



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Π.Μ.Σ. “Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου”
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: “Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων”
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

“Μελέτη σχηματισμού βιοϋμενίου από το παθογόνο βακτήριο *Cronobacter sakazakii* σε μονοκαλλιέργεια ή συγκαλλιέργεια με το βακτήριο *Bacillus subtilis*”

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Αθηνά Α. Αντουβά

Επιβλέπων καθηγητής: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς

ΑΘΗΝΑ, 2016

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου
Εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων

Π.Μ.Σ. “Επιστήμη και Τεχνολογία Τροφίμων και Διατροφή του Ανθρώπου”

ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: “Συστήματα Διαχείρισης Ποιότητας και Ασφάλειας Τροφίμων”

Μεταπτυχιακή Διατριβή

“Μελέτη σχηματισμού βιοϋμενίου από το παθογόνο βακτήριο *Cronobacter sakazakii* σε μονοκαλλιέργεια ή συγκαλλιέργεια με το βακτήριο *Bacillus subtilis*”

Αθηνά Α. Αντουβά

Επιβλέπων καθηγητής: Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς

ΑΘΗΝΑ, 2016

Μεταπτυχιακή Διατριβή

“Μελέτη σχηματισμού βιοϋμενίου από το παθογόνο βακτήριο *Cronobacter sakazakii* σε μονοκαλλιέργεια ή συγκαλλιέργεια με το βακτήριο *Bacillus subtilis*”

Αθηνά Α. Αντουβά

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γεώργιος-Ιωάννης Νυχάς, Καθηγητής, Διευθυντής Εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (Επιβλέπων)

Ελευθέριος Δροσινός, Καθηγητής

Ευστάθιος Πανάγου, Επίκουρος Καθηγητής

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, όπου γνώρισα ανθρώπους που συνέβαλαν τα μέγιστα για να κατορθώσω να ολοκληρώσω τα πειράματα και τη συγγραφή της μελέτης. Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά:

Τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Γεώργιο-Ιωάννη Νυχά, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου και την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το ενδιαφέρον και καινοτόμο θέμα των βιοϋμενίων.

Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Ελευθέριο Δροσινό και Επίκουρο Καθηγητή κ. Ευστάθιο Πανάγου, για τα σχόλια, τις διευκρινίσεις και την έμπνευση που μου έδωσαν καθ' όλη τη διάρκεια των μαθημάτων του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Ιδιαίτερα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μεταδιδάκτορα Αλεξάνδρα Λιανού για την πολύτιμη και άμεση συμβολή της στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στη συγγραφή της παρούσας διατριβής. Οι γνώσεις της, η μεθοδικότητα, η ακρίβεια και η αποφασιστικότητα που τη χαρακτηρίζουν αποτέλεσαν πρότυπο για τον μελλοντικό τρόπο εργασίας μου. Ήταν πάντα πρόθυμη να βοηθήσει, όποτε και αν τη χρειαζόμουν και θα ήθελα να της εκφράσω την αμέριστη ευγνωμοσύνη μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης θερμά τη διδάκτορα Ελένη Γκάννα για όλη τη βοήθεια, την άψογη συνεργασία, τη θετική ενέργεια, φιλική αντιμετώπιση και αμέριστη συμπαράσταση που έδειχνε πάντα, παρά τις δυσκολίες που μπορεί να προέκυπταν σε πρακτικό επίπεδο.

Δε θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω θερμά τη συνάδελφο και κυρίως φίλη, Ειρήνη Κανδαράκη, η οποία δε βοήθησε μόνο στην πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, αλλά μου στέκεται πάντα και σε προσωπικό επίπεδο. Είμαι τυχερή που απέκτησα μια τόσο καλή φίλη, μέσα από την παρακολούθηση του συγκεκριμένου Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους διδακτορικούς, μεταπτυχιακούς, προπτυχιακούς φοιτητές και το μόνιμο προσωπικό του εργαστηρίου Μικροβιολογίας Τροφίμων, για τη συμβολή τους σε ηθικό και πρακτικό επίπεδο, καθώς και για τη δημιουργία ενός φιλικού περιβάλλοντος εργασίας.

*Στους γονείς μου,
Μαρία και Άγγελο*

Και σε σένα, Άγγελέ μου

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	10
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	12
1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	13
1.1 Βιοϋμένιο	13
Ορισμός	13
Ιστορικά στοιχεία	14
Βιοϋμενική ανάπτυξη και περιβαλλοντική προσαρμογή	15
Δίκτυο εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS)	18
Κύκλος σχηματισμού βιοϋμενίου	19
1.2 Αλληλεπιδράσεις σε βιοϋμένια πολλαπλών βακτηριακών ειδών.....	21
Συνέργεια και ανταγωνισμός	23
Αίσθηση απαρτίας (quorum sensing)	25
Προστατευτική δράση.....	26
Αυξημένη μολυσματικότητα	27
Οριζόντια μεταφορά γονιδίων (horizontal gene transfer).....	28
1.3 <i>Bacillus subtilis</i>	30
Ταξινόμηση.....	30
Παθογένεια και επιδημιολογικά στοιχεία	30
Σχηματισμός βιοϋμενίου.....	31
1.4 <i>Cronobacter sakazakii</i>	33
Ταξινόμηση.....	33
Παθογένεια και επιδημιολογικά στοιχεία	34
Σχηματισμός βιοϋμενίου.....	36
2. ΣΚΟΠΟΣ	37
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	38
3.1 Καλλιέργειες.....	38
3.2 Θρεπτικά υλικά	38
3.3 Κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα.....	39
3.4 Σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων <i>Cronobacter sakazakii</i> και <i>Bacillus subtilis</i> σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα κάτω από συνθήκες μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας σε θρεπτικό ζυμό.....	40

Προετοιμασία εμβολίου.....	41
Ενοφθαλμισμός κουπονιών και ανάπτυξη βιοϋμενίου	41
Μικροβιολογικές αναλύσεις	42
Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τη συσκευή Malthus	42
3.5 Σχηματισμός βιοϋμενίου του βακτηρίου <i>Cronobacter sakazakii</i> σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα σε γάλα.....	43
Προετοιμασία εμβολίου.....	44
Ενοφθαλμισμός κουπονιών και ανάπτυξη βιοϋμενίου	44
Μικροβιολογικές αναλύσεις	44
3.6 Σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων <i>Cronobacter sakazakii</i> και <i>Bacillus subtilis</i> σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου (microtiter plates)	45
3.6.1 Σχηματισμός βιοϋμενίου των <i>C. sakazakii</i> και <i>B. subtilis</i> (μονοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργεια) σε θρεπτικό ζωμό	45
Εμβολιασμός και επώαση μικροσυστοιχιών	46
Χρώση κρυσταλλικού ιώδους και μέτρηση οπτικής πυκνότητας	46
3.6.2 Σχηματισμός βιοϋμενίου του <i>C. sakazakii</i> σε γάλα	47
Εμβολιασμός και επώαση μικροσυστοιχιών	47
Χρώση κρυσταλλικού ιώδους και μέτρηση οπτικής πυκνότητας	47
3.7 Προσαρμογή δεδομένων και στατιστική ανάλυση.....	47
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	49
4.1 Σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων <i>Cronobacter sakazakii</i> και <i>Bacillus subtilis</i> σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα κάτω από συνθήκες μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας σε θρεπτικό ζωμό	49
Κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα.....	49
Μέθοδος ηλεκτρικής αγωγιμότητας.....	52
4.2 Σχηματισμός βιοϋμενίου του βακτηρίου <i>Cronobacter sakazakii</i> σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα σε γάλα.....	55
4.3 Σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων <i>Cronobacter sakazakii</i> και <i>Bacillus subtilis</i> σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου (microtiter plates)	56
Σχηματισμός βιοϋμενίου των <i>C. sakazakii</i> και <i>Bacillus subtilis</i> (μονοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργεια) σε θρεπτικό ζωμό	56
Σχηματισμός βιοϋμενίου του <i>C. sakazakii</i> σε γάλα	62
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Δύο γένη βακτηρίων, τα οποία εμφανίζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων και τη δημόσια υγεία, είναι τα *Cronobacter* και *Bacillus*. Το *Cronobacter sakazakii* είναι ένα ευκαιριακό παθογόνο βακτήριο, η ανεύρεση του οποίου στη σκόνη βρεφικού γάλακτος έχει συσχετιστεί με πληθώρα περιστατικών τροφιογενών λοιμώξεων σε νεογνά και βρέφη. Η σοβαρότητα των συμπτωμάτων υποδεικνύει την αναγκαιότητα πρόληψης επιμολύνσεων στο περιβάλλον παρασκευής και επεξεργασίας της φόρμουλας βρεφικού γάλακτος. Ταυτόχρονα, τα προϊόντα γάλακτος σε σκόνη επιμολύνονται συχνά με αλλοιωγόνα στελέχη του σποριογόνου βακτηρίου *Bacillus subtilis*, το οποίο είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στη φύση.

Οι συχνότερες εστίες μικροβιακών επιμολύνσεων σε περιβάλλοντα επεξεργασίας τροφίμων είναι τα βιοϋμένια τα οποία έχουν σχηματιστεί σε επιφάνειες και εξοπλισμούς των βιομηχανιών. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου αποτελεί πλέον καθολικό γνώρισμα των βακτηρίων, το οποίο παρουσιάζει εξαιρετική ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών και υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Ειδικότερα, τα μικτά βιοϋμένια αποτελούν δυναμικά συστήματα, όπου κυριαρχούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών, έχοντας ως αποτέλεσμα την ενίσχυση της προσαρμοστικότητας σε αντίξοες συνθήκες. Η ικανότητα προσκόλλησης και ανάπτυξης βιοϋμενίου των *C. sakazakii* και *B. subtilis* χωριστά έχουν μελετηθεί εκτενώς. Ωστόσο, λόγω της κοινής ανεύρεσής τους σε προϊόντα σκόνης γάλακτος, είναι πιθανό να συνυπάρχουν σε μορφή βιοϋμενίων.

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η αξιολόγηση της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου των βακτηρίων *C. sakazakii* και *B. subtilis*, υπό συνθήκες μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε αρχικά, ήταν η ανάπτυξη σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα, τα οποία εμβολιάστηκαν με τις βακτηριακές καλλιέργειες σε αλατούχο διάλυμα και επώαστηκαν στους 15°C για 3 h (στάδιο προσκόλλησης). Στη συνέχεια, τα κουπόνια με τα ισχυρώς προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό ζωμό και επώαστηκαν περεταίρω στους 37°C για 72 h ή στους 20°C για 144 h. Παράλληλα, έλαβαν χώρα συμπληρωματικές μετρήσεις ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τη συσκευή Malthus, κατά την τελευταία δειγματοληψία. Σε δεύτερο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν πειράματα, όπου ο θρεπτικός ζωμός αντικαταστάθηκε με γάλα, προκειμένου να ελεγχθεί η πιθανή επίδραση ενός τροφίμου, ως υπόστρωμα, στη βιοϋμενική ανάπτυξη του *C. sakazakii* στους 20°C. Οι ζώντες βιοϋμενικοί πληθυσμοί ανακτήθηκαν και προσδιορίστηκαν με δειγματοληψίες και μικροβιολογικές αναλύσεις ανά 24 h (37°C) ή 48 h (20°C). Στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων, αξιολογήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου (microtiter plates). Η βιοϋμενική ανάπτυξη ποσοτικοποιήθηκε μέσω χρωμομετρικής μεθόδου με κρυσταλλικό ιώδες, η οποία βασίζεται σε μετρήσεις οπτικής πυκνότητας της βιοϋμενικής μάζας που έχει σχηματιστεί στα τοιχώματα των βοθρίων των μικροσυστοιχιών. Όπως και στο πρώτο

μέρος των πειραμάτων, ελέγχθηκε πρώτα η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου των *C. sakazakii* και *B. subtilis* σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας σε θρεπτικό ζωμό (TSB και αραιωμένο TSB, dTSB 1:20). Οι μικροσυστοιχίες επώαστηκαν στους 5°C, 10°C, 20°C και 37°C. Ακολούθως, ο θρεπτικός ζωμός αντικαταστάθηκε με διαφορετικά είδη γάλακτος, ώστε να μελετηθεί η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου για τον *C. sakazakii* στις αντίστοιχες θερμοκρασίες.

Ο σχηματισμός βιοϋμενίου βρέθηκε να επηρεάζεται από το χρόνο, το βακτηριακό είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας (μονοκαλλιέργεια και μικτή καλλιέργεια). Όσον αφορά στα κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα, η μονοκαλλιέργεια του *C. sakazakii* φάνηκε να σχηματίζει σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερο βιοϋμένιο σε σύγκριση με τον *B. subtilis*, για τις πρώτες 48 h της επώασης στους 20°C. Στους 37°C, η ύπαρξη του *B. subtilis* στη συγκαλλιέργεια φάνηκε να ενισχύει σημαντικά ($p < 0,05$) την ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου από τον *C. sakazakii*. Σε παρόμοια αποτελέσματα δεν κατέληξε η επώαση στους 20°C. Περνώντας στη δοκιμασία των μικροσυστοιχιών, δε λήφθηκαν εξίσου σημαντικά αποτελέσματα, καθώς οι τιμές τυπικής απόκλισης ήταν μεγάλες. Γενικότερα, τα πειράματα έδειξαν πως με την αύξηση της θερμοκρασίας οι τιμές οπτικής πυκνότητας αυξάνονται, γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί ως υψηλότερο επίπεδο σχηματισμού βιοϋμενίου. Ανάπτυξη βιοϋμενίου με γάλα ως θρεπτικό υπόστρωμα, υπήρξε μόνο στην περίπτωση της φόρμουλας βρεφικού γάλακτος, όταν οι μικροσυστοιχίες επώαστηκαν στους 20°C.

Συμπερασματικά, η υψηλή ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου του παθογόνου βακτηρίου *C. sakazakii*, και στις δύο επιφάνειες που αξιολογήθηκαν στην παρούσα μελέτη, τονίζει τη σημασία της πρόληψης επιμόλυνσης και του σωστού και επαρκούς καθαρισμού των επιφανειών που δύναται να έλθουν σε επαφή με τρόφιμα. Επιπλέον, η σημαντική ενίσχυση της βιοϋμενικής ανάπτυξης του *C. sakazakii* σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα από την παρουσία του *B. subtilis* συνιστά ένα εξίσου σημαντικό εύρημα. Αν και μη παθογόνο, το βακτήριο *B. subtilis* αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τις γαλακτοβιομηχανίες, λόγω της αλλοίωσης των προϊόντων που προκαλεί. Βέβαια, εφόσον φάνηκε να ενισχύει την παραγωγή βιοϋμενίου ενός παθογόνου βακτηρίου, προστίθεται ένας ακόμη λόγος ανησυχίας, πέραν της αλλοίωσης των τροφίμων.

Λέξεις-κλειδιά: βιοϋμένιο, συγκαλλιέργεια, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

Two important bacterial genera for the food industry and public health are *Cronobacter* and *Bacillus*. *Cronobacter sakazakii* is an opportunistic foodborne pathogen commonly isolated from powdered infant formula. Consumption of contaminated infant formula has been correlated with numerous foodborne illness cases in neonates and infants. The severity of the symptoms underlines the need to prevent contamination of the production and processing environments. At the same time, milk powder products are also frequently contaminated with the spore-forming species of the genus *Bacillus*.

One of the most common sources of microbial contamination of food is through biofilms formed on surfaces and equipment used in food industries. Nowadays, biofilm forming ability is alleged to be a universal trait of bacteria, showing many differences among species and under different environmental conditions. Multi-species biofilms especially, are dynamic systems, where variable interactions among the different species dominate, resulting in the reinforcement of adaptation under unfavorable environmental conditions. *C. sakazakii* and *B. subtilis* biofilm formation abilities under monoculture conditions has been extensively studied. However, due to their common isolation from powdered milk products, their coexistence within biofilm communities is likely.

The aim of this study was to evaluate the biofilm-forming ability of *C. sakazakii* and *B. subtilis* under mono- or mixed-culture conditions. In the first place, biofilm formation was studied on stainless steel (SS) coupons utilizing a two-step procedure: SS coupons were initially incubated in saline bacterial suspensions at 15°C for 3 h (attachment step) and afterwards, coupons carrying strongly attached bacteria were further incubated in broth at 37°C for 72 h or at 20°C for 144 h. Meanwhile, supplementary electric impedance measurements took place, using the Malthus system device. Afterwards, broth was replaced with milk, in order to study food, instead of artificial medium, and its possible effect on biofilm growth of *C. sakazakii* at 20°C. Viable biofilm bacterial populations were determined, using the bead vortexing method, after initial attachment, and at 24-h and 48-h intervals during incubation at 37°C and 20°C, respectively. Then, biofilm formation was investigated and quantified via the crystal violet assay and optical density measurements. Likewise, the biofilm-forming ability of *C. sakazakii* and *B. subtilis* under mono- and mixed culture conditions was studied in broth (TSB and diluted TSB, dTSB 1:20 dilution) as artificial medium. The microtiter plates were incubated at 5°C, 10°C, 20°C and 37°C. Next, broth was substituted with different types of milk.

Biofilm formation was found to be influenced by time, bacterial species and culture conditions (mono- or mixed-culture). Regarding the mono-culture conditions on SS coupons, *C. sakazakii* exhibited a significantly ($p < 0.05$) higher biofilm formation compared to *B. subtilis* for the first 48 h of incubation at 20°C. Co-culture with *B. subtilis* within a dual-species community significantly ($p < 0.05$) enhanced the biofilm-forming ability of *C. sakazakii* at 37°C; nonetheless, no corresponding difference was observed with regard to biofilm formation at 20°C. Microtiter plates

results didn't reach to such important results, as standard deviation values were high. In general, increase in temperature brought increase in optical density, which may be interpreted as higher level of biofilm growth. Biofilm formation in milk was only observed in infant formula incubated at 20°C.

As a conclusion, the high biofilm-forming ability of the pathogenic *C. sakazakii* in both studied surfaces, underlines the need of prevention of contamination and adequate cleaning procedures of surfaces that can possibly come into contact with food. Moreover, the enhancement of *C. sakazakii* biofilm growth on SS coupons when co-cultured with *B. subtilis*, constitutes a really important finding. Even though *B. subtilis* is non-pathogenic, the spoilage that it can provoke causes problems to food industries. Hence, the enhancement of biofilm-formation of a pathogenic species caused by *B. subtilis*, raises additional concerns beyond its importance as food spoilage microorganism.

Key-words: biofilm, mixed-culture, *Cronobacter sakazakii*, *Bacillus subtilis*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η απαρχή της μικροβιολογίας όριζε την ύπαρξη των βακτηρίων υπό μορφή υδατικής καλλιέργειας, σε ελεύθερη διασπορά μεμονωμένων κυττάρων (πλαγκτονική). Ωστόσο, η σύγχρονη επιστημονική κοινότητα αποδέχεται την επικράτηση των βακτηρίων, τόσο σε φυσικά περιβάλλοντα όσο και σε αβιοτικές επιφάνειες, σε μορφή βιοϋμενίων. Οι μικροοργανισμοί που κυριαρχούν στις επιφάνειες εκδηλώνουν διακριτούς φαινότυπους μεταγραφής γονιδίων και ρυθμού ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να ενεργοποιούν εξειδικευμένους μηχανισμούς για την αρχική προσκόλληση στην επιφάνεια, την ανάπτυξη κοινοτικής δομής και την τελική αποκόλληση.

Μέχρι και σήμερα, οι επιστημονικές γνώσεις πάνω στα βιοϋμένια εμπλουτίζονται αδιάκοπα, διαφωτίζοντας τους μηχανισμούς σχηματισμού και ανάπτυξης σε μοριακό επίπεδο. Το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα βιοϋμένια οφείλεται στην οικολογική σημασία, στο πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών και στην πιθανή εμπλοκή τους σε ανθρώπινες λοιμώξεις (Hall-Stoodley et al., 2004). Σε κλινικό επίπεδο για παράδειγμα, είναι δυνατό να σχηματιστούν σε οποιοδήποτε μόνιμο ιατρικό εξάρτημα ασθενούς, ενώ σε επίπεδο βιομηχανίας, αποφράσσουν συχνότερα τις σωληνώσεις (Hall-Stoodley και Stoodley, 2009). Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου αποτελεί πλέον καθολικό γνώρισμα των βακτηρίων, το οποίο παρουσιάζει εξαιρετική ποικιλομορφία μεταξύ των ειδών και υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Δύο γένη βακτηρίων, τα οποία εμφανίζουν εξαιρετικό ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων και τη δημόσια υγεία, είναι τα *Cronobacter* και *Bacillus*. Τα είδη του γένους *Cronobacter* χαρακτηρίζονται ως ευκαιριακά παθογόνα με σοβαρές επιπτώσεις όπως βακτηριακός, νεκρωτική εντεροκολίτιδα και νεογνική μηνιγγίτιδα. Το *Cronobacter* spp. φαίνεται να έχει χαμηλή μολυσματική δόση και μικρή περίοδο επώασης, ενώ προσβάλλει κυρίως νεογνά. Τα αποτελέσματα δύο επιστημονικών συναντήσεων των FAO/WHO (2004, 2008) για τη μικροβιολογική ασφάλεια της σκόνης βρεφικού γάλακτος, βρίσκουν αδιαμφισβήτητη υπαιτιότητα μεταξύ τροφογενών λοιμώξεων σε νεογνά από κατανάλωση φόρμουλας και ανεύρεσης του *Cronobacter sakazakii* στη σκόνη βρεφικού γάλακτος. Αν και η συχνότητα των περιστατικών δεν είναι υψηλή, η σοβαρότητα των συμπτωμάτων υποδεικνύει την αναγκαιότητα λήψης προληπτικών μέτρων ενάντια στη νεογνική λοίμωξη από *C. sakazakii*.

Το βακτήριο *Bacillus subtilis* αντίθετα, είναι ιδιαίτερα διαδεδομένο στη φύση, αλλοιωγόνο για τα τρόφιμα, με χαρακτηριστική ικανότητα σποριογένεσης σε αντίξοες συνθήκες. Αυτά τα χαρακτηριστικά το καθιστούν έναν από τους κύριους μικροοργανισμούς που δημιουργούν προβλήματα στις βιομηχανίες τροφίμων, ειδικότερα γάλακτος και παραγώγων του. Η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου και η ανάπτυξή του έχουν μελετηθεί εκτενώς. Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εξετάζει για πρώτη φορά την πιθανή επίδραση μιας συγκαλλιέργειας των παραπάνω βακτηρίων (*C. sakazakii* και *B. subtilis*) στα στάδια προσκόλλησης και ανάπτυξης βιοϋμενίου.

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Βιοϋμένιο

Ορισμός

Σύμφωνα με τον ορισμό της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC), το βιοϋμένιο είναι ένα συνονθύλευμα μικροοργανισμών, οι οποίοι βρίσκονται προστατευμένοι εντός ενός σύνθετου στρώματος ένυδρων εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (extracellular polymeric substances, EPS). Πρόκειται κυρίως για ουσίες πολυσακχαριδικής φύσεως, DNA ή/και πρωτεΐνες, όμως μη κυτταρικές ύλες, όπως μεταλλικοί κρύσταλλοι, σωματίδια σκουριάς, πηλού, λάσπης ή συστατικών του αίματος είναι δυνατό να βρεθούν εντός του βιοϋμενικού στρώματος, ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης (Donlan, 2002).

Τα μικροβιακά κύτταρα ενός βιοϋμενίου μπορεί να είναι:

- μεμονωμένα
- προσκολλημένα μεταξύ τους
- προσκολλημένα σε αβιοτικές/αδρανείς επιφάνειες (π.χ. μέταλλο, πλαστικό, γυαλί)
- προσκολλημένα σε μεσεπιφάνειες, όχι απαραίτητα αβιοτικές (π.χ. μεταξύ αέρα-τροφίμου)
- προσκολλημένα σε βιοτικές επιφάνειες (π.χ. φυτικοί ιστοί, επιθηλιακά κύτταρα ξενιστή).

Πρόκειται για μια κοινότητα μικροβιακών κυττάρων, ένα λειτουργικό σύστημα που έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται εσωτερικά ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Σχηματίζεται ως φυσική διαδικασία, σχεδόν οπουδήποτε υπάρχουν μικροοργανισμοί και επιφάνειες, με βασικές προϋποθέσεις την αρχική δυνατότητα προσκόλλησης και ακολούθως την παρουσία υπολειμμάτων οργανικής ύλης, που θα είναι ικανή να διατηρήσει εν ζωή και να επιτρέψει τον πολλαπλασιασμό των προσκολλημένων κυττάρων. Ο δεσμός μεταξύ επιφάνειας και μικροβιακών κυττάρων του βιοϋμενίου είναι άρρηκτος, δηλαδή μικροβιακά κύτταρα δεν μπορούν να αποκολληθούν με ήπιο ξέβγαλμα. Η επικράτησή τους σε ανθρωπογενείς/τεχνητούς χώρους και εξοπλισμούς, αλλά και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά σχηματισμού και ανάπτυξης τους αποτελούν τους λόγους ευρείας μελέτης τους (Skandamis, 2012).

Ο μικροβιακός πληθυσμός των βιοϋμενίων που απαντάται στη φύση είναι κατά κύριο λόγο μικτός, ωστόσο η καθαρή καλλιέργεια ενός μικροοργανισμού μπορεί ομοίως να σχηματίσει βιοϋμένιο, συνήθως υπό εργαστηριακές συνθήκες. Όταν ένα κύτταρο τίθεται σε βιοϋμενική μορφή ανάπτυξης, υποβάλλεται σε μια σειρά φαινοτυπικών αλλαγών, οι οποίες υπόκεινται σε διαφορετική γονιδιακή ρύθμιση (An and Parsek, 2007). Ανεξαρτήτως των μικροοργανισμών και των μη κυτταρικών υλών που μπορεί να τα απαρτίζουν, τα βιοϋμένια παρουσιάζουν τα εξής κοινά χαρακτηριστικά:

- διαφορές στην κυτταρική φυσιολογία από τα πλαγκτονικά κύτταρα
- ετερογένεια σε χώρο και χρόνο
- υψηλού βαθμού βιοποικιλότητα που διευκολύνει την ανταλλαγή γονιδίων
- μακρόχρονη συγκράτηση των γειτονικών κυττάρων μεταξύ τους
- αυξημένη ανθεκτικότητα σε στρεσογόνους παράγοντες

Ιστορικά στοιχεία

Επί σειρά ετών, στον τρόπο ζωής των βακτηρίων αποδίδονταν η αυτονομία και η αυτάρκεια που χαρακτηρίζουν μονοκύτταρους και όχι ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς. Σε κατάσταση λοίμωξης, η βακτηριακή μάζα θεωρούταν απλοϊκά, ως το αθροιστικό σύνολο όλων των μονοκύτταρων οργανισμών. Τα κριτήρια του Koch και η προσέγγιση του καθορισμού των παθογόνων με την εργαστηριακή μέθοδο της καθαρής καλλιέργειας συνέβαλαν ουσιαστικά στη διαμόρφωση της συγκεκριμένης αντίληψης. Σε αυτήν άλλωστε, οφείλονταν η μεγάλη επιτυχία της ταυτοποίησης των παθογόνων βακτηρίων και η δημιουργία αντιβιοτικών θεραπειών. Ωστόσο, η ανάπτυξη των βακτηρίων σε μορφή καθαρής καλλιέργειας πλαγκτονικών κυττάρων απαντάται σπάνια στο φυσικό περιβάλλον, όπου επικρατούν τα βιοϋμένια (Li and Tian, 2012).

Η ανακάλυψη των βιοϋμενίων μπορεί να αποδοθεί στον Van Leeuwenhoek, ο οποίος παρατήρησε πρώτος μικροοργανισμούς στην επιφάνεια των δοντιών, χρησιμοποιώντας το απλό οπτικό μικροσκόπιο (Donlan, 2002). Ακολούθησαν άλλες αξιοσημείωτες παρατηρήσεις, οι οποίες έστρεψαν τα επόμενα χρόνια τους ερευνητές σε περαιτέρω διερεύνηση του θέματος. Οι Heukelekian και Heller, έγιναν μάρτυρες του φαινομένου “bottle effect” κατά το οποίο η ανάπτυξη και δραστηριότητα των θαλάσσιων μικροοργανισμών παρουσιάζεται ιδιαίτερα αυξημένη, με την ενσωμάτωση μιας επιφάνειας εντός του υγρού περιβάλλοντος, όπου και μπορούσαν να προσκολληθούν (Heukelekian and Heller, 1940). Παρομοίως, ο Zobell διαπίστωσε ότι ο αριθμός των βακτηρίων σε επιφάνεια ήταν δραματικά υψηλότερος σε σχέση με το περιβάλλον μέσο (Zobell, 1943).

Η λεπτομερής εξέταση των βιοϋμενίων ωστόσο, πραγματοποιήθηκε αργότερα με τη χρήση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου, το οποίο προσέφερε μικροσκοπία υψηλής ευκρίνειας. Οι Jones et al. (1969) χρησιμοποίησαν ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και διέλευσης (TEM) για να εξετάσουν βιοϋμένια σε σωλήνες εργοστασίου διαχείρισης λυμάτων. Τα αποτελέσματα, βάσει κυτταρικής μορφολογίας, έδειξαν την ύπαρξη πλήθους διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών. Αποδείχθηκε μάλιστα, με τη χρήση χρώσης ερυθρού του ρουθηνίου ότι το υλικό που βρίσκονταν εγκλεισμένα τα κύτταρα ήταν πολυσακχαρίτης.

Η μελέτη του Characklis το 1973 σε γλοιό προερχόμενο από συστήματα νερού βιομηχανιών, κατέδειξε την υψηλή ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων σε ισχυρά απολυμαντικά, όπως η χλωρίνη. Το 1978 οι Costerton et al., μελετώντας μικροβιακές κοινότητες οδοντικής πλάκας και ορεινών χείμαρρων, εξήγησαν τους μηχανισμούς προσκόλλησης σε βιοτικές και αβιοτικές επιφάνειες. Από εκείνη την εποχή και έπειτα, οι μελέτες για τα βιοϋμένια εστιάζουν κυρίως σε βιομηχανικά και

άλλα περιβάλλοντα, τα οποία κρύβουν πιθανούς κινδύνους για τη δημόσια υγεία. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες, οι έρευνες στηρίζονταν στην ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) και στις κλασικές μικροβιολογικές εργαστηριακές μεθόδους για τον προσδιορισμό του μικροβιακού φορτίου. Ωστόσο, η αποκάλυψη νέων ερευνητικών οδών και η βαθύτερη κατανόηση των βιοϋμενίων έγιναν δυνατές με τη στροφή της έρευνας σε γονιδιακό επίπεδο και τη χρήση του συνεστιακού μικροσκοπίου με ακτίνες laser, το οποίο αποσαφήνισε την υπερδομή τους.

Βιοϋμενική ανάπτυξη και περιβαλλοντική προσαρμογή

Σύμφωνα με τη θεωρία της εξέλιξης του Δαρβίνου, η κινητήριος δύναμη της πορείας ενός οργανισμού είναι η προσαρμογή στις εκάστοτε συνθήκες, με κύριο σκοπό την ικανότητα αναπαραγωγής. Οποιοδήποτε γνώρισμα ωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, θα επιβιώσει εντός του είδους. Όταν τα βακτήρια μελετώνται σε πλαγκτονική μορφή στο εργαστήριο, ο βιοϋμενικός τρόπος ανάπτυξης μοιάζει να αντιβαίνει αυτή τη θεωρία. Στο εξωτερικό περιβάλλον όμως, οι συνθήκες ανάπτυξης και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών δεν είναι ιδανικές, όπως αυτές που προσφέρει ένα θρεπτικό μέσο καλλιέργειας. Ο σχηματισμός βιοϋμενίων προσδίδει πολλά πλεονεκτήματα, που οδηγούν τα βακτηριακά κύτταρα να αλλάξουν τρόπο ζωής.

Ο βασικότερος ρόλος του βιοϋμενίου είναι η προστασία των βιοϋμενικών κυττάρων, μέσω διατήρησης της ομοιόστασης και της σταθερότητάς τους, απέναντι σε ένα διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον. Εντός του βιοϋμενίου, τα βακτήρια ανταποκρίνονται καλύτερα σε στρεσογόνους παράγοντες, όπως έλλειψη θρεπτικών συστατικών και νερού, ελεύθερες ρίζες, αντιβιοτικά ή αλλαγές στο pH, σε σχέση με τις αντίστοιχες πλαγκτονικές μορφές τους. Ένα ώριμο βιοϋμένιο είναι 10-1000 φορές πιο ανθεκτικό σε συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών παραγόντων, οι οποίες θα ήταν ικανές να εξουδετερώσουν τα γενετικά ισότιμα πλαγκτονικά κύτταρα (Lewis, 2001). Επίσης, ενισχύονται ενάντια στη φαγοκυττάρωση, με τα φαγοκύτταρα που επιτίθενται στα βιοϋμένια να βλέπουν περισσότερο γειτονικούς ιστούς. Ένα από τα εν δυνάμει μέρη προσκόλλησης και ανάπτυξης βιοϋμενίου στο φυσικό περιβάλλον είναι οι ρίζες φυτών. Το σύνθετο στρώμα των EPS του βιοϋμενίου προστατεύει τα βιοϋμενικά κύτταρα από τους αμυντικούς μηχανισμούς των φυτών, οι οποίοι ενεργοποιούνται όταν προσβάλλονται από παθογόνα. Συμβάλλει συνεπώς, στον αποικισμό των ριζών από διάφορα είδη βακτηρίων κατά το στάδιο ανάπτυξης του φυτού και χάρη στον υψηλό βαθμό των EPS, αποφεύγεται η αποξήρανση (desiccation) (Kavamura and de Melo, 2013). Το πλέγμα των EPS δε συμβάλλει μόνο στη δομή και την προσκόλληση, αλλά είναι το γνώρισμα που σχετίζεται ισχυρότερα με την ενίσχυση της άμυνας των βιοϋμενίων. Ως αμυντικός μηχανισμός στα Gram-αρνητικά βακτήρια, φαίνεται να λειτουργούν και κυστιδικές δομές του πλέγματος των EPS, με ένζυμα και DNA, τα οποία μπορούν να μεταβάλλουν τις ιδιότητες του βιοϋμενικού πλέγματος, απειλώντας μικροοργανισμούς-ανταγωνιστές. Τα βιοϋμένια παθογόνων του ανθρώπου αντιστέκονται απέναντι σε φυσικές δυνάμεις, όπως της αιματικής ροής και της έκπλυσης από το σίελο. Ο χρόνιος χαρακτήρας ορισμένων λοιμώξεων οφείλεται, χωρίς αμφιβολία, στην ανάπτυξη ανθεκτικών βιοϋμενίων.

