

דו"ח מדעי בנושא:

פיתוח טכנולוגיה אנטימיקרוביאלית חדשנית למניעת התבססות חיידקים על משטחי עבודה במערכות המשמשות את משק החלב.
מספר הזיהוי: 18-0307-421

שמות החוקרים בקבוצת המחקר:

ד"ר משה שמש, המחלקה לחקר איכות מזון ובטיחותו, מינהל המחקר החקלאי, מכון וולקני (עובד תקן). תחום מחקר: מיקרוביולוגיה של מזון.
פרופ' מיטל רכס, המכון לכימיה, האוניברסיטה העברית בירושלים. תחום מחקר: כימיה והנדסת חומרים.

התקציר

התבססות חיידקים במזון או על משטחי עבודה שבאים במגע עם המזון מהווה בעיה מיקרוביאלית קשה ונחשבת כאחד האתגרים הקשים ביותר של תעשיית המזון כיום. במהלך ההתבססות של חיידקים, נוצרות קהילות מורכבות של תאים שמכוסות במטריקס פולימרי הנקראות ביופילמים. לחיידקי הביופילם יש עמידות מוגברת בפני טיפולים אנטימיקרוביאליים הנערכים במהלך עיבוד ואחסון המזון. לפיכך, קיים צורך לפתח גישות חדשות, ידידותיות לאדם ולסביבה, לעיכוב היווצרות של ביופילמים במזון או במשטחי עבודה שבאים במגע עם המזון. מטרת המחקר הייתה לפתח משטחים המשלבים פפטידים אשר מונעים יצירת ביופילם על מנת לפגוע בהתבססות החיידקים במשטחים. תוצאות המחקר מצביעות כי הצלחנו לבנות משטחים הפוגעים בהיצמדות חיידקים על בסיס פלדה בלתי מחלידה על ידי טבילה של המשטחים בתמיסה של הפפטיד המונע הצמדות חיידקים למשטח. נבחנה יכולת של חיידקי הפסאודומונס (גרם שלילי) וחיידקי בצילוס (גרם חיובי) להיצמדות ויצירת הביופילם על משטח שעבר מודיפיקציה בפפטיד. מצאנו ירידה משמעותית ביכולת החיידקים ליצור ביופילמים על המשטח המצופה. בנוסף, הראינו כי המשטח המצופה משמר את הפעילות האנטימיקרוביאלית גם כאשר נחשף לחלב. כמוכן, תוצאות המחקר מצביעות כי למשטח המצופה אין השפעה על התכונות הטכנולוגיות של החלב מוצריו.

מבוא

למרות טכנולוגיות שימור מזון קיימות, נזקים מיקרוביאליים מהווים איום עיקרי לבטיחות ואיכות של תוצרת חקלאית ומזון. מיקרואורגניזמים עלולים לפגוע במרקם, בצבע, בריח או בטעם של מזון טרי ומעובד ולהביאו למצב שאינו ראוי לאכילה. נזקים אלו כוללים בדרך כלל פירוק של חלבונים, פחמימות ושומנים על ידי אנזימים שמיקרואורגניזמים מפרישים במזון. כיום, מעריכים כי כשליש מסה"כ המזון המיוצר נזרק בעיקר עקב נזקים מיקרוביאליים שונים. למרות תהליכי חיטוי וניקוי אגרסיביים, אשר נועדו להשמדת מיקרואורגניזמים הבאים במגע במזון במהלך עיבודו ו/או טיפולים אנטימיקרוביאליים לשימורו,

מתגלות לעיתים קבוצות של חיידקים המסוגלות לשרוד את התהליכים הללו ומסכנות את האיכות והבטיחות של המזון.

מיקרואורגניזמים המתבססים על משטחי עבודה (צנרת, מיכלים ואביזרי חליבה) ברפתות ובמחלבות מהווים בעיה חמורה בתחום איכות ובטיחות של חלב ומוצריו (Simoes *et al.*, 2010; Burgess *et al.*, 2010). משטחי העבודה בתעשיית החלב בנויים ממספר חומרים הבאים במגע עם העטין ועם החלב. החומרים העיקריים כוללים: פלדת אל חלד (פלב"מ), גומי, סיליקון וחומרים פלסטיים מורכבים. חיידקים המצויים בחלב גולמי נצמדים לשטח פני המשטחים במערכת החליבה. עיקר ההיצמדות מתחוללת כאשר המערכת נמצאת במצב סטטי. במערכת החליבה, החלב נמצא בדרך כלל בתהליך זרימה, עם הפסקות בין דבוקת פרות אחת לשנייה. חיידקים יכולים להיצמד בזמן הזרימה ובהפסקות אל דפנות הצנרת. לאחר היצמדות ראשונית למשטח, מתחיל תהליך התיישבות החיידקים ובניית ביופילם (O'Toole *et al.*, 2002; Stoodley *et al.*, 2007; Shemesh *et al.*, 2000). הפסקה זמנית בהזרמת החלב יכולה לעודד את התבססות החיידקים בביופילם כתוצאה מהעדר שטיפה. יצירת הביופילם מהווה מנגנון הישרדות, המגן על חיידקים ומאפשר את התרבותם בתנאי סביבה קשים, כגון זרימה טורבולנטית וחוסר במזון (Davey & O'Toole G, 2000). החיידקים בונים מטריקס פולימרי המכסה אותם ומקנה להם עמידות מוגברת בפני חומרים אנטימיקרוביאליים הנמצאים בחומרי החיטוי (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2002; Shemesh *et al.*, 2010a);

