

DYNAMIKA TWORZENIA BIOFILMÓW BAKTERYJNYCH NA MATERIAŁACH KONSTRUKCYJNYCH LINII TECHNOLOGICZNYCH W PRZEMYSŁE SPOŻYWCZYM

Joanna Królasik, Zofia Żakowska, Milena Krępska, Leszek Klimek,
Anna Szosland-Fałtyn

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego

Oddział Chłodnictwa i Jakości Żywności

92-202 Łódź, Al. Marsz. J. Piłsudskiego 84

joanna.krolasik@och-ibprs.pl

Streszczenie

Celem badań było określenie wpływu rodzaju i chropowatości powierzchni materiałów, stosowanych do konstrukcji urządzeń produkcyjnych w przemyśle spożywczym na szybkość tworzenia biofilmu. Materiał biologiczny stanowiły bakterie saprofityczne: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus hominis*, *Listeria innocua* i *Enterobacter cloacae* wyizolowane z powierzchni użytkowych kontaktujących się z żywnością, po procesach mycia i dezynfekcji. W badaniach wykorzystano dwa rodzaje tworzyw: polipropylen oraz stal nierdzewną typu 304, o współczynnikach chropowatości: $R_z = 1,2 \mu\text{m}$ i $R_z = 7,4 \mu\text{m}$. Proces tworzenia biofilmu prowadzono w warunkach hodowli modelowej, symulującej środowisko, panujące na powierzchniach produkcyjnych, po procesach mycia i dezynfekcji. Liczbę komórek na powierzchniach abiotycznych oceniano techniką wymazu. Obraz utworzonego biofilmu zarejestrowano w mikroskopie elektronowym skaningowym 3000 N Hitachi.

Cztery bakterie (*Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus hominis*, *Listeria innocua*) wykazywały zdolność do tworzenia biofilmów na powierzchniach stali nierdzewnej i polipropylenu. Najefektywniej zasiedlaną płaszczyzną był polipropylen, najslabiej zaś, stal nierdzewna, o niskim współczynniku chropowatości ($R_z = 1,2 \mu\text{m}$). Przeprowadzone badania wykazały, że większa chropowatość powierzchni stali ($R_z = 7,4 \mu\text{m}$) sprzyjała adhezji drobnoustrojów.

Słowa kluczowe: adhezja, biofilm, stal nierdzewna, polipropylen

THE DYNAMICS OF BIOFILM FORMATION ON STRUCTURAL MATERIALS OF PROCESSING LINES IN FOOD INDUSTRY

Summary

The aim of this study was to determine the effect of surface roughness and type of materials used for construction of production facilities in the food industry on the dynamics of biofilm formation. Biological material were saprophytic bacteria: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus hominis*, *Listeria innocua* and *Enterobacter cloacae* isolated from food contact surfaces, after clearing and disinfection. Two types of materials were used: polypropylene and stainless steel type 304, with coefficients of roughness: $R_z = 1.2 \mu\text{m}$ and $R_z = 7.4 \mu\text{m}$. The process of biofilm formation was conducted in a model culture conditions simulating the environment prevailing in the areas of production, after cleaning and disinfecting processes. The number of cells adhered to abiotic surfaces was assessed by swabbing technique. Images of biofilm were registered in a scanning electron microscope Hitachi 3000 N.

Four bacteria (*Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus hominis*, *Listeria innocua*) showed the ability to form biofilms on surfaces of stainless steel and polypropylene. Efficiently colonized surface was polypropylene, while the least, stainless steel, with low roughness ($R_z = 1.2 \mu\text{m}$). The study showed that the greater roughness of steel surface ($R_z = 7.4 \mu\text{m}$), favored microbial adhesion.

Key words: adhesion, biofilm, stainless steel, polypropylene

WSTĘP

Mikroorganizmy charakteryzuje silna skłonność do kolonizacji wszelkiego rodzaju powierzchni stałych, również wykorzystywanych przemysłowo. Osadzające się na płaszczyznach drobnoustroje tworzą tzw. biofilmy, czyli wyspecjalizowane, zróżnicowane gatunkowo zespoły komórek, zanurzonych w wytwarzanym przez siebie polisacharydowym śluzie [Czaczyk 2004, Nikolaev, Plakunov 2007]. Ich obecność na powierzchniach urządzeń w przemyśle spożywczym stanowi stałe źródło zanieczyszczenia żywności w czasie procesów produkcyjnych, szczególnie tych, o długim okresie operacji technologicznych, a ponadto negatywnie wpływa na pracę urządzeń, powodując m. in. zaburzenia przepływu cieczy w rurociągach czy korozję materiałów. Biofilmy stwarzają ogromny problem dla producentów żywności, ponieważ ich usuwanie z powierzchni produkcyjnych podczas rutynowych procedur jest trudne do przeprowadzenia i zazwyczaj mało efektywne. Drobnoustroje żyjące w skupiskach, ukryte pod warstwą wytworzonego przez siebie śluzu

wytwarzają różnorodne mechanizmy obrony przed degradacyjnym wpływem środków dezynfekcyjnych, antybiotyków czy wysokiej temperatury.

