

Αναλυτική έκθεση με δεδομένα σχετικά με τον έλεγχο της συνολικής μεταγραφικής έκφρασης γονιδίων που οδηγούν στην ανάπτυξη βιοϋμενίων από τα βακτήρια *Salmonella* και *Staphylococcus* μέσω χρήσης γονιδιωματικών μικροσυστοιχιών (genomic microarrays). (Π16-Δ4.1)

Το είδος *Salmonella enterica* είναι ένα από τα σημαντικότερα εντερικά παθογόνα, όπου προσαρμοσμένα στελέχη του στο ξενιστή είναι ικανά να προκαλέσουν ανθρώπινες λοιμώξεις, οι οποίες μπορούν να αποτελέσουν σημαντικά προβλήματα στη δημόσια υγεία (Ruby et al., 2012). Στελέχη που κατηγοριοποιούνται στους πιο συχνά απαντώμενους ορότυπους, Typhimurium και Enteritidis (Foley et al., 2013), εμπλέκονται σε πολλαπλά, πολύπλοκα και συχνά αλληλοσυσχετιζόμενα συστήματα σχετιζόμενα με συνθήκες καταπόνησης ως αποτέλεσμα της στρατηγικής επιβίωσης (Shen and Fang, 2012). Εκτός από την ικανότητα να του είδους αυτού να προσαρμόζεται σε συνθήκες καταπόνησης, μπορεί και αποικίζει πλήθος αβιοτικών και βιοτικών επιφανειών όπως φυτικές επιφάνειες, ξενιστές, επιφάνειες βιομηχανίας και ιατρικά εργαλεία, και να σχηματίζει βιο-υμένια (Steenackers et al., 2012).

Τα τελευταία χρόνια, η δημιουργία βιοϋμενίων από παθογόνα βακτήρια, όπως το *Salmonella*, έχει προσεγγίζει τον ενδιαφέρον των ερευνητών ειδικά σε ιατρικά θέματα και παραγωγή τροφίμων, λόγω του ενδεχομένου αυτού κινδύνου, συμπεριλαμβανομένου της ανθεκτικότητας σε αντιμικροβιακές ουσίες και της παραγωγής τοξικών παραγόντων (Chmielewski and Frank, 2003; Coenye, 2010). Έτσι η ανθεκτικότητα του γένους *Salmonella* σε βιο-υμένια στην τροφική αλυσίδα αποτελεί σημαντικό υγειονομικό πρόβλημα, καθώς φαίνεται ότι η δημιουργία βιο-υμενίων αυξάνει την ικανότητα επιβίωσης σε συνθήκες καταπόνησης που συχνά απαντώνται στην παραγωγική διαδικασία (Vestby et al., 2009). Συγκεκριμένα το 2013, στην αναφορά της η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των τροφίμων, δεικνύει ότι τα πράσινα φυλλώδη λαχανικά συνδέονται με τροφιμογενείς λοιμώξεις που οφείλονται στα παθογόνα βακτήρια όπως το *Salmonella*. Σημαντικό παράγοντα κινδύνου αποτελεί η επεξεργασία και οι χειρισμοί μετά τη συγκομιδή, καθώς φαίνεται ότι η απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών κατά τον τεμαχισμό και τραυματισμό των ιστών μπορεί να ευνοήσει την ανάπτυξη των μικροοργανισμών (Harris et al. 2003). Αυτά τα θρεπτικά συστατικά μπορούν να παραμείνουν στις επιφάνειες της

βιομηχανίας επηρεάζοντας την επιβίωση, την προσκόλληση και την δημιουργία βιο-υμενίου, τα οποία θα αποτελέσουν στην συνέχεια σημαντικό παράγοντα διασταυρούμενης επιμόλυνσης των φυλλωδών σαλατών. Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ικανότητα σχηματισμού βιο-υμενίων στην επιφάνεια των φύλλων, παρόλα αυτά έχουν ασχοληθεί με τις μικροβιακές αλληλεπιδράσεις με την αυτόχθονη χλωρίδα, ενώ ελάχιστες ή καθόλου με την έκφραση παθογόνων γονιδίων κατά τον σχηματισμό βιο-υμενίων.

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα βιο-υμενικά κύτταρα φαίνεται έχουν διαφορετικό φαινότυπο από τα ελεύθερα κύτταρα όπως αυξημένη αντίσταση σε συνθήκες καταπόνησης, το οποίο οφείλεται σε διαφορές στην έκφραση γονιδίων. Τα τελευταία χρόνια, μεταγραφικές μελέτες δείχνουν ότι η ανάπτυξη βιο-υμενίων απαιτεί την έκφραση συγκεκριμένων ομάδων γονιδίων (Puttamreddy et al., 2008). Συγκεκριμένα για το είδος *S. enterica*, έχουν γίνει μελέτες που σχετίζονται με την φυσιολογία των κυττάρων σε ένα βιο-υμένιο (White et al., 2010; Steenackers et al., 2012). Συγκρίνοντας την ανάπτυξη πλαγκτονικών και βιο-υμενικών κυττάρων, η έκφραση γονιδίων είναι διαφορετική και φαίνεται ότι εξαρτάται όχι μόνο από το στάδιο που αφορά στην δημιουργία του βιο-υμενίου αλλά και την προσκόλληση στο βιο-υμένιο (Stewart and Franklin, 2008; Mangalappalli-Illathu et al., 2009). Παρόλα αυτά, οι ακριβείς αυτοί μηχανισμοί που σχετίζονται με την ικανότητα του μικροοργανισμού να αποικίζει επιφάνειες δεν έχει πλήρως διευκρινιστεί. Παράλληλα, φαίνεται ότι αρκετοί παράγοντες πρέπει να ελέγχονται για την κατανόηση ενός τέτοιου φαινομένου. Για παράδειγμα, για τον έλεγχο της παθογένειας απαιτείται ο έλεγχος της έκφρασης γονιδίων όχι μόνο αυτών που σχετίζονται με την παθογένεια αλλά και άλλες διαδικασίες όπως η ανθεκτικότητα και η προσαρμογή σε συνθήκες καταπόνησης.

Στο πλαίσιο αυτού του έργου έχουν σχεδιαστεί επιμέρους εργασίες ώστε να διευρυνθεί η γνώση μας σχετικά με την φυσιολογία των κυττάρων *Salmonella* κατά το σχηματισμό βιο-υμενίου σε αβιοτικές (Α) και βιοτικές επιφάνειες (Β) με μεταγραφική προσέγγιση, καθώς και με την χρήση βιοδεικτών (Γ). Συγκεκριμένα, μελετήθηκε:

Α. η σχετική έκφραση 14 γονιδίων με την τεχνική PCR πραγματικού χρόνου (Real Time-PCR) μεταξύ βιο-υμενικών και πλαγκτονικών κυττάρων *S. Enteritidis* σε δύο θερμοκρασίες. Τα 14 αυτά γονίδια επιλέχθηκαν με βάση προγενέστερες μελέτες σχετιζόμενες με την ενδεχόμενη συνεισφορά τους στην δημιουργία βιο-υμενίου από *Salmonella* και άλλα παθογόνα βακτήρια. Για το σκοπό αυτό, το βακτήριο

*Salmonella* αφέθηκε να σχηματίσει βιο-υμένιο σε κουπόνια ανοξείδωτου χάλυβα (SS) σε στατικές συνθήκες στους 10 και 20 °C, για 360 και 144 h, αντίστοιχα (**Παράρτημα Α**)

**Β.** η ικανότητα του *Salmonella* Typhimurium να σχηματίζει βιο-υμένιο σε ιστό ρόκας και σε στερεό θερμικά αποστειρωμένο εκχύλισμα ρόκας στους 10 και 20 °C. Η ικανότητα αυτή ελέγχθηκε και με την μελέτη της έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με το σχηματισμό βιο-υμενίων και σχετικών με αυτό ρόλων (**Παράρτημα Β**).

**Γ.** η έκφραση διαφορετικών γονιδίων *Salmonella* με την χρήση βιοδεικτών σε συνθήκες συγκαλλιέργειας με βακτήρια που απομονώθηκαν από βιομηχανία εμφιάλωσης νερού προσομοιάζοντας τις συνθήκες που επικρατούν στις σωληνώσεις, δεξαμενές και νερό μιας βιομηχανίας τροφίμων πχ. Βιομηχανία παραγωγής φρέσκων έτοιμων φυλλωδών σαλατών (**Παράρτημα Γ**).

## Συζήτηση

Η μελέτη της έκφρασης γονιδίων κυττάρων *Salmonella enterica* που σχετίζονται με το σχηματισμό βιο-υμενίων *in vitro* (**Α**) έδειξε ότι υπάρχουν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σύμφωνα με τον συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό (**Παράρτημα Α**), η θερμοκρασία δεν φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την σχετική έκφραση των γονιδίων, παρόλο που παρατηρήθηκε διαφορά 1 log cfu/cm<sup>2</sup> (**Παράρτημα Α - Εικόνα 1**) στον πληθυσμό των βιο-υμενικών κυττάρων στους 10 και 20 °C. Η επιλογή των 14 αυτών γονιδίων βασίστηκε στην γνώση από προηγούμενη μελέτη για τον ενδεχόμενο ρόλο τους στον σχηματισμό βιο-υμενίου (**Παράρτημα Α - Πίνακας 1**). Ωστόσο, μεταξύ των βιο-υμενικών και των πλαγκτονικών κυττάρων, 10 (*ribB*, *sseA*, *mipA*, *adrA*, *dppA*, *ssb*, *crr*, *csxD*, *barA* and *sdiA*) από τα 14 γονίδια αναπάντεχα φάνηκε να υπό εκφράζονται σε συνθήκες βιο-υμενίου (**Παράρτημα Α - Εικόνα 2**). Αυτή η διαφορετικότητα των αποτελεσμάτων με προηγούμενη πρωτεομική μελέτη (Giaouris et al., 2013) μπορεί να εξηγηθεί με τα αποτελέσματα μελετών που δείχνουν ότι η συσχέτιση αποτελεσμάτων μεταγραφής (mRNA) και μετάφρασης (πρωτεΐνες) μπορεί να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα που οφείλονται σε διάφορους παράγοντες όπως διαφορετικούς χρόνους ημι ζωής και μετα μεταγραφικών μηχανισμών (Haider and Pal, 2013). Παράλληλα τα αποτελέσματα αυτά επισημαίνουν, ότι οι βιο-υμενικές κοινότητες εμφανίζουν μεγάλη

ετερογένεια, ακόμα και σε περιπτώσεις σχηματισμού από τον ίδιο μικροοργανισμό σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Stewart and Franklin, 2008). Αξίζει να σημειωθεί ότι τα γονίδια *arcA* και *dps* φάνηκε να εκφράζονται σε μεγαλύτερο βαθμό σε συνθήκες βιο-υμενίου και στις δύο θερμοκρασίες ενώ τα *trxA* και *gmpA* στους 10 και 20 °C αντίστοιχα. Τα γονίδια αυτά *dps*, έχουν συνδεθεί με μεταβολισμό και την κινητικότητα (*arcA*), (Evans et al., 2011), με την προστασία του κυττάρου σε συνθήκες οξειδωτικού στρες (*dps*, *trxA*), πείνι (*dps*) και γλυκόλυση (*gmpA*).

