

PRIMENA TESTA NA MIKROTITRACIONIM PLOČAMA I MIKROSKOPSKIH TEHNIKA U ISPITIVANJU SPOSOBNOSTI NEKIH BAKTERIJSKIH VRSTA IZOLOVANIH OD ŽIVOTINJA DA FORMIRAJU BIOFILM

Milanov Dubravka*, Dejan Bugarski, Jelena Petrović, Olga Rackov
Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“, Novi Sad, Rumenački put 20

Kratak sadržaj

U radu je prikazana primena pojedinih procedura za in vitro ispitivanje sposobnosti formiranja biofilma kod bakterijskih vrsta: *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* i *Pseudomonas aeruginosa*, izolovanih od životinja. Biofilmovi su formirani na površinama od polistirena i nerđajućeg čelika. Na površini od polistirena, izolati *S. aureus* i *L. monocytogenes* ispitani su testom u mikrotitracionim pločama i svetlosnom mikroskopijom. Biofilmovi *L. monocytogenes*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* formirani na površini nerđajućeg čelika pregledani su skening elektronskom mikroskopijom. Primenom navedenih metoda bilo je moguće razlikovanje izolata bakterija koje ne proizvode biofilm od onih koje pokazuju tu sposobnost u in vitro uslovima. Test na mikrotitracionim pločama pokazao se kao jednostavna metoda pogodna za pregled većeg broja izolata iste ili različitih vrsta bakterija, naročito pre izvođenja nekih drugih ispitivanja koja zahtevaju komplikovaniju proceduru. Prednost testa je, između ostalog, u kvantifikaciji dobijenih rezultata, a nedostatak se odnosi na nemogućnost detekcije ekstracelularne polimerične supstancije. Tehnike mikroskopiranja omogućile su neposredan uvid u strukture koje su ispitivani sojevi formirali na korišćenim supstratima, uz izvesna ograničenja. Ona se odnose na slaba svojstva rezolucije i dvodimenzionalnu sliku kod svetlosne mikroskopije, kao i na deformaciju trodimenzionalne strukture biofilma u pripremi preparata za skening elektronsku mikroskopiju.

Ključne reči: biofilm, mikrotitracioni test, svetlosna mikroskopija, skening elektronska mikroskopija

* E-mail: dubravka@niv.ns.ac.rs

APPLICATION OF MICROPLATE BIOFILM ASSAY AND MICROSCOPY TECHNIQUES TO INVESTIGATE ABILITY OF SOME BACTERIAL STRAINS OF ANIMAL ORIGIN TO FORM BIOFILM

Milanov Dubravka, Dejan Bugarski, Jelena Petrović, Olga Rackov
Scientific Veterinary Institute "Novi Sad", Novi Sad,
Rumenački put 20

Abstract

The use of some procedures for in vitro investigation of biofilm formation in bacterial species *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from animals is presented in this paper. Biofilms are formed on polystyrene and stainless steel surfaces. On polystyrene surface *S. aureus* and *L. monocytogenes* were examined by microplate biofilm assay and light microscopy. Biofilms of *L. monocytogenes*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*, formed on stainless steel surface, were examined by scanning electron microscopy. The application of these methods can help distinguish between the bacteria isolates that don't form and the one that form biofilm. Microplate biofilm assay proved to be a simple method suitable for examining a large number of isolates of the same or different bacteria species, particularly if used prior to other investigation techniques that require more complex procedure. The advantages of the test, among the others, is quantification of the obtained results, whereas a principal drawback implicates the impossibility of detecting extracellular substance. The microscopy techniques have provided a direct insight in the structures formed by the investigated strains on the used substrates, with some limitations. They are related to the poor resolution features and two-dimensional image obtained by light microscopy, as well as deformation of three-dimensional biofilm structures in the preparation for scanning electron microscopy.

Key words: biofilm, microplate biofilm assay, light microscopy, scanning electron microscopy

UVOD

Izolacija bakterija iz njihovih prirodnih staništa i umnožavanje na podlogama bogatim hranljivim sastojcima omogućila je tokom proteklog stoleća identifikaciju velikog broja bakterijskih vrsta, ispitivanje njihovih biohemijskih osobina i rasvetljavanje pojedinih aspekata patogeneze bolesti izazvanih ovim vrstama mikroorganizama. Međutim, u svim ekosistemima, uključujući i organizme ljudi i životinja, bakte-

rije pokazuju tendenciju vezivanja za površine i formiranja struktura poznatih pod nazivom „biofilm“ u kojima se one bitno razlikuju od svojih slobodno suspendovanih dvojnika koje izučavamo u laboratorijskim uslovima. Biofilm se definiše kao zajednica mikroorganizama koji su vezani za žive ili nežive površine i koji su uklopljeni u ekstracelularnu supstanciju koju sami proizvode (Costerton i sar., 1999). Bakterije u biofilmu pokazuju drugačiju ekspresiju gena u odnosu na planktonske dvojnike, drugačije vrednosti rasta i povećanu rezistenciju na biocide, uključujući i dezinficijense i antibiotike (Mah i O'Toole, 2001; Donlan i Costerton, 2002). Biofilmovi su perfektna milje za horizontalni transfer genetičkog materijala i nastanak patogena sa novim faktorima virulencije i povećanom otpornošću na različite faktore spoljašnje sredine (Hausner i Wuertz, 1999).