Jednym z bardziej istotnych czynników, warunkującym adhezję drobnoustrojów jest rodzaj i charakter powierzchni abiotycznej. Do materiałów, na których najczęściej stwierdza się obecność biofilmów należą: powierzchnie szklane, ze stali nierdzewnej oraz tworzyw sztucznych: polipropylen, polistyren, teflon, silikon, guma [Carpentier, Cerf 1993, Czaczyk 2005]. Uważa się, że wraz ze wzrostem chropowatości, rozmiarów uszkodzeń oraz ziarnistości powierzchni stalowych rośnie ilość osadzających się na nich zanieczyszczeń mikrobiologicznych i mechanicznych [Pyć 2008]. Jednak, jak dotychczas opinie naukowców na temat wpływu stanu powierzchni abiotycznej, a zwłaszcza wszelkich zarysowań, na adhezję mikroorganizmów i wzrost biofilmów różnią się między sobą. Z pewnością jednak można stwierdzić, że rodzaj i sposób wykończenia powierzchni ma istotny wpływ na skuteczność usunięcia z niej osadzonych bakterii [Lewicki 2006].

W ostatnich latach obserwuje się coraz większy wzrost zainteresowania producentów żywności obecnością biofilmów bakteryjnych na materiałach, stosowanych w przemyśle spożywczym. Fakt ten, zainicjował poszukiwanie skutecznych metod likwidacji i zapobiegania temu zjawisku. Aby tego dokonać niezbędne jest poznanie mechanizmów, odpowiedzialnych za pozostawanie cieczy na powierzchni urządzeń i tworzenie się osadów mikrobiologicznych.

Celem badań było określenie wpływu rodzaju i chropowatości powierzchni urządzeń produkcyjnych kontaktujących się z żywnością na dynamikę tworzenia biofilmów bakteryjnych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał biologiczny stanowiły drobnoustroje: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus hominis*, *Listeria innocua*, *Enterobacter cloacae*, które zostały wyizolowane z powierzchni produkcyjnych kontaktujących się z żywnością, po zakończonych procesach mycia i dezynfekcji, w zakładzie mięsny. Izolacji oraz identyfikacji materiału badawczego dokonano w ramach prezentowanej pracy, w Instytucie Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Pracowni Mikrobiologii Oddziału Chłodnictwa i Jakości Żywności w Łodzi. Cztery spośród wybranych do badań bakterii, należało do gatunków najczęściej wykrywanych na powierzchniach użytkowych oraz jedna (*Enterobacter cloacae*), występująca sporadycznie w środowisku produkcyjnym. Wszystkie uważane są za niechorobotwórcze, chociaż opisano przypadki ich izolacji z zakażeń

oportunistycznych. Zaliczane są one do mikroorganizmów odpowiedzialnych za przemiany podstawowych składników żywności, z wytworzeniem produktów obniżających jakość i określane są często, jako mikroflora psująca – SSO (ang. Specific Spoilage Organisms) [Nowak, Piątkiewicz 2008].

W badaniach wykorzystano dwa rodzaje tworzyw, polipropylen oraz stal nierdzewną o niskiej zawartości węgla, chromowo-niklową typu 304. Aby ocenić wpływ chropowatości powierzchni na proces tworzenia biofilmów, w doświadczeniach zastosowano dwa rodzaje stali nierdzewnej typu 304: pierwszą - gładką, o współczynniku chropowatości: $R_z = 1,2 \mu\text{m}$ i drugą – w równoległe rysy, o współczynniku chropowatości $R_z = 7,4 \mu\text{m}$. Chropowatość powierzchni stali nierdzewnej określono z wykorzystaniem laserowego mikroskopu skaningowego Nikon MA200m, przy powiększeniu 500x. Dla określenia różnic chropowatości badanych powierzchni stali, wykorzystano współczynnik R_z , jako parametr uniwersalny, rutynowo stosowany w praktyce inżynierskiej. Wybór materiałów podyktowany był faktem, iż są one powszechnie stosowane w przemyśle spożywczym, do konstrukcji urządzeń produkcyjnych.

Przechowywanie drobnoustrojów

Drobnoustroje przechowywano na podłożu płynnym TSB (bulion kazeinowo-sojowy) z dodatkiem glicerolu w temperaturze – 20°C. Do celów doświadczalnych drobnoustroje przeszczepiano na skosy z podłożem TSA (agar kazeinowo-sojowy) i inkubowano w temperaturze 30°C przez 24 h.

Przygotowanie powierzchni materiałów

Przed przystąpieniem do doświadczeń badane powierzchnie abiotyczne przygotowano według metodyki zaproponowanej przez Joseph i in. [2001]:

- Płytki ze stali nierdzewnej o wymiarach 5 x 5 x 0,1 cm przemywano acetonem, wytrawiano, w roztworze 5N HCl, następnie myto roztworem detergentu i spłukiwano wodą destylowaną. Po wysuszeniu płytki umieszczano w szklanym naczyniu i sterylizowano w autoklawie, w temperaturze 121°C przez 15 minut;
- Płytki z polipropylenu o wymiarach 5 x 5 x 0,3 cm myto roztworem detergentu i spłukiwano wodą destylowaną, a następnie sterylizowano w temperaturze 117°C przez 15 minut.