Όσον αφορά στην μελέτη για την ικανότητα του *Salmonella* Typhimurium να σχηματίζει βιο-υμένιο σε ιστό ρόκας και σε στερεό θερμικά αποστειρωμένο εκχύλισμα ρόκας (**Παράρτημα Β**), η ανάπτυξη του παθογόνου φάνηκε να επηρεάζεται από το θερμικά αποστειρωμένο εκχύλισμα ρόκας και τον φυτικό ιστό σε σύγκριση με το εργαστηριακό υπόστρωμα (**Παράρτημα Β – Εικόνα 5**). Επίσης από τον έλεγχο των γονιδίων (**Παράρτημα Β – Πίνακας 2**) που από προηγούμενες μελέτες έχουν συνδεθεί με το σχηματισμό βιο-υμενίου φάνηκε ότι, βιο-υμένιο σχηματίζεται στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα και στον ιστό ενώ η είσοδος και η αποίκιση του παθογόνου γίνεται σε μεγαλύτερο βαθμό από την πλευρά των στοματίων (**Παράρτημα Β - Εικόνες 6 έως 13**). Επιπρόσθετα, τα γονίδια που σχετίζονται με την διαχείριση συνθηκών καταπόνησης φάνηκε να υπέρ εκφράζονται στους 20°C (**Παράρτημα Β - Εικόνες 6 έως 13**). Συγκεκριμένα το γονίδιο *dps* φάνηκε να επηρεάζεται από την θερμοκρασία ανάπτυξης, καθώς παρατηρήθηκε έκφραση κατά την ανάπτυξη σε υγρό εκχύλισμα ρόκας στους 10°C, και όχι 20°C). Έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου παρατηρήθηκε και κατά την ανάπτυξη του σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα και σε φυτικό ιστό. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες για τους οροτύπους *S. Enteritidis* (Giaouris et al. 2013) και *S. Typhimurium* (Hamilton et al. 2009). Επιπρόσθετα, έκφραση του γονιδίου *ddpA* παρατηρήθηκε στις περισσότερες περιπτώσεις, με πτωτική τάση κατά την διάρκεια της επώασης. Αξίζει να σημειωθεί ότι μεγαλύτερα ποσοστά έκφρασης παρατηρήθηκαν όταν ο εμβολιασμός του παθογόνου πραγματοποιήθηκε από την πλευρά των στοματίων. Αντίστοιχα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για το γονίδιο *csxB*. Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου *groH* που σχετίζεται με την αντίσταση σε συνθήκες καταπόνησης, φάνηκε να είναι αρνητικά συνδεδεμένη με την ανάπτυξη στον φυτικό ιστό και να μειώνεται κατά την διάρκεια επώασης στην περίπτωση των στερεών θρεπτικών μέσων. Παράλληλα ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου *sdiA*, η οποία φάνηκε να μειώνεται με την αύξηση του χρόνου επώασης και της

θερμοκρασίας στα στερεά θρεπτικά υποστρώματα. Αντίθετα αρνητική έκφραση του γονιδίου ή μη έκφραση παρατηρήθηκε στην περίπτωση του φυτικού ιστού, δεικνύοντας ότι η έκφραση του *in vitro* ήταν πιο εμφανής. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί σε προηγούμενη μελέτες (Ahmer et al. 2004; Michael et al. 2001). Εξάρτηση της έκφρασης του γονιδίου *sdiA* με την θερμοκρασία επώασης επίσης έχει αναφερθεί (Smith and Ahmer, 2003). Αξίζει να σημειωθεί ότι, έχει αναφερθεί ότι γονίδια που εμπλέκονται στην επικοινωνία των μικροοργανισμών όπως το *sdiA*, φαίνεται να αποτρέπουν την έκφραση παραγόντων παθογένειας μέχρι ο πληθυσμός να αυξηθεί στο επίπεδο όπου η έκφραση αυτών είναι σίγουρη (Michael et al. 2001). Στην συγκεκριμένη μελέτη, η έκφραση του παράγοντα παθογένειας *sspH2* και του *sdiA* έχουν παρόμοια τάση εκτός από την περίπτωση του φυτικού ιστού, όπου η έκφραση του πρώτου ήταν θετική ενώ του δεύτερου αρνητική. Τέλος το γονίδιο *osmY*, του οποίου η επάγεται από σήματα οσμωτικά και φάσης ανάπτυξης (Yim and Villarejo, 1992), φάνηκε να επηρεάζεται από την θερμοκρασία ανάπτυξης. Σε προηγούμενες μελέτες έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου έχει παρατηρηθεί στη περίπτωση βιουμενικών κυττάρων (Giaouris et al. 2013; Hamilton et al., 2009). Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι το βακτήριο *S. Typhimurium*, υφίσταται καταπόνηση κατά την ανάπτυξη του σε θερμικά επεξεργασμένο εκχύλισμα φυτικού ιστού στη χαμηλή θερμοκρασία ανάπτυξης.

Για να επιτευχθεί ο έλεγχος η έκφραση διαφορετικών γονιδίων *Salmonella* με την χρήση βιοδεικτών σε συνθήκες συγκαλλιέργειας προσομοιάζοντας τις συνθήκες που επικρατούν στις σωληνώσεις, δεξαμενές και νερό μιας βιομηχανίας τροφίμων πχ. Βιομηχανία παραγωγής φρέσκων έτοιμων φυλλωδών σαλατών, βακτήρια που απομονώθηκαν από βιομηχανία εμφιάλωσης νερού (**Παράρτημα Γ**). Τα βακτήρια αυτά ταυτοποιήθηκαν με την μέθοδο PCR-DGGE (Παράρτημα Γ – Εικόνα 3) και ανήκαν στα είδη των γενών *Citrobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Bacillus* και *Exiguobacterium*. Αξίζει να σημειωθεί ότι το γένος *Citrobacter*, ανιχνεύτηκε στα τρία βασικά στάδια της γραμμής του δικτύου. Αυτή η παρατήρηση είναι πολύ σημαντική καθώς όταν τα βακτήρια αυτά αφέθηκαν να σχηματίσουν βιο-υμένια, απουσία/παρουσία του παθογόνου *S. Typhimurium* (Παράρτημα Γ – Εικόνα 4), ο πληθυσμός των βιο-υμενικών κυττάρων ήταν υψηλός. Αυτά τα αποτελέσματα είναι συμφωνία με προηγούμενες μελέτες όπου φάνηκε ότι το γένος *Citrobacter* ανταγωνίζεται των πληθυσμό των βιο-υμενικών κυττάρων *E. coli* και *L. monocytogenes* (Pereira et al., 2010, Weiler et al., 2013). Αντίστοιχα, όταν

μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων (Παράρτημα Γ- Πίνακας 1) με την βοήθεια βιοδεικτών *S. Typhimurium* με την βοήθεια μικροσκοπίου φθορισμού παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *csrA* παρουσία του συγκεκριμένου είδους (Παράρτημα Γ- Εικόνα 6). Στην εικόνα 5 (Παράρτημα Γ) απεικονίζεται η επαγωγική έκφραση σε μονο και συγκαλλιέργειες άλλων βιοδεικτών *S. Typhimurium*. Αξίζει να σημειωθεί, ότι ο φθορισμός στην περίπτωση του *csrA* ήταν εντοπισμένος στους πόλους των κυττάρων. Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες *CsrA* (*RsmA*) συμμετέχουν στον έλεγχο πολλών κυτταρικών λειτουργιών και λοιμογόνων παραγόντων, όπως η κινητικότητα, η επικοινωνία μικροοργανισμών, μεταβολισμός του άνθρακα, αλληλεπίδραση με ξενιστή και δημιουργία βιο-υμενίου (Lenz et al., 2005, Heroven et al., 2008, Brencic and Lory, 2009). Η σημαντικότητα της επαγωγής του συγκεκριμένου γονιδίου παρουσία του *Citrobacter* έγκειται στο γεγονός ότι το συγκεκριμένο γονίδιο ελέγχει αλλαγή από βιο-υμενικά κύτταρα *Salmonella* σε κύτταρα με κινητικότητα (Jonas et al., 2010). Έτσι, η επαγωγή του *csrA* επιτρέπει την διασπορά πλανγκτονικών κυττάρων από το βιο-υμένιο, το οποίο μπορεί να οφείλεται στους υψηλούς πληθυσμούς που έχουμε στην περίπτωση της συγκαλλιέργειας των μικροοργανισμών αυτών. Σημαντική πληροφορία θα αποτελούσε η συσχέτιση της επαγωγής του *csrA* παρουσία του γένους *Citrobacter* και της ρυθμιστικής έκφρασης γονιδίων παθογένειας.

Συμπερασματικά, από τα παραπάνω φαίνεται ότι υπάρχει ετερογένεια στις βιο-υμενικές κοινότητες συγκριτικά με τα πλανγκτονικά κύτταρα, ενισχύοντας έτσι την γνώση μας στην συμπεριφορά κυττάρων *Salmonella* κατά την δημιουργία βιο-υμενίων σε αβιοτικές και βιοτικές επιφάνειες. Σημαντική παράλληλα φαίνεται να είναι και η επίδραση στην έκφραση γονιδίων κατά την παρουσία άλλων ειδών μικροοργανισμών στην κοινότητα αυτή. Η τελευταία αυτή παρατήρηση είναι σημαντική καθώς στην φύση απαντώνται μεικτοί πληθυσμοί και όχι πληθυσμοί ενός είδους ή στελέχους. Η καλύτερη αυτή κατανόηση των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα σε ένα βιο-υμένιο με την βοήθεια της μεταγραφομικής, όπως προκύπτει από μελέτες όπως αυτή, είναι απαραίτητη για τον καλύτερο έλεγχο του παθογόνου μικροοργανισμού, με απώτερο στόχο την μείωση της πιθανότητας επιμόλυνσης στην παραγωγική διαδικασία με θετικό αντίκτυπο στην ασφάλεια των τροφίμων.

## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α**

### **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

Ο μικροοργανισμός που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μελέτη είναι η *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ορότυπος Enteritidis φάγος τύπου (PT) 4 στέλεχος P167807, η οποία παραχωρήθηκε από το Τμήμα Βιοϊατρικής και Μοριακές Επιστήμες του Surrey University (Surrey, UK). Το στέλεχος αυτό επιλέχτηκε λόγω της εμπλοκής του σε περιπτώσεις σαλμονέλλωσης του ανθρώπου, που προήλθε κυρίως από την κατανάλωση ωμών προϊόντων αυγών με κέλυφος (Cowden et al., 1989). Πριν από τη χρησιμοποίηση, ο μικροοργανισμός ήταν αποθηκευμένος (στους  $-80^{\circ}\text{C}$ ) σε ειδικά φιαλίδια σφαιριδίων (Τεχνική Υπηρεσία Consultants Ltd, Heywood, Lancashire, Ηνωμένο Βασίλειο) και στην συνέχεια αναζωογονήθηκε με προσθήκη 100 ml Brain Heart Infusion broth (BHI LAB M Διεθνείς Διαγνωστικός Όμιλος Plc, Bury, Lancashire, UK) σε μια κωνική φιάλη και επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 18 h, στον χρόνο αυτό επιτεύχθηκε αργή εκθετική φάση (προκαλλιέργεια). Η καλλιέργεια παρασκευάστηκε με την προσθήκη 10 μl προκαλλιέργειας σε 10 ml BHI και επώαση στους  $37^{\circ}\text{C}$  για 18 ώρες.

### **Η ανάπτυξη βιο-υμενίου πάνω σε αβιοτική επιφάνεια**

Κουπόνια από ανοξείδωτο χάλυβα (SS) ( $50 \times 20 \times 1$  mm, τύπου AISI-304 Χαλυβουργική ΑΕ, Αθήνα, Ελλάδα) ήταν τα αβιοτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του βιο-υμενίου. Τα κουπόνια αρχικά ήταν εμβαπτισμένα σε ακετόνη (διανυκτέρευση), για να αφαιρεθούν τυχόν υπολείμματα της διαδικασίας κατασκευής. Τα κουπόνια εν συνεχεία πλύθηκαν με την χρήση ενός κοινού απορρυπαντικού, ξεπλύθηκαν καλά με νερό βρύσης και μετά με αποσταγμένο νερό και στο τέλος απομακρύνθηκε πλήρως η υγρασία. Με σκοπό την παραγωγή βιο-υμενίου, τα κουπόνια SS τοποθετούνται ατομικά σε 50 ml σωλήνες φυγοκέντρου πολυπροπυλενίου (μήκος, 114,4 χιλιοστά Εξωτερική διάμετρο, 29,1 χιλιοστά Corning Iha, Άμστερνταμ, Ολλανδία) που το καθένα περιέχει 25 ml μέσου ανάπτυξης, κατά τέτοιο τρόπο ώστε το άνω τμήμα κάθε μεταλλικής επιφάνεια (περ. 2 mm) εκτέθηκε στο στον αέρα πάνω από την υγρή επιφάνεια, δεδομένου ότι αυτή η διασύνδεση παρέχει μία επιλεκτικά πλεονεκτική θέση για το σχηματισμό βιο-υμενίου

*Salmonella* (Giaouris and Nychas, 2006). Το μέσο ανάπτυξης που χρησιμοποιείται για την υποστήριξη της ανάπτυξης βιο-υμενίου είναι BHI broth (pH 7,4 0,5% w / v NaCl). Σωλήνες φυγοκέντρου SS με κουπόνια θερμάνθηκαν σε αυτόκλειστο στους 121 ° C για 15 λεπτά. Μετά την αποστείρωση και την ψύξη, τα μέσα αυτά ανάπτυξης εμβολιάστηκαν με *Salmonella*. Τα εμβολιασμένα σωληνάκια στη συνέχεια επωάζονται στους 20 ° C για 6 ημέρες (144 ώρες) και 10°C για 15 ημέρες, υπό στατικές συνθήκες, χωρίς ανανέωση του θρεπτικού μέσου , για να επιτρέπουν την ανάπτυξη βιο-υμενίου στα κουπόνια. Οι συνθήκες επώασης που εφαρμόζονται εδώ ήταν αυτοί που βρέθηκαν να παρέχουν το μέγιστο αριθμό των κυττάρων του βιο-υμενίου, σύμφωνα με τα προηγούμενα αποτελέσματα (Giaouris et al., 2005).

### **Ανάκτηση των πλαγκτονικών κυττάρων**

Την 6<sup>η</sup> για τους 20°C και 15<sup>η</sup> ημέρα για τους 10°C της επώασης, συλλέχθηκε 1 ml καλλιέργειας πλαγκτονικών κυττάρων από τους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης που περιείχαν τα κουπόνια SS. Τα κύτταρα αυτά που βρίσκονταν σε προηγμένη στατική φάση συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση (5000 χ g, 10 λεπτά, στους 4 ° C)

### **Ανάκτηση των βιο-υμενικών κυττάρων από τα κουπόνια**

Την 6<sup>η</sup> για τους 20°C και 15<sup>η</sup> ημέρα για τους 10°C της επώασης των κουπονιών SS, που μεταφέρουν βιο-υμενικά κύτταρα *S. Enteritidis* σε αυτά - απομακρύνθηκαν προσεκτικά από τους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης χρησιμοποιώντας αποστειρωμένη λαβίδα και εν συνεχεία ακολούθησε ξέπλυμα με 10 ml ringer την κάθε πλευρά της μεταλλική επιφάνεια , προκειμένου να απομακρυνθούν τα χαλαρά προσκολλημένα κύτταρα. Μετά

αυτή τη διαδικασία έκπλυσης, τα κουπόνια εισήχθησαν σε νέους αποστειρωμένους πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρωσης που περιέχουν 40 ml διαλύματος ¼ Ringer και 30 αποστειρωμένα γυάλινα σφαιρίδια (διαμέτρου 3 mm). Ο πλαστικός σωλήνας ακολούθως στροβιλίζεται( vortex) επί 2 λεπτά, στη μέγιστη ταχύτητα, για να αποσπάσουμε βιο-υμενικά κύτταρα από τα κουπόνια. Τα κύτταρα στη συνέχεια συλλέγονται με φυγοκέντρωση (5000 χ g, 10 λεπτά, στους 4 ° C) και τοποθετούνται



στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ενώ πρώτα προστίθενται σε αυτά ειδικό διάλυμα συντήρησης RNA later.

### Έλεγχος έκφρασης γονιδίων

#### Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Για την απομόνωση του RNA εφαρμόστηκε η τεχνική που περιγράφεται στο εμπορικό σκεύασμα The PureLink® RNA Kit (Ambion). Συγκεκριμένα, αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (rt). Μετά τη φυγοκέντρηση προστίθενται 100μL του διαλύματος λυσοζύμης και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Έπειτα προστίθενται 0,5μL 10% SDS και ακολουθεί vortex. Τα δείγματα επώάζονται για 5min σε rt. Μετά από την επώαση προστίθενται 350μL Lysis Buffer και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Τέλος, γίνεται καλή ανάδευση του μίγματος με τη χρήση πιπέτας και ακολουθεί φυγοκέντρηση (12.000 g για 2min σε rt). Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο RNA-free eppendorf. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 250μL 100% αιθανόλη και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε στήλες φυγοκέντρου και ακολουθεί φυγοκέντρηση (12.000 g για 15 sec σε rt). Μετά την απομάκρυνση της κινητής φάσης προστίθενται 350μL Wash Buffer I, ακολουθεί φυγοκέντρηση (12.000 g για 15sec σε rt) και απομάκρυνση της ροής. Έπειτα προστίθενται σε κάθε δείγμα 80μL 10x μίγμα DNase και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 15min σε rt. Ακολουθεί προσθήκη 350μL Wash Buffer I και φυγοκέντρηση (12.000 g για 15 sec σε rt). Οι στήλες που συγκρατούν τα δείγματα μεταφέρονται σε νέο tube και προστίθενται 500μL Wash Buffer II. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνται (12.000 g για 15 sec σε rt), απομακρύνεται η κινητή φάση και προστίθενται πάλι 500μL Wash Buffer II. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (12.000 g για 15 sec σε rt), απομάκρυνση της κινητής φάσης και τα δείγματα φυγοκεντρώνται (12.000 g για 1 min σε rt). Η στήλη μεταφέρεται σε νέο eppendorf και στα δείγματα προστίθεται 30μl RNase free water και ακολουθεί επώαση για 1 min σε rt. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνται (12.000 g για 2 min) και επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα για άλλη μία φορά. Μικρή ποσότητα δείγματος μετριέται με νανοφωτόμετρο ενώ τα τελικά δείγματα αποθηκεύονται στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

### **Μετατροπή RNA σε cDNA (DNA synthesis)**

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιγράφεται στο σκεύασμα Primescript Reverse Transcriptase (Takara). Συγκεκριμένα, ένα σύνολο 18-20 ng RNA αναμίχθηκε με 10mM dNTP's και 50 pmol Random primer hexamers σε τελικό όγκο 10 μl. Το μίγμα RNA/εκκινητή επωάζεται στους 65°C για 5 min και έπειτα τοποθετείται αμέσως στον πάγο. Κάθε δείγμα αναμίχθηκε με μίγμα 5x Primescript Buffer, RNase inhibitor (20 units), Primescript Reverse Transcriptase (200 units) και RNase free H<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 20μl. Ακολουθεί ανάμειξη και επώαση των δειγμάτων (30°C για 10min, 42°C για 60min και 70°C για 15min). Τα δείγματα cDNA αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση τους.

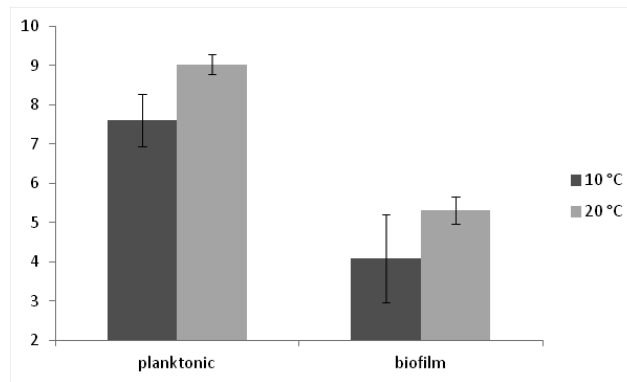
### **Real Time PCR**

Η αντίδραση της Real Time PCR πραγματοποιήθηκε σε 96 well plates με το σύστημα ανίχνευσης StepOnePlus (Applied Biosystems) και με τη χρήση της χρωστικής SYBR GREEN για την ανίχνευση του προϊόντος. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκε SYBR GREEN Master mix, 200nM από κάθε εκκινητή (Πίνακας 1) και το cDNA. Τα στάδια της αντίδρασης ήταν τα ακόλουθα: 3 min στους 95°C και 40 κύκλοι από 95°C για 20 sec, 60°C για 30 sec. Η εξειδίκευση της PCR ελέγχθηκε με τις καμπύλες τήξης (melting curves) οι οποίες προέκυψαν από τη θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C και μετά από την ψύξη τους στους 60°C που ακολουθήθηκε από επαναθέρμανση τους με ρυθμό 0,3°C/min στους 95°C για την ανίχνευση της χρωστικής SYBR GREEN. Τα προφίλ των καμπυλών τήξης αναλύθηκαν με χρήση του λογισμικού StepOne 2.1 (Applied Biosystems).