Το ανθρώπινο σώμα αποτελεί ιδανικό ξενιστή για τα παθογόνα βακτήρια, καθώς προσφέρει κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας, διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών και οξυγόνου. Διαθέτει όμως, ένα περίτεχνο ανοσοποιητικό σύστημα, το οποίο εξελίσσεται συνεχώς, ως συνέπεια της διαρκούς προσπάθειας αποίκισής του από παθογόνα. Συνεπώς, η ενίσχυση της άμυνας δεν είναι ο μοναδικός λόγος ενεργοποίησης της βιοϋμενικής κυτταρικής μορφής ανάπτυξης των βακτηρίων. Πρόκειται για μια στρατηγική προσκόλλησης και επιβίωσης σε ένα πρόσφορο περιβάλλον, ακόμη και αν είναι τόσο εχθρικό, όπως ο ανθρώπινος οργανισμός. Εξωκυτταρικοί πρωτεϊνικοί υποδοχείς του ξενιστή, όπως η φιμπρονεκτίνη και η ελαστίνη του ανθρώπινου σώματος, βοηθούν στην αρχική προσκόλληση των βακτηρίων σε στερεές επιφάνειες, όπου προσδένονται βακτηριακές επιφανειακές πρωτεΐνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα ο *Staphylococcus aureus*, ο οποίος παράγει παράγοντες πρόσδεσης A και B της φιμπρονεκτίνης (*FnBA/B*) και μια πρωτεΐνη πρόσδεσης κολλαγόνου (*Cna*). Ο *Streptococcus pyogenes* διαθέτει γονίδια για πρωτεΐνες πρόσδεσης της φιμπρονεκτίνης (*prtF*) και του φιμπρινογόνου (*emm*) (Patti et al., 1994). Οι στρεπτόκοκκοι που προσβάλλουν τη στοματική κοιλότητα έχουν αναπτύξει ικανότητα πρόσδεσης και στην επιφάνεια των δοντιών, συγκεκριμένα στην οδοντική μεμβράνη που σχηματίζεται από σιαλικές γλυκοπρωτεΐνες και λιπίδια (πρωτεΐνες πρόσδεσης *SspA*, *SspB* του *Streptococcus gordonii* και *SpaP* του *Streptococcus mutans*) (Burne, 1998, Loo, 2003). Μαστίγια, κροσσοί και τριχίδια συμμετέχουν στην αρχική προσκόλληση των *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* και *Salmonella enterica* (Lejeune, 2003). Μόλις το βιοϋμένιο εγκατασταθεί, η έκφραση των μηχανισμών κίνησης και ορισμένων πρωτεϊνών αρχικής προσκόλλησης καταστέλλεται, καθώς δεν είναι χρήσιμες στα επόμενα στάδια ανάπτυξης του βιοϋμενίου.

Η υπόθεση σχηματισμού βιοϋμενίου, προς όφελος της ανάπτυξης σε πρόσφορο περιβάλλον, ενισχύεται από τη σημασία της γονιδιακής ρύθμισης καταβολισμού των πηγών άνθρακα. Όταν οι πηγές εξαντληθούν, τα βακτήρια εγκαταλείπουν το βιοϋμένιο, υπό πλαγκτονική μορφή, αναζητώντας καλύτερες συνθήκες διαθεσιμότητας θρεπτικών συστατικών. Εναλλακτικά, η παραγωγή εξωπολυσακχαριτών από τα βακτήρια του βιοϋμενίου μπορεί να λειτουργεί ως αποθηκευτικός μηχανισμός άνθρακα, σε περιόδους που η γλυκόζη ή ανάλογες πηγές ήταν άφθονες στο περιβάλλον. Με όλους τους πολύπλοκους μηχανισμούς που έχουν αναπτύξει τα παθογόνα για να επιβιώνουν στον ανθρώπινο οργανισμό, τα οφέλη που τους προσφέρει το ανθρώπινο σώμα ως ξενιστής, υπερτερούν των κινδύνων που τους θέτει το ανοσοποιητικό σύστημα.

Πρόκληση, η οποία παραμένει, προς το παρόν, σε υποθετικό και φιλοσοφικό επίπεδο αποτελεί η παρομοίωση των βιοϋμενίων με πολυκύτταρους οργανισμούς. Στην προσπάθεια απόδοσης επιστημονικής απόδειξης για τη συγκεκριμένη υπόθεση, σχεδιάστηκαν πρόσφατα πειράματα και μαθηματικά μοντέλα, προσανατολισμένα στη συμβατότητα της φύσης και της συλλογικής συμπεριφοράς των βακτηρίων με την κυρίαρχη θεωρία της εξέλιξης των ειδών (Kreft, 2003). Πράγματι, υπάρχουν ομοιότητες μεταξύ των βακτηρίων που συμβιώνουν σε βιοϋμένιο και των πολυκύτταρων οργανισμών. Για παράδειγμα, τα βακτήρια (ακόμη και σε πλαγκτονική μορφή) μπορούν να «αισθανθούν» τον περίγυρό τους, προσαρμόζοντας τις μεταβολικές τους διαδικασίες, ώστε να αξιοποιήσουν το διαθέσιμο υπόστρωμα με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Όταν αναπτύσσονται σε

βιοϋμένιο, οι αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση καταλήγουν σε φαινοτυπική ετερογένεια, η οποία μέσα στο βιοϋμένιο μπορεί να ερμηνευτεί ως εξειδίκευση ή ως καταμερισμός εργασίας, παρόμοια με την κυτταρική διαφοροποίηση των πολυκύτταρων οργανισμών. Επιπλέον, υπάρχουν ενδείξεις ότι τα βακτήρια παρουσιάζουν αλτρουιστική συμπεριφορά και μπορούν να υποβληθούν σε μια διαδικασία απόπτωσης που προσομοιάζει με αυτήν του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου των πολυκύτταρων οργανισμών.

Ωστόσο, οι διαφορές μεταξύ των δύο ειδών οργανισμών είναι θεμελιώδεις, με κυριότερη της αδυναμία των βακτηριακών κυττάρων να διαφοροποιηθούν μόνιμα, όπως συμβαίνει με τα διαφοροποιημένα κύτταρα του ανθρώπινου οργανισμού. Όλες οι επιστημονικές προσπάθειες αντιστροφής του αποτελέσματος της κυτταρικής διαφοροποίησης με φυσικές μεθόδους έχουν αποτύχει, λόγω της μονιμότητας που χαρακτηρίζει την τροποποίηση της γονιδιακής ρύθμισης των διαφοροποιημένων κυττάρων στους πολυκύτταρους οργανισμούς. Για παράδειγμα, η απομόνωση και καλλιέργεια επιθηλιακών κυττάρων του πνεύμονα σε ειδικό εργαστηριακό θρεπτικό μέσο, δεν επιφέρει τροποποίηση φύσης των κυττάρων, καθώς συνεχίζουν να αναπτύσσονται και να δραστηριοποιούνται ως πνευμονικά επιθηλιακά κύτταρα, παρά τις δραστικές αλλαγές περιβάλλοντος που υπέστησαν. Αντίθετα, η απομόνωση βακτηριακών κυττάρων από ένα βιοϋμένιο και η τοποθέτησή τους σε ριζικά διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, τα οδηγεί σε φαινοτυπικές αλλαγές και γρήγορη προσαρμογή στα νέα δεδομένα. Μάλιστα, είναι δυνατό ακόμη και να επιστρέψουν σε πλαγκτονική μορφή, ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης. Συνεπώς, επειδή τα βακτηριακά κύτταρα δε διαφοροποιούνται, αλλά ανταποκρίνονται στο περιβάλλον προς όφελος της επιβίωσής τους, είναι πιο ακριβής ο όρος «διαδραστικές κοινότητες» συγκριτικά με τους καθατού πολυκύτταρους οργανισμούς. Εντούτοις, ο κοινοτικός τρόπος ζωής αποτελεί ένα επαρκές κίνητρο σχηματισμού βιοϋμενίων για τα βακτήρια, διότι παρέχει στα μέλη του το πλεονέκτημα της ενισχυμένης αντίστασης στα περιβαλλοντικά στρες, της μεταφοράς γονιδίων, της διακυτταρικής επικοινωνίας-αίσθησης απαρτίας (quorum sensing), της συνέργειας και του επιμερισμού του μεταβολικού φόρτου (Jefferson, 2004).

Τέλος, κάποια βακτηριακά είδη φαίνεται πως δύνανται να αναπτυχθούν μόνο σε βιοϋμενική μορφή, όταν βρίσκονται υπό τις φυσικές συνθήκες περιβάλλοντος, εκτός του εργαστηρίου. Οι στρεπτόκοκκοι της στοματικής κοιλότητας έχουν προσαρμοστεί σε πολύ μεγάλο βαθμό στη στατική ανάπτυξη στην επιφάνεια των δοντιών. Τα περισσότερα στοματικά βακτηριακά είδη στερούνται άλλης περιβαλλοντικής βιοθέσης, καθώς βρίσκονται σχεδόν αποκλειστικά στη στοματική κοιλότητα (Burne et al., 2003). Για τα συγκεκριμένα είδη, δεν υπάρχει δυνατότητα πλαγκτονικής μορφής ανάπτυξης, διότι θα επιδέχονταν έκπλυση από το σίελο, κατάποση και καταστροφή τους από τα οξέα του στομάχου. Συνεπώς στο φυσικό περιβάλλον, περνούν το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους σε βιοϋμένιο και συχνά, μπορούν να καλλιεργηθούν στο εργαστήριο, ως πλαγκτονικά κύτταρα. Σε γενικές γραμμές, το γεγονός ότι ο βιοϋμενικός τρόπος ανάπτυξης είναι αυτός που επικρατεί στη φύση για τα περισσότερα είδη βακτηρίων, τίθεται υπό αναζήτηση το έναυσμα του πλαγκτονικού τρόπου ανάπτυξης και όχι οι λόγοι πυροδότησης του σχηματισμού βιοϋμενίου (Jefferson, 2004).

Δίκτυο εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS)

Στα περισσότερα βιοϋμένια, τα μικροβιακά κύτταρα αποτελούν μόλις το 10% της ξηρής μάζας, ενώ το υπόλοιπο 90% απαρτίζουν τα συστατικά του εξωκυτταρικού πλέγματος (matrix). Πρόκειται για ένα σύνθετο δίκτυο εξωκυτταρικής ουσίας, το οποίο παράγεται κατά το μέγιστο από τους ίδιους τους μικροοργανισμούς. Εκεί, βρίσκονται ενσωματωμένα τα μικροβιακά κύτταρα. Συνίσταται από μια ομάδα διαφορετικών ειδών βιοπολυμερών, τις γνωστές ως εξωκυτταρικές πολυμερείς ουσίες (EPS), η οποία διαμορφώνει την τρισδιάστατη αρχιτεκτονική του βιοϋμένιου. Συχνά, οι EPS αποκαλούνται «σκοτεινή ύλη» των βιοϋμενίων, λόγω του μεγάλου εύρους βιοπολυμερών και της δυσκολίας ανάλυσής τους. Παρουσιάζουν μεγάλες διαφορές ανά βιοϋμένιο, ανάλογα με τους παρόντες μικροοργανισμούς και τις διατμητικές δυνάμεις που υπέστησαν, τη θερμοκρασία και τη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών (Flemming and Wingender, 2010). Ως επί το πλείστον, χαρακτηρίζονται από υψηλού βαθμού ενυδάτωση, χάρη στις μεγάλες ποσότητες νερού που μπορούν να ενσωματώσουν με δεσμούς υδρογόνου (Donlan, 2002).

Οι EPS αρχικά αναφέρονταν ως εξωκυτταρικοί πολυσακχαρίτες, οι οποίοι στη συνέχεια μετονομάστηκαν σε βιοπολυμερείς ουσίες, όταν αποσαφηνίστηκε η ύπαρξη πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων, λιπιδίων, μεταλλικών ιόντων, ακόμη και συστατικών του εδάφους ή του αίματος στο βιοϋμενικό πλέγμα (Flemming and Wingender, 2010). Σε πείραμα των Hussain et al., παρατηρήθηκε πως ο γλοιός προερχόμενος από βακτήρια αρνητικά στη δοκιμασία κοαγουλάσης συνίσταται από τεϊχοϊκό οξύ αναμεμειγμένο με μικρή ποσότητα πρωτεϊνών (Hussain et al., 1993). Επιπλέον, στην επιφάνεια βιοϋμένιου έχει παρατηρηθεί ποσότητα εξωκυτταρικού DNA (eDNA) (Kadam et al., 2013), το οποίο φαίνεται να συμβάλλει στην αποτελεσματικότητα της προσκόλλησης των κυττάρων (Harmsen et al. 2013). Ωστόσο, οι πολυσακχαρίτες εξακολουθούν να αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα μόρια που συνθέτουν το στρώμα των EPS. Οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες διαφέρουν έντονα ανά περίπτωση και επηρεάζουν τις ιδιότητες ολόκληρου του βιοϋμένιου. Για παράδειγμα, ορισμένοι πολυσακχαρίτες των EPS Gram-αρνητικών βακτηρίων είναι ουδέτεροι ή ανιονικοί, ενώ των Gram-θετικών είναι κυρίως κατιονικοί. Το φορτίο των πολυσακχαριτών είναι ιδιαίτερα σημαντικό, διότι καθορίζει την πρόσδεση δισθενών κατιόντων, ασβεστίου και μαγνησίου, στις αλυσίδες των πολυμερών, ενισχύοντας τη δεσμευτική ικανότητα του ώριμου βιοϋμένιου. Η δομή και η σύσταση των πολυσακχαριτών διαδραματίζουν εξίσου σημαντικό ρόλο, αφού επηρεάζουν τη διαλυτότητα των EPS. Πολλές βακτηριακές EPS που περιέχουν δεσμούς εξοζών 1,3- ή 1,4- τείνουν να παραμορφώνονται λιγότερο, είναι πιο άκαμπτες ή σχεδόν αδιάλυτες στο νερό. Αντίθετα, άλλες EPS είναι άμεσα υδατοδιαλυτές (Donlan, 2002).

Η σύσταση των EPS παρουσιάζει μεγάλη ετερογένεια, ανάλογα με το είδος και τον αριθμό των μικροοργανισμών που συνθέτουν το βιοϋμένιο. Αλλαγές στη σύσταση είναι δυνατό να εμφανιστούν προσωρινά και εντός του ίδιου βιοϋμένιου με την πάροδο του χρόνου. Ο Leriche σε πείραμά του (Leriche et al., 2000), εκμεταλλευόμενος την εξειδίκευση των λεκτινών σε απλά σάκχαρα, έδειξε πως διαφορετικοί μικροοργανισμοί παράγουν διαφορετικές σε ποσότητα και ποιότητα EPS, οι οποίες μάλιστα αυξάνονται με την ωρίμανση του βιοϋμένιου. Η παραγωγή EPS επηρεάζεται από παράγοντες ανάπτυξης του βιοϋμένιου, όπως η ταχύτητα αύξησης και η διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών στο περιβάλλον. Για

παράδειγμα, η υψηλή διαθεσιμότητα άνθρακα και ο περιορισμός αζώτου, ποτασίου και φωσφόρου προάγουν τη σύνθεση EPS. Επίσης, η αργή βακτηριακή αύξηση ενισχύει την παραγωγή EPS (Donlan, 2002).

Η παρουσία EPS φαίνεται να προσδίδει πολλά πλεονεκτήματα στο βιοϋμένιο. Καταρχάς, του παρέχει την απαραίτητη μηχανική σταθερότητα, διατηρεί τη συνεκτικότητά του και είναι υπεύθυνη για την προσκόλληση στις επιφάνειες και την ενίσχυση της άμυνας. Στη διατήρηση της σταθερότητας και την αρχική προσκόλληση συντελούν και εξωκυτταρικές βακτηριακές δομές, όπως μαστίγια και τριχίδια. Πιο συγκεκριμένα, συνεισφέρουν στην ανθεκτικότητα των βιοϋμενίων σε αντιμικροβιακούς παράγοντες και τοξικά βιοκτόνα, καθώς συνδέονται απευθείας με τις χημικές ενώσεις και παρεμποδίζουν τη μαζική μεταφορά τους εντός του βιοϋμενίου. Επιπλέον, το πλέγμα προστατεύει τους μικροοργανισμούς από αφυδάτωση, οξείδωση, υπεριώδη ακτινοβολία και τις άμυνες του ανοσοποιητικού συστήματος των ξενιστών. Ως ενιαίο τρισδιάστατο δίκτυο πολυμερών, το οποίο διασυνδέει και ακινητοποιεί τα μικροβιακά κύτταρα, διευκολύνει τις έντονες μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις, την επικοινωνία και την αίσθηση απαρτίας. Το περίβλημα που σχηματίζουν οι EPS λειτουργεί ως εξωτερικό πεπτικό σύστημα, μέσω συγκράτησης εξωκυτταρικών ενζύμων κοντά στα μικροβιακά κύτταρα. Ομοίως, συγκρατούνται και τα προϊόντα διαρρηγμένων κυττάρων ή κολλοειδών και στερεών βιοπολυμερών, μετατρέποντας το πλέγμα των EPS σε κέντρο ανακύκλωσης. Αν και, λόγω της πολυπλοκότητάς τους, χαρακτηρίζονται από αργή βιοδιάσπαση, οι EPS είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν ως πηγή θρεπτικών συστατικών και ενζύμων, ενώ η δεξαμενή DNA που δημιουργείται ευνοεί την οριζόντια μεταφορά γονιδίων (Flemming and Wingender, 2010). Το στρώμα των EPS αποτελεί το άμεσο περιβάλλον του βιοϋμενίου, επηρεάζει τις συνθήκες ζωής των βιοϋμενικών κυττάρων και συνεπώς θεωρείται στοιχείο κλειδί για την κατανόηση του βιοϋμενικού τρόπου ζωής (Jachlewski et al., 2015).

Κύκλος σχηματισμού βιοϋμενίου

Ο κύκλος σχηματισμού των βιοϋμενίων ξεκινά με την εναπόθεση οργανικής ύλης και νερού σε μια επιφάνεια. Η επιφάνεια δρα ως υπόστρωμα, το οποίο καλύπτεται από την αποκαλούμενη «μεμβράνη περιβαλλοντικής προσαρμογής» (conditioning film), που αποτελείται κυρίως από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και νερό. Παρουσία της παραπάνω μεμβράνης, οι φυσικοχημικές ιδιότητες της επιφάνειας (υδροφοβικότητα και ηλεκτροστατικό φορτίο) τροποποιούνται, ευνοώντας τη μετέπειτα προσκόλληση των μικροβιακών κυττάρων (Hood και Zottola, 1997).

Οι πρωταρχικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηριακών κυττάρων και επιφάνειας είναι κρίσιμες για την εξέλιξη της ανάπτυξης του βιοϋμενίου. Διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν την αρχική προσκόλληση, ωστόσο τα ίδια τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να διαφοροποιήσουν το αποτέλεσμα, μέσω παραγωγής αντιπροσκολλητικών μορίων ή καλύπτοντας όσο το δυνατό μεγαλύτερο χώρο, δημιουργώντας φυσικό εμπόδιο αποτροπής της προσκόλλησης ανταγωνιστών. Ανάλογα με τη φύση της επιφάνειας, είναι δυνατή η ενεργοποίηση

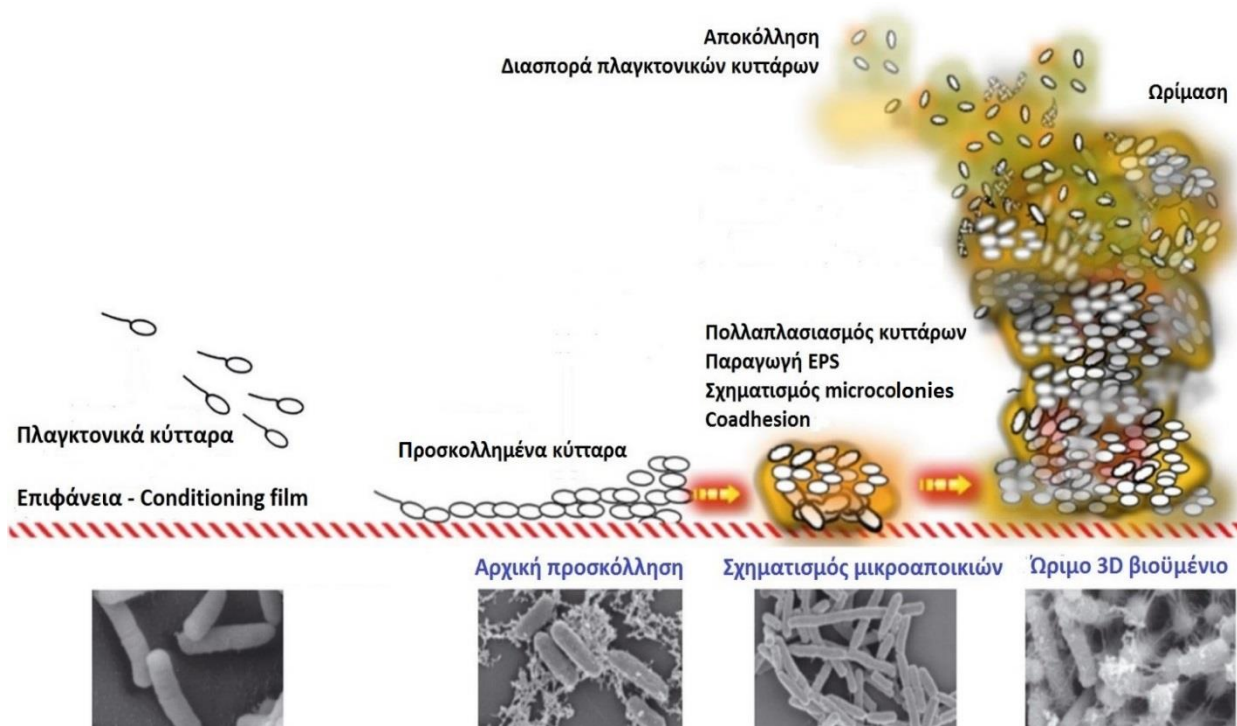
διαφορετικών μηχανισμών προσκόλλησης. Σε αβιοτικές επιφάνειες για παράδειγμα, μεσολαβούν συνήθως μη-ειδικοί παράγοντες, όπως το ηλεκτροστατικό φορτίο και η υδροφοβικότητα της επιφάνειας, η παρουσία εξωκυτταρικών πολυμερών και της μεμβράνης περιβαλλοντικής προσαρμογής. Οι βιοτικές επιφάνειες αντίθετα, όπως επιθηλιακά κύτταρα ή άλλοι ιστοί του ξενιστή, εξαρτώνται από τους ειδικούς υποδοχείς που συμμετέχουν στην προσκόλληση και τη συστηματική απάντηση του ξενιστή στη βακτηριακή αποίκιση (Rendueles and Ghigo, 2012).

Η προσκόλληση προκύπτει σταδιακά, όταν κύτταρα προσεγγίζουν την επιφάνεια ενεργητικά ή παθητικά, μέσω της φυσικής τους κινητικότητας (μαστίγια, βλεφαρίδες, κ.ά.), διάχυσης, βαρύτητας ή δυναμικής ροής του μέσου (Kumar και Anand, 1998). Αρχικά, οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις που κυριαρχούν μεταξύ μικροβιακών κυττάρων και ανώτερης επιφάνειας του υποστρώματος είναι ασθενούς ηλεκτροστατικής φύσης (οξέος-βάσης κατά Lewis ή Van der Waals). Το πρώτο στάδιο προσκόλλησης θεωρείται αντιστρεπτό, καθώς τα κύτταρα διατηρούν ακόμη την κινητικότητά τους, άρα είναι δυνατή η αποκόλλησή τους με απλή έκπλυση (Hood και Zottola, 1997). Εν συνεχεία, λαμβάνουν χώρα ισχυρότερες δυνάμεις, όπως δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, ομοιοπολικοί ή ιοντικοί δεσμοί και η ύπαρξη βιοσυνθετικών πολυμερών καθιστά την προσκόλληση των κυττάρων μη αντιστρεπτή. Άμεσο επακόλουθο της αρχικής προσκόλλησης βακτηριακών κυττάρων σε μια στερεή επιφάνεια είναι η έναρξη της τροποποίησης της γονιδιακής ρύθμισης (Kuchma and O'Toole, 2000).

Μόλις τα κύτταρα εντοπίσουν την επιφάνεια που θα προσκολληθούν, ενεργοποιούν μόρια σηματοδότησης, μέσω των μηχανισμών αίσθησης που διαθέτουν, που προωθούν πρώιμα γονιδιακά μοτίβα γονιδιακής έκφρασης, απαραίτητα για το σχηματισμό του βιοϋμενίου. Επί παραδείγματι, η έκφραση του γονιδίου *algC* του *Pseudomonas aeruginosa*, που είναι απαιτούμενο για τη βιοσύνθεση του πολυσακχαρίτη του αλγινικού οξέος, αυξάνει μέσα σε λίγα λεπτά από την αρχική προσκόλληση του βακτηρίου σε στερεή επιφάνεια (τεφλόν και γυαλί, Davies και Geesey, 1995). Ένα ακόμη παράδειγμα είναι η αλλαγή της μορφολογίας του *Staphylococcus epidermidis*, η οποία είναι φυσιολογικά σφαιρική, μόλις έλθει σε επαφή με μια στερεή επιφάνεια, όπου σχηματίζει απόφυση με σχήμα ποδιού (Kodjikian et al., 2003). Τα συγκεκριμένα ευρήματα δείχνουν ότι τα βακτηριακά κύτταρα διαθέτουν αισθητήρια συστήματα για επιφάνειες, τα οποία επάγουν ισχυρά ενδοκυτταρικά σήματα, ικανά να προκαλέσουν μεταφραστικές και μορφολογικές μεταβολές. Οι βακτηριακοί αισθητήριοι μηχανισμοί, αν και προσομοιάζουν με αυτούς των ευκαρυωτικών κυττάρων, δεν είναι απόλυτα κατανοητοί.

Ακολουθεί ο πολλαπλασιασμός των προσκολλημένων κυττάρων και ο σχηματισμός μικροαποικιών (microcolonies), με παράλληλη ενίσχυση του στρώματος των EPS. Στο νεοσυντιθέμενο βιοϋμένιο, είναι δυνατή η προσκόλληση (coadhesion) μεμονωμένων κυττάρων (single cells), συναθροίσματος κυττάρων (coaggregated cells) και ομάδων ομοειδών κυττάρων (group of identical cells) (Εικόνα 1). Το βιοϋμένιο λαμβάνει προοδευτικά την ώριμη μορφή του, καθώς εναποτίθενται μικροαποικίες του ίδιου ή διαφορετικών ειδών μικροοργανισμών σε

στρώματα, με ενδιάμεση ύπαρξη εξωπολυσακχαρίτη. Το ώριμο βιοϋμένιο χαρακτηρίζεται από ετερογενή σύσταση. Το τελικό στάδιο της ωρίμασης, ολοκληρώνεται με την αποκόλληση και εκ νέου διασπορά κυττάρων του βιοϋμένιου, σε πλαγκτονική μορφή.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του σχηματισμού ενός βιοϋμένιου (Rendueles και Ghigo, 2012).

Στην παραπάνω εικόνα, αναπαρίστανται σχηματικά και μέσω ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης τα στάδια σχηματισμού ενός βιοϋμένιου:

- πρωτογενής αποίκηση υποστρώματος που καλύπτεται από μεμβράνη περιβαλλοντικής προσαρμογής (conditioning film)
- αύξηση των κυττάρων, παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμερών ουσιών (EPS) και σχηματισμός μικροαποικιών (microcolonies) - δυνατότητα προσκόλλησης (coadhesion) διαφορετικών ειδών κυττάρων
- ωρίμαση (maturation)
- αποκόλληση (detachment) και διασπορά (dispersal) πλαγκτονικών κυττάρων

1.2 Αλληλεπιδράσεις σε βιοϋμένια πολλαπλών βακτηριακών ειδών

Η παρατήρηση ενός ακέραιου βιοϋμένιου στο μικροσκόπιο μαρτυρά ότι τα βακτήρια δεν προσκολλώνται μεταξύ τους τυχαία, αλλά διαμορφώνουν μια οργανωμένη οντότητα με πληθώρα εξειδικευμένων σχηματισμών και μηχανισμών (Yung-Hua Li, 2012). Τα βακτηριακά κύτταρα που την απαρτίζουν, μπορεί να ανήκουν στο ίδιο ή σε διαφορετικά είδη, τα οποία συνυπάρχουν, αλληλεξαρτώνται

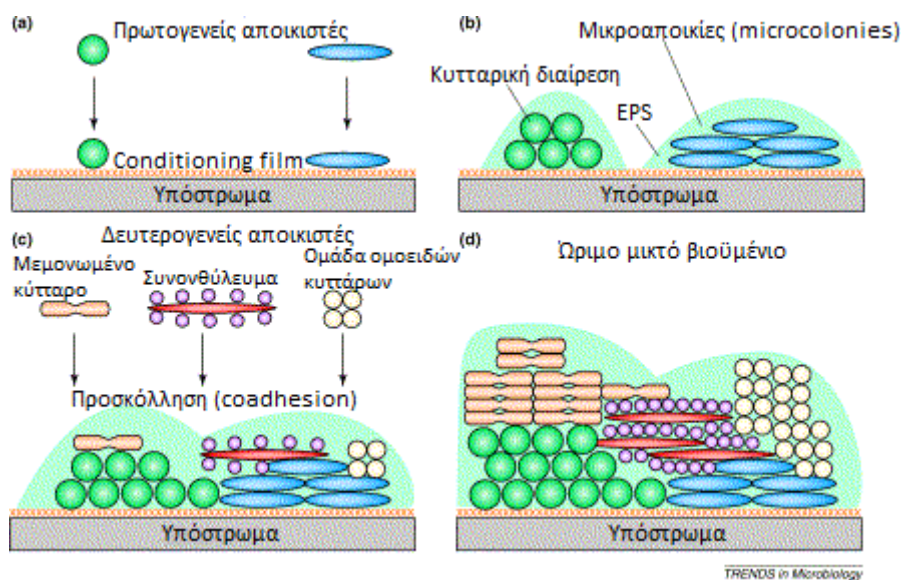
και αλληλοεπιδρούν. Οι χωρικές και οι μεταβολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ειδών επηρεάζουν τη συνολική λειτουργικότητα, τη φυσιολογία και την οργάνωση του βιοϋμενίου, δημιουργώντας ένα δυναμικό περιβάλλον. Η διαδραστικότητα και η επικοινωνία των βιοϋμενικών κυττάρων συνεισφέρουν στην αρχική προσκόλληση (Εικόνα 2), την ανάπτυξη του βιοϋμενίου και την τελική αποκόλληση, ενώ προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιμικροβιακούς παράγοντες, στη φαγοκυττάρωση και αυξημένη λοιμοτοξικότητα (Moons et al., 2009). Ένα ώριμο βιοϋμένιο είναι 10-1000 φορές πιο ανθεκτικό σε συγκεντρώσεις αντιμικροβιακών παραγόντων, οι οποίες θα ήταν ικανές να εξουδετερώσουν τα γενετικά ισότιμα πλαγκτονικά κύτταρα (Lewis, 2001).

Τα βιοϋμένια πολλών βακτηριακών ειδών (multi-species), γνωστά και ως «μικτά βιοϋμένια», χρήζουν περεταίρω διερεύνησης, ώστε να διαφωτιστούν οι πολύπλοκες διακυτταρικές αλληλεπιδράσεις συνέργειας ή ανταγωνισμού και οι τρόποι επικοινωνίας των μικροβιακών κυττάρων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφορετικών ειδών κυμαίνονται από έντονο ανταγωνισμό και χημικό πόλεμο, έως διασταυρούμενη σίτιση (cross-feeding) και προστατευτικούς αμυντικούς μηχανισμούς (Εικόνα 3). Ο ανταγωνισμός αφορά κυρίως την πρόσβαση σε περιορισμένες πηγές θρεπτικών συστατικών, οξυγόνο και διαθέσιμο χώρο για αποίκηση, προκαλείται όμως και μέσω παραγωγής ουσιών (βακτηριοσίνες, οργανικά οξέα, ένζυμα, εξωπολυσακχαρίτες, επιφανειοδραστικοί παράγοντες), που μπορούν να αναστείλουν την ανάπτυξη, να απενεργοποιήσουν ή να αποτρέψουν την προσκόλληση άλλων ειδών, ακόμη και να προκαλέσουν την αποκόλληση κυττάρων από το βιοϋμένιο. Το φαινόμενο της συνέργειας μεταξύ των βακτηρίων αυξάνει την προσαρμοστικότητα όλων των ειδών σε ένα βιοϋμένιο και συμπεριλαμβάνει τη συσσωμάτωση (coaggregation), την αλληλεξάρτηση από προϊόντα του μεταβολισμού και την προστασία έναντι τοξικών ενώσεων. Το αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων παρατηρείται συνήθως ως αύξηση της βιομάζας, ως ενίσχυση μιας λειτουργίας ή ενός μεταβολικού προϊόντος ή ως ανακατανομή των βακτηριακών κυττάρων εντός του βιοϋμενίου (Burtnølle et al., 2014). Η ποσοτική αύξηση του βιοϋμενίου σε βιομάζα προέρχεται κυρίως μέσω κυτταρικής διαίρεσης και σε ποικιλομορφία με την προσκόλληση νέων βακτηριακών ειδών (Rickard et al., 2003).

