



Ambalaje alimentare polimerice bioactive pe baza de PET reciclat

Dr Biol Alina Maria Holban

Noiembrie 2017



Cuprins

Introducere.....	pg 3
Materiale si metode	pg 5
Metode de obtinere.....	pg 5
Metode de caracterizare.....	pg 6
Evaluarea efectului antimicrobian.....	pg 7
Evaluarea toxicitatii in vitro.....	pg 8
Rezultate si discutii.....	pg 9
Caracterizarea fizico-chimica.....	pg 10
Evaluarea efectului antimicrobian.....	pg 19
Evaluarea citotoxicitatii.....	pg 28
Concluzii	pg 30
Diseminarea rezultatelor cercetarii.....	pg 32
Bibliografie	pg 33

Ambalaje alimentare polimerice bioactive pe baza de PET reciclat

Introducere

Consumul global de materialele plastice ajunge la peste 200 de milioane de tone, cu o creștere anuală de aproximativ 5%. Industria maselor plastice prezintă o importanță deosebită pentru industria de obținere și prelucrare a petrolului, pretul celor două tipuri de produse (mase plastic și petrol) influențându-se reciproc și afiandu-se într-o continuă creștere. În plus, anual sunt eliberate în mediu tone de mase plastic, în special din produse alimentare (alimente și băuturi), care constituie poluanți majori ai ecosistemelor terestre și acvatice, cu impact deosebit asupra calității vietii sistemelor biologice care populează aceste nișe.

În prezent, se urmărește identificarea și utilizarea unor materii prime alternative pentru fabricarea de ambalaje alimentare. În prezent, materialele plastice de origine petrochimică, cum ar fi tereftalat de polietilena (PET), clorura de polivinil (PVC), polietilena (PE), polipropilena (PP), polistiren (PS) și poliamida au un cost relativ scăzut și o bună performanță mecanică, precum rezistența la rupere, asigură o barieră eficientă pentru tranzitia unor substanțe gazoase, precum oxigenul, dioxidul de carbon, anhidrida și compusii aromatici derivați, asigură etanșeitate la căldură etcⁱ. Ambalajele plastice pot fi adesea contaminate cu alimente și diferite elemente biologice, astfel încât reciclarea acestor materiale este impracticabilă sau, de cele mai multe ori, nu este convenabilă din punct de vedere economic. Având în vedere că acumularea unor cantități mari din aceste materiale în mediu are consecințe ecologice grave și ireversibile, abordaile actuale se canalizează pe utilizarea unor strategii eficiente de reciclare sau pe înlocuirea acestor polimeri cu unii biodegradabiliⁱⁱ.

Polimerii termoplastici sunt materiale capabile să suferă deformații elastice atunci când se atinge o anumită temperatură, și să se solidifice după racire.

Tereftalatul de polietilena (sau poli (eten tereftalat)), PET, PETE sau PETP este cea mai comună răsină polimerică termoplastica din familia poliesterilor, fiind utilizat pentru obținerea de fibre pentru textile, îmbrăcăminte, producerea de containere/recipiente pentru băuturi și alimente, dar și în combinație cu fibră de sticlă pentru dezvoltarea de rășini tehnice.

Cea mai mare cantitate de PET produsa la nivel mondial este destinata producerii de fibre sintetice (peste 60%), urmata de producerea de recipient (sticle) pentru imbutelierea bauturilor, reprezentând aproximativ 30% din cantitatea mondialăⁱⁱⁱ. În contextul producerii de textile, PET este întâlnit sub denumirea de poliester, în timp ce acronimul PET este în general utilizat cand se face referire la ambalaje^{iv}.

PET poate fi produs din etilen glicol și dimetil tereftalat (DMT) ($C_6H_4(CO_2CH_3)_2$) sau acid tereftalic. Prima varianta implica o reacție de transesterificare, în timp ce a doua - o reacție de esterificare^v.

În 2016, s-a estimat că în fiecare an se produc 56 milioane de tone de PET. Cu toate ca majoritatea polimerilor termoplastici pot fi reciclați, reciclarea sticelor din PET este mult mai practică decât multi alti polimeri, datorită valorii ridicate a rășinii și a utilizării PET-ului pentru pe scară largă pentru imbutelierea apei și a băuturilor răcoritoare.

La nivel industrial PET fibrilar (poliester) poate fi reciclat pe două cai:

1. Reciclarea chimică a acidului tereftalic purificat și a etilenglicolului, în cazul în care structura polimerică este degradată complet sau la intermediari cum ar fi bis (2-hidroxietil) tereftalat;
2. Reciclarea mecanică în care proprietățile polimerului inițial sunt menținute sau reconstituite.

Recipientele pentru imbuteliat bauturi, constituite din PET, se reciclează de regulă prin tratament termic, la aprox. $280\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($536\text{ }^{\circ}\text{F}$), temperatură la care majoritatea contaminanților sunt degradati și pot rezulta diferiti produsi de degradare a acestora ce impurifica PET^{vi}.

Reciclarea PET în vederea obținerii de ambalaje alimentare este un concept intens investigat și de interes global. Principalele preocupări privind (bio)siguranța alimentelor în cazul utilizării materialelor reciclate pentru ambalaje care intră în contact cu alimentele se referă la: 1) contaminanții prezenti în materialul supus reciclarii, ce pot apărea în produsul final reciclat, și intra în contact cu alimentele; 2) componente ale materialului supus reciclarii pot să nu fie admisibile pentru utilizarea în contact cu alimentele, și 3) adjuvanții prezenti în plasticul reciclat nu respectă reglementările privind utilizarea (aplicarea) în contact cu alimentele^{vii}. În prezent se urmărește dezvoltarea unor ambalaje alimentare cu proprietăți imbunătățite, care să reducă rata de poluare a mediului (ex. precum cele care implica materiale reciclate), să asigure menținerea prospetimei alimentelor perioade indelungate de timp și să impiedice sau să reducă dezvoltarea contaminanților biologici (ex. microorganisme) responsabile de degradarea alimentelor, de

afectarea calitatii acestora si de aparitia de boli umane si animale (ex. infectii, toxii infectii, intoxiciatii etc)^{viii}.

Scopul acestui studiu a fost obtinerea si caracterizarea unor ambalaje alimentare pe baza de PET reciclat prin procedee chimice si electrospinning, cu proprietati biologice imbunatatite de evitare a contaminarii alimentelor.

Materiale si metode

1. Metode de obtinere

Obtinerea de filme (membrane) din PET reciclat prin tehnica electrospinning

Probele de PET au fost obtinute prin dizolvarea a 1g de PET intr-o soluție de 20 mL clorură de metilen și 2 mL acid trifluoroacetic. Soluția a fost omogenizată prin intermediul unui agitator magnetic.

Soluția de PET de concentrație 4.54% a fost depusă prin intermediul tehnicii Electrospinning pe folie de aluminiu.

Experimetul a fost realizat la 4 debite de depunere diferite: 10mL/h, 7.5mL/h, 5mL/h și 2.5mL/h. Iar parametrii aparatului pentru cele 4 depunerile au fost:

-output1: -5,73KV

-output2: 17.53KV

-încalzire: 0.6KW

-umiditate: 35%

-temperatură: 27°C

Probele obtinute in urma depunerii prin intermediul tehnicii Electrospinning au fost indepartate de pe folia de aluminiu și tăiate in sectiuni cu dimensiunea de 1cm x 1cm.

Probele au fost funcționalizate in 2 moduri la toate cele 4 debite menționate mai sus.

In primul caz, s-a adaugat un strat suplimentar de chitosan, iar in cel de-al doilea caz s-a adaugat un strat suplimentar de alginat, ulterior reticulat cu ioni de cupru.

Probele obtinute au fost notate astfel:

-PET@CS pentru probele cu chitosan, codul fiind urmat de debitul afferent obtinerii probei - 10mL/h, 7.5mL/h, 5mL/h și 2.5mL/h.

-PET@ALG_Cu pentru probele cu alginat de sodiu reticulat cu ioni de cupru, codul fiind urmat de debitul aferent obtinerii probei - 10mL/h, 7.5mL/h, 5mL/h și 2.5mL/h.

Obținerea de PET@CS

A fost obținută o soluție de CS de 2 % (prin dizolvarea a 2g de CS într-o soluție de 89 mL apa și 9 mL de acid acetic 1N sub agitare magnetică) în care au fost imersate probele și lăsate timp de 10 minute sub agitare magnetică. Ulterior probele au fost scoase din soluție, imersate într-o soluție de apă distilată pentru 10 secunde și ulterior lăsate la uscat în etuva timp de 7 ore la o temperatură de 40°C.

Obținerea de PET@ALG_Cu

Au fost preparate 2 soluții, soluția 1 de ALG 1% (prin dizolvarea a 1g de ALG în 99mL de H₂O) și soluția 2 de CuCl₂ 1% (prin dizolvarea a 1g de CuCl₂ în 99mL de H₂O). Probele au fost imersate în soluția de ALG unde au fost imersate timp de 10 minute sub agitare magnetică, iar apoi au fost transferate în soluția de CuCl₂ pentru încă 10 minute. Ulterior, probele au fost spălate cu apă distilată lăsate la uscat la temperatura camerei.

2. Metode de caracterizare

Microscopie Electronica de Baleiaj (SEM)

În scopul investigării morfologiei membranelor pe baza de PET reciclat, probele au fost introduse în incinta de analiză a unui microscop electronic de baleiaj achiziționat de la compania FEI (Oregon, Statele Unite ale Americii), imaginile obținute fiind realizate prin înregistrarea fasciculului de electroni secundari rezultat, cu energie de 30 keV.

Spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR)

Pentru investigarea integrității grupelor funcționale caracteristice materialelor obtinute, o cantitate redusă de suspensie a particulelor a fost analizată prin intermediul unui cristal de ZnSe al spectrometrului de tip FT-IR Nicolet 6700, achiziționat de la compania Thermo Nicolet (Wisconsin, Statele Unite ale Americii). Măsurările au fost efectuate la temperatura camerei, fiind efectuate 32 de scanări ale probei între 4000 și 600 cm⁻¹, la o rezoluție de 4 cm⁻¹.

Înregistrarea informațiilor astfel achiziționate a fost posibilă prin conectarea spectrometrului la o unitate de preluare și prelucrare a datelor, prin intermediul programului de lucru Omnic (versiunea 8.2 Thermo Nicolet).

3. Evaluarea efectului antimicrobian

Tulpinile utilizate pentru acest studiu: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*tulpina bacteriana model, Gram pozitiva*), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*tulpina bacteriana model, Gram negativa*), *Candida albicans* ATCC 10231 (*tulpina levurica model*) si *Aspergillus niger* ATCC 16888 (*tulpina microfungica*) au fost obtinute din colectia de tulpi a laboratorului de Microbiologie, Facultatea de Biologie, Universitatea din Bucuresti.

Cresterea microorganismelor planctonice (plutitoare) in prezența materialelor

Pentru testarea efectului materialelor obtinute asupra cresterii microorganismelor in mediu lichid (culturi planctonice), materialele obtinute au fost taiate la dimensiunile de 1cm/1cm si sterilizate prin expunere la radiatii UV timp de 30 min pe fiecare parte. Cate un fragment de material steril a fost depus individual intr-un godeu al unei placi cu 6 godeuri sterile. Peste materialele depuse, in godeuri s-au adaugat 2 mL mediu lichid (bullion simplu pentru bacterii si YPG lichid pentru levuri) si ulterior 20 μ L suspensie microbiana de densitate 0.5 McFarland (bacterii) sau 1McFarland (levuri), pregatita in AFS (apa fiziologica sterilă, sol NaCl 0,9%). Placile cu 6 godeuri astfel pregatite, au fost incubate la 37°C timp de 24h. Dupa expirarea timpului de incubare 200 μ L din suspensiile microbiene obtinute au fost trasferati in placi cu 96 dogeuri sterile si turbiditatea culturilor microbiene (absorbanta) a fost masurata spectrofotometric la 600nm.

Evaluarea aderentei si a formarii de biofilme

Pentru testarea efectului materialelor fibrilare obtinute asupra capacitatii de aderenta si a producerii de biofilme, materialele obtinute au fost taiate la dimensiunile de 1cm/1cm si sterilizate prin expunere la radiatii UV timp de 20 min pe fiecare parte. Cate un fragment de material steril a fost depus individual intr-un godeu al unei placi cu 6 godeuri sterile. Peste materialele depuse, in godeuri s-au adaugat 2 mL mediu lichid (bullion simplu) si ulterior 20 μ L suspensie microbiana de densitate 0.5 McFarland sau 1McFarland (levuri), pregatita in AFS (apa fiziologica sterilă, sol NaCl 0,9%). Placile cu 6 godeuri astfel pregatite, au fost incubate la 37°C timp de 24h. Dupa incubare materialele au fost spalate cu AFS si mediul a fost schimbat, pentru

dezvoltarea biofilmelor dezvoltate pe acestea. Placutele au fost incubate pentru diferite perioade de timp (24, 48 si respective 72h), pentru evidențierea capacității de aderență și formare de biofilme a microorganismelor. După expirarea fiecărei perioade de incubare luate în calcul, esantionul pe care s-a dezvoltat biofilmul a fost spălat cu AFS și depus într-un tub steril într-un mL AFS. Tubul a fost vortexat energetic timp de 30 sec și sonicat 10 sec pentru desprinderea celulelor din biofilm. Suspensia celulară obținută a fost diluată și diferite dilutii au fost insamantate pe placi cu mediu de cultură solidificat în vederea obținerii și cuantificării numărului de unități formatoare de colonii.

Evidențierea efectului antifungic

Pe suprafața mediului YPG agarizat repartizat în placi Petri ($\varnothing = 10$ cm) s-a însămânțat “în pânză” un inocul standardizat reprezentat de o suspensie sporală constituită din spori de *A. niger* în AFS suplimentat cu 1% Tween 80. În centrul fiecărei placute Petri inoculată în panza cu suspensia sporală s-a adăugat cale un fragment de material obținut (dimensiuni: 1cm/1cm, sterilizat în prealabil) și placutele s-au incubat la temperatură camerei timp de 4 săptămâni, cu inspectare săptamanală pentru observarea aspectului esantioanelor testate în prezenta culturilor fungice.