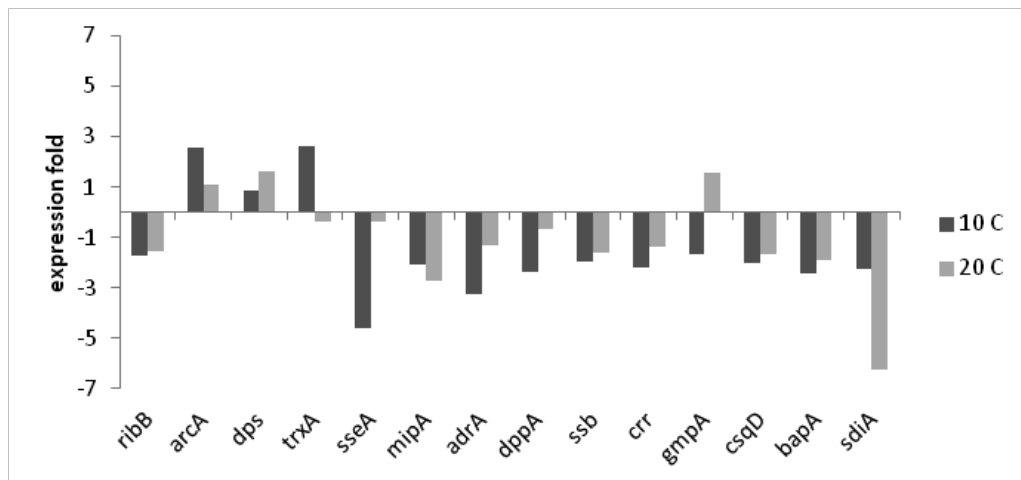
## Πίνακας 1. Αετοουγκικός ρόλος γονιδίων στόχων και εκκλητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση αυτών των γονιδίων

Γονίδιο	Αετοουγκικός ρόλος	Primer sequence F	Primer sequence R	Αναφορά	
<b>RibB</b>	3-4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphophate synthase	GGTGTGATGGTGTGGATGA	GTAGGGCGCTGGTGTGTTTT	Παρούσα μέλετη	
<b>arcA</b>	two-component system, OmpK family, aerobic respiration control protein	AGGGAAAAACGGTCTCCTGT	TACCACAGGTTTCATGGTACGG	Παρούσα μέλετη	
<b>dps</b>	DNA starvation/stationary phase protection protein Dps	ATGCGCGGTGCTAACCTTAT	AAGTGATCCTGCACGGTTATGG	Παρούσα μέλετη	
<b>trxA</b>	thioredoxin 1	CGACAGTTTTTGACACCGGATG	AACACGACAGCAGAGTCCGGAAT	Παρούσα μέλετη	
<b>sseA</b>	thiosulfate/3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	AGATTCCTTGACCGCCCGTATG	GGTGTTATTCCTGGCGAACA	Παρούσα μέλετη	
<b>mipA</b>	outer membrane protein	ACTTCTGGTTCGCGTGGTCTG	CCAGTGAGGTACCGCAGGAAT	Παρούσα μέλετη	
<b>adrA</b>	diguanylate cyclase AdrA	GACGGCCACTGGGAAATTTTA	AAAGCGCCCGATAATATCACT	Παρούσα μέλετη	
<b>dppA</b>	dipeptide transport system	TTGACCGTCTGGTCTTCTCC	GACATCATCCAGCGGTTTTT	Παρούσα μέλετη	
<b>ssb</b>	substrate-binding protein	single-stranded DNA-binding	GCCAGCAGAGGCGCTAAACMA	Παρούσα μέλετη	
<b>ctr</b>	protein	PTS system, glucose-specific	CCCCGATCACACCTTATTGC	Zheng	
<b>gmpA</b>	IIA component	PTS system, glucose-specific	CGGTATGAAGAGCGGTGAGC	Bearson et al 2008	
<b>csgD</b>	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase	GCCTCATATTAACGGCGGTG	GGACTCGGTGCTGTTGTAGC	Meng et al 2013	
<b>bapA</b>	DNA-binding transcriptional regulator CsgD	large cell surface protein required for biofilm formation	ATGCGGCCAACATTCCTCT	TGGATGACTGTGCCCTGCG	Lataasa et al 2005
<b>16s</b>					
<b>rpod</b>		GATCATGGCTCAGATTGAACGGCTGGCGG	CACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTC	Eswarappa et al 2009	
<b>trsG</b>		GTTGACCCCGGGAAGCGGAAA	CAGAACCAGGAGTGTGAGTTGCCG	Quiroz et al 2011	
		GTTAACCCCGCAGAAGAAGCAC	CACATCCGACTTGACAGAGCC	Zheng et al 2011	

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



**Εικόνα 1.** Πληθυσμός (log CFU/ml or cm<sup>2</sup>) πλαγκτονικών και βιο-υμενικών κυττάρων *Salmonella* σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα στους 10 και 20 °C μετά από 360 και 144 h, αντίστοιχα.



**Εικόνα 2.** Σχετικά επίπεδα έκφρασης 14 γονιδίων βιο-υμενικών κυττάρων *Salmonella* σε κουπόνια ανοξειδωτου χάλυβα (SS coupons) στους 10 και 20 °C και μετά από επώαση 360 και 144 h, αντίστοιχα. Τα πλαγκτονικά κύτταρα των αντίστοιχων συνθηκών χρησιμοποιήθηκαν σαν δείγματα αναφοράς, ενώ ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *rrsG*.

## Παράρτημα Β

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### Συνθήκες ανάπτυξης

Το βακτηριακό στέλεχος *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CDC 6516-60 (ATCC 14028) αναπτύχθηκε σε διάφορα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης στους 20°C και στους 10°C. Στον Πίνακα.1 παρουσιάζονται τα διάφορα θρεπτικά μέσα ανάπτυξης που παρασκευάστηκαν και οι αντίστοιχοι κωδικοί αυτών. Η κάθε ανανέωση του στελέχους πραγματοποιήθηκε με προσθήκη 10μL ενεργούς καλλιέργειας αυτού σε 10ml LB Broth.

#### **Πίνακας 1.** Θρεπτικά μέσα ανάπτυξης

Κωδικός	Δείγμα
LB	LB BROTH
R	Εκχύλισμα ρόκας
LBA	LB AGAR
RA	Εκχύλισμα ρόκας με AGAR
Tissue	Φυτικός ιστός
Tissue S	Φυτικός ιστός από την πλευρά των στοματίων

<sup>1</sup>Οι αριθμοί 1 και 2 στα δείγματα αντιστοιχούν στους 20°C ενώ οι αριθμοί 4 και 5 αντιστοιχούν στους 10°C.

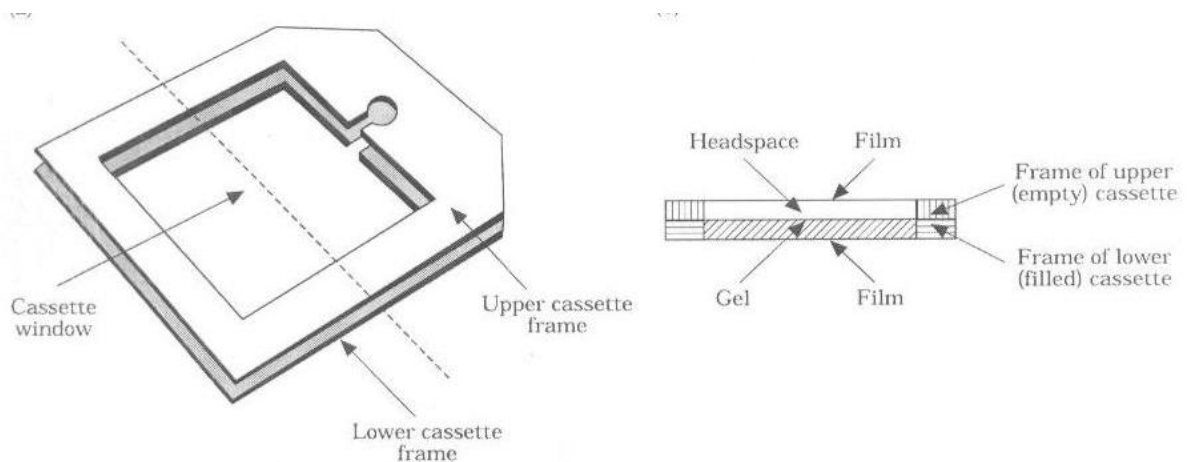
#### Προετοιμασία φυτικού ιστού και θρεπτικού υποστρώματος εκχυλίσματος ρόκας

Η προμήθεια της ρόκας έγινε από συνοικιακό οπωροπωλείο μια ημέρα πριν τη διεξαγωγή του πειράματος. Την ημέρα του πειράματος, ολόκληρη η ποσότητα της ρόκας πλύθηκε με νερό βρύσης και έπειτα αφαιρέθηκε η περίσσεια υγρασίας. Δείγματα ρόκας τοποθετήθηκαν με αποστειρωμένη λαβίδα σε τετράγωνα τρυβλία πλευράς 10 εκατοστών και συντηρήθηκαν στους 4°C μέχρι τον εμβολιασμό τους, ενώ ορισμένα φύλλα ρόκας χρησιμοποιήθηκαν για την καταμέτρηση της αρχικής μικροβιακής χλωρίδας. Η υπόλοιπη ποσότητα χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος εκχυλίσματος ρόκας. Για την παρασκευή του

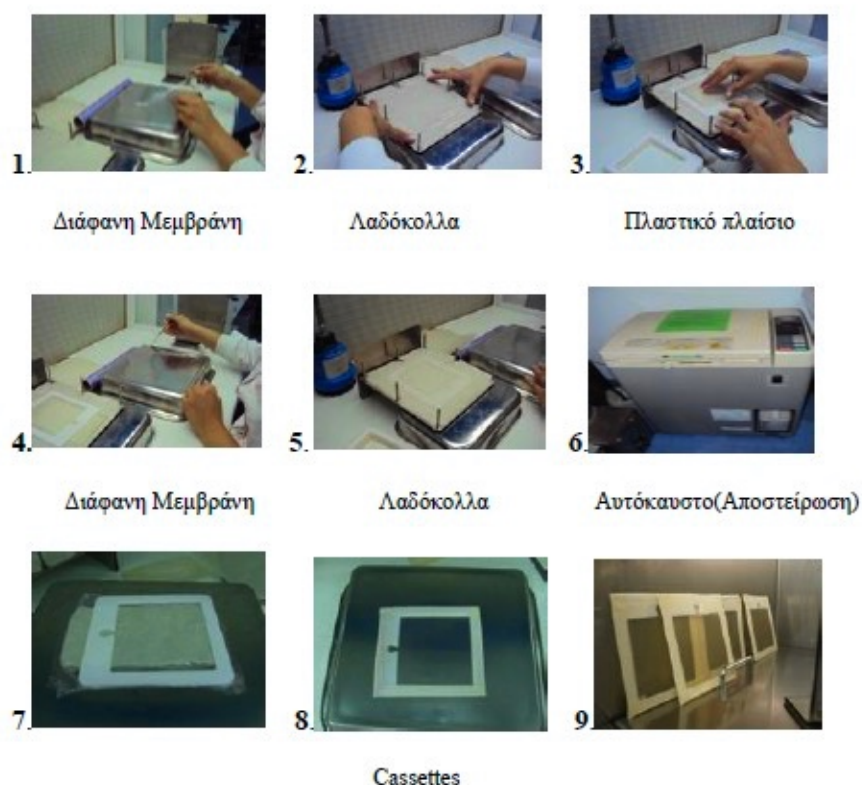
εγκυλίσματος, σε ποτήρι ζέσεως τοποθετήθηκε ψιλοκομμένη η υπόλοιπη ρόκα και προστέθηκε απιονισμένο νερό σε ίση αναλογία. Το διάλυμα παρέμεινε στους 4°C για 4 ώρες και γινόταν πίεση ανά 30 λεπτά. Μετά το πέρας των 4 ωρών, το διάλυμα διηθήθηκε, και ποσότητα 20mL τοποθετήθηκε σε γυάλινες φιάλες (Duran) για την προετοιμασία των δειγμάτων υγρής καλλιέργειας. Αντίστοιχα για την παρασκευή του στερεού εγκυλίσματος προστέθηκε 15g/L άγαρ. Ακολούθησε θερμική αποστείρωση στους 121°C για 15 λεπτά..

### Προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης

Η στερεή μήτρα ανάπτυξης (Gel Cassettes) είναι μία κατασκευή η οποία αποτελείται από ένα πλαστικό πλαίσιο πάχους 2 χιλιοστών (mm) με εξωτερικές διαστάσεις 130 x 145 mm και από ένα «παράθυρο» εσωτερικά του πλαισίου διαστάσεων 100 x 100 mm (εικόνα 1). Για την προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης (εικόνα 2) το πλαίσιο καλύφθηκε με μεμβράνη οικιακής χρήσης και σφραγίστηκε θερμικά με αποστείρωση σε αυτόκαυστο στους 121°C για 15 λεπτά (Brocklehurst et al. 1997).



**Εικόνα 1** Σχέδιο της στερεής μήτρας ανάπτυξης (gel cassettes) για την ανάπτυξη επιφανειακών αποικιών



Εικόνα 2 Προετοιμασία της στερεής μήτρας ανάπτυξης (gel cassettes)

## Εμβολιασμός δειγμάτων

### Gel cassettes

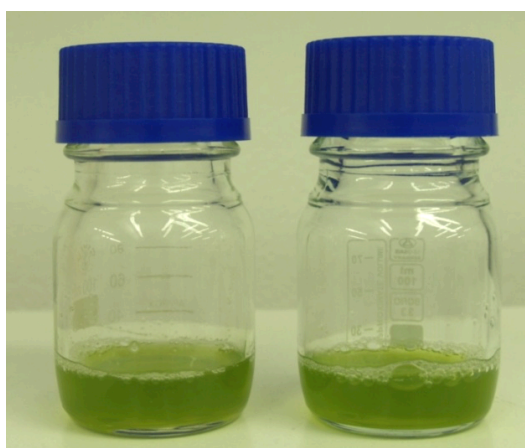
Αρχικά γίνεται η πλήρωση των Gel Cassettes με LB agar και με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ρόκας. Αφήνονται έως ότου στερεοποιηθεί το υλικό και έπειτα εμβολιάζονται με 10-15 κύτταρα ανά τετραγωνικό εκατοστό του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CDC 6516-60. Στη συνέχεια, ακολουθεί εξάπλωση του εμβολίου με πλαστικό κρίκο μιας χρήσης σε όλη την επιφάνεια του υλικού. Τέλος, σφραγίζεται το σημείο εισόδου της πιπέτας εμβολιασμού και του κρίκου εξάπλωσης με χάρτινη ταινία για εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών επώασης. Τα Gel Cassettes τοποθετήθηκαν για επώαση στους 20°C και στους 10°C (εικόνα 3).



**Εικόνα 3** Διαδικασία πλήρωσης της στερεής μήτρας ανάπτυξης

### Υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα LB (LB Broth) και το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα ρόκας τοποθετήθηκαν σε γυάλινες φιάλες (Duran) των 100ml. Το κάθε δείγμα είχε όγκο 20ml. Τα δείγματα αυτά αφού προηγουμένως είχαν αποστειρωθεί εμβολιάστηκαν με πιπέτα με 10-15 κύτταρα ανά ml του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CDC 6516-60.



**Εικόνα 4** Δείγμα υγρού θρεπτικού υποστρώματος ρόκας



## Φυτικός ιστός

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα δείγματα του φυτικού ιστού τοποθετήθηκαν σε τετράγωνα τρυβλία πλευράς 10 εκατοστών με το φυτικό ιστό να καλύπτει όσο το δυνατόν περισσότερο την επιφάνεια του τρυβλίου. Στα μισά δείγματα, τα φύλλα ρόκας στα τρυβλία ήταν τοποθετημένα από την πλευρά των στοματίων. Ο φυτικός ιστός εμβολιάστηκε με 10-15 κύτταρα ανά τετραγωνικό εκατοστό του μικροοργανισμού *Salmonella enterica* serovar Typhimurium CDC 6516-60. Ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε με τοποθέτηση του εμβολίου με πιπέτα πάνω στο φυτικό ιστό και με μετέπειτα εξάπλωση του με πλαστικό κρίκο μιας χρήσης. Παράλληλα με τον εμβολιασμό των δειγμάτων φυτικού ιστού πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία για την καταμέτρηση της αρχικής ολικής μικροβιακής χλωρίδας. Ως εργαστηριακό θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το LB και η επώση των τρυβλίων έγινε στους 30°C και στους 37°C.

## Έλεγχος έκφρασης γονιδίων

### Απομόνωση RNA (RNA extraction)

Για την απομόνωση του RNA εφαρμόστηκε η τεχνική που περιγράφεται στο εμπορικό σκεύασμα The PureLink® RNA Kit (Ambion). Συγκεκριμένα, αρχικά τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (rt). Μετά τη φυγοκέντρηση προστίθενται 100μL του διαλύματος λυσοζύμης και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Έπειτα προστίθενται 0,5μL 10% SDS και ακολουθεί vortex. Τα δείγματα επωάζονται για 5min σε rt. Μετά από την επώαση προστίθενται 350μL Lysis Buffer και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Τέλος, γίνεται καλή ανάδευση του μίγματος με τη χρήση πιπέτας και ακολουθεί φυγοκέντρηση (12.000 g για 2min σε rt). Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο RNA-free eppendorf. Σε κάθε δείγμα προστίθενται 250μL 100% αιθανόλη και ακολουθεί ομογενοποίηση με vortex. Στη συνέχεια τα δείγματα μεταφέρονται σε στήλες φυγοκέντρου και ακολουθεί φυγοκέντρηση (12.000 g για 15 sec σε rt). Μετά την απομάκρυνση της κινητής φάσης προστίθενται 350μL Wash Buffer I, ακολουθεί φυγοκέντρηση (12.000 g για 15sec σε rt) και απομάκρυνση της ροής. Έπειτα προστίθενται σε κάθε δείγμα 80μL 10x μίγμα DNase και ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 15min σε rt. Ακολουθεί προσθήκη 350μL Wash Buffer I και

φυγοκέντρωση (12.000 g για 15 sec σε rt). Οι στήλες που συγκρατούν τα δείγματα μεταφέρονται σε νέο tube και προστίθενται 500μL Wash Buffer II. Στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρώνονται (12.000 g για 15 sec σε rt), απομακρύνεται η κινητή φάση και προστίθενται πάλι 500μL Wash Buffer II. Ακολουθεί φυγοκέντρωση (12.000 g για 15 sec σε rt), απομάκρυνση της κινητής φάσης και τα δείγματα φυγοκεντρώνονται (12.000 g για 1 min σε rt). Η στήλη μεταφέρεται σε νέο erpendorf και στα δείγματα προστίθεται 30μl RNase free water και ακολουθεί επώαση για 1 min σε rt. Έπειτα τα δείγματα φυγοκεντρώνονται (12.000 g για 2 min) και επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα για άλλη μία φορά. Μικρή ποσότητα δείγματος μετρίεται με νανοφωτόμετρο ενώ τα τελικά δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την περαιτέρω χρήση τους.

### **Μετατροπή RNA σε cDNA (DNA synthesis)**

Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε περιγράφεται στο σκεύασμα Primescript Reverse Transcriptase (Takara). Συγκεκριμένα, ένα σύνολο 18-20 ng RNA αναμίχθηκε με 10mM dNTP's και 50 pmol Random primer hexamers σε τελικό όγκο 10 μl. Το μίγμα RNA/εκκινητή επωάζεται στους 65°C για 5 min και έπειτα τοποθετείται αμέσως στον πάγο. Κάθε δείγμα αναμίχθηκε με μίγμα 5x Primescript Buffer, RNase inhibitor (20 units), Primescript Reverse Transcriptase (200 units) και RNase free H<sub>2</sub>O ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 20μl. Ακολουθεί ανάμειξη και επώαση των δειγμάτων (30°C για 10min, 42°C για 60min και 70°C για 15min). Τα δείγματα cDNA αποθηκεύονται στους -20°C μέχρι περαιτέρω χρήση τους.

### **Real Time PCR**

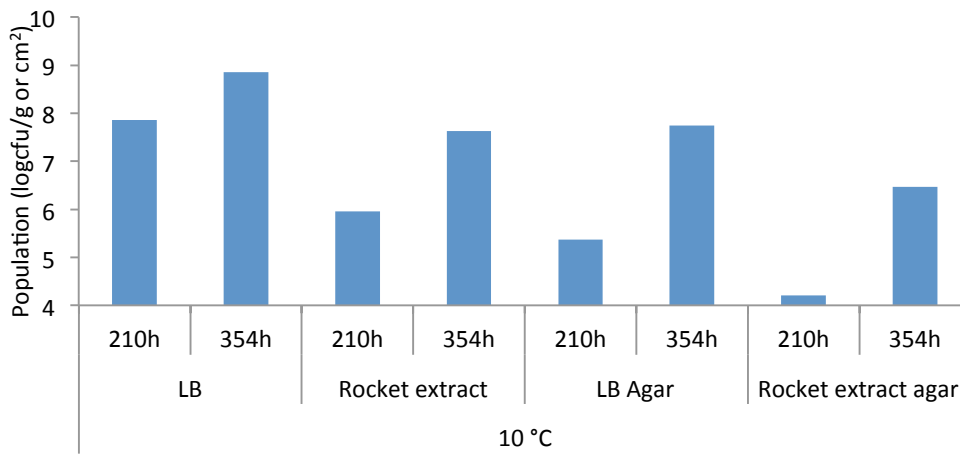
Η αντίδραση της Real Time PCR πραγματοποιήθηκε σε 96 well plates με το σύστημα ανίχνευσης StepOnePlus (Applied Biosystems) και με τη χρήση της χρωστικής SYBR GREEN για την ανίχνευση του προϊόντος. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκε SYBR GREEN Master mix, 200nM από κάθε εκκινητή (Πίνακας 2) και το cDNA. Τα στάδια της αντίδρασης ήταν τα ακόλουθα: 3 min στους 95°C και 40 κύκλοι από 95°C για 20 sec, 60°C για 30 sec. Η εξειδίκευση της PCR ελέγχθηκε με τις καμπύλες τήξης (melting curves) οι οποίες προέκυψαν από τη θέρμανση των δειγμάτων στους 95°C και μετά από την ψύξη τους στους 60°C που ακολουθήθηκε από επαναθέρμανση τους με ρυθμό 0,3°C/min στους 95°C για την ανίχνευση της

χρωστικής SYBR GREEN. Τα προφίλ των καμπυλών τήξης αναλύθηκαν με χρήση του λογισμικού StepOne 2.1 (Applied Biosystems).

