου με τη χρήση χημικών ουσιών. Σκοπός επίσης ήταν η παρατήρηση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα. Στα τρία πρώτα πειράματα εξετάστηκε ο σχηματισμός βιομενίου από τους μικροοργανισμούς *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp., είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό (πείραμα 1: *Listeria monocytogenes*, πείραμα 2 : *Pseudomonas* sp, πείραμα 3: *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp.), ενώ στο τέταρτο πείραμα, πραγματοποιήθηκε απολύμανση του βιομενίου *Listeria monocytogenes*. Σε κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε παρακολούθηση του πληθυσμού των βιομενίων καθώς και οπτική παρακολούθηση της ανάπτυξης αυτού με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

2.1. Θρεπτικά υλικά

Όλα τα θρεπτικά υλικά ήταν της Lab M (Lancashire, UK).

2.1.1. Tryptone Soy Agar (TSA)

Το TSA είναι ένα θρεπτικό υπόστρωμα γενικής χρήσης το οποίο επιτρέπει την ανάπτυξη ενός μεγάλου εύρους μικροοργανισμών. Είναι κατάλληλο για την ποσοτικοποίηση του ολικού αριθμού των μικροοργανισμών σε ένα δείγμα (Mendez-Vilas 2009).

Στα 1000 ml απιονισμένου νερού περιέχονται:

Tryptone (Casein Digest USP)	15 g
Soy peptone	5 g
Sodium chloride	5 g
Agar No.2	12 g
pH: $7,3 \pm 0,2$	

Παρασκευή TSA:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 40 g σκόνης από το TSA και 3 g Yeast Extract.
- Σε ογκομετρικό κύλινδρο μετρήθηκαν 1000 ml απιονισμένο νερό και μεταφέρθηκαν στη φιάλη.
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15 min.
- Μοιράστηκε σε τρυβλία.

2.1.2. Tryptic Soy Broth (TSB)

Το θρεπτικό υλικό TSB (ζωμός από πεπτόνες σόγιας) είναι ένα μέσο γενικής χρήσης για την ανάπτυξη όλων των μικροοργανισμών, ακόμα και αυτών που δεν αποτελούν οργανισμούς τυπικής απομόνωσης (π.χ. *Brucella*). Το TSB αναπτύχθηκε αρχικά για χρήση χωρίς αίμα για τον προσδιορισμό της αποτελεσματικότητας των

σουλφοναμίδων έναντι των πνευμονόκοκκων και άλλων οργανισμών. Το TSB ενδείκνυται για τον έλεγχο της βακτηριακής επιμόλυνσης στη βιομηχανία τροφίμων (Diedrich 2007).

Περιεκτικότητα στα 1000ml απιονισμένου νερού:

Enzymatic Digest of Casein	17 g
Enzymatic Digest of Soybean Meal	3 g
Sodium chloride	5 g
Dipotassium Phosphate	2,5 g
Dextrose	2,5 g

pH: $7,3 \pm 0,2$ στους 25°C

http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7164_PI.pdf, 2/2/2012

Παρασκευή TSB:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν: 17 g Enzymatic Digest of Casein, 3 g Enzymatic Digest of Soybean Meal, 5 g Sodium Chloride, 2,5 g Dipotassium Phosphate και 2,5 g Dextrose.
- Σε ογκομετρικό κύλινδρο μετρήθηκαν 1000 ml απιονισμένο νερό και μεταγγίσθηκαν στη φιάλη.
- Τα υλικά αναδεύτηκαν με την χρήση μαγνητικού αναδευτήρα.
- Το pH ρυθμίστηκε στους $7,3 \pm 0,2$.
- Με τη χρήση dispenser μεταγγίστηκαν 10 ml σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα όπου κλείστηκε με ειδικό πώμα.

- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121°C για 15min.

2.1.3. Palcam Agar Base (Polymyxin, Acriflavine, Lithium chloride, Cefotaxime, Aesculin, Mannitol)

Το άγαρ Palcam αναπτύχθηκε από τον Van Netten *et al.* (1989) ως ένα βελτιωμένο εκλεκτικό υλικό για την απομόνωση και την απευθείας μέτρηση της *Listeria monocytogenes* από τρόφιμα, κλινικά και περιβαλλοντικά δείγματα. Πρόκειται για μια βελτιωμένη τροποποίηση των υλικών RAPAMY (Van Netten *et al.*, 1988a), ALPAMY (Van Netten *et al.*, 1988b) και Οξφόρδης (Curtis *et al.*, 1989). Η επιλεκτικότητα επιτυγχάνεται με τον συνδυασμό ενός αντιβιοτικού συμπληρώματος, ενώ οι διαγνωστικές του ιδιότητες βασίζονται σε ένα διπλό σύστημα δεικτών της αισκούλινης και του σιδήρου και στη ζύμωση της μαννιτόλης σε συνδυασμό με το ερυθρό της φαινόλης. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται η διαφοροποίηση της *Listeria* spp από εντερόκοκκους και σταφυλόκοκκους (Εικ. 7) (Corry *et al.* 1995).

Διαδικασία παρασκευής:

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 71,8 g σκόνης από το Palcam.
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.
- Τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για να φτάσει σε θερμοκρασία 45 °C.
- Προστέθηκαν ασηπτικά, το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου με εκλεκτικό αντιβιοτικό για την *Listeria*.

Μοιράστηκε σε τρυβλία

Περιεκτικότητα στα 1000 ml απιονισμένου νερού:

Columbia Peptone Mix	23 g
Sodium chloride	5 g
Corn Starch	1 g
Yeast Extract	3 g
Glucose	0,5 g
Mannitol	10 g
Aesculin	0,8 g
Lithium chloride	15 g
Ferric ammonium citrate	0,5 g
Phenol red	0,08 g
Agar No. 2	12 g

pH: $7,2 \pm 0,2$ στους 25°C



Εικόνα 7 : Πληθυσμοί *Listeria* sp. σε Άγαρ Palcam

(http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/863B1D19756C7C46C12574C700331E38?opendocument&LG=EN&, 12/12/2011)

2.1.4. Cephaloridine Fucidin Cetrимide (CFC) Agar

Το CFC άγαρ χρησιμοποιείται για την απομόνωση του *Pseudomonas* sp. Η επιλεκτικότητα του άγαρ CFC εξαρτάται από ένα συγκεκριμένο συνδυασμό των αντιμικροβιακών ουσιών chephaloridine, fucidin και cetrимide. Το μέσο έχει ως στόχο να καταστείλει σχεδόν όλους τους ανεπιθύμητους οργανισμούς. Αν και αναπτύχθηκε για την απομόνωση της *Pseudomonas* sp. από πουλερικά και διάφορα προϊόντα κρέατος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε άλλα τρόφιμα (Corry et al. 1995).

Περιεκτικότητα σε 1000 ml απιονισμένου νερού:

Gelatin Peptone	16 g
Enzymatic Digest of Casein	10 g
Potassium Sulfate	10 g
Magnesium Chloride	1,4 g
Agar	11 g

pH: 7.1 ± 0.2 στους 25 °C

- Σε φιάλη των 1000 ml ζυγίστηκαν και προστέθηκαν 48,4 g σκόνης από το CFC.
- Συμπληρώθηκε με απιονισμένο νερό.
- Ανακινήθηκε για 10 min και προστέθηκαν 10 ml γλυκερόλης.
- Ακολούθησε αποστείρωση στους 121 °C για 15 min.

- Τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για να φτάσει σε θερμοκρασία 45 °C.
- Προστέθηκαν ασηπτικά, το περιεχόμενο ενός φιαλιδίου με το συμπλήρωμα X107(CN) ή X108(CFC) για τον *Pseudomonas* sp.
- Μοιράστηκε σε τρυβλία.

2.2. Προετοιμασία θρεπτικού ζωμού ιχθύος

Αρχικά για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, απαιτήθηκε η δημιουργία ενός θρεπτικού ζωμού προερχόμενου από τις τσιπούρες για να χρησιμοποιηθεί ως υλικό ανάπτυξης του βιοϋμενίου, προσομοιάζοντας έτσι τις πραγματικές συνθήκες ενός χώρου επεξεργασίας αλιευμάτων.

Αγοράστηκαν τσιπούρες ιχθυοτροφείου (*Sparus aurata*, Linnaeus, 1758) από ιχθυοπωλείο του Βόλου. Έπειτα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και από κάθε τσιπούρα χρησιμοποιήθηκε το φιλέτο του ψαριού (200-250 g) το οποίο μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένες σακούλες, όπου προστέθηκε απιονισμένο νερό σε αναλογία 1:1. Το δείγμα μεταφέρθηκε σε συσκευή τύπου stomacher (Interscience) και ομογενοποιήθηκε για πέντε λεπτά. Μετά την ομογενοποίηση όλων των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε ως φίλτρο ένα τούλι, από το οποίο διηθήθηκε όλο το δείγμα του ζωμού ιχθύος. Έπειτα ο ζωμός ιχθύος μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη και πραγματοποιήθηκε βρασμός για πέντε λεπτά. Μετά το βρασμό ο ζωμός ιχθύος διηθλήθηκε από ηθμούς whatman No2 125 mm και αφού μεταφέρθηκε σε κωνική φιάλη πραγματοποιήθηκε βρασμός για τριάντα λεπτά προκειμένου να αποστειρωθεί το δείγμα. Μετά το βρασμό ο ζωμός ιχθύος μεταφέρθηκε ασηπτικά σε αποστειρωμένη φιάλη, μετρήθηκε το pH και σταθεροποιήθηκε στην τιμή 6,4 με τη βοήθεια ρυθμιστικών φωσφορικών διαλυμάτων (H_2KPO_4 και HK_2PO_4).

2.3. Προετοιμασία εμβολίου μικροοργανισμών

Όλοι οι μικροοργανισμοί προμηθεύτηκαν από την Τράπεζα Μικροοργανισμών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Χρησιμοποιήθηκαν έξι διαφορετικά στελέχη *Listeria monocytogenes* και συγκεκριμένα τα *Listeria monocytogenes* Pirie 21075, Pirie 210885, Pirie 21412, Pirie 23UD, Pirie NCTC 10527 και Scott A και πέντε διαφορετικά στελέχη *Pseudomonas* sp. και συγκεκριμένα τα *Pseudomonas fragi* ATCC 4973, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13526, *Pseudomona putida* ATCC 12633, *Pseudomonas fluorescens* που απομονώθηκε από τσιπούρα υδατοκαλλιέργειας και *Pseudomona putida* που απομονώθηκε από φιλέτο τσιπούρας. Τα κύτταρα ήταν αποθηκευμένα σε Tryprone Soy Broth (TSB) με 20 % (v/v) γλυκερόλη σε θερμοκρασία -18°C .

Με τη βοήθεια κρικοφόρου στυλέου απομονώθηκαν και εμβολιάστηκαν σε TSB και επώστηκαν για 24 h στους 37 ή 25 °C για τα στελέχη *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp. αντίστοιχα. Μετά το πέρας των 24 h εξαπλώθηκαν σε τρυβλία Petri με Tryptone Soy Agar (TSA) και επώστηκαν για άλλες 24 h στους 37 ή 25 °C. Έπειτα από 24 h οι καθαρές πλέον αποικίες μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και να εμβολιαστούν σε νέο TSB και να επωαστούν για άλλες 24 h προκειμένου να δημιουργηθεί ο πληθυσμός που θα χρησιμοποιηθεί για τα πειράματα.

2.4. Σχηματισμός και καταμέτρηση βακτηριακού πληθυσμού στο βιουμένιο.

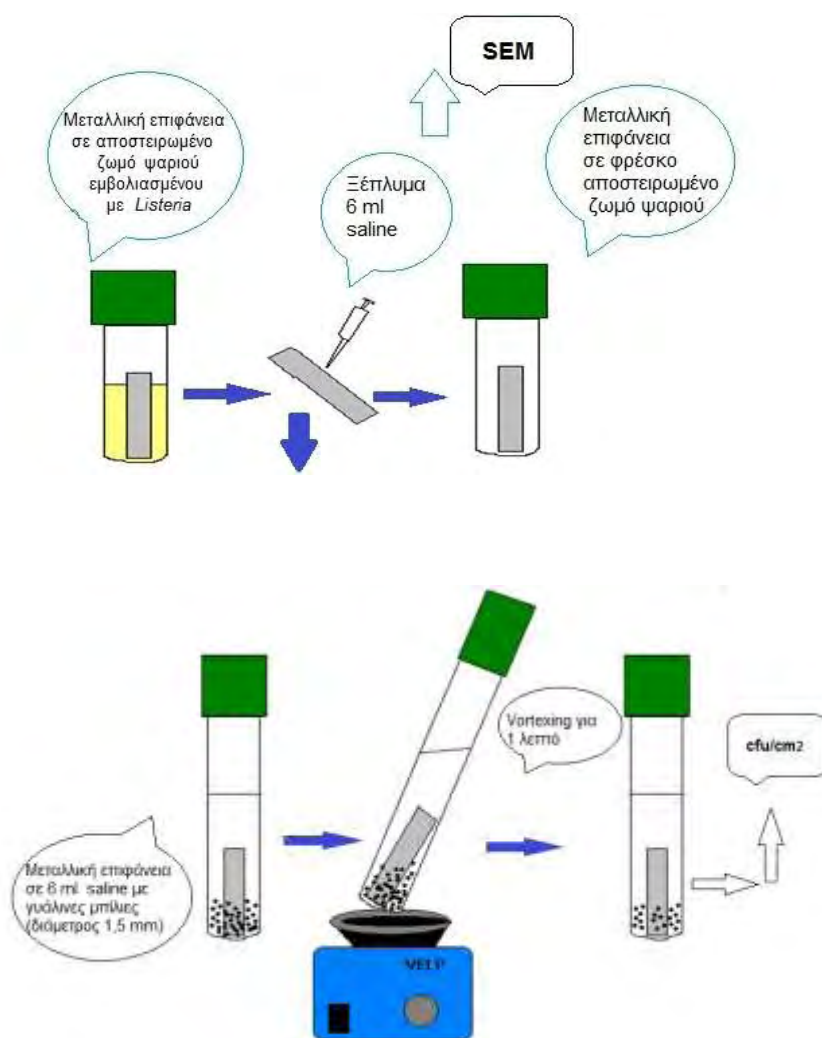
2.4.1. Εμβολιασμός μικροοργανισμών σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος

Από κάθε ένα από τους σωλήνες που περιείχαν εναιωρήματα πληθυσμών των στελεχών *Listeria monocytogenes*, ή *Pseudomonas* sp., όγκοι μεταφέρθηκαν ασηπτικά σε αποστειρωμένο φιαλίδιο. Το φιαλίδιο φυγοκεντρήθηκε για δέκα λεπτά στις 2500 x g στους 25°C (φυγόκεντρος UNIVERSAL 320). Κατόπιν το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε, ενώ στα κύτταρα του παθογόνου μικροοργανισμού που απέμειναν στο κάτω μέρος του φιαλιδίου, προστέθηκαν 5 ml NaCl 0,85 % (w/v) και ακολούθησε επαναδιαλυτοποίηση (resuspension) με vortexing (vortex VELP SCIENTIFICA) για 1 λεπτό. Οι πληθυσμοί των *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp. βρισκόταν περίπου στο επίπεδο των 10^8 cfu/ml.

Σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν μεταλλικές επιφάνειες τύπου AISI-304, διαστάσεων $3 \times 1 \times 0,1$ cm (Giaouris & Nychas 2006), μεταφέρθηκαν ασηπτικά 5 ml NaCl 0,85 % (w/v) και 0,1 ml από το μίγμα των βακτηριακών στελεχών. Στους σωλήνες που βρίσκονταν οι μεταλλικές επιφάνειες που επρόκειτο να παρατηρηθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, προστέθηκαν μόνο 3 ml Sodium Chlorite [NaCl 0,85 % (w/v)]. Και στις δύο περιπτώσεις οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στους 15 °C για 3 ώρες αρχικά, προκειμένου να πραγματοποιηθεί η προσκόλληση των κυττάρων του μικροοργανισμού στις μεταλλικές επιφάνειες. Μετά το πέρασμα των τριών ωρών, αφού έγινε η πρώτη καταμέτρηση του πληθυσμού, κάθε μεταλλική επιφάνεια ξεπλύθηκε με 6 ml Sodium Chlorite [NaCl 0,85 % (w/v)] προκειμένου να απομακρυνθούν τα κύτταρα που δεν είχαν προσκολληθεί επιτυχώς στην επιφάνεια. Έπειτα κάθε επιφάνεια

μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένο σωλήνα με 5 και 3 ml ζωμού ιχθύος και τοποθετήθηκε στους 15 °C.

Ο τρόπος με τον οποίο πραγματοποιήθηκε η πειραματική διαδικασία προκειμένου να γίνει η καταμέτρηση του πληθυσμού ή η παρατήρηση του βιοϋμενίου από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, δίνεται σχηματικά στην Εικόνα 8.



Εικόνα 8 : Σχηματική παράσταση της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την καταμέτρηση και παρατήρηση των κυττάρων βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes* και του *Pseudomonas* sp.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8, κάθε μεταλλική επιφάνεια που βρισκόταν σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος εμβολιασμένο με τους μικροοργανισμούς, απομακρύνθηκε ασηπτικά από τον σωλήνα στον οποίο βρισκόταν και ξεπλύθηκε με 6 ml NaCl 0,85 % (w/v), 3ml για κάθε πλευρά της μεταλλικής επιφάνειας. Σε αυτό το στάδιο οι επιφάνειες που επρόκειτο να παρατηρηθούν στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο μεταφέρονταν σε κενά τρυβλία για να υποστούν περεταίρω επεξεργασία και να γίνει η παρατήρησή τους, ενώ κάποιες άλλες επιφάνειες μεταφέρονταν σε φρέσκο αποστειρωμένο ζωμό ιχθύος και μεταφέρονταν στους 15 °C προκειμένου να χρησιμοποιηθούν τις επόμενες ημέρες. Οι μεταλλικές επιφάνειες οι οποίες χρησιμοποιούνταν εκείνη την ώρα για την καταμέτρηση του πληθυσμού, μεταφέρονταν ασηπτικά σε αποστειρωμένο σωλήνα με 6 ml NaCl 0,85 % (w/v), και 35 γυάλινα σφαιρίδια διαμέτρου 1,5 mm. Ακολουθούσε vortexing για 1 λεπτό προκειμένου τα σφαιρίδια να αποξέσουν τα κύτταρα του μικροοργανισμού από τη μεταλλική επιφάνεια. Έπειτα 1 ml από το βακτηριακό εναιώρημα μεταφέρονταν σε 9 ml αποστειρωμένου NaCl 0,85 % (w/v), προκειμένου να πραγματοποιηθούν διαδοχικές αραιώσεις και κατόπιν όγκος 0,1 ml από την κατάλληλη αραιώση χρησιμοποιήθηκε για την επίστρωσή του σε τριβλύα με θρεπτικό υπόστρωμα (TSA ή Palcam) προκειμένου να γίνει η ανάπτυξη του μικροοργανισμού.

Μετά τον εμβολιασμό των δειγμάτων, σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα, έγινε η καταμέτρηση του πληθυσμού της *Listeria monocytogenes* σε TSA και Palcam και του *Pseudomonas* sp. σε TSA και CFC, καθώς και η παρατήρηση του βιοϋμενίου που σχηματίστηκε στις μεταλλικές επιφάνειες με χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

Οι μετρήσεις του πληθυσμού γίνονταν ανά μία ημέρα, εκτός από τη αρχική μέρα (μέρα 0) όπου πραγματοποιήθηκαν περισσότερες από μία μετρήσεις, ενώ ανά δύο ημέρες οι μεταλλικές επιφάνειες μεταφέρονταν σε νέο θρεπτικό υλικό (ζωμό ιχθύος). Η καταμέτρηση πληθυσμού σε κάθε χρονική στιγμή πραγματοποιούνταν εις τριπλούν (3 μεταλλικά κουπόνια κάθε φορά).

Πιο αναλυτικά, ο χρόνος που πραγματοποιήθηκε η κάθε μέτρηση αλλά και η παρατήρηση από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, αναγράφονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1 : Καταμέτρηση βακτηριακού πληθυσμού και παρατήρηση βιοϋμενίου

Ημέρα	Ώρες	Μέτρηση Πληθυσμού	Παρατήρηση βιοϋμενίου στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο
0	30 λεπτά	Δεν πραγματοποιήθηκε	Πραγματοποιήθηκε
0	3	Πραγματοποιήθηκε	Πραγματοποιήθηκε
0	7	Πραγματοποιήθηκε	Πραγματοποιήθηκε
1	24	Πραγματοποιήθηκε	Δεν πραγματοποιήθηκε
2	48	Πραγματοποιήθηκε	Πραγματοποιήθηκε
3	72	Πραγματοποιήθηκε	Δεν πραγματοποιήθηκε
4	96	Πραγματοποιήθηκε	Πραγματοποιήθηκε
5	120	Πραγματοποιήθηκε	Δεν πραγματοποιήθηκε
6	144	Πραγματοποιήθηκε	Πραγματοποιήθηκε
7	168	Πραγματοποιήθηκε	Δεν πραγματοποιήθηκε
8	192	Πραγματοποιήθηκε	Πραγματοποιήθηκε
9	216	Δεν πραγματοποιήθηκε	Δεν πραγματοποιήθηκε
10	240	Πραγματοποιήθηκε	Πραγματοποιήθηκε

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και στο πείραμα που αναπτύχθηκαν μαζί τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* και του *Pseudomonas* sp.

2.5. Καθαρισμός-απολύμανση βιουμενίου

Τα καθαριστικά-απολυμαντικά προμηθευτικών από την εταιρεία ΔΙΑΣ Ιχθυοκαλλιέργειες ΑΕ και ήταν το αλκαλικό απορρυπαντικό Hypofoam VF6 και το απολυμαντικό Divosan SU 319/VT 8w.

Τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* αναπτύχθηκαν και εμβολιάστηκαν στον ζωμό ιχθύος με τον ίδιο τρόπο που περιγράφηκε πιο πάνω. Το συγκεκριμένο πείραμα διήρκησε επτά ημέρες, ενώ δεν πραγματοποιήθηκαν καθημερινές μετρήσεις, παρά μόνο την τρίτη και την έβδομη ημέρα όπου πραγματοποιήθηκε και ο καθαρισμός-απολύμανση. Ανά δύο μέρες γινόταν αλλαγή στο θρεπτικό υλικό. Την τρίτη και έβδομη μέρα αφού έγιναν αρχικά οι μετρήσεις, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε καθαριστικό που βρισκόταν στους 37 °C για δεκαπέντε λεπτά. Έπειτα σε δύο δείγματα έγινε μέτρηση και ένα παρατηρήθηκε στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα αφού ξεπλύθηκαν με NaCl 0,85 % (w/v), μεταφέρθηκαν σε απολυμαντικά για πέντε, δέκα και δεκαπέντε λεπτά. Μετά το πέρας του συγκεκριμένου χρόνου που αντιστοιχούσε σε κάθε δείγμα (5, 10, 15 λεπτά) έγιναν οι απαραίτητες μετρήσεις και η παρατήρηση του βιοϋμενίου με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο.

2.6. Προετοιμασία δειγμάτων για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Cambridge Stereoscan 240.

2.6.1. Παρασκευή διαλύματος 0,1M κακοδυλικού νατρίου (Sodium Cacodylate)

Σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα των 100 ml, προστέθηκαν 2,1 g κακοδυλικού νατρίου. Συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή των 100 ml. Το pH του διαλύματος ήταν 7,4. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 4 °C.

2.6.2. Παρασκευή διαλύματος 2,5 % γλουταρδεΐδης (glutaraldehyde)

Σε πλαστικό αποστειρωμένο σωλήνα των 100 ml, προστέθηκαν 2,1 g κακοδυλικού νατρίου και 11,1 g γλουταρδεΐδης από διάλυμα με 2,5 % γλουταρδεΐδη. Συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι τη χαραγή των 100 ml. Το pH του διαλύματος ήταν 7,4. Το διάλυμα διατηρήθηκε στους 4 °C.

Η άμεση παρατήρηση των δειγμάτων στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης δεν ήταν εφικτή. Για το λόγο αυτό τα δείγματα δέχτηκαν μια περεταίρω επεξεργασία προκειμένου η εικόνα των κυττάρων των μικροοργανισμών που χρησιμοποιήθηκαν (*Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp.) να παραμείνει όσο το δυνατόν αναλλοίωτη.

Κάθε δύο ημέρες που λαμβάνονταν οι μεταλλικές επιφάνειες με το σχηματισμένο βιοϋμένιο για παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, μετά το ξέπλυμά τους με NaCl 0,85 % (w/v), μεταφέρονταν σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε γλουταρδεΐδη 3 ml και παρέμεναν εκεί κατά τη διάρκεια όλης της νύχτας. Το στάδιο αυτό αποτελεί το στάδιο της μονιμοποίησης και στόχο έχει τη διατήρηση της δομής του κυττάρου πριν τη θανάτωσή του (Βερίλλης 2008). Την επόμενη ημέρα μετά το ξέπλυμα των μεταλλικών επιφανειών με 4 ml κακοδυλικό νάτριο (2 ml σε κάθε μεριά), ακολουθούσε το στάδιο της αφυδάτωσης. Κάθε μεταλλική επιφάνεια εμβάπτιζόταν διαδοχικά σε δοκιμαστικούς σωλήνες με διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων αιθυλικής αλκοόλης (30, 50, 60, 70, 90, 95 100%) και παρέμεναν σε κάθε σωλήνα για δέκα λεπτά. Η εμβάπτιση της μεταλλικής επιφάνειας σε 100 % αιθυλική αλκοόλη επαναλαμβανόταν δύο φορές. Έπειτα η κάθε μεταλλική επιφάνεια φυλασσόταν σε θερμοκρασία δωματίου, προφυλαγμένη από τη σκόνη, έως ότου πραγματοποιηθεί η παρατήρησή της. Το τελευταίο στάδιο πριν την παρατήρηση των μεταλλικών επιφανειών από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης αποτελούσε η επιμετάλλωση κάθε επιφάνειας με χρυσό.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Αύξηση μικροβιακού πληθυσμού βιοϋμενίου

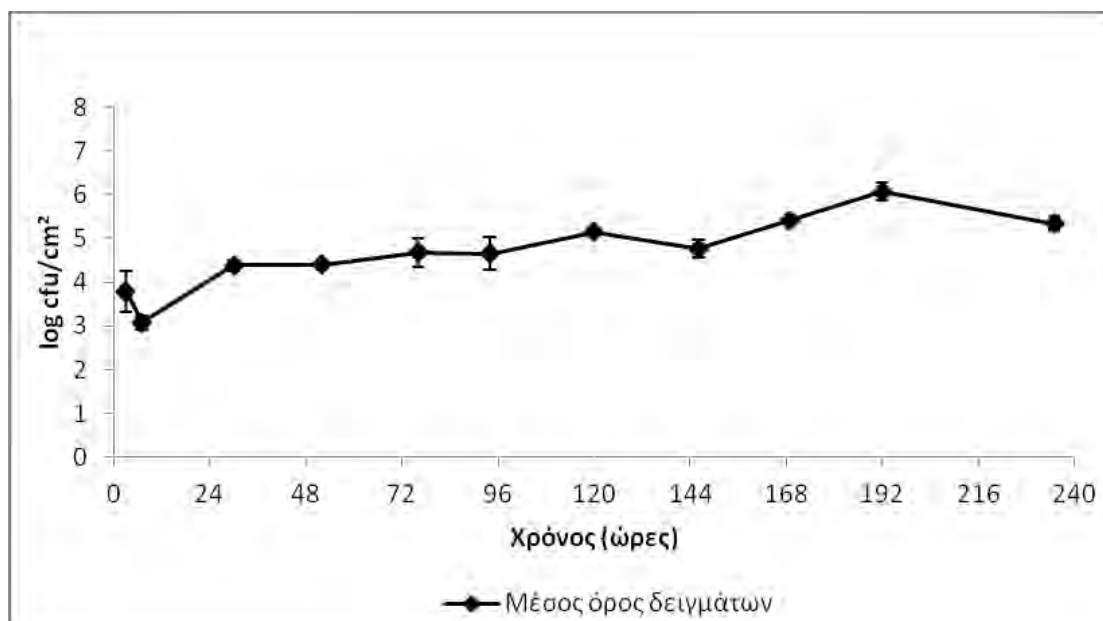
3.1.1. Αύξηση βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes*

Η αύξηση των κυττάρων του βιοϋμενίου που σχημάτισε ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes*, παρουσιάζεται στον Πίνακα 2. Η αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος στους 15 °C, πραγματοποιήθηκε σε διάστημα δέκα ημερών. Στο Σχήμα 1 φαίνεται η γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes*.