Tworzenie biofilmów bakteryjnych

Proces adhezji komórek do powierzchni polipropylenu i stali nierdzewnej, o różnej chropowatości monitorowano w warunkach hodowli modelowej. Badane powierzchnie abiotyczne umieszczano w sterylnych szalkach Petriego, zawierających 2 ml hodowli

drobnoustrojów, o gęstości 10^6 jtk/ml i 18 ml płynnej pożywki TSB, o dziesięciokrotnie zredukowanej zawartości składników odżywczych. Doświadczenie prowadzono w temperaturze 20°C przez 14 dni, w warunkach statycznych. Po 2, 4, 6, 16, 24, 48, 72, 168 i 336 godzinach inkubacji płytki ze stali nierdzewnej i polipropylenu wyjmowano i przemywano roztworem PBS (o pH 7,2), celem usunięcia komórek, nietrwale związanych z badanymi powierzchniami. Następnie określano ilość komórek w biofilmie metodą wymazu, pobierając próbki przy użyciu jałowych tamponów, które umieszczano następnie w butelkach, zawierających płyn płuczący i wytrząsano ok. 1 minuty. Po przygotowaniu serii dziesięciokrotnych rozcieńczeń wykonano posiew na płytki z podłożem stałym TSA. Posiewy inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godzin. Ogólną liczbę drobnoustrojów (L) na 1 cm^2 obliczono według wzoru:

$$L = (a \times b) / c$$

gdzie:

a – liczba drobnoustrojów w 1 ml zawiesiny wyjściowej

b – objętość zawiesiny wyjściowej

c – wielkość badanej powierzchni w cm^2

W trakcie prowadzenia hodowli, po każdych 48 godzinach inkubacji badane materiały wyjmowano, przemywano roztworem PBS i przenoszono, z zachowaniem warunków aseptycznych do sterylnych szalek Petriego, ze świeżym podłożem płynnym. Czynność ta, miała na celu zachowanie rosnących bakterii tylko na badanych płaszczyznach, a nie w ich otoczeniu. Badania tworzenia biofilmów na powierzchniach abiotycznych przeprowadzono w warunkach, które miały stanowić pewną symulację środowiska, panującego na powierzchniach produkcyjnych, po procesach mycia i dezynfekcji.

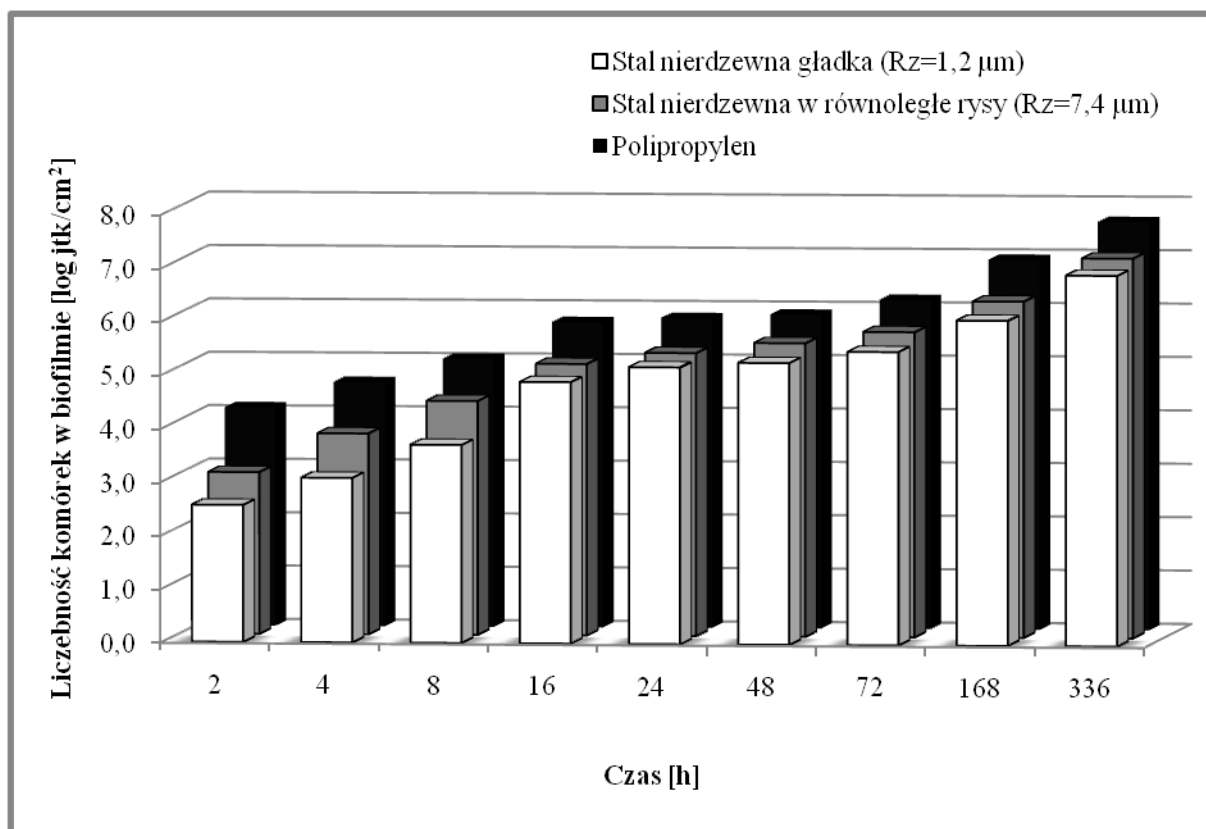
Każdy wariant eksperymentu powtórzono trzykrotnie. W celu stwierdzenia różnic w liczebności komórek w błonach biologicznych, tworzonych na trzech powierzchniach, uzyskane wyniki badań poddawano analizie statystycznej, z wykorzystaniem jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA w programie *Statistica 6,0* (PL).