4. Evaluarea toxicității *in vitro*

Proliferarea celulară - metoda MTT (*Vybrant MTT cell Proliferation Assay kit, Molecular Probe*)

Pe baza acestei metode colorimetrice cantitative se permite aprecierea proliferării, viabilității și citotoxicității. Metoda se bazează pe reducerea unei sareuri de tetrazoliu galben MTT (bromura de 3-(4,5-dimetiltiazoliu)-2,5-difeniltetrazoliu) la formazan de culoare albastru-inchis. Reducerea realizată de enzime mitocondriale (în special succinat dehidrogenază) este un indicator al integrității celulare/mitocondriale. Formazanul insolubil în apă poate fi solubilizat cu izopropanol, dimetilsulfoxid sau alt solvent organic. Densitatea optică (DO) a formazanului solubilizat este evaluată spectrofotometric, obținându-se o funcție absorbanta-concentrație colorant-număr de celule active metabolic din cultură. Pentru aceasta metoda s-au utilizat celule AFSC (celule stem mezenchimale izolate din lichid amniotic), cultivate în placute cu 96 de godeuri, având o densitate de insamantare de 3000 celule /godeu în diferite condiții

experimentale in prezenta materialelor obtinute. Ulterior s-au adaugat 10 µl din solutie 12 mM MTT si s-a incubat la 37°C timp de 4 ore. Se adauga ulterior 100 µl solutie SDS-HCl, si se pipeteaza energetic pentru solubilizarea cristalelor de formazan. Se incubeaza 1 ora, apoi se pipeteaza pentru omogenizare si se elimina bulele pentru a nu interfiera cu citirea. Se citeste absorbanta la spectrofotometru la 570 nm (TECAN, Männedorf, Switzerland).

Evaluarea stresului oxidativ celular (GSH-Glo™ Glutathione Assay, Promega)

Celulele AFSC (celule stem mezenchimale izolate din lichid amniotic) se insamanteaza la o densitate de 3000 celule in 300 µl mediu de cultura DMEM suplimentat cu 10% ser fetal bovin si 1 % antibiotice (penicilina, streptomicina/neomicina) in placute cu 96 godeuri. La 24 de ore de la insamatare celulele se trateaza cu biomateriale. Stresul oxidativ a fost evaluat utilizand kitul GSH-Glo™ Glutathione Assay kit. Acest kit dozeaza cantitatea de glutation, un agent antioxidant. Glutationul produs de celule este transformat de glutation S-transferaza in glutation oxidat, cantitatea de glutation transformat fiind direct proportionala cu cantitatea de enzima glutation S-transferaza care transforma glutationul legat cu un precursor de luciferina in glutation oxidat legat cu luciferina care emite lumina. Cu cat lumina este mai intensa cu atat s-a transformat mai mult glutation, deci s-a sintetizat mai mult glutation, deci celula a fost mai stresata. Protocolul de lucru a constat in adaugarea a 100 µL 1X GSH-Glo™ Reagent si incubarea la 37°C timp de 30 de minute. Apoi s-au adaugat 100µl Luciferin Detection Reagent si s-a incubat la 37°C pentru inca 15 de minute. La finalul celor 15 min se omogenizeaza bine mediul din godeurile cu celule si apoi placuta se citeste la luminometru.

Rezultate si discutii

Contaminarea microbiana a alimentelor reprezinta un factor principal de risc asupra sanatatii consumatorilor dar si de degradare si scadere a calitatii produselor alimentare si a bauturilor. Contaminantii biologici ai produselor alimentare pot fi de origine bacteriana, virală, fungica sau parazitara. Cele mai frecvente specii microbiene implicate in contaminarea alimentelor sunt: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Clostridium Perfringens*, *Shigella* sp., *Campylobacter* sp., *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, si *Cryptosporidium* sp.^{ix}

In acest studiu s-a testat efectul antimicrobian al unor materiale polimerice pe baza de PET reciclat, chitosan, alginat si CuCl₂ obtinute prin electrospining, cu scopul de a dezvolta

ambalaje alimentare imbunatatite, care sa evite colonizarea cu microorganisme a alimentelor. Efectul antimicrobian al materialelor obtinute s-a testat pe specii microbiene bacteriene (*S. aureus* – specie Gram pozitiva; *P. aeruginosa* – specie Gram negativa) si microfungice model (*C. albicans* – levura, drojdie; *A. niger* – microfung), de importanta biomedicala dar si in industria alimentara^x.

Chitosanul este un polimer binecunoscut pentru proprietatile sale antimicrobiene, activitate observata asupra unui numar mare de microorganisme, atat sensibile cat si rezistente la antibiotice^{xi}. Cu toate ca mecanismul antimicrobian al chitosanului nu este pe deplin elucidat, in prezent este acceptata ideea conform careia anumite grupari incarcate electric de pe suprafata structurii polimerice a chitosanului interactioneaza cu diferite molecule constitutive ale peretelui celular bacterian. Aceasta interactie are ca rezultat hidroliza peptidoglicanului (component major al peretelui celular bacterian) si eliberarea ulterioara a continutului celular la exterior, determinand astfel moartea celulelor microbiene^{xii}.

Nanoparticulele de Cu, precum si clorura de Cu (CuCl_2), utilizata ca precursor in obtinerea nanoparticulelor, prezinta proprietati antimicrobiene dovedite stiintific. Cu toate ca mecanismele intime ale efectului antimicrobian nu se cunosc pe deplin, studiile recente sustin ca CuCl_2 determina moartea celulelor microbiene prin inducerea stresului oxidativ si realizarea de pori in membranele celulare^{xiii}.

Alginatul este un polimer natural cu numeroase aplicatii in domenii precum industria alimentara si biomedicala, fiind utilizat in numeroase studii ce au ca scop cresterea biocompatibilitatii diferitelor materiale de interes biomedical, sau pentru stabilizarea si eliberarea controlata a unor compusi cu potential efect bioactiv, inclusiv substante cu rol antimicrobian^{xiv}.

Caracterizarea fizico-chimica

In figura 1, 2 si 3 sunt prezentate principalele rezultate obtinute in cazul membranelor obtinute prin electrospining, membrane de tipul PET (reciclat, control), PET@CS si PET@ALG_Cu.

Fibrele sunt orientate aleatoriu si exista multe curburi de-a lungul axei fibrelor, care ar putea fi atribuite depunerii asincrone a diferitelor parti ale fibrelor din cauza propriei instabilitati, cum ar fi oscilatia nesimetrica.

Orientarea aleatoare a fibrelor se datorează forțelor electrostatice repulsive aduse datorită sarcinilor de suprafață induse. Tinând cont de faptul că s-a folosit colectorul rotativ pentru colectarea de fibre, există o orientare ușoară a alinierii fibrelor. Diametrul fiberelor este cuprins între 50 și 200 nm, dimensiunea variind în funcție de rapoartele masice utilizate, aşa cum se arată în imaginile SEM.

In cazul fibrelor PET@CS se observă aceeași morfologie fibroasă, suplimentar fibrele fiind acoperite de un strat de chitosan. De asemenea, din analiza imaginilor SEM pentru proba PET@CS se observă și un strat de chitosan depus pe suprafața membranei. Pentru analiză a fost necesară crearea unui defect pe suprafața membranei.

In cazul fibrelor de PET@ALG_Cu, rezultatele obținute în urma analizei SEM sunt similare cu cele obținute pentru PET@CS.

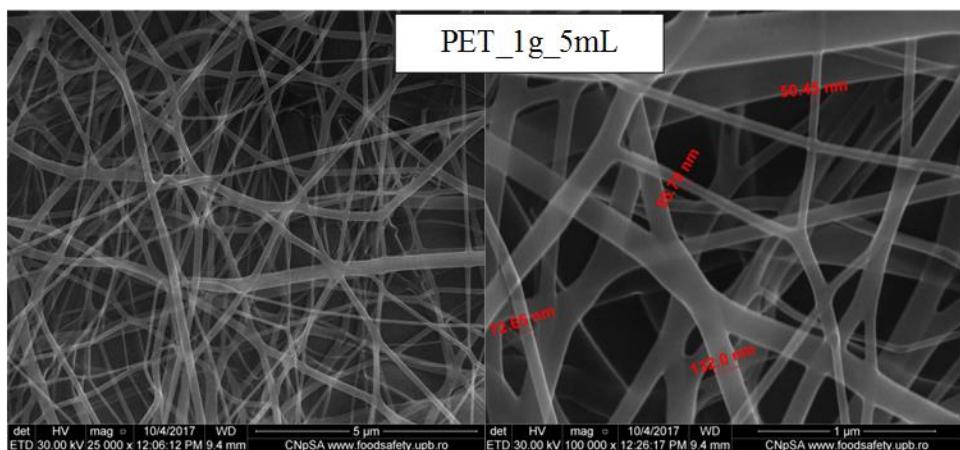
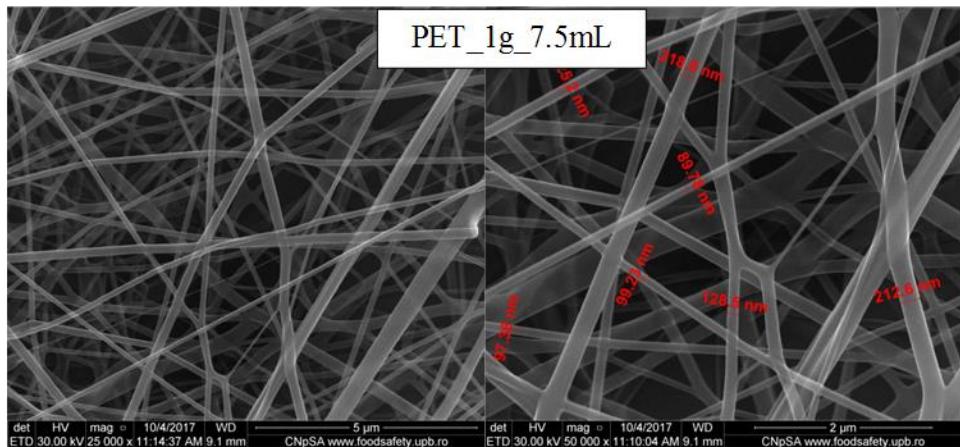
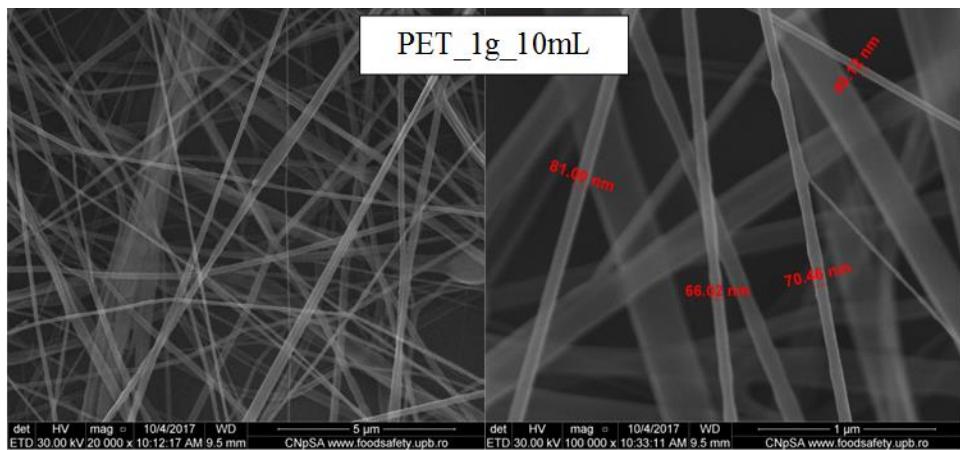
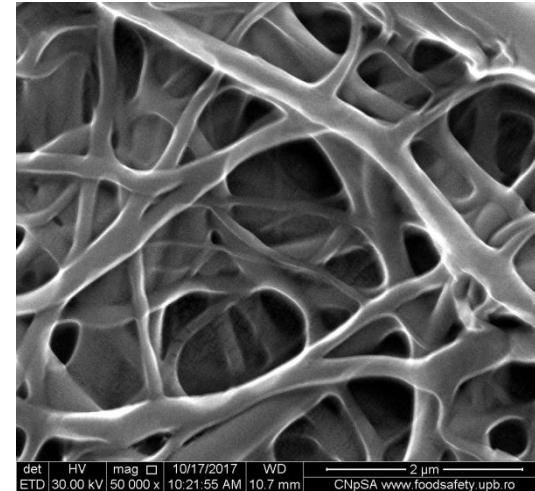
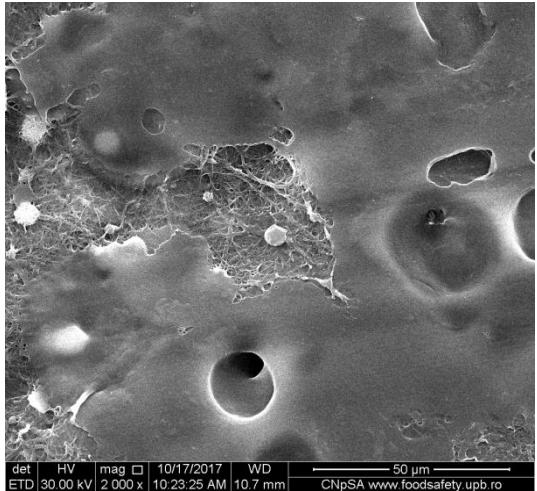
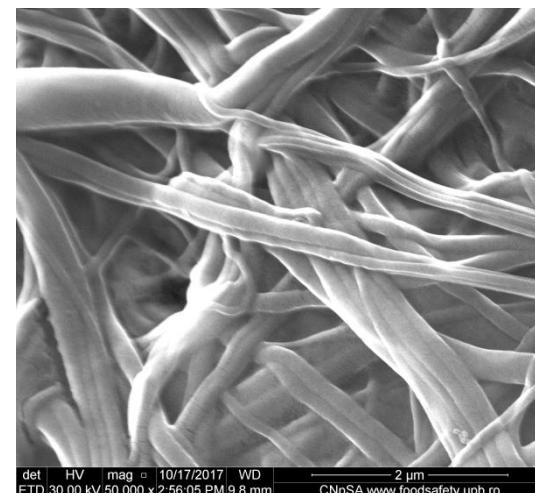
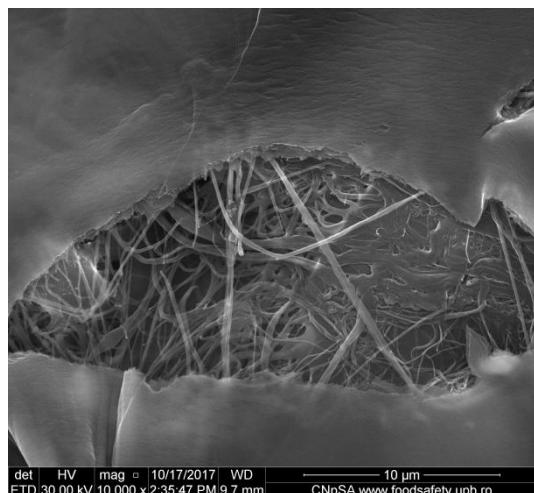
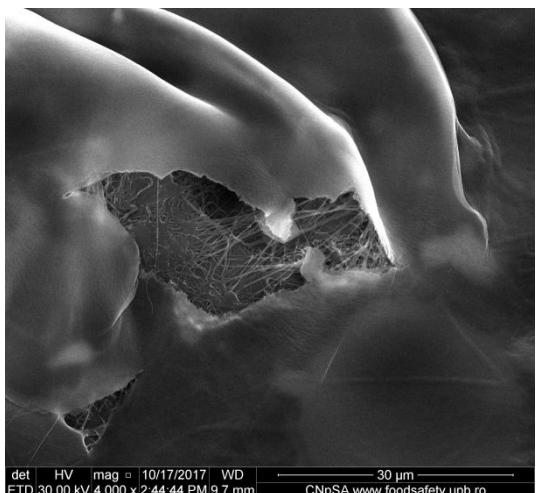