Αρχικά, αμέσως μετά την προσκόλληση, ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* ήταν περί τα 10^4 cfu/cm². Κατόπιν ο πληθυσμός μειώθηκε περί τον 1 λογάριθμο και κατόπιν άρχισε να αυξάνεται και έφθασε στο επίπεδο των 10^5 cfu/cm² στις 72 ώρες (3^η ημέρα) όπου παρέμεινε για περίπου 3 ημέρες μέχρι να αρχίσει να αυξάνεται και πάλι. Ο μέγιστος πληθυσμός της τάξης των 10^6 cfu/cm² επιτεύχθηκε μετά από 192 ώρες (8 ημέρες). Στο τέλος του πειράματος (10^η ημέρα) παρατηρήθηκε μικρή πτώση 0,5 λογαρίθμων.

Πίνακας 2: Πληθυσμός βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* (log cfu/cm²) καθώς αναπτύχθηκε σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C.

Χρόνος (ώρες)	Μέτρηση 1	Μέτρηση 2	Μέτρηση 3	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
3	3,25	4,12	4,00	3,79	0,47
7	3,23	2,90	3,10	3,07	0,16
24	4,50	4,26	4,40	4,38	0,12
48	4,48	4,38	4,32	4,39	0,08
72	5,04	4,38	4,60	4,67	0,33
96	5,04	4,30	4,60	4,64	0,37
120	5,23	5,10	5,10	5,14	0,07
144	4,98	4,59	4,70	4,75	0,20
168	5,47	5,37	5,39	5,41	0,05
192	5,90	6,30	6,00	6,06	0,20
240	5,5	5,2	5,3	5,33	0,15



Σχήμα 1: Γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* που αναπτύχθηκε σε μεταλλικές επιφάνειες (log cfu/cm²) με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C. Κάθε σημείο αναπαριστά τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων (log cfu/cm²) και οι μπάρες σφάλματος την τυπική απόκλιση.

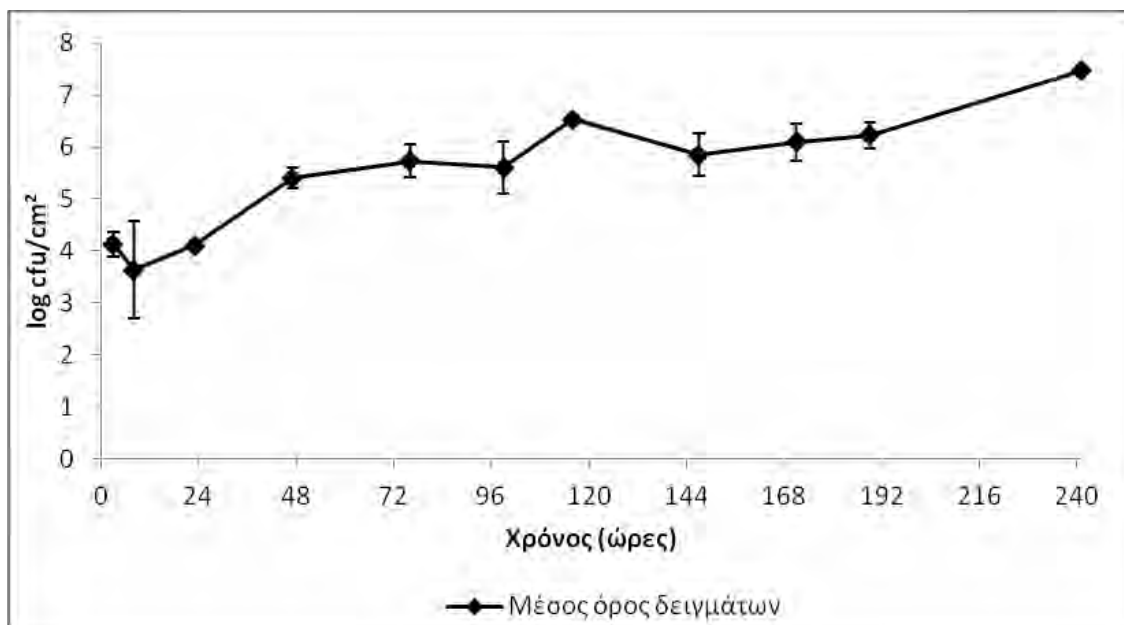
3.1.2 Αύξηση βιοϋμενίου *Pseudomonas* sp.

Η αύξηση των κυττάρων του βιοϋμενίου που σχημάτισε ο μικροοργανισμός *Pseudomonas* sp., παρουσιάζεται στον Πίνακα 3. Η αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος στους 15 °C, πραγματοποιήθηκε σε διάστημα δέκα ημερών. Στο Σχήμα 2 φαίνεται η γραφική παράσταση της μεταβολής του πληθυσμού των κυττάρων βιοϋμενίου *Pseudomonas* sp. Όπως συνέβη και με την *Listeria monocytogenes* έτσι και η αύξηση βιοϋμενίου του *Pseudomonas* sp. σε μεταλλικές επιφάνειες σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος στους 15°C, πραγματοποιήθηκε σε διάστημα δέκα ημερών. Στο Σχήμα 2 φαίνεται η αναπαράσταση της ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Παρατηρείται ότι καθ'όλη τη διάρκεια του πειράματος και τα τρία δείγματα παρουσιάζουν παρόμοια αποτελέσματα. Αμέσως μετά την προσκόλληση ο πληθυσμός του *Pseudomonas* ήταν περίπου 10^4 cfu/cm². Έπειτα ο πληθυσμός μειώθηκε σχεδόν 0,5 λογάριθμο και μετά ακολούθησε αυξητική πορεία φτάνοντας στο επίπεδο των 10^5 cfu/cm² στις 48 ώρες (2^η ημέρα). Από τις 72 μέχρι τις 192 ώρες (3^η ημέρα ως 8^η ημέρα) ο πληθυσμός συνέχισε να αυξάνεται φτάνοντας στο επίπεδο του 10^6 cfu/cm² και έπειτα στις 240 ώρες (10^η ημέρα) έφτασε στο μέγιστο πληθυσμό της τάξης των 10^7 cfu/cm².

Πίνακας 3: Πληθυσμός βιοϋμενίου *Pseudomonas* sp. (log cfu/cm²) καθώς αναπτύχθηκε σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C.

Χρόνος (ώρες)	Μέτρηση 1	Μέτρηση 2	Μέτρηση 3	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
3	4,37	3,92	4,1	4,13	0,23
7	2,77	4,65	3,5	3,64	0,95
24	4,16	4,06	4,09	4,10	0,05
48	5,6	5,42	5,2	5,41	0,20
72	6,04	5,4	5,75	5,73	0,32
96	5,04	5,98	5,8	5,61	0,50
120	6,48	6,63	6,51	6,54	0,08
144	6,3	5,47	5,8	5,86	0,42
168	6,48	5,79	6,03	6,1	0,35
192	6,5	6	6,2	6,23	0,25
240	7,5	7,51	7,4	7,47	0,06



Σχήμα 2: Γραφική παράσταση της ανάπτυξης των κυττάρων βιοϋμενίου της *Pseudomonas* sp. (log cfu/cm²) που αναπτύχθηκε σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C. Κάθε σημείο αναπαριστά τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων (log cfu/cm²) και οι μπάρες σφάλματος την τυπική απόκλιση.

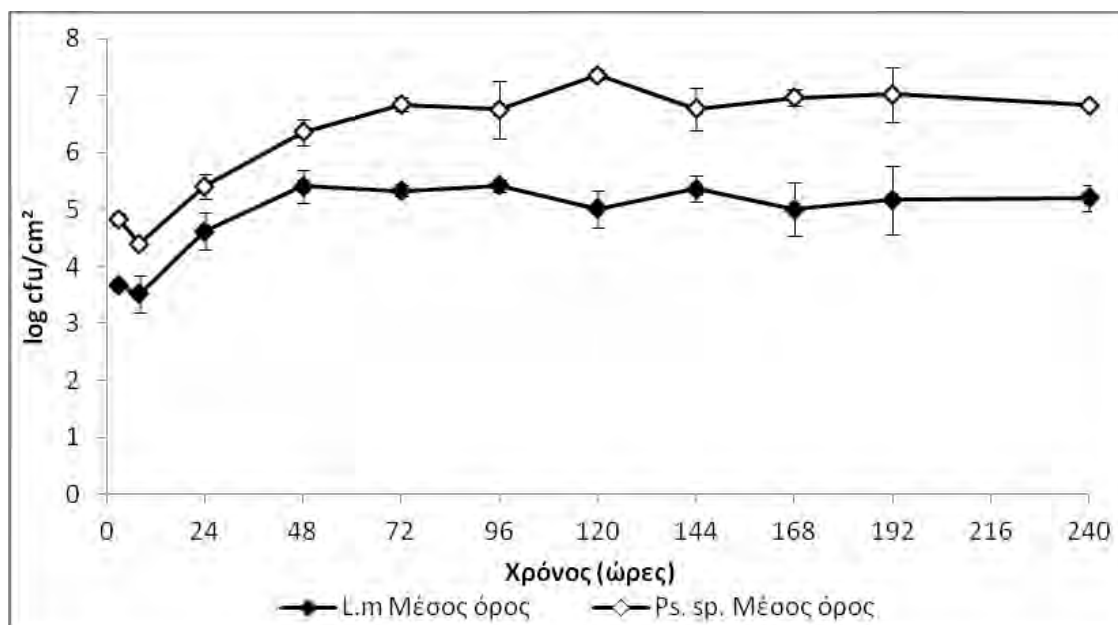
3.1.3. Σύγχρονη ανάπτυξη βιοϋμενίων *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp.

Η αύξηση των κυττάρων του βιοϋμενίου που σχηματίστηκαν από την ταυτόχρονη ανάπτυξη των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp., παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Η αύξηση του μικροβιακού πληθυσμού σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος στους 15 °C, πραγματοποιήθηκε σε διάστημα δέκα ημερών. Στο Σχήμα 3 αναπαρίστανται οι καμπύλες ανάπτυξης των μικροοργανισμών της μικτής καλλιέργειας.

Πίνακας 4: Πληθυσμός βιοϋμενίου μικτής καλλιέργειας των *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp. (log cfu/cm²) καθώς αναπτύχθηκαν σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C.

Χρόνος (ώρες)	<i>L.m.</i> Μέτρηση 1	<i>L.m.</i> Μέτρηση 2	<i>L.m.</i> Μέτρηση 3	<i>L.m.</i> Μέσος όρος	<i>L.m.</i> Τυπική απόκλιση
3	3,68	3,66	3,65	3,66	0,02
8	3,17	3,84	3,54	3,52	0,34
24	4,35	4,98	4,53	4,62	0,32
48	5,16	5,71	5,35	5,41	0,28
72	5,23	5,42	5,34	5,33	0,10
96	5,47	5,29	5,5	5,42	0,11
120	4,69	5,34	5	5,01	0,33
144	5,1	5,54	5,43	5,36	0,23
168	4,57	5,51	4,93	5,00	0,47
192	4,55	5,75	5,21	5,17	0,60
240	4,93	5,36	5,31	5,20	0,24

Χρόνος (ώρες)	<i>Ps.sp.</i> Μέτρηση 1	<i>Ps.sp.</i> Μέτρηση 2	<i>Ps.sp.</i> Μέτρηση 3	<i>Ps. sp.</i> Μέσος όρος	<i>Ps. sp.</i> Τυπική απόκλιση
3	4,75	4,92	4,81	4,83	0,09
8	4,45	4,34	4,4	4,40	0,06
24	5,22	5,64	5,36	5,41	0,21
48	6,11	6,54	6,42	6,36	0,22
72	6,71	6,92	6,9	6,84	0,12
96	6,19	7,15	6,92	6,75	0,50
120	7,47	7,32	7,3	7,36	0,09
144	6,34	7,07	6,89	6,77	0,38
168	6,81	7,08	7	6,96	0,14
192	6,52	7,5	7,03	7,02	0,49
240	6,86	6,81	6,82	6,83	0,03



Σχήμα 3: Γραφική παράσταση της ταυτόχρονης ανάπτυξης της μικτής καλλιέργειας των κυττάρων βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes* και του *Pseudomonas* sp. (log cfu/cm²) που αναπτύχθηκαν σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C. Κάθε σημείο αναπαριστά τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων (log cfu/cm²) και οι μπάρες σφάλματος την τυπική απόκλιση.