Οι μικροαποικίες είναι βασική δομική μονάδα του βιοϋμενίου. Σε συνδυασμό με τις EPS, που συγκρατούν σε κοντινή απόσταση τα βιοϋμενικά κύτταρα, παρέχουν την απαραίτητη εγγύτητα για πραγματοποίηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κυττάρων. Τα μικτά βιοϋμένια διαμορφώνουν σταθερές δομές μικροκοινοτήτων (microconsortia), όπου πραγματοποιούνται διαστρωμάτωση θρεπτικών συστατικών, ανταλλαγή γονιδίων και διακυτταρική χημική επικοινωνία (quorum sensing). Η ύπαρξη μικροκοινοτήτων αντιπροσωπεύει άκρως ανταγωνιστικά περιβάλλοντα (Flemming and Wingender, 2010), όπου η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός ενός βακτηριακού είδους απαιτεί διαδραστικότητα με τα γειτονικά είδη.

Η σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών ειδών που απαρτίζουν ένα βιοϋμένιο έγινε αντιληπτή και περιγράφηκε λεπτομερώς για τα βακτήρια της στοματικής κοιλότητας. Αργότερα, μελετήθηκαν βιοϋμένια βακτηρίων

που απομονώθηκαν από περιβάλλοντα που δεν αποτελούν ξενιστές, φυσικά ή τεχνητά, όπως το έδαφος και το θαλασσινό νερό ή συστήματα διανομής νερού και διεργασίες παραγωγής γαλακτοκομικών αντίστοιχα. Για να γίνουν κατανοητές οι συνέπειες των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών βακτηριακών ειδών που συνυπάρχουν σε ένα βιοϋμένιο, είναι απαραίτητη η εξέτασή του, ως ενιαία μονάδα.



Εικόνα 2. Προσκόλληση κυττάρων κατά την ανάπτυξη ενός μικτού βιοϋμένιου (βιοϋμένιο πολλαπλών βακτηριακών ειδών): (a) αρχικό στάδιο προσκόλλησης του υποστρώματος, το οποίο καλύπτεται από «μεμβράνη περιβαλλοντικής προσαρμογής», (b) κυτταρική ανάπτυξη, διαίρεση και παραγωγή EPS, η οποία οδηγεί σε δημιουργία μικροαποικιών, (c) προσκόλληση (coadhesion) μεμονωμένων κυττάρων (single cells), συναθροίσματος κυττάρων (coaggregate) και ομάδας ομοειδών κυττάρων κατά την ανάπτυξη του μικτού βιοϋμένιου, και (d) ωρίμαση και σχηματισμός «κλωνικών μωσαϊκών» μέσα στο μικτό βιοϋμένιο (Rickard et al., 2003).

Συνέργεια και ανταγωνισμός

Οι σύνθετες βακτηριακές κοινότητες είναι δομημένες βάσει των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών ειδών που τις απαρτίζουν. Η κατηγοριοποίησή τους ως συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές δεν είναι εύκολη, λόγω των υπεράριθμων παραγόντων που συμβάλλουν στην αρμοστικότητα του κάθε είδους. Η κατάσταση γίνεται ακόμη πιο περίπλοκη, όταν συνυπολογιστούν οι τύποι και το επίπεδο των κινδύνων που προέρχονται από το περιβάλλον. Τα περιβαλλοντικά στρες μπορεί να επηρεάσουν τόσο τη συνολική αρμοστικότητα του βιοϋμένιου, όσο και την ικανότητα προσαρμογής κάθε είδους ξεχωριστά. Για παράδειγμα, ένα βακτήριο μπορεί να υποστεί απώλεια βιομάζας με την προσκόλληση στο βιοϋμένιο, αλλά παράλληλα να αυξηθεί η προστασία του απέναντι σε έναν παράγοντα που, υπό άλλες συνθήκες, θα το εξόντωνε.

Τα βακτήρια εμφανίζουν κοινωνική συμπεριφορά, όταν υπάρχει διαδραστικότητα που επηρεάζει τον πομπό και τον δέκτη ενός σήματος. Σύμφωνα με την επίδραση κάποιου παράγοντα στο βακτήριο που την προκάλεσε και σε αυτό

που τη δέχθηκε, παρατηρούνται τα εξής φαινόμενα: «αμοιβαίο όφελος» (όφελος και των δύο), «αλτρουισμός» (επίπτωση στον πομπό, όφελος στον δέκτη), «εγωκεντρισμός» (όφελος μόνο στον πομπό), «βλάβη (spite)» (επίπτωση και στους δύο). (West et al., 2006, 2007). Πρόσφατα, διατυπώθηκαν και οι εξελικτικές θεωρίες “Black Queen Hypothesis” και “Red Queen Hypothesis”. Σύμφωνα με την πρώτη, κάθε είδος διαγράφει ζωτικές λειτουργίες ή μονοπάτια που του παρέχουν τα περιβάλλοντα βακτήρια, με σκοπό να βελτιώσει τη δική του προσαρμοστικότητα (Morris et al., 2012). Κατά συνέπεια, αναμένεται οι συγκεκριμένοι μικροοργανισμοί να είναι πιο αποδοτικοί όταν συνυπάρχουν με άλλα είδη, κατά τον ίδιο τρόπο με τον οποίο προσαρμόζονται οι ενδοβιότες για να ωφεληθούν από τον ξενιστή τους (Klasson and Andersson, 2004). Αντίθετα, η δεύτερη υπόθεση προβλέπει ανταγωνισμό μεταξύ των ειδών που συμβιώνουν. Ακόμη και όταν η συνολική παραγωγικότητα του μικτού βιοϋμενίου (όσον αφορά στη βιομάζα) αυξάνεται, η κυρίαρχη υποβόσκουσα συμπεριφορά είναι ανά περιπτώσεις ανταγωνιστική. Για παράδειγμα, η βιομάζα του μικτού βιοϋμενίου *Acinetobacter* sp. και *Pseudomonas putida* παρουσιάζεται αυξημένη σε σύγκριση με την παραγωγικότητα των μονοκαλλιιεργειών, η οποία όμως προέρχεται μόνο από την ποσοτική ανάπτυξη του *P. putida*, διότι το *Acinetobacter* sp. βλάπτεται από την περιορισμένη πρόσβαση σε οξυγόνο (Hansen et al., 2007). Συνεπώς, η εξέταση των μεταβολών για κάθε είδος ξεχωριστά είναι ζωτικής σημασίας, ώστε να καθοριστεί σωστά ο συνεργιστικός ή ο ανταγωνιστικός χαρακτήρας μιας αλληλεπίδρασης (Ren et al., 2013).

Ο μοριακός μηχανισμός που συμμετέχει στην αλληλεπίδραση είναι εξίσου σημαντικός, και θεωρείται άμεσος όταν τα κύτταρα αλληλοεπιδρούν (cell-cell interactions), ή έμμεσος, όταν η ύπαρξη ή η ανάπτυξη ενός είδους επηρεάζει κάποιο άλλο. Η συνάθροιση (coaggregation), ως μηχανισμός άμεσης αλληλεπίδρασης, έχει εξεταστεί διεξοδικά για τα βιοϋμένια βακτηρίων της στοματικής κοιλότητας (Kolenbrander et al., 2010). Καθώς συναθροίζονται τα κύτταρα, η συνοχή του μικτού βιοϋμενίου ελέγχεται από εξειδικευμένες επιφανειακές αλληλεπιδράσεις υποδοχέα-προσδέτη, με αποτέλεσμα να ενισχύεται ο σχηματισμός του (Sharma et al., 2005). Έμμεση αλληλεπίδραση παρατηρήθηκε σε μικτές αποικίες *Pseudomonas aeruginosa* και *Escherichia coli* O157:H7, όπου τα βακτηριακά κύτταρα του παθογόνου *E. coli* O157:H7 ήταν ικανά να σχηματίσουν βιοϋμένιο σε κύτταρα τριχοειδούς ροής μόνο σε συγκαλλιέργεια με το *P. aeruginosa*. Χωροταξικές αναλύσεις αποκάλυψαν ότι οι μικροαποικίες του *E. coli* εντοπιζόνταν κυρίως στις άκρες, σε περιοχές πρωταρχικά αποικισμένες από *P. aeruginosa*, το οποίο πιθανώς τροποποιούσε τις ιδιότητες της επιφάνειας και διευκόλυνε την προσκόλληση του πρώτου (Klayman et al., 2009).

Ενώ περιβαλλοντικοί παράγοντες επηρεάζουν τα πρώτα στάδια προσκόλλησης, η βακτηριακή δραστηριότητα από μόνη της μπορεί να μεταβάλει το αποτέλεσμα των επιφανειακών αλληλεπιδράσεων, με παραγωγή αντιπροσκολλητικών μορίων ή με φυσικοχημικές μεθόδους, όπως η τροποποίηση των ιδιοτήτων της επιφάνειας ή η σύσταση φυσικών εμποδίων (φαινόμενο “blanketing”). Η κάλυψη (σκέπασμα) της επιφάνειας, ώστε να παρεμποδιστεί η αποίκιση από ανταγωνιστικά στελέχη, είναι μια από τις απλούστερες στρατηγικές που ακολουθούν τα βακτήρια. Το φαινόμενο

παρατηρήθηκε και στο πείραμα των An et al., κατά τη μελέτη των βιοϋμενίων της συγκαλλιέργειας *P. aeruginosa* με *Agrobacterium tumefaciens*. Φυσιολογικά, η ταχεία εξάπλωση του *P. Aeruginosa* δεν επέτρεπε την προσκόλληση του *Agrobacterium tumefaciens*. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιήθηκε στέλεχος *P. aeruginosa* με μετάλλαξη στο γονίδιο κινητικότητας *flgK*, δεν ήταν δυνατός ο αποκλεισμός του *A. tumefaciens*, με αποτέλεσμα να σχηματιστούν μικτά βιοϋμένια στην υάλινη επιφάνεια (An et al., 2006). Μια ακόμη γνωστή ικανότητα των βακτηρίων είναι η έκκριση επιφανειοδραστικών παραγόντων, που μπορεί να τροποποιήσει ιδιότητες μιας επιφάνειας, όπως η διαβρεξιμότητα και το φορτίο. Ο ρόλος των επιφανειοδραστικών παραγόντων δεν είναι πάντοτε ξεκάθαρος, κατά γενική ομολογία όμως, εξασθενούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ βακτηρίων και επιφάνειας (Banat et al., 2010). Χαρακτηριστικό παράδειγμα η σουρφακτίνη (surfactin), η οποία είναι απαραίτητη για την εξάπλωση (swarming) των αποικιών του *Bacillus subtilis* και παρεμποδίζει το σχηματισμό βιοϋμενίου άλλων ειδών, όπως *E. Proteus mirabilis* και *Salmonella enterica* (Rendueles and Ghigo, 2012).

Ένα ακόμη είδος αλληλεπίδρασης που επηρεάζει συνήθως τη δομή και τη λειτουργία των μικτών βιοϋμενίων είναι ο συμμεταβολισμός και η διασταυρούμενη σίτιση (syntrophy, cross-feeding), όπου ένα είδος τρέφεται από το παραπροϊόν του μεταβολισμού ενός άλλου. Στο πείραμα των Hansen et al., φάνηκε πως η ολική βιομάζα του μικτού βιοϋμενίου *Pseudomonas putida*-*Acinetobacter* sp. αυξήθηκε, όταν καλλιεργήθηκε σε βενζυλική αλκοόλη, χάρη στη συνύπαρξη των δύο ειδών. Η μεταβολική δράση του *Acinetobacter* sp. μετέτρεψε τη βενζυλική αλκοόλη σε βενζοϊκό οξύ, το οποίο μπορούσε να μεταβολίσει το *P. putida*. Μάλιστα, η συνύπαρξη των δύο βακτηρίων προκάλεσε ορισμένες μεταλλάξεις στο *P. putida*, οι οποίες ενίσχυσαν τη συνολική παραγωγική ικανότητα του βιοϋμενίου. Η βακτηριακή κοινότητα που προέκυψε, ήταν πιο σταθερή και παραγωγική από την προγονική (Hansen et al., 2007). Βέβαια, η συνέργεια μεταξύ διαφορετικών ειδών στο πλαίσιο της εξέλιξης είναι δυσκολότερο να εξηγηθεί, ειδικότερα όταν ο ανταγωνισμός για τις πηγές θρεπτικών συστατικών είναι ισχυρός (Mitri et al., 2011, Morris et al., 2012).

Αίσθηση απαρτίας (quorum sensing)

Τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν να επικοινωνούν απελευθερώνοντας και ανιχνεύοντας μικρά αυτεπαγωγικά μόρια-σηματοδότες που εκκρίνονται και διαχέονται στο εγγύς περιβάλλον του κυττάρου. Η μέθοδος επικοινωνίας είναι γνωστή ως διακυτταρική χημική επικοινωνία ή αίσθηση απαρτίας (quorum sensing, QS). Παρόλο που τα μόρια επικοινωνίας (κυρίως οι αυτεπαγωγείς) φαίνεται να είναι σημαντικότερα εντός της ίδιας μικροαποικίας, παρά μεταξύ των μικροαποικιών ενός βιοϋμενίου (Egland et al., 2004), είναι δυνατό κύτταρα διαφορετικών ειδών, που βρίσκονται σε απόσταση, να αλληλοεπηρεάζονται. Η μέγιστη απόσταση επικοινωνίας αγγίζει τα 78 mm για μεμονωμένα κύτταρα (Gantner et al., 2006), ενώ η συντονισμένη παραγωγή σηματοδοτών από τα χιλιάδες κύτταρα μιας μικροαποικίας είναι ικανή να φτάσει ακόμη μακρύτερα. Παράδειγμα αποτελεί η μελέτη των Fazli et al., στην οποία ερευνήθηκαν οι αλληλεπιδράσεις των

Pseudomonas aeruginosa και *Staphylococcus aureus* σε χρόνιο τραύμα, με τη χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου και της μεθόδου φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH). Τα στελέχη βρίσκονταν διαχωρισμένα σε στιβάδες με μη τυχαίο τρόπο και σε μέση απόσταση 40 mm (Fazli et al., 2009).

Σε πολλές περιπτώσεις μονοειδικών βιοϋμενίων, η QS έχει πρωταγωνιστικό ρόλο στη διαμόρφωση δομής και στην ωρίμαση *in vitro*. Ένα κύριο σύστημα επικοινωνίας που επηρεάζει Gram-αρνητικά είδη και έχει περιγραφεί διεξοδικά για τα βιοϋμένια του *Pseudomonas aeruginosa*, είναι το σύστημα N-ακυλο-ομοσερινο λακτονών (AHL). Αντίστοιχα για Gram-θετικά βακτήρια, όπως ο *Staphylococcus aureus*, το κύριο σύστημα QS που συμβάλλει στη ρύθμιση του σχηματισμού βιοϋμενίου, βασίζεται σε πεπτίδια (Parsek and Greenberg, 2005, Suntharalingam and Cvitkovitch, 2005, de Kievit, 2009,). Τα συστήματα AHL παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση και επιτρέπουν μόνο χαμηλού επιπέδου παρεμβολή μεταξύ των ειδών που συνυπάρχουν *in vivo* και *in vitro*. Ένα παράδειγμα αποτελούν τα ευκαιριακά παθογόνα *Pseudomonas aeruginosa*-*Burkholderia cepacia*, το μικτό βιοϋμένιο των οποίων συναντάται συχνά σε χρόνιες λοιμώξεις των πνευμόνων ασθενών με κυστική ίνωση. Τα δύο βακτηριακά είδη αλληλοεπιδρούν χρησιμοποιώντας το σύστημα AHL, ενώ φαίνεται να ανταλλάσσουν και γενετικό υλικό (Riedel et al., 2001, Eberl and Tummeler, 2004). Αντίθετα, το σύστημα QS αυτεπαγωγέας-2 (AI-2), το οποίο βασίζεται σε αυτεπαγωγικά μόρια φουρανοσουλ-βορικού διεστέρα, σχετίζεται με την επικοινωνία ανάμεσα στα διαφορετικά είδη μικτών βιοϋμενίων, λειτουργώντας εκτός των ορίων του είδους (Saito et al., 2008, Kolenbrander et al., 2010). Συνεπώς, το βιοϋμένιο παρέχει στα συστήματα QS τις κατάλληλες χωροταξικές και περιβαλλοντικές συνθήκες για γονιδιακή ρύθμιση και επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων (Parsek and Greenberg, 2005).

Προστατευτική δράση

Τα βακτήρια που αναπτύσσονται εντός βιοϋμενίου είναι περισσότερο προστατευμένα από τα αντίστοιχα πλαγκτονικά κύτταρα, ενάντια σε περιβαλλοντικά στρες, αντιμικροβιακούς παράγοντες, πρωτόζωα (φαινόμενο protozoan grazing, Matz and Kjelleberg, 2005) και τους αμυντικούς μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος. Η συνεργιστική προστασία που παρατηρείται, αποδίδεται σε πληθώρα παραγόντων, όπως δομικές αλλαγές, μειωμένο ρυθμό διάχυσης ουσιών από το βιοϋμενικό πλέγμα, μειωμένο ρυθμό αύξησης των βιοϋμενικών κυττάρων και τροποποίηση μονοπατιών γονιδιακής έκφρασης (Fux et al., 2005). Επιπλέον, η δομή και η σύσταση του βιοϋμενικού πλέγματος λειτουργεί από μόνη της ως προστατευτικός παράγοντας, ενάντια στην αφυδάτωση και άλλες ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, χάρη στην υψηλή περιεκτικότητά της σε νερό (σχεδόν 97%) (Flemming and Wingender, 2010). Η προστατευτική δράση φαίνεται να ενδυναμώνεται, όταν συνυπάρχουν πολλαπλά βακτηριακά είδη.

Η μελέτη των Burmølle et al., απέδειξε πως η συγκαλλιέργεια τεσσάρων διαφορετικών ειδών θαλάσσιων βακτηρίων παρήγαγε 167% υψηλότερα επίπεδα βιοϋμενίου σε σύγκριση με τις μονοκαλλιέργειες, με κριτήριο την κυτταρική βιομάζα. Μάλιστα, τα βακτηριακά κύτταρα του πολυειδικού βιοϋμενίου ήταν πιο

ανθεκτικά σε χημικά στρες (τετρακυκλίνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου) και στη βακτηριακή επιμόλυνση από *Pseudoalteromonas tunicata* (Burmølle et al., 2006). Οι ερευνητές μιας παρόμοιας μελέτης, με βιοϋμένια ευκαιριακά παθογόνων στελεχών πόσιμου νερού, συμπέραναν πως ήταν ανθεκτικά σε υψηλότερες συγκεντρώσεις χλωρίνης από τα αντίστοιχα βιοϋμένια μονοκαλλιιεργειών και τις καλλιέργειες πλαγκτονικών κυττάρων (Schwering et al., 2013). Πρόσφατα, οι Lee et al. (2013), μελετώντας τη σχετική και χωρική κατανομή των *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas protegens* και *Klebsiella pneumonia* σε ένα πολυειδικό βιοϋμένιο, παρατήρησαν την ανθεκτικότητά του σε τομπραμυκίνη και δωδεκυλο-σουλφονικό νάτριο (SDS), η οποία στα μονοειδικά βιοϋμένια διέφερε από είδος σε είδος. Αξίζει να σημειωθεί πως η σύσταση των βακτηρίων δεν επηρεάστηκε, υποδεικνύοντας πως η χρήση των κατασταλτικών παραγόντων δεν κατέληξε σε επικράτηση του πιο ανθεκτικού είδους, αλλά σε συνεργιστική προστατευτική δράση υπέρ της βακτηριακής κοινότητας (Lee et al., 2013).

Αυξημένη μολυσματικότητα

Πολλοί τύποι χρόνιων λοιμώξεων προκαλούνται από βακτηριακά βιοϋμένια. Η αδυναμία αντιμετώπισής τους οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στις προστατευτικές δράσεις που περιγράφηκαν παραπάνω, οι οποίες ενισχύονται με τη συνύπαρξη πολλαπλών ειδών. Βέβαια, η ποικιλότητα των μολυσματικών βιοϋμενίων είναι χαμηλότερη από αυτήν των βιοϋμενίων που απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον και συχνά, τα διαφορετικού είδους βακτήρια δεν αναμιγνύονται μεταξύ των μικροαποικιών. Οι αλληλεπιδράσεις δεν επηρεάζουν μόνο τη θεραπευτική αγωγή, αλλά μπορεί να αυξήσουν και τη σοβαρότητα της λοίμωξης. Πρόσφατη *in vivo* έρευνα έδειξε πως ο εμβολιασμός τραύματος με βιοϋμένιο δικαλλιέργειας (dual-species) *Staphylococcus aureus* και *Pseudomonas aeruginosa* επέφερε καθυστερημένη επούλωση, σε σχέση με τα μη-εμβολιασμένα και τα εμβολιασμένα με μονοκαλλιέργεια του κάθε είδους τραύματα. Το αποτέλεσμα αποδόθηκε στην εξαρτώμενη από την *Pseudomonas aeruginosa* επαγωγή των μολυσματικών παραγόντων λευκοσιδίνη Panton-Valentine και α-αιμολυσίνη του *Staphylococcus aureus* (Pastar et al., 2013). Η ενίσχυση της μολυσματικότητας της *Pseudomonas aeruginosa* μπορεί να προκληθεί και από τις πεπτιδογλυκάνες Gram-θετικών στελεχών, όπως ισχυρίζεται η μελέτη των Korgaonkar et al. (2013). Η μολυσματικότητα του *Staphylococcus aureus* ενισχύεται από το μύκητα *Candida albicans*, όπως απέδειξαν τα *in vitro* πειράματα των Peters et al. (2010), σύμφωνα με τα οποία, τα βακτηριακά κύτταρα προσδένονται ισχυρά στο μυκήλιο της *C. albicans* και προάγεται η ικανότητα εισβολής τους στις επιθηλιακές στιβάδες. Επιπλέον, πρωτεωμική ανάλυση σε gel ηλεκτροφόρησης των βακτηριακών βιοϋμενικών κυττάρων της συγκαλλιέργειας αποκάλυψε μειορρύθμιση του γενικού μεταγραφικού παράγοντα CodY. Δεδομένου ότι ο μεταγραφικός παράγοντας CodY είναι υπεύθυνος για την καταστολή λειτουργιών που σχετίζονται με τη λοιμοτοξικότητα, όπως ο σχηματισμός βιοϋμενίου, η έκφραση μολυσματικών παραγόντων και η χημική QS στον *Staphylococcus aureus*, η μειορρύθμισή που

προξενεί η παρουσία της *Candida albicans*, συνεπάγεται βελτιωμένο σχηματισμό βιοϋμενίου και αυξημένη μολυσματικότητα του *Staphylococcus aureus* (Peters et al., 2010).

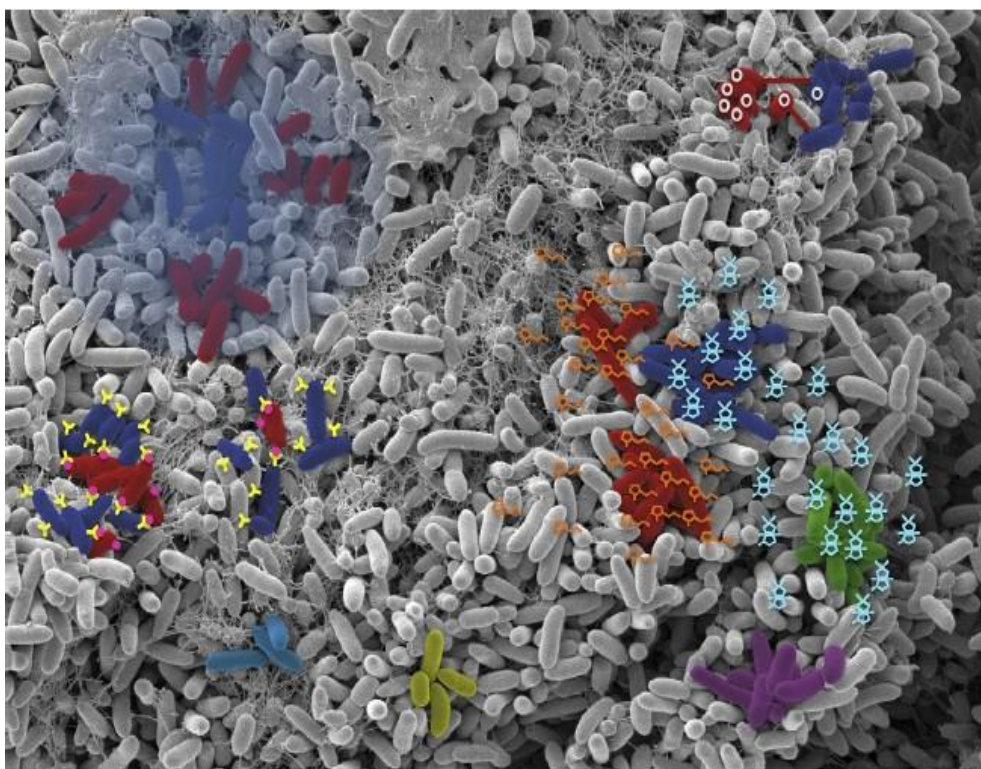
Οριζόντια μεταφορά γονιδίων (horizontal gene transfer)

Η σχέση μεταξύ βιοϋμενίου, γονιδιακής ρύθμισης, γονιδιακής έκφρασης και μεταφοράς γονιδίων είναι περίπλοκη. Πολυάριθμα γονίδια που εμπλέκονται στη δημιουργία βιοϋμενίου έχουν αναγνωρισθεί, όμως η ακριβής ταυτοποίηση των ρόλων που διαδραματίζει το καθένα είναι εξαιρετικά δύσκολη. Καταρχήν, οι διαδικασίες ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης κατά την ανάπτυξη των βιοϋμενίων έχουν κυκλικό και δυναμικό χαρακτήρα. Με άλλα λόγια, εξωγενείς συνθήκες πυροδοτούν τις απαιτούμενες αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση για το σχηματισμό βιοϋμενίου, ο σχηματισμός με τη σειρά του επηρεάζει το μικροπεριβάλλον των βιοϋμενικών κυττάρων και ως αποτέλεσμα, η γονιδιακή έκφραση μεταβάλλεται περεταίρω, καθώς το βιοϋμένιο ωριμάζει. Επιπλέον, η ετερογένεια των κυττάρων που το απαρτίζουν περιπλέκει περισσότερο την κατάσταση. Ακόμη και σε επίπεδο μονοειδικού βιοϋμενίου, η έκφραση των γονιδίων μεταξύ κυττάρων του ίδιου είδους δεν ταυτίζεται, υποδηλώνοντας ότι το βιοϋμένιο αντιπροσωπεύει ουσιαστικά, μια συστάδα από κύτταρα που βρίσκονται σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης (Jefferson, 2004). Ωστόσο, ο συνδυασμός υψηλής βακτηριακής πυκνότητας, στενής κυτταρικής επαφής και το σχετικά σταθερό περιβάλλον που παρέχουν τα βιοϋμένια, τα καθιστά κατάλληλα για οριζόντια μεταφορά γονιδίων (horizontal gene transfer, HGT) (Sørensen et al., 2005).

Τα συμπεράσματα μελετών για τις συνέπειες της μεταφοράς πλασμιδίων στο σχηματισμό βιοϋμενίου, κυρίως μέσω βακτηριακής σύζευξης, είναι αμφίσημα. (Ghigo, 2001, Reisner et al., 2006, Røder et al., 2013). Η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι η συχνότητα και ο ρόλος της μεταφοράς πλασμιδιακού DNA στο βιοϋμένιο εξαρτάται από τις γενετικές ιδιότητες του πλασμιδίου, αλλά και του δέκτη του (Kroil et al., 2013, Røder et al., 2013). Πολλά πλασμίδια που κωδικοποιούν γονίδια δομών προσκόλλησης, όπως οι κροσσοί (fimbriae), έχουν χαρακτηριστεί, με την παρουσία τους να θεωρείται υπεύθυνη για την επαγωγή σχηματισμού βιοϋμενίου στο κύτταρο-δέκτη (May και Okabe, 2008, Burmølle et al., 2012). Σε αντίθεση με τα μονοειδικά βιοϋμένια, η HGT μέσω βακτηριακής σύζευξης σε βιοϋμένια πολλών ειδών καταλήγει σε νέους γενετικούς συνδυασμούς που μπορεί να αποτελέσουν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Burmølle et al., 2008). Η διαθεσιμότητα των δεκτών πλασμιδίου αλλάζει ανάλογα με τη σύσταση της βιοϋμενικής κοινότητας, με αποτέλεσμα βακτήρια που φυσιολογικά δεν μπορούν να ενσωματώσουν πλασμίδιο, να παρουσιάζουν πλασμιδιακή ανοχή. Σε πρόσφατη έρευνα, βακτηριακά στελέχη ανίκανα να δεχτούν πλασμίδιο σε συγκαλλιέργεια με το βακτήριο δότη, μετατράπηκαν σε δέκτες, όταν συνυπήρξαν με 15 διαφορετικά είδη (de la Cruz-Perera et al., 2013).

Στα βιοϋμένια πολλών ειδών βακτηρίων, η HGT ενισχύεται, λόγω της πληθώρας πηγών DNA που διευκολύνουν το φαινόμενο του μετασχηματισμού. Οι μεγάλες ποσότητες εξωκυτταρικού DNA (eDNA), οι οποίες αποτελούν μέρος του δικτύου

EPS, χρησιμεύουν ως πηγή γενετικής πληροφορίας για τα μέλη της βιοϋμενικής κοινότητας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η μεταφορά του καθοριστικού παράγοντα ανθεκτικότητας στην τετρακυκλίνη (TetM), μεταξύ των διαφορετικών ειδών βακτηρίων από βιοϋμένια της στοματικής κοιλότητας (Hannan et al., 2010). Η μελέτη των Antonova και Hammer σε βιοϋμένια *Vibrio cholerae* και άλλων *Vibrio* spp., έδειξε πως η ικανότητα ανταλλαγής γονιδίων και η HGT προάγονται από τη χημική QS που υφίσταται ανάμεσα στα βιοϋμενικά κύτταρα (Antonova and Hammer, 2011). Συνεπώς, η ενισχυμένη δημιουργία νέων γενετικών συνδυασμών στα πολυειδικά βιοϋμένια οφείλεται στην υψηλή διαθεσιμότητα και ποικιλότητα δυνητικών δεκτών γενετικού υλικού και στην ύπαρξη πληθώρας μηχανισμών που ενισχύουν την HGT.



Εικόνα 3. Απεικόνιση αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ειδών σε ένα μικτό βιοϋμένιο.

Στην παραπάνω εικόνα παρουσιάζονται διάφορα είδη αλληλεπιδράσεων μεταξύ των διαφορετικών ειδών ενός πολύ-ειδικού βιοϋμενίου. **Πάνω αριστερά:** Συμμεταβολισμός, όπου το βακτηριακό είδος που απεικονίζεται με μπλε χρώμα παράγει ή μεταβολίζει κάποιο ανεπιθύμητο υπόστρωμα, ώστε να επιτραπεί η ανάπτυξη του κόκκινου βακτηριακού είδους. **Κάτω αριστερά:** Συνάθροιση (coaggregation) δύο διαφορετικών ειδών βακτηρίων (κόκκινα και μπλε κύτταρα), τα οποία προσκολλώνται μέσω ειδικών επιφανειακών μορίων που απεικονίζονται με κίτρινο και ροζ χρώμα. **Πάνω δεξιά:** HGT, όπου το πλασμιδιακό DNA (κύκλοι άσπρου χρώματος) μεταφέρεται από τα κύτταρα του κόκκινου βακτηριακού είδους σε αυτά του μπλε, διαμέσου συζευκτικών τριχιδίων (κόκκινες γραμμές). **Κάτω δεξιά:** QS, εντός του ίδιου είδους (κόκκινα κύτταρα με πορτοκαλί AHL μόρια) και μεταξύ των

διαφορετικών ειδών (μπλε και πράσινα κύτταρα με γαλάζια AI-2 μόρια). Η επικοινωνία πραγματοποιείται μέσω διάχυτων μορίων, με τα πορτοκαλί AHL μόρια να μπορούν να φτάσουν και να επηρεάσουν και τα γειτονικά κύτταρα του μπλε βακτηριακού είδους. Τα κύτταρα που απεικονίζονται με κίτρινο, γαλάζιο και μωβ χρώμα παραμένουν ανεπηρέαστα από όλες τις μορφές αλληλεπιδράσεων.

1.3 *Bacillus subtilis*

Ταξινόμηση

Το γένος *Bacillus* συνίσταται από έναν μεγάλο αριθμό διαφορετικών Gram-θετικών αερόβιων βακτηρίων, με ραβδοειδές σχήμα και ικανότητα κίνησης που αποδίδεται στα περίτριχα μαστίγια που το περιβάλλουν. Το *Bacillus subtilis* είναι ένας αερόβιος μικροοργανισμός, ο οποίος παρουσία γλυκόζης και νιτρικού μπορεί να εμφανίσει και μερική αναερόβια ανάπτυξη (US EPA, 1997). Το θερμοκρασιακό εύρος βέλτιστης ανάπτυξης υπολογίστηκε μεταξύ 30-37°C, με ελάχιστη θερμοκρασία που παρουσιάζεται ανάπτυξη τους 18°C και μέγιστη τους 43°C (Korsten και Cook, 1996). Πρόκειται για ένα ευρέως διαδεδομένο βακτήριο του εδάφους το οποίο, όταν είναι βιολογικά ενεργό, συμβάλλει στην ανακύκλωση των θρεπτικών συστατικών, χάρη στην πληθώρα ενζύμων που παράγει. Οι πληθυσμοί του στο έδαφος ποικίλλουν και ανέρχονται περίπου στα 10^6 - 10^7 κύτταρα ανά γραμμάριο χώματος. Ακόμη και αν το έδαφος έχει εμπλουτιστεί με οργανική ύλη, η οποία παρέχει άμεσα αξιοποιήσιμα θρεπτικά στοιχεία, το *Bacillus* spp. εξακολουθεί να υπάρχει στο ανενεργό στάδιο του ενδοσπορίου. Υπολογίζεται πως >60% των πληθυσμών *Bacillus* spp. του εδάφους βρίσκονται σε μορφή ενδοσπορίου που είναι πολύ ανθεκτική σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες (Claus και Berkeley, 1986).