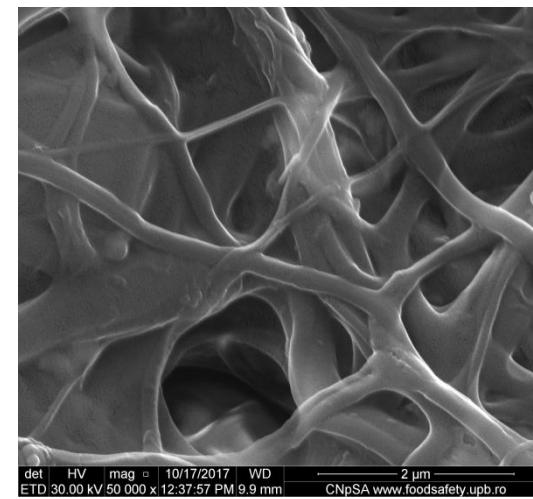
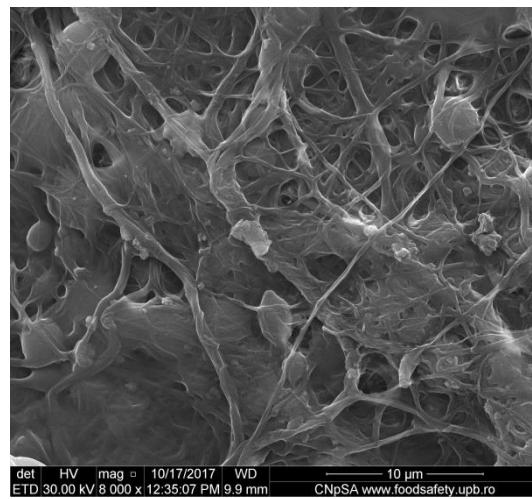
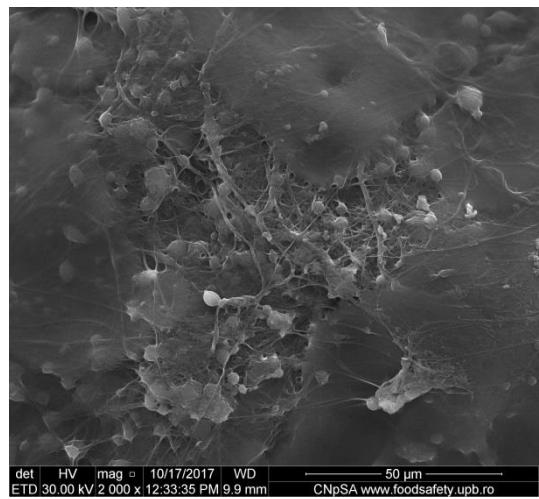
Figura 1. Micrografii SEM inregistrate pentru membrana de PET obtinuta prin electrospinning



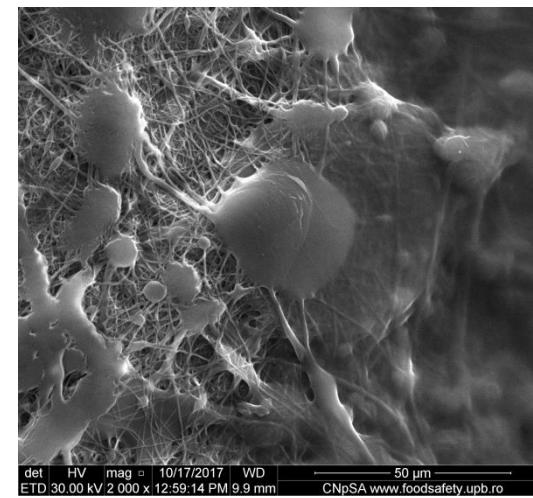
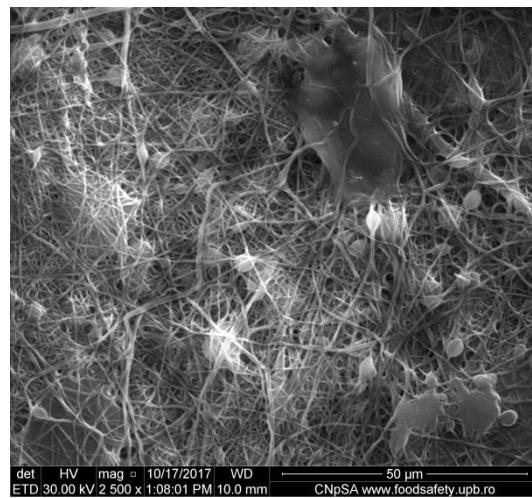
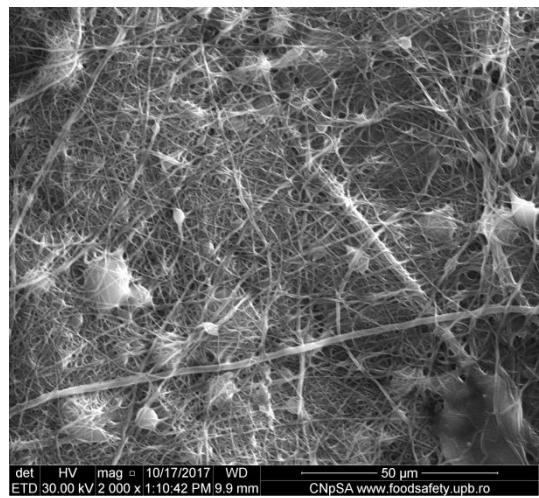
PET@CS_1g_10mL



PET@CS_1g_7.5mL

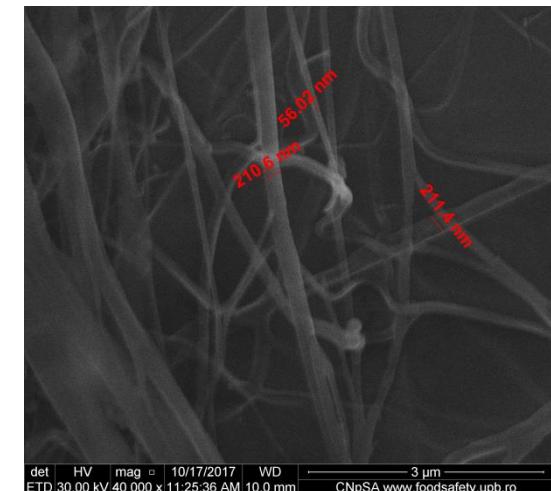
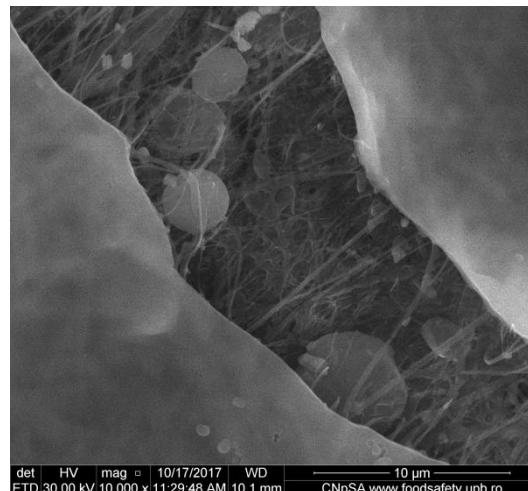
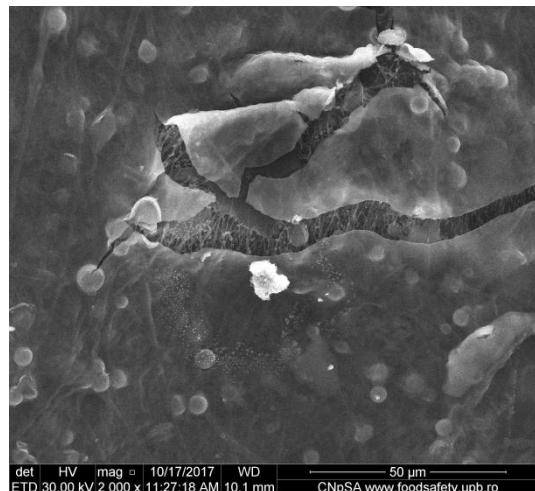


PET@chitosan_1g_5ml

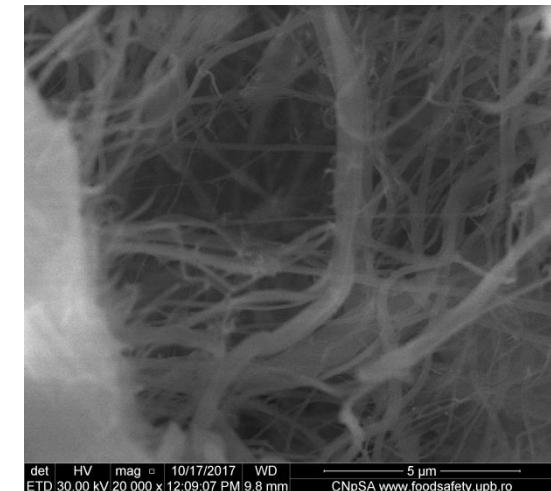
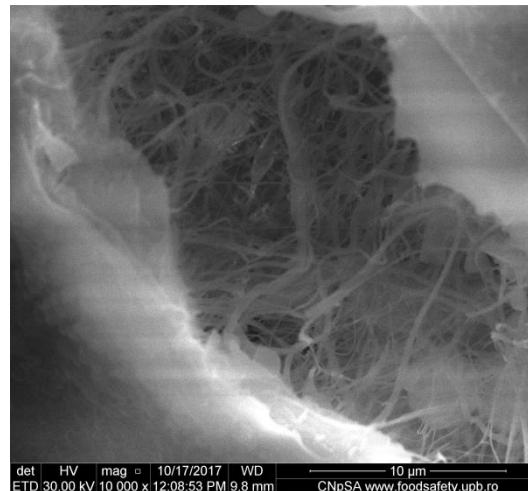
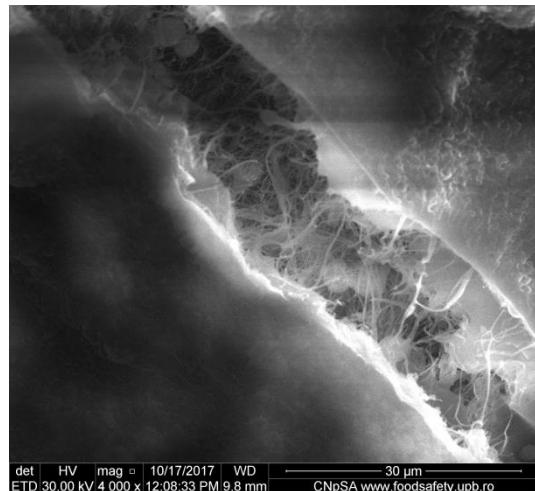


PET@chitosan_1g_2.5ml

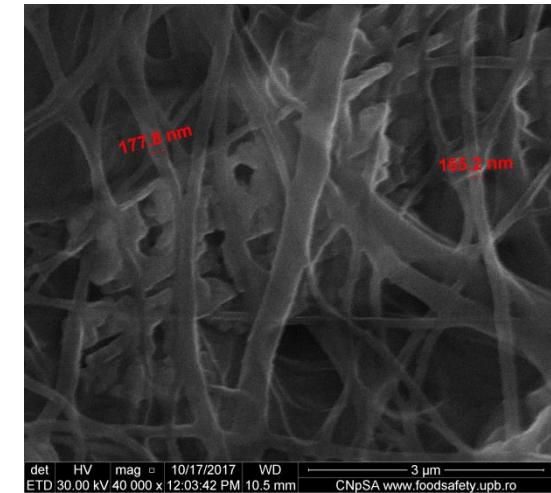
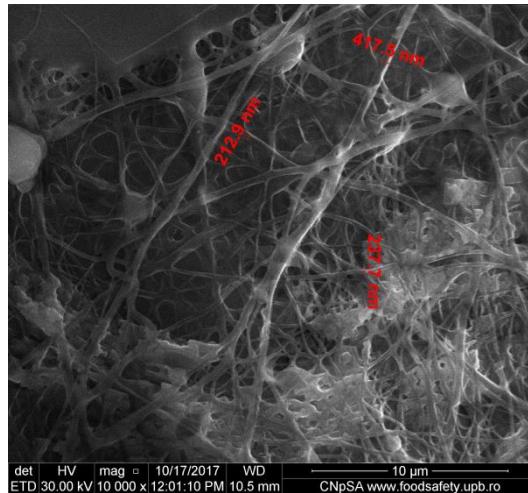
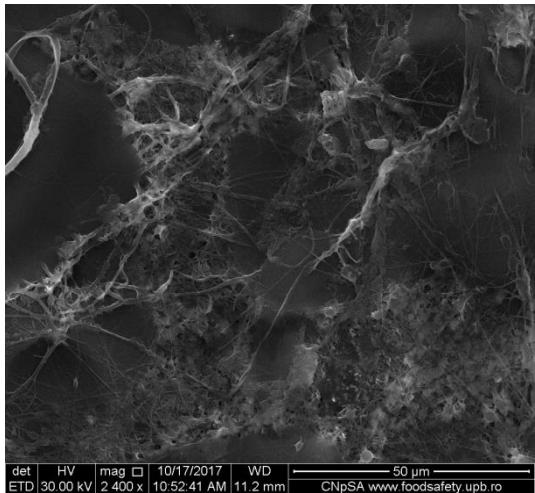
Figura 2. Micrografii SEM inregistrate pentru membrana de PET@CS obtinuta prin electrospining.