Istraživanja mikrobnih biofilмова otpočela su u okviru ekološke mikrobiologije, a na ova ispitivanja su se nadovezale industrijska i medicinska mikrobiologija, čime je prihvaćen koncept da bakterije prate sličnu strategiju razvoja u svim ekosistemima, uključujući i žive organizme. Rasvetljena je uloga bakterijskih biofilмова u nastanku nekih hroničnih infekcija, posebno onih koje se prenose upotrebom pomoćnih medicinskih uređaja, kao što su kateteri, implantati, materijali za šivenje i sl. Za neka oboljenja životinja takođe se smatra da su izazvana bakterijskim biofilmovima: mastitis (*Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*), pneumonija (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*), abscesi jetre (*Fusobacterium necrophorum*), limfadenitis (*Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Streptococcus* spp.), enteritis (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp.) i infekcije rana (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*). Uklopljene u biofilm, bakterije su zaštićene od fagocitoze, a primena antibiotika u terapiji ovih infekcija uobičajeno je neefikasna i indukuje rezistenciju (Donlan, 2000; Donlan i Costerton, 2002; Leid i sar., 2005).

Staphylococcus aureus je oportunistički patogen koji ima sposobnost da perzistira i da se umnožava u životnoj sredini i organizmima različitih domaćina. Izaziva širok spektar oboljenja i kod ljudi i kod životinja, koje se manifestuju od superficijalnih infekcija kože do septikemija. Kod krava u laktaciji, *Staphylococcus aureus* je čest uzročnik intramamarnih infekcija, a formiranje biofilma se razmatra kao jedno od mogućih objašnjenja za hronični tok bolesti i neuspeh u terapiji (Cucarella i sar., 2004; Fox i sar., 2005; Melchior et al., 2006). Vrste iz roda *Staphylococcus* i *Pseudomonas*, generalno se razmatraju kao dobri biofilm produceri (Götz F., 2002; Chmielewski i Frank, 2003). *Listeria monocytogenes* je od izuzetnog značaja u proizvodnji zdravstveno bezbednih namirnica, jer hrana predstavlja glavni put prenošenja ovog patogena. Brojni literaturni podaci sugerišu da površine u prehrambenoj industriji predstavljaju potencijalni rezervoar za ovu bakteriju, zahvaljujući njenoj sposobnosti da na njima formira biofilm, sama ili u zajednici sa drugim bakterijskim vrstama uobičajeno prisutnim na mestima proizvodnje hrane (Sasahara i Zottola, 1993; Jeong i Frank, 1994; Møretro i Langsrud, 2004).

Za ispitivanje sposobnosti bakterija da produkuju biofilm u *in vitro* uslovima, do danas su razvijeni različiti protokoli i sistemi koji u osnovi mogu biti statički ili dinamički (hemodinamski i sistem sa kontinuiranim protokom tečnosti). Za formiranje biofilma koriste se različiti hidrofobni (plastika, guma, politetrafluoroetilen) i hidrofilni supstrati (staklo, nerđajući čelik). Produkcija biofilmova se može ustanoviti na direktan način, primenom različitih tehnika mikroskopiranja, ili se o njima posredno zaključuje na osnovu merenja nekih njihovih atributa kao što su količina boje koju vezuju, koncentracija ukupnih proteina, endotoksina, adenozin-trifosfata i sl.

U ovom radu smo prikazali primenu testa na mikrotitracionim pločama i mikroskopskih tehnika u ispitivanju produkcije biofilmova kod bakterijskih vrsta: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* i *Pseudomonas aeruginosa* izolovanih od životinja. Biofilmovi su formirani u statičkim uslovima inkubacije na površinama od polistirena i nerđajućeg čelika.

