

Αναλυτική έκθεση με δεδομένα σχετικά με το σχηματισμό μιας μικτής βιο-υμενικής κοινότητας (mixed culture biofilm) (Π1-Δ1.1)

Τα βιο-υμένια είναι μικροβιακές κοινότητες που βρίσκονται προσκολλημένες σε μια επιφάνεια ή διεπιφάνεια και οι οποίες παράγουν ένα εξωκυττάριο υλικό το οποίο περικλείει τα κύτταρα αυτών (Costerton *et al.* 1995, Stoodley *et al.*, 2002). Ο σχηματισμός ενός βιο-υμενίου είναι ένα φυσικό φαινόμενο, το οποίο συμβαίνει σχεδόν οπουδήποτε μικροοργανισμοί και επιφάνειες βρίσκονται σε εγγύτητα (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Στη βιομηχανία τροφίμων, τα βιο-υμένια που σχηματίζονται πάνω σε επιφάνειες του εξοπλισμού από αλλοιογόνα και παθογόνα βακτήρια παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον και έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων (Giaouris *et al.*, 2011, Shi and Zhu, 2009). Προφανώς, η προσκόλληση αυτών των βακτηρίων πάνω σε επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με τρόφιμα και ο επακόλουθος σχηματισμός ενός βιο-υμενίου είναι κάτι ανεπιθύμητο, καθώς η πιθανή αποκόλληση των κυττάρων από τη βιο-υμενική δομή μπορεί να οδηγήσει σε επιμόλυνση των τροφίμων, οδηγώντας σε μείωση της διάρκειας συντήρησης αυτών, αλλά και πρόκληση τροφιμογενών νοσημάτων (Brooks and Flint, 2008). Ο κίνδυνος είναι μεγάλος, δεδομένου πως η ανθεκτικότητα των βιο-υμενικών κυττάρων έναντι αντιμικροβιακών μεταχειρίσεων αυξάνεται σημαντικά σε σχέση με την ανθεκτικότητα των ίδιων κυττάρων όταν αυτά βρίσκονται υπό πλαγκτονική μορφή (μη προσκολλημένα) (Gilbert *et al.*, 2002, Mah and O'Toole, 2001).

Το γένος *Salmonella* είναι προαιρετικά αναερόβιο, Gram αρνητικό ραβδόμορφο βακτήριο και ανήκει στην οικογένεια Enterobacteriaceae της οποίας οικογένειας τα μέλη διαφοροποιούνται με οροτυπικές μεθόδους. Έχουν ταυτοποιηθεί περίπου 2200 ορότυποι όμως λίγοι από αυτούς προκαλούν τροφοδηλητηριάσεις στον άνθρωπο. Μολύνσεις του ανθρώπου από *Salmonella* μπορούν να οδηγήσουν σε διάφορες κλινικές καταστάσεις όπως ο τυφοειδής πυρετός, η απλή εντεροκολίτιδα και οι συστηματικές μολύνσεις από μη τυφοειδείς μικροοργανισμούς. Ο εντερικός πυρετός είναι μια σοβαρή ανθρώπινη ασθένεια που συνδέεται με τυφοειδή και παρατυφοειδή στελέχη. Ένα άλλο παθογόνο βακτήριο, *Listeria monocytogenes* είναι ένα πολύ διαδεδομένο θετικό κατά Gram, προαιρετικά ενδοκυττάριο παθογόνο βακτήριο, το οποίο προκαλεί τη λιστερίωση, μια σοβαρή ασθένεια που χαρακτηρίζεται από υψηλά ποσοστά νοσοκομειακής περίθαλψης και θνησιμότητας, με την κατανάλωση ενός μολυσμένου τροφίμου να είναι ο κύριος τρόπος μετάδοσής της στους ανθρώπους (Gandhi and Chikindas, 2007, Kathariou, 2002). Οι ψευδομονάδες (*Pseudomonas* spp.) είναι αρνητικά κατά Gram υποχρεωτικά αερόβια βακτήρια, τα οποία αποικοδομούν μια ποικιλία από χαμηλού μοριακού βάρους οργανικά συστατικά. Όλοι οι παραπάνω μικροοργανισμοί είναι πολύ συνηθισμένοι στα φρέσκα τρόφιμα, εξαιτίας κυρίως της ευρείας ύπαρξης τους στο νερό, στο έδαφος και στη βλάστηση. Συνήθως, μολύνουν λαχανικά, έτοιμες σαλάτες αλλά και ζωικά προϊόντα όπως αυγά, κρέας, γάλα, πουλερικά, ιχθυρά, και λαχανικά. Πολλά είδη είναι ψυχρότροφα και αποτελούν σημαντικούς αλλοιογόνους μικροοργανισμούς των τροφίμων που συντηρούνται υπό ψύξη. Αξιοσημείωτα, οι ψευδομονάδες είναι ικανές να προσκολλώνται πάνω σε διάφορες επιφάνειες και να σχηματίζουν ισχυρά βιο-υμένια (Simões *et al.*, 2008).