Ιστορικά, πριν την ερευνητική μονογραφία του Smith το 1946 και το 1952, ο χαρακτηρισμός *Bacillus subtilis* δινόταν σε όλους τους αερόβιους βακίλους που σχημάτιζαν ενδοσπόριο (Logan, 1988). Αργότερα, ανακαλύφθηκαν πολλά είδη που πλέον ανήκουν επίσημα στο είδος *B. subtilis*, όπως τα *B. atterimus*, *B. mesentericus*, *B. niger*, *B. panis*, *B. vulgaris*, *B. nigrificans* και *B. natto*. Παλαιότερα υπήρχε δυσκολία στο διαχωρισμό των 3 συγγενών ειδών *B. subtilis*, *B. licheniformis* και *B. pumilus*, τα οποία ταξινομούσαν μαζί ως ομάδα ή φάσμα-*subtilis* (Gordon, 1973).

Παθογένεια και επιδημιολογικά στοιχεία

Το *Bacillus subtilis* δεν κατηγοριοποιείται παραδοσιακά στα παθογόνα βακτήρια του ανθρώπου. Παρά την ικανότητά του να αναπτύσσεται σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος, στο οποίο συμπεριλαμβάνεται και η θερμοκρασία του ανθρώπινου σώματος, δεν εμφανίζει τους τυπικούς μηχανισμούς προσκόλλησης παθογόνων του ανθρώπου (Edberg, 1991). Ωστόσο, έχουν καταγραφεί περιστατικά τροφογενούς δηλητηρίασης, στα οποία εμπλέκεται. Για παράδειγμα, το 2005 μια έξαρση που παρουσιάστηκε σε παιδικό σταθμό, έπειτα από κατανάλωση σκόνης γάλακτος, με κυριότερο σύμπτωμα τον έμετο (Pavic et al., 2005). Μαζί με το *Bacillus*

subtilis, μερικά ακόμη είδη *Bacillus*, όπως τα *B. licheniformis* και *B. pumilus*, που απομονώνονται συχνά από γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα ή από το περιβάλλον αγροκτημάτων, είναι ικανά να παράξουν την τοξίνη cereulide του *Bacillus cereus* που προκαλεί έμετο, καθώς και άλλες εντεροτοξικές ουσίες επιβλαβείς για τον άνθρωπο (Nieminen et al., 2007, Yoo et al., 2014). Βέβαια, οι εξάρσεις που μπορεί να προκαλούνται από το *Bacillus subtilis*, απουσία μικροβιολογικής ταυτοποίησης εις βάθος, αποδίδονται συνήθως στο *Bacillus cereus* (Logan, 2012).

Οι ποικιλία πρωτεασών και άλλων ενζύμων που παράγει, δεν του επιτρέπουν μόνο να αποδομεί φυσικά υποστρώματα, αλλά το καθιστούν ένα από τα κυριότερα βακτήρια που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανική παραγωγή ενζύμων και εξειδικευμένων χημικών. Τα δημοφιλέστερα είδη για τις βιοτεχνολογικές διεργασίες παραγωγής πρωτεϊνών είναι τα *B. subtilis* και *B. licheniformis*, χάρη στις εξαιρετικές ζυμωτικές τους ιδιότητες, την υψηλή παραγωγική απόδοση (20-25 γραμμάρια ανά λίτρο) και την παντελή έλλειψη τοξικών παραπροϊόντων. Ειδικότερα για τον *B. subtilis*, η ευκολία δημιουργίας αναπτυξιακών πρωτοκόλλων για σποριογένεση, πρόσδεση και πρόσληψη DNA (μετασηματισμό), το κατέστησαν το κυριότερο αντικείμενο μελέτης και τελικά, το καλύτερα χαρακτηρισμένο Gram-θετικό βακτήριο (van Diji και Hecker, 2013).

Σχηματισμός βιοϋμενίου

Στον τομέα της έρευνας, το *B. subtilis* αποτελεί ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο βακτήριο, χάρη στην ικανότητά του να σχηματίζει ισχυρά βιοϋμένια με περίτεχνη αρχιτεκτονική. Η πολυπλοκότητα της δομής τους εκδηλώνεται τόσο με χαρακτηριστικές αποικίες σε τρυβλία με άγαρ, όσο και σε υγρές καλλιέργειες, ως πλωτή μεμβράνη στην επιφάνεια (Branda et al., 2001, Vlamakis et al., 2013). Η συνηθέστερη επιλογή “άγριου” γονοτυπημένου στελέχους για πειράματα βιοϋμενίων στο εργαστήριο είναι το NCIB3610 (Mielich-Süss και Lopez, 2015). Η πειραματική έρευνα που βασίστηκε στο συγκεκριμένο στέλεχος ανέδειξε πως η αφθονία αρχιτεκτονικών χαρακτηριστικών οφείλεται στον υψηλό βαθμό κυτταρικής εξειδίκευσης και διακυτταρικής επικοινωνίας εντός της βιοϋμενικής κοινότητας, η οποία ακολουθείται από μοτίβα χωροχρονικής οργάνωσης που παρατηρούνται συνήθως σε πολυκύτταρους οργανισμούς (Vlamakis et al., 2008, Lopez et al., 2009). Βέβαια, πολλά εργαστηριακά στελέχη του *B. subtilis* 168 χάνουν την ικανότητα σχηματισμού ισχυρών βιοϋμενίων, λόγω συσσώρευσης μεταλλάξεων κατά τη διάρκεια της αναπαραγωγής στο εργαστήριο (φαινόμενο “εξημέρωσης”, domestication). Ο σχηματισμός δομικά εξελιγμένων βιοϋμενίων από “άγρια” (wild) στελέχη απομονωμένα από το φυσικό περιβάλλον είναι ενδεικτικός της σημασίας τους στην επιβίωση του *B. subtilis*, υπό φυσικές συνθήκες (Zeigler et al., 2008).

Η έναρξη σχηματισμού ενός βιοϋμενίου απαιτεί αλλαγή της κατάστασης των κυττάρων από πλαγκτονική σε στατική (sessile), η οποία πυροδοτείται από ενισχυμένα εξωτερικά σήματα, όπως η έλλειψη θρεπτικών στοιχείων, τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου ή η προσκόλληση σε επιφάνειες. Η μεταβολή της κυτταρικής κατάστασης πραγματοποιείται με ταυτόχρονη μείωση της γονιδιακής έκφρασης των μηχανισμών κίνησης και επαγωγή της παραγωγής εξωκυτταρικού πλέγματος (Cairns

et al., 2013, Kolodkin-Gal et al., 2013). Κύριος ρυθμιστικός μεταγραφικός παράγοντας της αλλαγής κυτταρικής κατάστασης είναι ο SinR (Kearns et al., 2005). Στα κύτταρα με δυνατότητα κίνησης ο SinR καταστέλλει τη μεταγραφή των υπεύθυνων γονιδίων για παραγωγή εξωκυτταρικής μεμβράνης, προάγοντας έμμεσα την κινητικότητα και το διαχωρισμό των κυττάρων (Branda et al., 2006). Μόλις οι περιβαλλοντικές συνθήκες ευνοήσουν τη δημιουργία βιοϋμενίου, τη δραστηριότητα του SinR ανταγωνίζονται άμεσα ή έμμεσα οι πρωτεΐνες YlbF και YmcA. Η μειωμένη δραστηριότητα του SinR συνεπάγεται απώλεια κινητικότητας, σχηματισμό αλυσίδων κυττάρων και παραγωγή εξωκυτταρικής μεμβράνης (Lemon et al., 2008).

Ο σχηματισμός βιοϋμενίου για το *B. subtilis* σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ακολουθεί ένα διακριτό μονοπάτι ανάπτυξης. Μετά τον εμβολιασμό θρεπτικού υλικού με κύρια πηγή άνθρακα τη γλυκερόλη (MSgg, Branda et al., 2001), τα κύτταρα συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται ως πλαγκτονικά, περίπου έως την πυκνότητα των 5×10^7 cfu/ml, για 1 μέρα επώασης σε θερμοκρασία δωματίου. Σε αυτό το σημείο, η πλειονότητα των κυττάρων μεταφέρεται στη διεπιφάνεια αέρα-υγρού μέσου και σχηματίζει μια επιφανειακή μεμβράνη (pellicle) που αποτελεί ένα βιοϋμένιο που επιπλέει. Η μεμβράνη συνεχίζει να είναι εμφανής, αλλά επίπεδη, έπειτα από 3 ημέρες. Μετέπειτα, τα συγκριτικά λιγότερα πλαγκτονικά κύτταρα που απομένουν ($<10^5$ cfu/ml) διατηρούν την κινητικότητά τους και δε δημιουργούν σπόρια. Αντίθετα, καθώς τα κύτταρα εντός της βιοϋμενικής μεμβράνης συνεχίζουν να πολλαπλασιάζονται, υφίστανται δραματική διαφοροποίηση. Χάνουν την ικανότητα κίνησης, λόγω αναστολής της λειτουργίας των υδρολασών του κυτταρικού τοιχώματος και σχηματίζουν μακριές δέσμες αλυσίδων που ευθυγραμμίζονται παράλληλα (Branda et al., 2001). Το βιοϋμένιο επεκτείνεται, χάρη στη διατήρηση μερικής κινητικότητας ορισμένων κυττάρων και στην απελευθέρωση επιφανειοδραστικών μορίων (Angelini et al., 2009). Κατά την επέκταση και ωρίμαση του βιοϋμενίου, η παραγωγή του πλέγματος συνεχίζεται και εμφανίζεται η χαρακτηριστική πτυχωτή δομή του *B. subtilis*. Οι πτυχώσεις αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα του κυτταρικού θανάτου από τον περιορισμό χώρου και τις έμμεσες δυνάμεις συμπίεσης που ασκεί η μηχανική ακαμψία του βιοϋμενικού πλέγματος (Asally et al., 2012, Trejo et al., 2013). Στις 5 ημέρες επώασης και καθώς η κυτταρική μάζα αυξάνεται, ομάδες κυττάρων ξεκινούν να αναπτύσσονται ως εναέριες προεκβολές (aerial projections), στις πτυχώσεις της επιφανειακής μεμβράνης. Οι εναέριες δομές της επιφανειακής μεμβράνης προσομοιάζουν με αυτές που δημιουργούνται στις κορυφές των αποικιών των τρυβλίων με άγαρ. Βέβαια, για να επιτευχθεί η συγκεκριμένη χωροχρονική οργάνωση, απαιτείται η ύπαρξη του εξωκυτταρικού πλέγματος που συγκρατεί τα βιοϋμενικά κύτταρα (Branda et al., 2001). Συνολικά, οι πτυχώσεις προσφέρουν μερικά πλεονεκτήματα στη μικροαποικία. Παρέχουν καλύτερη πρόσβαση των κυττάρων σε οξυγόνο, λόγω της αύξησης του λόγου επιφάνειας-όγκου (Kolodkin-Gal et al., 2013), διευκολύνουν τη ροή των υγρών εντός του βιοϋμενίου, μέσω σχηματισμού ενός πολύπλοκου δικτύου καναλιών (Wilking et al., 2013) και δημιουργούν πρόσφορες περιοχές για σποριογένεση και εξάπλωση των σπορίων,

όπως μαρτυρά η τοπική έκφραση των εξειδικευμένων γονιδίων σποριογένεσης *sspE-lacZ* στις κορυφές των εναέριων προεκβολών (Branda et al., 2001).

Η άκαμπτη μεμβράνη που περιβάλλει το βιοϋμένιο του *B. subtilis* περιέχει εξωκυτταρικούς πολυσακχαρίτες (EPS) και πρωτεΐνες. Τα υπεύθυνα γονίδια για την παραγωγή των EPS αποτελούν τμήμα του οργανωμένου οπερονίου *epsA-O*. Οι δύο κύριες πρωτεΐνες, TasA και TapA, που συμβάλλουν στη δομική συνοχή της μεμβράνης, κωδικοποιούνται από 3 γονίδια, τα οποία οργανώνονται στο οπερόνιο *tapA-sipW-tasA* (Branda et al., 2006). Η TasA είναι μια λειτουργική αμυλοειδής πρωτεΐνη που εκκρίνεται στον εξωκυττάριο χώρο με τη βοήθεια της SipW και συσσωματώνεται σε δομές ινών πάνω στο κυτταρικό τοίχωμα από την TapA (Romero et al., 2011). Μετάλλαξη έλλειψης του γονιδίου *tasA* οδηγεί σε απώλεια της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου, όχι τόσο δραματική όσο οι ελλείψεις γονιδίων του οπερονίου *eps*. Οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις προκαλούν ανάπτυξη επίπεδων αποικιών και εξαιρετικά εύθραυστων επιφανειακών μεμβρανών (pellicle), με τα βιοϋμενικά κύτταρα όμως να διατηρούν την ικανότητα σχηματισμού αλυσίδων κυττάρων που δε συγκρατούνται μεταξύ τους (Branda et al., 2006). Ένα επιπλέον συστατικό του πλέγματος, που ανακαλύφθηκε πρόσφατα, είναι η BslA. Πρόκειται για ένα μόριο πρωτεϊνικής φύσεως που εκκρίνεται κατά τα τελευταία στάδια της ωρίμασης του βιοϋμενίου. Συγκεντρώνεται σε υδροφοβική στιβάδα στην κορυφή του βιοϋμενίου, η οποία δρα ως υδατοαπωθητικός φραγμός για την βιοϋμενική κοινότητα (Hobley et al., 2013).

1.4 *Cronobacter sakazakii*

Ταξινόμηση

Οι απαρχές του καθορισμού του μέλους της οικογένειας Enterobacteriaceae, *Cronobacter sakazakii*, ως νέο είδος, βρίσκονται πίσω στο 1980. Οι μελέτες του Farmer και της ερευνητικής του ομάδας εκείνη την εποχή, ξεχώρισαν το πρότερα γνωστό ως “*Enterobacter cloacae* που σχηματίζει κίτρινες αποικίες” από το *Enterobacter cloacae* και του απέδωσαν το όνομα *Enterobacter sakazakii*, βάσει των διαφορών μεταξύ τους που αναδείχθηκαν από δοκιμασίες DNA-DNA υβριδισμού, ανθεκτικότητας σε αντιβιοτικά, βιοχημικές αντιδράσεις και την ικανότητα παραγωγής χρωστικών. Τα αποτελέσματα του DNA-DNA υβριδισμού δεν ήταν ικανά να ξεκαθαρίσουν από μόνα τους το τοπίο, διότι έδειξαν περίπου 50% συσχέτιση του *Enterobacter sakazakii* με δύο βακτηριακά είδη από διαφορετικά γένη, τα *Enterobacter* και *Citrobacter*. Ωστόσο, επιλέχθηκε η κατάταξή του στο πρώτο γένος, καθώς εμφάνιζαν περισσότερες γονοτυπικές και φαινοτυπικές ομοιότητες (Farmer et al., 1980). Περεταίρω διερεύνηση από τους Iversen et al. (2007) οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το *Enterobacter sakazakii* δεν κατατάσσεται στο γένος *Enterobacter*, αλλά αποτελεί ξεχωριστή ομάδα μικροοργανισμών με όμοια χαρακτηριστικά. Η πρότασή τους στηρίχθηκε σε ανεξάρτητες μοριακές μεθόδους, όπως η f-AFLP γονοτύπηση, σε αυτοματοποιημένη γονοτύπηση RNA, πλήρη αλληλούχιση των γονιδίων 16s rRNA και DNA-DNA υβριδισμό, και πυροδότησε

έρευνες που οδήγησαν στην κοινά αποδεκτή δημιουργία του γένους *Cronobacter* (Iversen et al., 2007). Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των πρόσφατων ερευνών, το *Cronobacter* spp. διακρίνεται στα εξής 7 είδη: *C. sakazakii*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. malonaticus*, *C. condimentii*, *C. universalis* και *C. dublinensis*. Πρόκειται για μη σποριογόνα, προαιρετικά αναερόβια Gram-αρνητικά βακτήρια, με σχήμα βάκιλλου και δυνατότητα κίνησης.

Παθογένεια και επιδημιολογικά στοιχεία

Το *Cronobacter* spp. χαρακτηρίζεται ως ευκαιριακό παθογόνο με σοβαρές επιπτώσεις όπως βακτηραιμία, νεκρωτική εντεροκολίτιδα και νεογνική μηνιγγίτιδα. Το *Cronobacter sakazakii* φαίνεται να έχει χαμηλή μολυσματική δόση και μικρή περίοδο επώασης, ενώ προσβάλλει κυρίως νεογνά. Πρόκειται για ένα Gram-αρνητικό βακτήριο, ραβδοειδούς σχήματος, με ικανότητα κίνησης. Δε σχηματίζει ενδοσπόριο, μπορεί όμως να αναπτυχθεί υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες (FAO/WHO, 2008). Το θερμοκρασιακό εύρος που επιτρέπει την ανάπτυξή του κυμαίνεται είναι 6 έως 45°C, με τη βέλτιστη ανάπτυξη να παρατηρείται μεταξύ 37°C και 43°C, ενώ ο χρόνος διπλασιασμού στους 22°C ανέρχεται περίπου στα 40 λεπτά (Food Safety Authority of Ireland, 2011).

Οι ακριβείς μηχανισμοί και παράγοντες παθογένειας του *Cronobacter* spp. παραμένουν ακόμη ασαφείς. Ορισμένα στελέχη παράγουν εντεροτοξίνη, άλλα προσβάλλουν τα μακροφάγα και πολλαπλασιάζονται εντός αυτών ή προσκολλώνται και εισβάλλουν στα ενδοθηλιακά κύτταρα του ανθρώπου. Υπεύθυνη πρωτεΐνη για την προσκόλληση είναι η επιφανειακή πρωτεΐνη A που κωδικοποιείται από το γονίδιο *omp-A*, το οποίο φέρουν στο γονιδίωμά τους όλα τα στελέχη του *Cronobacter*. Συνεπώς, παρατηρείται μεγάλη ποικιλομορφία λοιμογόνου ικανότητας ανά στέλεχος *Cronobacter* (Yan et al., 2012). Αν και δεν είναι όλα τα στελέχη ικανά να μολύνουν νεογνά, κανένα δεν μπορεί να θεωρηθεί απολύτως ακίνδυνο για την υγεία τους. Ανεξαρτήτως μηχανισμού και μολυσματικής ικανότητας όλα τα είδη του γένους *Cronobacter* χαρακτηρίζονται ως παθογόνα για τη συγκεκριμένη ηλικιακή ομάδα. Μέχρι σήμερα τα καταγεγραμμένα περιστατικά λοίμωξης νεογνών ενοχοποιούν μόνο στελέχη των ειδών *C. sakazakii*, *C. malonaticus* και *C. turicensis*. Στο στέλεχος ST4 του *C. sakazakii* μάλιστα, αποδίδονται τα περισσότερα περιστατικά νεογνικής μηνιγγίτιδας. Στη μελέτη των Pagotto et al. (2003), η θανατηφόρα δόση υπολογίστηκε σε νεογέννητα ποντίκια με ενδοπεριτοναϊκή έγχυση στα 10^8 CFU για όλα τα στελέχη *Cronobacter sakazakii*, ενώ δια στόματος μόνο 2 εκ των 18 στελεχών αποδείχθηκαν ικανά να προκαλέσουν θάνατο. Η τιμή αυτή δεν αντανάκλα απαραίτητα τη σχέση δόσης-απόκρισης για τον ανθρώπινο νεογνικό οργανισμό. Σύμφωνα με δεδομένα των FAO/WHO, η σχέση δόσης-απόκρισης είναι γραμμική για αριθμό βακτηριακών κυττάρων μικρότερο των 10.000 CFU (Zhu, 2013).

Η πρώτη επίσημη μελέτη και καταγεγραμμένη απομόνωση *Cronobacter* spp. πραγματοποιήθηκε το 1961 από τους Urmengy και Franklin στην Αγγλία, με αφορμή το θάνατο 2 νεογνών από μηνιγγίτιδα τρία χρόνια νωρίτερα (Putthana et al., 2012,

Zhu, 2013). Σήμερα, τα περιστατικά λοιμώξεων από *Cronobacter* είναι αυξημένα σε σχέση με το παρελθόν, παραμένουν όμως αρκετά σπάνια σε σχέση με άλλες μολυσματικές ασθένειες (FAO/WHO, 2008). Δεδομένα ανασκόπησης των FAO/WHO το 2008, έδειξαν πως μεταξύ των ετών 1961-2008 καταγράφηκαν περίπου 120 περιστατικά λοιμώξεων από *Cronobacter* spp. σε βρέφη και παιδιά κάτω των 3 ετών. Τα 27 από αυτά οδήγησαν σε θάνατο, αποδίδοντας ένα μέσο ποσοστό θνητότητας 22%. Ωστόσο, το ετήσιο ποσοστό θνησιμότητας πρόωρων ή ελλιποβαρών νεογνών (<2500 γραμμάρια) από λοίμωξη *Cronobacter* ανέρχεται στο 50%. Ο ετήσιος δείκτης επίπτωσης στη συγκεκριμένη ευαίσθητη ηλικιακή ομάδα ανέρχεται στα 9/100.000 νεογνά. Λοιμώξεις από *Cronobacter* spp. μπορεί να εμφανιστούν σε όλες της ηλικιακές ομάδες, σε ιδιαίτερο κίνδυνο όμως βρίσκονται τα νεογνά κάτω των 28 ημερών, τα πρόωρα, ελλιποβαρή, ανοσοκατεσταλμένα ή εξασθενημένα λόγω φαρμακευτικής αγωγής νεογνά καθώς και αυτά που έχουν οροθετικές μητέρες. Όσον αφορά στις ασθένειες, τα συμπτώματα της μηνιγγίτιδας εμφανίζονται ήδη από την πρώτη εβδομάδα ζωής των νεογνών, η βακτηριαιμία καταλήγει σε θάνατο μόνο στο 10% των περιπτώσεων, ενώ η μηνιγγίτιδα αγγίζει το 44%, αφήνοντας μακροπρόθεσμες νευρολογικές επιπλοκές στην πλειονότητα των επιζώντων. Σύμφωνα με αυτά, η Διεθνής Επιτροπή Μικροβιολογικών Προδιαγραφών για τα Τρόφιμα (ICMSF) αξιολόγησε το γένος *Cronobacter* ως “σοβαρό κίνδυνο για περιορισμένους πληθυσμούς, απειλητικό για τη ζωή ή με ουσιώδεις χρόνιες επιπτώσεις” (Zhu, 2013).

Βέβαια, οι λοιμώξεις από *Cronobacter* υποκαταγράφονται συστηματικά. Χαρακτηριστικό παράδειγμα οι Η.Π.Α., όπου μόνο στην Πολιτεία της Minnesota απαιτείται η καταγραφή των περιστατικών λοίμωξης με αιτιολογία το *Cronobacter*. Το 2011, η αναφορά περιστατικών μόνο από τις Πολιτείες Missouri και Illinois ώθησε τα Κέντρα Πρόληψης και Ελέγχου Νοσημάτων της Αμερικής (CDC), να ζητήσουν πιο συστηματική καταγραφή από τους υπαλλήλους δημόσιας υγείας σε ολόκληρη τη χώρα. Αποτέλεσμα, η αναφορά επιπλέον 2 περιστατικών, ενός από την Πολιτεία της Oklahoma και ενός από την Πολιτεία της Florida. Συνολικά για το 2011 λοιπόν, καταγράφηκαν επίσημα στις Η.Π.Α. 13 περιστατικά λοίμωξης από *Cronobacter* (Jason, 2012). Όσον αφορά στην Ελλάδα, τα δεδομένα του Κέντρου Ελέγχου και Πρόληψης Νοσημάτων (ΚΕΕΛΠΝΟ) για την περίοδο 2005-2009, το *Cronobacter* ταυτοποιήθηκε ως αιτιογόνο παθογόνο σε 2 από τα 510 συνολικά δηλωθέντα κρούσματα βακτηριακής μηνιγγίτιδας.

Στην προσπάθεια ανεύρεσης της πηγής των μολύνσεων έγινε ανασκόπηση συνολικά 10 εξάρσεων σε Μονάδες Εντατικής Θεραπείας νεογνών από διάφορες χώρες του πλανήτη. Μάλιστα, μια εκ των εξάρσεων που κατέληξε σε 4 θανάτους νεογνών είχε εμφανιστεί και μελετηθεί στην Ελλάδα το 1987 από την Α. Αρσένη και την ομάδα της. Τα επιδημιολογικά και μικροβιολογικά δεδομένα της μελέτης δεν έδειξαν ύπαρξη *Cronobacter* σε κανένα δείγμα από τα χέρια υπαλλήλων και το περιβάλλον της μονάδας του νοσοκομείου παιδών «Αγία Σοφία», και η πηγή της εξάπλωσης του παθογόνου παρέμεινε άγνωστη (Arseni et al., 1987). Αντίθετα, στις υπόλοιπες περιπτώσεις που αναλύθηκαν, σε όλα τα νοσοκομεία νεογνά είχε χορηγηθεί παρασκευάσμα βρεφικού γάλακτος από σκόνη (PIF). Τα ευρήματα αυτά,

οδήγησαν το 2002 τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) να μελετήσει δείγματα PIF, από το 23% των οποίων απομόνωσε στελέχη του *Cronobacter*. Επακόλουθο, η δήλωση του WHO: «Η μολυσμένη σκόνη βρεφικού γάλακτος έχει αποδειχθεί επιδημιολογικά και μικροβιολογικά πηγή και μέσο μετάδοσης νεογνικών λοιμώξεων» (Jason, 2012).

Σχηματισμός βιοϋμενίου

Οι έρευνες σχηματισμού βιοϋμενίου που έχουν διεξαχθεί έως σήμερα για το *Cronobacter sakazakii* είναι ολιγάριθμες, ιδιαίτερα σε σύγκριση με άλλα παθογόνα, όπως τα *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 και *Staphylococcus aureus*. Η βιοχημεία της προσκόλλησης και της παραγωγής EPS κατά τη διάρκεια σχηματισμού του βιοϋμενίου δεν είναι σαφώς κατανοητή για το συγκεκριμένο γένος (Du et al., 2012). Η μεγάλη ποικιλομορφία μεταξύ των διαφορετικών στελεχών του *C. sakazakii* είναι αδιαμφισβήτητη, με αποτέλεσμα ο σχηματισμός βιοϋμενίου να διαφέρει ανάμεσα στα στελέχη, ενώ ταυτόχρονα εξαρτάται και από πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων (θρεπτικό μέσο, επιφάνεια προσκόλλησης, θερμοκρασία, υγρασία, αλατότητα, κλπ.), οι οποίοι επηρεάζουν το αποτέλεσμα και την ανθεκτικότητα του βιοϋμενίου (Jung et al., 2013, Hartmann et al., 2010).

Το *C. sakazakii* μπορεί να προσκολληθεί και να σχηματίσει βιοϋμένια σε σιλικόνη, λατέξ, πολυανθρακικά πολυμερή, ανοξείδωτο χάλυβα, γυαλί και πολυβινυλοχλωρίδιο (PVC) (Iversen et al., 2004, Lehner et al., 2005). Παρόμοια ικανότητα φαίνεται να εμφανίζει και σε νωπά αγροτικά προϊόντα και χυμούς (Kim et al., 2005). Ακόμη, τρόφιμα όπως σκόνη βρεφικού γάλακτος ή νωπά φρούτα και λαχανικά αποτελούν πιθανούς αγωγούς (vehicles) *C. sakazakii*, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία νεογνών και ανοσοκατεσταλμένων πληθυσμών αντίστοιχα. Η επαφή επιμολυσμένων τροφίμων με βιοτικές ή αβιοτικές επιφάνειες είναι δυνατό να επιφέρει προσκόλληση και σχηματισμό βιοϋμενίων, αυξάνοντας τον κίνδυνο λοίμωξης. Πολλές καταγεγραμμένες λοιμώξεις νεογνών σε κλινικό περιβάλλον ενοχοποιούν την αποίκιση από *C. sakazakii*, σκευών (κουτάλι, ψήκτρα, ομογενοποιητής-blender) που χρησιμοποιήθηκαν για την προετοιμασία της φόρμουλας βρεφικού γάλακτος (Muytjens et al., 1983, Simmons et al., 1989, Noriega et al., 1990, Bar-Oz et al., 2001). Ο σχηματισμός βιοϋμενίων από παθογόνα σε φρέσκα φρούτα και λαχανικά κατά τα στάδια της παραγωγικής αλυσίδας μπορεί να αυξήσει τον κίνδυνο τροφογενών λοιμώξεων (Kim et al., 2006).

Η σύνθεση του εξωκυτταρικού πλέγματος χρήζει περεταίρω αποσαφήνισης, με αποδεδειγμένη όμως την ύπαρξη κυτταρίνης (Lehner et al., 2005, Grimm et al., 2008). Επιπλέον, έχουν ανιχνευθεί γονίδια βιοσύνθεσης μαστιγίων (Hartmann et al., 2010).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Το γάλα που παράγεται στα μαστικά κύτταρα θεωρείται στείρο, εξαιτίας όμως της υψηλής περιεκτικότητας σε θρεπτικά στοιχεία, της υψηλής ενεργότητας υγρασίας και του ουδέτερου pH που το χαρακτηρίζουν, αποτελεί ιδανικό περιβάλλον και στόχο επιμόλυνσης για παθογόνα και αλλοιωγόνα βακτήρια (Quigley et al., 2013). Η βακτηριακή επιμόλυνση μπορεί να προκύψει σε οποιοδήποτε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας και να προκαλέσει αλλοίωση του γάλακτος και των παραγώγων του ή λοίμωξη στον καταναλωτή (Gopal et al., 2015). Τα δύο, υπό εξέταση, βακτήρια, το ευκαιριακό παθογόνο *Cronobacter sakazakii* και το αλλοιωγόνο *Bacillus subtilis*, απασχολούν ιδιαίτερα τις βιομηχανίες παραγωγής γάλακτος και των προϊόντων του. Το *Bacillus subtilis*, ως Gram-θετικός μικροοργανισμός που σχηματίζει ενδοσπόρια, είναι ανθεκτικό σε ακραίες συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας, υγρασίας, έλλειψης θρεπτικών συστατικών, που επικρατούν σε βιομηχανικά περιβάλλοντα. Η λοίμωξη από *Cronobacter sakazakii*, αν και σπάνια, συσχετίζεται άμεσα με την κατανάλωση φόρμουλας βρεφικού γάλακτος και χαρακτηρίζεται από σοβαρά συμπτώματα. Εάν σε οποιοδήποτε στάδιο παραγωγής προκληθεί επιμόλυνση από *C.sakazakii*, η ανθεκτικότητα του μικροοργανισμού στη θερμική επεξεργασία και το ξηρό περιβάλλον της σκόνης, καθιστά δυνατή την επιβίωσή του στο προϊόν ακόμη και για 2 έτη (FAO/WHO, 2004). Η εμφάνιση των δύο βακτηρίων στις επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων καθώς και στα παραγόμενα προϊόντα οφείλεται κυρίως στην ύπαρξη βιοϋμενίων.

Στην προσπάθεια να μελετηθεί η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου, αλλά και το αποτέλεσμα των πιθανών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα δύο διαφορετικά είδη, σχεδιάστηκαν και πραγματοποιήθηκαν τρία ανεξάρτητα πειράματα. Τα σημεία-κλειδιά της μελέτης που συνυπολογίστηκαν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό ήταν το υλικό της επιφάνειας προσκόλλησης (ανοξειδωτος χάλυβας, πολυστυρένιο) και οι συνθήκες επώασης των επιφανειών (θερμοκρασία, χρόνοι και θρεπτικό υλικό), ώστε να μελετηθεί η ικανότητα κάθε μονοκαλλιέργειας ή της συγκαλλιέργειας να προσκολλάται και να σχηματίζει βιοϋμένιο.

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1 Καλλιέργειες

Οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν στο πειραματικό μέρος της παρούσας διατριβής ήταν ένα στέλεχος *Bacillus subtilis* (απομόνωση από παστεριωμένη κρέμα με γεύση βανίλια) από τη συλλογή του εργαστηρίου Μικροβιολογίας και Βιοτεχνολογίας Τροφίμων (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, ΓΠΑ) και ένα στέλεχος *Cronobacter sakazakii* από τη συλλογή του Ινστιτούτου Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων (Ελληνικός Γεωργικός Οργανισμός, ΕΛΓΟ-Δήμητρα). Τα δύο βακτηριακά είδη παρέμειναν υπό κατάψυξη (-20°C) σε Tryptone Soya Broth (TSB) και 20% γλυκερόλη, έως την ενεργοποίησή τους στην αρχή κάθε πειράματος. Η ενεργοποίηση πραγματοποιήθηκε με μεταφορά 0,1 ml της καλλιέργειας σε δοκιμαστικό σωλήνα με 10 ml υγρού θρεπτικού υποστρώματος TSB και επώαση των δοκιμαστικών σωληνίων σε επωαστικό κλίβανο υψηλής ακρίβειας (MIR-153 Sanyo Electric Co., Osaka, Japan), στους 30°C για το *B. subtilis* και στους 37°C για το *C. sakazakii* για 24 h (1^η ανακαλλιέργεια). Η διαδικασία επαναλήφθηκε με εκ νέου μεταφορά 0,1 ml από το δοκιμαστικό σωλήνα κάθε καλλιέργειας και εκ νέου επώαση στις αντίστοιχες θερμοκρασίες για 18 h (2^η ανακαλλιέργεια).

3.2 Θρεπτικά υλικά

Στα πειράματα της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής χρησιμοποιήθηκαν τόσο μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα που παρασκευάζονταν στο εργαστήριο, όσο και γάλατα του εμπορίου (σκόνη γάλακτος πρώτης βρεφικής ηλικίας και UHT πλήρες γάλα). Όλα τα εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα είχαν αγοραστεί από διεθνώς αναγνωρισμένες εταιρείες (Lab M, Biolife, Biomérieux) και παρασκευάζονταν σύμφωνα με τις αναγραφόμενες οδηγίες. Πιο συγκεκριμένα, τα υγρά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν Tryptone Soya Broth (TSB, Biolife) σε σκόνη που ζυγίστηκε και διαλύθηκε υπό ανάδευση σε απιονισμένο ύδωρ και ταμπλέτες Ringer's solution (Lab M Limited) που ομοίως διαλύθηκαν σε απιονισμένο ύδωρ. Τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν τα επιλεκτικά *Enterobacter sakazakii* Isolation Agar (ESIA, Biomérieux) και *Bacillus cereus* Selective Agar (BCSA, Biolife) με συμπλήρωμα αντιβιοτικού (Πολυμυξίνη Β)-γαλακτώματος egg yolk και το μη επιλεκτικό Tryptone Soya Agar (TSA, Biolife), τα οποία παρασκευάζονταν και επιστρώνονταν ασηπτικά σε τρυβλία Petri. Ειδικότερα, το μη επιλεκτικό υπόστρωμα TSA επιλέχθηκε, ώστε να μπορέσουν να αναπτυχθούν αποικίες και των δύο βακτηριακών ειδών για τη μελέτη των μικτών βιοϋμενίων. Όλα τα θρεπτικά υποστρώματα, τοποθετούνταν είτε σε γυάλινες φιάλες για επίστρωση, είτε σε δοκιμαστικούς σωλήνες για επώαση και αποστειρώνονταν στους 121°C για 15 min.