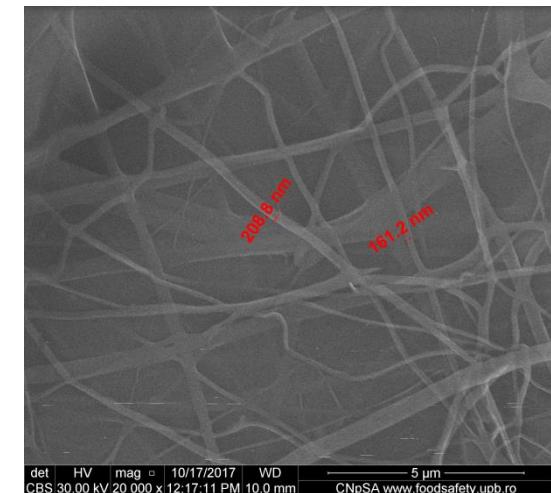
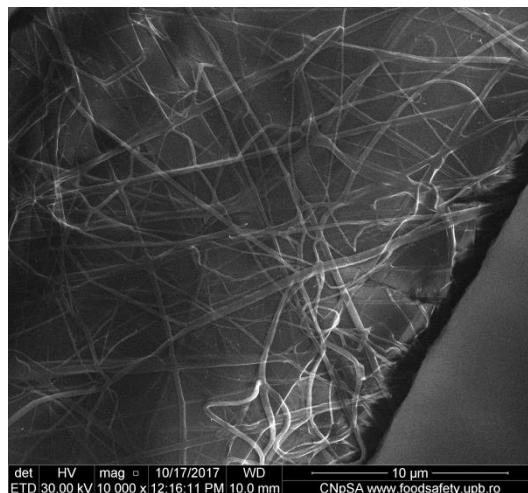
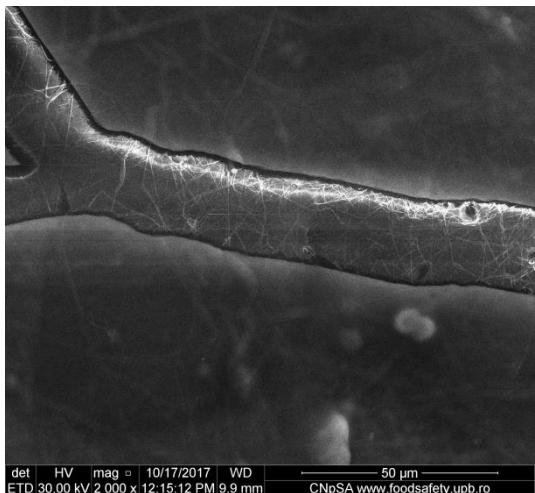
PET@ALG_Cu _1g_10mL



PET@ALG_Cu _1g_7.5mL



PET@ALG_Cu _1g_5ml



PET@ALG_Cu _1g_2.5ml

Figura 3. Micrografii SEM inregistrate pentru membrana de PET@ALG_Cu obtinuta prin electrospining.

In figurile 4, 5 si 6 sunt prezentate principalele rezultate in urma investigarii probelor obtinute prin Spectroscopie de Infrarosu.

In figura 5 sunt prezenta spectrele IR pentru membranele de PET (reciclat, control). Analizand spectrele inregistrate, se constata ca structura chimica a polimerului nu este afectata dupa procesul de electrospinning, benzile de absorbtie identificate sunt ale PET-ului, dintre care banda de absorbtie caracteristica grupei C=O la $\sim 1714 \text{ cm}^{-1}$, regiunea $1403\text{-}910 \text{ cm}^{-1}$ contine mai multe benzi de absorbtie caracteristice legaturilor C-C si C-O. De asemenea la $\sim 2969 \text{ cm}^{-1}$ se poate identifica prezenta benzii de absorbtie caracteristica legaturii C-H.

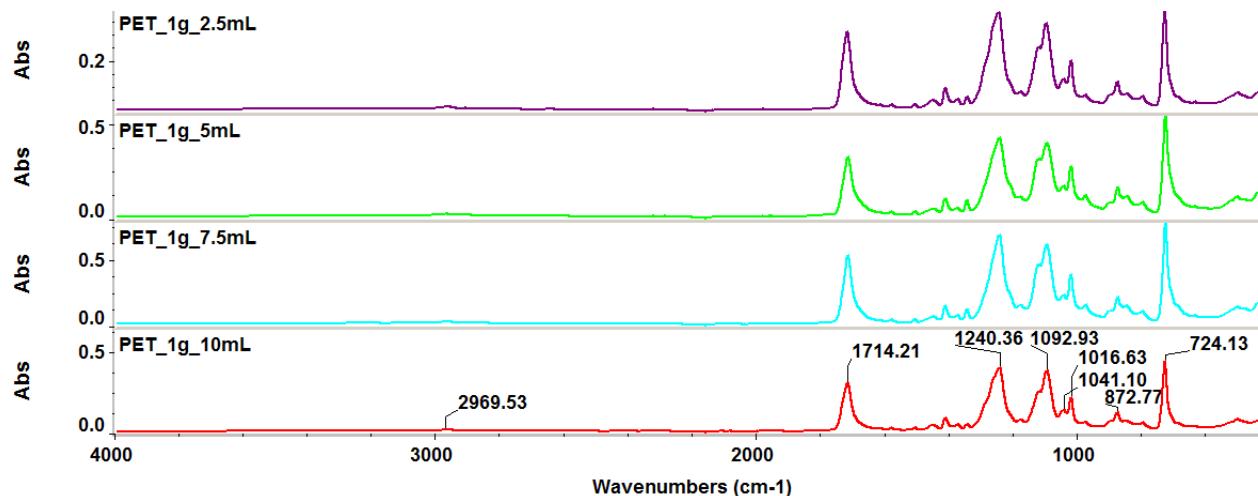


Figura 4. Spectrele FT-IR inregistrate pentru PET (reciclat).

In cazul variantelor experimentale acoperite cu chitosan sau alginat de cupru, tinand cont de faptul ca analiza IR a fost de tip ATR, benzile de absorbtie inregistrate sunt ale polimerilor utilizati pentru acoperire, acestea mascand benzile de absorbtie caracteristice PET-ului (aspect constatat si in cazul analizei SEM).

Astfel, spectrele IR caracteristice pentru membranele de tipul PET@CS sunt prezentate in figura 5. Benzile de absorbtie caracteristice pentru chitosan si identificate prin analiza IR sunt: 1672 cm^{-1} caracteristica pentru gruparea carbonil (prezenta in structura chitosanului datorita dezacetilariei incomplete a chitinei), 3405 cm^{-1} caracteristica grupei OH, iar 2879 cm^{-1} caracteristica legaturii C-H. De asemenea se poate identifica in zona de amprenta si banda de absorbtie caracteristica amidei III in timp ce banda de absorbtie inregistrata la 892 cm^{-1} este caracteristica legaturii C-H din structura polizaharidica.

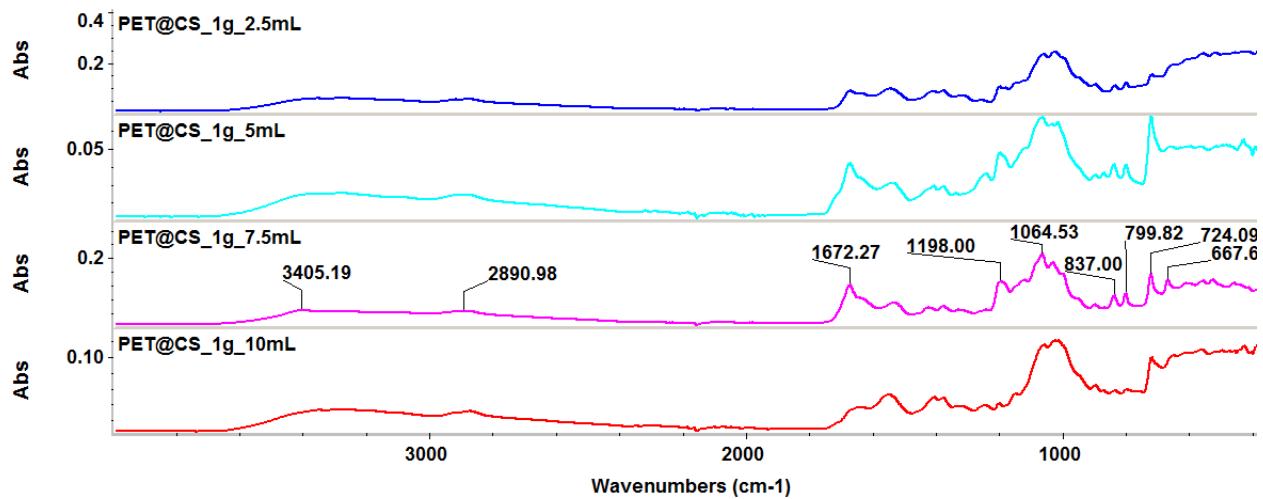


Figura 5. Spectrele FT-IR inregistrate pentru PET@CS.

In figura 6 sunt prezentate spectrele inregistrate pentru probele de tipul PET@ALG_Cu.

Analizand spectrele inregistrare se observa prezenta alginatului de cupru prin benzile sale caracteristice, dupa cum urmeaza : $\sim 3440 - 3200 \text{ cm}^{-1}$ corespunde OH-ului caracteristic inelului piranozic ; 2973 cm^{-1} corespunde legaturii C-H ; 1739 cm^{-1} , 1645 cm^{-1} 1579 cm^{-1} sunt benzi de absorbtie caracteristice pentru gruparea carbonil (C=O) si pentru intinderea asimetrica de tipul – O-C-O-; Benzile de absorbtie de la 1464 cm^{-1} - 1400 cm^{-1} pot fi atribuite interactiilor dintre ionul carboxilat si ionii de cupru. Benzile de absorbtie intre 1150 si 810 cm^{-1} sunt caracteristice strurii piranozice ce apartine alginatului de cupru.

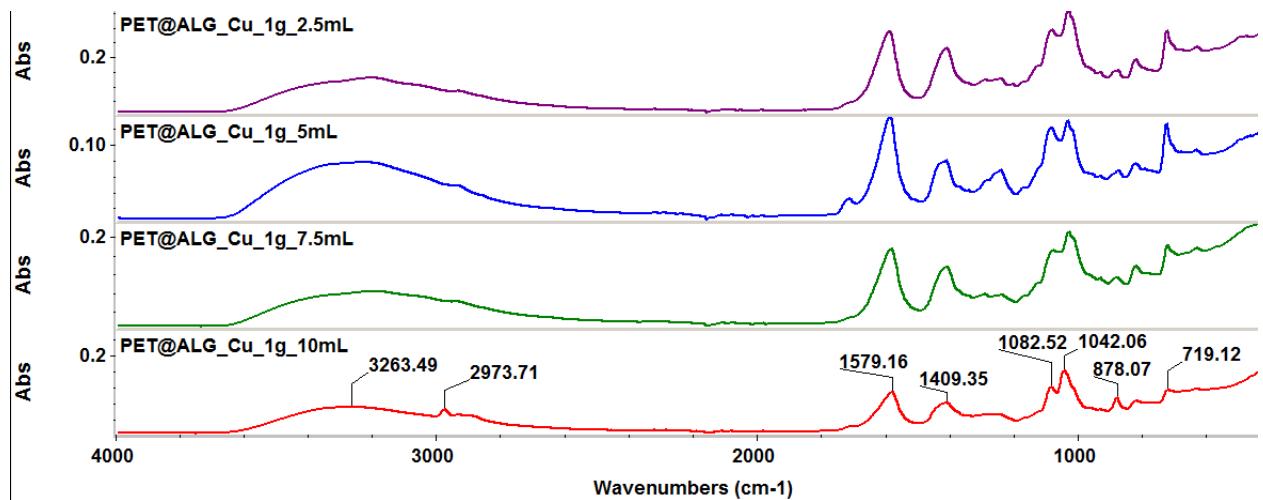


Figura 6. Spectrele FT-IR inregistrate pentru PET@ALG_Cu.

