

# Utilizarea germenilor de interes pentru obținerea de biofilme mono și polimicrobiene; studiul dinamicii populaționale

efectuat în cadrul proiectului *Abordarea bioeconomică a  
agenților antimicrobieni – utilizare și rezistență*  
(cod - PN-III-P1-1.2-PCCDI-2017-0361).

Colectiv de redacție:

Coordonatori: Prof. dr. Carmen Panaitescu, Prof. dr. Gabriela Tănăsie

Membri: Asist. univ. dr. Csilla Zambori, Doctorand Brigitta Kis, Biolog Simona Anghel

Data finalizării: 15.11.2019

## **Acknowledgements**

Activities under this work were carried out in the *Research Laboratory Complex "Horia Cernescu"* - financed by project *"A bio-economical approach of the antimicrobial agents - use and resistance"*, in the frame of contract PCCDI 7/19.03.2018, code: PN-III P1-1.2-FPRD-2017.

## 1. Introducere

În mediul înconjurător bacteriile se găsesc în două stări: în stare de plutire (planctonice) sau atașate (sesile). Bacteriile aflate în starea de plutire se răspândesc și proliferază rapid, în diferite medii, pe când cele sesile (atașate) se răspândesc mai greu și contribuie la persistența populației bacteriene, respectiv a formării biofilmului. Colonizarea și formarea biofilmelor se realizează pe suprafețe biotice cum ar fi: suprafețele unor plante, țesuturi animale, și pe suprafețe abiotice precum metalele și mineralele, dar și pe suprafața majorității implanturilor medicale. Biofilmele au capacitatea de a coloniza diverse țesuturi ale organismului uman și animal, precum dinții, gingiile, plămânii, urechile, tractul urogenital, rănilor cât și suprafețe artificiale precum cateterelor intravenoase (Davey, M. E., & O'Toole, G. A., 2000). Capacitatea biofilmelor de a coloniza numeroase suprafețe ale organismului gazdă are implicații clinice importante atât la om cât și în medicina veterinară. Biofilmele se atașează și se formează la nivelul acestor suprafețe unde se grupează sub forma unor comunități microbiene care, la rândul lor, sunt capabile să interacționeze între ele prin sisteme de comunicare intracelulare care stau la baza capacității acestora de a se adapta la condiții de mediu aflate într-o permanentă schimbare (Blenkinsopp S.A. et al., 1991).

Creșterea biofilmelor începe odată cu atașarea bacteriilor la suprafețele unde există condiții favorabile pentru multiplicare și dezvoltare. Atașarea bacteriilor la o anumită suprafață este influențată de o serie de factori de mediu precum: temperatura, pH-ul, hidrodinamica, disponibilitatea nutritivă a suprafeței, dar și de factorii genetici care stau la baza funcțiilor motorii, de sensibilitatea față de factorii de mediu, de prezența adevizinelor și a altor substanțe de natură proteică, rugozitatea suprafeței, caracteristicile hidrofobe și electro- chimice ale acesteia (Brading, M.G et al., 1995). Acțiunea simultană a acestor factori influențează dezvoltarea biofilmului însă dezvoltarea sa este condiționată în cea mai mare parte de specia participantă. Anumite caracteristici sunt comune tuturor speciilor studiate până în prezent.

După atașarea inițială a microorganismelor la substrat, numărul celulelor bacteriene de la nivelul suprafeței crește și se creează condiții favorabile pentru maturare, cu formarea de microcolonii, atașarea ireversibilă și detașarea. În tot acest timp, la nivelul celulelor bacteriene, au loc o serie de modificări care permit conturarea arhitecturii biofilmului matur. Cea mai importantă modificare este cea a formării matricei polimerice extracelulare care va susține întregul complex. Odată cu maturarea biofilmului, celulele bacteriene se pot răspândi și la nivelul zonelor neinfectate sau anumite celule își vor recăpăta calitățile planctonice devenind astfel sursa de infecție pentru structuri similare de pe suprafețe noi.