לפיכך, חיידקי הביופילם (תאים וגטטיביים ונבגים) במתקני החליבה מהווים מקור לזיהום מיקרוביאלי מתמשך שמהווה מצד אחד איום לבטיחות של חלב ומוצריו ומצד שני, גורם להקטנת אורך חיי המדף של המוצרים ע"י חיידקי קלקול (spoilage) (Bremer *et al.*, 2006; Mittelman, 1998). תהליך הפסטור משמיד את מרבית החיידקים הוגטטיביים בחלב, אולם אינו פוגע בנבגים. בנוסף לפגיעה אפשרית באיכות החלב, הזיהום המיקרוביאלי עלול לגרום לנזק כלכלי משמעותי עקב פגיעה בציוד החליבה. חיידקי הביופילם מקטלזים ריאקציות כימיות וביולוגיות הגורמות לקורוזיה מתכתית של הצנרת, המיכלים ואביזרי החליבה (Bremer *et al.*, 2006; Mittelman, 1998).

ביופילמים הנוצרים על משטחים הבאים במגע עם החלב כוללים, בין השאר, חיידקי בצילוס (*Bacillus*) ופסאודומונס (*Pseudomonas*) (Simoes *et al.*, 2010). חיידקים אלו מסוגלים להתרבות גם בטמפרטורות המקרר, לייצר אנזימים המפרקים את מרכיבי החלב ואף לייצר טוקסינים (Flint *et al.*, 2010; Simoes *et al.*, 1998; Mittelman, 1998). תופעות אלו מאיצות את קלקול מוצרי החלב וגורמות לנזק כלכלי.

חיידקי הבצילוס הם חיידקים גרם חיוביים יוצרי נבגים המהווים את המיקרופלורה הדומיננטית בביופילמים שנוצרים במערכות המשמשות את משק החלב (Sharma *et al.*, 2002). הביופילמים של בצילוס יכולים להכיל הן תאים וגטטיביים והן נבגים. כמות הנבגים עולה כאשר הביופילם חשוף לאוויר, מצב המתרחש בצנרת החלב במהלך הפסקות החליבה. פרסומים דיווחו שביופילם של בצילוס החשוף לאוויר מורכב בעיקר מנבגים (Wijman *et al.*, 2007), כלומר המטריקס הפולימרי של הביופילם משמש כמוקד להבשלת נבגים אשר עלולים להשתחרר ממנו ולגרום לזיהום מתמשך של סביבת הייצור. מכיוון

שהנבגים עמידים הרבה יותר מתאים ווגטיביים לטיפול בחומרי חיטוי הם יישארו במערכת החליבה, ישרדו את הטיפול התרמי (פסטור) ויזהמו את החלב.

חיידקי הפסאודומונס מהווים קבוצה נוספת של חיידקים בעייתיים בתעשיית החלב (Simoes *et al.*, 2010). חיידקים אלו מייצרים אנזימים ליפוליטיים ופרוטאוליטיים הגורמים לירידה משמעותית באיכות החלב ומוצריו. מרבית אנזימים אלה יכולים לשרוד את תהליך הפסטור הרגיל ואף את טיפול ה-UHT (ultra-high-temperature) ולגרום בכך לקיצור חיי המדף של מוצרי החלב. בנוסף, חיידקי פסאודומונס עלולים לפגוע (כמזהמים לאחר הפסטור) במוצרי החלב עקב התרבותם בטמפרטורות נמוכות (Dogan & Boor, 2003).

תהליך ההיצמדות למשטח הוא שלב התחלתי וחשוב להתיישבות של חיידקים והתפתחות הביופילם (Gristina, 1987; Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2007). התפתחות הביופילם מתחילה באינטראקציה של חיידק עם משטח הגורמת לשפעול גנים הדרושים להצמדות והתיישבות. בעבודה קודמת מצאנו כי לסוג המשטח יש השפעה מכרעת על היצמדות של חיידקי סטרפטוקוקוס למשטח ולהתפתחות הביופילם (Shemesh *et al.*, 2010b). בעזרת טכנולוגיית DNA-microarrays הראנו כי סוג המשטח משנה את פרופיל הביטוי הגני בחיידק וזיהינו את הגנים המתבטאים בצורה דיפרנציאלית בביופילים שנוצרו על משטחים שונים. בנוסף, מצאנו שרמתו של הסיגנל המופרש - Autoinducer-2, אשר משחק תפקיד חשוב בתקשורת בין חיידקית המשפיעה על יצירת הביופילם, משתנה בהתאם לסוג המשטח עליו נוצר הביופילם. תוצאות מחקר זה מובילות למסקנה שסוג המשטח קובע את פרופיל ביטוי גני בחיידק ורמת יצירת הביופילם (Shemesh *et al.*, 2010b).