Evaluarea efectului antimicrobian

Evaluarea efectului antimicrobian s-a realizat atat prin utilizarea de culturi microbiene planctonice (plutitoare) cat si aderate, incluse in biofilme. Rezultatele au aratat ca esantioanele de ambalaje ce contin chitosan prezinta cel mai eficient efect antimicrobian asupra celulelor planctonice, fiind eficiente atat asupra tulpinilor bacteriene, *S. aureus* (fig 7) si *P. aeruginosa* (fig 8), cat si asupra *C. albicans* (fig 9). La tulpina de *S. aureus* testata s-a constatat o scadere drastica a numarului de celule microbiene in suspensie, evaluat prin masurarea spectrofotometrica a culturii, in cazul cultivarii acestui microorganism in prezenta PET 2.5mL/hCS, PET 10mL/h, dar si in prezenta PET 10mL/hALG+CuCl2 si PET 7.5mL/hALG+CuCl2. Cu toate ca diferentele sunt mai putin semnificative, se poate observa in figura 7 ca toate materialele testate au prezentat un oarecare efect inhibitor asupra multiplicarii microorganismelor in cultura.

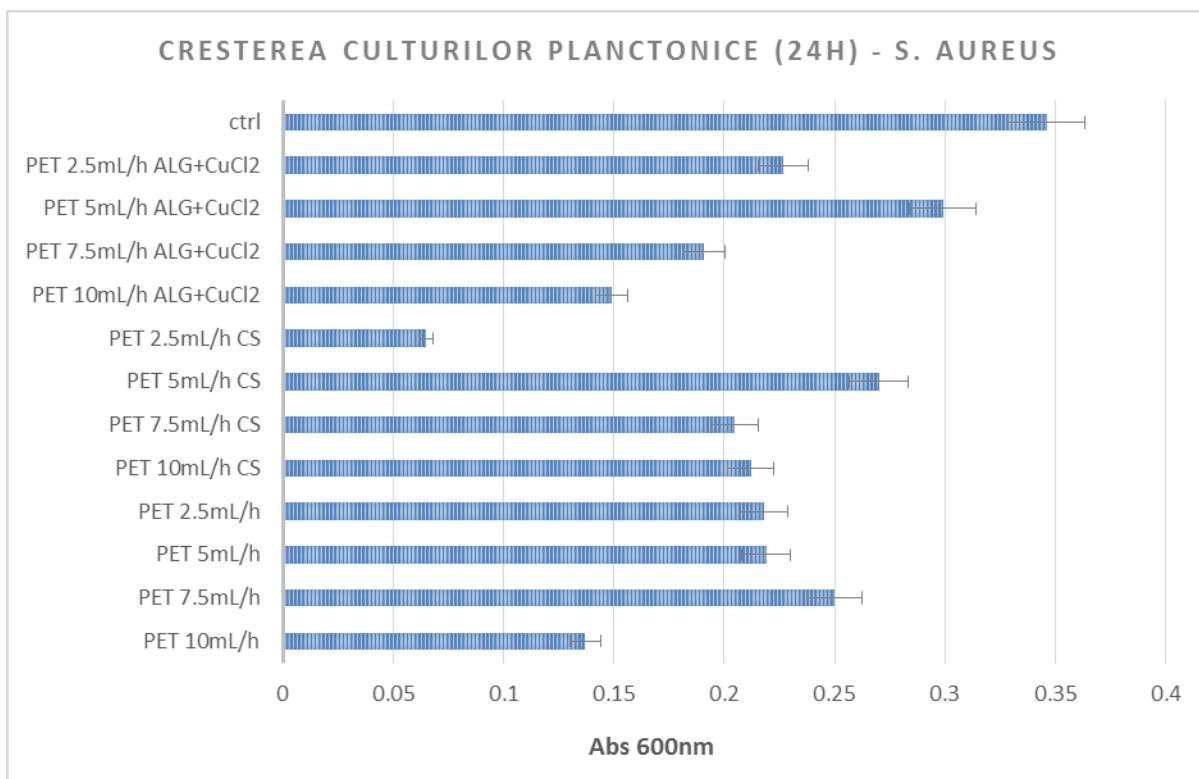


Figura 7. Reprezentare grafica a valorilor absorbantei inregistrate pentru culturile de *S. aureus*, ce exprima capacitatea de multiplicare a acestor celule in urma cultivarii, timp de 24h in prezenta materialelor polimerice pe baza de PET reciclat obtinute.

In cazul culturilor de *P. aeruginosa*, rezultatele au aratat ca multiplicarea celulelor planctonice este inhibata in prezenta materialelor ce contin chitosan, cel mai semnificativ efect fiind observat in cazul probei PET 2.5mL/hCS. In figura 8 se poate observa ca toate materialele pe baza de citosan, dar si alginat si CuCl₂ inhiba in grade diferite multiplicarea celulelor de *P. aeruginosa*.

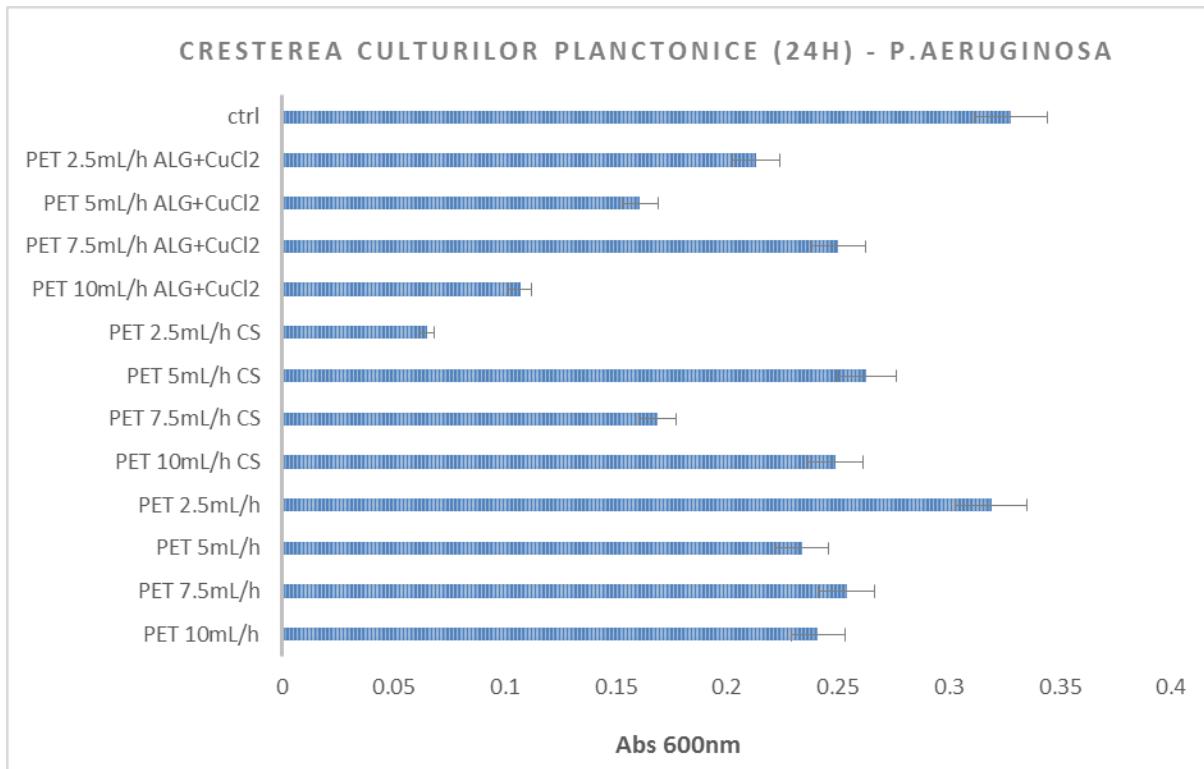


Figura 8. Reprezentare grafica a valorilor absorbantei inregistrate pentru culturile de *P. aeruginosa*, ce exprima capacitatea de multiplicare a acestor celule in urma cultivarii, timp de 24h in prezenta materialelor polimerice pe baza de PET reciclat obtinute.

Nu doar multiplicarea celulelor bacteriene planctonice este alterata in prezenta materialelor polimerice reciclate testate, dar si multiplicarea celulelor de *C. albicans* in cultura. In acest caz, se poate observa ca materialele ce contin alginat si CuCl₂ prezinta cele mai efficient efect de inhibitie a cresterii *C. albicans*, probele ce contin chitosan demonstrand un efect inhibitor scazut asupra cresterii celulelor levurice planctonice (fig 9).

CRESTEREA CULTURILOR PLANCTONICE (24H) - C. ALBICANS

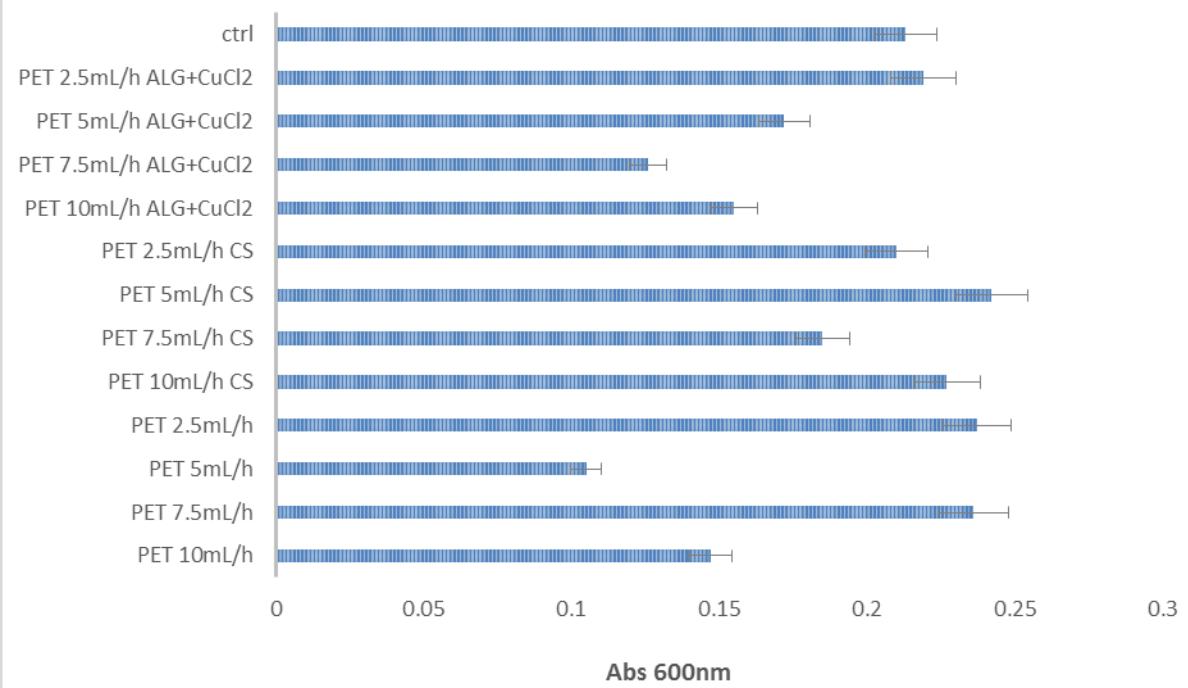


Figura 9. Reprezentare grafica a valorilor absorbantei inregistrate pentru culturile de *C.albicans*, ce exprima capacitatea de multiplicare a acestor celule in urma cultivarii, timp de 24h in prezenta materialelor polimerice pe baza de PET reciclat obtinute.

Culturile microbiene se dezvolta diferit si prezinta adaptari fenotipice si moleculare distincte in stare planctonica, comparativ cu cele care cresc in stare aderata^{xv}. Studii comparative realizate pe culturi planctonice si aderate demonstreaza ca microorganismele aderate si care formeaza comunitati multicelulare, numite biofilme, prezinta grade diferite de rezistenta, virulenta si particularitati metabolice tipice^{xvi}. Capacitatea de aderenta la o suprafata biotica sau abiotica reprezinta prima etapa in initierea unui process infectios sau in colonizarea ambalajelor, suprafetei alimentelor sau a instalatiilor industriale utilizate obtinerea sau procesarea produselor alimentare. Microorganismele aderate pot dezvolta comunitati multicelulare specializate, care se dezvolta in stare aderata, numite biofilme. Dezvoltarea de biofilme microbiene reprezinta unul dintre cei mai importanți factori de risc in industria alimentara, determinand infundarea sistemelor industrial fluidice, dezvoltarea unei surse de contaminare persistente – biofilmele fiind deosebit de dificil de eradicat de pe instalatiile de procesare, precum si principal sursa de degradare a alimentelor^{xvii}. La nivel industrial, dar si biomedical, se studiaza noi modalitati de

evitare a contaminarii cu microorganisme, precum si strategii de limitare a aderentei microorganismelor si de inhibare a dezvoltarii biofilmelor^{xviii}.

Filmele fibrilare obtinute au demonstrat un potential remarcabil de inhibare a aderentei tulpinilor microbiene si levurice testate, in functie de substantele antimicrobiene inglobate. Materialele confectionate din PET reciclat simplu nu au prezentat efecte de inhibare a aderentei in nici unul dintre cazurile testate. In schimb, filmele ce contin chitosan sau combinatia alginat-Cu Cl2 au prezentat efecte semnificative de inhibare a aderentei microorganismelor (fig 10, 11 si 12).