Biofilmele sunt responsabile de producerea numeroaselor infecții, ele se dezvoltă în interiorul unei matrice extracelulare care poate fi compusă din polizaharide, proteine, ADN sau ARN, lipide produse atât de gazda umană, cât și de microorganisme. Prezența

## Utilizarea germenilor de interes pentru obținerea de biofilme mono și polimicrobiene

biofilmelor bacteriene a fost demonstrată pe numeroase dispozitive medicale cum ar fi: valve cardiace, catetere intravenoase și urinare, proteze articulare, lentile de contact, de asemenea ele apar și în plăgi, placă dentară. Microorganismele cele mai importante care formează astfel de biofilme sunt: stafilococii coagulazo-negativi, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter spp*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* precum și *Candida spp*. S-a demonstrat că peste 70% din infecțiile nosocomiale sunt cauzate de biofilme. Bacteriile care cresc în interiorul unui biofilm sunt foarte rezistente la antibiotice. Antibioterapia standard adesea este inutilă, în acest caz singura soluție este îndepărtarea dispozitivului contaminat. Pentru observarea formării biofilmelor mono- și polimicrobiene s-a utilizat tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Escherichia coli*.

În studiile recente s-a demonstrat că cele mai multe biofilme care duc la infecții cronice sunt polimicrobiene. Deși sunt recunoscute din ce în ce mai important această temă, există foarte puține studii asupra proprietăților biofilmelor polimicrobiene. Dinamica biofilmelor polimicrobiene este mai variabilă în comparație cu biofilmele monomicrobiene din cauza interacțiunilor diferitelor specii. Fiziologia celulelor microbiene din biofilm este modificată frecvent prin aceste interacțiuni și duce la obținerea de anumite avantaje, precum rezistența la antibiotice sau la sistemul imunitar. Diferite abordări trebuie să fie combinate în cercetarea pe biofilme pentru o mai bună înțelegere a acestor comunități complexe (Jauffred, L., et al., 2017). Comportamentele biologice ale diferitelor celule bacteriene din biofilmele polimicrobiene ne oferă implicații clinice importante pentru combaterea infecțiilor cu biofilm. Reproductibilitatea este un blocaj actual în cercetarea biofilmului. Pentru experimentele cu biofilm trebuie elaborat un set de protocoale standard. Aparatură robotice noi ar trebui dezvoltate pentru cercetarea biofilmului, ceea ce poate minimiza în continuare variațiile experimentale.

*S. aureus* se poate multiplica la nivelul tegumentelor și mucoaselor (în special în zonele piloase și la nivelul vestibulului nazal). Există o serie de factori care determină/influențează starea de purtător pentru *S. aureus*. O parte dintre acești factori sunt legați de apărarea la nivel de gazdă, o parte sunt corelați cu anumite proprietăți ale bacteriei. Dintre acestea, menționăm formarea de biofilm, care pare să faciliteze nu numai creșterea supraviețuirii bacteriilor în tratament cu antibiotic, dar și evitarea mecanismelor de apărare specifice gazdei, care pot fi de tip peptide antimicrobiene precum: lizozimul, lactoferina, SLPI (secretory leukoprotease inhibitor), catelicidine, alfa și beta defensine, inclusiv beta defensina umană 3 (HBD-3), cea mai eficientă dintre beta defensine în ceea ce privește rolul în infecțiile cu *S. Aureus* (Amorena B. et al., 1999). Deoarece unele studii arată că circa 20% dintre persoanele sănătoase sunt purtătoare în mod permanent de *S. aureus*, s-a ajuns la faptul că există un anumit grad de influență genetică privind starea de purtător de *S. aureus*.

Studiul de față urmărește stabilirea capacității de formare „*in vitro*”, a biofilmului tulpinilor planctonice *Staphylococcus* și *E.coli* izolate din probele biologice. Stafilococii sunt rezistenți față de agenții din mediul extern. În culturi ca bulionul sau geloza, rezistă la temperatura frigidului câteva luni, în puroi uscat pot supraviețui 2-3 luni. Sunt relativ rezistenți la

## Utilizarea germenilor de interes pentru obținerea de biofilme mono și polimicrobiene

anumite antiseptice și dezinfectante (de exemplu, rezistă peste 30 minute la alcool 70°și peste 10 minute în fenol 2%). Sunt distruși în 60 minute la o temperatură de 60°C.