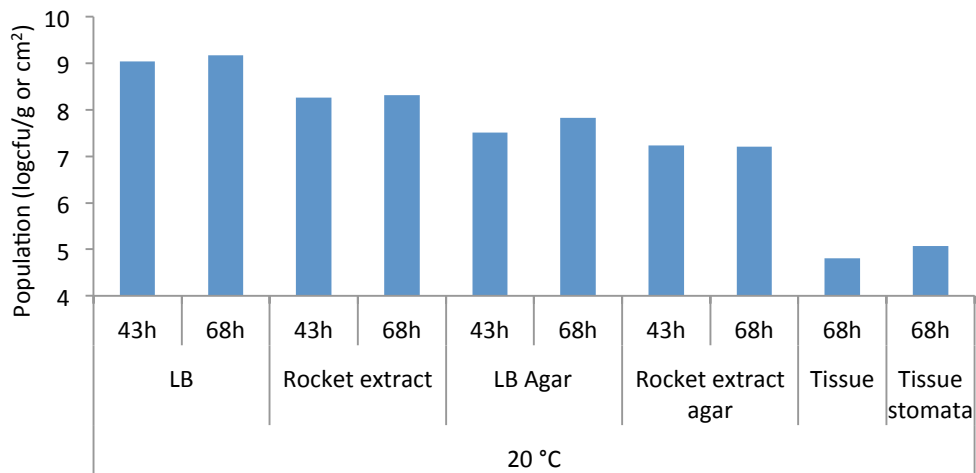
**Πίνακας 2** Γονίδια στόχοι που αναλύθηκαν με την Real-Time PCR και εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν

<b>Γονίδιο</b>	<b>Λειτουργικός ρόλος</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>
Dps	Starvation, stress response	ATGCGCGGTGCTAACTTTAT	AAGTGATCCTGCACGTTATGG
dppA	Membrane transport, adaptation to nutrient deficiency	TTGACCGTCTGGTCTTCTCC	GACATCATCCAGCGGTTTTT
csgB	Attachment	AGTGCCAGAGTACGCCAGGA	ACCGTAAGCGCTTTGCGATA
rpoH	Starvation	CGTTAAAGTTGCAACCACGA	CCATCTCACGCACGTCTTTA
sidA	Involved in cell division control and quorum sensing	ACGCGCAATGTTGTTACGC	ACCCACGCCGGAGGATAAGT
sspH2	Effector protein, induced by SPI-2 ssrA, pathogenicity	GCACAACCTGGCTGAAGATGA	TCGTATTGCCCTTTTTCTGC
osmY	rpoS dependent gene, induced by osmotic stress and growth phase signals	GTCACCCTGAGCGGCTTTGT	CTTCACTGGTCGTGGCCGTA

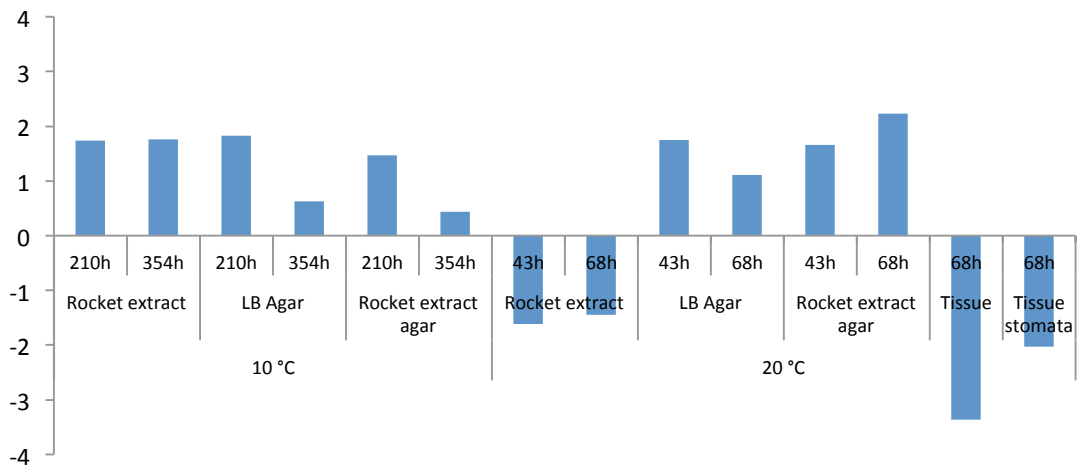
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



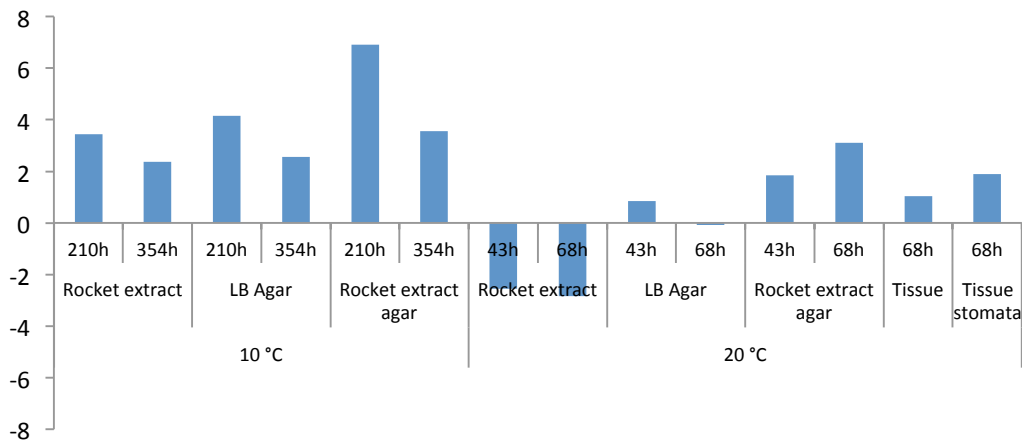
**Εικόνα 5.** Πληθυσμός *Salmonella Typhimurium* κατά την ανάπτυξη σε διάφορα υποστρώματα στους 10 °C.



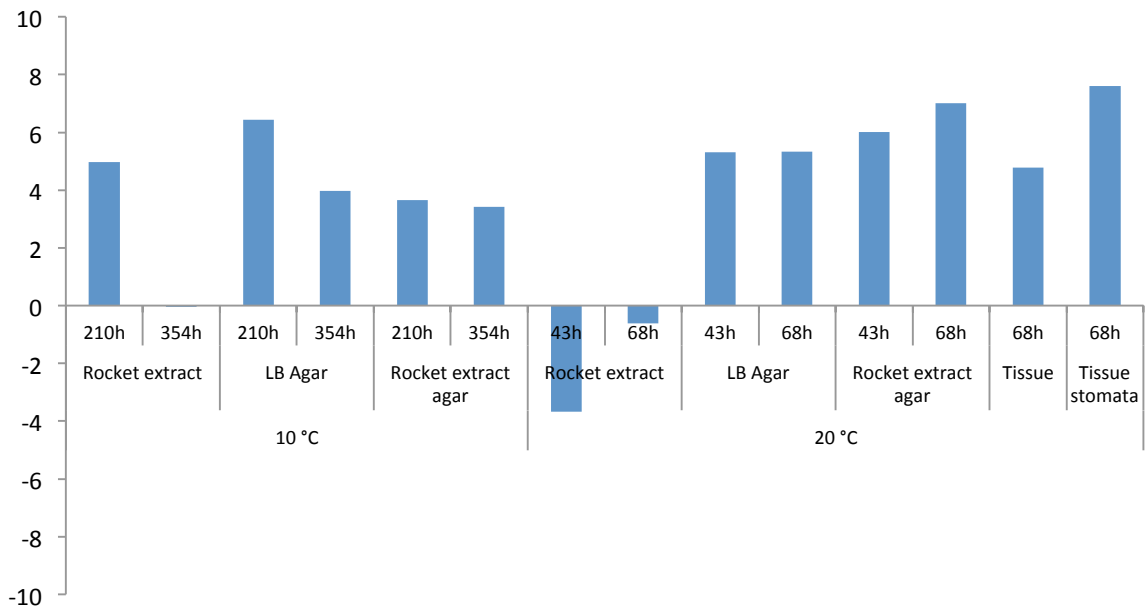
**Εικόνα 6.** Πληθυσμός *Salmonella Typhimurium* κατά την ανάπτυξη σε διάφορα υποστρώματα στους 20 °C.



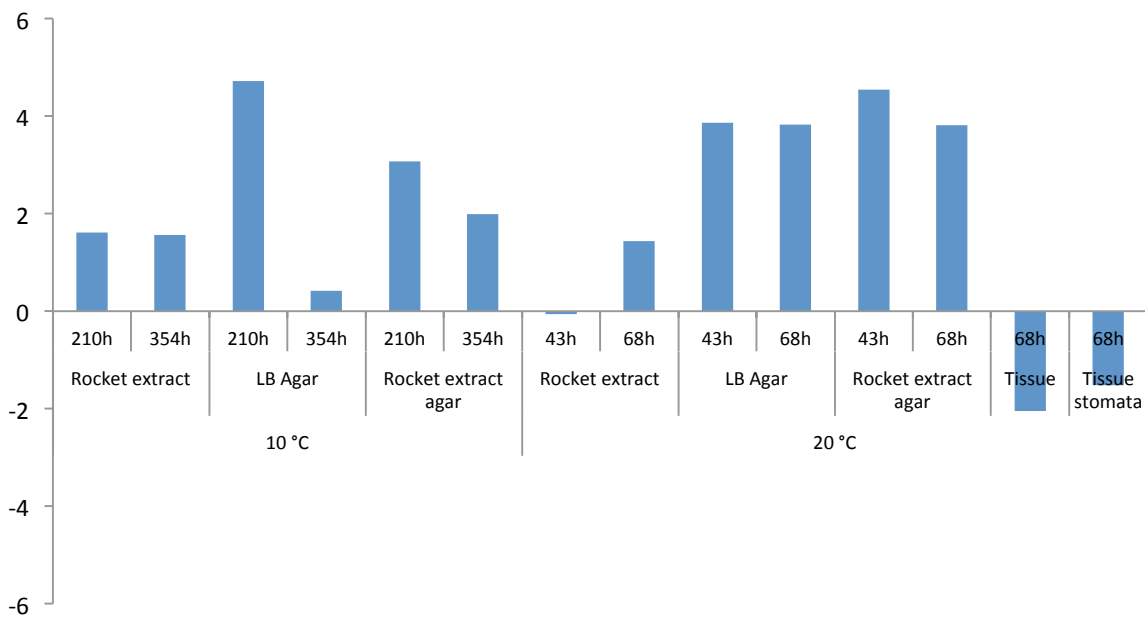
**Εικόνα 7.** Σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *dps* του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium όταν αυτό αναπτύχθηκε σε διάφορα υποστρώματα στους 10 και 20 °C. Το γονίδιο αναφοράς ήταν *rrsG* και δείγματα αναφοράς η καλλιέργεια 210h και 42h σε LB broth στους 10 και 20 °C, αντίστοιχα.