Προφανώς, βιο-υμένια μπορούν να σχηματιστούν ακόμη και από ένα μοναδικό είδος βακτηρίου. Εντούτοις, στη συντριπτική πλειοψηφία των φυσικών αλλά και των τεχνητών περιβαλλόντων (π.χ. βιομηχανία τροφίμων), τα βιο-υμένια ενός μόνου είδους (mono-species biofilms) είναι σχετικά σπάνια. Αντιθέτως, οι μικροοργανισμοί προτιμούν να προσκολλώνται σε επιφάνειες σχηματίζοντας σύνθετες κοινότητες που απαρτίζονται από πολλά και διάφορα μικροβιακά είδη (Wimpenny, 2009, Wimpenny *et al.*, 2000). Επίσης, η μικροβιακή χλωρίδα που παραμένει πάνω σε επιφάνειες του βιομηχανικού εξοπλισμού ακολούθως της έκθεσης αυτού σε ανεπαρκή διαδικασία καθαρισμού και απολύμανσης είναι συνήθως μια σύνθετη κοινότητα, σε αντίθεση με τα εργαστηριακά μελετημένα βιο-υμένια ενός μόνου είδους (Gounadaki *et al.*, 2008). Προφανώς, αλλοιογόνα βακτήρια, όπως η *Ps. putida*, αλλά και παθογόνα, όπως Gram negative παθογόνα όπως Σαλμονέλα, μπορούν να παγιωθούν μέσα σε σύνθετες προσκολλημένες κοινότητες που σχηματίζονται πάνω σε τέτοιες επιφάνειες.

Μέχρι στιγμής, λίγες μόνο μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ανθεκτικότητα των μικτών βιο-υμενίων (mixed species biofilms) στην απολύμανση (Bremer *et al.*, 2002, Chorianoopoulos *et al.*, 2008, Fatemi and Frank, 1999, Norwood and Gilmour, 2000) και σχεδόν καμία με την ενδογενή χλωρίδα του φυτικού προϊόντος. Σε μια προηγούμενη μελέτη, βρέθηκε ότι η ενδογενής χλωρίδα του σπανακιού φάνηκε να επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη του παθογόνου *E. coli in vitro* και *in situ* (Lopez-Velasco *et al.*, 2012).

Παράλληλα, στις περισσότερες από αυτές τις μελέτες δεν περιλαμβάνονται αποτελέσματα σχετικά με την ανθεκτικότητα των βιο-υμενίων ενός μόνου είδους, καθιστώντας έτσι αδύνατο να κρίνει κάποιος κατά πόσο υπάρχει κάποια επίδραση των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων στην ανθεκτικότητα του κάθε ξεχωριστού είδους μέσα στη σύνθετη κοινότητα. Σε μια πρόσφατη μελέτη, οι Van der Veen and Abee (2011) μελέτησαν την ανθεκτικότητα βιο-υμενίων *L. monocytogenes* και *Lactobacillus plantarum*, που σχηματίστηκαν πάνω σε μικροπλακίδια πολυστυρενίου, υπό συνθήκες μονοκαλλιέργειας (μόνο ένα είδος), αλλά και συγκαλλιέργειας (δύο είδη μαζί) εναντίον του χλωριούχου βενζαλκονίου και του υπεροξικού οξέος. Αυτοί οι συνάδελφοι έδειξαν πως όταν αυτά τα δύο βακτηριακά είδη αναπτύσσονταν μαζί και σχημάτιζαν βιο-υμένιο, στις περισσότερες των περιπτώσεων, αυτό ήταν πιο ανθεκτικό στις αντιμικροβιακές μεταχειρίσεις σε σχέση με τα βιο-υμένια ενός μόνου είδους.