*Escherichia coli* se dezvoltă bine pe medii simple de cultură, pe geloză se pot dezvolta colonii de tip S, lactoză pozitive, convexe, umede, cu suprafață lucioasă, margini netede, ușor emulsionabile în soluție salină fiziologică sau colonii de tip R, uscate, cu marginile crenelate, care se emulsionează greu și neuniform în soluție salină fiziologică; există forme intermediare între coloniile S și R, după cum există și colonii mucoide de tip M. Germenii supraviețuiesc în mediul extern (sol, apă) luni de zile. *E. coli* este distrus prin expunere la 60°C în 30 minute. Este sensibil la acțiunea antisepticelor și dezinfectantelor uzuale (Hung, C. et. al., 2013).

Aceste bacterii au tropism pentru epiteliile (piele și mucoase), însă datorită echipamentului agresiv, de care dispun, reprezentat de enzime, toxine și alți factori de patogenitate, pot invada orice țesut sau organ, provocând o serie de boli sistemice cu evoluție gravă. Cercetările care fac obiectul acestui raport au avut ca obiectiv principal identificarea tulpinilor de stafilococi și *E.coli* care formează cel mai mare biofilm izolate din probele biologice umane în vederea prevenirii și combaterii rezistenței multiple a acestor microorganisme la antibioterapie.

## 2. Materiale si metode

În prezent, cercetarea biofilmului s-a orientat asupra studiului acestuia prin metode non-distructive tridimensionale. Astfel, biofilmele sunt crescute pe fundul sau pe pereții plăcii de microtitrare, prevăzută cu 96 de godeuri. Metodele de creștere în plăci de microtitrare sunt metode închise, tip Batch, în care nu există curgere în interiorul său exteriorul reactorului în timpul experimentelor. În acest sens, mediul de la nivelul godeurilor se poate schimba (scade sursa de nutrienți, crește numărul moleculelor chemotactice) frecvent. Utilizarea acestor metode are o multitudine de avantaje: sunt ieftine, iar pentru efectuarea experimentelor sunt necesare cantități reduse de reagenți, asigură posibilitatea efectuării mai multor teste simultan, fiind astfel sisteme ideale pentru a fi utilizate în scop de screening.

Metodele de creștere în plăci de microtitrare sunt utilizate pentru a putea diferenția biofilmul format de către tulpinile mutante de cele sălbatice și pentru a pune în evidență efectele antimicrobiene, respectiv antibiofilm, a antibioticelor, dezinfectantelor, substanțelor chimice precum și a unor extracte din plante.

În al doilea rând, se pot pune în evidență modificările care se produc în urma atașării la nivelul diferitelor materiale, în diferite stadii ale dezvoltării biofilmelor.

În al treilea rând, aceste sisteme permit cercetătorilor să varieze anumiți parametri precum: mediul de creștere, temperatura de incubare, umiditatea, prezența sau absența unor factori de stres, a oxigenului, dioxidului de carbon.

## Utilizarea germenilor de interes pentru obținerea de biofilme mono și polimicrobiene

Pentru prima dată, aceasta metodă de creștere în plăci de microtitrare, a fost folosită în anul 1986, de către McEldowney și Flecher, pentru a observa acțiunea și efectul mai multor factori asupra procesului de formare al biofilmului (McEldowney, et.al. 1986).

În anul 1998, George O'Toole și Kolter (O'Toole, G.A., Kolter, R., 1998) au adaptat această tehnică, în vederea screeningului genetic, pentru a identifica anumite gene care au rol în formarea biofilmului la *Pseudomonas fluorescens*. Această metodă, cunoscută sub numele de "tehnica lui O'Toole și Kolter", a devenit una dintre cele mai cunoscute metode în screeningul tulpinilor mutante și studiul biofilmului. În prima fază, suspensia bacteriană este plasată la nivelul godeului plăcii de microtitrare și incubată pentru o perioadă de timp adecvată. În perioada incubării anumite bacterii adera la nivelul godeului (se formează biofilmul) iar altele rămân în suspensie (planctonice). După incubare în fiecare godeu se adaugă o cantitate mică de cristal violet pentru a colora atât biofilmul cât și bacteriile planctonice. Bacteriile planctonice se înlătură odată cu excesul de cristal violet iar microorganismele de la nivelul biofilmului rămân atașate. Intensitatea colorării cu cristal violet se corelează cu cantitatea de microorganisme atașate din biofilm.