מניעת היווצרות הביופילם היא הגישה המועדפת לטיפול בבעיה. אך עד עתה לא קיימת טכנולוגיה אשר תמנע לחלוטין היווצרות של ביופילם מבלי לגרום לתופעות לוואי בלתי רצויות. הגישות הקיימות להתמודד עם בעיית הביופילם מבוססות בעיקר על ניקוי וחיטוי יסודיים של מערכות החליבה לפני שהחיידקים מצליחים להתבסס בצורה משמעותית על המשטחים. מספר עבודות דיווחו על פיתוח חיישנים לזיהוי הביופילמים בשלבי התפתחות התחלתיים (Pereira *et al.*, 2008) במטרה לעכב את המשך התפתחותם. עבודות אחרות ניסו לזהות חומרים אשר אינם מאפשרים את היווצרות הביופילמים (Rogers *et al.*, 1994). בעבודה זו, נבדק עיכוב יצירת הביופילמים ע"י חומרים שונים, אך לא נמצא חומר אשר פגע בצורה משמעותית ביכולתם של החיידקים לבנות ביופילם (Rogers *et al.*, 1994). דווח גם על שילוב של חומרים אנטימיקרוביאליים בתוך ציפוי משטחים על מנת למנוע היווצרות הביופילם (Gottenbos *et al.*, 2002). עבודות אחרות דיווחו על שימוש בחומרים פעילי שטח כמעכבי היווצרות ביופילמים (Meylheuc *et al.*, 2006 Splendiani *et al.*, 2006). חומרים אלו משפיעים, ככל הנראה, על התפתחות השוטונים בחיידקים ובכך מעכבים היצמדות והיווצרות הביופילמים (Splendiani *et al.*, 2006).

למרות התקדמות מסוימת בנושא, טרם נמצא פתרון ממשי בטיפול בבעיית הביופילמים בתחום תעשיית החלב. לכן, יש צורך לפתח טכנולוגיה חדשה המונעת היווצרות הביופילם על ידי חיידקים הרלוונטיים לתעשיית החלב. בעבודה קודמת מצאנו שניתן להשתמש בציפויים סופר-הידרופוביים על מנת להנדס

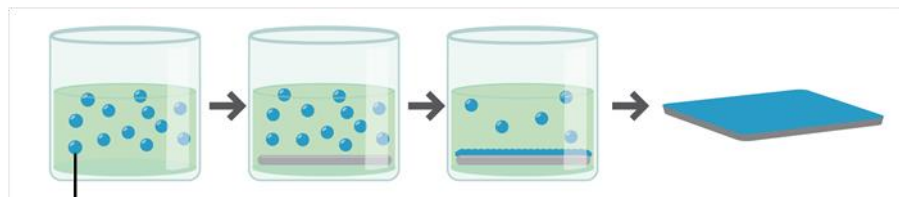
משטחים כך שימנעו היצמדות של חיידקים והיווצרות הביופילם (Pechook *et al.*, 2015). בעבודת המחקר הנוכחית, רצינו לפתח משטחים המשלבים פפטידים המונעים יצירת ביופילם על מנת לפגוע בהתבססות החיידקים במערכות המשמשות את משק החלב.

מטרות המחקר

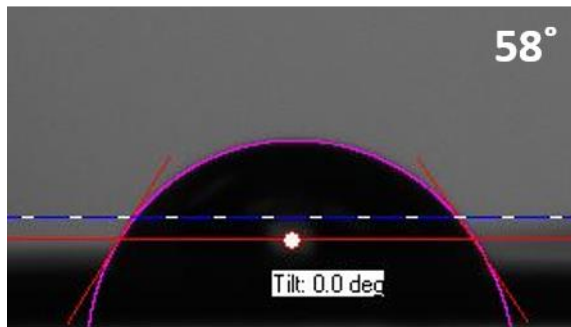
מטרת המחקר הכללית הינה פיתוח טכנולוגיה למניעת היצמדות והתבססות חיידקים על משטחי עבודה אשר באים במגע עם חלב ומוצריו. מטרה זו תושג באמצעות היעדים הספציפיים הבאים: (א) פיתוח משטחים המשלבים פפטידים העשויים למנוע יצירת ביופילם, (ב) בחינת יציבות המשטחים בנוכחות דוגמאות חלב ובצנרת החלב, (ג) אבחון פגיעה בהיצמדות החיידקים וביצירת הביופילם, (ד) בחינת השפעת המשטחים על איכות טכנולוגית של החלב ומוצריו, (ה) בחינת יעילות המשטחים כנגד ביופילם של תבדידי חיידקים המזהמים מערכות החליבה, (ו) בחינת יעילות המשטחים כנגד ביופילם פולימיקרוביאלי.

פירוט עיקרי הניסויים שבוצעו והתוצאות שהתקבלו

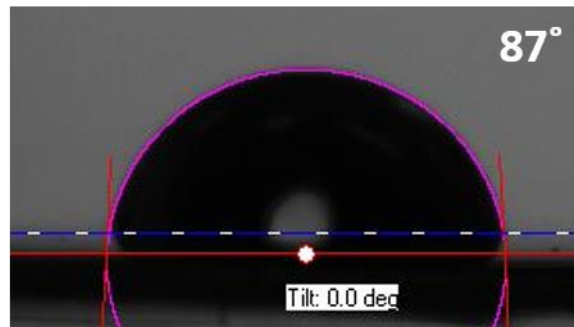
במטרה ליצור משטחים רלוונטים לתעשיית החלב אשר פוגעים ביכולת החיידקים להתיישב ולזהם את החלב, הצלחנו לבנות משטחים על בסיס פלדה בלתי מחלידה (SS 316) על ידי טבילה של המשטחים בתמיסה של הפפטיד (איור 1). המשטחים אופיינו על ידי מדידת זווית המגע של המשטח; הפפטיד משנה את אופי המשטח להידרופובי כך שזווית המגע של המשטח עולה (איור 2).