Στο πλαίσιο αυτού του έργου έχουν σχεδιαστεί επιμέρους εργασίες ώστε να μελετηθεί η αλληλεπίδραση στο σχηματισμό – επιβίωση του βιουμενίου του παθογόνου *Salmonella* με την ενδογενή χλωρίδα. Για το σκοπό αυτό μικροοργανισμοί από την ενδογενή χλωρίδα έτοιμης σαλάτας ρόκας και σπανακιού απομονώθηκαν. Αφού οι διαφορετικοί αυτοί μικροοργανισμοί ομαδοποιηθούν και ταυτοποιηθούν με μοριακές τεχνικές, θα εξεταστεί η επίδρασή τους στο σχηματισμό βιο-υμενίου *Salmonella*. Τα αποτελέσματα από την μελέτη, σχετικά με την ανθεκτικότητα και η πιθανή προσαρμοστικότητα μικτών βιο-υμενικών κοινοτήτων αποτελούμενες από κύτταρα Gram αρνητικού (*Ps. putida*) και Gram θετικού (*L. monocytogenes*) έναντι ενός κοινού απολυμαντικού μέσου, του χλωριούχου βενζαλκονίου, θα αξιολογηθούν και θα βοηθήσουν στον σχεδιασμό περαιτέρω πειραμάτων .

## Συζήτηση

Είναι γενικά αποδεκτό πως τα βιο-υμένια είναι ο κυρίαρχος τρόπος ζωής των βακτηρίων, σε όλα τα περιβάλλοντα, είτε φυσικά, είτε τεχνητά. Αυτή η προσκολλημένη μορφή κυτταρικής ανάπτυξης αποτελείται από ενσωματωμένα μέσα σε εξωκυττάριο γλυκοπολυμερές υλικό βακτήρια είτε ενός, είτε συνηθέστερα πολλών μικροβιακών ειδών, τα οποία σχηματίζουν μια αλληλοεξαρτώμενα δομημένη κοινότητα, ικανή για συντονισμένη και συλλογική συμπεριφορά (Nadell *et al.*, 2009). Παρόλο που οι μικροβιακές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα σε βακτήρια έχουν κυρίως μελετηθεί σε πλαγκτονικά συστήματα καλλιέργειας (Taylor-Robinson *et al.*, 2003), αυτές είναι πολύ πιο πιθανό να λαμβάνουν χώρα μέσα σε σύνθετα βιο-υμένια πολλών ειδών (multi-species biofilms), μέσα στα οποία γενετικά ευδιάκριτα βακτήρια μπορούν να προσκολληθούν το ένα στο άλλο μέσω ειδικών μορίων (Moons *et al.*, 2009, Rickard *et al.*, 2003, Yang *et al.*, 2011). Οι βακτηριακές αλληλεπιδράσεις μπορεί να επιτευχθούν μέσω εξωκυττάρων ενώσεων των οποίων ο μοναδικός ρόλος είναι να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση, μέσω μεταβολικής συνέργειας (metabolic cooperativity) ή ανταγωνισμού, μέσω φυσικής επαφής και τέλος μέσω παραγωγής αντιμικροβιακών εξωπροϊόντων (Davey and O'Toole, 2000). Ένα είδος ή και όλα αυτά τα είδη αλληλεπιδράσεων μπορεί να συμβαίνουν ταυτόχρονα και αρχίζουν να επηρεάζουν ένα βιο-υμένιο κατά τα αρχικά στάδια του σχηματισμού του, κατά την προσκόλληση των βακτηρίων στην επιφάνεια και την αποίκιση αυτής, και συνεχίζουν να επηρεάζουν τη δομή και τη φυσιολογία της βιο-υμενικής κοινότητας καθώς αυτή αναπτύσσεται (James *et al.*, 1995).