Prin utilizarea cititoarelor din poliester, pentru plăcile de microtitrare, se pot obține date numerice cu privire la formarea biofilmului. Pentru a evita anumite probleme, legate de deshidratarea culturii, se recomandă ca unele godeuri să fie umplute cu apă sterilă, pentru menținerea umidității optime, iar placa să fie sigilată și acoperită cu un parafilm. De-a lungul timpului această tehnică a suferit o serie de modificări, inclusiv prin intervenția unor factori de agitare (forțele de frecare) sau s-a încercat adăugarea anumitor substanțe la nivelul godeurilor, care au fost folosite drept substaturi de colonizare (Chandra, J. et. al., 2001).

Cuantificarea formării „in vitro” a biofilmului a tulpinilor bacteriene planctonice din genurile *Staphylococcus* și *E.coli* s-a realizat folosind plăcile de microtitrare după tehnica descrisă de descrisă de Djordjevic și colab. (Hajek, V., 1976).

Pentru experimentele efectuate au fost pregătite materialele, instrumentele și echipamentele necesare. Sterilizarea s-a efectuat corespunzător în autoclave, în spații bine precizate și dotate corespunzător, urmată de dezinfecția suprafețelor de lucru, a mâinilor. Probele de material patologic au fost prelevate de la mai mulți pacienți, apoi au fost prelucrate din punct de vedere bacteriologic, în conformitate cu metodologia de izolare și tipizare a stafilococilor și *E.coli* (vezi raportul 2.2.1.). Ulterior au fost pregătite mediile de cultură necesare pentru creșterea tulpinilor izolate și identificate de *Staphylococcus spp.* și *E. coli* (mediu solid: agar cu sânge, bulion BHI). Au fost prelucrate 10 tulpini de *Staphylococcus aureus* și 11 tulpini de *E. coli* recoltate din probe biologice umane diferite.

S-a lucrat după un protocol standard de lucru, care a fost împărțit în felul următor:

- creșterea biofilmelor monomicrobiene;
- creșterea biofilmelor polimicrobiene;

Ultima etapă a constat în determinarea grosimii biofilmului format cu ajutorul spectrofotometrului și calcularea mediei densității optice.

### 3. Formarea biofilmelor monomicrobiene

#### ZIUA 1:

Tulpinile bacteriene din culturile stoc de *Staphylococcus* și *E. coli* au fost însămânțate pe agar cu sânge turnat în plăci Petri și s-au incubat la 37°C, timp de 24 de ore.

#### ZIUA 2:

După cele 24 de ore au fost preparate suspensiile bacteriene cu *Staphylococcus aureus* și separat *Escherichia coli* în soluție salină izotonă (NaCl 0,9%) cu densitatea de 0,5 pe scala McFarland.

Aceste suspensii s-au diluat în proporție de 1:30 în bulion cord creier (bulion BHI, Oxoid), s-a adăugat 0,30 ml soluție salină izotonă. Suspensia obținută s-a vortexat bine pentru omogenizare.

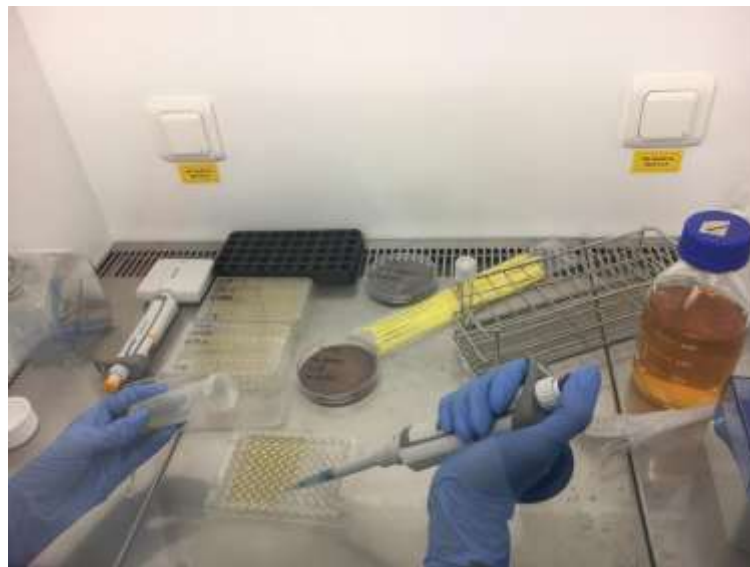


Fig. 1. Însămânțarea godeurilor plăcii de microtitrare cu bacteria patogenă (original)

