



Study on the ability of *Salmonella* Typhimurium to form biofilm on polystyrene surface in the presence of cell-to-cell communication signal molecules

Vasiliki A. Blana, Xenia Gkaripogkli, George-John Nychas*

*Contact e-mail: gjn@aua.gr

AIM OF THE STUDY

The **formation of biofilms** by *Salmonella enterica* is likely to be affected by the simultaneous presence of **indigenous microflora** of the food-processing equipment. This microflora may also produce **cell-to-cell communication** signal molecules, like *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) and autoinducer-2 (AI-2), which may influence both the **formation** and the **dispersal** of biofilms of pathogenic bacteria.

This study aimed to evaluate the effect of microbial AHL molecules on the biofilm-forming ability of *S. enterica* serovar Typhimurium on an abiotic substratum.

METHODOLOGY

S. Typhimurium CDC 6516-60 was left to form biofilms on 96-well polystyrene microplates at 20 °C for a total period of 120 h under two growth conditions (TSB and diluted $1/_{10}$ TSB, dTSB). Both growth media were supplemented with **evaporated ethyl acetate AHL extracts of *Hafnia alvei* culture** re-diluted in the aforementioned media (50% v/v AHLs) (Shaw *et al.* 1997, modified). The biofilm-forming ability was measured at different time intervals using a crystal violet binding assay (Lianou & Koutsoumanis 2012). The presence of AHLs and AI-2 activity in the wells was monitored by biosensor-based bioassays (Ravn *et al.* 2001; Surette & Bassler 1998).

RESULTS

S. Typhimurium was found to form more biofilm under limited nutritional conditions (dTSB) during the whole period of storage, as shown in Figures 1a and 2a. The addition of AHLs under nutrient rich conditions (TSB) did not significantly influence the biofilm-forming ability of the strain under the whole tested period, while the addition of AHLs in the dTSB significantly reduced the biofilm-forming ability of *S. Typhimurium* compared to the control treatment (0% v/v AHLs). AHL content in the wells (planktonic phase) remained stable (Figures 1a and 2a), whereas there was less AI-2 activity detected in dTSB compared to TSB (planktonic phase), regardless of the AHL content, throughout storage (Figures 1b and 2b).

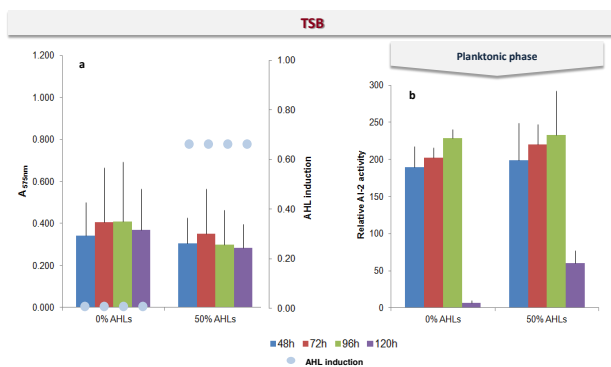


Figure 1. (a) Biofilm-forming ability of *Salmonella* Typhimurium expressed as absorbance measurements at 575 nm and AHL induction in planktonic phase (calculated as the ratio of the AHL induction of the test sample to that of the positive control – 100% v/v AHL), and **(b)** AI-2 activity of *S. Typhimurium* in planktonic phase (expressed as relative AI-2 activity) during incubation of the strain in TSB supplemented with 50% v/v evaporated ethyl acetate AHL extracts stored at 20 °C for 120 h.

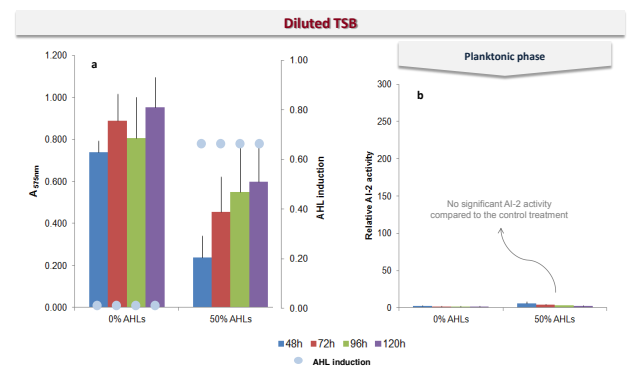


Figure 2. (a) Biofilm-forming ability of *Salmonella* Typhimurium expressed as absorbance measurements at 575 nm and AHL induction in planktonic phase (calculated as the ratio of the AHL induction of the test sample to that of the positive control – 100% v/v AHL), and **(b)** AI-2 activity of *S. Typhimurium* in planktonic phase (expressed as relative AI-2 activity) during incubation of the strain in diluted TSB supplemented with 50% v/v evaporated ethyl acetate AHL extracts stored at 20 °C for 120 h.