Στο δεύτερο στάδιο του πειράματος, μελετήθηκε η ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου από το *C. sakazakii* παρουσία γάλακτος, ως θρεπτικό υπόστρωμα.

Σκοπός ήταν η μελέτη της ανταπόκρισης του *C. sakazakii*, ως προς την ικανότητά του να σχηματίζει βιοϋμένιο, σε ένα τρόφιμο που συχνά κατηγορείται ότι επιμολύνει και σε ένα παρόμοιο τρόφιμο, θεωρητικά πιο απαλλαγμένο από μικροβιακή χλωρίδα. Τα γάλατα (σκόνη και UHT) που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μακράς διάρκειας, συνεπώς μετά την αγορά τους από τοπική αλυσίδα σούπερ μάρκετ διατηρήθηκαν με κλειστή συσκευασία σε σκιερό μέρος, εντός του μικροβιολογικού εργαστηρίου. Η σκόνη βρεφικού γάλακτος είναι ένα προϊόν βιομηχανικής επεξεργασίας που προκύπτει από αρχική ανάμιξη των πρώτων υλών (νερό, υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, έλαια, βιταμίνες και ιχνοστοιχεία) σε νωπή ή αποξηραμένη μορφή, ομογενοποίηση, παστερίωση (72°C για 16-20 δευτερόλεπτα) και ξήρανση δια καταιονισμού. Στο παρόν πείραμα, επιλέχθηκαν σκόνη γάλακτος 1^{ης} βρεφικής ηλικίας, με σύσταση ανά 100ml έτοιμου προς κατανάλωση προϊόντος: ενέργεια 64kcal, πρωτεΐνες 1,4g, υδατάνθρακες 6,8g και λιπίδια 3,5g και UHT (Ultra High Temperature) πλήρες γάλα με σύσταση ανά 100ml: ενέργεια 63 kcal, πρωτεΐνες 3,2g, υδατάνθρακες 4,7g και λιπίδια 3,5g. Το ακριβές στάδιο, στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν τα γάλατα, ήταν για την επώαση των κουπονιών μετά τον ενοφθαλμισμό, όπου αντικατέστησαν το TSB του πρώτου μέρους των πειραμάτων. Σε αντίθεση με το TSB, τα γάλατα δεν αποστειρώνονταν περαιτέρω, αλλά τοποθετούνταν ανά 5 ml σε στείρους δοκιμαστικούς σωλήνες. Πιο συγκεκριμένα, η ακριβής ποσότητα των 5 ml UHT γάλακτος μεταφέρονταν ασηπτικά (εντός θαλάμου νηματικής ροής) απευθείας από τη συσκευασία σε μικρούς δοκιμαστικούς σωλήνες (10 cm) που είχαν αποστειρωθεί στο αυτόκαυστο στους 121°C για 15 min. Αντίθετα, η σκόνη βρεφικού γάλακτος παρασκευάζονταν ασηπτικά (εντός θαλάμου νηματικής ροής) σε επαρκή ποσότητα και εντός γυάλινης φιάλης με αποστειρωμένο απιονισμένο ύδωρ, το οποίο θερμαινόταν ξανά στους 50°C για την ανασύσταση της φόρμουλας, σύμφωνα με τις οδηγίες παρασκευής της συσκευασίας (1 scoop ανά 30 ml αποστειρωμένου νερού, θερμασμένου στους 50°C).

Όσον αφορά στα μικροβιολογικά θρεπτικά υποστρώματα, χρησιμοποιήθηκαν ακριβώς τα ίδια και με όμοιο τρόπο με το πρώτο μέρος των πειραμάτων. Πιο συγκεκριμένα, τα υγρά θρεπτικά που παρασκευάζονταν στο εργαστήριο σύμφωνα με τις αναγραφόμενες οδηγίες, ήταν τα TSB και διάλυμα Ringer. Τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα που επιλέχθηκαν, ήταν ομοίως τα επιλεκτικά ESIA και BCSA με συμπλήρωμα αντιβιοτικού (Πολυμυξίνη Β)-γαλακτώματος egg yolk, και το μη επιλεκτικό TSA. Αν και το συγκεκριμένο στάδιο των πειραμάτων δεν εστίασε στο σχηματισμό βιοϋμένιου από το βακτηριακό είδος *B. subtilis*, χρησιμοποιήθηκε το επιλεκτικό υπόστρωμα BCSA, ώστε να μελετηθεί η μικροχλωρίδα των τροφίμων που λειτούργησαν ως θρεπτικά υποστρώματα.

3.3 Κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα

Οι διαστάσεις των κουπονιών (τύπου AISi-304, Χαλυβουργική Α.Ε., Αθήνα, Ελλάδα) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν 3×0,8×0,1 cm (μ×π×υ), με εμβαδόν 5,56 cm². Τα κουπόνια φυλάσσονταν σε διάλυμα αλκοόλης 100% και

πριν τη χρήση τους στα πειράματα καθαρίζονταν προσεκτικά και αποστειρώνονταν. Η διαδικασία καθαρισμού περιλάμβανε εμβάπτιση σε ακετόνη, έως την πλήρη απομάκρυνση οποιουδήποτε υπολείμματος, πλύσιμο υπό ανάδευση (shaking) στους 50°C με διάλυμα απολυμαντικού του εμπορίου (2% vol/vol RBS 35, Fluka/Life Science Chemilab, S.A.), ξέπλυμα με απιονισμένο ύδωρ και στέγνωμα σε ξηραντήριο. Η αποστείρωση των κουπονιών λάμβανε χώρα σε αυτόκαυστο 121°C για 15 min, εντός γυάλινων δοκιμαστικών σωλήνων (μήκους 10 cm και διαμέτρου 1,5 cm) με 4,5 ml αλατούχο διάλυμα Ringer. Η τοποθέτηση στους δοκιμαστικούς σωλήνες αποσκοπούσε στον απευθείας εμβολιασμό των κουπονιών με τις βακτηριακές μονοκαλλιέργειες ή τη συγκαλλιέργεια.

3.4 Σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων *Cronobacter sakazakii* και *Bacillus subtilis* σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα κάτω από συνθήκες μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας σε θρεπτικό ζωμό

Κύριος στόχος αυτής της πειραματικής δοκιμής ήταν η ανίχνευση πιθανών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των δύο ειδών, όταν αναπτύσσονται σε συγκαλλιέργεια, με γνώμονα την ικανότητα προσκόλλησης και σχηματισμού βιοϋμενίου, συγκριτικά με τις αντίστοιχες μονοκαλλιέργειες. Ακόμη, ερευνήθηκε και η επίδραση της θερμοκρασίας στην ικανότητα ανάπτυξης βιοϋμενίου τόσο στις μονοκαλλιέργειες, όσο και στη συγκαλλιέργεια των *B. subtilis* και *C. sakazakii*. Συνολικά, έλαβαν χώρα δύο ανεξάρτητα πειράματα, ενώ σε κάθε στιγμή δειγματοληψίας λαμβάνονταν τρία ανεξάρτητα δείγματα κουπονιών προς ανάλυση ($n=6$).

Οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν για τη μελέτη της ανάπτυξης των βιοϋμενίων ήταν οι 20°C και οι 37°C, προς προσομοίωση περιβαλλοντικών συνθηκών στα παραγωγικά στάδια και της θερμοκρασίας του ανθρώπινου σώματος αντίστοιχα, εφόσον ο *Cronobacter sakazakii* είναι παθογόνος μικροοργανισμός. Μόνο οι 37°C βρίσκονται εντός του θερμοκρασιακού εύρους βέλτιστης ανάπτυξης και των δύο βακτηρίων. Συνεπώς, η ανάπτυξη στη συγκεκριμένη θερμοκρασία αναμένεται ταχύτερη σε σχέση με τους 20°C. Με την ίδια λογική, ο συνολικός χρόνος επώασης και ο χρόνος μεταξύ των δειγματοληψιών για τους 20°C ήταν μεγαλύτερος. Πιο συγκεκριμένα, ως διάρκεια συνολικής επώασης για τους 37°C επιλέχθηκαν οι 72 h, με ενδιάμεσες δειγματοληψίες ανά 24 h, ενώ για τους 20°C οι 144 h, με δειγματοληψίες ανά 48 h. Επίσης, δειγματοληψία λάμβανε χώρα και μετά τις 3 h που διαρκούσε το αρχικό στάδιο της προσκόλλησης στους 15°C. Αρχικά, η έλλειψη δεδομένων για το σχηματισμό βιοϋμενίου μιας συγκαλλιέργειας *Cronobacter sakazakii*-*Bacillus subtilis* οδήγησε στην επιλογή ενός μη επιλεκτικού θρεπτικού υλικού επώασης των επιφανειών ανοξειδωτού χάλυβα. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκε το TSB που χρησιμοποιείται ευρέως στα μικροβιολογικά εργαστήρια για τη μελέτη αερόβιων μικροοργανισμών.

Προετοιμασία εμβολίου

Μετά τις δύο ανανεώσεις που πραγματοποιήθηκαν σε TSB (Παράγραφος 3.1), ώστε να ενεργοποιηθούν οι κατεψυγμένες καλλιέργειες, έλαβε χώρα η διαδικασία της φυγοκέντρησης και έκπλυσης των κυττάρων. Αρχικά, το περιεχόμενο των δοκιμαστικών σωλήνων, μεταφέρθηκε ασηπτικά σε αποστειρωμένους σωλήνες Falcon για φυγοκέντρηση (5000xg για 10 min στους 4°C), εντός φυγοκέντρου με δυνατότητα ρύθμισης θερμοκρασίας (Heraus Multifuge 3S-R, Thermo Electron Corporation, Langenselbold, Germany). Για την παρασκευή των μικτών καλλιεργειών οι επανασυστάσεις έγιναν εις διπλούν, ώστε μετά τη 2^η επανασύσταση το περιεχόμενο ενός δοκιμαστικού σωλήνα με καλλιέργεια *B. subtilis* και ενός με *C. sakazakii* να αναμιχθούν με απόχυση σε μεγαλύτερου μεγέθους Falcon και να ακολουθήσει η διαδικασία της φυγοκέντρησης. Το υπερκείμενο κάθε Falcon μετά τη φυγοκέντρηση απορρίφθηκε και πραγματοποιήθηκε διπλή επαναιώρηση των κυττάρων σε 10 mL αλατούχου διαλύματος (quarter strength Ringer's solution), με ενδιάμεση φυγοκέντρηση ίδιων συνθηκών και με τελικό σκοπό η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι περίπου 10⁸ CFU/ml. Η καθαρότητα των καλλιεργειών (εμβολίων), καθώς και ο ακριβής μικροβιακός πληθυσμός προσδιορίστηκαν μέσω της επιφανειακής επίστρωσης κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία TSA και επώαση αυτών στους 37°C για 24 h.

Ενοφθαλμισμός κουπονιών και ανάπτυξη βιοϋμενίου

Ο ενοφθαλμισμός των αποστειρωμένων κουπονιών ανοξειδωτου χάλυβα λάμβανε χώρα εντός των δοκιμαστικών σωλήνων με το αλατούχο διάλυμα Ringer. Συγκεκριμένα, 0,5 ml από την κατάλληλη αραιώση κυττάρων της κάθε μονοκαλλιέργειας ή της συγκαλλιέργειας μεταφερόταν ασηπτικά εντός των δοκιμαστικών σωλήνων με τα 4,5 ml Ringer (αραίωση 1:10), έτσι ώστε ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός να έφτανε περίπου τα 10⁵ CFU/ml. Ιδιαίτερη προσοχή δόθηκε στην περίπτωση της μικτής καλλιέργειας, για τη διασφάλιση ίσης αναλογίας κυττάρων από το κάθε βακτηριακό είδος. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στατικά για 3 h σε υψηλής ακρίβειας επωαστικούς θαλάμους στους 15°C (στάδιο προσκόλλησης). Σε αυτό το σημείο, πραγματοποιούνταν η πρώτη δειγματοληψία (3 h), ώστε να αποκτηθεί μια ποσοτική εικόνα της ικανότητας προσκόλλησης των διαφορετικών καλλιεργειών. Ακολούθως, τα κουπόνια αφαιρούνταν προσεκτικά και, υπό ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένη λαβίδα, τοποθετούνταν σε νέους στείρους δοκιμαστικούς σωλήνες ίδιου μεγέθους, που περιείχαν 5 ml TSB (πρωτόκολλο Kostaki et al., 2012). Μετά τη μεταφορά των κουπονιών στο TSB, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν για στατική επώαση σε κλιβάνους στους 20°C για συνολικά 144 h και στους 37°C για συνολικά 72 h, με τις ενδιάμεσες δειγματοληψίες και μικροβιολογικές αναλύσεις να πραγματοποιούνται ανά 48 h και 24 h, αντίστοιχα.

Μικροβιολογικές αναλύσεις

Έπειτα από το επιθυμητό διάστημα επώασης, τα προσκολλημένα κύτταρα των κουπονιών ανοξείδωτου χάλυβα αποκολλούνται με τη μέθοδο μηχανικής απόξεσης με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortexing method, Giaouris et al., 2005). Πρόκειται για την πλέον καθιερωμένη μέθοδο απομάκρυνσης προσκολλημένων βακτηριακών κυττάρων (Lindsay και von Holy, 1997), αν και δεν μπορεί να διασφαλίσει το απόλυτο ποσοστό απόξεσης (Chorianopoulos et al., 2008). Συνοπτικά, η διαδικασία περιλάμβανε προσεκτική και υπό ασηπτικές συνθήκες αφαίρεση των κουπονιών με αποστειρωμένη λαβίδα, ξέπλυμα κάθε πλευράς με 5 ml αποστειρωμένου αλατούχου διαλύματος Ringer, για να απομακρυνθούν τα ασθενώς προσκολλημένα κύτταρα, και τοποθέτησή τους σε αποστειρωμένους σωλήνες φυγοκέντρου (Falcons) των 15 ml, οι οποίοι περιείχαν 10 γυάλινα σφαιρίδια (beads) διαμέτρου 5 mm και 6 ml αλατούχο διάλυμα Ringer. Η αποκόλληση των κυττάρων πραγματοποιούνταν με ανάδευση σε vortex με μέγιστη ταχύτητα για 2 min. Τα αποκολλημένα πλέον κύτταρα, που βρίσκονταν σε αιώρηση στο διάλυμα Ringer, χρησιμοποιούνταν για καταμέτρηση των βιοϋμενικών πληθυσμών, μέσω επιφανειακής επίστρωσης ποσότητας 0,1 ml από την κατάλληλη αραιώση σε τρυβλία TSA και για τις δύο μονοκαλλιέργειες και τη συγκαλλιέργεια, BCSA για τη μονοκαλλιέργεια *B. subtilis* και τη συγκαλλιέργεια, ή ESIA για τη μονοκαλλιέργεια *C. sakazakii* και τη συγκαλλιέργεια. Τα τρυβλία TSA και BCSA επωάζονταν για 24-48 h στους 30°C, ενώ τα ESIA στους 44°C για 24h.

Μέτρηση ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τη συσκευή Malthus

Παράλληλα με το πρωτόκολλο των Kostaki et al. (2012) για τον υπολογισμό των προσκολλημένων βιοϋμενικών κυττάρων στα κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα επωασμένων σε TSB, χρησιμοποιήθηκαν συμπληρωματικές μετρήσεις ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Η μέθοδος μεταβολής της ηλεκτρικής αγωγιμότητας μετρά την παραγωγή ιοντικών (ionic) μορίων στο θρεπτικό μέσο, η οποία αποτελεί ένδειξη βακτηριακής μεταβολικής δραστηριότητας. Μια τυπική κυψελίδα Malthus περιέχει πλατινένια ηλεκτρόδια, τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση των μεταβολών της αγωγιμότητας. Κατά αυτόν τον τρόπο, είναι εφικτή η παρακολούθηση των αλλαγών σε καθορισμένα μεσοδιαστήματα και η καταγραφή των αντίστοιχων δεδομένων. Πρόκειται για μια ταχεία μέθοδο έμμεσου προσδιορισμού των ισχυρώς προσκολλημένων κυττάρων, η οποία μπορεί να ανιχνεύσει βακτηριακά κύτταρα που δεν ανακτήθηκαν μέσω της μηχανικής απόξεσης με γυάλινα σφαιρίδια (bead vortexing method). Συνεπώς, συνιστά ένα ερευνητικό εργαλείο μεγαλύτερης ευαισθησίας (Chorianopoulos et al., 2008).

Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με το όργανο Malthus (Radiometer International, Copenhagen, Denmark), στις τελευταίες δειγματοληψίες για κάθε θερμοκρασία (144 h για τους 20°C και 72 h για τους 37°C). Όπως στη μέθοδο της μηχανικής απόξεσης με γυάλινα σφαιρίδια, το πείραμα εφαρμόστηκε σε δύο ανεξάρτητες επαναλήψεις. Η πειραματική διαδικασία για κάθε περίπτωση (τρεις περιπτώσεις καλλιέργειας: μονοκαλλιέργεια *Cr. sakazakii*, μονοκαλλιέργεια *B.*

subtilis, συγκαλλιέργεια, δύο θερμοκρασίες: 20°C και 37°C) περιλάμβανε ασηπτική μεταφορά με λαβίδα 5 κουπονιών ανοξειδωτού χάλυβα σε κυψελίδες Malthus με 5 ml TSB το καθένα, έπειτα από έκπλυση κάθε πλευράς με 5 ml Ringer. Στη συνέχεια, οι κυψελίδες τοποθετούνταν εντός του επωαστικού θαλάμου της συσκευής, με ρυθμισμένη θερμοκρασία στους 37°C για 24 h.

Οι χρόνοι ανίχνευσης (Detection times, DTs) που προκύπτουν από το όργανο, ορίζονται ως το χρονικό μεσοδιάστημα μεταξύ της πρωταρχικής καταγραφής μεταβολών στην αγωγιμότητα και της έναρξης της φάσης επιτάχυνσης των τιμών της αγωγιμότητας. Προφανώς, ένας βραχύτερος χρόνος ανίχνευσης αντιστοιχεί σε αυξημένο μικροβιακό μεταβολισμό, ο οποίος μπορεί να παρατηρηθεί και γραφικά, ως απότομη καμπύλης αύξησης μετά την ανίχνευση. Είναι εύλογο πως οι χρόνοι ανίχνευσης (DTs) είναι συνάρτηση του αρχικού μικροβιακού πληθυσμού στις κυψελίδες Malthus (κύτταρα εμβολίου τα οποία έχουν προσκολληθεί ισχυρά στις επιφάνειες ανοξειδωτού χάλυβα και έχουν σχηματίσει βιοϋμένιο), της κινητικής αύξησης των υπό μελέτη βακτηρίων και των ιδιοτήτων του θρεπτικού μέσου (Sillee και Forsythe, 1996). Συνεπώς, για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, η γραμμική συσχέτιση των χρόνων ανίχνευσης (DTs) με την αρχική συγκέντρωση των προσκολλημένων κυττάρων, υποδεικνύει ότι ένας μικρότερος χρόνος ανίχνευσης σημαίνει υψηλότερο επίπεδο αρχικά σχηματισμένου βιοϋμενίου (Chorianopoulos et al., 2010).

Σε δεύτερο στάδιο, μελετήθηκε μόνο το βακτηριακό είδος *C. sakazakii*, όταν αναπτύσσεται και σχηματίζει βιοϋμένιο σε διαφορετικού είδους γάλατα, ως θρεπτικό υπόστρωμα. Τα γάλατα που επιλέχθηκαν ήταν η φόρμουλα γάλακτος 1^{ος} βρεφικής ηλικίας, το πλήρες UHT, τα οποία παρασκευάστηκαν ή μεταχειρίστηκαν ομοίως με τα πειράματα των κουπονιών ανοξειδωτού χάλυβα, ενώ προστέθηκε και το άπαχο UHT γάλα, ώστε να ανιχνευθούν τυχόν διαφορές που θα μπορούσαν να αποδοθούν στη διαφορετική λιποπεριεκτικότητα.

3.5 Σχηματισμός βιοϋμενίου του βακτηρίου *Cronobacter sakazakii* σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα σε γάλα

Η δεύτερη πειραματική δοκιμή εστίασε μόνο στο βακτήριο *C. sakazakii*, για το οποίο δεν έχουν πραγματοποιηθεί βιβλιογραφικά επαρκείς μελέτες σχηματισμού βιοϋμενίου, όπως στο *B. subtilis*. Συγκεκριμένα, ερευνήθηκε η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος στην ικανότητα σχηματισμού βιοϋμενίου. Συνολικά, έλαβαν χώρα δύο ανεξάρτητα πειράματα, ενώ σε κάθε στιγμή δειγματοληψίας λαμβάνονταν τρία ανεξάρτητα δείγματα κουπονιών προς ανάλυση ($n=6$).

Το TSB της προηγούμενης πειραματικής δοκιμής αντικαταστάθηκε με πλήρες γάλα UHT και φόρμουλα βρεφικού γάλακτος σε σκόνη. Η επέμβαση αυτή τη φορά στόχευε στη συγκριτική αξιολόγηση της ανάπτυξη βιοϋμενίου του *C. sakazakii* σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 20°C, σε δύο πολύ διαφορετικά υποστρώματα. Το UHT γάλα αποτελεί προϊόν υψηλής διατροφικής ασφαλείας, λόγω της αποστείρωσης που έχει υποστεί σε υπερυψηλή θερμοκρασία. Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων

και Ποτών (2009) η θέρμανσή του είναι κατ' ελάχιστη θερμοκρασία στους 135°C επί τουλάχιστον 1 δευτερόλεπτο, προς καταστροφή όλων των υπολειπόμενων μικροοργανισμών και των σπορίων τους. Αντίθετα, η σκόνη βρεφικού γάλακτος έχει υποστεί κατά τη βιομηχανική παρασκευή της απλή παστερίωση (63°C για 30 λεπτά ή 72°C για 15 περίπου δευτερόλεπτα). Επίσης, λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς της σε θρεπτικά συστατικά και πιθανών λανθασμένων χειρισμών κατά την ανασύστασή της, είναι δυνατό να μην αποτελεί τόσο μικροβιολογικά απαλλαγμένο προϊόν, όπως το UHT γάλα.

Προετοιμασία εμβολίου

Η ενεργοποίηση των κατεψυγμένων καλλιιεργειών *C. sakazakii* και η διαδικασία της έκπλυσης των κυττάρων, με τις δύο ενδιάμεσες φυγοκεντρήσεις, ώστε να προετοιμαστεί το εμβόλιο, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις διαδικασίες που περιγράφηκαν στην Παράγραφο 3.4. Τελικός σκοπός ήταν ομοίως η συγκέντρωση των κυττάρων να είναι περίπου 10^8 CFU/ml, η οποία προσδιορίστηκε μέσω επιφανειακής επίστρωσης κατάλληλων δεκαδικών αραιώσεων σε τρυβλία TSA και επώαση αυτών στους 37°C για 24 h.

Ενοφθαλμισμός κουπονιών και ανάπτυξη βιοϋμενίου

Ο ενοφθαλμισμός των αποστειρωμένων κουπονιών ανοξείδωτου χάλυβα και στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων πραγματοποιούνταν εντός των δοκιμαστικών σωλήνων με το αλατούχο διάλυμα Ringer, όπου 0,5 ml από την κατάλληλη αραιώση κυττάρων της μονοκαλλιέργειας *Cronobacter sakazakii* μεταφερόταν ασηπτικά εντός των δοκιμαστικών σωλήνων με τα 4,5 ml Ringer (αραιώση 1:10), έτσι ώστε ο αρχικός βακτηριακός πληθυσμός να έφτανε περίπου τα 10^5 CFU/ml. Στη συνέχεια, οι δοκιμαστικοί σωλήνες επώαστηκαν στατικά για 3 h σε υψηλής ακρίβειας επωαστικούς θαλάμους στους 15°C (στάδιο προσκόλλησης). Στο συγκεκριμένο σημείο και ομοίως με τα πρώτα πειράματα, λάμβανε χώρα η πρώτη δειγματοληψία (3 h), ακολούθως τα κουπόνια αφαιρούνταν προσεκτικά, υπό ασηπτικές συνθήκες με αποστειρωμένη λαβίδα, και τοποθετούνταν στους νέους στείρους δοκιμαστικούς σωλήνες ίδιου μεγέθους, όπου είχαν μεταφερθεί νωρίτερα τα 5 ml UHT γάλακτος ή φόρμουλας. Μετά την εμφύσηση των κουπονιών στα γάλατα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν για στατική επώαση σε υψηλής ακριβείας επωαστικό κλίβανο στους 20°C για 144 h με ενδιάμεσες δειγματοληψίες στις 24, 48 και 96 h.

Μικροβιολογικές αναλύσεις

Ομοίως με την ανάπτυξη βιοϋμενίου μονοκαλλιιεργειών σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα επωασμένα σε TSB, και κάνοντας χρήση των μεθοδολογιών και διαδικασιών που περιγράφονται στην αντίστοιχη ενότητα του κεφαλαίου 3.4, δειγματοληψίες και μικροβιολογικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στις 3, 24, 48, 96 και 144 h. Η καταμέτρηση των βιοϋμενικών πληθυσμών γινόταν μέσω επιφανειακής επίστρωσης ποσότητας 0,1 ml από την κατάλληλη αραιώση σε τρυβλία TSA και ESIA. Επίσης, τρυβλία BCSA χρησιμοποιήθηκαν για πιθανή

ανίχνευση κυττάρων *Bacillus* spp., τα οποία προέρχονταν από τη μικροχλωρίδα του υπό μελέτη γάλακτος. Σε μικροβιολογική ανάλυση υποβάλλονταν και τα γάλατα, αμέσως μετά τη μεταφορά τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες, μέσω επιφανειακής επίστρωσης 0,1 ml σε τρυβλία TSA, ESIA και BCSA. Τα τρυβλία TSA και BCSA επωάζονταν για 24-48 h στους 30°C, ενώ τα ESIA στους 44°C για 24 h.

3.6 Σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων *Cronobacter sakazakii* και *Bacillus subtilis* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου (microtiter plates)

Στο επόμενο μέρος των πειραμάτων, χρησιμοποιήθηκε η χρωμομετρική μέθοδος των μικροσυστοιχιών (microtiter plate assay). Πρόκειται για μια δοκιμασία η οποία χρησιμοποιείται συχνά κατά τη μελέτη σχηματισμού βιοϋμενίων, καθώς επιτρέπει ταυτόχρονη εξέταση πολλών διαφορετικών συνθηκών. Όπως στα πειράματα με τα κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα, μελετήθηκαν για αρχή οι μονοκαλλιέργειες *C. sakazakii*-*B. subtilis* και η επίδραση της συγκαλλιέργειάς τους στο σχηματισμό βιοϋμενίου παρουσία του θρεπτικού ζωμού TSB και αραιωμένου TSB (dTSB). Στα πλαίσια της συγκεκριμένων πειραματικών δοκιμών αξιολογήθηκαν τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες: 5, 10, 20 και 37°C. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών ειδών γάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα, μόνο για το βακτήριο *C. sakazakii* στις ίδιες θερμοκρασίες. Βέβαια, όπως και στο πείραμα με τα κουπόνια, η ανάπτυξη βιοϋμενίου στους 37°C ήταν υπερβολικά μεγάλη, ώστε να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και αποφασίστηκε η απόρριψη της συγκεκριμένης πειραματικής συνθήκης. Τα είδη γάλακτος που επιλέχθηκαν ήταν σκόνη γάλακτος 1^{ης} βρεφικής ηλικίας, UHT άπαχο και UHT πλήρες γάλα, αναζητώντας και πάλι την πιθανή επίδραση του υποστρώματος στο σχηματισμό βιοϋμενίου του συγκεκριμένου στελέχους. Για κάθε διαφορετικό υπόστρωμα (ζωμό και γάλα) έλαβαν χώρα δύο ανεξάρτητα πειράματα, ενώ ταυτόχρονα για όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν 12 επαναλήψεις ανά μικροσυστοιχία (n=24).

3.6.1 Σχηματισμός βιοϋμενίου των *C. sakazakii* και *B. subtilis* (μονοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργεια) σε θρεπτικό ζωμό

Η ανάπτυξη βιοϋμενίου ποσοτικοποιήθηκε μέσω της χρωμομετρικής μεθόδου των μικροσυστοιχιών (microtiter plates ή microplates assay), η οποία βασίζεται σε μετρήσεις οπτικής πυκνότητας της βιοϋμενικής μάζας που έχει σχηματιστεί στα τοιχώματα των κατασκευασμένων από πολυστυρένιο βοθρίων των μικροσυστοιχιών (MicrotestPlate 96-Well, FStarstät, Germany). Η παρούσα μέθοδος επιλέγεται πολύ συχνά για την *in vitro* αξιολόγηση παραγωγής βιοϋμενίου με διάφορες παραλλαγές (Stapanović et al., 2000, 2003, 2004), χάρη στην υψηλή διεκπεραιωτική ικανότητα του πειραματικού πρωτοκόλλου, το οποίο προσφέρει ταυτόχρονη μελέτη πολλαπλών συνθηκών με πολλές επαναλήψεις (Díez-García et al., 2012, Steenackers et al., 2012). Τα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο σχηματισμού βιοϋμενίου των Lianou και Koutsoumanis (2012).

Σε πρώτο στάδιο, τέθηκε υπό διερεύνηση η πιθανή αλληλεπίδραση των βακτηριακών ειδών *C. sakazakii* και *B. subtilis* κατά το σχηματισμό βιοϋμενίου, όταν

αναπτύσσονται σε μη επιλεκτικό υγρό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα. Επιλέχθηκε το TSB, το οποίο χρησιμοποιήθηκε και στα πειράματα με τα κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα, αλλά και αραιωμένο TSB (diluted TSB, dTSB) με αραιώση 1:20, όπως προτείνουν στα πειράματά τους οι Stepanović et al. (2004).

Εμβολιασμός και επώαση μικροσυστοιχιών

Τα βοθρία των κατασκευασμένων από πολυστυρένιο μικροσυστοιχιών (microplates) πληρώθηκαν με 180 μl θρεπτικό υπόστρωμα και εμβολιάστηκαν με 20 μl μονοκαλλιέργεια ή συγκαλλιέργεια των *C. sakazakii*-*B. subtilis*. Πιο συγκεκριμένα, ανά 12 βοθρία (μια οριζόντια σειρά) περιέχονταν μονοκαλλιέργεια *C. sakazakii* σε TSB, μονοκαλλιέργεια *B. subtilis* σε TSB, συγκαλλιέργεια σε TSB, μονοκαλλιέργεια *C. sakazakii* σε dTSB, μονοκαλλιέργεια *B. subtilis* σε dTSB, συγκαλλιέργεια σε dTSB. Στις τελευταίες δύο σειρές βοθρίων (ανά 12) διαμοιράστηκαν 200 μl από κάθε θρεπτικό υπόστρωμα, χωρίς να εμβολιαστούν, ώστε να λειτουργήσουν ως αρνητικοί μάρτυρες (control). Οι βακτηριακές καλλιέργειες και τα θρεπτικά υποστρώματα προετοιμάστηκαν ομοίως με το αντίστοιχο πειραματικό μέρος των κουπονιών ανοξειδωτού χάλυβα, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στο κεφάλαιο 3.2. Οι μικροσυστοιχίες επώαστηκαν στατικά στους 5, 10, 20 και 37°C (μια μικροσυστοιχία σε κάθε θερμοκρασία) για 48 h.

Χρώση κρυσταλλικού ιώδους και μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Μετά το πέρας των 48 h επώασης των μικροσυστοιχιών στις παραπάνω θερμοκρασίες, το περιεχόμενο των βοθρίων απομακρύνθηκε με τη βοήθεια πολυπιπέτας και ακολούθησε προσθήκη 200 μl αποστειρωμένου διαλύματος Ringer σε κάθε βοθρίο. Οι μικροσυστοιχίες τοποθετήθηκαν σε συσκευή ήπιας ανάδευσης (320 mot) για 5 min και το περιεχόμενο των βοθρίων αδειάστηκε εκ νέου με πολυπιπέτα, με σκοπό να απομακρυνθούν τα μη-/αντιστρεπτός προσκολλημένα βακτηριακά κύτταρα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl μεθανόλης σε κάθε βοθρίο, προς σταθεροποίηση των ισχυρώς προσκολλημένων βιοϋμενικών κυττάρων, η οποία απομακρύνθηκε με αναστροφή των μικροσυστοιχιών, έπειτα από 15 min. Οι μικροσυστοιχίες στεγνώθηκαν στον αέρα για 20 min και χρωματίστηκαν με 200 μl κρυσταλλικό ιώδες (crystal violet) ανά βοθρίο, το οποίο απομακρύνθηκε προσεκτικά, μετά το πέρας 5 min, με την ίδια πολυπιπέτα που είχε προστεθεί. Η περίσσεια χρωστικής απομακρύνθηκε με έκπλυση των μικροσυστοιχιών με απιονισμένο ύδωρ και απόχυση με αναστροφή του περιεχομένου, συνολικά τρεις φορές. Μετά από προσεκτικό, αλλά επίμονο χτύπημα των μικροσυστοιχιών σε απορροφητικό χαρτί, αφέθηκαν να στεγνώσουν στον αέρα για 1 h. Τέλος, προκειμένου να επαναδιαλυτοποιηθεί το κρυσταλλικό ιώδες που έχει δεσμευτεί στα σχηματισμένα βιοϋμένια, τοποθετήθηκαν 200 μl αιθανόλης (100%) ανά βοθρίο και ακολούθησε άμεση μέτρηση της οπτικής πυκνότητας του διαλύματος κάθε βοθρίου, χρησιμοποιώντας το σπεκτροφωτόμετρο SynergyHT multi-mode microplate reader (Biotek, Winooski, VT, USA). Το όργανο είχε προηγουμένως

ρυθμιστεί να μετρά στα 580 nm (OD_{580nm}), ενώ ανακινούσε τις μικροσυστοιχίες σε μεσαίου εύρους ταχύτητα για 10 sec και σε θερμοκρασία 25°C. Για κάθε μικροσυστοιχία, η μέση τιμή των μετρήσεων οπτικής πυκνότητας κάθε περίπτωσης αρνητικού μάρτυρα υπολογίστηκε και αφαιρέθηκε από τη μέτρηση οπτικής πυκνότητας κάθε αντίστοιχου υπό εξέταση βοθρίου. Το αποτέλεσμα της διαφοράς (ΔOD_{580nm}) ήταν αυτό που χρησιμοποιήθηκε τελικά, για το χαρακτηρισμό της ικανότητας σχηματισμού βιοϋμενίου των βακτηριακών ειδών ως μονοκαλλιέργεια και ως συγκαλλιέργεια.

