

Μελέτη του σχηματισμού βιοϋμενίων στο τροφικό παθογόνο *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ST4/74

Ευθυμίου Γ., Βρυωνίδου Μ.Α., Τύπας Μ.Α., Παππά Α-Μ.

Τομέας Γενετικής και Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογίας, ΕΚΠΑ, Πανεπιστημιούπολη, Ιλίσσια 15701, Αθήνα

Το *Salmonella* είναι παθογόνο βακτήριο μεγάλης σημασίας, κλινικής και οικονομικής, αφού προκαλεί σοβαρές λοιμώξεις του γαστρεντερικού συστήματος (σαλμονελλώσεις) και αποτελεί μέγιστο πρόβλημα στους χώρους παραγωγής ή διάθεσης τροφίμων και στην κτηνοτροφία. Το στέλεχος *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ST4/74 απομονώθηκε από κρούσμα σαλμονέλλωσης στη Μεγάλη Βρετανία το 1966 και εξετάστηκε στην παρούσα εργασία ως στέλεχος για το οποίο προϋπήρχαν διαθέσιμα μοριακά εργαλεία. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προσήλκυσε ο σχηματισμός βιοϋμενίων (biofilms) στο ST4/74, ο σχηματισμός δηλαδή πολυκυτταρικών δομών ανώτερης οργάνωσης, που συγκροτούνται κατόπιν επικοινωνίας, συνεργασίας και διαφοροποίησης των κυττάρων που τις απαρτίζουν. Οι δομές αυτές καθιστούν τα βακτηριακά κύτταρα περισσότερο ανθεκτικά έναντι των παραγόντων που χρησιμοποιούνται για αντιμικροβιακή θεραπεία, αντισηψία ή απολύμανση. Με βάση την προϋπάρχουσα γνώση πάνω στα γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό βιοϋμενίων στο *Salmonella* και με χρήση βιοπληροφορικών εργαλείων, αναζητήθηκε η παρουσία ομολόγων γονιδίων στο γονιδίωμα του ST4/74, συγκροτήθηκαν λειτουργικά δίκτυα στα οποία αυτά συμμετέχουν, και εντοπίστηκαν υποσύνολα γονιδίων που μπορούν να εξυπηρετήσουν στη δημιουργία μοριακών βιοδεικτών πρώιμου ή όψιμου σχηματισμού υμενίων. Σε φαινοτυπικό επίπεδο, αξιολογήθηκε η δυνατότητα του ST4/74 να σχηματίζει βιοϋμένια σε αβιοτικές επιφάνειες (ανοξειδωτο ατσάλι, πλαστικά πολυμερή και νιτροκυτταρίνη) ή βιολογικά υλικά όπως το εκχύλισμα φυτικών ιστών. Με γνώμονα τον σχηματισμό βιοϋμενίων πάνω σε επιφάνειες πολυστυρενίου (τρυβλία Petri), εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, του pH και του θρεπτικού υλικού στη βιωσιμότητα των πλαγκτονικών ή βιοϋμενιακών κυττάρων και στη δημιουργία βιοϋμενίων αυτήν καθ' αυτήν. Βρέθηκε ότι το *Salmonella* σχηματίζει περισσότερο βιοϋμένιο στους 25 °C και σε αλκαλικό pH μετά από 144 h (6 ημέρες), η δε αλκαλικότητα ενισχύει τη μακροπρόθεσμη διατήρηση των βιοϋμενίων. Περισσότερο βιοϋμένιο επίσης σχηματίστηκε σε συνθήκες τροφοπενίας. Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα παραπάνω, καθώς και τις καθιερωμένες πρακτικές απολύμανσης, μελετήθηκε η επίδραση αλκαλικού καθαριστικού επιφανειών και ειδικά ο ρόλος του EDTA και των δισθενών κατιόντων στο σχηματισμό βιοϋμενίων *Salmonella*. Ο οργανισμός φάνηκε αρκετά ανθεκτικός στο εν λόγω καθαριστικό συγκριτικά με άλλα βακτήρια, ο δε σχηματισμός υμενίων βρέθηκε να εμποδίζεται από την παρουσία EDTA και χαλκού, ενώ αντιστρόφως να ενισχύεται από την προσθήκη ασβεστίου, μαγγανίου και σιδήρου. Τα παραπάνω ενδιαφέρουν άμεσα τόσο σε επίπεδο εφαρμογών, όσο και σε επίπεδο ανάλυσης των μοριακών μηχανισμών που τα διέπουν.

Ευχαριστούμε το Πρόγραμμα «ΘΑΛΗΣ 'ΒΙΟΪΜΕΝΙΑ' Κωδ. 63.0001».

Λέξεις-κλειδιά: *Salmonella*, βιοϋμένιο, τροφικά παθογόνα, αλκαλικά καθαριστικά

Study of biofilm formation by the food-borne pathogen *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ST4/74

Efthimiou G., Vryonidou M.L., Typas M.A., Pappas K.M.

Department of Genetics and Biotechnology, Faculty of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimioupolis, Ilissia 15701, Athens

Salmonella is a bacterial pathogen of great clinical and economic importance, since it causes serious gastrointestinal infections (salmonellosis) and poses as a major threat in the food and animal-breeding industries. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ST4/74 was isolated during a salmonella outbreak in Great Britain in 1966 and has been used in the work herein as a study case for biofilm formation in the organism. Biofilms are highly organized multicellular structures that are formed by bacteria engaging in cell-cell communication, aggregation, and differentiation. In clinical environments or the food industry, biofilms cause grave concern since they render the bacteria more tolerant to the therapeutic and disinfecting agents used to combat them. Based on previous knowledge regarding the genes involved in biofilm formation in *Salmonella*, and making use of bioinformatic tools, the presence of homologs in the genome of ST4/74 was investigated, functional gene networks were constructed, and subsets of candidates that may serve as biomarkers for early or late biofilm maturation were selected. At a phenotypic level, the ability of ST4/74 to form biofilms on abiotic surfaces (stainless steel, plastic polymers and nitrocellulose) or biological materials such as plant extracts was examined. Based on biofilm formation on polystyrene surfaces (Petri dishes), the effects of temperature, pH and growth medium on the survival of planktonic or biofilm-associated cells was investigated, and the formation of biofilms *per se* quantified. It was found that ST4/74 forms more biofilm at 25 °C, at alkaline conditions, and after 144 h (6 days), while alkalinity also seemed to enhance long-term preservation of biofilms. More biofilm also formed under starvation conditions. Based on the aforementioned and on standard disinfection practices, the effects of an alkaline surface detergent, EDTA, and bivalent cations on biofilm formation by *Salmonella* were also studied. The microorganism was found to be more tolerant to the detergent compared to other bacteria, while biofilm formation was prevented by EDTA and copper, and contrarily promoted by calcium, manganese and iron. These findings are of imminent interest towards applications and serve as source for further analysis regarding the molecular mechanisms involved.

We are thankful to the Network of Excellence «THALES – ‘BIOFILMS’ Pr. No. 63.0001»

Keywords: *Salmonella*, *biofilm*, *food-borne pathogens*, *alkaline detergents*