Planktonic phase: The presence of AHL molecules could not be related to the absence or presence of AI-2 activity, while the nutrient content of the used media seems to influence the produced and detected AI-2 activity under the tested experimental conditions

Detached phase: Yoon and Sofos (2008) detected little or none AI-2 activity in attached *S. Typhimurium* biofilm cells (polypropylene coupons stored at 25 °C for 72h)

SIGNIFICANCE

Cell-to-cell communication signal molecules seem to affect biofilm-forming ability of *S. Typhimurium*, while their effective control may improve food safety.

REFERENCES: Lianou, A. & Koutsoumanis, K.P. 2012. International Journal of Food Microbiology 160, 171-178
Yoon, Y. & Sofos, J.N. 2008. Journal of Food Science 73, M140-M147
Ravn, L. *et al.* 2001. Journal of Microbiological Methods 44, 239-251

Surette, M.G & Bassler, B.L. 1998. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 95, 7046-7050
Shaw, P.D. *et al.* 1997. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 94, 6036-6041

Μελέτη της ικανότητας του βακτηρίου *Salmonella Typhimurium* να σχηματίζει βιο-υμενίο σε επιφάνεια πολυστυρενίου παρουσία μορίων-σημάτων διακυτταρικής επικοινωνίας

Μπλάνα Β., Γκαριπόγκλι Ξ., Νυχάς Γ-Ι.

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

Ο σχηματισμός βιο-υμενίου από το παθογόνο βακτήριο *Salmonella enterica* είναι πιθανό να επηρεαστεί από την παρουσία ενδογενούς μικροχλωρίδας στον εξοπλισμό επεξεργασίας τροφίμων. Η συγκεκριμένη μικροχλωρίδα δύναται να παράγει μόρια-σήματα διακυτταρικής επικοινωνίας, όπως ακυλιωμένες λακτόνες της ομοσερίνης (AHLs) και αυτεπαγωγείς-2 (AI-2), τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τόσο το σχηματισμό όσο και τη διασπορά των βιο-υμενίων παθογόνων βακτηρίων. Αυτή η μελέτη είχε σκοπό την αξιολόγηση της επίδρασης των AHLs μικροβιακής προέλευσης στην ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου από το βακτήριο *S. enterica* ορότυπος Typhimurium (SeT) σε αβιοτική επιφάνεια. Το SeT αφέθηκε να σχηματίσει βιο-υμενίο σε μικροπλακίδιο πολυστυρενίου 96-βοθρίων στους 20°C για συνολικό χρονικό διάστημα 120 ωρών, με τη χρήση δύο μέσων ανάπτυξης (TSB και αραιωμένο TSB, αTSB). Αμφότερα τα μέσα ανάπτυξης εμπλουτίστηκαν με AHLs, τα οποία λήφθησαν μετά την εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα καλλιέργειας *Hafnia alvei*, την εξάτμιση του οργανικού διαλύτη και την επαναιώρηση στα προαναφερθέντα μέσα ανάπτυξης (50% v/v AHLs). Η ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου μετρήθηκε σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα εφαρμόζοντας χρώση με κρυσταλλικό ιώδες, ενώ η παρουσία AHLs και AI-2 δραστηριότητας στα βοθρία ελέγχθηκε με τη χρήση βιο-αισθητήρων. Ο σχηματισμός SeT βιο-υμενίου ήταν πιο έντονος παρουσία περιορισμένων θρεπτικών συστατικών (αTSB) καθ' όλη τη διάρκεια της αποθήκευσης. Η προσθήκη των AHLs σε πλούσιες με θρεπτικά συστατικά συνθήκες (TSB) δεν επηρέασε σημαντικά την ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου του στελέχους στο σύνολο της μελετηθείσας περιόδου, ενώ η προσθήκη των AHLs στην αTSB συνθήκη μείωσε σημαντικά την ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίου του SeT σε σύγκριση με το μάρτυρα (0% v/v AHL). Η παρουσία των AHLs παρέμεινε σταθερή, ενώ ανιχνεύτηκε μικρότερη AI-2 δραστηριότητα στο αTSB σε σχέση με το TSB μέσο ανάπτυξης, ανεξάρτητα από την παρουσία ή μη των AHLs, κατά την αποθήκευση. Τα μόρια-σήματα διακυτταρικής επικοινωνίας μπορεί να επηρεάσουν το σχηματισμό βιο-υμενίου του SeT, ενώ ο αποτελεσματικός έλεγχος τους μπορεί να βελτιώσει την ασφάλεια των τροφίμων.