Εκ πρώτης όψεως γίνεται αντιληπτή η διαφορά τιμών που υπάρχει ανάμεσα στους δύο πληθυσμούς, με τον πληθυσμό του *Pseudomonas* sp. να υπερβαίνει τον πληθυσμό της *Listeria monocytogenes* κατά περίπου 1 λογάριθμο. Η συνύπαρξη των δύο διαφορετικών μικροοργανισμών υπό τις ίδιες συνθήκες θρέψης, οδηγεί στην ταυτόχρονη ανάπτυξη και των δύο πληθυσμών, διαφοροποιώντας όμως τα αποτελέσματα αύξησης των βιοϋμενίων σε σχέση με αυτά της μονοκαλλιέργειας που παρατηρήθηκαν στα προηγούμενα πειράματα. Όσο αφορά τη *Listeria monocytogenes*, αμέσως μετά την προσκόλληση και μέχρι τις πρώτες 7 ώρες, ο πληθυσμός ήταν περί τα 10⁴ cfu/cm². Από τις 24 ώρες και μέχρι το τέλος του πειράματος ο πληθυσμός βρίσκεται σταθερά στην τάξη του 10⁵ cfu/cm². Ο πληθυσμός του *Pseudomonas* από την

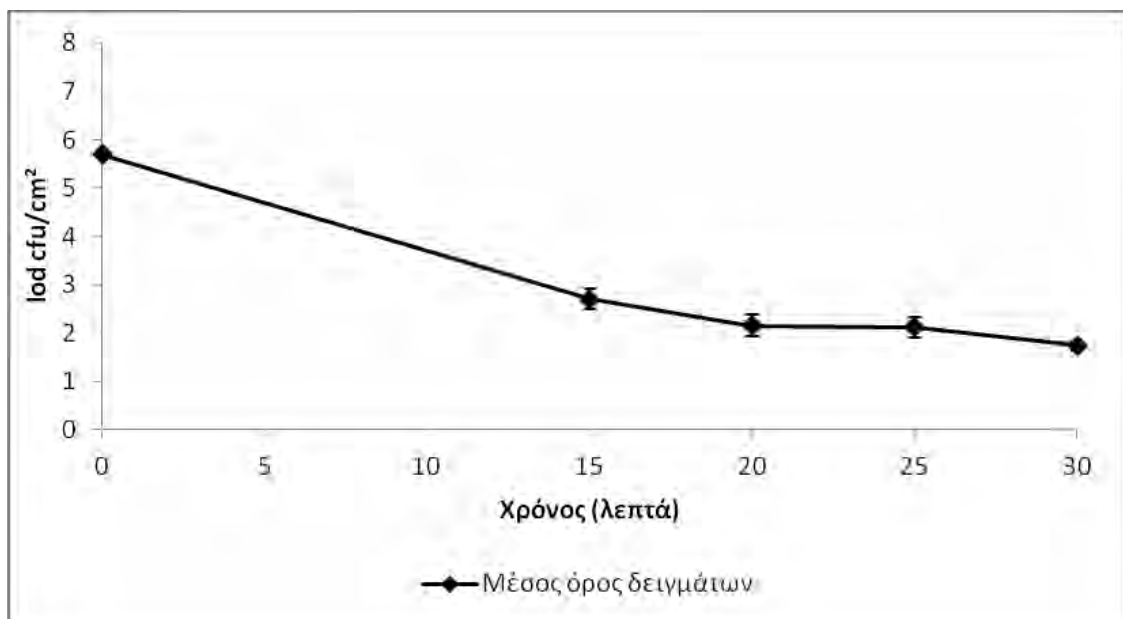
προσκόλλησή του και μέχρι τις 24 ώρες έφθανε στο επίπεδο του 10^5 cfu/cm². Κατόπιν, στις 48 ώρες (2^η ημέρα) ο πληθυσμός αυξήθηκε κατά ένα λογάριθμο, ενώ από τις 72 ώρες (3^η ημέρα) ο πληθυσμός έφτασε περί τα 10^7 cfu/cm² και διατηρήθηκε σε αυτό το επίπεδο μέχρι το τέλος του πειράματος. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος με τα δύο προηγούμενα πειράματα όπου το βιοϋμένιο του κάθε παθογόνου μικροοργανισμού αυξήθηκε μεμονωμένα, παρατηρείται ότι η παρουσία του *Pseudomonas*, παρεμποδίζει την δημιουργία βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes*, ενώ ταυτόχρονα η ανάπτυξη βιοϋμενίου του *Pseudomonas* παραμένει στα ίδια επίπεδα αλλά φτάνει πιο γρήγορα σε αυτά τα επίπεδα, και συγκεκριμένα στις 72 ώρες αντί για τις 120 ώρες που έφθανε όταν αναπτυσσόταν μόνος του.

3.1.4. Καθαρισμός-Απολύμανση βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes*

Η μεταβολή των κυττάρων του βιοϋμενίου που σχημάτισε ο μικροοργανισμός *Listeria monocytogenes* λόγω της επίδρασης των καθαριστικών - απολυμαντικών ουσιών, φαίνεται στους Πίνακες 5 και 6 για μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα τριών και επτά ημερών αντίστοιχα. Στα Σχήματα 4 και 5 αναπαρίστανται οι γραφικές παραστάσεις του καθαρισμού - απολύμανσης πληθυσμού βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes* τριών και επτά ημερών αντίστοιχα.

Πίνακας 5: Καθαρισμός - απολύμανση πληθυσμού βιοϋμενίου τριών ημερών της *Listeria monocytogenes* (log cfu/cm²) καθώς αναπτύχθηκε σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C.

Χρόνος (λεπτά)	Μέτρηση 1	Μέτρηση 2	Μέτρηση 3	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0	5,68	5,79	5,6	5,69	0,10
15	2,94	2,57	2,6	2,70	0,21
20	2,43	2,04	2	2,16	0,24
25	2,36	2	2	2,12	0,21
30	1,69	1,84	1,7	1,74	0,08

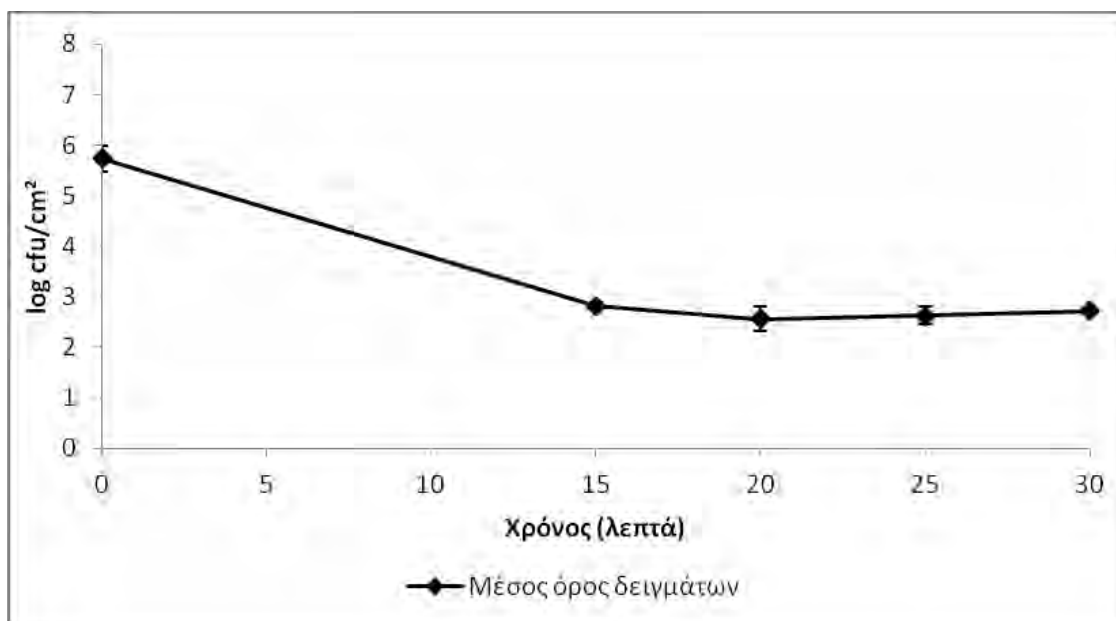


Σχήμα 4 : Γραφική παράσταση του καθαρισμού - απολύμανσης πληθυσμού βιοϋμενίου τριών ημερών της *Listeria monocytogenes* (log cfu/cm²) που αναπτύχθηκε σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C. Κάθε σημείο αναπαριστά τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων (log cfu/cm²) και οι μπάρες σφάλματος την τυπική απόκλιση.

Ο πληθυσμός της *Listeria* μετά το πέρας των τριών ημερών βρίσκεται περί τα 10^6 cfu/cm². Η επίδραση του καθαριστικού Hyprofoam VC6 για 15 λεπτά μειώνει το βιοϋμένιο για 3 λογάριθμους. Έπειτα, με τη χρήση του απολυμαντικού Divosan SU 319/VT8w για 5 και 10 λεπτά, ο πληθυσμός φθάνει στα επίπεδα του 10^2 cfu/cm², ενώ με τη χρήση του απολυμαντικού για 15 λεπτά ο πληθυσμός μειώνεται ακόμα 0,5 λογάριθμο.

Πίνακας 6 : Καθαρισμός - απολύμανση πληθυσμού βιοϋμένιου επτά ημερών της *Listeria monocytogenes* (log cfu/cm²) που αναπτύχθηκε σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C.

Χρόνος (λεπτά)	Μέτρηση 1	Μέτρηση 2	Μέτρηση 3	Μέσος όρος	Τυπική απόκλιση
0	6	5,5	5,7	5,73	0,25
15	2,75	2,85	2,86	2,82	0,06
20	2,82	2,34	2,5	2,55	0,24
25	2,44	2,79	2,63	2,62	0,18
30	2,74	2,71	2,7	2,72	0,02



Σχήμα 5 : Γραφική παράσταση του καθαρισμού - απολύμανσης πληθυσμού βιοϋμενίου επτά ημερών της *Listeria monocytogenes* (log cfu/cm²) που αναπτύχθηκε σε μεταλλικές επιφάνειες με θρεπτικό υλικό, ζωμό ιχθύος σε διάστημα 10 ημερών στους 15 °C. Κάθε σημείο αναπαριστά τον μέσο όρο των τριών μετρήσεων (log cfu/cm²) και οι μπάρες σφάλματος την τυπική απόκλιση.

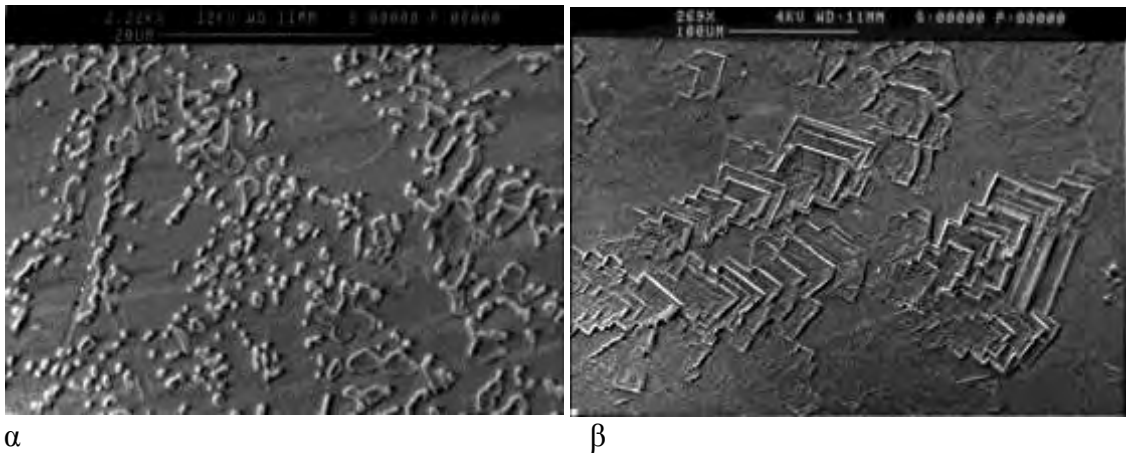
Ο πληθυσμός της *Listeria monocytogenes* μετά το πέρας των επτά ημερών βρίσκεται περί τα 10⁶ cfu/cm². Με την επίδραση του καθαριστικού Hyprofoam VC6 για 15 λεπτά το βιοϋμένιο μειώνεται και φθάνει στο επίπεδο του 10³ cfu/cm². Η χρήση του απολυμαντικού Divosan SU 319/VT8w για 5, 10 και 15 λεπτά, δεν επιφέρει καμία αλλαγή στο επίπεδο του πληθυσμού.

3.2. Παρατήρηση δημιουργίας βιοϋμενίου με χρήση Ηλεκτρονικού Μικροσκοπίου Σάρωσης

Στην παρούσα ενότητα παραθέτονται οι εικόνες που παρατηρήθηκαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σε συγκεκριμένες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Για κάθε πείραμα που πραγματοποιήθηκε παρουσιάζονται οι εικόνες που αποτυπώνουν όσο δυνατόν το καλύτερο το σχηματισμό του βιοϋμενίου από τους μικροοργανισμούς, καθώς επίσης και κάποιες που απεικονίζουν μόνο τον ζωμό ιχθύος όπως φαίνεται από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο στη μεταλλική επιφάνεια, προκειμένου να φανούν οι διαφορές όταν σχηματίζεται το βιοϋμένιο από τους μικροοργανισμούς.

3.2.1. Ζωμός ιχθύος στις μεταλλικές επιφάνειες

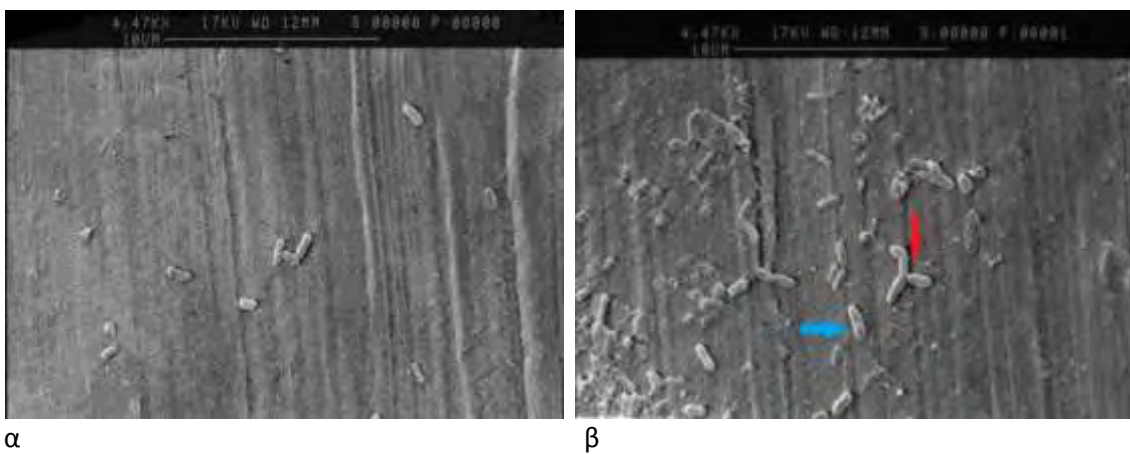
Στην Εικόνα 9 (α, β), απεικονίζονται τα συστατικά του ζωμού ιχθύος, ο οποίος έχει προσκολληθεί στις μεταλλικές επιφάνειες χωρίς να εμπεριέχει κάποιο μικροοργανισμό, μετά την πάροδο μίας ημέρας. Στην Εικόνα 9α, απεικονίζονται οι πρωτεΐνες του ζωμού ιχθύος, ενώ στην Εικόνα 9β, φαίνονται οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης.