Τα αποτελέσματα της μελέτης σχετικά με την ανθεκτικότητα και η πιθανή προσαρμοστικότητα μικτών βιο-υμενικών κοινοτήτων αποτελούμενες από κύτταρα Gram αρνητικού (*Ps. putida*) και Gram θετικού (*L. monocytogenes*) έναντι ενός κοινού απολυμαντικού μέσου, (ως προκαταρκτική μελέτη λόγω της δυσκολίας δημιουργίας βιουμένιου από τον συγκεκριμένο παθογόνο) φανέρωσαν πως η ταυτόχρονη παρουσία των κυττάρων *L. monocytogenes* αύξησε σημαντικά την ανθεκτικότητα των βιο-υμενικών κυττάρων *Ps. putida* στον απολυμαντικό παράγοντα (BC), ενώ οι συνθήκες καλλιέργειας (μονοκαλλιέργεια / συγκαλλιέργεια) δεν φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά την ανθεκτικότητα των βιο-υμενικών κυττάρων *L. monocytogenes*. Αξιοσημείωτα, υπό συνθήκες συγκαλλιέργειας, το απολυμαντικό μέσο θανάτωσε κυρίως τα κύτταρα *L. monocytogenes*, κάτι το οποίο είχε σαν επακόλουθο, μετά την απολύμανση, η βιο-υμενική κοινότητα να αποτελείται κυρίως από κύτταρα στελεχών *Ps. putida*. Παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν ανεπαρκείς (υποθανάτιες) συγκεντρώσεις του απολυμαντικού μέσου, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική σταδιακή αύξηση της ανθεκτικότητας (προσαρμοστικότητα), ούτε για τα κύτταρα *Ps. putida*, αλλά ούτε και για τα κύτταρα *L. monocytogenes*. Εν κατακλείδι, η παρούσα μελέτη επισημαίνει τον αντίκτυπο των μικροβιακών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μέσα σε σύνθετες μικροβιακές κοινότητες, τόσο στη δυναμική των πληθυσμών τους, όσο και στην ανθεκτικότητά τους στη χημική απολύμανση. Η επεξεργασία παρόμοιων εργασιών με Σαλμονέλα βρίσκεται σε εξέλιξη. Αναμένεται ότι τα αποτελέσματα στην μελέτη της αλληλεπίδραση των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν από έτοιμες (φυτικές) σαλάτες με το παθογόνο *Salmonella*, και το σχηματισμό βιο-υμενίου από το τελευταίο, καθώς οι απομονωμένοι αυτοί μικροοργανισμοί έχουν προέλθει από ένα επεξεργασμένο από την βιομηχανία προϊόν. Πιο συγκεκριμένα, η μικροχλωρίδα της έτοιμης σαλάτας αποτελείται από μικροοργανισμούς που

επιβίωσαν κατά τον καθαρισμό – πλυσίματα του φυτού στην βιομηχανία καθώς και από πιθανή επιμόλυνση κατά τον τεμαχισμό με μικροοργανισμούς που είχαν σχηματίσει κοινότητες βιο-υμενίων στις επιφάνειες της βιομηχανίας.

Σε πραγματικά περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων, η παρουσία πολλών άλλων μικροβιακών ειδών σαφώς προσθέτει επιπλέον πολυπλοκότητα στη συμπεριφορά των μικτών βιο-υμενίων, δεδομένου πως όλοι οι ενσωματωμένοι μικροοργανισμοί είναι σε θέση να ανταγωνίζονται, να συνεργάζονται και να επικοινωνούν μεταξύ τους. Αναμφίβολα, απαιτείται περαιτέρω έρευνα χρησιμοποιώντας περισσότερα είδη και στελέχη προκειμένου να προσομοιωθούν καλύτερα εκείνες οι συνθήκες που πιθανώς απαντώνται σε πραγματικά σύνθετα οικοσυστήματα επεξεργασίας τροφίμων. Η καλύτερη κατανόηση της φυσιολογίας των μικτών βιο-υμενίων αποτελούμενα από πολλά μικροβιακά είδη θα μπορούσε πιθανότατα να διευκολύνει την ανάπτυξη μεθόδων για τον έλεγχο των ανεπιθύμητων βακτηριακών βιο-υμενίων σε χώρους παραγωγής και επεξεργασίας τροφίμων.