Din fiecare cultură diluată s-a luat un volum de 150  $\mu$ l și s-a însămânțat în placa de microtitrare cu 96 de godeuri (8 godeuri pentru fiecare tulpină, în duplicat). Primul rând al plăcii a fost lasat gol iar în ultimele godeuri au fost adăugate doar bulionul cord creier, fără suspensia bacteriană, acestea fiind folosite ca martor (Figura 1).

#### ZIUA 5:

## Utilizarea germenilor de interes pentru obținerea de biofilme mono și polimicrobiene

După 72 de ore de incubare s-a îndepărtat bulionul cu ajutorul unei pipete multicanal și s-a spălat de două ori fiecare godeu cu 160  $\mu$ l ser fiziologic steril, pentru a îndepărta celulele planctonice.

Următoarea etapă a constat în colorarea biofilmului cu soluție cristal violet 1%, 160  $\mu$ l timp de 10 minute (Figura 2) apoi s-a spălat de două ori cu ser fiziologic pentru îndepărtarea colorantului. Cu cât absorbția colorantului a fost mai mare, cu atât biofilmul format a fost mai dens.

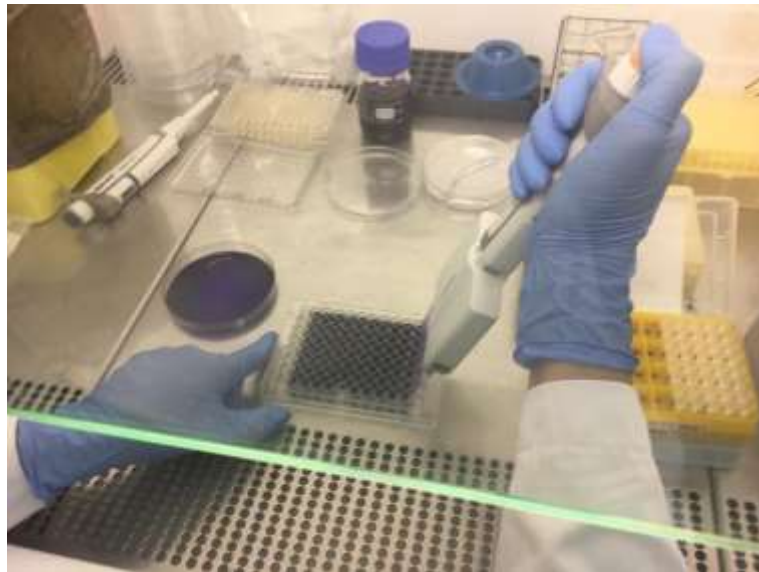


Fig. 2. Colorarea biofilmului cu cristal violet (CV), soluție 1% (original)

A urmat apoi etapa decolorării cu 160  $\mu$ l etanol 96% timp de 30 de minute.

După această etapă a fost măsurată densitatea optică a biofilmului format la nivelul fiecărui godeu, la lungimea de undă de 540 nm, cu ajutorul unui cititor ELISA și s-a stabilit care din tulpinile analizate formează cel mai dens biofilm.

### **ZIUA 6:**

S-a determinat numărul de bacterii aderate în biofilm (Figura 3). Pentru îndepărtarea biofilmului aderat s-a răzuit fiecare godeu cu un tampon steril care a fost ulterior diluat în 9 ml PBS.