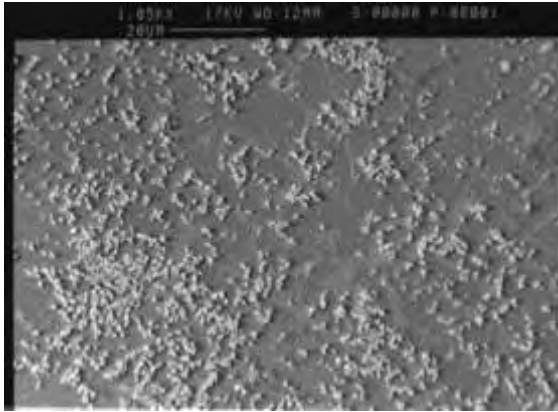


Εικόνα 9 : Απεικόνιση ζωμού ιχθύος στις μεταλλικές επιφάνειες μετά το πέρας 1 ημέρας. α) Απεικόνιση πρωτεϊνών ζωμού ιχθύος, κλίμακα μπάρας: 20 μm, β) Απεικόνιση κρυστάλλων πρωτεΐνης του ζωμού ιχθύος, κλίμακα μπάρας 100 μm.

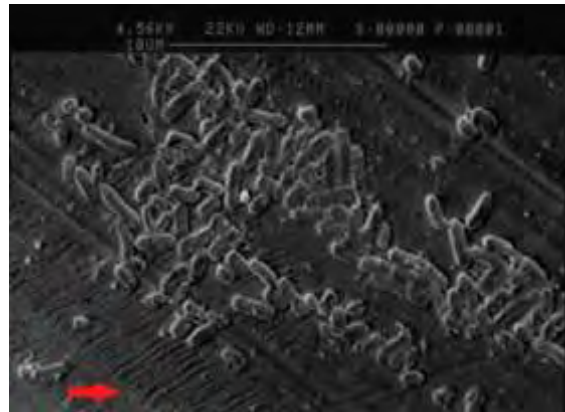
3.2.2. Δημιουργία βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες

Στην Εικόνα 10, αποτυπώνονται τα κύτταρα της *Listeria monocytogenes* από την αρχική τους προσκόλληση στην μεταλλική επιφάνεια ως μεμονωμένα κύτταρα, μέχρι τη δημιουργία του βιοϋμενίου σε χρονικό διάστημα 10 ημερών.





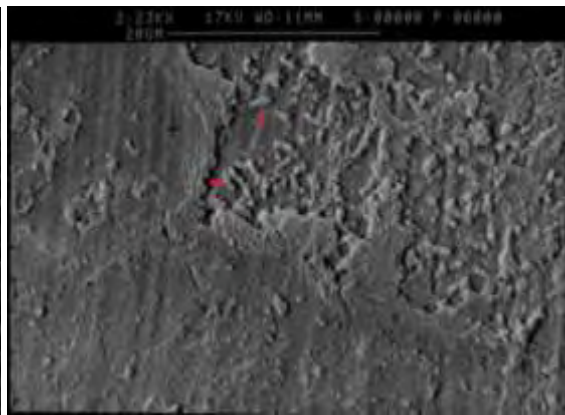
γ



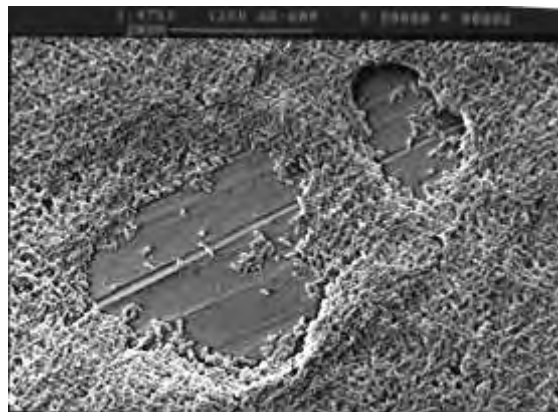
δ



ε



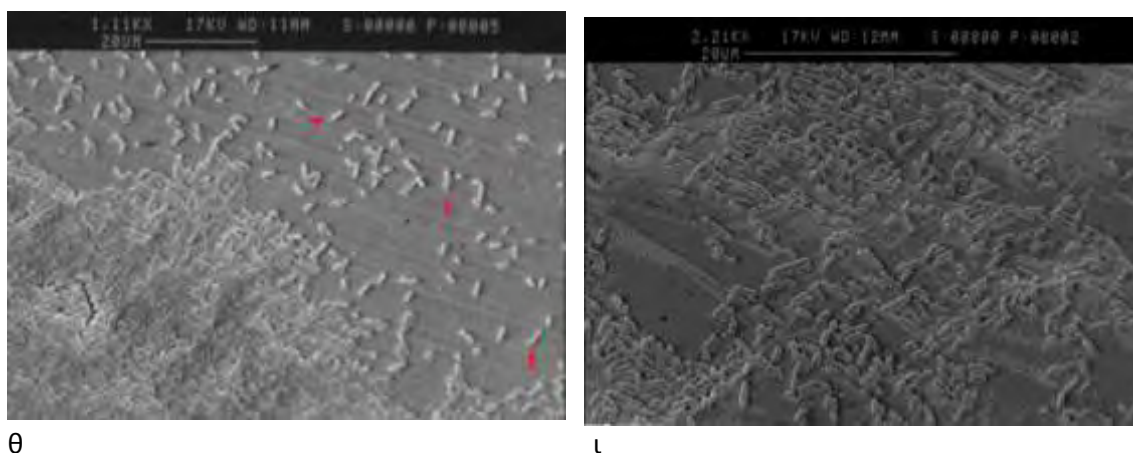
σ



ζ



η



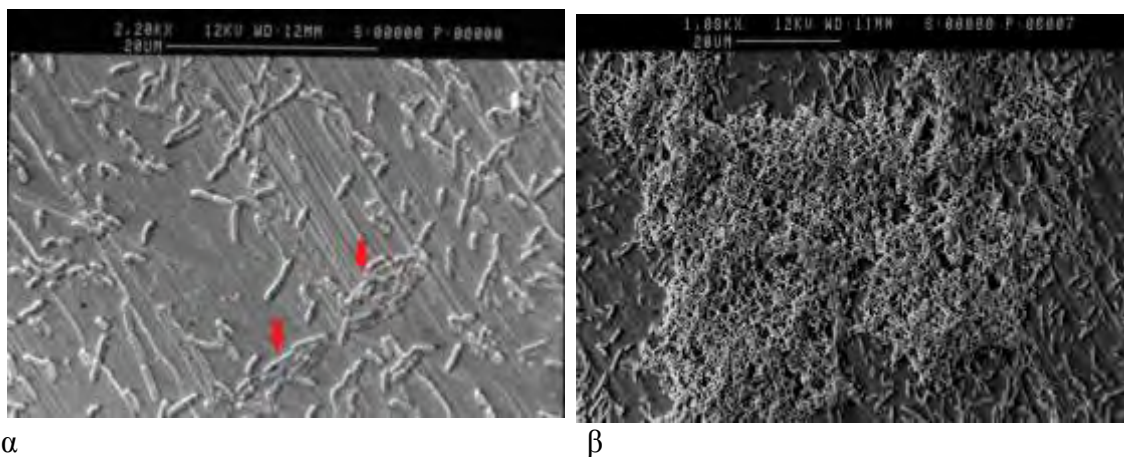
Εικόνα 10 : Απεικόνιση των κυττάρων της *Listeria monocytogenes* και της δημιουργίας βιοϋμενίου, σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε ζωμό ιχθύος, σε διάστημα 10 ημερών στους 15°C. Απεικόνιση των κυττάρων σε χρονικό διάστημα α) 30 λεπτών, κλίμακα μπάρας : 10 μm β) 3 ωρών, κλίμακα μπάρας : 10 μm γ) 7 ωρών, κλίμακα μπάρας : 20 μm δ) 1 ημέρας, κλίμακα μπάρας : 10 μm ε) 3 ημερών, κλίμακα μπάρας : 10 μm στ) 5 ημερών, κλίμακα μπάρας : 20 μm ζ) 7 ημερών, κλίμακα μπάρας : 20 μm η) 7 ημερών, κλίμακα μπάρας : 20 μm θ) 10 ημερών, κλίμακα μπάρας : 20 μm ι) 10 ημερών, κλίμακα μπάρας : 20 μm.

Η Εικόνα 10 δείχνει την πορεία δημιουργίας του βιοϋμενίου των κυττάρων της *Listeria monocytogenes* σε μεταλλικές επιφάνειες, στους 15 °C σε διάστημα δέκα ημερών. Στην Εικόνα 10 α, φαίνεται η αρχική προσκόλληση των μεμονωμένων κυττάρων του μικροοργανισμού τα πρώτα 30 λεπτά του πειράματος στη μεταλλική επιφάνεια. Μετά το πέρασμα 3 ωρών τα κύτταρα έχουν πολλαπλασιαστεί και αρχίζουν να σχηματίζουν αποικίες. Με το κυανό βέλος φαίνεται η διαίρεση ενός κυττάρου, ενώ το ερυθρό βέλος δείχνει το σχηματισμό μιας αποικίας. Μετά τις 7 ώρες ο πληθυσμός του μικροοργανισμού έχει αυξηθεί αρκετά, Εικόνα 10 γ, τα κύτταρα συνεχώς πολλαπλασιάζονται με αποτέλεσμα να δημιουργούνται αποικίες πολλών κυττάρων την

1^η ημέρα, Εικόνα 10 δ (με το ερυθρό βέλος φαίνονται οι κρύσταλλοι πρωτεΐνης του ζώμου ιχθύος όπως στην εικόνα 9 β). Την 3^η ημέρα έχει σχηματιστεί πλέον το βιοϋμένιο, οι εκκρίσεις των κυττάρων έχουν σχηματίσει το εξωπολυσκαριτικό στρώμα στο οποίο εσωκλείονται τα κύτταρα. Η μεταλλική επιφάνεια έχει καλυφθεί πλήρως στο συγκεκριμένο σημείο που φαίνεται στην Εικόνα, ενώ κάποια κύτταρα βρίσκονται ακόμα μεμονωμένα (ερυθρό βέλος). Από την 3^η ημέρα και έπειτα δεν παρατηρούνται ιδιαίτερες μεταβολές στις Εικόνες. Στις Εικόνες στ και θ που αντιπροσωπεύουν τις 5 και τις 10 ημέρες αντίστοιχα, φαίνεται και πάλι το σχηματισμένο βιοϋμένιο και μερικά μεμονωμένα κύτταρα (ερυθρό βέλος), ενώ στην Εικόνα ζ που αντιστοιχεί στις 7 ημέρες φαίνονται κάποιες περιοχές οι οποίες δεν έχουν καλυφθεί από κύτταρα. Στην Εικόνα 10 η, φαίνεται χαρακτηριστικά το πάχος του βιοϋμένιου (ερυθρή γραμμή). Η Εικόνα 10 ι δείχνει τις αποικίες των κυττάρων μετά από 10 ημέρες, ενώ φαίνεται πως η μεταλλική επιφάνεια δεν είναι επίπεδη.

3.2.3 Δημιουργία βιοϋμένιου *Pseudomonas* sp. σε μεταλλικές επιφάνειες

Στην Εικόνα 11 ενδεικτικά απεικονίζεται ο σχηματισμός βιοϋμένιου του *Pseudomonas* sp. σε μεταλλικές επιφάνειες σε διάστημα 10 ημερών.

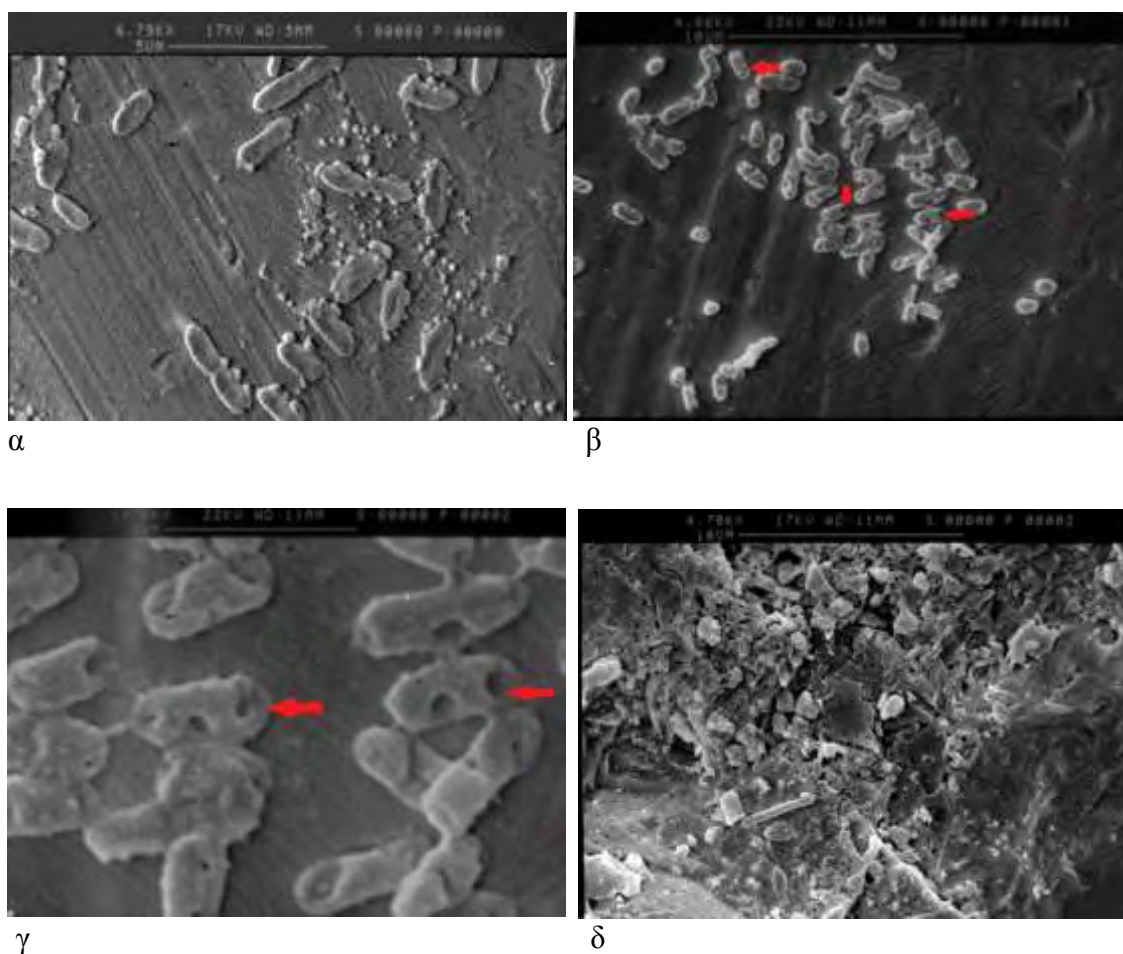


Εικόνα 11 : Απεικόνιση των κυττάρων του *Pseudomonas* sp. και της δημιουργίας βιοϋμενίου, σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε ζωμό ιχθύος, σε διάστημα 10 ημερών στους 15°C. Απεικόνιση των κυττάρων σε χρονικό διάστημα α) 1 ημέρας, κλίμακα μπάρας : 20 μm β) 10 ημερών, κλίμακα μπάρας : 20 μm.