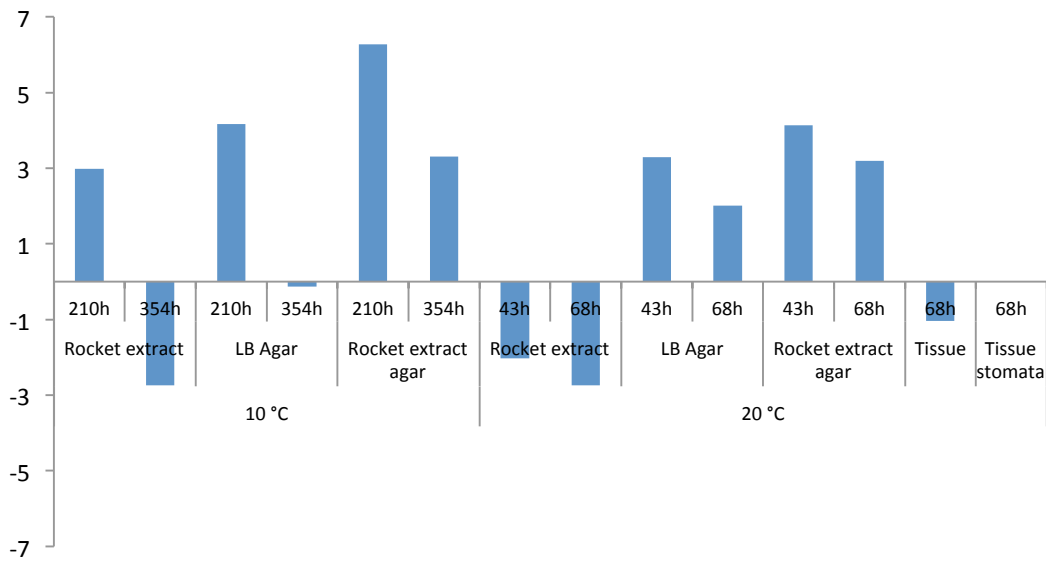
**Εικόνα 8.** Σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *dppA* του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium όταν αυτό αναπτύχθηκε σε διάφορα υποστρώματα στους 10 και 20 °C. Το γονίδιο αναφοράς ήταν *rrsG* και δείγματα αναφοράς η καλλιέργεια 210h και 42h σε LB broth στους 10 και 20 °C, αντίστοιχα.



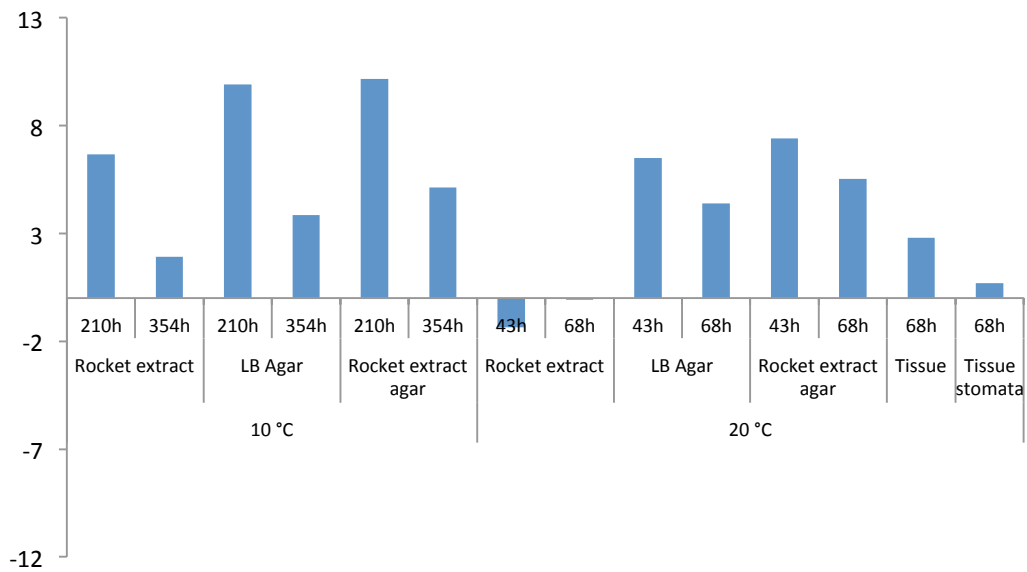
**Εικόνα 9.** Σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *csgB* του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium όταν αυτό αναπτύχθηκε σε διάφορα υποστρώματα στους 10 και 20 °C. Το γονίδιο αναφοράς ήταν *rrsG* και δείγματα αναφοράς η καλλιέργεια 210h και 42h σε LB broth στους 10 και 20 °C, αντίστοιχα.



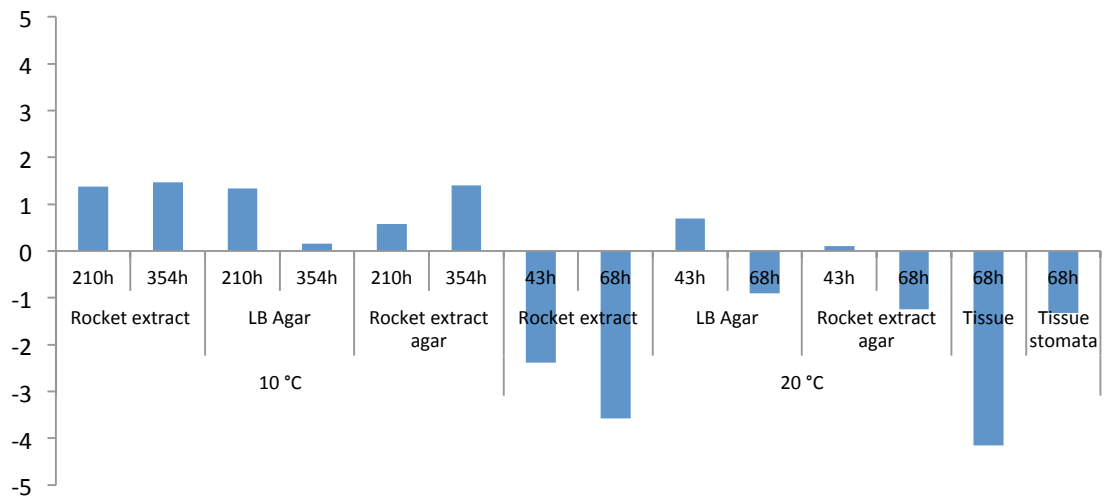
**Εικόνα 10.** Σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *rpoH* του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium όταν αυτό αναπτύχθηκε σε διάφορα υποστρώματα στους 10 και 20 °C. Το γονίδιο αναφοράς ήταν *rrsG* και δείγματα αναφοράς η καλλιέργεια 210h και 42h σε LB broth στους 10 και 20 °C, αντίστοιχα.



**Εικόνα 11.** Σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *sdiA* του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium όταν αυτό αναπτύχθηκε σε διάφορα υποστρώματα στους 10 και 20 °C. Το γονίδιο αναφοράς ήταν *rrsG* και δείγματα αναφοράς η καλλιέργεια 210h και 42h σε LB broth στους 10 και 20 °C, αντίστοιχα.



**Εικόνα 12.** Σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *sspH2* του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium όταν αυτό αναπτύχθηκε σε διάφορα υποστρώματα στους 10 και 20 °C. Το γονίδιο αναφοράς ήταν *rrsG* και δείγματα αναφοράς η καλλιέργεια 210h και 42h σε LB broth στους 10 και 20 °C, αντίστοιχα.



**Εικόνα 13.** Σχετικό επίπεδο έκφρασης του γονιδίου *osmY* του βακτηρίου *Salmonella* Typhimurium όταν αυτό αναπτύχθηκε σε διάφορα υποστρώματα στους 10 και 20 °C. Το γονίδιο αναφοράς ήταν *rrsG* και δείγματα αναφοράς η καλλιέργεια 210h και 42h σε LB broth στους 10 και 20 °C, αντίστοιχα.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ

### ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### Βακτηριακά στελέχη

Για συγκεκριμένο πειραματικό σχεδιασμό χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *S. Typhimurim* strain CDC 6516-60 (ATCC 14028) (FMCC B-415), καθώς και δέκα βιοδείκτες EYFP (Πίνακας 1).

#### Συλλογή δειγμάτων από το εμφιαλωτήριο νερού

Δεκαέξι δείγματα νερού συλλέχθηκαν από εμφιαλωτήριο νερού και συγκεκριμένα από την πηγή, το δίκτυο και το εμφιαλωμένο νερό. Αφού πραγματοποιήθηκε έλεγχος του πληθυσμού των μικροοργανισμών με την μέθοδο του φιλτραρίσματος, τα αναπτυχθέντα βακτήρια απομονώθηκαν και αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

#### Ταυτοποίηση μικροοργανισμών με τη μέθοδο PCR-DGGE

Από τα δεκαέξι δείγματα νερού που συλλέχθηκαν, απομονώθηκε το ολικό DNA και ακολούθησε ενίσχυση της περιοχής V6-V8 του 16s rRNA (Ercolini et al, 2006). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ταυτοποίηση των διαφορετικών ειδών με την μέθοδο PCR-DGGE (Ercolini et al, 2006) και αλληλούχιση του γονιδίου.