איור 1. הסכימה מתארת את תהליך הטבילה של המשטח בפפטיד אשר סונתז במעבדה ואשר פעילותם נבדקה. טבילה של משטח כלשהו בתמיסה המכילה את הפפטיד מובילה ליצירת ציפוי על המשטח.



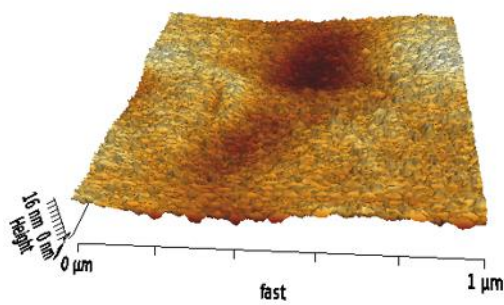
Bare substrate



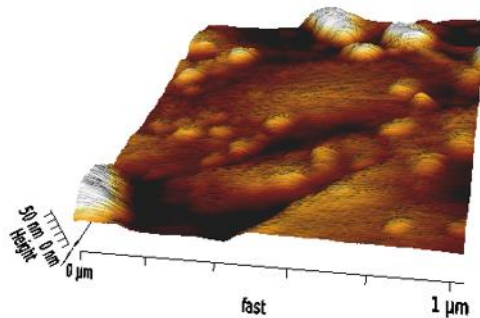
Peptide-coated substrate

איור 2. הציפוי משנה את תכונות פני השטח. זווית המגע הנוצרת בין טיפת המים לבין המשטח לא מצופה בפפטיד קטנה יותר מאשר זווית המגע הנוצרת בין טיפת המים לבין משטח מצופה בפפטיד.

בנוסף, נעשה מיפוי פני השטח באמצעות מיקרוסקופ אטומי סורק (AFM) לפני ואחרי הציפוי. המדידה הראתה כי טופוגרפיית פני השטח של המשטח עלתה ואיתה גם מידת החספוס הממוצעת שלו מערך של 1.8 nm, לערך של 2.8 nm (איור 3).



Bare substrate

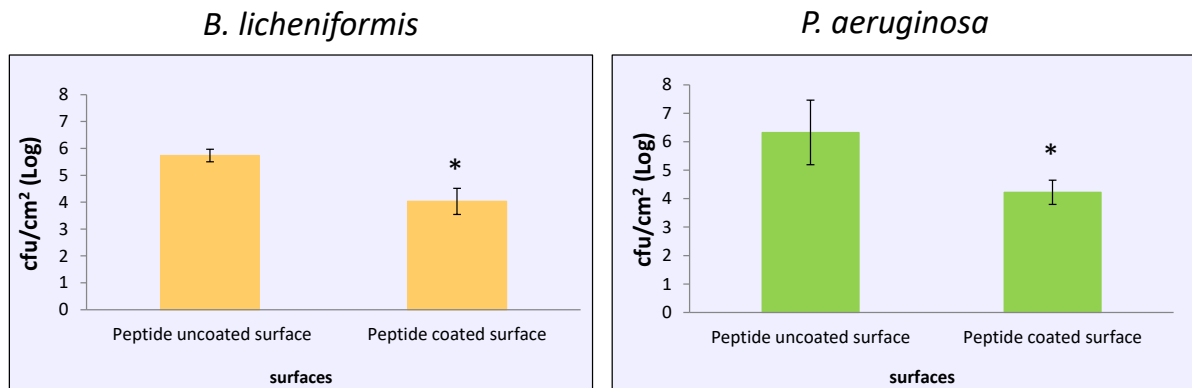


Peptide-coated substrate

איור 3. הציפוי משנה את פני השטח. משמאל משטח לא מצופה לעומת משטח מצופה בפפטיד (מימין) בעל פני שטח שונים ופחות אחידים.

בהמשך המחקר, נבחנה יכולת היצמדות של חיידקים שונים (הן גרם חיוביים והן גרם שליליים) לקראת היווצרות הביופילם במשטחים שעברו מודיפיקציה, בעזרת מערכת מודל שבה מוכנסים המשטחים באופן אספטי אל תוך צלחות פוליסטירן. יעילות עיכוב של יצירת הביופילם נקבעה ע"י אפיון כמותי (בעזרת ספירה חייה) של החיידקים הנצמדים למשטח ובנוסף ע"י אפיון מורפולוגי באמצעות צביעה פלואורסנטית ומיקרוסקופיה קונפוקלית.