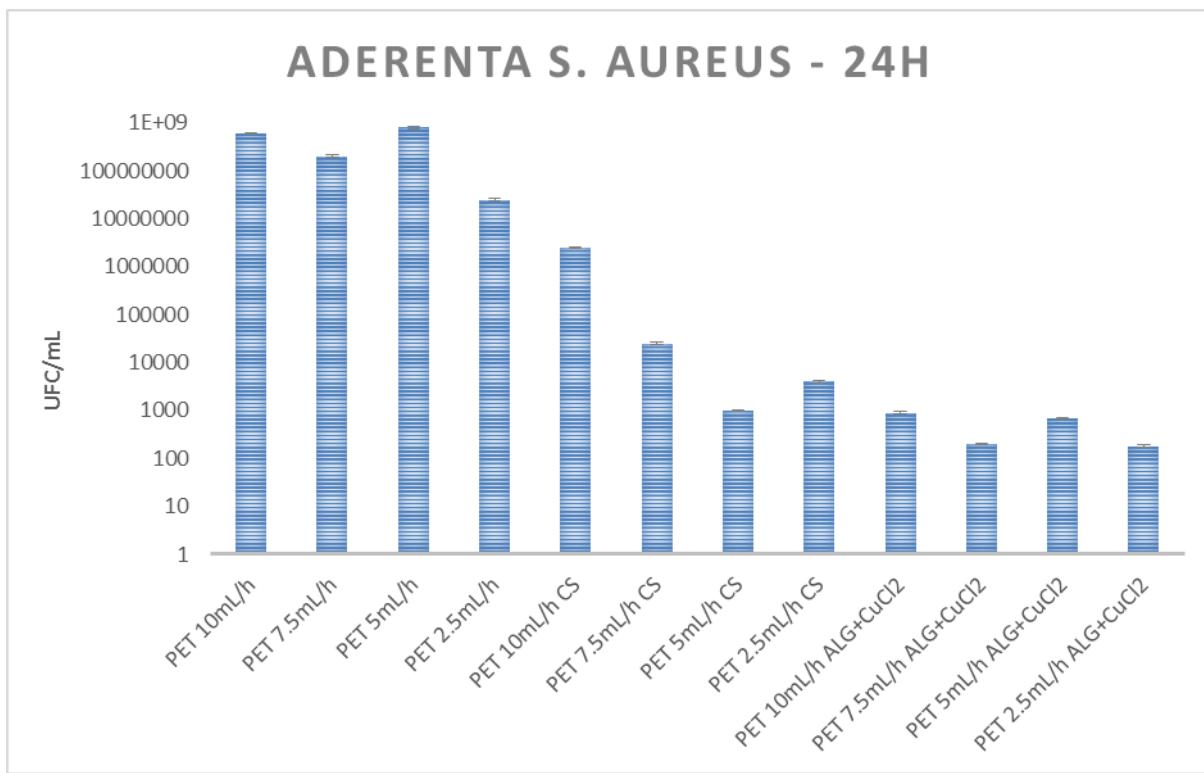


Fig 10. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitativ gradul de aderenta al celulelor de *S. aureus* la suprafata materialelor obtinute dupa incubarea timp de 24h, la 37°C.

Cele mai evidente efecte inhibitorii ale aderentei microorganismelor se observa in cazul tilpinilor *S. aureus* (fig 10) si *C. albicans* (fig 12). Cu toate ca si in cazul *P. aeruginosa* (fig 11) se poate observa o scadere evidentă a numarului de unitati formatoare de colonii (UFC) ce releva

celulele microbiene aderate pe suprafata materialelor obtinute, in cazul materialelor cu chitosan si alginat-CuCl₂, diferențele sunt mai putin semnificative comparativ cu numarul de UFC obtinut pentru celelele tulpini microbiene.

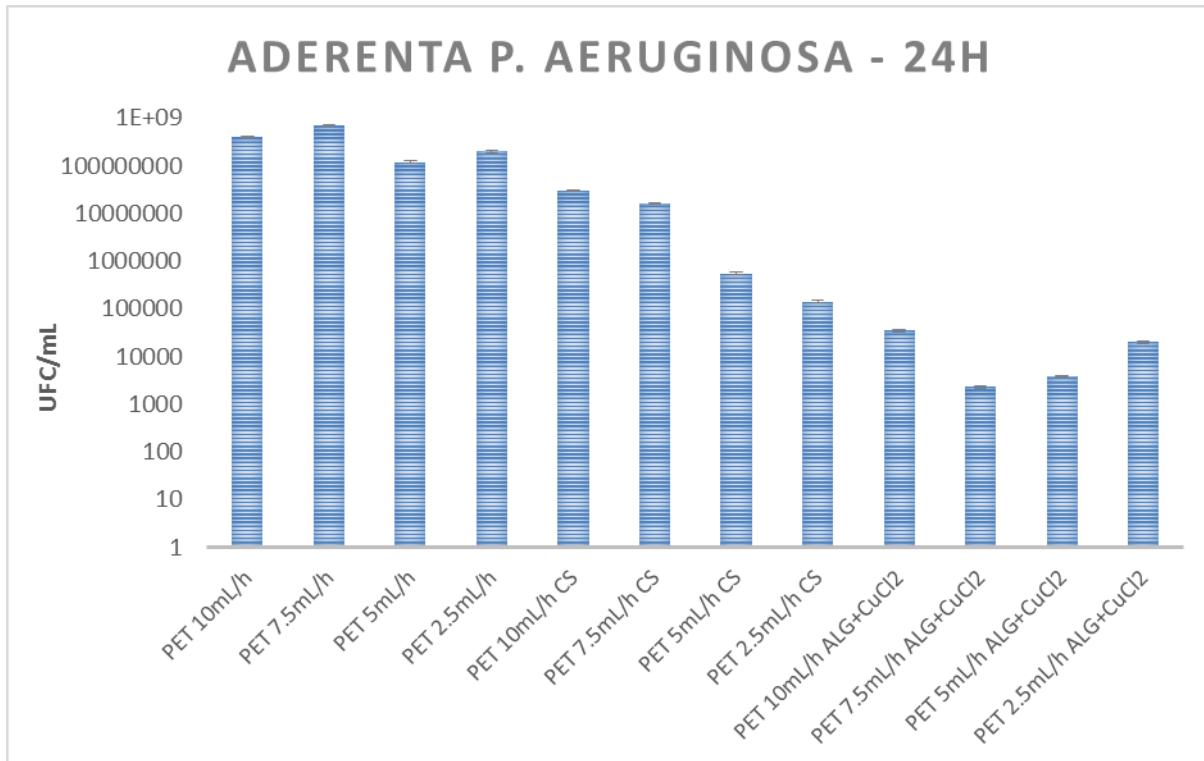


Figura 11. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitativ gradul de aderenta al celulelor de *P.aeruginosa* la suprafata materialelor obtinute dupa incubarea timp de 24h, la 37°C.

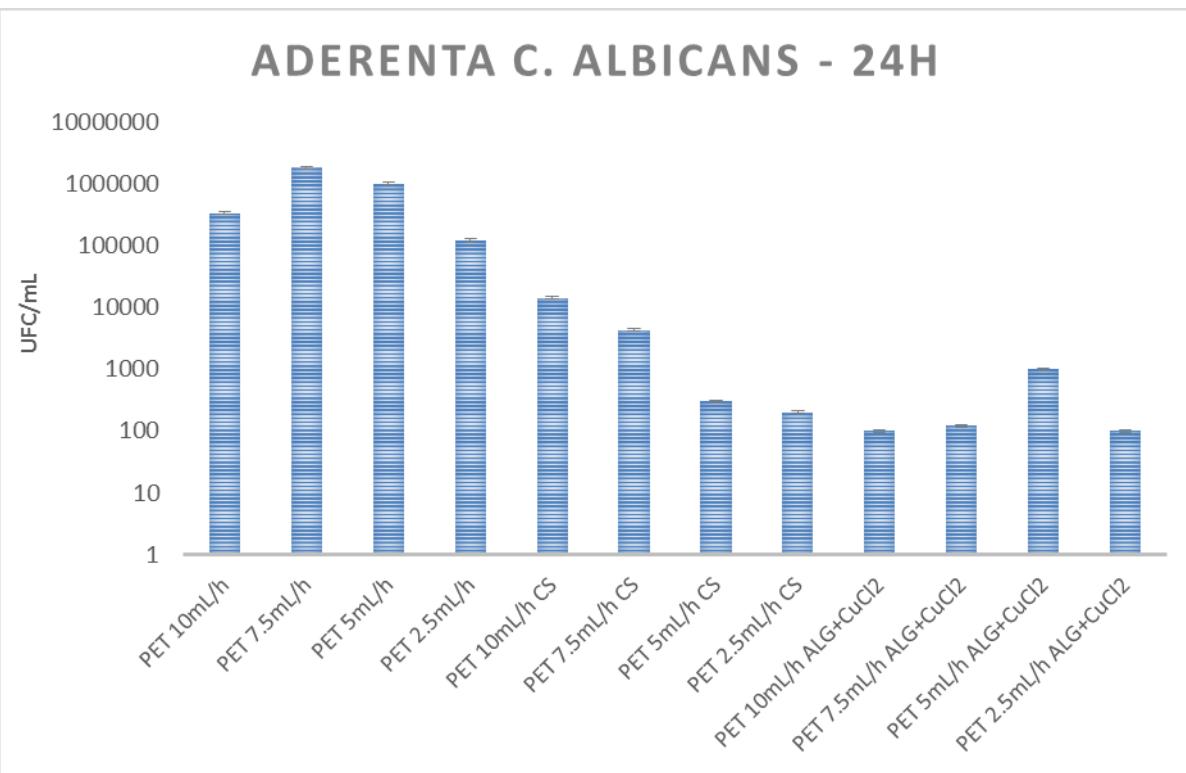


Figura 12. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitativ gradul de aderenta al celulelor de *C. albicans* la suprafata materialelor obtinute dupa incubarea timp de 24h, la 37°C.

Formarea de biofilme microbiene pe suprafata alimentelor determina degradarea rapida a acestora, precum si acumularea de diferiti produsi metabolici microbieni care pot fi toxici pentru consumator. Ingerarea de alimente contaminate cu microorganism enteropatogene poate conduce la afectiuni infectioase sau toxigenice grave, ce pot avea character epidemic, in functie de gradul de raspandire al produselor contaminate^{xix}.

Analiza capacitatii de dezvoltare a biofilmelor microbiene pe suprafata foliilor alimentare fibrilare obtinute, arata ca acest fenotip este semnificativ redus, mai ales in cazul *S. aureus* si *C. albicans* (fig 13, 14 si 16). Dezvoltarea biofilmelor microbiene s-a analizat in dinamica, timp de 3 zile, observandu-se mentinerea modelului de dezvoltare a comunitatilor microbiene multicelulare, in functie de gradul de aderenta al celulelor microbiene la 24h incubare.

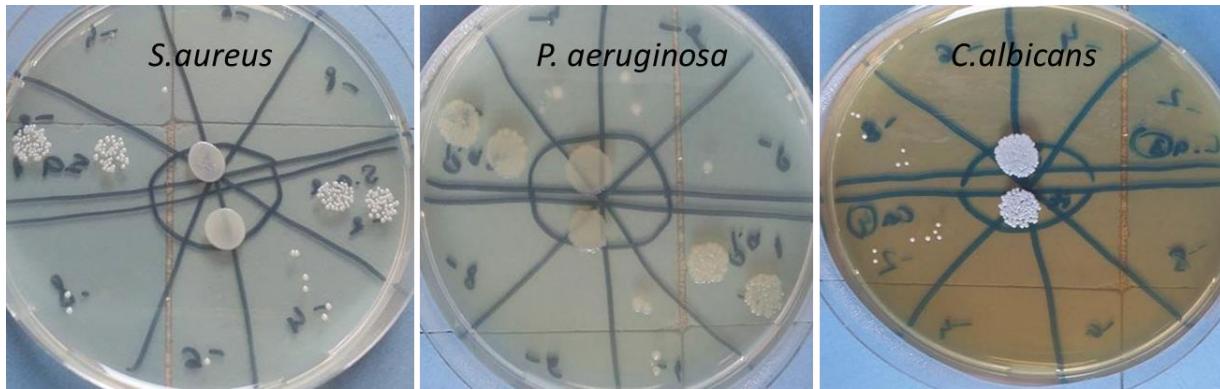


Figura 13. Aspectul coloniilor de *S. aureus*, *P. aeruginosa* si *C. albicans*, obtinute in cazul cultivarii dilutiilor suspensiilor microbiene obtinute din celule desprinse din biofilmele cultivate in prezenta materialelor pe baza de PET reciclat.

In figura 14 se observa gradul de dezvoltare al biofilmelor de *S.aureus* in prezenta filmelor alimentare obtinute prin electrospinning.

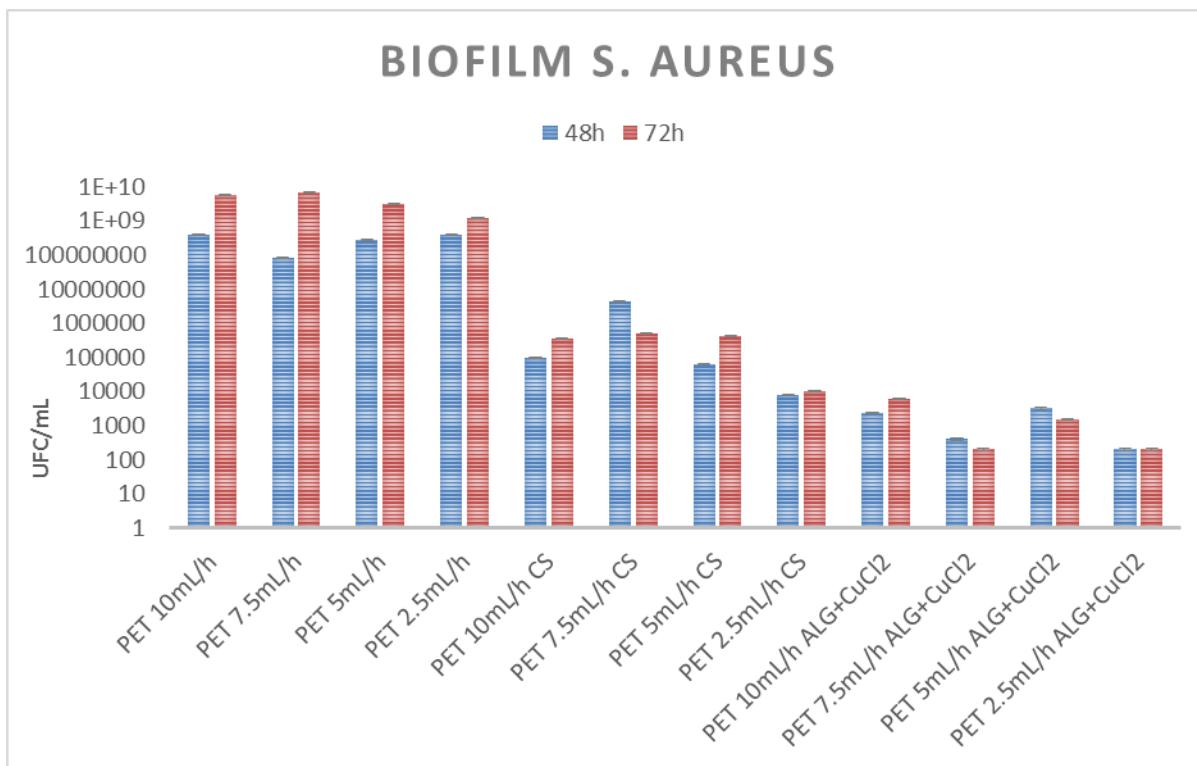


Figura 14. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitatea de celule de *S. aureus* incluse in biofilmele monospecifice dezvoltate pe suprafata materialelor obtinute timp de 48h si 72h, la 37°C.