Πίνακας 1 : Στελέχη <i>Salmonella</i> Typhimurium strains			
FMCC Κωδικός <sup>1</sup>	Περιγραφή	Αετοσυγία γονιδίου	Βιβλιογραφία
B-415	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium CDC 6516-60 (ATCC 14028), parent strain		
B-416	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium 4/74, marker - GFP reporter <sup>2</sup>		
B-417	CDC 6516-60, clpV - EYFP reporter <sup>3</sup>	type VI secretion system (T6SS) encoded in <i>Salmonella</i> pathogenicity island 6 and 19 (SPI-19), (SPI-6)	Pezoa et al. 2013
B-418	CDC 6516-60, csqB - EYFP reporter <sup>3</sup>	Nucleator in the assembly of curli (coiled surface structures) on the cell surface	Steenackers et al. 2012
B-419	CDC 6516-60, rpoH - EYFP reporter <sup>3</sup>	heat shock regulatory gene	Ban et al. 2015
B-420	CDC 6516-60, osmC - EYFP reporter <sup>3</sup>	defense against oxidative stress	Rosenkrantz et al. 2013
B-421	CDC 6516-60, csrA - EYFP reporter <sup>3</sup>	general regulator: motility, biofilm formation, virulence	Steenackers et al. 2012
B-422	CDC 6516-60, prgH - EYFP reporter <sup>3</sup>	SPI-1 secretion apparatus protein (invasion)	Klein et al. 2000
B-423	CDC 6516-60, sspH2 - EYFP reporter <sup>3</sup>	virulence factor	Bhavsar et al. 2013
B-424	CDC 6516-60, flhC - EYFP reporter <sup>3</sup>	motility regulator	Bogomolnaya et al. 2014
B-425	CDC 6516-60, sraA - EYFP reporter <sup>3</sup>	SPI-2 regulator	Tomljenovic-Berube et al. 2010

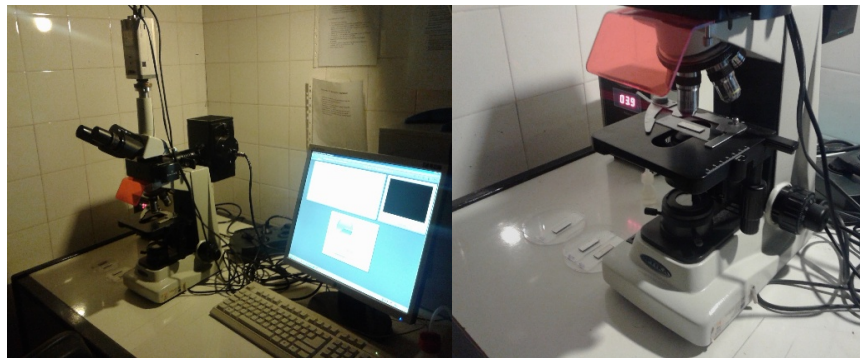
<sup>1</sup>Laboratory of Food Microbiology and Biotechnology of Foods Culture collection <sup>2</sup>Growth on LB supplemented with 40µg/mL kanamycin <sup>3</sup>Growth on LB supplemented with 100µg/mL ampicillin

## Εμβολιασμός ανοξειδωτου χάλυβα και δημιουργία βιο-υμενίου

Μονοκαλλιέργειες και συγκαλλιέργειες του παθογόνου Salmonel δείγματα που απομονώθηκαν από το εμφιαλωτήριο νερού αφέθηκαν να σχη βιο-υμένιο για 6 μέρες στους 20 °C. Ανανέωση του θρεπτικού μέσου λάμβ ανά δύο μέρες.

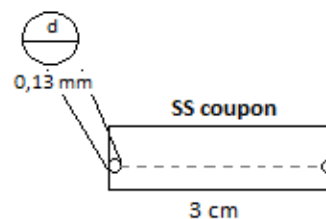
## Μελέτη της έκφρασης γονιδίων με μικροσκόπιο φθορισμού

Το ώριμο βιο-υμένιο (6 μέρες επώαση) εκπλύθηκε εις διπλούν με 5l για την απομάκρυνση πλαγκτονικών και ελαφρώς προσκολλημένων κυττάρω αφού τα κουπόνια τοποθετήθηκαν σε καλυπτρίδα, παρατηρήθηκαν με το μικ φθορισμού (N-400 FL Epi-fluorescence microscope) ( Εικόνα 1).



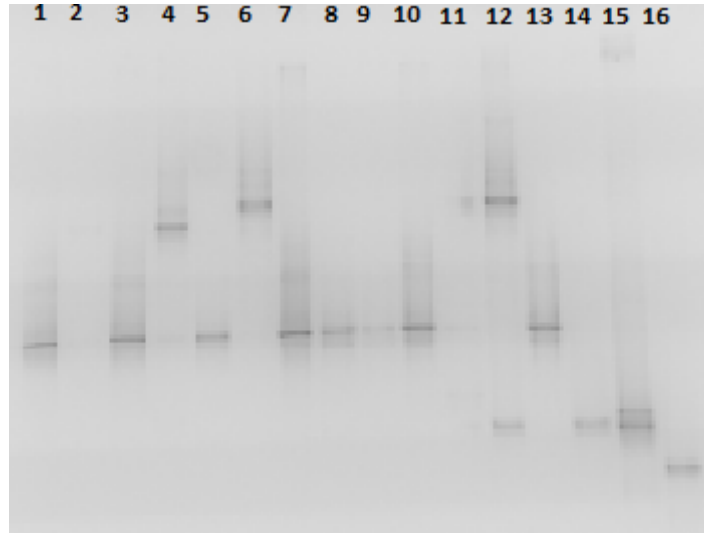
**Εικόνα 1.** N-400 FL Epi-fluorescence microscope.

Η παρατήρηση του κάθε δείγματος έγινε από την αριστερή ή δεξιά κουπονιού μέχρι την δεξιά καλύπτοντας μια 30 mm (Εικόνα 2). Η έκφ γονιδίων υπολογίστηκε από την παρουσία ή απουσία φθοριζόντων κυττα θετικά δείγματα φωτογραφήθηκαν με το λογισμικό Pinnacle Studio.

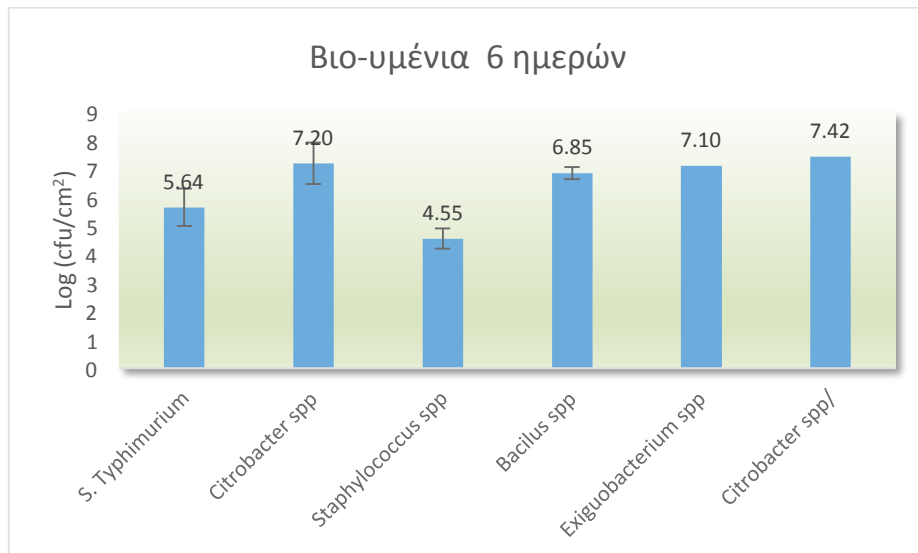


**Εικόνα 2:** επιφάνεια παρατήρησης κουπονιού ανοξειδωτου χάλυβα

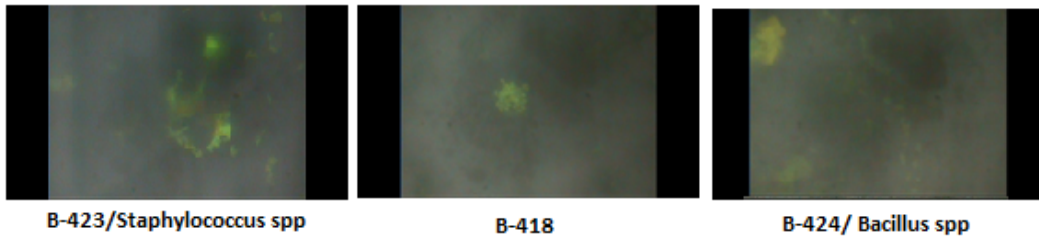
## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



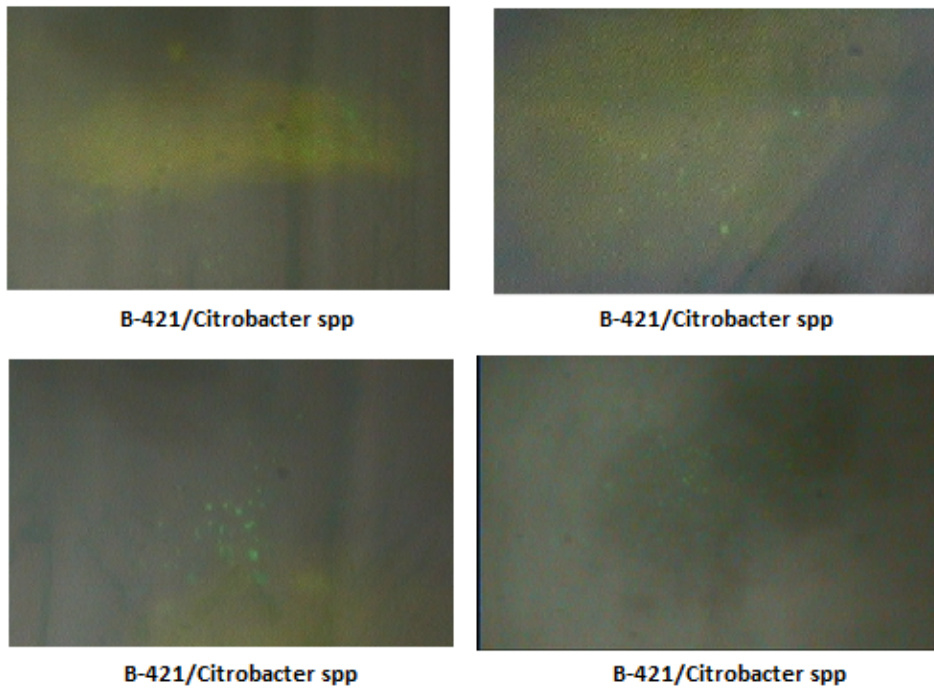
**Εικόνα 3:** Μοριακό αποτύπωμα που πρόκυψε με την μέθοδο PCR DGEE για τα 16 δείγματα που συλλέχθηκαν από το εμφιαλωτήριο νερού



**Εικόνα 4:** Πυκνότητα βακτηρίων που ανιχνεύθηκαν στη γραμμή εμφιάλωσης σε βιο-υμένια 6 ημερών υπό συνθήκες μονοκαλλιέργειας.



**Εικόνα 5:** Έκφραση EYFP μαρτύρων σε βιο-υμένα *S. Typhimurium* μονοκαλλιέργειας και συγκαλλιέργειας



**Εικόνα 6:** Έκφραση *csfA* EYFP μάρτυρα σε βιο-υμένα *S. Typhimurium* & *Citrobacter* spp