Λέξεις-κλειδιά

Βιο-υμενία, *Salmonella Typhimurium*, διακυτταρική επικοινωνία, ακυλιωμένες λακτόνες της ομοσερίνης, αυτεπαγωγείς-2

Ευχαριστίες

Η πράξη Θαλής: «Βιολογική ολιστική προσέγγιση της δυναμικής Μορφής Επιβίωσης παθογόνων βακτηριακών σχηματισμών-BIOYMENIA», έχει συγχρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο-EKT) και από εθνικούς πόρους μέσω του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια Βίου Μάθηση» του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ)-Ερευνητικό Χρηματοδοτούμενο Έργο: ΘΑΛΗΣ. Επένδυση στην κοινωνία της γνώσης μέσω του ΕΚΤ.

Study on the ability of *Salmonella* Typhimurium to form biofilm on polystyrene surface in the presence of cell-to-cell communication signal molecules

Blana A., Gkaripogkli X., Nychas G-J.

Laboratory of Microbiology and Biotechnology of Foods, Department of Food Science and Human Nutrition, Agricultural University of Athens, Athens, Greece

The formation of biofilms by *Salmonella enterica* is likely to be affected by the simultaneous presence of indigenous microflora on the food-processing equipment. This microflora may also produce cell-to-cell communication signal molecules, like *N*-acyl-homoserine lactones (AHLs) and autoinducer-2 (AI-2), which may influence both the formation and dispersal of biofilms of pathogenic bacteria. Thus, this study aimed to evaluate the effect of microbial AHL molecules on the biofilm-formation ability of *S. enterica* serovar Typhimurium (*SeT*) on an abiotic substratum. *SeT* was left to form biofilms on 96-well polystyrene microplates at 20 °C for a total period of 120h under two growth conditions (TSB and diluted TSB, dTSB). Both growth media were supplemented by evaporated ethyl acetate AHL extracts of *Hafnia alvei* culture re-diluted in the aforementioned media (50% v/v AHLs). The biofilm-forming ability was measured at different time intervals using a crystal violet binding assay. The presence of AHLs and AI-2 activity in the wells was monitored by biosensor-based bioassays. *SeT* was found to form more biofilm under limited nutritional conditions (dTSB) during the whole period of storage. The addition of AHLs under nutrient rich conditions (TSB) did not significantly influence the biofilm-forming ability of the strain under the whole tested period, while the addition of AHLs in the dTSB significantly reduced the biofilm-forming ability of *SeT* compared to the control treatment (0% v/v AHLs). AHL content in the wells remained stable, whereas there was less AI-2 activity detected in dTSB compared to TSB, regardless of the AHL content, throughout storage. Cell-to-cell communication signal molecules can affect biofilm-forming ability of *SeT*, while their effective control may improve food safety.

Key-words

Biofilms, *Salmonella* Typhimurium, cell-to-cell communication, *N*-acyl-homoserine lactones, autoinducer-2

Acknowledgment

The action THALIS: “Biological Investigation Of the Forces that Influence the Life of pathogens having as Mission to Survive in various Lifestyles; BIOFILMS”, has been co-financed by the European Union (European Social Fund-ESF) and Greek national funds through the Operational Program "Education and Lifelong Learning" of the National Strategic Reference Framework (NSRF)-Research Funding Program: **THALES**. Investing in knowledge society through the European Social Fund.