Ο *Pseudomonas* sp. παρουσιάζει παρόμοια συμπεριφορά με αυτή της *Listeria monocytogenes*. Στην Εικόνα 11 α φαίνονται η διασπορά των κυττάρων και ο σχηματισμός αποικιών (ερυθρό βέλος) μετά το πέρας 1 ημέρας, ενώ στην Εικόνα 11 β το βιοϋμένιο έχει σχηματιστεί ενώ υπάρχουν και πάλι κάποια μεμονωμένα κύτταρα.

3.2.4. Καθαρισμός- Απολύμανση της *Listeria monocytogenes*

Στις Εικόνες που ακολουθούν αποτυπώνεται η δομή τόσο των μεμονωμένων κυττάρων όσο και του βιοϋμενίου, μετά την εμβάπτιση των μεταλλικών επιφανειών σε χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία τροφίμων για την καταπολέμηση παθογόνων μικροοργανισμών, και πιο συγκεκριμένα στο αλκαλικό απορρυπαντικό Hypofoam VF6 και στο απολυμαντικό Divosan SU 319/VT 8w.



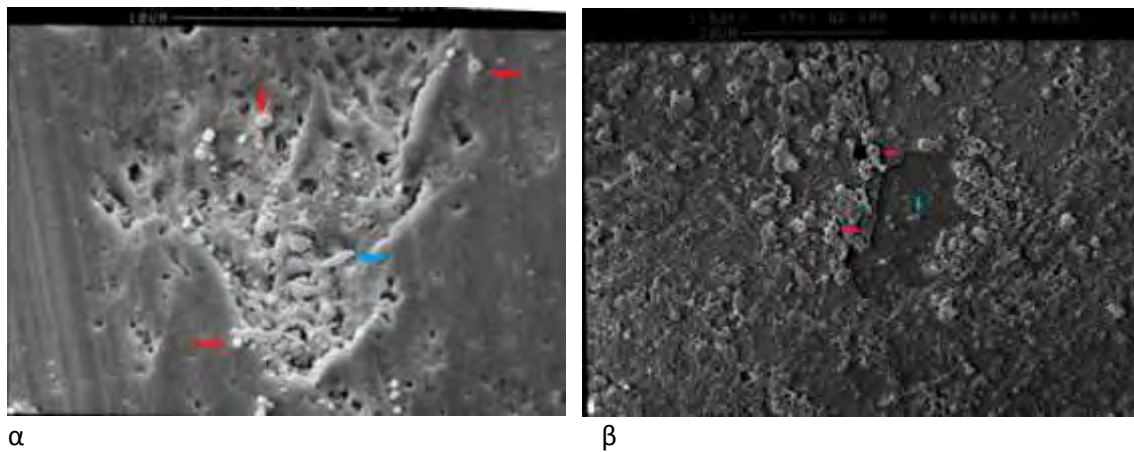
Εικόνα 12 : Απεικόνιση μεμονωμένων κυττάρων και των κυττάρων βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes* μετά την επίδραση καθαριστικής και απολυμαντικής ουσίας, σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε ζωμό ιχθύος, σε διάστημα 3 ημερών στους 15°C. α) Απεικόνιση κυττάρων μετά την εμβάπτιση της μεταλλικής επιφάνειας σε καθαριστικό για 15 λεπτά και σε απολυμαντικό για 5 λεπτά, κλίμακα μπάρας : 5 μm. β-γ-δ) Απεικόνιση κυττάρων και βιοϋμενίου μετά την εμβάπτιση της μεταλλικής επιφάνειας σε καθαριστικό για 15 λεπτά και σε απολυμαντικό για 15 λεπτά, κλίμακα μπάρας : 10, 2, 10 μm αντίστοιχα.

Στην Εικόνα 12 απεικονίζονται βιοϋμένια 3 ημερών. Οι μεταλλικές επιφάνειες και τα βιοϋμένια που αντιστοιχούν σε κάθε μία από τις τέσσερις φωτογραφίες, έχουν δεχτεί

μια πρώτη επεξεργασία με την επίδραση του καθαριστικού Hygrofoam VF6 για 15 λεπτά. Μετά την εμβάπτιση των μεταλλικών επιφανειών στο καθαριστικό, δεν παρατηρήθηκε καμία οπτική αλλαγή στο βιοϋμένιο.

Η Εικόνα 12 α απεικονίζει τα κύτταρα, τα οποία μετά το καθαριστικό, δέχτηκαν την επίδραση του απολυμαντικού Divosan SU 319/VT 8w για 5 λεπτά. Όπως φαίνεται, τα κύτταρα δεν έχουν καμία διαφορά στη δομή τους και μοιάζουν με τα κύτταρα της Εικόνας 10, δηλαδή τα κύτταρα που δεν είχαν υποστεί τη δράση κάποιας χημικής ουσίας.

Τα κύτταρα της Εικόνας 12 β, γ, δ μετά τη δράση του καθαριστικού, έχουν υποστεί τη δράση του απολυμαντικού για 15 λεπτά. Στις Εικόνες β και γ τα ερυθρά βέλη προσδιορίζουν την καταστροφή που έχουν υποστεί τα κύτταρα στη δομή τους από τις χημικές ουσίες. Η Εικόνα γ αποτελεί μια μεγεθυμένη περιοχή της εικόνας β. Στην Εικόνα 12 δ φαίνεται η κατεστραμμένη δομή του βιοϋμενίου και πιθανόν οι διάφορες ουσίες του κυττάρου οι οποίες έχουν εξέλθει πλέον από αυτό.



Εικόνα 13 : Απεικόνιση των κυττάρων βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes* μετά την επίδραση καθαριστικής και απολυμαντικής ουσίας, σε μεταλλικές επιφάνειες εμβαπτισμένες σε ζωμό ιχθύος, σε διάστημα 7 ημερών στους 15°C. α) Απεικόνιση κυττάρων και βιοϋμενίου μετά την εμβάπτιση της μεταλλικής επιφάνειας σε καθαριστικό για 15 λεπτά και σε απολυμαντικό για 5 λεπτά, κλίμακα μπάρας : 10 μm. β) Απεικόνιση κυττάρων και βιοϋμενίου μετά την εμβάπτιση της μεταλλικής επιφάνειας σε καθαριστικό για 15 λεπτά και σε απολυμαντικό για 15 λεπτά, κλίμακα μπάρας : 20 μm.

Στην Εικόνα 13 απεικονίζονται βιοϋμένια 7 ημερών. Οι μεταλλικές επιφάνειες και τα βιοϋμένια που αντιστοιχούν στις φωτογραφίες, έχουν δεχτεί μια πρώτη επεξεργασία με την επίδραση του καθαριστικού Hypofoam VF6 για 15 λεπτά. Μετά την εμβάπτιση των μεταλλικών επιφανειών στο καθαριστικό, δεν παρατηρήθηκε καμία οπτική αλλαγή στο βιοϋμένιο.

Η Εικόνα 13 α απεικονίζει τα κύτταρα βιοϋμενίου, τα οποία μετά το καθαριστικό, δέχτηκαν την επίδραση του απολυμαντικού Divosan SU 319/VT 8w για 5 λεπτά. Όπως φαίνεται, το βιοϋμένιο έχει δεχτεί αλλαγές στη δομή του με έκκριση διαφόρων ουσιών (ερυθρά βέλη), ενώ υπάρχουν κάποια κύτταρα στα οποία δεν έχει επηρεαστεί καθόλου η κατασκευή τους (κυανό βέλος). Τα ίδια χαρακτηριστικά αποτυπώνονται και στην

Εικόνα 13 β, όπου το βιοϋμένιο μετά το καθαριστικό έχει υποστεί την επίδραση του απολυμαντικού για 15 λεπτά.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η *Listeria monocytogenes* έχει απομονωθεί από πολλά προϊόντα περιλαμβανομένων λαχανικών, γάλατος, τυριών, ψαριών και κρεατικών, καθώς και έτοιμων φαγητών προς κατανάλωση. Η *Listeria monocytogenes* είναι ένα από τα πιο σημαντικά παθογόνα που σχετίζονται με τα τρόφιμα και είναι ικανό να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας. Αυτές οι ιδιότητες το καθιστούν ιδιαίτερα επικίνδυνο ειδικά σε τρόφιμα τα οποία φυλάσσονται στο ψυγείο, διότι μπορεί να πολλαπλασιαστεί σε χαμηλές θερμοκρασίες. Το είδος αυτό είναι ικανό να αντέξει σε ποικίλες συνθήκες στρες (Hanna & Wang 2007).

Τα κύτταρα της *Listeria monocytogenes* έχουν παρατηρηθεί ότι προσκολλώνται μέσα σε 3-5 δευτερόλεπτα σε τυχαίες περιοχές σε επιφάνειες αλουμινίου. Η προσκόλληση αρχικά είναι αραιή και ομοιόμορφη αλλά με το πέρασμα του χρόνου γίνεται πιο συμπαγής, δημιουργώντας τελικά μικροκοινωνίες (Hanna & Wang 2007). Η αρχική προσκόλληση εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ του κυτταρικού τοιχώματος και της υποκείμενης επιφάνειας. Τα κύτταρα που προσκολλώνται αρχικά δημιουργούν μια εξωκυττάρια πολυμερή ουσία στην οποία τα επόμενα κύτταρα αρχίζουν και προσκολλώνται και στη συνέχεια δημιουργούνται μικροκοινωνίες οι οποίες αυξάνονται προς τις περιοχές όπου τα θρεπτικά είναι άφθονα. Με το πέρασμα του χρόνου οι μικροκοινωνίες ολοένα και αυξάνονται δημιουργώντας ένα βακτηριακό πλέγμα. Με το πέρασμα του χρόνου το στρώμα πολυμερούς αρχίζει και μειώνεται εξ' αιτίας της χρήσης του ως πηγή ενέργειας από τους μικροοργανισμούς. Όσο το στρώμα μειώνεται ολόκληρο το βιοϋμένιο μπορεί να αποκολληθεί από την επιφάνεια (Hanna & Wang 2007).

Η ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος στους 15 °C σε μεταλλική επιφάνεια σε διάστημα δέκα ημερών, έδειξε ότι σταδιακά ο πληθυσμός του μικροοργανισμού αυξήθηκε. Γίνεται σαφές ότι υπάρχει αύξηση του πληθυσμού από 3,8 log cfu/cm² ως 6,1 log cfu/cm². Η γενική τάση είναι ότι υπάρχει αύξηση του πληθυσμού, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις υπάρχει μια αυξομείωση των τιμών. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κάθε μέτρηση έγινε σε διαφορετική μεταλλική επιφάνεια και πιθανόν οι επιφάνειες έχουν διαφορές μεταξύ τους, άρα και τα αποτελέσματα που δίνουν είναι διαφορετικά. Στην τελευταία μέτρηση παρατηρείται μια πτώση στα 5,3 log cfu/cm². Η πτώση που παρατηρείται είναι πιθανό να οφείλεται στο θάνατο ορισμένων κυττάρων. Πιθανόν η βιωσιμότητα του μικροοργανισμού ελαττώνεται και από αυτό το σημείο και έπειτα ίσως δεν αναπτύσσεται περαιτέρω.

Από παρόμοια μελέτη των Jeong & Frank (1994) φαίνεται ότι η *Listeria monocytogenes* παρουσιάζει αυξομειώσεις στην ανάπτυξή της εντός διαστήματος δέκα ημερών σε βιοϋμένιο σε μεταλλική επιφάνεια με υλικό ανάπτυξης TSB. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζει μείωση του πληθυσμού της κατά την τέταρτη μέρα, ενώ τις υπόλοιπες μέρες ο πληθυσμός αυξάνεται και κυμαίνεται γύρω στο 5,5 log cfu/cm², παρόμοιο αποτέλεσμα με την παρούσα εργασία.

Πολλά είδη του γένους *Pseudomonas* συναντώνται σε ποικίλα περιβάλλοντα, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, και δημιουργούν προβλήματα που σχετίζονται με το σχηματισμό βιοϋμενίου, αφού αυτό συγκαταλέγεται στις ιδιαίτερες ικανότητές τους. Συγκεκριμένα το είδος *Pseudomonas fluorescens* εμφανίζεται πολύ συχνά στα τρόφιμα λόγω του μικρού χρόνου διπλασιασμού του, της αντοχής του σε διάφορα εύρη θερμοκρασιών και της ικανότητάς τους να σχηματίζουν βιοϋμενία (Simoes *et al.* 2008). Πολλά προβλήματα σχετίζονται με τον *Pseudomonas* sp. γεγονός που του προσάπτει

την ιδιότητα να έχει μελετηθεί ευρέως, ειδικά ως προς την ικανότητα του να δημιουργεί βιοϋμένια (Benamara *et al.* 2011).

Ο *Pseudomonas* sp. παρουσιάζει παρόμοια αποτελέσματα με αυτά της *Listeria monocytogenes* ως προς την αυξητική πορεία που παρουσιάζει ο πληθυσμός με το πέρασμα των ημερών. Ο πληθυσμός κυμάνθηκε από την τιμή 3,6 ως 7,5 log cfu/cm². Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρούνται κάποιες μικρές διαφορές γεγονόσ που οφείλεται όπως ειπώθηκε παραπάνω στη διαφορετικότητα των μεταλλικών επιφανειών.