A urmat vortexarea timp de 1 minut pentru dezagregarea biofilmului și efectuarea de diluții seriale prin însămânțarea microorganismelor pe agar cu sânge. Plăcile însămânțate au fost incubate timp de 24h la 37°C.

$$\text{cfu/ml} = (\text{nr de colonii} \times \text{factorul de diluție}) / \text{volumul culturii initial}$$

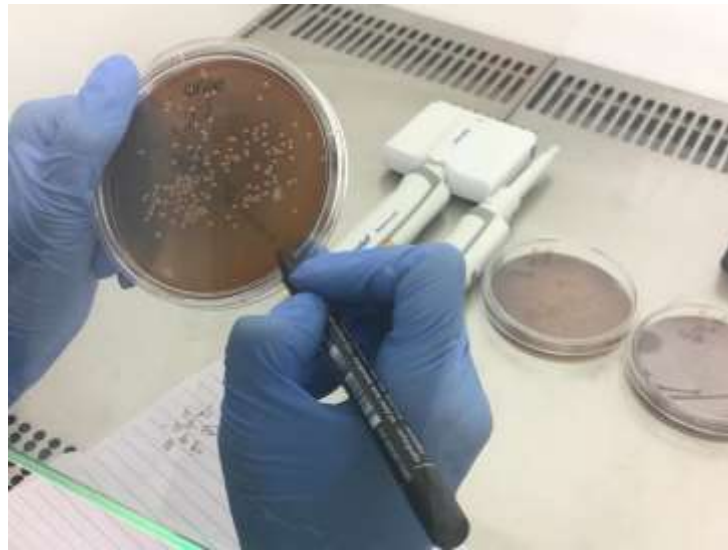


Fig. 3. Determinarea numărului de bacterii aderate în biofilm (original)

Pentru fiecare tulpină din genul *Staphylococcus* și *E.coli* s-a calculat media densității optice (DO) și deviația standard. S-a determinat densitatea biofilmului de la nivelul primelor șapte godeuri, în godeul opt fiind proba martor. Citirea densității optice s-a făcut pentru fiecare godeu în parte și s-a realizat o medie a densităților optice stabilindu-se apoi deviația standard.

#### 4. Formarea biofilmelor bimicrobiene

##### ZIUA 1:

Tulpinile bacteriene din culturile stoc au fost însămânțate pe agar cu sânge turnat în plăci Petri și incubate la 37°C, timp de 24 de ore.

##### ZIUA 2:

După cele 24 de ore au fost preparate suspensiile bacteriene (cu tulpinile *Staphylococcus aureus* + *Escherichia coli*) în soluție salină izotonă (NaCl 0,9%) cu densitatea de 0,5 pe scala McFarland. Aceste suspensii s-au diluat în proporție de 1:30 în bulion cord creier (bulion BHI, Oxoid), s-a adăugat 0,30 ml soluție salină izotonă. Suspensia obținută s-a vortexat bine pentru omogenizare.

Din fiecare cultură diluată s-a luat un volum de 150 μl și s-a însămânțat în placa de microtitrare cu 96 de godeuri (8 godeuri pentru fiecare tulpină, în triplicat). Primul rând al plăcii a fost lasat gol iar în ultimele godeuri au fost adăugate doar bulionul cord creier, fără suspensia bacteriană, acestea fiind folosite ca martor (Figura 4). Plăcile s-au incubat la 37°C, timp de 72 de ore.