MATERIJAL I METODE

1. Kulture mikroorganizama

U ispitivanjima je korišćeno 10 sojeva *Listeria monocytogenes* izolovanih iz tkiva preživara kod pojave abortusa i nervne forme listerioze; 10 sojeva *Staphylococcus aureus* i 5 sojeva *Pseudomonas aeruginosa* izolovanih iz mleka krava sa mastitisom. Identifikacija bakterija izvedena je na osnovu karakterističnih kulturelnih i tinktorijelnih osobina, testova katalaze i oksidaze. U identifikaciji *Listeria monocytogenes* korišćen je CAMP test sa *Staphylococcus aureus* i MICROBACT™ *Listeria* Identification System 12L (Oxoid LTD, UK). U identifikaciji sojeva *Staphylococcus aureus* korišćeni su testovi koagulacije plazme i fermentacije manitola, a u biohemijskoj identifikaciji Microbact Staph 12S (Oxoid LTD, UK).

Priprema suspenzija: Dve do tri pojedinačne kolonije kultura bakterija koje su rasle na krvnom agaru za 24 sata inkubacije, inokulisane su u 3 ml tripton soja bujona (Tryptone Soy Broth, Biokar Diagnostics). Suspenzije su inkubirane 24 sata na temperaturi od 37°C, posle čega su homogenizovane na vorteksu i razređene 1:40 u svežem tripton soja bujonu. Na taj način pripremljene su suspenzije gustine 107 cfu/ml koje su korišćene za formiranje biofilma.

2. Test na mikrotitracionim pločama

Za izvođenje testa korišćene su polistirenske ploče Nunc (Roskilde, Denmark) sa ravnim dnom, za postavljanje kulture ćelija. U ispitivanju kliničkih izolata vrste *Listeria monocytogenes* koristili smo metodu koju su opisali Borucki i sar. (2003), a u ispitivanju izolata *Staphylococcus aureus*, metodu opisanu od strane Stepanović i sar.

(2000), uz male modifikacije. Tako smo u testu za *Listeria monocytogenes* koristili nešto višu koncentraciju kristal violeta (od 0,2%) i višu temperaturu inkubacije (37°C), a u ispitivanju vrste *Staphylococcus aureus*, za rastvaranje boje je korišćen 95% etanol, umesto glacijalne sirćetne kiseline. Rezultati su očitani spektrofotometrijski upotrebom filtera talasne dužine od 595 nm (Labsystems Multiscan MCC/340). Prema kalkulacijama, sojevi su klasifikovani u sledeće kategorije: slabi, umereni i jaki biofilm produceri i sojevi koji ne proizvode biofilm (po metodi Stepanović i sar., 2000).

3. Mikroskopski pregled

Za pregled svetlosnom mikroskopijom korišćene su ploče NUNC (Roskilde, Denmark) sa 6 udubljenja površine 9,6 cm². Suspenzije bakterija u količini od 0,3 mL, inokulisane su u udubljenja ploče. U svako udubljenje je dodato 3 mL tripton soja bujona, a ploče su inkubirane 24 h (za *Staphylococcus aureus*) i 48 h (za *Listeria monocytogenes*) na temperaturi od 37°C. Posle isteka perioda inkubacije, sadržaj udubljenja je uklonjen pipetiranjem, a svako udubljenje isprano tri puta sa po 5 mL sterilnog fiziološkog rastvora. Ploče su osušene na vazduhu u invertnoj poziciji. Biofilmovi su obojeni 0,2% rastvorom kristal-violeta za 45 minuta na sobnoj temperaturi. Nevezana boja uklonjena je ispiranjem, ploče su osušene na vazduhu i pregledane svetlosnim mikroskopom Olympus (Tokio) (objektiv 20x).

Za skeniranje elektronsku mikroskopiju korišćeni su sterilni kuponi od nerđajućeg čelika. Kuponi su postavljeni odvojeno u udubljenja polistirenske ploče Nunc (Roskilde, Denmark) sa 12 udubljenja. Suspenzija bakterija je u količini od 100 µL inokulisana na površinu kupona. Adherencija bakterija omogućena je inkubacijom na sobnoj temperaturi tokom tri sata, posle čega je suspenzija uklonjena, kuponi isprani sterilnim fiziološkim rastvorom i potopljeni u 2 mL tripton soja bujona. Biofilmovi su formirani za pet dana inkubacije na temperaturi od 37°C. Posle isteka perioda inkubacije kuponi su izvađeni i isprani sterilnim fiziološkim rastvorom, da bi se uklonila podloga i nevezane ćelije. Kuponi su zatim potopljeni u 4% rastvor glutaraldehida i fiksirani preko noći u frižideru. Posle fiksacije, kuponi su isprani dva puta u sterilnoj destilovanoj vodi, a zatim dehidrirani sukcesivnim potapanjem u vodene rastvore etanola rastućih koncentracija (30%, 50%, 60%, 70% i 90%) po pet minuta u svakom. Na kraju su tri puta potopljeni po deset minuta u koncentrovani etanol i ostavljeni na vazduhu da se osuše. Osušeni preparati napareni su zlatom (Sputter Coater SCD 005, BALTEC SCAN) i posmatrani skeniranjem elektronskim mikroskopom JMS SEM 6460 LV.