### Βιβλιογραφία

1. **Bremer, P. J., I. Monk, and R. Butler.** 2002. Inactivation of *Listeria monocytogenes/Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. *Lett. Appl. Microbiol.* 35:321-325.
2. **Brooks, J. D., and S. H. Flint.** 2008. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43:2163-2176.
3. **Chorianopoulos, N. G., E. D. Giaouris, P. N. Skandamis, S. A. Haroutounian, and G.-J. E. Nychas.** 2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. *J. Appl. Microbiol.* 104:1586-1596.
4. **Cocolin, L., S. Stella, R. Nappi, E. Bozzetta, C. Cantoni, and G. Comi.** 2005. Analysis of PCR-based methods for characterization of *Listeria monocytogenes* strains isolated from different sources. *Int. J. Food Microbiol.* 103:167-178.
5. **Costerton, J. W., Z. Lewandowski, D. E. Caldwell, D. R. Korber, and H. M. Lappin-Scott.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745.
6. **Davey, M. E., and G. A. O' Toole.** 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 64:847-867.
7. **Fatemi, P., and J. F. Frank.** 1999. Inactivation of *Listeria monocytogenes/Pseudomonas* biofilms by peracid sanitizers. *J. Food Prot.* 62:761-765.
8. **Gandhi, M., and M. L. Chikindas.** 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *Int. J. Food Microbiol.* 113:1-15.
9. **Giaouris, E., N. Chorianopoulos, P. Skandamis, and G.-J. Nychas.** 2011. Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments, in press. In: B. S. M. Mahmoud (ed.), *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*. Intech Open Access Publisher, Croatia.
10. **Gilbert, P., D. G. Allison, and A. J. McBain.** 2002. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.* 92 Suppl:98-110.
11. **Gounadaki, A. S., P. N. Skandamis, E. H. Drosinos, and G.-J. E. Nychas.** 2008. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages. *Food Microbiol.* 25:313-323.
12. **Hall-Stoodley, L., J. W. Costerton, and P. Stoodley.** 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:95-9108.

13. **James, G. A., L. Beaudette, and J. W. Costerton.** 1995. Interspecies bacterial interactions in biofilms. *J. Ind. Microbiol.* 15:257-262.
14. **Kathariou, S.** 2002. *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *J. Food Prot.* 65:1811-1829.
15. **Kostaki, M., N. Chorianopoulos, E. Brahou, G.-J. Nychas, and E. Giaouris.** 2012. Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:2586-2595
16. **Lopez-Velasco, G, H. A. Tydings, R. R. Boyer, J. O. Falkinham III, M. A. Ponder.** 2012. Characterization of interactions between *Escherichia coli* O157:H7 with epiphytic bacteria in vitro and on spinach leaf surfaces. *Int J Food Microbiol*
17. **Mah, T.-F. C., and G. A. O'Toole.** 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 9:34-39.
18. **Moons, P., C. W. Michiels, and A. Aertsen.** 2009. Bacterial interactions in biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 35:157-168.
19. **Nadell, C. D., J. B. Xavier, and K. R. Foster.** 2009. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:206-224.
20. **Norwood, D. E., and A. Gilmour.** 2000. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J. Appl. Microbiol.* 88:512-520.
21. **Rickard, A. H., P. Gilbert, N. J. High, P. E. Kolenbrander, and P. S. Handley.** 2003. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 11:94-100.
22. **Schlech, W. F. III, et al.** 1983. Epidemic listeriosis: evidence for transmission by food. *N. Engl. J. Med.* 308:203-206.
23. **Shi, X., and X. Zhu.** 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends Food Sci. Technol.* 20:407-413.
24. **Simões, M., L. C. Simões, and M. J. Vieira.** 2008. Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamics stresses. *Int. J. Food Microbiol.* 128:309-316.
25. **Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:187-209.
26. **Taylor-Robinson, J. D., M. Child, R. Pickup, P. Strike, and C. Edwards.** 2003. Cell-cell interactions influence resistance and survival of *Salmonella* serotype Typhimurium to environmental stress. *J. Appl. Microbiol.* 94:95-9102.
27. **van der Veen, S., and T. Abee.** 2011. Mixed species biofilms of *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus plantarum* show enhanced resistance to benzalkonium chloride and peracetic acid. *Int. J. Food. Microbiol.* 144:421-431.
28. **Wimpenny, J.** 2009. Microbial metropolis. *Adv. Microb. Physiol.* 56:29-84.
29. **Wimpenny, J., W. Manz, and U. Szewzyk.** 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:661-671.
30. **Yang, L., Y. Liu, H. Wu, N. Hoiby, S. Molin, and Z.-J. Song.** 2011. Current understanding of multi-species biofilms. *Int. J. Oral Sci.* 3:74-81.