מכיוון שישנה חשיבות רבה בהוכחת יעילות הטכנולוגיה במניעת התבססות של בידודי חיידקים המזהמים את מערכות החליבה, המשטח המצופה נבחן כנגד התבססות ביופילמים של חיידקי הבצילוס אשר בודדו מדגימות חלב נגוע. אחד התבדידים אשר זוהה כחיידקי *B. licheniformis* S127 מתאפיין כבעלי יכולת ליצור ביופילם קשה במיוחד (Ostrov et al. 2019). לכן, הוחלט לבחון את יכולת המשטח במניעת היווצרות הביופילם גם על ידי חיידק זה. כפי שניתן לראות באיור 4, מצאנו פגיעה משמעותית ביכולת החיידק ליצור ביופילם מפותח על המשטח המצופה עם הפפטיד.

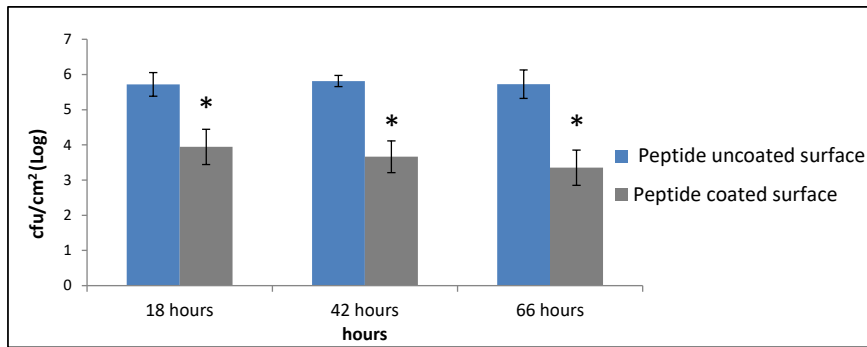


איור 4. המשטח SS-316 המצופה בפפטיד פוגע ביכולת חיידקי *Pseudomonas aeruginosa* PA14 ו-*B. licheniformis* S127 להיצמד למשטח ולבנות ביופילם. * ברמת המובהקות: $P\text{-value} < 0.05$.

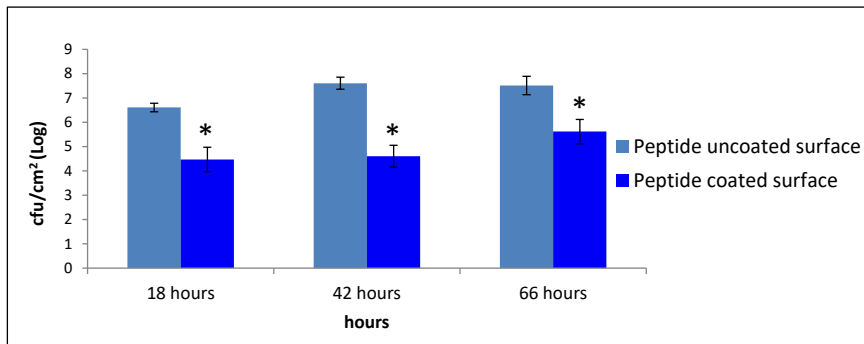
בהמשך, בדקנו האם הציפוי הפפטידי מסוגל למנוע את התפתחות הביופילם לאורך זמן. ככל שניתן לראות מאיור 5 החיידקים שנבדקו אינם מצליחים לבנות ביופילם במשטח מצופה בפפטיד בצורה יעילה לעומת הביקורת (משטח לא מצופה). הערכה כמותית שבוצעה ע"י החיידק בעזרת ספירה חיה ליצירת הביופילם מצביעה כי קיימת ירידה כשני סדרי גודל בכמות החיידקים כאשר המשטח מצופה בפפטיד (איור 5).

בנוסף, בוצעה הסתכלות בעזרת מיקרוסקופיה קונפוקלית על יכולת החיידקים ליצור ביופילם על המשטחים. ככל שניתן לראות מאיור 6, ישנה פגיעה קשה ביכולת החיידקים לבנות ביופילם במשטח מצופה.