Efektywność tworzenia biofilmów bakteryjnych na płytkach ze stali nierdzewnej gładkiej, o współczynniku chropowatości $R_z = 1,2\ \mu\text{m}$, oceniano również przy użyciu mikroskopu skaningowo - elektronowego (Hitachi 3000N).

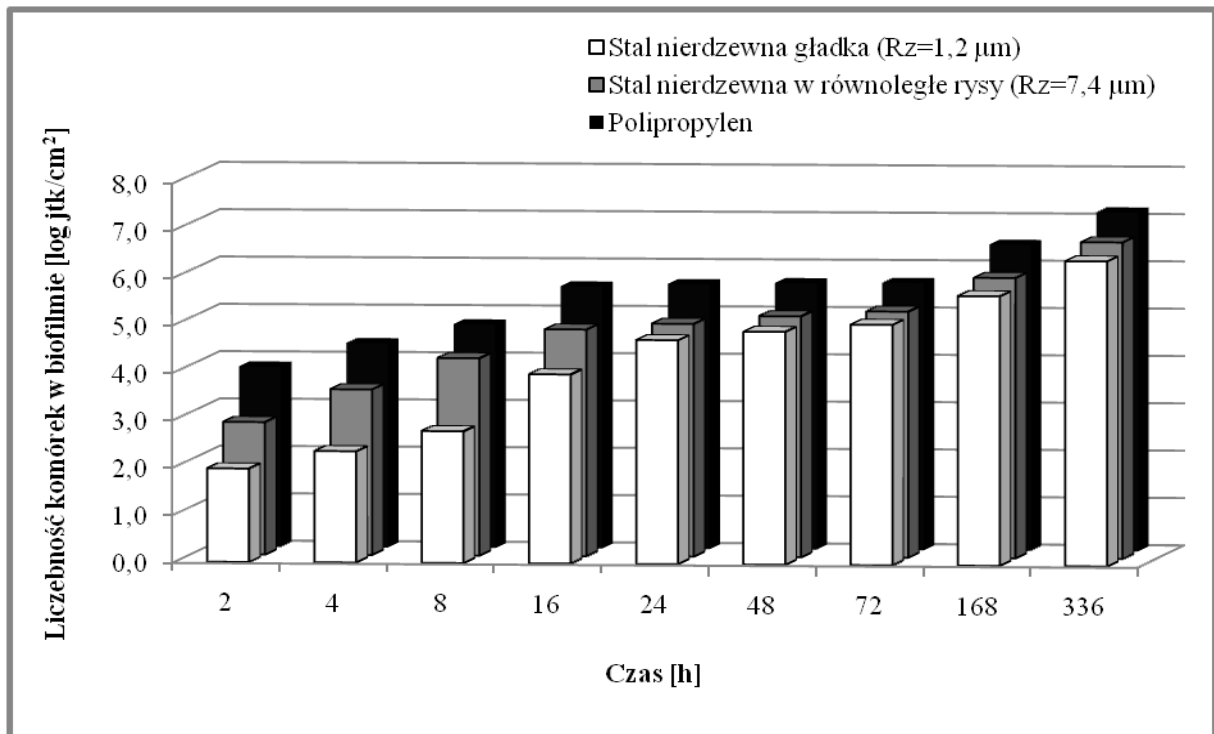
WYNIKI I DYSKUSJA

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że zdolność do tworzenia biofilmu na zastosowanych płaszczyznach (polipropylen, stal nierdzewna typu 304) wykazywały cztery, spośród pięciu badanych drobnoustrojów: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas putida*, *Staphylococcus hominis* i *Listeria innocua* (rys. 1 - 4). Bakteria *Enterobacter cloacae* nie tworzyła biofilmu na żadnej z badanych powierzchni. Po 48 godzinach hodowli izolowano z płaszczyzn tylko nieliczne, pojedyncze komórki tego drobnoustroju.

Można to wytłumaczyć faktem, iż niektóre drobnoustroje nie ulegają adhezji, jeżeli są użyte w czystych kulturach, natomiast w hodowlach mieszanych obserwuje się znaczącą ich adhezję, co świadczy, że włączają się w już istniejący biofilm. Obecność populacji mieszanych w środowisku może przyspieszać proces adhezji, a także powodować przyczepianie się komórek, które same nie posiadają takich uzdolnień [Bagge i in. 2001, Czaczyk 2004].