Σε αντίθεση με τη *Listeria monocytogenes* όπου στην τελευταία μέτρηση μειώνεται ο πληθυσμός της, ο *Pseudomonas* παρουσιάζει ραγδαία αύξηση της τάξης του ενός λογαρίθμου σε σχέση με την προτελευταία μέτρησή του. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και στη μελέτη των Wirtanen & Sandholm (1994) με τις τιμές να φτάνουν τα ίδια επίπεδα.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του *Pseudomonas* sp. με αυτά της *Listeria monocytogenes*, όσο αφορά την ανάπτυξή τους σε διαφορετικό θρεπτικό ζωμό ιχθύος, γίνεται αμέσως αντιληπτό ότι ο πληθυσμός του *Pseudomonas* sp. είναι μεγαλύτερος περίπου κατά 1 λογάριθμο. Με βάση τους μέσους όρους των δειγμάτων των δύο μικροοργανισμών, η *Listeria monocytogenes* κυμαίνεται από τιμές 3,1 ως 6,1 log cfu/cm² ενώ ο *Pseudomonas* από 3,6 ως 7,5 log cfu/cm².

Η διαφορά στις τιμές του πληθυσμού μεταξύ των δύο μικροοργανισμών φαίνεται και στην κοινή τους ανάπτυξη σε θρεπτικό ζωμό ιχθύος. Σε αυτή την περίπτωση οι τιμές της *Listeria monocytogenes* κυμάνθηκαν από 3,5 ως 5,4 log cfu/cm², ενώ του *Pseudomonas* από 4,4 ως 7,4 log cfu/cm². Μεταξύ των δύο μικροοργανισμών, φαίνεται ότι ο *Pseudomonas* είναι ο κυρίαρχος, με την παρουσία της *Listeria* να επηρεάζει την ανάπτυξή του κατά ένα λογάριθμο περισσότερο σε σχέση με την μεμονωμένη ανάπτυξή

του. Όταν η *Listeria monocytogenes* αναπτύχθηκε μόνη της, το εύρος ανάπτυξής της ήταν μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό που βρέθηκε στη μικτή καλλιέργεια, που πιθανώς σημαίνει ότι η παρουσία άλλων μικροοργανισμών, στην παρούσα φάση του *Pseudomonas* sp., επηρεάζει και μάλιστα αναστέλλει την ανάπτυξή της. Έρευνες με μικτές καλλιέργειες της *Listeria monocytogenes* με άλλους μικροοργανισμούς, έχουν δείξει ποικίλα αποτελέσματα για τη συμπεριφορά του οργανισμού, ορισμένα από τα οποία συμφωνούν με την παρούσα κατάσταση. Για παράδειγμα, σύμφωνα με τους Renier *et al.* (2011) φάνηκε ότι η παρουσία κάποιων άλλων μικροοργανισμών όπως *Staphylococcus capitis*, *S. aureus* και *Pseudomonas fragi*, ήταν πολύ σημαντική για την ενίσχυση και τη δημιουργία του βιουμενίου της *Listeria monocytogenes*. Στην έρευνα των Ibusquiza *et al.* (2012) αναφέρεται ότι η παρουσία ορισμένων ειδών *Pseudomonas* και *Flavobacterium* αυξάνουν την προσκόλληση κυττάρων της *Listeria monocytogenes* σε επιφάνεια προκειμένου να σχηματιστεί βιοϋμένιο, σε άλλες περιπτώσεις η παρουσία των *Pseudomonas fragi*, *Staphylococcus xylosus* και *Enterococcus faecium* μειώνουν την προσκόλληση κυττάρων της *Listeria monocytogenes*, ενώ η παρουσία των *Pseudomonas putida* και *Staphylococcus aureus* δεν είχαν καμία επίδραση στον αριθμό κυττάρων της *Listeria monocytogenes* που προσκολλήθηκαν. Τέλος η μελέτη των Lebert *et al.* (2000) έδειξε ότι ο χρόνος γένεσης της *Listeria* ήταν ο ίδιος με την παρουσία ή όχι του *Pseudomonas*, η *Listeria monocytogenes* δεν επηρέασε την ανάπτυξη του *Pseudomonas* ενώ η ανάπτυξή της βρισκόταν ένα επίπεδο πιο κάτω σε σχέση με τον *Pseudomonas* και ο δεύτερος αποτέλεσε τον κυρίαρχο οργανισμό στην μικτή καλλιέργεια. Τα αποτελέσματα της τελευταίας έρευνας, φαίνεται να συμφωνούν σε μεγάλο βαθμό με αυτά της παρούσας εργασίας.

Στο πείραμα του καθαρισμού - απολύμανσης του βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes* παρατηρούνται τα εξής. Τόσο στις τρεις μέρες όσο και στις επτά που έγιναν οι μετρήσεις, φαίνεται να ακολουθείται περίπου η ίδια πορεία ανάπτυξης του βιοϋμενίου κυττάρων όπως και στα άλλα πειράματα, με τον πληθυσμό να φθάνει στο επίπεδο των 10^6 cfu/cm². Η πρώτη προσπάθεια αντιμετώπισης του παθογόνου μικροοργανισμού γίνεται με την εμβάπτιση των μεταλλικών επιφανειών σε χλωριωμένο καθαριστικό Hyprofoam VC6 που χρησιμοποιείται στη βιομηχανία τροφίμων στους 37 °C για 15 λεπτά. Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις έδειξαν ότι η επίδραση του καθαριστικού στην ανάπτυξη της *Listeria monocytogenes* ήταν καταλυτική μειώνοντας τον πληθυσμό. Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τις μετρήσεις των τριών ημερών ο πληθυσμός μειώνεται από 5,69 σε 2,7 log cfu/cm², ενώ στις επτά ημέρες από 5,73 σε 2,82 log cfu/cm². Μετά τη χρήση του καθαριστικού χρησιμοποιήθηκε το απολυμαντικό Divosan SU 319/VT8w που ανήκει στα απολυμαντικά τεταρτοταγούς ενώσεως αμμωνίου (QUATS). Η δράση του απολυμαντικού δεν επέφερε σημαντικές μειώσεις στις συγκεντρώσεις των πληθυσμών και σε καμία περίπτωση δεν εξάλειψε πλήρως τον παθογόνο μικροοργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, για τις τρεις ημέρες ο πληθυσμός από 2,7 μειώθηκε σε 2,15 – 2,12 – 1,74 log cfu/cm² αντίστοιχα για 5,10 και 15 λεπτά, ενώ για τις επτά ημέρες από 2,86 έφτασε σε 2,5 – 2,63 – 2,7 log cfu/cm². Συμπερασματικά, φαίνεται ότι τη μεγαλύτερη επίδραση έχει το καθαριστικό ενώ το απολυμαντικό επιδρά σε πολύ μικρότερο βαθμό στις συγκεντρώσεις των πληθυσμών.

Σύμφωνα με τους Holah *et al.* (2003) τα QUATS χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για το γεγονός ότι δεν είναι τοξικά και διαβρωτικά για τον άνθρωπο. Η συχνή τους χρήση όμως πιθανόν ενίσχυσε την προσαρμογή των μικροοργανισμών και συγκεκριμένα της *Listeria monocytogenes* ιδιαίτερα όταν

δημιουργεί βιοϋμένια, και γι'αυτό πολλές φορές χρησιμοποιήθηκαν προϊόντα που περιείχαν χλωρίνη για να μεταβάλλουν την προσαρμοστική ικανότητα του μικροοργανισμού. Ο Meyer (2003) υποστήριξε ότι για να είναι αποτελεσματικές οι ουσίες πρέπει τα βιοϋμένια να καταπολεμούνται εγκαίρως και επίσης θεώρησε ότι οι ουσίες που περιέχουν χλωρίνη είναι πιο αποτελεσματικές από τα QUATS. Σε παρόμοιες έρευνες οι Arnisalo *et al.* (2007) και οι Belessi *et al.* (2011) παρατήρησαν προσαρμοστική συμπεριφορά της *Listeria monocytogenes* στα QUATS και αποτελεσματικότερη δράση των καθαριστικών με χλώριο. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα με άλλες έρευνες, φαίνεται ότι υπάρχει συσχέτιση.

Το τελευταίο μέρος των πειραμάτων αφορούσε την παρατήρηση των κυττάρων βιοϋμενίου των μικροοργανισμών από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (SEM). Το SEM χρησιμοποιεί μια εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων προκειμένου να αποκαλυφθούν τα επιφανειακά χαρακτηριστικά ενός εξεταζόμενου είδους και να δοθούν πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή του (Arana 2012). Χρησιμοποιούμενο στα τρόφιμα, το SEM μπορεί να αναλύσει την αρχιτεκτονική δομή ενός τροφίμου, όπως το μέγεθος των κυττάρων, τον αριθμό των κυττάρων σε μια μελετώμενη περιοχή, καθώς και την επιφάνεια ενός δείγματος με λεπτομέρεια. Στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του SEM, συγκαταλέγονται η ευκρίνεια των εικόνων και το μεγάλο βάθος πεδίου με αποτέλεσμα πολλές περιοχές του δείγματος να είναι στο επίκεντρο την ίδια στιγμή (Maskan & Altan 2011).

Όσον αφορά τα πειράματα στα οποία αναπτύχθηκαν τα κύτταρα των μικροοργανισμών *Listeria monocytogenes* και *Pseudomonas* sp. και σχηματίστηκαν βιοϋμένια στις μεταλλικές επιφάνειες, παρατηρήθηκε η διαδικασία σχηματισμού του βιοϋμενίου. Σε αυτές τις εικόνες, κυρίως για τη *Listeria monocytogenes*,

παρατηρήθηκαν όλα τα στάδια της ανάπτυξης βιοϋμενίου σε διάστημα 10 ημερών. Η παρατήρηση ξεκίνησε με την αρχική προσκόλληση των κυττάρων στις μεταλλικές επιφάνειες οι οποίες βρίσκονταν σε Sodium Chlorite για 3 ώρες. Σε αυτό το σημείο πρέπει να επισημανθεί ότι προκειμένου να γίνει η προσκόλληση των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε το Sodium Chlorite [NaCl 0,85 % (w/v)], καθώς το ποσοστό της βακτηριακής επικόλλησης αυξάνει με την αύξηση της ιοντικής ισχύος του μέσου ανάπτυξης (Belessi *et al.* 2011). Στη συνέχεια παρατηρήθηκε ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, ο σχηματισμός αποικιών από τα μεμονωμένα κύτταρα, και τελικά η δημιουργία του βιοϋμενίου αποτελούμενο από συμπαγείς στρώσεις κυττάρων και πολυσακχαριδιτικού στρώματος.

Συγκρίνοντας τις εικόνες που παρατηρήθηκαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν από τις καταμετρήσεις των πληθυσμών των μικροοργανισμών, θα μπορούσε να ειπωθεί σε γενικές γραμμές ότι υπάρχει συσχέτιση. Η αύξηση του πληθυσμού των κυττάρων των μικροοργανισμών που καταμετρήθηκαν στα τριβλύα συμβαδίζει με τη σταδιακή προσκόλληση των κυττάρων στις μεταλλικές επιφάνειες και τη δημιουργία βιοϋμενίου σε διάστημα 10 ημερών.

Στο πείραμα του καθαρισμού – απολύμανσης του βιοϋμενίου της *Listeria monocytogenes*, όσον αφορά το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, παρατηρήθηκαν τα εξής. Τόσο για τα βιοϋμένια που σχηματίστηκαν στις 3 ημέρες όσο και για αυτά που σχηματίστηκαν στις 7 ημέρες, η επίδραση του καθαριστικού Hypofoam VF6 δεν επέφερε καμία οπτική αλλαγή στην αρχιτεκτονική δομή των βιοϋμενίων, σε αντίθεση με το απολυμαντικό Divosan SU 319/VT 8w που κατέστρεψε την κατασκευή τους.

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο σχετικά με τη δράση των QUATS στα κύτταρα, έτσι και τώρα μπορεί να ειπωθεί ότι τα QUATS ενεργούν στη

διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης και προκαλούν διαρροή των κυτταροπλασματικών υλικών σε χαμηλές συγκεντρώσεις (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε QUAT σε συγκέντρωση 1%), ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούν πήξη του κυτταροπλάσματος (To *et al.* 2002). Πιθανολογείται ότι στις Εικόνες 12 και 13, κυρίως στις Εικόνες 12 δ και 13 α, που παρατηρήθηκαν προηγουμένως, τα QUATS έχουν καταστρέψει την κυτταρική μεμβράνη και έχουν προκαλέσει διαρροή των κυτταροπλασματικών υλικών.

Συγκρίνοντας τις Εικόνες που παρατηρήθηκαν από το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης με τα αποτελέσματα που βρέθηκαν από τις καταμετρήσεις των πληθυσμών των μικροοργανισμών, γίνεται αντιληπτό ότι δεν υπάρχει μεγάλη συσχέτιση. Στην καταμέτρηση των πληθυσμών στα τρυβλία, φάνηκε ότι η επίδραση του καθαριστικού μειώνει περίπου 3 λογαρίθμους τη συγκέντρωση του αρχικού πληθυσμού, ενώ η μετέπειτα χρήση του απολυμαντικού δεν επιφέρει αλλαγές στη συγκέντρωση. Το αντίθετο παρατηρήθηκε στις εικόνες όπου το καθαριστικό δεν μετέβαλλε τη δομή του βιοϋμενίου σε αντίθεση με το απολυμαντικό, και κυρίως μετά τη δράση του για 15 λεπτά, που άλλαξε τη δομή του.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα έρευνα έγινε προσπάθεια δημιουργίας συνθηκών παρόμοιων με μιας βιομηχανίας τροφίμων, όπου κύτταρα μικροοργανισμών που παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον, όπως κύτταρα της *Listeria monocytogenes* και του *Pseudomonas* sp., σχηματίζουν βιοϋμένια σε επιφάνειες ανοιξείδωτου χάλυβα, με θρεπτικό υπόστρωμα τα συστατικού του οποίου ιχθύος σε θερμοκρασία που επικρατεί σε αυτές τις εγκαταστάσεις.

Τα κύτταρα των βακτηρίων προσκολλούνται πολύ ικανοποιητικά στις μεταλλικές επιφάνειες σε πληθυσμό περίπου 10^4 cfu/cm². Ο τελικός πληθυσμός των κυττάρων του βιοϋμενίου *Listeria monocytogenes* φθάνει τα 10^6 cfu/cm², ενώ του *Pseudomonas* sp. τα 10^7 cfu/cm², σε διάστημα 10 ημερών.

Στη συγκαλλιέργεια παρατηρείται ότι ο *Pseudomonas* sp. αναστέλει τον τελικό πληθυσμό των κυττάρων *Listeria monocytogenes* στο μικτό βιοϋμένιο, ενώ ο ίδιος χρειάζεται λιγότερο χρόνο για να φτάσει στο μέγιστο πληθυσμό του.