Rezultatele arata ca biofilmele monospecifice formate de tulpina de *S.aureus* prezinta o dezvoltare alterata, diminuata in timp, in prezenta materialelor obtinute din PET reciclat, ce contin un strat suplimentar de chitosan, si mai ales cele cu alginat si CuCl₂ (fig 14). Probele cu PET si alg+CuCl₂ au inhibat cel mai semnificativ numarul de UFC/mL, ce reprezinta celulele aderate, incluse in biofilmele dezvoltate pe suprafata materialelor, atat la 48 cat si la 72 h incubare. Acest rezultat sugereaza ca ambalajele obtinute prezinta un efect antimicrobian si anti-biofilm mentinut cel putin pe parcursul a cateva zile.

In cazul, *P. aeruginosa*, se poate observa ca biofilmele monospecifice formate prezinta dezvoltare incetinita in prezenta probelor de PET cu chitosan, dar mai ales in prezenta celor ce contin alg+CuCl₂ (fig 15).

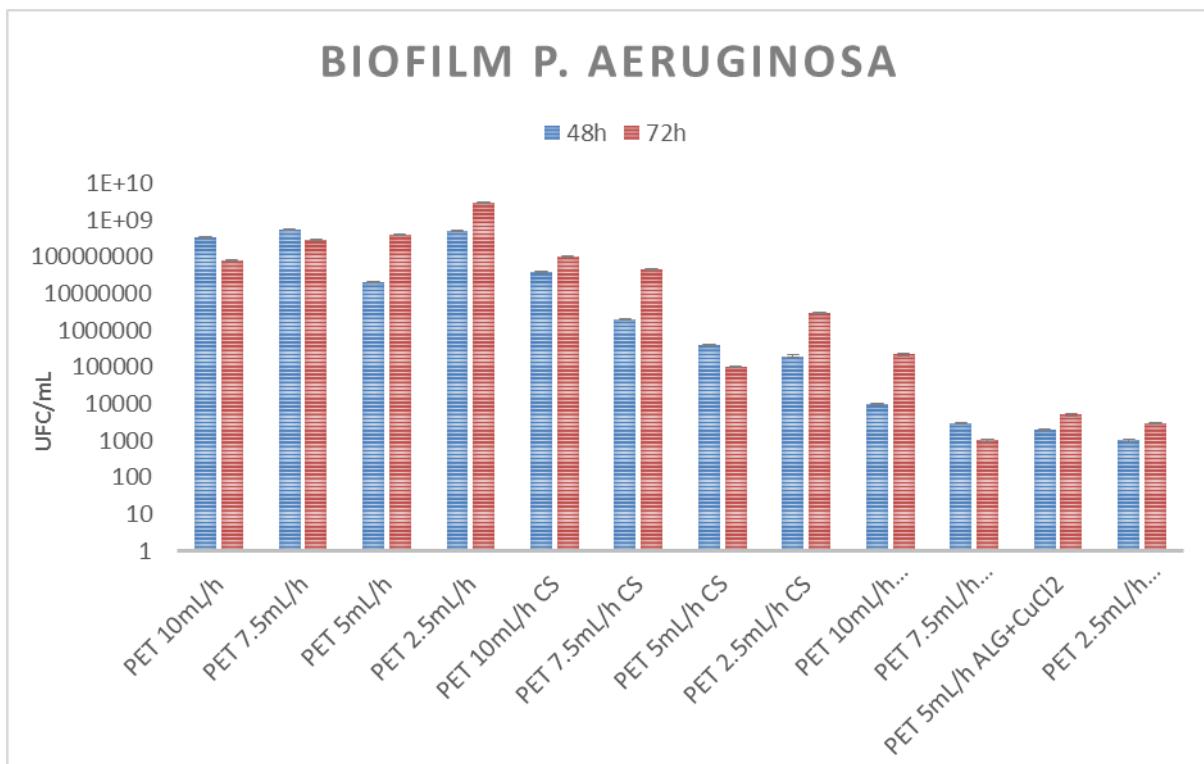


Figura 15. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitatea de celule de *P. aeruginosa* incluse in biofilmele monospecifice dezvoltate pe suprafata materialelor obtinute timp de 48h si 72h, la 37°C.

Capacitatea de a inhiba biofilmele de *P. aeruginosa* este mentinuta aproape constant pe parcursul celor 3 zile de testare, efectele inhibitorii fiind observate atat la 48h cat si la 72h.

In cazul tulpinii levurice analizate, capacitatea de inhibare a biofilmelor monospecifice cultivate in prezenta materialelor obtinute a fost evidențiata mai ales la PET cu chitosan si PET cu alg+CuCl₂. In ambele variante experimentale, pentru *C. albicans*, numarul de UFC/mL ce reprezinta celulele recuperate din biofilmele dezvoltate pe aceste materiale, prezinta o scadere drastica, mult mai semnificativa cu comparativ cu rezultatele obtinute pentru *S. aureus* sau *P. aeruginosa* (fig 16).

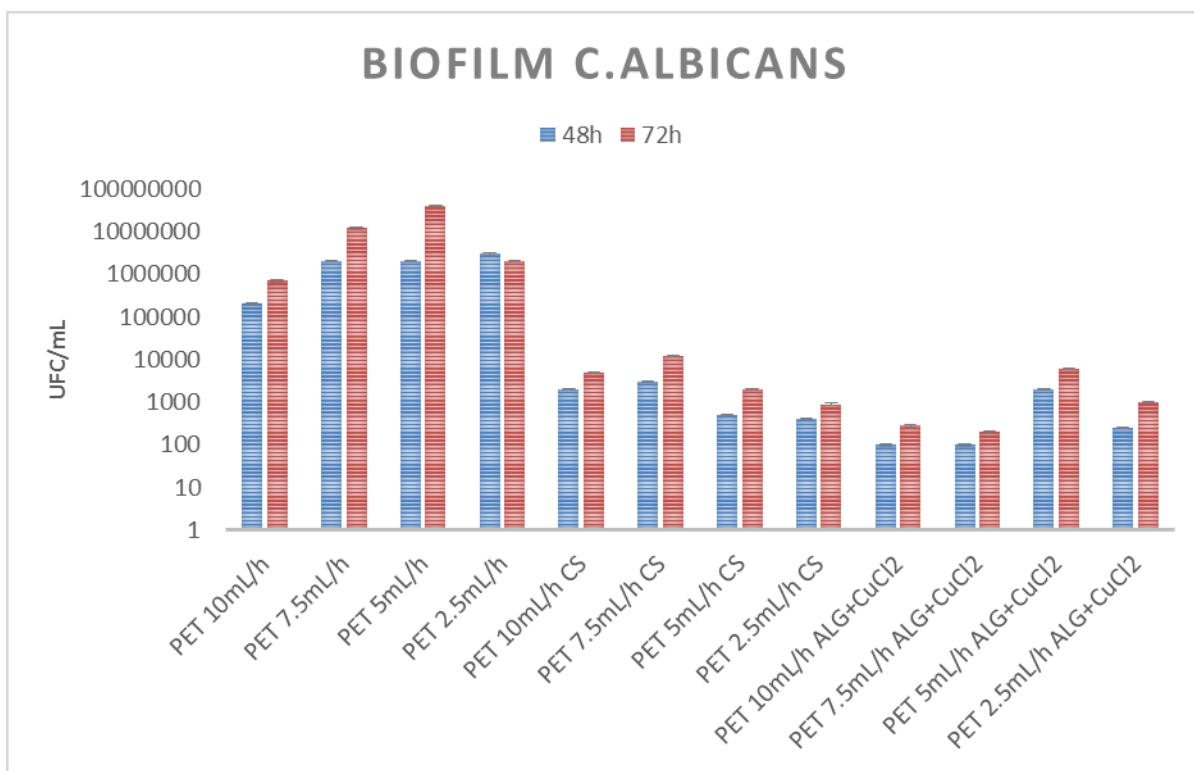


Figura 16. Reprezentare grafica a valorilor UFC/mL (unitati formatoare de colonii/mL) ce reprezinta cantitatea de celule de *C.albicans* incluse in biofilmele monospecifici dezvoltate pe suprafata materialelor obtinute timp de 48h si 72h, la 37°C.

Efectul antifungic al materialelor obtinute a demonstrat ca membranele pe baza de PET si chitosan sau PET si alg+CuCl₂ inhiba dezvoltarea fungilor filamentosi microscopici la suprafata acestora timp de cel putin trei saptamani. Cele mai evidente efecte inhibitorii asupra dezvoltarii tulpinii fungice de *A.niger* s-au evidentiat in prezenta PET si alg+CuCl₂ (fig 17).

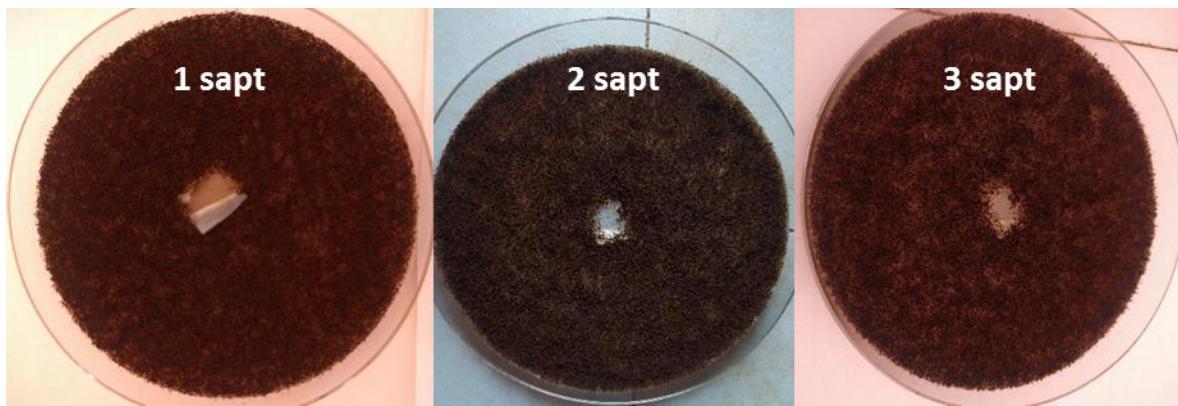


Figura 17. Aspectul culturilor de *A.niger* dezvoltate in prezenta membranelor fibrilare de PET reciclat 2,5ml/h cu alginat si CuCl₂, timp de 1, 2 sau 3 saptamani.

Acstea rezultate sustin ideea conform careia foliile alimentare fibrilare din PET reciclat si substante bioactive, obtinute prin electrospinning, prezinta un potential real de a fi utilizate in dezvoltarea de ambalaje imbunatatite, care limiteaza colonizarea alimentelor cu microorganisme cu potential patogen si inhiba formarea de biofilme microbiene.

Evaluarea citotoxicitatii

Testul MTT a aratat ca proliferarea si activitatea celulara a celulelor diploide in cultura poate suferi anumite modificari in prezenta materialelor analizate, in functie de debitul de depunere a fibrelor prin electrospinning. Cu toate acestea, nu s-a observat un pattern clar de interferenta a materialelor cu proliferarea si activitatea metabolica a celulelor, pentru nici una dintre varientele experimentale testate. Astfel, anumite probe din toate cele 3 seturi experimentale (si anume PET control, PET cu chitosan si PET cu alg+CuCl₂) nu influenteaza in nici un fel proliferarea si activitatea metabolica normala a celulelor in cultura, pe cand la alte debite de depunere, aceleasi compositii pot altera capacitatea de proliferare si activitatea metabolica a celulelor diploide in cultura, conform rezultatelor MTT. Probele PET 2,5 mL/h ctrl, PET 10mL/h ctrl, PET 2,5 mL/h CS, PET 5 mL/h CS, dar si PET 10 mL/h alg+CuCl₂ nu alttereaza semnificativ proliferarea si activitatea metabolica a celulelor diploide in cultura, comparativ cu celelalte variante experimentale, pentru care s-au observat alterari usoare ale acestor fenotipuri (fig 18).