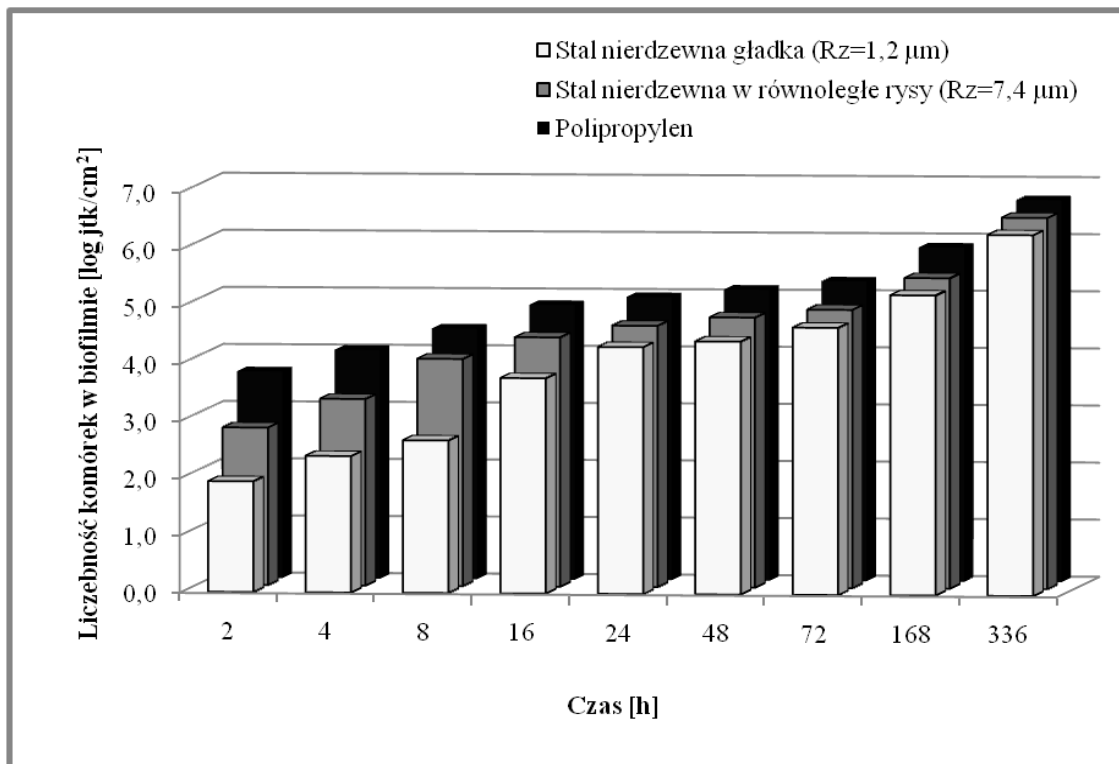


Rysunek 1. Liczebność komórek *Micrococcus luteus* w biofilmie na powierzchniach abiotycznych
The amount of cells Micrococcus luteus in biofilm on abiotic surfaces



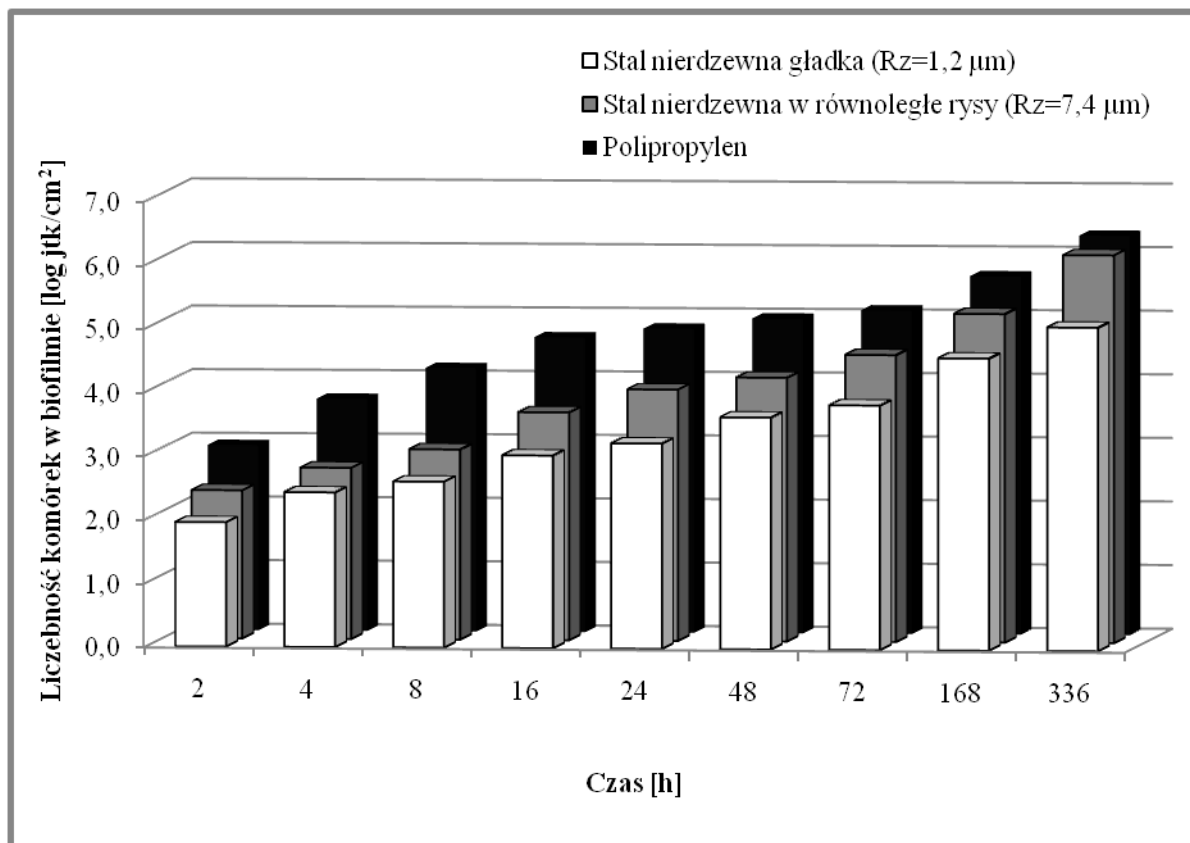
Rysunek 2. Liczebność komórek *Pseudomonas putida* w biofilmie na powierzchniach abiotycznych