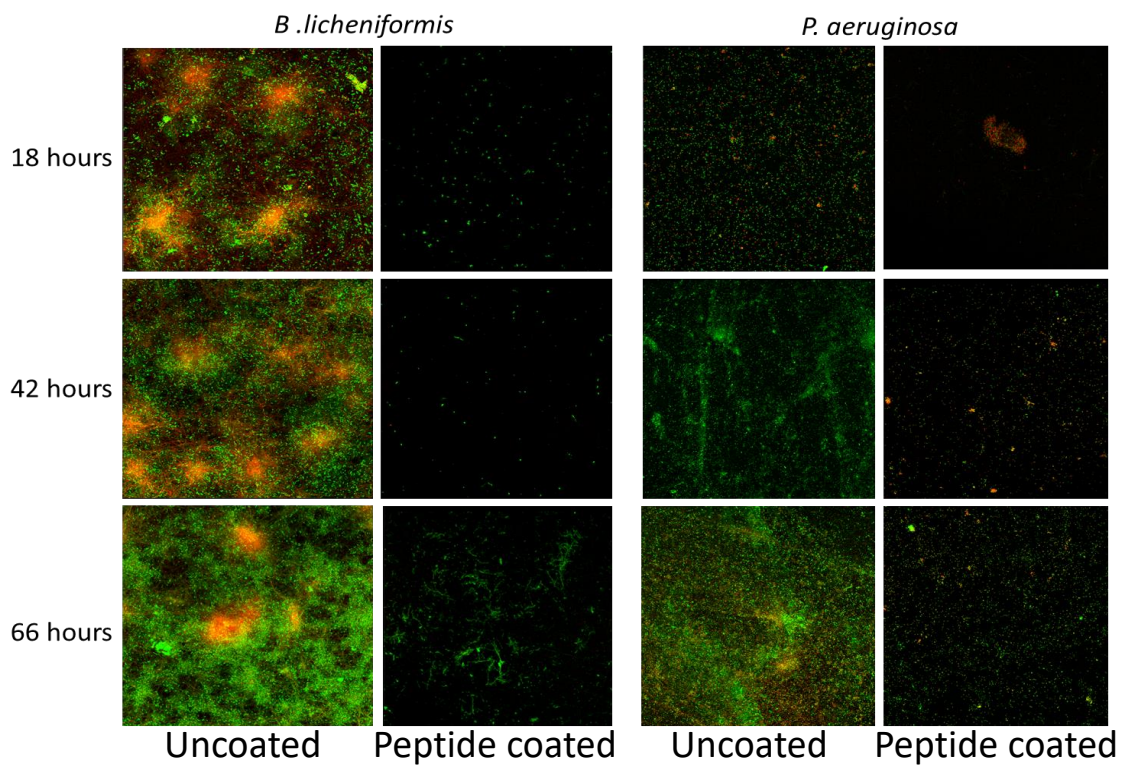
B. licheniformis:



P. aeruginosa:

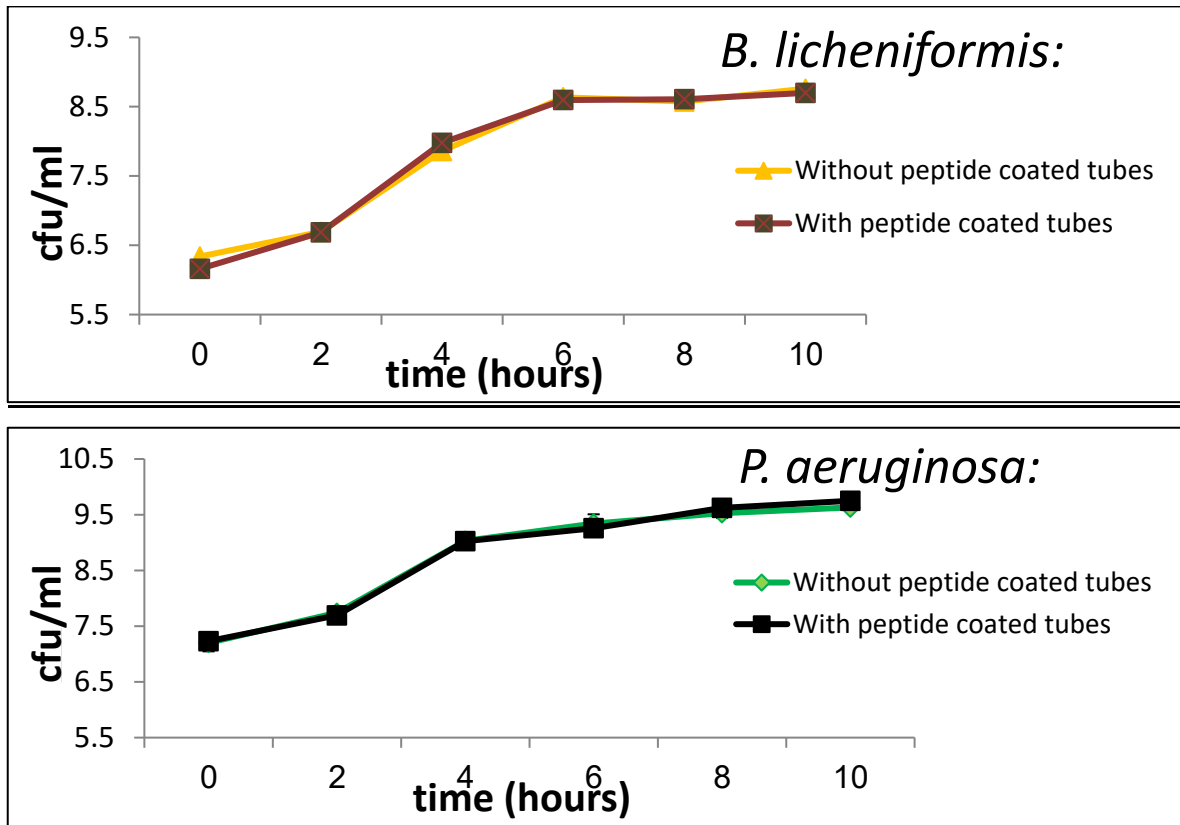


איור 5. המשטח SS-316 המצופה בפפטיד פוגע ביכול חיידקי הבצילוס ופסודומונאס להיצמד למשטח ולבנות ביופילם לאורך זמן (במשך מספר ימים). תוצאות אנליזת ספירה חייה לכימות החיידקים שנצמדו ויצרו ביופילם על משטח מצופה לעמת הלא מצופה. * ברמת המובהקות: $P\text{-value} < 0.05$.