## Utilizarea germenilor de interes pentru obținerea de biofilme mono și polimicrobiene

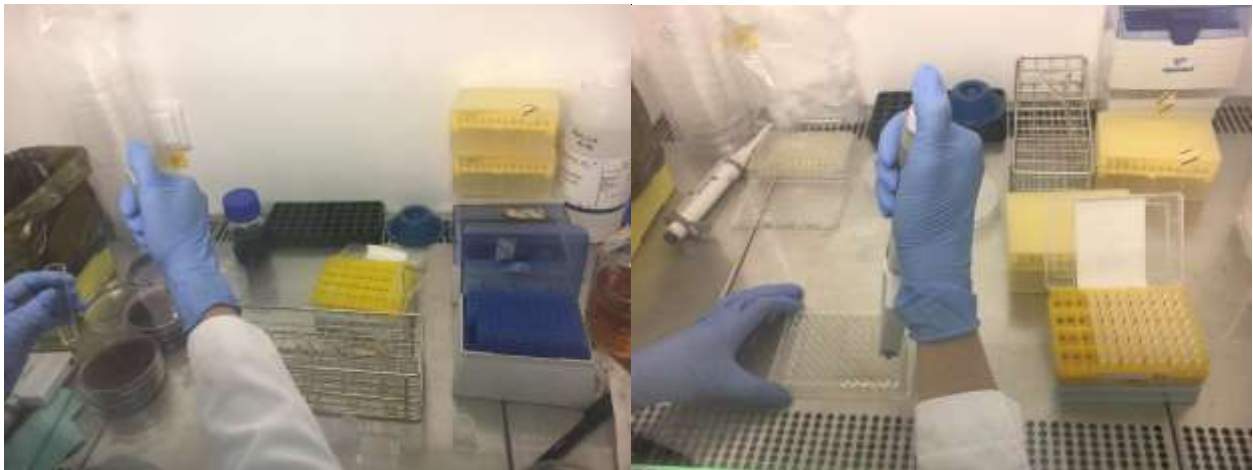


Fig. 4. Stanga - efectuarea diluțiilor seriale (original); Dreapta - însămânțarea godeurilor plăcii de microtitrare cu bacteria patogenă (original)

### ZIUA 5:

După 72 de ore de incubare s-a îndepărtat bulionul cu ajutorul unei pipete multicanal și s-a spălat de două ori fiecare godeu cu 160  $\mu$ l ser fiziologic steril, pentru a îndepărta celulele planctonice. În următoarea etapă s-a colorat biofilmul cu soluție cristal violet 1%, 160  $\mu$ l, timp de 10 minute (Figura 5) apoi godeurile s-au spălat de două ori cu ser fiziologic pentru îndepărtarea colorantului. Cu cât absorbția colorantului a fost mai mare, cu atât biofilmul format a fost mai dens.

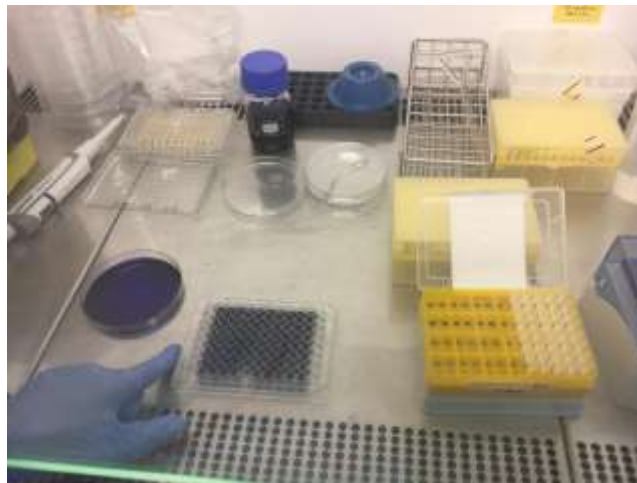


Fig. 5. Colorarea biofilmului cu cristal violet (CV), soluție 1% (original)

Decolorarea s-a realizat cu 160  $\mu$ l etanol 96% timp de 30 de minute. După această etapă a s-a măsurat densitatea optică a biofilmului format la nivelul fiecărui godeu, la lungimea de undă de 540 nm, cu ajutorul unui cititor ELISA (Figura 6) și s-a stabilit care din tulpinile analizate formează cel mai dens biofilm.

## Utilizarea germenilor de interes pentru obținerea de biofilme mono și polimicrobiene



Fig. 6. Stanga - aspectul biofilmului, format la fundul godeurilor plăcii de microtitrare, după îndepărtarea colorantului cristal violet (CV), soluție 1 % (original); Dreapta - măsurarea densității optice (DO) la 540 nm cu ajutorul cititorului ELISA (original)

### ZIUA 6:

S-a determinat numărul de bacterii aderate în biofilm.

Pentru îndepărtarea biofilmului aderat s-a răzuit fiecare godeu cu un tampon steril care a fost ulterior diluat în 9 ml PBS.

A urmat vortexarea timp de 1 minut pentru dezagregarea biofilmului și efectuarea de diluții seriale prin însămânțarea microorganismelor pe agar cu sânge.

Plăcile însămânțate au fost incubate timp de 24h la 37°C.

$$\text{cfu/ml} = (\text{nr de colonii} \times \text{factorul de diluție}) / \text{volumul culturii initial.}$$

Pentru fiecare tulpină din genul *Staphylococcus* + *E.coli* s-a calculat media densității optice (DO) și deviația standard.