The amount of cells Pseudomonas putida in biofilm on abiotic surfaces



Rysunek 3. Liczebność komórek *Staphylococcus hominis* w biofilmie na powierzchniach abiotycznych

The amount of cells Staphylococcus hominis in biofilm on abiotic surfaces



Rysunek 4. Liczebność komórek *Listeria innocua* w biofilmie na powierzchniach abiotycznych
The amount of cells Listeria innocua in biofilm on abiotic surfaces

Analizując zjawisko tworzenia biofilmów na badanych powierzchniach abiotycznych, można zauważyć, że już w czasie pierwszych dwóch godzin inkubacji, znacząca ilość bakterii, ulegała trwałemu związaniu z badanymi płaszczyznami (polipropylen, stal nierdzewna 304 ($R_z = 1,2 \mu\text{m}$ i $R_z = 7,4 \mu\text{m}$). Proces tworzenia biofilmu przebiegał najintensywniej w czasie pierwszych 24 godzin inkubacji. W trakcie kolejnych 312 godzin doświadczenia, liczba bakterii w błonach biologicznych wzrastała już w mniejszym stopniu. Podobne spostrzeżenia odnotowali Olsson i Krasse [1996], stwierdzając skupiska mikrokolonii *Staphylococcus epidermidis* na powierzchni biomateriałów, już po dwugodzinnej inkubacji, natomiast po 24 godzinach, obecność dojrzałego biofilmu. Zgodnie z ogólnie przyjętą zasadą, aby zapobiec tworzeniu błon biologicznych, zabiegi mycia i dezynfekcji powierzchni użytkowych powinny być wykonywane, co 8 godzin [Poulsen, 1999; Pontefract, 1991]. W praktyce przemysłowej, procedury higieniczne często przeprowadzane są z dużo mniejszą częstotliwością: raz na 24 godziny, raz na tydzień, a zdarza się, że raz na kilka tygodni, co jest związane z przerwami pomiędzy poszczególnymi cyklami produkcji. Ze względów praktycznych i ekonomicznych w zakładach przemysłu

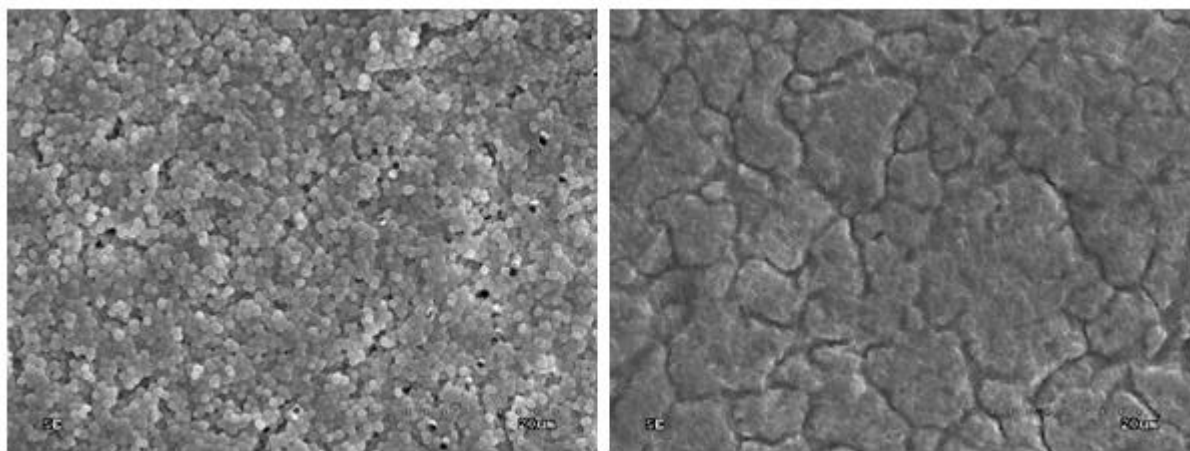
spożywczego niemożliwe jest wykonywanie kompleksowych zabiegów higienicznych z częstotliwością, zapobiegającą tworzeniu się biofilmów. Istnieje, więc potrzeba poszukiwania nowych skutecznych metod zapobiegania rozwojowi biofilmów, a także usuwania ich z powierzchni użytkowych, z użyciem efektywnie działających środków chemicznych.