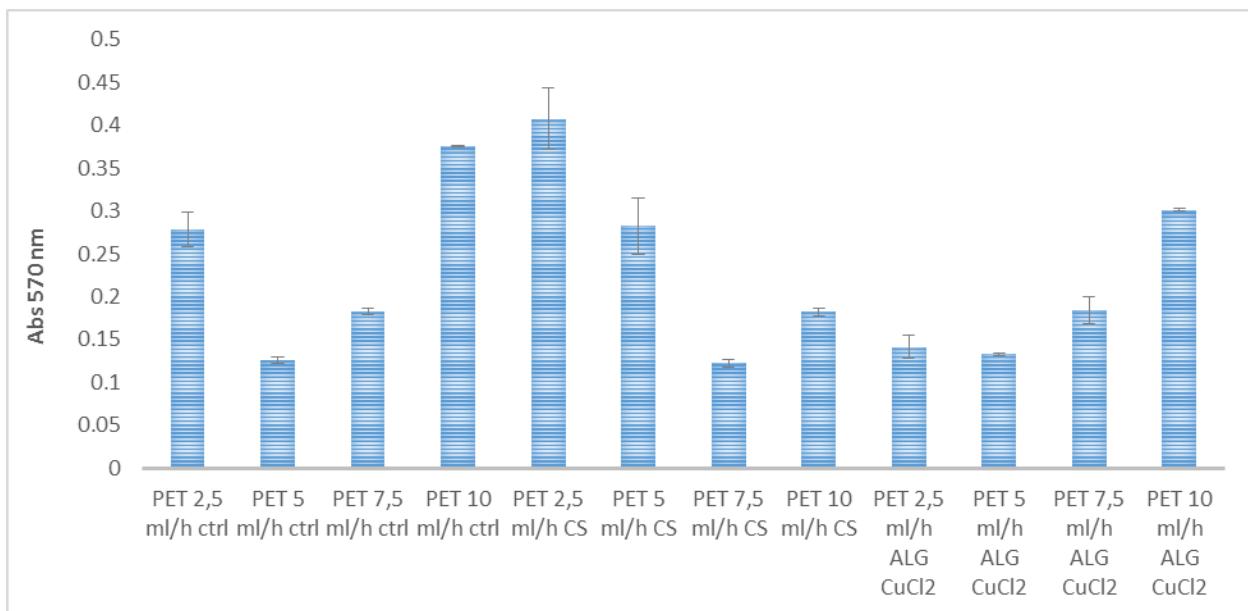


Figura 18. Reprezentare grafica a rezultatelor tehnicii MTT, reprezentate prin valorile absorbantei la 570nm ce sugereaza densitatea optica a formazanului eliberat in urma reactiei de reducere a reactivului MTT de catre oxidoreductazele mitocondriale ale celulelor active metabolic in prezenta materialelor testate.

Rezultatele testului GSH demonstreaza ca materialele obtinute pot sa induca un oarecare stress oxidativ in celulele diploid in cultura, in functie de debitul de depunere a fibrelor prin electrospinning. Similar cu rezultatele obtinute in cazul tehnicii MTT, si in cazul evaluarii activitatii enzimei glutation S-transferazei, rezultatele au aratat ca anumite materiale din toate cele trei categorii de probe pot stimula aparitia unui stress oxidativ in celulele diploid in cultura. Astfel, probele PET 5mL/h ctrl, PET 7,5 mL/h CS, PET 10mL/h CS si PET 7,5mL/h alg+CuCl₂ prezinta cel mai semnificativ potential de inducer al unui stress oxidativ in celulele diploid in cultura, conform testului GSH (fig 19).

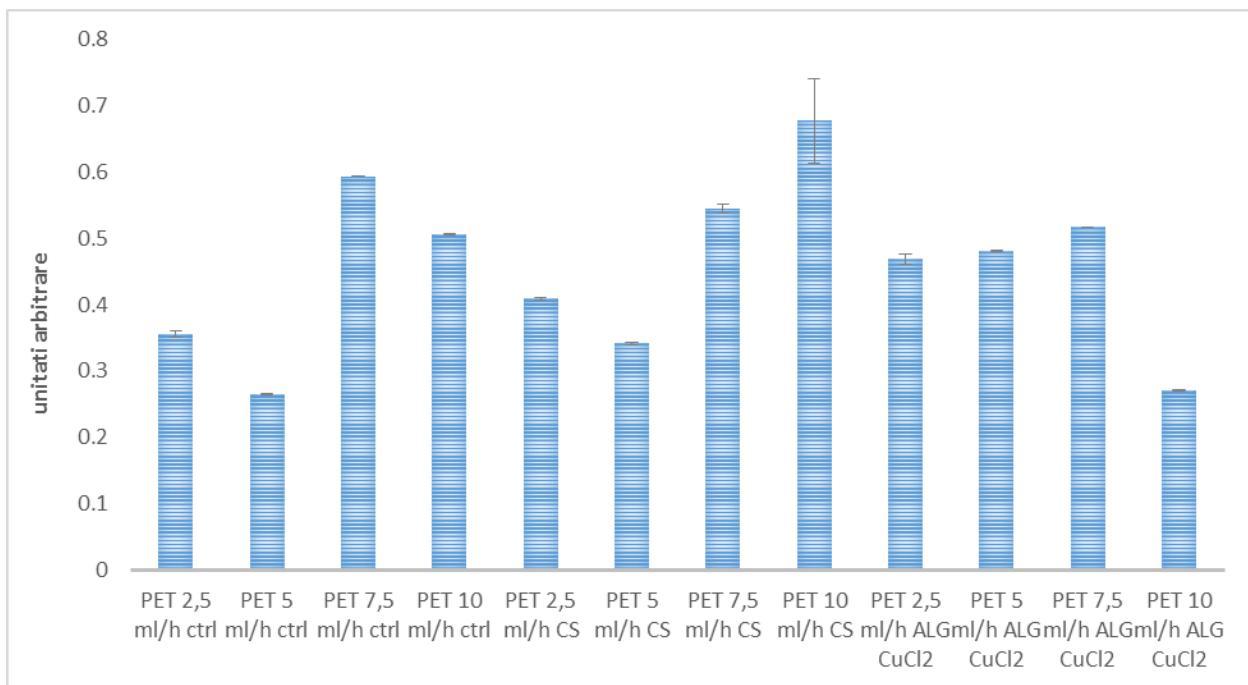


Figura 19. Reprezentare grafica a valorii luminiscente, exprimata in unitati arbitrate, ce sugereaza activitatea glutation S-transferazei (care transforma glutationul legat cu un precursor de luciferina in glutation oxidat legat cu luciferina care emite lumina), activitate corelata cu inducerea stresului oxidativ in celulele diploide cultivate in prezenta materialelor obtinute.

Rezultatele testelor biologice sugereaza faptul ca filmele alimentare fibrilare pe baza de PET reciclat si diferite substante antimicrobiene netoxice, obtinute prin electrospinning ar putea sa reprezinte o noua strategie in dezvoltarea de ambalaje alimentare ecologice imbunatatite, care sa reduca contaminarea cu microorganisme si formarea de biofilme microbiene pe suprafata acestora.

Concluzii

Studiile realizate au avut ca scop sinteza si caracterizarea din punct de vedere fizico-chimic si biologic a unor folii alimentare fibrilare, pe baza de PET reciclat, chitosan si alginat cu CuCl_2 , obtinute prin tehnica electrospinning.

Materialele obtinute prezinta proprietati fizico-chimice (aspect, organizare, dimensiuni) care le recomanda pentru utilizarea si dezvoltarea de ambalaje (folii) alimentare.

Rezultatele biologice au aratat ca materialele pe baza de PET reciclat obtinute inhiba aderenta si colonizarea cu microorganisme, dezvoltand in acelasi timp efecte citotoxice reduse asupra celulelor eucariote diploide in cultura. In plus, efectele biologice observate sunt dependente de debitul de depunere a fibrelor prin electrospinning.

Atat materialele pe baza de PET si chitosan, cat si cele pe baza de alginat+CuCl₂ prezinta efecte antimicrobiene si antibiofilm semnificative, limitand cresterea si multiplicarea microorganismelor in cultura planctonica, dar si aderenta si dezvoltarea biofilmelor monospecifice.

Cele mai semnificative efecte de inhibitie a capacitatii de aderenta si formare a biofilmelor au fost observate in cazul probelor de PETce contin alginat+CuCl₂, acestea fiind deobit de eficiente atat in limitarea biofilmelor tulpinilor bacteriene (*S. aureus* si *P. aeruginosa*), cat si a levurilor (*C. albicans*).

Citotoxicitatea materialelor a fost investigata prin metode biochimice (i.e. MTT si GSH), rezultatele sugerand ca materialele obtinute pot prezentaperturbari in proliferarea si activitatea metabolica a celulelor, fara sa determine moartea acestora in conditii testate, doar in anumite cazuri de depunere a fibrelor prin electrospinning.

In concluzie, se recomanda optimizarea protocoalelor de depunere a fibrelor PET functionale prin controlul riguros al debitului de depunere prin electrospinning in functie de tipul de substanta/material bioactiv utilizat.

Membranele fibrilare obtinute ar putea fi utilizate cu succes pentru dezvoltarea de noi ambalaje alimentare cu proprietati imbunatatite, care sa limiteze colonizarea cu microorganisme cu potential patogen, precum si dezvoltarea de biofilme.

Diseminarea rezultatelor cercetarii

Articole ISI

Mădălina Elena Grigore, Alexandru Mihai Grumezescu, Alina Maria **Holban**, George Dan Mogoșanu and Ecaterina Andronescu. Collagen-Nanoparticles Composites for Wound Healing and Infection Control. Metals, Received: 7 October 2017; **Accepted:** 15 November 2017.

Participari la conferinte

Alina M **Holban**, Alexandru M Grumezescu, Mariana C Chifiriuc, Lia M Ditu, Carmen Curutiu, Valentina Grumezescu, Coralia Bleotu and Veronica Lazar. Magnetite nanoparticles as efficient nanoshuttles for the delivery of antimicrobial natural volatile compounds. 9th International conference of Nanomaterials, 19-21 iulie 2017, Aveiro, Portugalia.

Alexandru Mihai Grumezescu, Alexandra Elena Oprea, Anton Ficai, Bogdan Stefan Vasile, Roxana Trusca, Alina Maria **Holban**, Ecaterina Andronescu. Electrospun recycled PET: improving biological properties by addition of silver nanoparticles. 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCE 2017), 6 – 9 Sept. 2017, Poiana Brasov, Romania.

Alexandra Elena Oprea, Alexandru Mihai Grumezescu, Anton Ficai, Bogdan Stefan Vasile, Roxana Trusca, Alina Maria **Holban**, Ecaterina Andronescu. Nanobioactive surfaces for the modulation of microbial biofilm. 20th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCE 2017), 6 – 9 Sept. 2017, Poiana Brasov, Romania.

Bibliografie

- ⁱ Valentina Siracusa, Pietro Rocculi, Santina Romani, Marco Dalla Rosa. Biodegradable polymers for food packaging: a review. *Trends in Food Science & Technology*, Volume 19, Issue 12, December 2008, Pages 634-643
- ⁱⁱ A. Sorrentino, G. Gorrasi, V. Vittoria. Potential perspectives of bio-nanocomposites for food packaging applications, *Trends in Food Science & Technology*, 18 (2007), pp. 84-95.
- ⁱⁱⁱ Ji, Li Na (June 2013). "Study on Preparation Process and Properties of Polyethylene Terephthalate (PET)". *Applied Mechanics and Materials*. **312**: 406–410.
- ^{iv} Thiele, Ulrich K. (2007) Polyester Bottle Resins, Production, Processing, Properties and Recycling, Heidelberg, Germany, pp. 85 ff, ISBN 978-3-9807497-4-9.
- ^v Polyesters", Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, A21, Weinheim: Wiley-VCH, 2005, pp. 233–238, doi:10.1002/14356007.a21_227.
- ^{vi} Jefferson Hopewell, Robert Dvorak and Edward Kosior. Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009; 364(1526): 2115–2126. doi: 10.1098/rstb.2008.0311
- ^{vii}
- <https://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/PackagingFCS/RecycledPlastics/default.htm>
- ^{viii} Francesca Patrignani, Lorenzo Siroli, Fausto Gardini and Rosalba Lanciotti. Contribution of Two Different Packaging Material to Microbial Contamination of Peaches: Implications in Their Microbiological Quality. *Front. Microbiol.* 16 June 2016
- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00938>.
- ^{ix} Amélie Rouger, Odile Tresse and Monique Zagorec. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms* 2017, 5(3), 50; doi:10.3390/microorganisms5030050.
- ^x Arícia Possas, Elena Carrasco, R.M. García-Gimeno, Antonio Valero. Models of microbial cross-contamination dynamics. *Current Opinion in Food Science*. Volume 14, April 2017, Pages 43-49.

-
- ^{xi} Rejane C.Goy, Sinara T.B.Morais, Odilio B.G.Assis. Evaluation of the antimicrobial activity of chitosan and its quaternized derivative on *E. coli* and *S. aureus* growth. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. Volume 26, Issue 1, January–February 2016, Pages 122-127.
- ^{xii} Ming Kong, Xi Guang Chen, Ke Xing, Hyun Jin Park. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 144, Issue 1, 15 November 2010, Pages 51-63.
- ^{xiii} Chatterjee AK, Chakraborty R, Basu T. Mechanism of antibacterial activity of copper nanoparticles. *Nanotechnology*. 2014; 25(13):135101. doi: 10.1088/0957-4484/25/13/135101. Epub 2014 Feb 28.
- ^{xiv} Maria Cristina Straccia, Giovanna Gomez d'Ayala, Ida Romano, Adriana Oliva, and Paola Laurienzo. Alginic Hydrogels Coated with Chitosan for Wound Dressing. *Mar Drugs*. 2015 May; 13(5): 2890–2908. 2015. doi: 10.3390/md13052890.
- ^{xv} Barry Heffernan, Cormac D. Murphy and Eoin Casey. Comparison of Planktonic and Biofilm Cultures of *Pseudomonas fluorescens* DSM 8341 Cells Grown on Fluoroacetate. *Appl. Environ. Microbiol.* May 2009 vol. 75 no. 9, 2899-2907.
- ^{xvi} Kives, J., B. Orgaz, and C. San Jose. 2006. Polysaccharide differences between planktonic and biofilm-associated EPS from *Pseudomonas fluorescens* B52. *Colloids Surf. B* 52:123-127.
- ^{xvii} Sokunrotanak Srey, Iqbal Kabir, Jahid Sang-DoHa. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. Volume 31, Issue 2, June 2013, Pages 572-585.
- ^{xviii} Holban AM, Gestal MC, Grumezescu AM. Control of biofilm-associated infections by signaling molecules and nanoparticles. *Int J Pharm.* 2016 Aug 30;510(2):409-18. doi: 10.1016/j.ijpharm.2016.02.044. Epub 2016 Mar 2.
- ^{xix} Winkelströter LK, Teixeira FB, Silva EP, Alves VF, De Martinis EC. Unraveling microbial biofilms of importance for food microbiology. *Microb Ecol.* 2014 Jul;68(1):35-46. doi: 10.1007/s00248-013-0347-4. Epub 2013 Dec 27.