S-a determinat densitatea biofilmului de la nivelul primelor șapte godeuri, în godeul opt fiind proba martor.

Citirea densității optice s-a realizat cu ajutorul spectrofotometrului ELISA și s-a făcut pentru fiecare godeu în parte apoi realizează o medie a densităților optice stabilindu-se deviația standard (vezi raportul 2.3.3).

## 5. Concluzii

*S. aureus* și *E.coli* reprezintă patogeni importanți al infecțiilor nosocomiale și asociate îngrijirilor medicale, cu risc crescut de generare de biofilme la nivelul dispozitivelor medicale implantate în diferite situsuri în organism. Din structura biofilmelor mature se pot ulterior desprinde celulele bacteriene, care pot adera pe suprafețe sau pentru a genera infecții diseminate. În dezvoltarea biofilmului sunt implicate mai multe structuri de suprafață, de tipul proteinelor de perete celular, straturilor de polizaharide sau moleculelor specifice numite adezine.

Tulpinile incluse în acest studiu au fost izolate cel mai frecvent din secreție plagă. Tulpinile cel mai frecvent identificate au fost cele de *Staphylococcus aureus* și *E.coli*, fiind caracterizate de o intensă capacitate de a produce biofilm și aderență la culturile celulare.

Caracteristicile tulpinilor în ceea ce privește incidența, capacitatea lor de a produce factori de virulență, de a dezvolta biofilm, de a adera la suprafața celulelor sensibile și patternul diferit de sensibilitate la antibiotice subliniază importanța abordării personalizate de la caz la caz a patologiilor și, de asemenea, a aplicării tratamentelor personalizate, în funcție de alte aspecte ce țin de pacient, de tulpina identificată și de terapiile anterioare.

## Bibliografie

- Amorena, B., Gracia, E., Monzon, M., Leiva, J., Oteiza, C., Perez, M., Alabart, J.L., Hernandez-Yago, J. (1999). Antibiotic susceptibility assay for *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro, *J. Antimicrob. Chemother.*, 44, p. 43-55.
- Blenkinsopp, S.A., Costerton, J.W. (1991). Understanding bacterial biofilms. *Trends Biotechnol.*, 9, p. 138-143.
- Brading, M.G., Jass, J., Lappin, S.H.M. (1995), Dynamics of bacterial biofilm formation. In: Lappin-Scott, H.M., Costerton, J.W., editors. *Microbial biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press., p. 46-63
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture and drug resistance, *J. Bacteriol.* 183, p. 5385- 5394.
- Davey, M. E., & O'Toole, G. A. (2000). *Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847-867. doi:10.1128/mmbr.64.4.847-867.2000
- Hajek, V. (1976). *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 26, p. 401-408
- Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Crowley, J. R., Heuser, J., ... Hultgren, S. J. (2013). *Escherichia coli* Biofilms Have an Organized and Complex Extracellular Matrix Structure. *mBio*, 4(5). doi:10.1128/mbio.00645-13

## Utilizarea germenilor de interes pentru obținerea de biofilme mono și polimicrobiene

- Jauffred, L., Munk Vejborg, R., Korolev, K. et al. Chirality in microbial biofilms is mediated by close interactions between the cell surface and the substratum. *ISME J* 11, 1688–1701 (2017) doi:10.1038/ismej.2017.19
- Mc.Eldoweny, S., Fletcher M. (1986). Variability of the influence of physiochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl. Environ.Microbiol.*, 52, p. 460-465.
- Milanov, D., Prunić, B., Velhner, M., Todorović, D., & Polaček, V. (2015). Investigation of Biofilm Formation and Phylogenetic Typing of *Escherichia Coli* Strains Isolated from Milk of Cows with Mastitis / Ispitivanje Formiranja Biofilma I Filogenetska Tipizacija Sojeva *Escherichia Coli* Izolovanih Iz Mleka Krava Sa Mastitisom. *Acta Veterinaria*, 65(2), 202–216. doi:10.1515/acve-2015-0017
- O'Toole, G.A., Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.*, 30, p. 295-304