3.6.2 Σχηματισμός βιοϋμενίου του *C. sakazakii* σε γάλα

Σε δεύτερο στάδιο μελετήθηκε η επίδραση διάφορων ειδών γάλακτος, ως θρεπτικό υπόστρωμα, μόνο για το βακτήριο *C. sakazakii* στους 5, 10 και 20°C, λόγω της υπερβολικής ανάπτυξης στους 37°C, που απέτρεψε τη διαδικασία της χρώσης. Σκοπός ήταν η πιθανή ανίχνευση μεταβολών στο βιοϋμενικό σχηματισμό που θα μπορούσαν να αποδοθούν στη διαφορετική διατροφική σύσταση ή δομή των υπό μελέτη τροφίμων. Επιλέχθηκαν φόρμουλα βρεφικού γάλακτος, UHT άπαχο και UHT πλήρες γάλα. Τα συγκεκριμένα πειράματα πραγματοποιήθηκαν ομοίως, σύμφωνα με το πρωτόκολλο σχηματισμού βιοϋμενίου των Lianou και Koutsoumanis (2012).

Εμβολιασμός και επώαση μικροσυστοιχιών

Ακριβώς όπως περιγράφεται παραπάνω, τα βοθρία των μικροσυστοιχιών πληρώθηκαν, ανά 12, με 180 μl από κάθε θρεπτικό υπόστρωμα, εμβολιάστηκαν με 20 μl μονοκαλλιέργειας *C. sakazakii*, ενώ χρησιμοποιήθηκαν και 12 βοθρία ανά θρεπτικό υπόστρωμα, ως αρνητικοί μάρτυρες. Οι μικροσυστοιχίες επώαστηκαν στατικά στους 5, 10 και 20°C (μια μικροσυστοιχία σε κάθε θερμοκρασία) για 48 h.

Χρώση κρυσταλλικού ιώδους και μέτρηση οπτικής πυκνότητας

Η διαδικασία που πραγματοποιήθηκε ήταν ακριβώς η ίδια με αυτήν που περιγράφεται στην ανωτέρω παράγραφο του κεφαλαίου 3.6.1, για τη χρώση κρυσταλλικού ιώδους και τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας.

3.7 Προσαρμογή δεδομένων και στατιστική ανάλυση

Αναφορικά με τα πειράματα σχηματισμού βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα, για κάθε πειραματική συνθήκη, τα δεδομένα από τις μετρήσεις των αποικιών μετασχηματίστηκαν σε αποικίες ανά μονάδα επιφάνειας (CFU/cm²) και στη συνέχεια μετατράπηκαν σε δεκαδικούς λογαρίθμους (\log_{10}). Ακολούθως, υπολογίστηκε η μέση τιμή (mean) και η τυπική απόκλιση (standard deviation) για κάθε περίπτωση.

Τα δεδομένα τα οποία συλλέχθηκαν από τα πειράματα ανάπτυξης βιοϋμενίου, τόσο σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα όσο και σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου, υποβλήθηκαν σε ανάλυση παραλλακτικότητας (ANOVA) χρησιμοποιώντας τη

διαδικασία γενικού γραμμικού μοντέλου (general linear model procedure) του λογισμικού IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Οι μέσες τιμές των μετρούμενων παραμέτρων (πληθυσμοί βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα/τιμές οπτικής πυκνότητας σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου) διαχωρίστηκαν χρησιμοποιώντας το τεστ Tukey's HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0,05$.

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ικανότητα των βακτηρίων να προσκολλώνται και να αναπτύσσονται αποικίες σε επιφάνειες επηρεάζεται από πληθώρα περιβαλλοντικών παραγόντων, οι οποίοι επιδρούν τόσο στα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας (Katsikogianni and Missirlis, 2004), όσο και στη φυσιολογία των ίδιων των βακτηρίων (Mai and Conner, 2007). Το είδος του θρεπτικού υποστρώματος είναι ένας από τους παράγοντες που σαφώς επηρεάζει το σχηματισμό και τη βιοϋμενική ανάπτυξη, ειδικότερα όμως τα τρόφιμα και τα υπολείμματά τους στο βιομηχανικό εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων έχει αναφερθεί ότι μπορεί να μεταβάλλουν τον πληθυσμό των προσκολλημένων κυττάρων (Mai and Conner, 2007).

4.1 Σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων *Cronobacter sakazakii* και *Bacillus subtilis* σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα κάτω από συνθήκες μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας σε θρεπτικό ζωμό

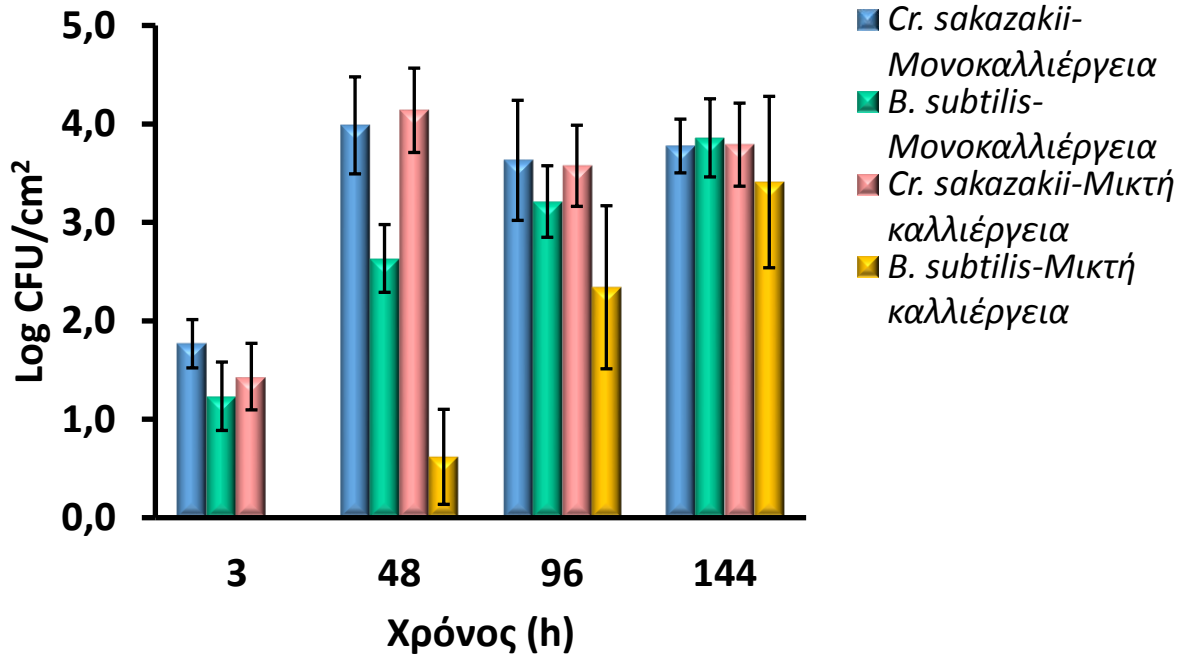
Κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα

Ο σχηματισμός βιοϋμενίου βρέθηκε πως επηρεάζεται από το χρόνο, το βακτηριακό είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας (μονοκαλλιέργεια/συγκαλλιέργεια και θερμοκρασία). Οι μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν μετά τις 3 h για τη βακτηριακή προσκόλληση έδειξαν πως ο *C. sakazakii* παρουσιάζει καλύτερη ικανότητα προσκόλλησης κατά τη συγκαλλιέργεια με το *B. subtilis*, καθώς ο μέσος πληθυσμός (\pm τυπική απόκλιση) των προσκολλημένων κυττάρων του *C. sakazakii* ήταν $1,43 \pm 0,34 \log \text{CFU/cm}^2$, ενώ ο *B. subtilis* παρέμεινε κάτω από το όριο ανίχνευσης ($< 0,03 \log \text{CFU/cm}^2$) (Σχήματα 3.1.1 και 3.1.2.). Στις μονοκαλλιέργειες, το επίπεδο προσκόλλησης ήταν περίπου το ίδιο, με τον *C. sakazakii* να φτάνει τα $1,77 \pm 0,25 \log \text{CFU/cm}^2$ και τον *B. subtilis* τα $1,23 \pm 0,35 \log \text{CFU/cm}^2$. Αξίζει να σημειωθεί ότι το επίπεδο του εμβολίου και για τα δύο βακτήρια ήταν παρόμοιο, με τη μεγαλύτερη παρατηρούμενη διαφορά να μην υπερβαίνει το $0,5 \log \text{CFU/cm}^2$. Βέβαια, οι διαφορές στην προσκόλληση μεταξύ των διαφορετικών ειδών θεωρούνται ανεξάρτητες από την κυτταρική πυκνότητα (Mai and Conner, 2007). Γενικότερα, η αυξημένη βακτηριακή προσκόλληση σε επιφάνειες υπό στατικές συνθήκες έχει αποδοθεί σε αυξημένη παραγωγή μαστιγίων. Η προσκόλληση οφείλεται στα ίδια τα μαστίγια (Chavant et al., 2002, Vatanyoopaisarn et al., 2000), αλλά και στην κινητικότητα που προκαλούν (Lemon et al., 2007). Δεδομένου ότι και τα δύο παραπάνω βακτήρια χαρακτηρίζονται από κινητικότητα και ύπαρξη μαστιγίων, μπορεί κατά κάποιο τρόπο να εξηγηθεί και η παραπλήσια προσκόλλησή τους (κάτω από συνθήκες μονοκαλλιέργειας) στα κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα, όπως αυτή παρατηρήθηκε κάτω από τις πειραματικές συνθήκες της παρούσας μελέτης.

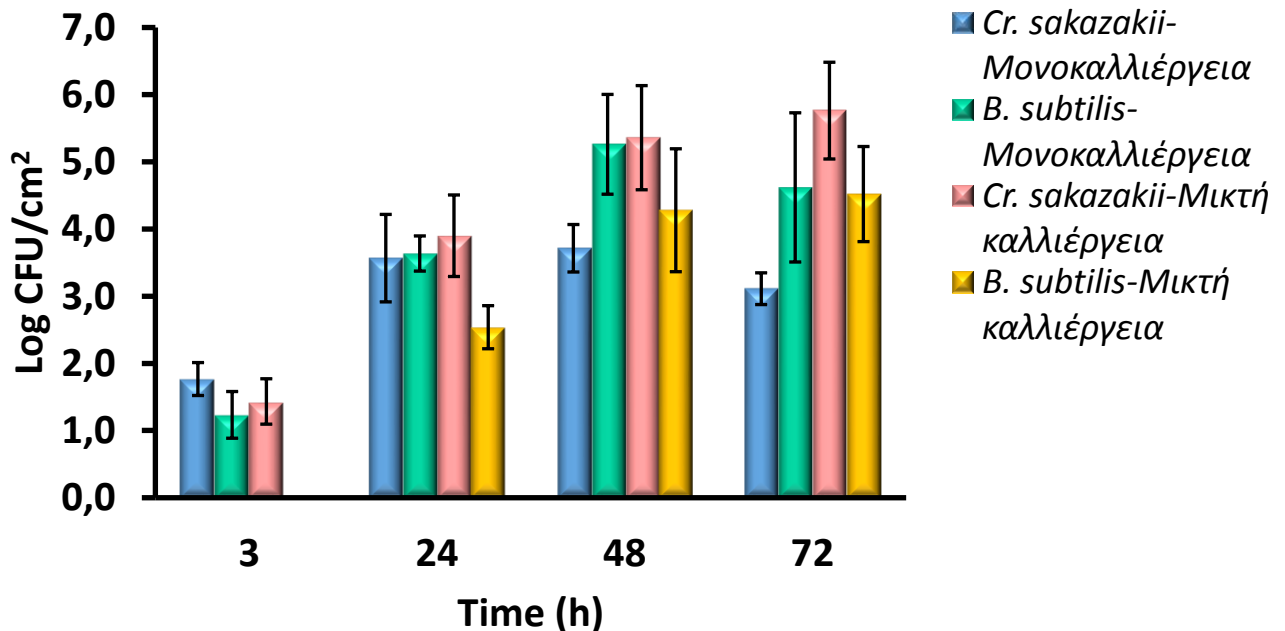
Όσον αφορά στις μονοκαλλιέργειες στους 20°C (Σχήμα 4.1.1.), ο *C. sakazakii* παρουσίασε σημαντικά ($p < 0,05$) υψηλότερη ανάπτυξη βιοϋμενίου τις πρώτες 48 h,

καθώς οι πληθυσμοί διέφεραν κατά 2,5-3,0 λογαρίθμους (*C. sakazakii*: $3,98 \pm 0,49 \log \text{CFU/cm}^2$ και *B. subtilis*: $2,63 \pm 0,34 \log \text{CFU/cm}^2$). Σε παρόμοια αποτελέσματα δεν κατέληξε η επώαση στους 37°C (Σχήμα 4.1.2), όπου μέχρι τις 48 h, οι πληθυσμοί των προσκολλημένων κυττάρων που ανακτήθηκαν από τα κουπόνια και για τα δύο βακτήρια κυμάνθηκαν μεταξύ 3,71 και 5,26 $\log \text{CFU/cm}^2$. Αντίθετα, στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας στους 37°C, η βιοϋμενική ανάπτυξη του *C. sakazakii* φάνηκε να ενισχύεται σημαντικά ($p < 0,05$) από την παρουσία του *B. subtilis*, όπως φαίνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα των δειγματοληψιών των 48 και 72 h (Σχήμα 4.1.2.). Στις 48 h, ο *C. sakazakii* σε μονοκαλλιέργεια σχημάτισε σημαντικά λιγότερο βιοϋμένιο ($3,71 \pm 0,35 \log \text{CFU/cm}^2$) σε σύγκριση με τον *B. subtilis* ($5,26 \pm 0,74 \log \text{CFU/cm}^2$), όταν όμως καλλιεργήθηκαν μαζί ο βιοϋμενικός πληθυσμός του *C. sakazakii* ανήλθε σημαντικά ($5,36 \pm 0,77 \log \text{CFU/cm}^2$). Παρομοίως στις 72h, οι βιοϋμενικοί πληθυσμοί του *C. sakazakii* σε συγκαλλιέργεια ($5,76 \pm 0,72 \log \text{CFU/cm}^2$) ήταν σημαντικά υψηλότεροι από της μονοκαλλιέργειας ($3,11 \pm 0,24 \log \text{CFU/cm}^2$), γεγονός που ενισχύει το συμπέρασμα ότι ο *B. subtilis* ευνοεί τη βιοϋμενική ανάπτυξη του *C. sakazakii*.

Όσον αφορά στη συγκριτική ανάπτυξη βιοϋμενίου μεταξύ των δύο υπό μελέτη θερμοκρασιών (Σχήματα 4.1.1 και 4.1.2), παρατηρήθηκε ότι στους 20°C ο *B. subtilis* καθυστερεί να σχηματίσει βιοϋμένιο, τόσο σε μονοκαλλιέργεια όσο και σε συγκαλλιέργεια. Ωστόσο, τα επίπεδα και των δύο μικροοργανισμών στην τελευταία δειγματοληψία των 20°C (144 h) ήταν παρόμοια (*C. sakazakii*-Μονοκαλλιέργεια: $3,78 \pm 0,27 \log \text{CFU/cm}^2$, *B. subtilis*-Μονοκαλλιέργεια: $3,86 \pm 0,40 \log \text{CFU/cm}^2$, *C. sakazakii*-Μικτή καλλιέργεια: $3,79 \pm 0,42 \log \text{CFU/cm}^2$, *B. subtilis*-Μικτή καλλιέργεια: $3,41 \pm 0,87 \log \text{CFU/cm}^2$). Στους 37°C, η ανάπτυξη και για τα δύο βακτήρια ήταν ταχύτερη (από ότι στους 20°C) με σαφώς υψηλότερους πληθυσμούς βιοϋμενίου να παρατηρούνται ήδη από τις 24 h της επώασης (*C. sakazakii*: $3,57 \pm 0,65 \log \text{CFU/cm}^2$ και *B. subtilis*: $3,64 \pm 0,26 \log \text{CFU/cm}^2$). Όμως, αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός της σημαντικής εύνοιας βιοϋμενικού σχηματισμού ως προς τον *C. sakazakii* στη συγκαλλιέργεια των δύο βακτηρίων, όπως φάνηκε από την τελευταία δειγματοληψία (72 h). Αντίθετα, στις μονοκαλλιέργειες υπερίσχυσε ο *B. subtilis* ($4,62 \pm 1,11 \log \text{CFU/cm}^2$), έναντι του *C. sakazakii* ($3,11 \pm 0,24 \log \text{CFU/cm}^2$), με υψηλή ωστόσο τυπική απόκλιση στις μετρήσεις για τον *B. subtilis*. Πρέπει να σημειωθεί πως στις 48 h, περισσότερο βιοϋμένιο σχημάτισε η μονοκαλλιέργεια *B. subtilis*, έναντι της μονοκαλλιέργειας *C. sakazakii*, γεγονός που όπως θα αναφερθεί εκτενώς στη συνέχεια της παρούσας μελέτης, συμφωνεί και με τα αποτελέσματα των μικροσυστοιχιών.



Σχήμα 4.1.1. Πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (log CFU/cm²) στις επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, μετά από επώαση στους 20°C για 144 h. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές (\pm τυπικές αποκλίσεις, $n=6$) των βιοϋμενικών πληθυσμών οι οποίοι ανακτήθηκαν από τα κουπόνια ανά 48 h επώασης, για κάθε βακτηριακό είδος σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας και μικτής καλλιέργειας.

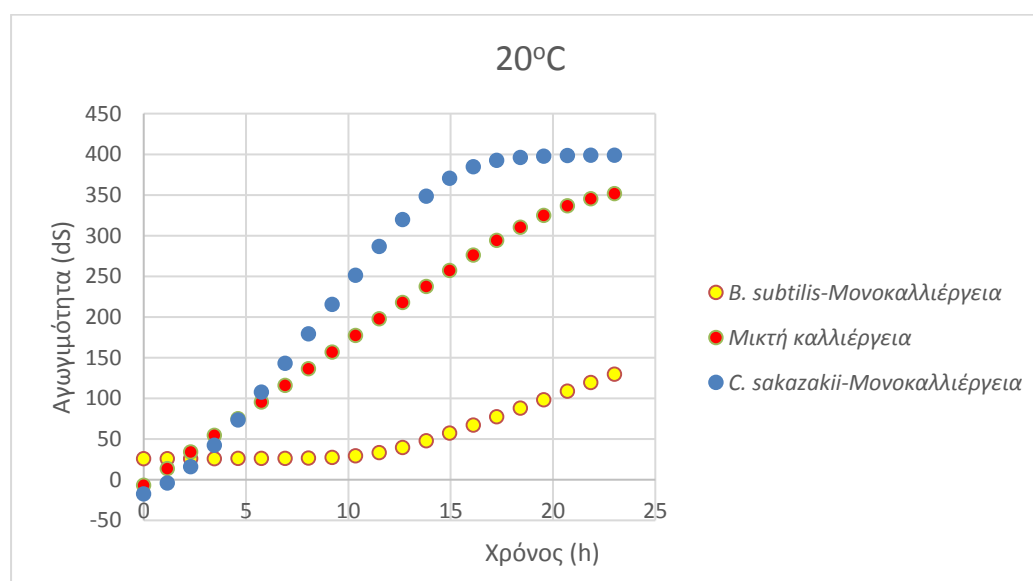


Σχήμα 4.1.2. Πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων (log CFU/cm²) στις επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, μετά από επώαση στους 37°C για 72 h. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται οι μέσες τιμές (\pm τυπικές αποκλίσεις, $n=6$) των βιοϋμενικών πληθυσμών οι οποίοι ανακτήθηκαν από τα κουπόνια ανά 24 h επώασης, για κάθε βακτηριακό είδος σε συνθήκες μονοκαλλιέργειας και μικτής καλλιέργειας.

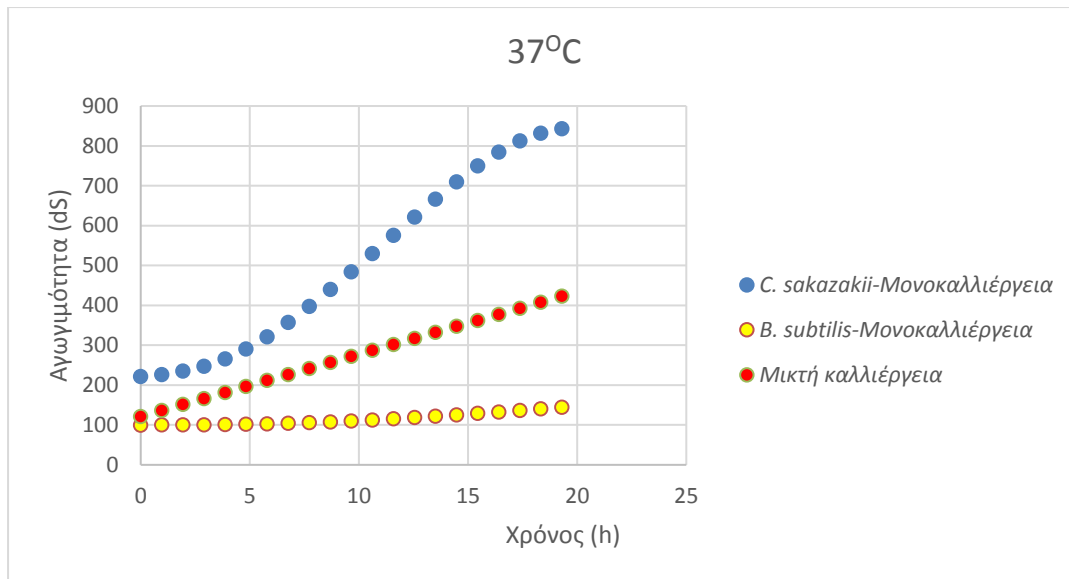
Μέθοδος ηλεκτρικής αγωγιμότητας

Για το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, ο χρόνος ανίχνευσης (DT) που δίδεται από τη συσκευή Malthus ως αποτέλεσμα της πειραματικής διαδικασίας, συσχετίζεται γραμμικά με τον αρχικό βακτηριακό πληθυσμό, ο οποίος είναι ο βιοϋμενικός πληθυσμός των κουπονιών κατά την τελευταία δειγματοληψία (72 h για τους 37°C και 144 h για τους 20°C). Η μεταβολική δραστηριότητα των προκολλημένων κυττάρων ενεργοποιεί την αγωγιμότητα του υποστρώματος (TSB), λόγω της αποδόμησης των θρεπτικών του συστατικών και της παραγωγής φορτισμένων μορίων. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των κυττάρων, ορισμένα ξεκινούν να αποκολλώνται από τα κουπόνια και να μετατρέπονται σε πλαγκτονικά κύτταρα. Το σύστημα Malthus υπολογίζει το χρόνο ανίχνευσης όταν η συγκέντρωση των πλαγκτονικών κυττάρων εντός των κυψελίδων υπερβεί το όριο ανίχνευσης του οργάνου και σταθεροποιηθεί. Συνεπώς, όταν ο χρόνος ανίχνευσης (DT) επέρχεται συντομότερα, σημαίνει πως ο πληθυσμός των προσκολλημένων κυττάρων που είχαν σχηματίσει βιοϋμένιο, ως την ώρα της τελευταίας δειγματοληψίας, ήταν υψηλότερος (Chorianopoulos et al., 2008).

Στα παρακάτω σχήματα (Σχήματα 4.1.3 και 4.1.4), παρουσιάζονται οι χαρακτηριστικές σιγμοειδείς καμπύλες αγωγιμότητας σε ένα συγκεντρωτικό διάγραμμα, ώστε να μπορέσουν να γίνουν πιο εμφανείς οι διαφορές μεταξύ των διαφορετικών περιπτώσεων καλλιέργειας.



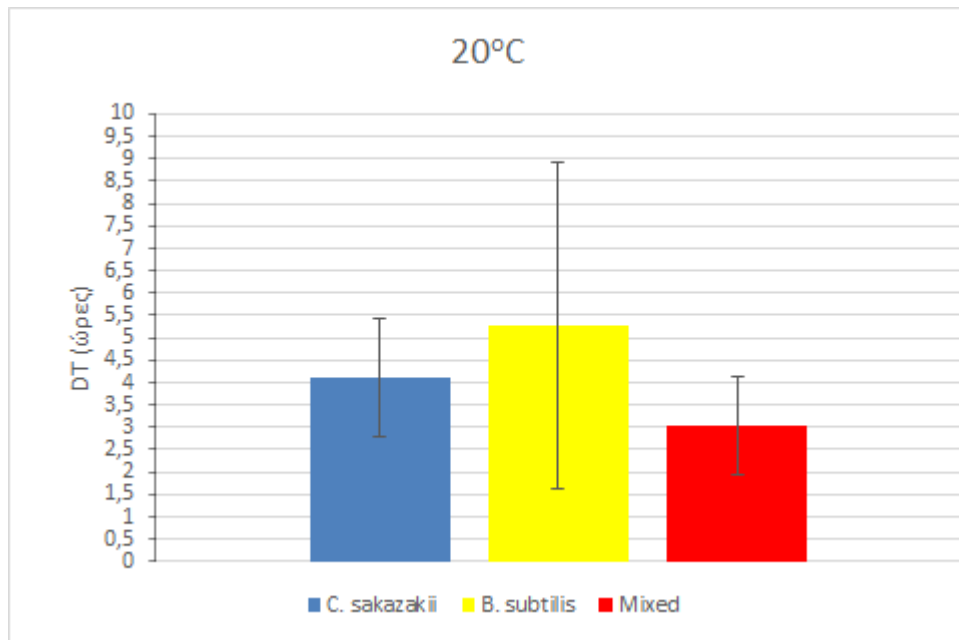
Σχήμα 3.1.3. Τυπικές μεταβολές της αγωγιμότητας (dS) ανά μονάδα χρόνου (h) στους 20°C.



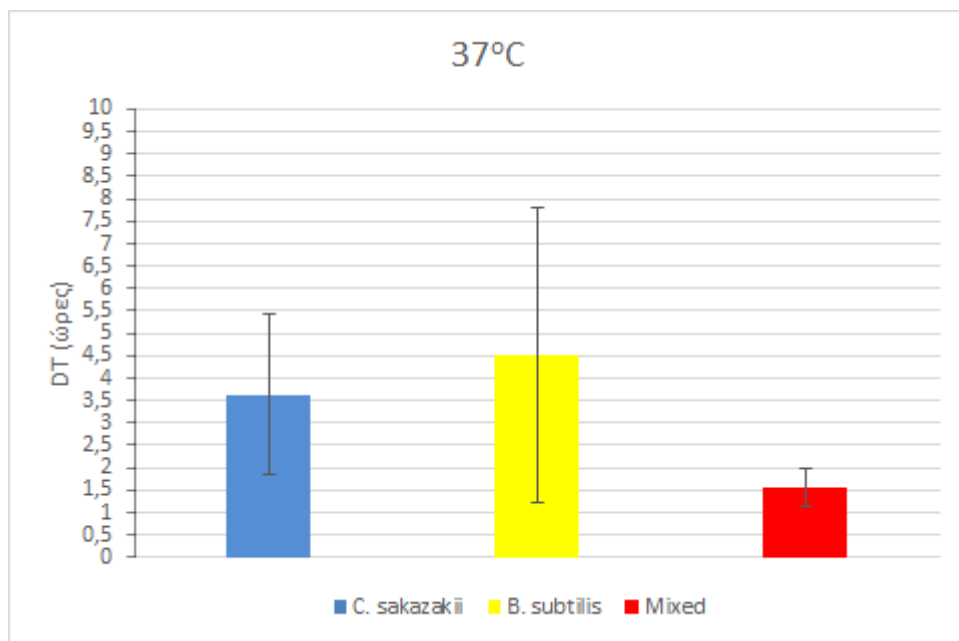
Σχήμα 4.1.4. Τυπικές μεταβολές της αγωγιμότητας (dS) ανά μονάδα χρόνου (h) στους 37°C.

Από τα παραπάνω διαγράμματα των τιμών αγωγιμότητας (dS) ανά μονάδα χρόνου (h), μπορούν να γίνουν ορισμένες παρατηρήσεις, βάσει του χαρακτηριστικού σχήματος της σιγμοειδούς καμπύλης. Αρχικά, το σχήμα της καμπύλης είναι και παραμένει χαρακτηριστικό για κάθε περίπτωση καλλιέργειας, ανεξαρτήτως θερμοκρασίας (20°C ή 37°C). Όσον αφορά στην καμπύλη του *B. subtilis*, αυτή εμφανίζει μεγαλύτερη φάση προσαρμογής (πριν ξεκινήσει το εκθετικό τμήμα της καμπύλης), γεγονός που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της μεθόδου μηχανικής απόξεσης με γυάλινα σφαιρίδια, όπου το συγκεκριμένο βακτήριο καθυστερούσε να σχηματίσει βιοϋμένιο. Στην περίπτωση της μικτής καλλιέργειας, παρατηρούμε πως το σχήμα της καμπύλης είναι γραμμικό, ενώ οι τιμές αγωγιμότητας είναι ενδιάμεσες αυτών της μονοκαλλιέργειας *C. sakazakii* και *B. subtilis*. Η συγκεκριμένη παρατήρηση μπορεί υποθετικά να αποδοθεί στην ταυτόχρονη μεταβολική δραστηριότητα των δύο βακτηρίων, τα οποία επηρεάζουν αμφότερα τα θρεπτικά συστατικά του υποστρώματος. Βέβαια, το εξ αρχής μικρό μέγεθος του δείγματος, από το οποίο αφαιρέθηκαν ορισμένα δείγματα που δεν αναγνωρίστηκαν από το όργανο ή των οποίων οι τιμές ήταν εκτός ορίου ανίχνευσης (overflow), αποτέλεσε ένα σημαντικά περιοριστικό παράγοντα για την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων.

Στα ραβδογράμματα που ακολουθούν (Σχήμα 4.1.5 και 4.1.6), παρουσιάζονται οι χρόνοι ανίχνευσης (DTs) ανά περίπτωση καλλιέργειας, όπως προέκυψαν από το σύστημα Malthus, για κάθε θερμοκρασία (20°C και 37°C).



Σχήμα 4.1.5. Χρόνοι ανίχνευσης (DTs) ανά περίπτωση καλλιέργειας στους 20°C (μέσες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις).



Σχήμα 4.1.6. Χρόνοι ανίχνευσης (DTs) ανά περίπτωση καλλιέργειας στους 37°C (μέσες τιμές ± τυπικές αποκλίσεις).

4.2 Σχηματισμός βιοϋμενίου του βακτηρίου *Cronobacter sakazakii* σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα σε γάλα

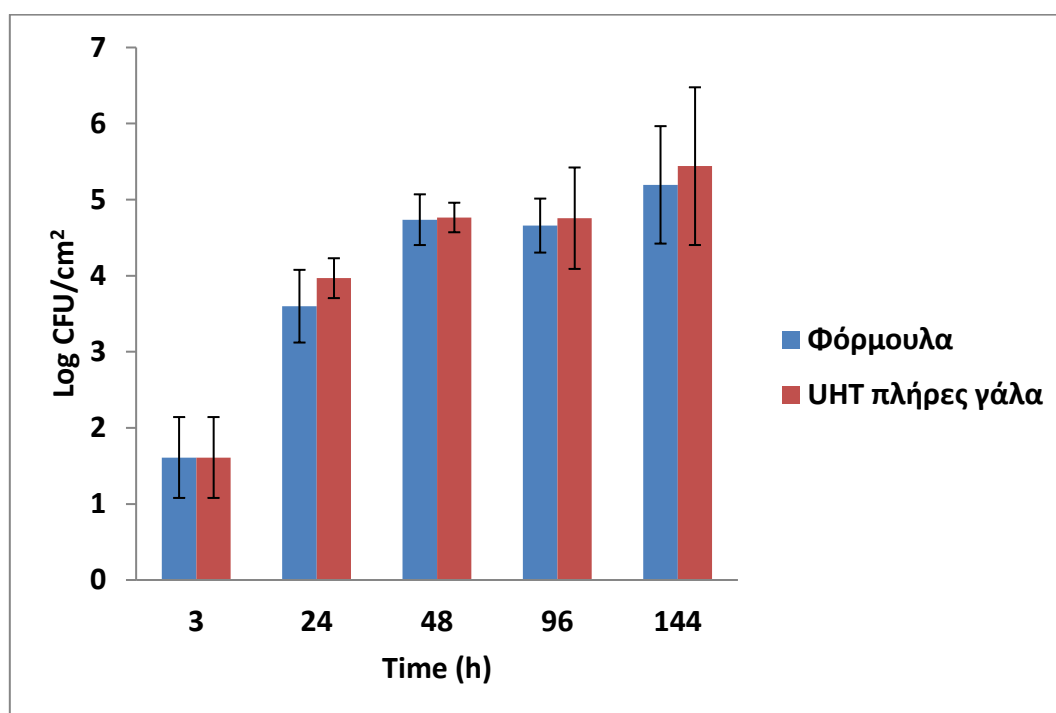
Παρά το γεγονός ότι οι λοιμώξεις από *C. sakazakii* κυριαρχούν στις νεογνικές και βρεφικές ηλικιακές ομάδες, η παρουσία του βακτηρίου και σε άλλα είδη τροφίμων (νωπά φρούτα-λαχανικά και χυμοί τους), εκτός της βρεφικής φόρμουλας, αυξάνει την ανησυχία για ασφαλή κατανάλωση των συγκεκριμένων ομάδων τροφίμων από ανοσοκατεσταλμένους καταναλωτές (Beuchat et al., 2009). Στόχος του παρόντος μέρους της πειραματικής μελέτης ήταν η παρατήρηση της συμπεριφοράς σχηματισμού βιοϋμενίου του συγκεκριμένου παθογόνου σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα, όταν αυτά εμβαπτίζονται σε φόρμουλα βρεφικού γάλακτος και σε ένα παρόμοιο είδος τροφίμου, το UHT (Ultra High Temperature) πλήρες γάλα που είναι θεωρητικά πιο απαλλαγμένο από ενδογενή μικροχλωρίδα, χάρη στην υπερυψηλή παστερίωση που έχει υποστεί. Πληθώρα μελετών έχει αποδείξει πως το *C. sakazakii* είναι ικανό να αναπτυχθεί και να σχηματίσει βιοϋμένιο σε ανασυσταμένη φόρμουλα βρεφικού γάλακτος (Nazarowec-White και Farber, 1997, Iversen et al., 2004, Kandhai et al., 2006, Lenati et al., 2008, Kim et al., 2006), όμως αντίστοιχες έρευνες δεν υπάρχουν για το UHT γάλα.

Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης πειραματικής δοκιμής δεν οδήγησαν σε κάποια σημαντική παρατήρηση, διότι σε όλες τις δειγματοληψίες ο *C. sakazakii* φάνηκε να σχηματίζει βιοϋμένιο στο ίδιο επίπεδο και στα δύο είδη γάλακτος (Σχήμα 4.2). Αξιοσημείωτο ήταν το γεγονός ότι και στα δύο τρόφιμα βρέθηκαν παρόμοιοι πληθυσμοί του *C. sakazakii* και της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας (ΟΜΧ), όπως μετρήθηκε από τα τρυβλία TSA και στις δύο θερμοκρασίες επώασης. Συνεπώς, το παθογόνο κυριαρχεί έναντι της ενδογενούς χλωρίδας. Συνοπτικά, τα αποτελέσματα και των δύο επαναλήψεων του πειράματος (μέσες τιμές πληθυσμών \pm τυπικές αποκλίσεις, $n=6$) παρουσιάζονται στο σχήμα 4.2.

Θεωρητικά, θα αναμενόταν διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων των 2 διαφορετικών υποστρωμάτων, αν λαμβανόταν κυρίως υπόψη η απουσία μικροβιακής χλωρίδας στο UHT πλήρες γάλα, όπως υπέδειξαν οι μικροβιολογικές αναλύσεις του γάλακτος, στην αρχή των πειραμάτων. Ειδικότερα μετά τα πρώτα πειράματα ανάπτυξης βιοϋμενίου σε broth, όπου αποδείχθηκε πως η συνύπαρξη με άλλο βακτήριο (στην παρούσα περίπτωση το *B. subtilis*) ενισχύει την παραγωγή βιοϋμενίου από το *C. sakazakii*, θα θεωρούνταν εύλογη η υψηλότερη βιοϋμενική ανάπτυξη στη φόρμουλα, όπου ανιχνεύθηκαν ειδή *Bacillus* spp. και μυκήτων. Η μικροβιολογική ανάλυση του γάλακτος είχε υποδείξει την ανάπτυξη αποικιών *Bacillus* spp. και, σε κάποιες περιπτώσεις, μυκήτων, μόνο στη φόρμουλα και όχι στο UHT γάλα. Βέβαια, ένα άλλο στοιχείο που επηρεάζει την ανάπτυξη βιοϋμενίου είναι η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος, η οποία ήταν σχεδόν ίδια (όσον αφορά στα μακροθρεπτικά συστατικά, παράγραφος 3.2) και για τα 2 είδη γάλακτος. Η έλλειψη αντίστοιχων ερευνών στη βιβλιογραφία και το μικρό μέγεθος το δείγματος στην παρούσα μελέτη αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες.

Συγκριτικά με την ανάπτυξη βιοϋμενίου σε κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα επωασμένα σε TSB, παρατηρούμε ότι η παρουσία ενός τροφίμου, ως θρεπτικό υπόστρωμα, προκάλεσε αύξηση των βιοϋμενικών πληθυσμών στις αντίστοιχες

δειγματοληψίες (περίπου $1 \log\text{CFU}/\text{cm}^2$). Τα αποτελέσματα βρίσκονται σε συμφωνία με τη μελέτη των Kim et al. (2006), όπου βιοϋμένια σχηματίστηκαν σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα, μόνο όταν εμβάπτιστηκαν σε φόρμουλα βρεφικού γάλακτος στους 25°C . Παρόμοια αποτελέσματα δεν εξήχθησαν από την εμβάπτιση σε TSB ή ζωμό λάχανου στην ίδια θερμοκρασία. Συμπερασματικά, υποστηρίχθηκε ότι ο τύπος και η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό βιοϋμενίου, ενισχύοντας τη σημασία της πρόληψης διαμείωσης επιφανειών που προετοιμάζεται και παρέχεται η βρεφική φόρμουλα.



Σχήμα 4.2. Πληθυσμός (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις, $n=6$) των προσκολλημένων κυττάρων *C. sakazakii* ($\log \text{CFU}/\text{cm}^2$) στις επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, κατά τη διάρκεια επώασης στους 20°C σε φόρμουλα βρεφικού γάλακτος και UHT πλήρες γάλα.

4.3 Σχηματισμός βιοϋμενίου των βακτηρίων *Cronobacter sakazakii* και *Bacillus subtilis* σε μικροσυστοιχίες πολυστυρενίου (microtiter plates)

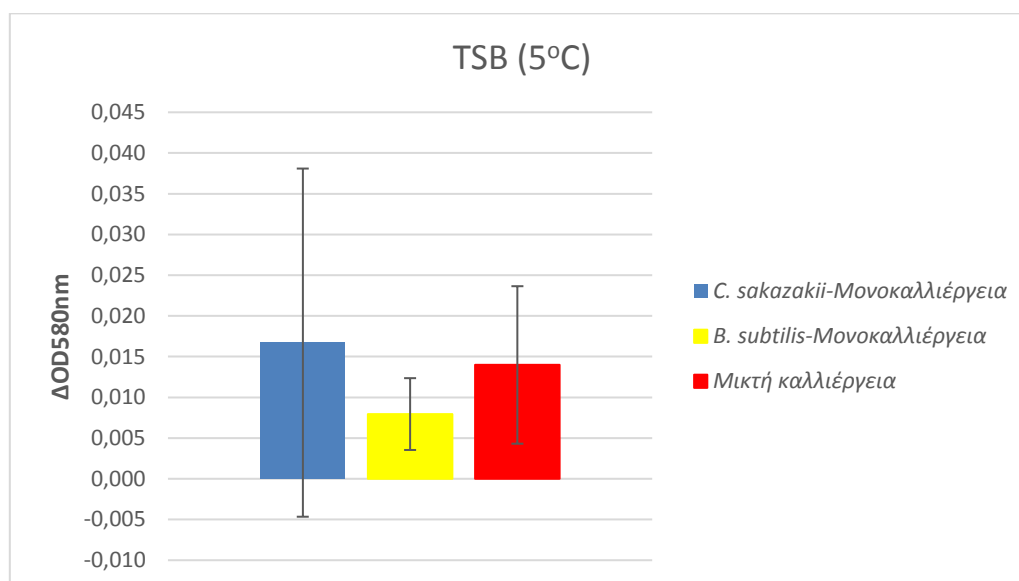
Σχηματισμός βιοϋμενίου των *C. sakazakii* και *Bacillus subtilis* (μονοκαλλιέργεια και συγκαλλιέργεια) σε θρεπτικό ζωμό

Σε συνέχεια της μελέτης σχηματισμού βιοϋμενίου των μονοκαλλιεργειών και της συγκαλλιέργειας *C. sakazakii*-*B. subtilis*, έλαβε χώρα η πειραματική διαδικασία των μικροσυστοιχιών πολυστυρενίου, στο ίδιο μη επιλεκτικό εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα (TSB) και σε αραιωμένο TSB (dTSB, αραιώση 1:20). Σκοπός ήταν η εξαγωγή συμπληρωματικών πληροφοριών για την επώαση των καλλιεργειών στο

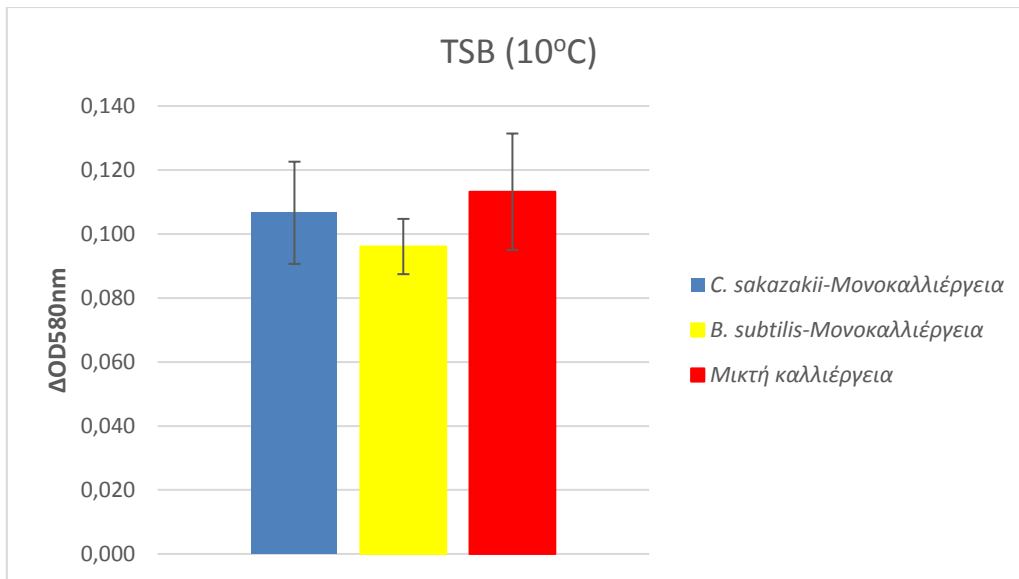
TSB και η πιθανή ανεύρεση διαφορών με το αραιωμένο υπόστρωμα που θα οφείλονταν στη χαμηλότερη συγκέντρωση θρεπτικών συστατικών.

Η ταχύτητα και ο ταυτόχρονος έλεγχος πολλών διαφορετικών συνθηκών που προσφέρει η μέθοδος των μικροσυστοιχιών, έδωσε τη δυνατότητα να μελετηθεί ο σχηματισμός βιοϋμενίου σε δύο επιπλέον θερμοκρασίες, πέραν των 20°C και 37°C, που επιάστηκαν και τα κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα στα πρώτα πειράματα. Επιλέχθηκαν οι 5°C και οι 10°C, διότι είναι οι θερμοκρασίες ψύξης που παρατηρούνται συχνά σε οικιακά και επαγγελματικά ψυγεία. Στα παρακάτω ραβδογράμματα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι και οι τυπικές αποκλίσεις των αποτελεσμάτων και των δύο επαναλήψεων για κάθε θερμοκρασία και θρεπτικό υπόστρωμα. Για κάθε υπό μελέτη περίπτωση, οι τιμές οπτικής πυκνότητας (ΔOD_{580nm}) προέκυψαν, έπειτα από αφαίρεση του μέσου όρου των τιμών οπτικής πυκνότητας των αρνητικών μαρτύρων (control) από κάθε βοθρίο με αντίστοιχο θρεπτικό υπόστρωμα, ώστε να μη ληφθεί υπόψη η απορρόφηση που οφείλεται στο υπόστρωμα.

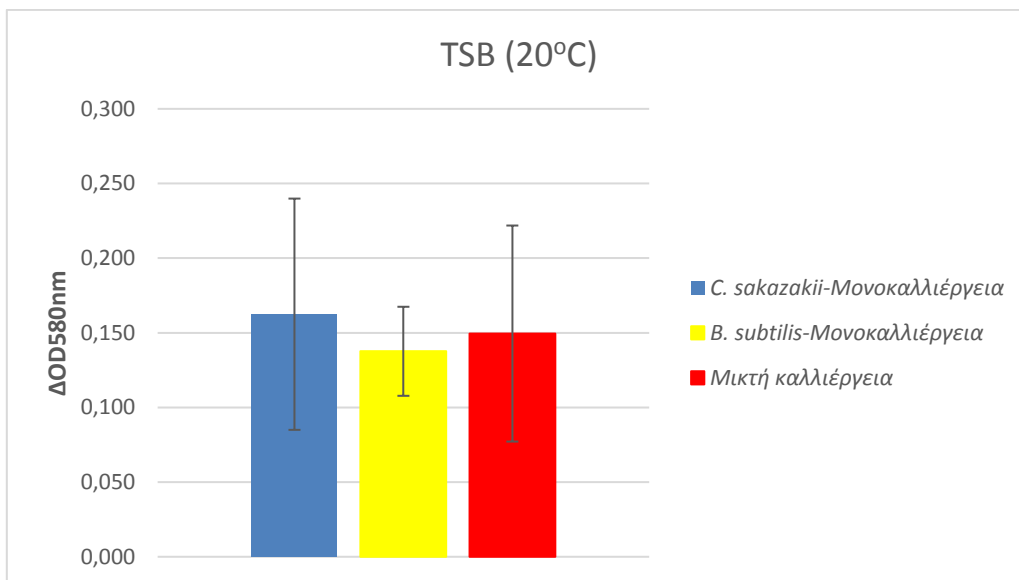
TSB



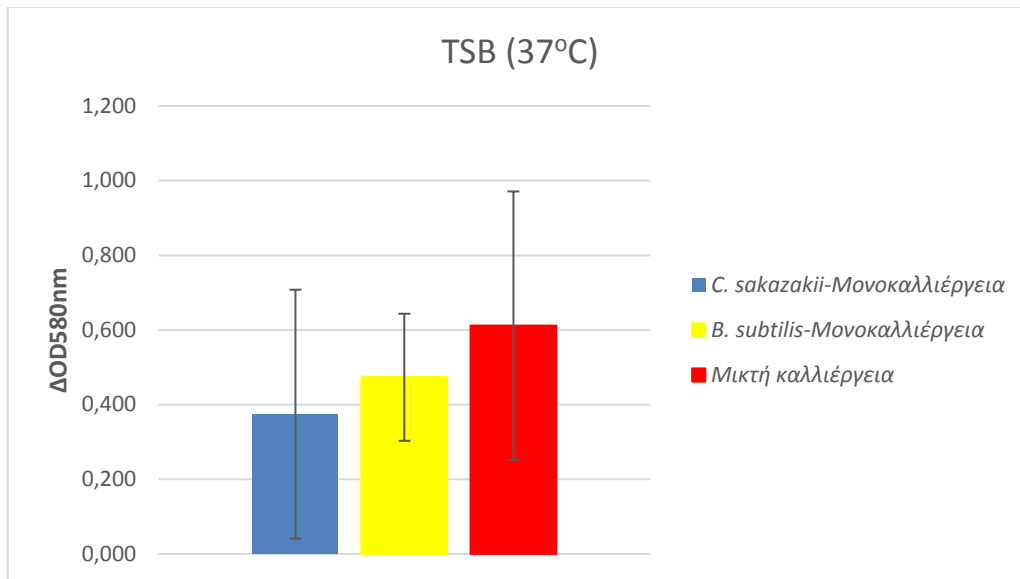
Σχήμα 4.3.1. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση καλλιέργειας επωασμένη σε TSB στους 5°C.



Σχήμα 4.3.2. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση καλλιέργειας επωασμένη σε TSB στους 10°C.



Σχήμα 4.3.3. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση καλλιέργειας επωασμένη σε TSB στους 20°C.



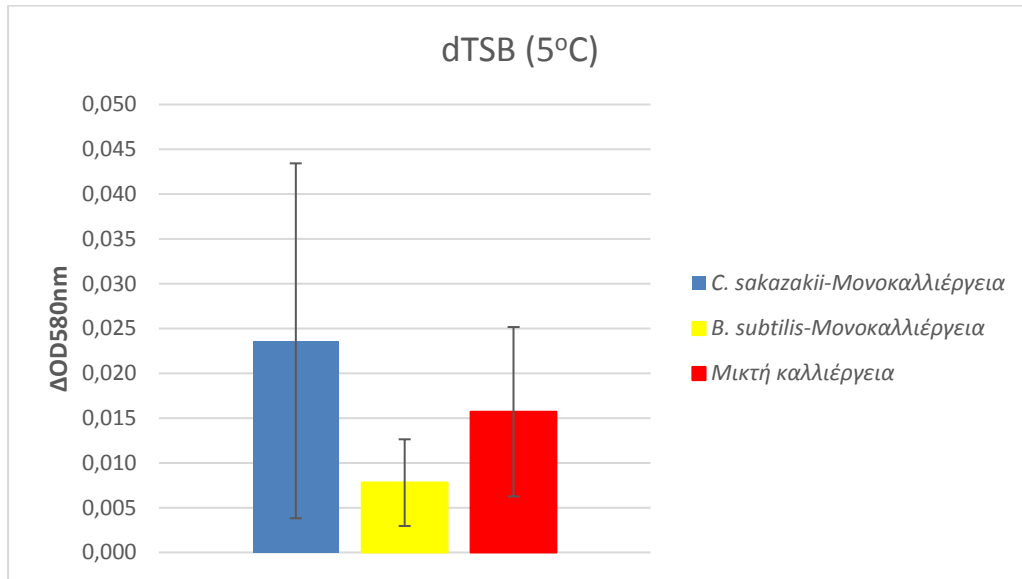
Σχήμα 4.3.4. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση καλλιέργειας επωασμένη σε TSB στους 37°C.

Όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 4.3.1, οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας για τους 5°C ήταν οριακά άνω του μηδενός, υποδεικνύοντας ότι στη συγκεκριμένη θερμοκρασία δεν έλαβε χώρα αξιοσημείωτος σχηματισμός βιοϋμενίου για καμία από τις τρεις περιπτώσεις καλλιέργειας που εξετάστηκαν. Περνώντας στους 10°C, κάποιος μικρός βαθμός σχηματισμού βιοϋμενίου φάνηκε να πραγματοποιείται, χωρίς ωστόσο σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών περιπτώσεων καλλιέργειών (Σχήμα 4.3.2). Όσον αφορά στις άλλες δύο θερμοκρασίες επώασης, γίνεται αντιληπτό από τις τιμές οπτικής πυκνότητας ότι στους 20°C ο *C. sakazakii* σχημάτισε περισσότερο βιοϋμένιο από τον *B. subtilis*, ενώ στους 37°C, παρατηρήθηκε το αντίστροφο. Λόγω ωστόσο των υψηλών τιμών τυπικής απόκλισης οι παρατηρούμενες διαφορές δεν μπόρεσαν να χαρακτηριστούν ως στατιστικώς σημαντικές. Τα αποτελέσματα σχηματισμού βιοϋμενίου, έπειτα από τις 48 h επώασης των μικροσυστοιχιών, συμφωνούν με αυτά της δειγματοληψίας των 48 h κουπονιών ανοξειδωτού χάλυβα. Γενικότερα, τα πειράματα έδειξαν πως με την αύξηση της θερμοκρασίας οι τιμές οπτικής πυκνότητας αυξάνονται, γεγονός που μπορεί να ερμηνευτεί ως υψηλότερο επίπεδο σχηματισμού βιοϋμενίου.

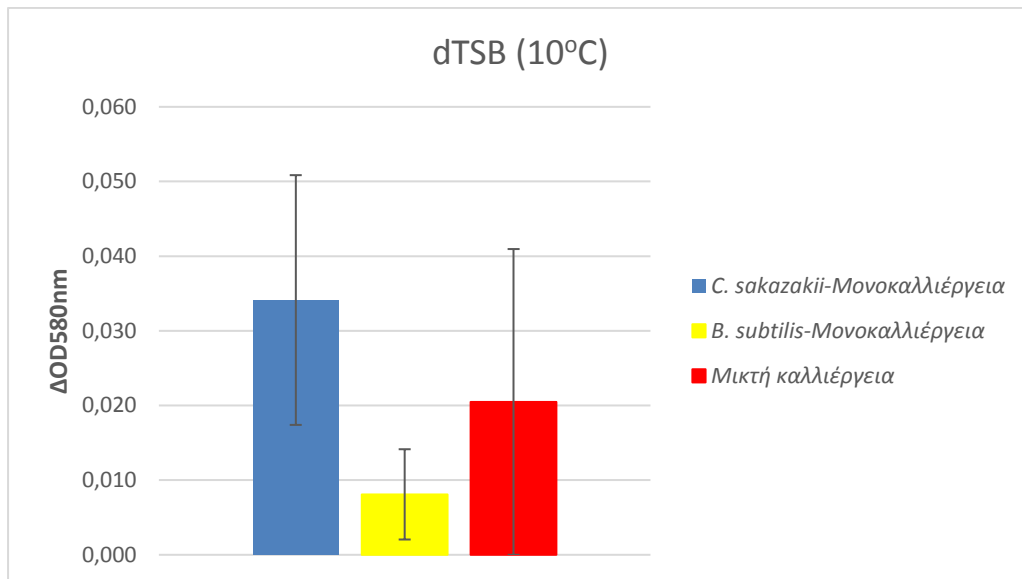
dTSB

Όσον αφορά στα αποτελέσματα του dTSB, αξιοσημείωτη παραγωγή βιοϋμενίου δεν παρατηρήθηκε στους 5, 10 και 20°C (Σχήματα 4.3.5-4.3.7). Βέβαια και στην περίπτωση του dTSB, οι τιμές αυξάνονταν ομοίως με αύξηση της θερμοκρασίας, ακόμη και αν επρόκειτο για οριακή αύξηση άνω του μηδενός. Στους 37°C, ο βιοϋμενικός σχηματισμός που υπερίσχυσε ήταν ξανά του *B. subtilis*, ο οποίος ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από αυτόν του *C. sakazakii* (Σχήμα 4.3.8). Οι χαμηλότερες, ωστόσο, τιμές οπτικής πυκνότητας συγκριτικά με αυτές που είχαν μετρηθεί στο TSB

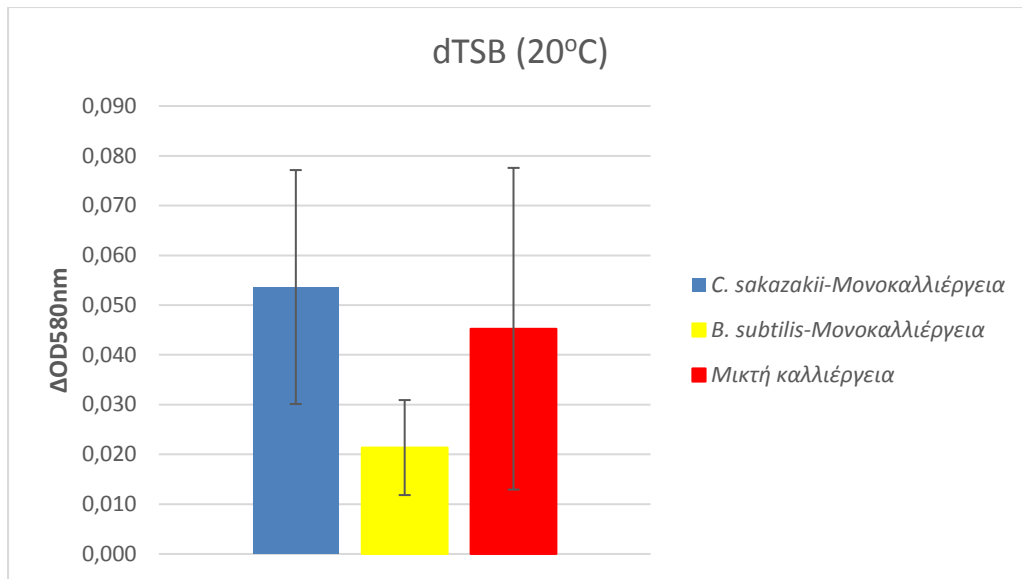
ήταν αναμενόμενες, δεδομένης της μικρότερης περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά του dTSB.



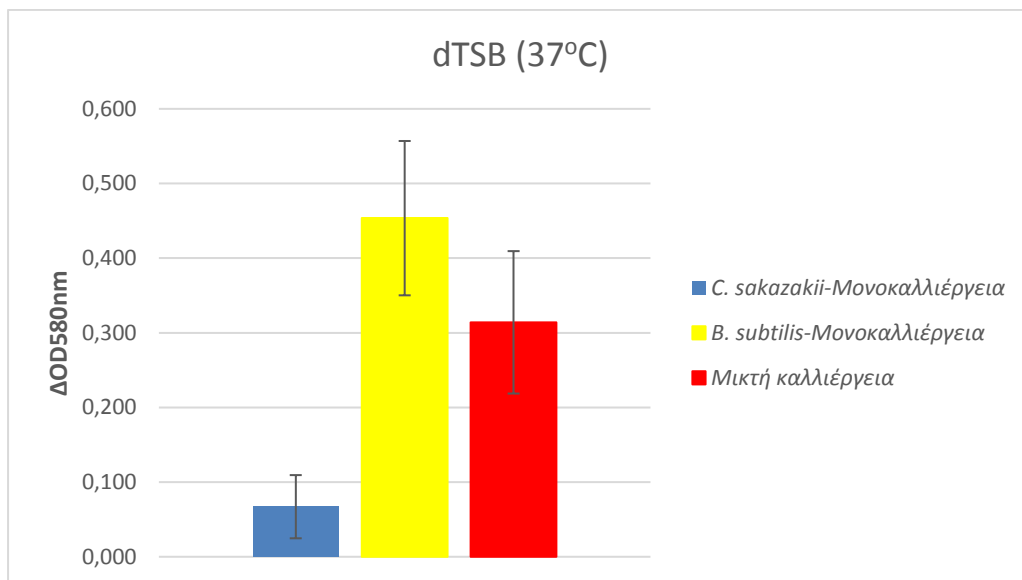
Σχήμα 4.3.5. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση καλλιέργειας επωασμένη σε dTSB στους 5°C.



Σχήμα 4.3.6. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση καλλιέργειας επωασμένη σε dTSB στους 10°C.



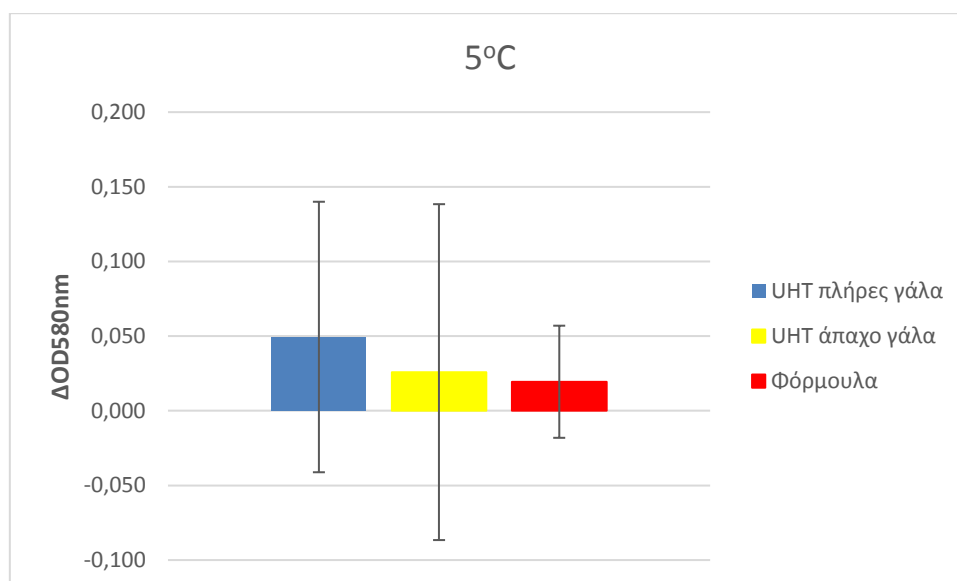
Σχήμα 4.3.7. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση καλλιέργειας επωασμένη σε dTSB στους 20°C.



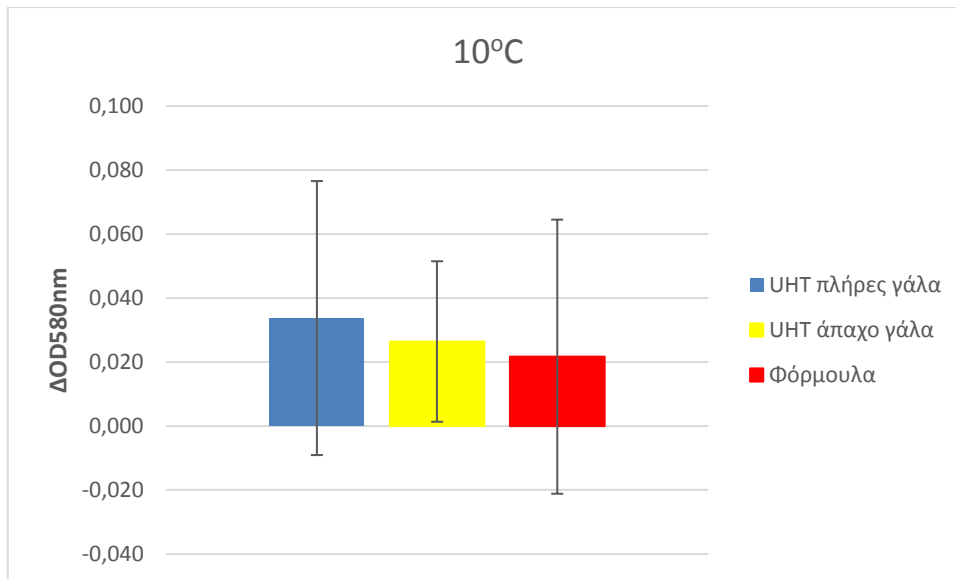
Σχήμα 4.3.8. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση καλλιέργειας επωασμένη σε dTSB στους 37°C.

Σχηματισμός βιοϋμενίου του *C. sakazakii* σε γάλα

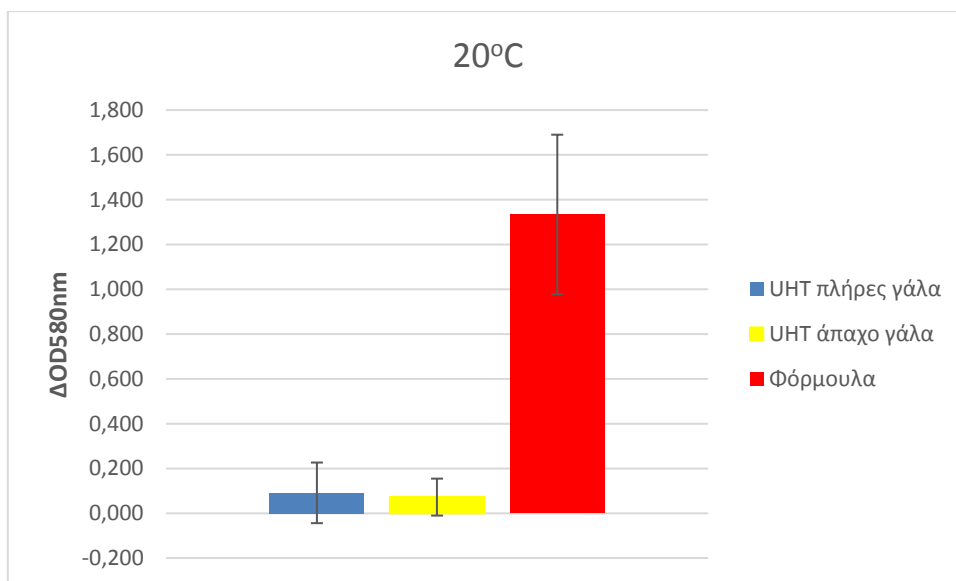
Προεκτείνοντας τη μελέτη σχηματισμού βιοϋμενίου για το *C. sakazakii* σε διαφορετικά είδη γάλακτος ως θρεπτικό υπόστρωμα, αποφασίστηκε η διεξαγωγή παρόμοιων πειραμάτων με τα κουπόνια ανοξειδωτού χάλυβα και για τις μικροσυστοιχίες. Τα TSB και dTSB δεν αντικαταστάθηκαν μόνο με φόρμουλα βρεφικού γάλακτος και πλήρες UHT γάλα, όπως πραγματοποιήθηκε στο πρώτο μέρος των πειραμάτων με τα κουπόνια, αλλά προστέθηκε και άπαχο UHT γάλα, προς διερεύνηση της πιθανής επίδρασης της λιποπεριεκτικότητας του γάλακτος στη βιοϋμενική ανάπτυξη. Επιλέχθηκαν οι ίδιες θερμοκρασίες με τα εργαστηριακά θρεπτικά υποστρώματα, όμως η μελέτη των 37°C δεν κατέστη δυνατή, λόγω υπερβολικής ανάπτυξης που απέτρεψε τη διαδικασία χρώσης. Στην ίδια παρατήρηση είχαν καταλήξει και τα πειράματα του Zain (2009), όπου η φόρμουλα μετατράπηκε σε κολλώδη και ιξώδη έπειτα από 24 h επώασης στους 37°C και αποφασίστηκε η αραιώσή της σε 1:10. Μικροσκοπική παρατήρηση των βιοϋμενίων απέδωσε την κολλώδη δομική μεταβολή σε σχηματισμό κάψουλας εξωπολυσακχαριτών (Zain, 2009). Τα αποτελέσματα για τους 5°C και 10°C έδειξαν, ομοίως με τα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, πως δεν ήταν δυνατός ο σχηματισμός βιοϋμενίου (Σχήματα 4.3.9 και 4.3.10). Στους 20°C, το μοναδικό υπόστρωμα στο οποίο δημιούργησε βιοϋμένιο ο *C. sakazakii* ήταν η φόρμουλα βρεφικού γάλακτος (Σχήμα 4.3.11).