W przeprowadzonych badaniach dynamika tworzenia biofilmu była zróżnicowana w zależności od rodzaju powierzchni. Najszybciej i najefektywniej zasiedlany był polipropylen, szczególnie w pierwszych 2-4 godzinach hodowli. Adhezja do tej powierzchni była, średnio o 0,7 log jtk/cm² większa, w stosunku do stali nierdzewnej, o wyższym współczynniku chropowatości ($R_z = 7,4 \mu\text{m}$) i o 2,0 log jtk/cm² większa, w stosunku do stali gładkiej ($R_z = 1,2 \mu\text{m}$). Podobne rezultaty uzyskali Ingham i in. [2006], badając zjawisko tworzenia biofilmu przez *Streptococcus pyogenes* na różnych powierzchniach użytkowych. Spostrzeżenia te dowodzą, iż powierzchnia polipropylenu, sprzyja w większym stopniu procesom adhezji i tworzeniu biofilmów, niż płaszczyzny ze stali nierdzewnej, co powinno być uwzględnione podczas projektowania linii technologicznych.

Aby określić wpływ chropowatości powierzchni stali nierdzewnej, na kinetykę tworzenia biofilmu, w badaniach wykorzystano dwa rodzaje stalowych płytek 304 ($R_z = 7,4 \mu\text{m}$) i 304 ($R_z = 1,2 \mu\text{m}$), różniących się strukturą i wartością współczynnika chropowatości. Analizując liczebność komórek w biofilmach, utworzonych na dwóch powierzchniach stali nierdzewnej, zauważono różnice, głównie w czasie pierwszych godzin inkubacji. Komórki drobnoustrojów adherowały efektywniej do powierzchni stali, o większej chropowatości, w pierwszej dobie prowadzenia eksperymentu, po czym liczba drobnoustrojów w biofilmie, na obu powierzchniach stali kształtowała się na zbliżonym poziomie. Powyższe wyniki, dowodzą i jednocześnie potwierdzają doniesienia niektórych autorów, że chropowatość powierzchni abiotycznych odgrywa istotną rolę w początkowych etapach adhezji, w mniejszym stopniu natomiast wpływa na liczebność komórek w dojrzałym biofilmie. Charakterystyczne dla użytej w badaniach stali nierdzewnej typu 304 równoległe rysy oraz wartość współczynnika chropowatości powierzchni $R_z = 7,4 \mu\text{m}$, sprzyjały adhezji komórek, zwłaszcza tych, o mniejszych rozmiarach (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus hominis*, *Pseudomonas putida*), które zakotwicząc się w nierównościach i szczelinach szybciej formowały błony biologiczne. Zdaniem Lappin-Scot i Bass [2001], każda szczelina zwiększa prawdopodobieństwo kontaktu komórki z powierzchnią stałą. Ponadto, struktura taka nastęrcza większych trudności w usuwaniu komórek z zasiedlanej płaszczyzny.

Należy wspomnieć, że nie ma jednoznacznego stanowiska wśród badaczy na temat wpływu chropowatości materiałów na proces adhezji. Kilku autorów wykazało wzrost adhezji drobnoustrojów wraz ze zwiększeniem się chropowatości powierzchni [Barnes i in. 1999, Han i in. 2000, Krysiński i in. 1992, Martinez, Casadevall, 2007]. Inni nie stwierdzili związku pomiędzy nierównościami powierzchni, a zdolnością bakterii do tworzenia biofilmu [Frank i Chmielewski 2001, Flint i in. 2000, Lewicki 2005, Mafu i in. 1990]. Powodem braku różnic, może być fakt, że autorzy zastosowali w badaniach powierzchnie, o stosunkowo niskich i zbliżonych do siebie współczynnikach chropowatości $R_z (< 1 \mu\text{m})$.

Przeprowadzona w ramach prezentowanej pracy analiza mikroskopowa (SEM) płaszczyzn stali nierdzewnej typu 304 ($R_z = 1,2 \mu\text{m}$) potwierdziła, obecność komórek wszystkich badanych bakterii, trwale związanych z tym materiałem. Ujawnienie obecności biofilmu, przy użyciu skaningowego mikroskopu elektronowego, na powierzchni stali gładkiej, najslabiej kolonizowanej przez badane bakterie, było jednocześnie potwierdzeniem istnienia błon biologicznych na pozostałych płaszczyznach tzn.: stali typu 304 ($R_z = 7,4 \mu\text{m}$) i polipropylenie, efektywniej zasiedlanych przez drobnoustroje. Przykładowe obrazy biofilmu zamieszczono na rysunku 5.