Ο καθαρισμός-απολύμανση με χημικά που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία μεταποίησης αλιευτικών προϊόντων έδειξε ότι το αρχικό στάδιο καθαρισμού αδρανοποιεί την πλειοψηφία των κυττάρων της *Listeria monocytogenes* με αποτέλεσμα το απολυμαντικό να τα μειώνει ελάχιστα ως και καθόλου.

Η παρατήρηση των βιοϋμενίων που σχηματίστηκαν στις μεταλλικές επιφάνειες με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, έδωσε μια ικανοποιητική εικόνα σχετικά με την αρχιτεκτονική δομή κυττάρων και βιοϋμενίων των μικροοργανισμών, τόσο κατά τη διαδικασία ανάπτυξης των βιοϋμενίων, όσο και κατά την προσπάθεια εξάλειψης αυτών.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Α. Ξένη Βιβλιογραφία

Aarnisalo K., Tallavaara K., Wirtanen G., Majjala R., Raaska L. (2006) The hygienic working practices of maintenance personnel and equipment hygiene in the Finnish food industry, *Food Control*, 17: 1001-1011

Aarnisalo K., Lunde J., Korkeala H., Wirtanen G (2007) Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures, *Lebensmittel – Wissensch und -Technologie*, 40: 1041–1048

Agle E. M. (2007) Biofilms in the food industry, In: *Biofilms in the food environment*, Blascheck P. H., Wang H., Agle E. M., Blackwell Publishing, Ames, USA, p 3-5

Arana I. (2012) *Physical Properties of Foods: Novel Measurement Techniques and Applications*, CRC Press, Pamplona, Spain, pp 293 -297

Benamara H., Rihouey C., Jouenne T., Alexandre S. (2011) Impact of the biofilm mode of growth on the inner membrane phospholipid composition and lipid domains in *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808: 98–10

Belessi A.C., Gounadaki S.A., Psomas N.A., Skadamis N.P. (2011) Efficiency of different sanitation methods of *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 145: 46-52

Belessi C., Gounadaki A., Schvartzman S., Jordan K., Skandamis P. (2011) Evaluation of growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* growing on stainless steel surfaces, detached from biofilms or in suspension, in response to pH and NaCl, *International Journal of Food Microbiology*, 145: 53–60

Burlingame B., Pineiro M. (2007) The essential balance: Risks and benefits in food safety and quality, *Journal of Food Composition and Analysis* 20: 139–146

Chae M. and Schraft H. (2001) Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms, *Food Microbiology*, 18: 103-112

Chae M. and Schraft H. (2000) Comparative evaluation of adhesion and biofilm formation of different *Listeria monocytogenes* strains, *International Journal of Food Microbiology*, 62: 103–111

Churchill R., Lee H., Hall C. (2006) Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food, *Journal of Microbiological Methods*, 64: 141–170

Corry J.E.L., Curtis G.D.W., Baird R.M. (1995) *Culture media for food microbiology*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, Netherlands, pp 67-69

Diedrich J. (2007) *Laser-induced breakdown spectroscopy on bacterial samples*, ProQuest Information and Learninf Company, United States, pp 37

- Donk D. and Gaalman G. (2004) Food safety and hygiene, Systematic Layout Planning of Food Processes, Chemical Engineering Research and Design, 82: 1485–1493
- Duarte G., Vaz-Velho M., Capella C., Gibbs P. (1999) Efficiency of four secondary enrichment protocols in differentiation and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* from smoked fish processing chains, International Journal of Food Microbiology, 52: 163–168
- Egan M., Raats M., Grubb S., Eves A., Lumbers M., Dean M., Adams M. (2007) A review of food safety and food hygiene training studies in the commercial sector, Food Control 18: 1180–1190
- FAO (2004) Microbiological Risk Assessment Series 5 Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods TECHNICAL REPORT, <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/en/mra4.pdf>, (Πρόσβαση 3-1-2012)
- Galaviz – Silva L., Gomez – Anduro G., Molina – Garza Z., Ascencio – Valle F. (2009) Food safety Issues and the microbiology of fish and shellfish, In : Microbiologically Safe Foods, Heredia N., Wesley I., Garcia S., Wiley, Hoboken, New Jersey, p 227-230
- Giaouris E. and Nychas G. (2006) The adherence of *Salmonella* Enteritidis PT4 to stainless steel: The importance of the air–liquid interface and nutrient availability, Food Microbiology, 23: 747-752
- Hanna E. S., Wang H. (2007) Biofilm development by *Listeria monocytogenes*, In: Biofilms in the food environment, Blascheck P. H., Wang H., Agle E. M., Blackwell Publishing, Ames, USA, p 47-50
- Hansen T. L. and Vogel F.B. (2011) Desiccation of adhering and biofilm *Listeria monocytogenes* on stainless steel: survival and transfer to salmon products, International Journal of Food Microbiology, 146: 88-93
- Harvey J., Keenan P.K., Gilmour A. (2007) Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains, Food Microbiology, 24: 380-392
- Holah J., Taylor J., Dawson D., Hall K. (2003) Biocide use in the food industry and the disinfectant resistance of persistent strains of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli*, Journal of Applied Microbiology, 92: 111–120
- Hood K. S. and Zottola A. E. (1995) Biofilms in food processing, Food Control, 6: 9-18
- Huss H., Jørgensen L., Vogel B. (2000) Control options for *Listeria monocytogenes* in seafoods, International Journal of Food Microbiology, 62: 267–274
- Ibusquiza P., Herrera J., Vázquez-Sánchez D., Cabo M. (2012) Adherence kinetics, resistance to benzalkonium chloride and microscopic analysis of mixed biofilms formed by *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas putida*, Food Control, 25: 202-210
- Jeong D. and Frank J. (1994) Growth of *Listeria monocytogenes* at 21 C in biofilms with Micro-organisms Isolated from Meat and Dairy Processing Environments, Lebensmittel – Wissensch und -Technologie, 27: 415 - 424

- Kives J., Orgaz B., San Jose C. (2006) Polysaccharide differences between planktonic and biofilm associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52, *Colloides and surfaces B: Bionterfaces*, 52: 123 – 127
- Lebert I. , Robles-Olvera V., Leber A. (2000) Application of polynomial models to predict growth of mixed cultures of *Pseudomonas spp.* and *Listeria* in meat, *International Journal of Food Microbiology*, 61: 27–39
- Longhi C., Scoarughi G., Poggiali F., Cellini A., Carpentieri A., Seganti L., Pucci P., Amoresano A., Cocconcelli P., Artini M., Costerton J., Selan L. (2008) Protease treatment affects both invasion ability and biofilm formation in *Listeria monocytogenes*, *Microbial Pathogenesis*, 45: 45–52
- Lorian V. (2005) Antibiotics in laboratory medicine, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp 643 – 644
- Lorber B. (2007) Listeriosis, In: *Listeria monocytogenes* and host response, Goldfine H. and Shen H., Springer Science + Business Media LLC, USA, pp 13-15
- Lourenco A., Machado H., Brito L. (2011) Biofilms of *Listeria monocytogenes* Produced at 12°C either in Pure Culture or in Co-Culture *Pseudomonas aeruginosa* Showed Reduced Susceptibility to Sanitizers, *Journal of Food Science*, 76: M143–M148
- Low J. and Donachie W. (1997) A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis The Veterinary Journal, 153: 9-29
- Maskan M. and Altan A. (2011) Advances in Food Extrusion Technology, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 319
- Mendez-Vilas A. (2009) Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, World Scientific, Singapore, pp 622
- Meyer B. (2003) Approaches to prevention, removal and killing of biofilms, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51: 249-253
- Norwood D. and Gilmour A. (1999) Adherence of *Listeria monocytogenes* strains to stainless steel coupons, *Journal of Applied Microbiology*, 86: 576-582
- Orsi H. R., Bakker C. H., Wiedmann M. (2011) *Listeria monocytogenes* lineages : Genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics, *International Journal of Food Microbiology*, 306: 79-96
- Pelczar M., Chan Jr., Krieg N. (2009) Microbiology An application based approach, Tata McGraw Hill, New Delhi, pp 210 -211
- Portnoy D. (2007) A 20-Year Perspective on *Listeria monocytogenes* Pathogenesis, In: *Listeria monocytogenes* and host response, Goldfine H. and Shen H., Springer Science + Business Media LLC, USA , p 1-4
- Poulsen V. L. (1999) Microbial biofilm in food processing, *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 32: 321-326

Renier S., Hebraud M., Desvaux M. (2011) Molecular biology of surface colonization by *Listeria monocytogenes* : an additional facet an opportunistic Gram-positive foodborne pathogen, *Environmental Microbiology*, 13: 835-850

Schothorst M. (1998) Principles for the establishment of microbiological food safety objectives and related control measures, *Food Control*, 9: 379-384

Shi X. and Zhu X. (2009) Biofilm formation and food safety in food industries, *Trends in food Science & Technology*, 20: 407-413

Simoes M., Simoes L., Vieira M. (2008) Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses, *International Journal of Food Microbiology*, 128: 309-316

Simoes M., Simoes L., Vieira M. (2010) A review of current emergent biofilm control strategies, *LWT - Food Science and Technology*, 43: 573–583

Tezel U. (2009) Fate and effect of quaternary ammonium compounds in biological systems, ProQuest LLC, United States, pp 2-33

To M., Favrin St., Romanova N., Griffiths M. (2002) Postadaptational Resistance to Benzalkonium Chloride and Subsequent Physicochemical Modifications of *Listeria monocytogenes*, *Food Microbiology*, 78: 7

Tome M., Vera A., Murcia A. (2000) Improving the control of food production in catering establishments with particular reference to the safety of salads, *Food Control*, 11: 437 – 445

Vanne L., Karwoski M., Karppinen S., Sjiiberg A. (1996) HACCP-based food quality control and rapid detection methods for microorganisms, *Food Control*, 7: 263-216

Wirtanen G., Solo S., Helander I., Matilla- Sandholm T. (2001) Microbiological methods for testing disinfectant efficiency on *Pseudomonas* biofilm, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 20: 37-50

Wirtanen G., Matilla- Sandholm T. (1994) Measurement of biofilm of *Pediococcus pentosaceus* and *Pseudomonas fragi* on stainless steel surfaces, *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces*, 2: 33-39

Zenki S. and Omariah H. (2006) Fruits: Sanitation and Safety, In : Handbook of fruits and fruit processing, Hui Y., Blackwell Publishing, USA, p 245 – 257

B. Ελληνική Βιβλιογραφία

Αρβανιτογιάννης Ι., Σάνδρου Δ., Κούρτης Λ. (2001) Ασφάλεια Τροφίμων : Εφαρμογή της ανάλυσης επικινδυνότητας και κρίσιμων σημείων ελέγχου (HACCP) στις βιομηχανίες τροφίμων και ποτών, University Studio Press, Θεσσαλονίκη, σελ. 191-193

Βερίλλης Π. (2008) Βασικές αρχές οπτικής και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, Λάρισα, σελ.78-80

C. Ηλεκτρονική Βιβλιογραφία

Stier F. R. (2005) Beating Back Biofilms in Food Processing
<http://www.foodsafetymagazine.com/article.asp?id=722&sub=sub1> (Πρόσβαση 8-6-2011)

http://www.solabia.fr/solabia/produitsDiagnostic.nsf/SW_PROD/863B1D19756C7C46C12574C700331E38?opendocument&LG=EN&1 (Πρόσβαση 2-12-2011)

<http://www.innovationdiagnostics.com> (Πρόσβαση 4-1-2012)

<http://textbookofbacteriology.net/themicrobialworld/Listeria.html> (Πρόσβαση 15-1-2012)

http://www.innovationdiagnostics.com/store/product.php?id_product=630126
 (Πρόσβαση 2-2-2012)

http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/7164_PI.pdf (Πρόσβαση 2-2-2012)

http://www.neogen.com/Acumedia/pdf/ProdInfo/9222_PI.pdf (Πρόσβαση 2-2-2012)

7. ABSTRACT

This master thesis was held within the framework of the Postgraduate Program, at the University of Thessaly, by the Board of Agriculture Ichthyology and Aquatic Environment.

The purpose of this study was to monitor the biofilm formation of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces simulating the fish processing plant environment. The growth medium was fish juice made from aqua cultured sea bream flesh. The metal surfaces (coupons) was made by stainless steel dimensions type AISI-304 with dimensions 3 x 1 x 0.1 cm. Sea beam flesh, was mixed with deionized water in 1:1 ratio, homogenized, filtered, boiled and subsequently the prepared broth was distributed into test tubes. The coupons were immersed into the medium which was inoculated with *Listeria monocytogenes* or *Pseudomonas* sp. cells. The duration of biofilm formation was ten days at 15 °C, usual average temperature in fish processing plants. The population was monitored by scraping the cells from the coupons using glass beads 1,5mm diameter. Subsequently the detached cells were decimally diluted in NaCl 0.85 % (w/v) and plated on Tryptone Soy Agar (TSA) or Palcam. The population was determined by counting the colonies after 24-48 h incubation at 37 °C. *Pseudomonas* biofilm formation was also monitored by following the same procedure. Mixed biofilm of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas* sp. was also studied. *Pseudomonas* sp. population was counted using TSA and/or CFC agar medium.

Listeria monocytogenes biofilm changes due to the application of cleaning – disinfection procedure was also studied by using chemicals commonly used in food

industry. Biofilm formation steps was also studied by using scanning electron microscopy.

Initial *Listeria monocytogenes* population after attachment of cells on coupons was about 10^4 cfu/cm² cfu/cm², while the final population reached the level of 10^6 cfu/cm² after 8 days. *Pseudomonas* sp. population was 10^4 cfu/cm² after cell attachment while its final population was 10^7 cfu/cm² after 10 days. The co-culture of two bacteria showed that *Pseudomonas* sp. inhibits *Listeria monocytogenes* growth while its own growth was enhanced. Maximum population of *Listeria monocytogenes* reached the level of 10^5 cfu/cm², while *Pseudomonas*' maximum population level of 10^7 cfu/cm² was reached after 3 days in contrast to 10 days when it was in mono-culture.

Cleaning reduced the biofilm population of *Listeria monocytogenes* by 3 logs while the subsequent disinfection step reduced the population by 1 log.

The observation of the biofilm formation by scanning electron microscopy exhibited a detailed view of biofilm formation.

Keywords : biofilm, *Listeria monocytogenes*, scanning electron microscopy, fish broth