Σχήμα 4.3.9. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση θρεπτικού υποστρώματος εμβολιασμένου με καλλιέργεια *C. sakazakii* στους 5°C.



Σχήμα 4.3.10. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση θρεπτικού υποστρώματος εμβολιασμένου με καλλιέργεια *C. sakazakii* στους 10°C.



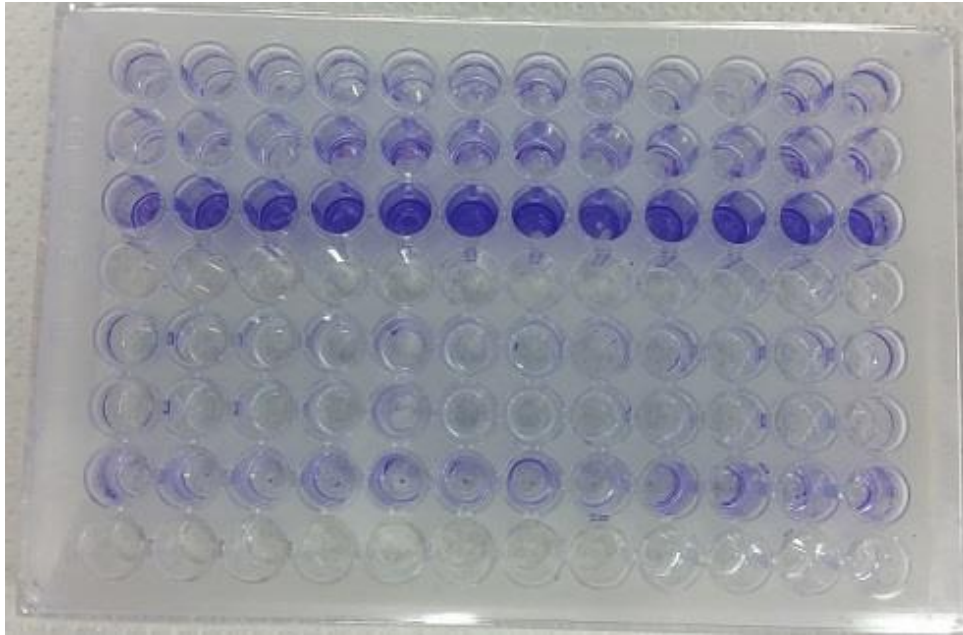
Σχήμα 4.3.11. Τιμές ΔOD_{580nm} (μέσες τιμές \pm τυπικές αποκλίσεις) ανά περίπτωση θρεπτικού υποστρώματος εμβολιασμένου με καλλιέργεια *C. sakazakii* στους 20°C.

Δεδομένων των πολυάριθμων περιστατικών λοίμωξης από το παθογόνο *C. sakazakii* τα οποία έχουν συσχετιστεί με κατανάλωση φόρμουλας βρεφικού γάλακτος, οι περισσότερες μελέτες σχηματισμού βιοϋμενίου του συγκεκριμένου βακτηρίου έχουν διεξαχθεί χρησιμοποιώντας αυτό το προϊόν ως υπόστρωμα. Η μελέτη των Dancer et al. (2009) αναζήτησε τα ουσιώδη συστατικά του άπαχου γάλακτος για την ανάπτυξη βιοϋμενίου από το *C. sakazakii* σε μικροσυστοιχίες. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν πως η πρωτεΐνη ορού και η καζεΐνη ήταν πιο καθοριστικές από τη λακτόζη στο σχηματισμό βιοϋμενίου, μολονότι η ικανότητα σχηματισμού διέφερε μεταξύ των στελεχών *C. sakazakii* που μελετήθηκαν.

Συμπερασματικά για τη βιοϋμενική ανάπτυξη, οι πηγές αζώτου ήταν πιο καταλυτικές από τους υδατάνθρακες και ταυτόχρονα, τα στελέχη που εμφάνισαν ισχυρή ικανότητα ανάπτυξης στο άπαχο γάλα θεωρήθηκαν υπεύθυνα για το φαινόμενο της πήξης του γάλακτος που παρατηρήθηκε (Dancer et al., 2009).

Η διατροφική σύνθεση, ανά 100 ml, του UHT άπαχου γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε στα παρόντα πειράματα, ήταν: ενέργεια 33 kcal, πρωτεΐνες 3,3 g, υδατάνθρακες 4,9 g και 0 g λιπιδίων. Λαμβάνοντας υπόψη τους ισχυρισμούς των Dancer et al. (2009), η ανάπτυξη βιοϋμενίου θα αναμενόταν υψηλότερη στο UHT άπαχο γάλα, καθώς διαθέτει υψηλότερη περιεκτικότητα πρωτεϊνών σε σχέση με τη σκόνη βρεφικού γάλακτος που χρησιμοποιήθηκε για την ανασύσταση της φόρμουλας. Στα πειράματα της παρούσας διατριβής όμως, βιοϋμενική ανάπτυξη με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών παρατηρήθηκε μόνο στη φόρμουλα βρεφικού γάλακτος. Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μπορούν να ερμηνευθούν, βάσει της διαφορετικής θερμοκρασίας επώασης των μικροσυστοιχιών. Στα πειράματα των Dancer et al. (2009) μελετήθηκαν οι 37°C, ενώ επιπλέον, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη και η διαφορετική θερμοκρασία παστερίωσης στην οποία είχαν υποβληθεί τα άπαχα γάλατα που χρησιμοποιήθηκαν. Η μικροβιολογική ανάλυση του UHT άπαχου γάλακτος, που έλαβε χώρα στην αρχή της πειραματικής διαδικασίας, έδειξε πως ήταν εντελώς απαλλαγμένο από ενδογενή μικροβιακή χλωρίδα, γεγονός στο οποίο ίσως οφείλεται η ασυμφωνία των αποτελεσμάτων των δύο ερευνών. Τέλος, τα διαφορετικά αποτελέσματα θα μπορούσαν σε σημαντικό βαθμό να οφείλονται και στα διαφορετικά στελέχη του παθογόνου *C. sakazakii* τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στις δύο αυτές μελέτες.

Αναφορικά με τον παρατηρούμενο σχηματισμό βιοϋμενίου από το παθογόνο στους 20°C μόνο στη φόρμουλα βρεφικού γάλακτος, αυτός ενδέχεται να αποδίδεται στη δομική ανομοιογένεια μεταξύ της φόρμουλας και των διαφορετικών ειδών UHT γάλακτος. Όπως παρατηρήθηκε και στα πειράματα της διδακτορικής διατριβής της Μπέλεση (2014), η κρέμα βρέθηκε περισσότερο ευνοϊκό υπόστρωμα από το γάλα για τον πολλαπλασιασμό βιοϋμενικών κυττάρων της *L. monocytogenes*. Η φόρμουλα βρεφικού γάλακτος άλλωστε, παρασκευασμένη σύμφωνα με τις αναγραφόμενες οδηγίες, χαρακτηρίζεται από μεγαλύτερη πυκνότητα, σε σύγκριση με άλλου είδους γάλατα. Ακόμη, σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν τα πειράματα των Oh et al. (2008) και Zain (2009), όπου η φόρμουλα φάνηκε να ενισχύει την προσκόλληση και ανάπτυξη του *C. sakazakii* στην υδροφοβική επιφάνεια των μικροσυστοιχιών. Συνεπώς, είναι πιθανό πως, όταν η “μεμβράνη περιβαλλοντικής προσαρμογής” (conditioning film) του υποστρώματος διαθέτει και θρεπτικά συστατικά του γάλακτος, η ικανότητα προσκόλλησης του *C. sakazakii* σε στερεές επιφάνειες αυξάνεται. Άλλωστε, συγκριτικά με τα αποτελέσματα στο TSB, οι μετρήσεις οπτικής πυκνότητας στους 20°C (άρα και το επίπεδο σχηματισμού βιοϋμενίου) ήταν σχεδόν δεκαπλάσιες.



Εικόνα 4. Μικροσυστοιχία (microtiter plate), ακριβώς πριν την προσθήκη διαλύματος αιθανόλης (100%), προς τοποθέτηση στο σπεκτροφωτόμετρο και μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) στα 580nm. Τα βοθρία που χρωματίστηκαν μωβ, χάρη στην προσθήκη χρωστικής κρυσταλλικού ιώδους που προηγήθηκε, μαρτυρούν σχηματισμό βιοϋμενίου.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Ο παθογόνος μικροοργανισμός *C. sakazakii* εμφανίζει μεγάλη ικανότητα προσκόλλησης και σχηματισμού βιοϋμενίου σε στερεές επιφάνειες που χρησιμοποιούνται ευρέως στις βιομηχανίες τροφίμων ως επιφάνειες επεξεργασίας (π.χ. ανοξείδωτος χάλυβας) και υλικά συσκευασίας (π.χ. πολυστυρένιο). Το κυριότερο αποτέλεσμα των πειραμάτων συνιστά η σημαντική ενίσχυση της βιοϋμενικής ανάπτυξης του *C. sakazakii* σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα από την παρουσία του *B. subtilis* στους 37°C. Πρόκειται για ένα μη παθογόνο βακτήριο, το οποίο όμως αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για τις γαλακτοβιομηχανίες, λόγω της αλλοίωσης των προϊόντων που προκαλεί. Βέβαια, εφόσον φάνηκε να ενισχύει τη βιοϋμενική παραγωγή ενός παθογόνου βακτηρίου, προστίθεται ένας ακόμη λόγος ανησυχίας, πέραν της αλλοίωσης των τροφίμων.

Η υψηλότερη διαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών και η δομή των τροφίμων φαίνεται πως ενισχύει τη βιοϋμενική ανάπτυξη του *C. sakazakii*. Συγκεκριμένα, βρέθηκε πως ο σχηματισμός βιοϋμενίου σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ενισχύθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα γάλα έναντι της χρήσης εργαστηριακού θρεπτικού υποστρώματος (θρεπτικός ζωμός). Η μικροχλωρίδα του γάλακτος δε φάνηκε να επηρεάζει ιδιαίτερα το βιοϋμένιο που αναπτύσσεται σε επιφάνειες ανοξείδωτου χάλυβα, καθώς παρατηρήθηκε παρόμοια ανάπτυξη σε φόρμουλα βρεφικού γάλακτος και γάλα υπερευψηλής παστερίωσης (UHT). Παρόμοια συμπεράσματα δεν μπόρεσαν να εξαχθούν για τη διαφορετική λιποπεριεκτικότητα, διότι βιοϋμενική ανάπτυξη σε πολυστυρένιο στους 20°C

παρατηρήθηκε μόνο στην περίπτωση της φόρμουλας βρεφικού γάλακτος και όχι στο άπαχο UHT γάλα.

Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα τονίζουν τη σημασία της πρόληψης επιμόλυνσης και του σωστού, επαρκούς καθαρισμού των επιφανειών, με τις οποίες δύναται να έρθουν σε επαφή διαφορετικά είδη γάλακτος, όπως η φόρμουλα βρεφικού γάλακτος και γάλατα υπερυψηλής παστερίωσης, ανεξαρτήτως λιποπεριεκτικότητας. Ειδικότερα, η σημασία της τήρησης των συνθηκών υγιεινής γίνεται κατανοητή, όταν λαμβάνεται υπόψη η δυσκολία καθαρισμού και απολύμανσης των επιφανειών όπου έχουν προσκολληθεί βακτηριακά κύτταρα και έχουν σχηματισθεί βιοϋμένια (Gawande and Bhagwat, 2002, Gilbert et al., 2003). Ως μελλοντικός ερευνητικός στόχος θα μπορούσε να τεθεί η περεταίρω έρευνα της ανθεκτικότητας του μικτού βιοϋμένιου *C. sakazakii-B. subtilis* σε καθαριστικά και απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται σε επιφάνειες χώρων επεξεργασίας τροφίμων.

BIBΛIOΓPAΦIA

An D., et al. (2006) "Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures", *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**: 3828–3833

An D. and Parsek, M.R. (2007) "The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities", *Curr Opin Microbiol*, **10**: 292–296

Angelini, T.E., Roper, M., Kolter, R., Weitz, D.A., Brenner, M.P. (2009) "*Bacillus subtilis* spreads by surfing on waves of surfactant", *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**: 18109–18113

Antonova, E.S. and Hammer, B.K. (2011) "Quorum-sensing autoinducer molecules produced by members of a multispecies biofilm promote horizontal gene transfer to *Vibrio cholerae*", *FEMS Microbiol Lett*, **322**: 68–76

Arseni, A., et al. (1987) "Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*", *J Hosp Infect*, **9**: 143–150

Asally, M., Kittisopikul, M., Rue, P., Du, Y., Hu, Z., Cagatay, T., et al. (2012) "Localized cell death focuses mechanical forces during 3D patterning in a biofilm", *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**: 18891–18896

Banat, I.M. et al. (2010) "Microbial biosurfactants production, applications and future potential", *Appl Microbiol Biotechnol*, **87**: 427–444

Bar-Oz, B., Preminger, A., Peleg, O., Block, C. and Arad, I. (2001) "*Enterobacter sakazakii* infection in the newborn", *Acta Paediatr*, **90**: 356–358

Beuchat, L.R., Kim, H., Gurtler, J.B., Lin, L.-C., Ryu, J.-H. and Richards, G.M. (2009) "*Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation", *Int J Food Microbiol*, **136**: 204–213

Branda, S.S., Gonzalez-Pastor, J.E., Ben-Yehuda, S., Losick, R., Kolter, R. (2001) "Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*", *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**: 11621–11626

Branda, S.S., Chu, F., Kearns, D.B., Losick, R., Kolter, R. (2006) "A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix", *Mol Microbiol*, **59**: 1229–1238

Burmølle, M. et al. (2006) "Enhanced biofilm formation and increased resistance towards antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms", *Appl Environ Microbiol*, **72**: 3916–3923

Burmølle, M. et al. (2008) "Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains", *Microbiology*, **154**: 187–195

- Burmølle, M. et al. (2012) "Sequencing of IncX-plasmids suggests ubiquity of mobile forms of a biofilm-promoting gene cassette recruited from *Klebsiella pneumoniae*", PLoS ONE **7**, e41259
- Burmølle, M. et al. (2014) "Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?", Trends Microbiol, **22**: 84-91
- Burne, R.A. (1998) "Oral streptococci... products of their environment", J Dent Res, **77**: 445–452
- Burne, R.A. et al. (2003) "Gene expression in oral biofilms" In: Medical Implications of Biofilms (Wilson, M. and Devine, D., Eds.), vol 1, pp 212–227
- Cairns, L.S., Marlow, V.L., Bissett, E., Ostrowski, A., Stanley-Wall, N.R. (2013) "A mechanical signal transmitted by the flagellum controls signalling in *Bacillus subtilis*", Mol Microbiol, **90**: 6–21
- Characklis, W.G. (1973) "Attached microbial growths-II. Frictional resistance due to microbial slimes", Water Res, **7**: 1249–1258
- Chavant, P., Martinie, B., Meylheuc, T., Bellon-Fontaine, M.N., Hebraud, M. (2002) "*Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases", Appl Environ Microbiol, **68**: 728-737
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Kourkoutas, Y., Nychas, G.-J.E. (2010) "Inhibition of the early stage of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture", Appl Environ Microbiol, **76**; 2018-2022
- Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Skandamis, P.N., Haroutounian, S.A., Nychas, G.-J.E. (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
- Chorianopoulos, N.G., Tsoukleris, D.S., Panagou, E.Z., Falaras, P., Nychas, G.-J.-E. (2011) "Use of titanium dioxide (TiO₂) photocatalysts as alternative means for *Listeria monocytogenes* biofilm disinfection in food processing", Food Microbiol, **28**; 164-170
- Claus, D. and Berkeley, R.C.W. (1986) "Genus *Bacillus* Cohn 1872", pp. 1105-1139. In: P.H.A. Sneath, et al. (eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD
- Costerton, J.W. et al. (1978) "How bacteria stick", Sci Am, **238**: 86–95
- Davies, D.G. and Geesey, G.G. (1995) "Regulation of the alginate biosynthesis gene algC in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture", Appl Environ Microbiol, **61**: 860–867

- de Kievit, T.R. (2009) "Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms", *Environ Microbiol*, **11**: 279–288
- de la Cruz-Perera, C.I. et al. (2013) "The ability of soil bacteria to receive the conjugative IncP1 plasmid, pKJK10, is different in a mixed community compared to single strains", *FEMS Microbiol Lett*, **338**: 95–100
- Díez-García, M., Capita, R., Alonso-Calleja, C. (2012) "Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry", *Food Microbiol*, **31**: 173–180
- Donlan R. M. (2002) "Biofilms: Microbial Life on Surfaces", *Emerg Infect Dis*, **8**: 881-890
- Du, X.-J, Wang, F., Lu, X., Rasco, B.A. and Wang, S. (2012) "Biochemical and genetic characteristics of *Cronobacter sakazakii* biofilm formation", *Res Microbiol*, **163**: 448-456
- Eberl, L. and Tumbler, B. (2004) "*Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation", *Int J Med Microbiol*, **294**: 123–131
- Edberg, S.C. (1991) "US EPA human health assessment: *Bacillus subtilis*", Unpublished, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Egland, P.G. et al. (2004) "Interspecies communication in *Streptococcus gordonii*-*Veillonella atypica* biofilms: signaling in flow conditions requires juxtaposition", *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **101**: 16917–16922
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization], 2004, Expert Meeting on *Enterobacter sakazakii* and Other Microorganisms in Powdered Infant Formula. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report, Geneva
- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization], 2008, *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) in powdered follow-up formulae, Microbiological Risk Assessment Series No. 15, Rome, pp 90
- Farmer, J.J., et al. (1980) "Enterobacter sakazakii: A New Species of "Enterobacteriaceae" Isolated from Clinical Specimens", *Int J Syst Evol Micr*, **30**: 569-584
- Fazli, M. et al. (2009) "Nonrandom distribution of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in chronic wounds", *J Clin Microbiol*, **47**: 4084–4089
- Food Safety Authority of Ireland (2011) "*Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)", Microbial Factsheet Series, Issue No. 1, pp 1-5
- Fux, C.A. et al. (2005) "Survival strategies of infectious biofilms", *Trends Microbiol*, **13**: 34–40

Gantner, S. et al. (2006) "In situ quantitation of the spatial scale of calling distances and population density-independent N-acylhomoserine lactone-mediated communication by rhizobacteria colonized on plant roots", *FEMS Microbiol Ecol*, **56**: 188–194

Ghigo, J.M. (2001) "Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development", *Nature*, **412**: 442–445

Giaouris, E., Chorianopoulos, N. and Nychas, G.J.E. (2005) "Effect of temperature, pH, and water activity on biofilm formation by *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 on stainless steel surfaces as indicated by the bead vortexing method and conductance measurements", *J Food Prot*, **68**: 2149-2154

Gopal N., Colin C., Ross P.R., Beresford T.P., Fenelon M.A. and Cotter P.D. (2015) "The Prevalence and Control of *Bacillus* and Related Spore-Forming Bacteria in the Dairy Industry", *Front Microbiol*, **6**: 1418

Gordon, R.E. (1973) "The genus *Bacillus*", *Agricultural Handbook No. 427*. Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Washington, DC

Grimm, M., Stephan, R., Iversen, C., Manzardo, G.G., Rattei, T., Riedel, K., Ruepp, A., Frishman, D. and Lehner, A. (2008) "Cellulose as an extracellular matrix component present in *Enterobacter sakazakii* biofilms", *J Food Prot*, **71**: 13–18

Hall-Stoodley L., Costerton J.W. and Stoodley P. (2004) "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases", *Nat Rev Microbiol*, **2**: 95–108

Hall-Stoodley L and Stoodley P. (2009) "Evolving concepts in biofilm infections". *Cell Microbiol*, **11**: 1034–1043

Hannan, S. et al. (2010) "Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms", *FEMS Immunol Med Microbiol*, **59**: 345–349

Hansen, S.K. et al. (2007) "Evolution of species interactions in a biofilm community", *Nature*, **445**: 533–536

Hartmann, I., Carranza, P., Lehner, A., Stephan, R., Eberl, L. and Riedel, K., (2010) "Genes involved in *Cronobacter sakazakii* biofilm formation", *Appl Environ Microbiol*, **76**: 2251-2261

Heukelekian H. and Heller A. (1940) "Relation between food concentration and surface for bacterial growth", *J Bacteriol*, **40**: 547–58

Hobley, L., Ostrowski, A., Rao, F.V., Bromley, K.M., Porter, M., Prescott, A.R., et al. (2013) "BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm", *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**: 13600–13605

Hood, S.K. and Zottola, E.A. (1997) "Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems", *Int J Food Microbiol*, **37**: 145-153

Hussain M., Wilcox M.H. and White P.J. (1993) "The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence", *FEMS Microbiol Rev*, **104**: 191–208

Iversen, C., et al. (2007) "The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1", *BMC Evol Biol*, **7**: 64

Jason, J. (2012) "Prevention of Invasive *Cronobacter* Infections in Young Infants Fed Powdered Infant Formulas", *Pediatr*, **130**: 1076-1084

Jones, H.C. et al. (1969) "Electron microscopic study of a slime layer", *J Bacteriol*, **99**: 316–25

Jung, J.-H., Choi, N.-Y. and Lee, S.-Y. (2013) "Biofilm formation and exopolysaccharide (EPS) production by *Cronobacter sakazakii* depending on environmental conditions", *Food Microbiol*, **34**: 70-80

Katsikogianni, M., and Missirlis, Y.F. (2004) "Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions", *Eur Cells Mater*, **8**: 37-57

Kavamura, V.N. and de Melo, I.S. (2014) "Effects of different osmolarities on bacterial biofilm formation", *Braz J Microbiol*, **45**: 627–631

Kearns, D.B., Chu, F., Branda, S.S., Kolter, R., Losick, R. (2005) "A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*", *Mol Microbiol*, **55**: 739–749

Kim, H. and Beuchat, L.R. (2005) "Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juice as affected by storage temperature", *J Food Prot*, **68**: 2541–2552

Kim, H., Ryu, J.H. and Beuchat, L.R. (2006) "Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes", *Appl Environ Microbiol*, **72**: 5846–5856

Klasson, L. and Andersson, S.G. (2004) "Evolution of minimal-gene-sets in host-dependent bacteria", *Trends Microbiol*, **12**: 37–43

Klayman, B.J. et al. (2009) "*Escherichia coli* O157:H7 requires colonizing partner to adhere and persist in a capillary flow cell", *Environ Sci Technol*, **43**: 2105–2111

Kodjikian, L., Burillon, C., Lina, G., Roques, C., Pellon, G., Freney, J. and Renaud, F.N. (2003) "Biofilm formation on intraocular lenses by a clinical strain encoding the *ica* locus: a scanning electron microscopy study", *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **44**: 4382–4387

- Kolenbrander, P.E. et al. (2010) "Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance", *Nat Rev Microbiol*, **8**: 471–480
- Kolodkin-Gal, I., Elsholz, A.K., Muth, C., Girguis, P.R., Kolter, R., Losick R. (2013) "Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase", *Genes Dev*, **27**: 887–899
- Korgaonkar, A. et al. (2013) "Community surveillance enhances *Pseudomonas aeruginosa* virulence during polymicrobial infection", *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**: 1059–1064
- Korsten, L., and Cook, N. (1996) "Optimizing Culturing Conditions for *Bacillus Subtilis*", *South African Avocado Growers' Association Yearbook*, **19**: 54-58
- Kostaki, M. et al. (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**: 2586-95
- Kreft, J.U. (2003) "Biofilms promote altruism", In: *ASM Conferences 2003*, American Society for Microbiology Eds.
- Krol, J.E. et al. (2013) "Invasion of *E. coli* biofilms by antibiotic resistance plasmids", *Plasmid*, **70**: 110–119
- Kuchma, S.L. and O'Toole, G.A. (2000) "Surface-induced and biofilm-induced changes in gene expression", *Curr Opin Biotechnol*, **11**: 429–433
- Lee, K.W. et al. (2013) "Biofilm development and enhanced stress resistance of a model, mixed-species community biofilm", *ISME J*, **2**: 894-907
- Lehner, A., Riedel, K., Eberl, L., Breeuwer, P., Diep, B. and Stephan, R. (2005) "Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental persistence", *J Food Prot*, **68**: 2287–2294
- Lejeune, P. (2003) "Contamination of abiotic surfaces: what a colonizing bacterium sees and how to blur it", *Trends Microbiol*, **11**: 179–184
- Lemon, K.P., Higgins, D.E and Kolter, R. (2007) "Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation", *J Bacteriol*, **189**: 4418-4424
- Lemon, K.P., Earl, A.M., Vlamakis, H.C., Aguilar, C. and Kolter, R. (2008) "Biofilm Development with an Emphasis on *Bacillus subtilis*", *Curr Top Microbiol Immunol*, **322**: 1–16
- Leriche, V., Sibille, P., Carpentier, B. (2000) "Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms". *Appl Environ Microbiol*, **66**: 1851–6

- Lewis, K. (2001) "Riddle of biofilm resistance", *Antimicrob Agents Chemother*, **45**: 999–1007
- Li, Y.-H. and Tian, X. (2012) "Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms", *Sensors (Basel)*, **12**: 2519–38
- Lianou, A. and Koutsoumanis, K.P. (2012) "Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions", *Int J Food Microbiol*, **160**: 171–8
- Lindsay, D., and von Holy, A. (1997) "Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms", *Food Microbiol*, **14**: 383–390
- Logan, N.A. (2012) "Bacillus and relatives in foodborne illness" *J Appl Microbiol*, **112**: 417–429
- Loo, C.Y. (2003) "Oral Streptococcal genes that encode biofilm formation" in: *Medical Implications of Biofilms* (Wilson, M. and Devine, D., Eds.), vol 1, pp 212–227
- Lopez, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2009) "Cannibalism enhances biofilm development in *Bacillus subtilis*", *Mol Microbiol*, **74**: 609–618
- Madsen, J.S. et al. (2012) "The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer", *FEMS Immunol Med Microbiol*, **65**: 183–195
- Mai, T.L., and Conner, D.E., (2007) "Effect of temperature and growth media on the attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel", *Int J Food Microbiol*, **120**: 282–286
- Matz, C. and Kjelleberg, S. (2005) "Off the hook - how bacteria survive protozoan grazing", *Trends Microbiol*, **13**: 302–307
- May, T. and Okabe, S. (2008) "*Escherichia coli* harboring a natural IncF conjugative F plasmid develops complex mature biofilms by stimulating synthesis of colanic acid and Curli", *J Bacteriol*, **190**: 7479–7490
- Mielich-Süss, B. and Lopez, D. (2015) "Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation", *Environ Microbiol*, **17**: 555–565
- Mitri, S. et al. (2011) "Social evolution in multispecies biofilms", *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **108**: 10839–10846
- Moons, P., Michiels, C.W. and Aertsen, A. (2009) "Bacterial interactions in biofilms", *Crit Rev Microbiol*, **35**: 157–68
- Morris, J.J. et al. (2012) "The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss", *MBio*, **3**: 1–7
- Muytjens, H.L., Zanen, H.C., Sonderkamp, H.J., Klee, L.A., Wachsmuth, I.K. and Farmer, J.J. (1983) "Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*", *J Clin Microbiol*, **18**: 115–120

- Nieminen, T., Rintaluoma, N., Andersson, M., Taimisto, A.-M., Ali-Vehmas, T., Seppälä, A., et al. (2007) "Toxinogenic *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* from mastitic milk", *Vet Microbiol*, **124**: 329–339
- Noriega, F.R., Kotloff, K.L., Martin, M.A. and Schwalbe, R.S. (1990) "Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula", *Pediatr Infect Dis*, **9**: 447–449
- Pagotto, F.J., Nazarowec-White, M., Bidawid, S., Farber, J.M. (2003) "*Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production in vitro and in vivo", *J Food Prot*, **66**: 370-5
- Parsek, M.R. and Greenberg, E.P. (2005) "Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms", *Trends Microbiol*, **13**: 27–33
- Pastar, I. et al. (2013) "Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection", *PLoS ONE* **8**, e56846
- Patti, J.M. et al. (1994) "MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues", *Annu Rev Microbiol*, **48**: 585–617
- Pavic, S., Brett, M., Petric, I., Lastre, D., Smoljanovic, M., Atkinson, M., et al. (2005) "An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*", *Arch Lebensmittel*, **56**: 20–22
- Peters, B.M. et al. (2010) "Microbial interactions and differential protein expression in *Staphylococcus aureus*-*Candida albicans* dual-species biofilms", *FEMS Immunol Med Microbiol*, **59**: 493–503
- Putthana, V., et al. (2012) "Isolation and Characterization of *Cronobacter* spp. from Environmental and Food Resources", *Agricultura Tropica et Subtropica*, **45**: 5-11
- Quigley, L., McCarthy, R., O'Sullivan, O., Beresford, T.P., Fitzgerald, G.F., Ross, R. P., et al. (2013) "The microbial content of raw and pasteurized cow milk as determined by molecular approaches", *J Dairy Sci*, **96**: 4928–4937
- Reisner, A. et al. (2006) "Synergistic effects in mixed *Escherichia coli* biofilms: conjugative plasmid transfer drives biofilm expansion", *J Bacteriol*, **188**: 3582–3588
- Ren, D. et al. (2014) "High-Throughput Screening of Multispecies Biofilm Formation and Quantitative PCR-Based Assessment of Individual Species Proportions, Useful for Exploring Interspecific Bacterial Interactions", *Microb Ecol*, **68**: 146-154
- Rendueles, O. and Ghigo, J.-M. (2012) "Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors", *FEMS Microbiol Rev*, **36**: 972–989

- Riedel, K. et al. (2001) "N-acylhomoserine-lactone-mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms", *Microbiology*, **147**: 3249–3262
- Røder, H.L. et al. (2013) "The impact of the conjugative IncP-1 plasmid pKJK5 on multispecies biofilm formation is dependent on the plasmid host", *FEMS Microbiol Lett*, **344**: 186–192
- Romero, D., Vlamakis, H., Losick, R., Kolter, R. (2011) "An accessory protein required for anchoring and assembly of amyloid fibres in *B. subtilis* biofilms", *Mol Microbiol*, **80**: 1155–1168
- Saito, Y. et al. (2008) "Stimulation of *Fusobacterium nucleatum* biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*", *Oral Microbiol Immunol*, **23**: 1–6
- Schwering, M. et al. (2013) "Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection", *Biofouling*, **29**: 917–928
- Sharma, A. et al. (2005) "Synergy between *Tannerella forsythia* and *Fusobacterium nucleatum* in biofilm formation", *Oral Microbiol Immunol*, **20**: 39–42
- Silley, P., and Forsythe, S. (1996) "Impedance microbiology: a rapid change for Microbiologists", *J Appl Bacteriol*, **80**: 233–243
- Simmons, B.P., Gelfand, M.S., Haas, M., Metts, L. and Ferguson J. (1989) "Enterobacter sakazakii infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula" *Infect Control Hosp Epidemiol*, **10**:398–401
- Sørensen, S.J. et al. (2005) "Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review", *Nat Rev Microbiol*, **3**: 700–710
- Steenackers, H., Hermans, K., Vanderleyden, J., De Keersmaecker, S.C.J. (2012) "*Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication", *Food Res Int*, **45**: 502–531
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. (2000) "A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation", *J Microbiol Methods*, **40**: 175–179
- Stepanović, S., Ćirković, I., Mijač, V., Švabić-Vlahović, M. (2003) "Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp.", *Food Microbiol*, **20**: 339–343
- Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., Švabić-Vlahović, M. (2004) "Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface", *Lett Appl Microbiol*, **38**: 428–432

- Suntharalingam, P. and Cvitkovitch, D.G. (2005) "Quorum sensing in streptococcal biofilm formation", *Trends Microbiol*, **13**: 3–6
- Trejo, M., Douarche, C., Bailleux, V., Poulard, C., Mariot, S., Regeard, C., Raspaud, E. "Elasticity and wrinkled morphology of *Bacillus subtilis* pellicles". *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**: 2011–2016
- van Dijl, J.M. and Hecker, M. (2013) "*Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory", *Microb Cell Fact*, **12**: 3
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C.E.R., Rees, C.E.D., Waites W.M. (2000) "Effect of flagella on initial attachment of *Listeria monocytogenes* to stainless steel", *Appl Environ Microbiol*, **66**: 860-863
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R. (2008) "Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community", *Genes Dev*, **22**: 945–953
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beauregard, P., Losick, R., Kolter, R. (2013) "Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way", *Nat Rev Microbiol*, **11**: 157–168
- West, S.A. et al. (2006) "Social evolution theory for microorganisms", *Nat Rev Microbiol*, **4**: 597–607
- West, S.A. et al. (2007) "The social lives of microbes", *Annu Rev Ecol Evol Syst*, **38**: 53–77
- Wilking, J.N., Zaburdaev, V., De Volder, M., Losick, R., Brenner, M.P., Weitz, D.A. (2013) "Liquid transport facilitated by channels in *Bacillus subtilis* biofilms", *Proc Natl Acad Sci USA*, **110**: 848–852
- Yan, Q.Q., et al. (2012) "*Cronobacter* species (formerly known as *Enterobacter sakazakii*) in powdered infant formula: a review of our current understanding of the biology of this bacterium", *J Appl Microbiol*, **113**: 1-15
- Yoo, J.G., Chang, J.-H., Kim, S.-Y., Ji, J.-Y., Hong, S.-W., Park, B.-Y., et al. (2014) "Analysis of emetic toxin production by *Bacillus* species using cellular cytotoxicity, molecular, and chromatographic assays", *Biotechnol Bioprocess Eng*, **19**: 978–983
- Zain, S.N.M. (2009) "Biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* on three different materials of infant feeding tube", (Master dissertation), Retrieved from Massey University, Palmerston North, New Zealand
- Zeigler, D.R., Pragai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., Bai, R., Wyss, M. and Perkins, J.B. (2008) "The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains", *J Bacteriol*, **190**: 6983–6995
- Zhu, S. (2013) "Effect of microbiologically active substances in powdered infant formula on the growth and detection of *Cronobacter* spp.", Thesis submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Doctor Nutritional Sciences

Zobell, C.E. (1943) "The effect of solid surfaces upon bacterial activity", J Bacteriol, **46**: 39-56