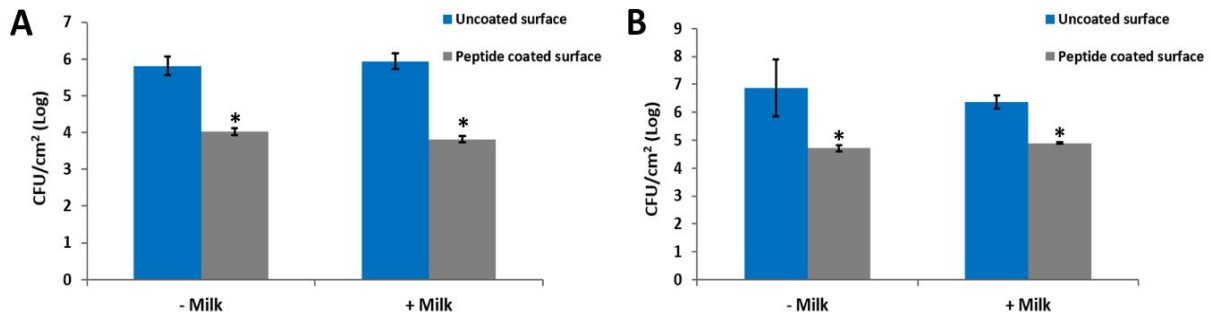
איור 6. המשטח SS-316 המצופה בפפטיד פוגע ביכול חיידקי הבצילוס ופסדומונס להיצמד למשטח ולבנות ביופילים לאורך זמן (במשך מספר ימים). תוצאות של אנליזת הביופילמים אשר נצבעו בצביעת LIVE/DEAD במיקרוסקופ קונפוקלי.

על מנת לבדוק את השפעת הציפוי הפפטידי על חיות החיידקים, הם גודלו בנוכחות ובעדר ציפוי פפטידי אשר לא כל כך השפיע על חיות החיידקים לאורך זמן (איור 7).



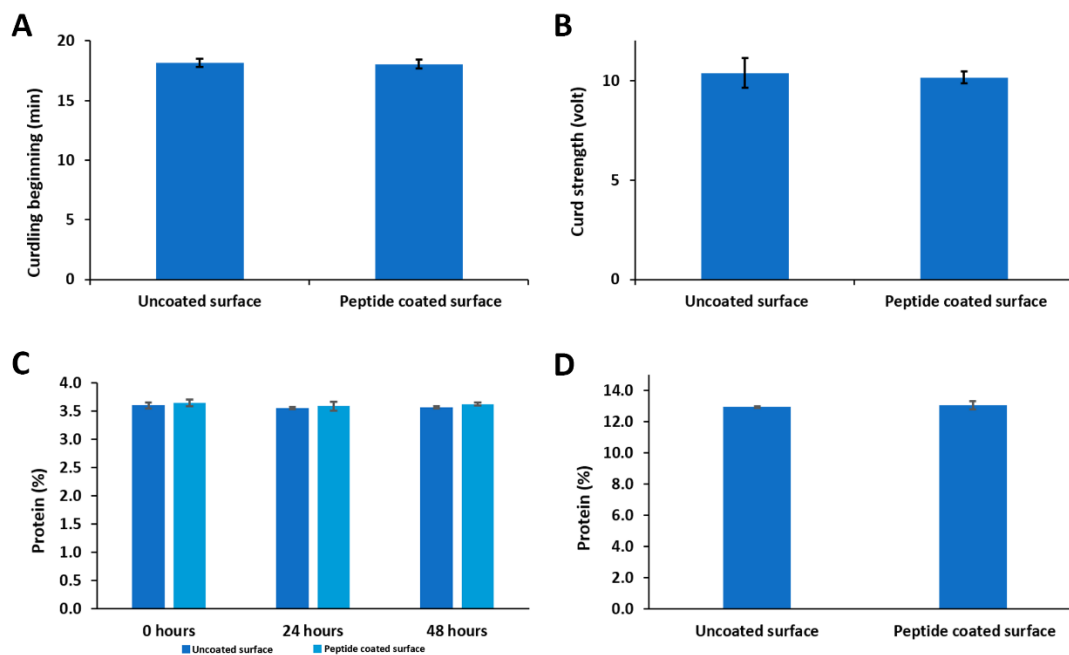
איור 7. השפעת הציפוי על חיות החיידקים. החיידקים גודלו בכלים שצופו בפפטיד לעומת ללא ציפוי במשך מספר שעות.

על מנת לבדוק כי הפעילות למניעת היווצרות הביופילים נשמרת גם לאחר מגע של המשטח המצופה עם החלב, נעשה מעקב אחרי היצמדות החיידקים על גבי המשטחים אשר נחשפו לחלב קודם לכן. כפי שניתן לראות מאיור 8, הפעילות כנגד היווצרות הביופילים נשמרה באופן מוחלט. תוצאה זו מצביעה על יכולת המשטח המצופה לשמר את הפעילות גם לאחר חשיפתו לחלב ומוצריו.