A

B

Rysunek 5. Biofilm na stali nierdzewnej typ 304 – B ($R_z=1,2 \mu\text{m}$) po 7 dniach inkubacji w 20^0C (SEM): A - *Micrococcus luteus*, B -*Pseudomonas putida*
*Biofilm on stainless steel type 304 – B ($R_z=1,2 \mu\text{m}$) after 7 days of incubation in 20^0C (SEM): A - *Micrococcus luteus*, B -*Pseudomonas putida**

WNIOSKI

1. Drobnoustroje, wyizolowane z linii technologicznych wykazują zdolność tworzenia biofilmu na powierzchniach polipropylenu oraz stali nierdzewnej typu 304, o różnej strukturze i współczynniku chropowatości ($R_z=1,2 \mu\text{m}$; $R_z=7,4 \mu\text{m}$).
2. Hydrofobowy charakter powierzchni polipropylenu oraz chropowatość stali, na poziomie $R_z = 7,4 \mu\text{m}$ sprzyja osadzaniu się drobnoustrojów i tworzeniu błon biologicznych, w przeciwieństwie do stali nierdzewnej, o niskim współczynniku chropowatości ($R_z = 1,2 \mu\text{m}$).
3. Najsilniej powierzchnie abiotyczne kolonizował *Micrococcus luteus* najslabiej zaś, *Listeria innocua*.
4. Częstotliwość zabiegów higienicznych w zakładach produkcyjnych powinna uwzględniać fakt szybkiego tworzenia się biofilmu w czasie pierwszych 24 godzin.

PIŚMIENNICTWO

- 1 Bagge D., Hjelm M., Johansen C., Huber I., Gram L. (2001). *Shewanella putrefaciens* adhesion and biofilm formation on food processing surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67 (5), 2319-2325
- 2 Barnes L.M., Lo M.F., Adams M.R., Chamberlain A.H.L. (1999). Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65 (10), 4543-4548
- 3 Carpentier B., Cerf O. (1993). Biofilm and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J. Appl. Bacteriol.*, 75, 499-511
- 4 Cunliffe D., Smart C.A., Alexander R.C., Vulfson E.N. (1999). Bacterial adhesion of synthetic surface. *Appl. Environ. Microbiol.*, 11, 4995-5002
- 5 Czaczyk K. (2004). Czynniki warunkujące adhezję drobnoustrojów do powierzchni abiotycznych. *Post. Mikrobiol.*, 43, 267-283
- 6 Czaczyk K. (2005). Adhezja mikroorganizmów do powierzchni stykających się z żywnością. *Przem. Spoż.*, 2, 28-31
- 7 Flint S.H., Brooks J.D., Bremer P.J. (2000). Properties of the stainless steel substrate influencing the adhesion of thermo-resistant streptococci. *J. Food Eng.*, 43, 235-242
- 8 Frank J.F., Chmielewski R., (2001). Influence of surface finish on the cleanability of stainless steel. *J. Food. Prot.*, 64 (8), 1178-1182
- 9 Han Y., Sherman D.M., Linton R.H., Nielsen S.S., Nelson P.E. (2000). The effect of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green paper surfaces. *Food Microbiol.*, 17, 521-533
- 10 Ingham S.C., Wadhwa R.K., Chun-Him Chu, DeVitta M. (2006). Survival of *Streptococcus pyogenes* on foods and food contact surfaces. *J. Food Prot.*, 69 (5), 1159-1163
- 11 Joseph B., Otta S.K., Karumasagar I. (2001). Biofilm formation by *Salmonella* spp.

- on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.*, 64, 367-372
- 12 Krysiński E.P., Brown L.J., Marchisello T.J. (1992). Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. *J. Food Prot.*, 55, 246-251
 - 13 appin-Scott H.M., Bass C. (2001) Biofilm formation: Attachment, growth and detachment of microbes from surfaces. *Am. J. Infect. Control.*, 29(4), 250-251
 - 14 Lewicki P.P. (2005). Mycie maszyn i urządzeń w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 2, 24-34
 - 15 Lewicki P.P. 2006. Skuteczność procesów mycia w przemyśle spożywczym. *Przem. Spoż.*, 2, 26
 - 16 Mafu A.A., Roy D., Goulet J., Magny P. (1990). Attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel, glass, polypropylene and rubber surfaces after short contact times. *J. Food. Prot.*, 53, 742-746
 - 17 Martinez L.R., Casadevall A. (2007). *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold and UV light. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73 (14), 4592-4601
 - 18 Nikolaev Y.A., Plakunov V.K. (2007). Biofilm-“city of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology.*, 76 (2), 125-138
 - 19 Nowak A., Piątkiewicz A. (2008). Mikrobiologiczne psucie żywności. W: *Mikrobiologia techniczna*. Warszawa: PWN Press
 - 20 Olsson J., Krasse B. (1996). A method for studying adherence of oral streptococci to solid surfaces. *Scand. J. Dent. Res.*, 84, 20-28
 - 21 Pontefract R.D. (1991). Bacterial adherence: its consequences in food processing. *Can. Inst. Food Sci. Technol.*, 24, 113-117
 - 22 Poulsen L.V. (1999). Microbial biofilm in food processing. *Lebensm.-Wiss.-Technol.*, 32, 321-326
 - 23 Pyć K.W. (2008). Elementy urządzeń jako źródło zanieczyszczeń mikrobiologicznych w przemyśle. W: *Mikrobiologia techniczna*. Warszawa: PWN Press