איור 8. המשטח המצופה משמר את יכולתו כנגד היווצרות הביופילם לאחר חשיפתו לחלב ע"י (A) חיידקים גרם חיוביים (*B. licheniformis*) ו-(B) חיידקים גרם שליליים (*P. aeruginosa*). * ברמת המובהקות: $P\text{-value} < 0.05$.

ולבסוף, רצינו לוודא שחשיפתו של החלב למשטח המצופה אינו פוגעת בתכונות הטכנולוגיות של החלב ומוצרו. כפי שניתן לראות מאיור 9, כמות החלבון בחלב ובגבינות אינה מושפעת כתוצאה מחשיפת החלב למשטח המצופה (איור 9 C ו-D). כמוכן, לא משתנה גם יכולת ההתגבנות של החלב בעקבות חשיפתו למשטח המצופה כפי שנבדק בעזרת מערכת האופטיגרף (איור 9 A ו-B).



איור 9. תכונות טכנולוגיות של החלב אינן נפגעות כתוצאה מחשיפתו למשטח המצופה. ציפוי המשטח אינו משפיע על: (A) קצב ההתגבנות, (B) חוזק הגבן, (C) כמות החלבון בחלב או (D) כמות החלבון בגבן.

- Bremer, P. J., Fillery, S. & McQuillan, A. J. (2006).** Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International journal of food microbiology* **106**, 254-262.
- Burgess, S. A., Lindsay, D. & Flint, S. H. (2010).** Thermophilic *bacilli* and their importance in dairy processing. *International journal of food microbiology* **144**, 215-225.
- Davey, M. E. & O'Toole G, A. (2000).** Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **64**, 847-867.
- Dogan, B. & Boor, K. J. (2003).** Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Applied and environmental microbiology* **69**, 130-138.
- Flint, S. H., Bremer, P. J. & Brooks, J. D. (1997).** Biofilms in dairy manufacturing plant - description, current concerns and methods of control. *Biofouling* **11**, 81-97.
- Gottenbos, B., van der Mei, H. C., Klatter, F., Nieuwenhuis, P. & Busscher, H. J. (2002).** *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activity of covalently coupled quaternary ammonium silane coatings on silicone rubber. *Biomaterials* **23**, 1417-1423.
- Gristina, A. G. (1987).** Biomaterial-centered infection: microbial adhesion versus tissue integration. *Science* **237**, 1588-1595.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. & Stoodley, P. (2004).** Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology* **2**, 95-108.
- Maity, S., Nir, S., Zada, T. & Reches, M. (2014).** Self-assembly of a tripeptide into a functional coating that resists fouling. *Chem Commun (Camb)*. **50**, 11154-11157.
- Meylheuc, T., Renault, M. & Bellon-Fontaine, M. N. (2006).** Adsorption of a biosurfactant on surfaces to enhance the disinfection of surfaces contaminated with *Listeria monocytogenes*. *International journal of food microbiology* **109**, 71-78.
- Mittelman, M. W. (1998).** Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. *Journal of dairy science* **81**, 2760-2764.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B. & Kolter, R. (2000).** Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology* **54**, 49-79.
- Ostrov, I., Sela, N., Belausov, E., Steinberg, D. & Shemesh, M. (2019).** Adaptation of *Bacillus* species to dairy associated environment facilitates their biofilm forming ability. *Food Microbiology* **82**, 316-324.

Palmer, J., Flint, S. & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* **34**, 577-588.

Pechook, S., Sudakov, K., Polishchuk, I., Ostrov, I., Zakin, V., Pokroy, B. & Shemesh, M. (2015). Bioinspired passive anti-biofouling surfaces preventing biofilm formation. *Journal of Materials Chemistry B*, **3**, 1371-1378.

Peng, J. S., Tsai, W. C. & Chou, C. C. (2002). Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. *Int J Food Microbiol* **77**, 11-18.

Pereira, A., Mendes, J & .Melo, L. F. (2008). Using nanovibrations to monitor biofouling. *Biotechnol Bioeng* **99**, 1407-1415.

Rogers, J., Dowsett, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V. & Keevil, C. W. (1994). Influence of plumbing materials on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems. *Appl Environ Microbiol* **60**, 1842-1851.

Sharma, M., & Anand, S. K. (2002). Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy industry - a case. *Food Control* **13**, 469-477.

Shemesh, M., Tam, A. & Steinberg, D. (2007). Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology* **153**, 1.307-1317

Shemesh, M., Kolter, R. & Losick, R. (2010a). The biocide chlorine dioxide stimulates biofilm formation in *Bacillus subtilis* by activation of the histidine kinase KinC. *J Bacteriol* **192**, 6352-6356.

Shemesh, M., Tam, A., Aharoni, R. & Steinberg ,D. (2010b). Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiol* **10**, 51.

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

Splendiani, A., Livingston, A. G. & Nicoletta, C. (2006). Control of membrane-attached biofilms using surfactants. *Biotechnology and bioengineering* **94**, 15-23.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187-209.

Wijman, J. G., de Leeuw, P. P., Moezelaar, R., Zwietering, M. H. & Abee, T. (2007). Air-liquid interface biofilms of *Bacillus cereus*: formation, sporulation, and dispersion. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1481-1488.

Reches M. (2014). Antifouling materials WO 2014118779 A1.
<http://www.google.com/patents/WO2014118779A1?cl=en>