REZULTATI I DISKUSIJA

Test na mikrotitracionim pločama

Prema izmerenim vrednostima optičke prozračnosti u testu na mikrotitracionim pločama, ispitani izolati *L. monocytogenes* klasifikovani su u umerene ili slabe biofilm producere (Tabela 1). Prema literaturnim podacima, *L. monocytogenes* u čistoj kulturi slabo produkuje biofilm, pa se pretpostavlja da ona „koristi“ druge, primarno kolonizirane vrste bakterija, sa kojima stvara biofilm zajednice na površinama u prehrambenoj industriji (Sasahara i Zottola, 1993; Hood i Zottola, 1997; Carpentier i Chassaing, 2004). Harvey i sar. (2007) su testom na mikrotitracionim pločama ispitili sposobnost produkcije biofilma kod 138 sojeva *L.monocytogenes*, uključujući animalne i humane izolate, perzistentne i sporadične izolate iz prehrambene industrije i sojeve poreklom iz okruženja. Samo dva soja su procenjena kao jaki, devet sojeva kao umereni, a čak 127 kao slabi biofilm produceri. Iznenadjuće je da su među ispitanim izolatima *Staphylococcus aureus* samo dva izolata (sa oznakama 977/8 i 2975/88) procenjena kao jaki biofilm produceri. Šest izolata je procenjeno slabim biofilm producerima, a dva nisu formirala biofilm. Fox i sar. (2005) su ispitili 221 izolat *Staphylococcus aureus* iz mleka krava i ustanovili visok procenat biofilm produkujućih sojeva, od 41%, dok su Oliveira i sar. (2006) ispitili 16 izolata i zabeležili znatno niži procenat biofilm pozitivnih sojeva od 18,75%. Oliveira i sar. (2006) smatraju da test na polistirenskim površinama treba dopuniti drugim metodama, jer neki pozitivni sojevi koji imaju gene za produkciju biofilma, ovim fenotipskim ispitivanjem ostaju neotkriveni.

Tabela 1. Srednje vrednosti optičke prozračnosti izmerene testom u mikrotitracionim pločama

Sojevi <i>L. monocytogenes</i>	Srednja vrednost OD595	Kalkulacije	Sojevi <i>S. aureus</i>	Srednja vrednost OD595	Kalkulacije
785/05	0,455 ± 0,099	umeren	113/4	0,237 ± 0,027	nije
593/05	0,39 ± 0,057	umeren	884/2	0,359 ± 0,042	slab
748/05	0,279 ± 0,053	umeren	992/3	0,31 ± 0,064	slab
021/04	0,303 ± 0,062	umeren	992/5	0,357 ± 0,108	slab

1915/04	$0,293 \pm 0,046$	umeren	977/8	$1,63 \pm 0,402$	jak
16	$0,405 \pm 0,054$	umeren	8974/4	$0,363 \pm 0,031$	slab
154	$0,480 \pm 0,076$	umeren	8974/78	$0,326 \pm 0,043$	slab
K	$0,234 \pm 0,018$	slab	1414	$0,289 \pm 0,065$	nije
221	$0,216 \pm 0,025$	slab	1531/82	$0,443 \pm 0,14$	slab
808	$0,320 \pm 0,065$	umeren	2975/88	$1,273 \pm 0,284$	jak

Test na mikrotitracionim pločama se pokazao kao jednostavna metoda pogodna za monitoring bakterijskog vezivanja za abiotske površine. Ovi testovi su opisani sredinom i krajem 90-tih godina, a proistekli su iz protokola koji su opisali Christensen i sar. 1985. Pogodni su iz više razloga. Prvo, protokol ovog testa je jednostavan i može se izvesti u svim laboratorijama upotrebom standardne laboratorijske opreme. Primena ploča sa 96 udubljenja omogućava istovremeno ispitivanje većeg broja bakterijskih vrsta ili različitih izolata odabrane bakterijske vrste. Dalje, mikrotitracioni sistem omogućava istovremeno ispitivanje uticaja više promenljivih faktora sredine. Modifikacijom nekih komponenata testa, kao što je raspoloživost hranljivih materija (upotreba podloga različitog sastava), temperature i vremena inkubacije, mogu se pratiti različiti aspekti ispitivanih bakterijskih zajednica, vezani za formiranje biofilma ili njegovo osipanje. Takođe, test je pogodan kao skrining pre izvođenja nekih drugih ispitivanja čije su procedure komplikovanije.

Jedan od nedostataka ovog testa odnosi se na činjenicu da matriks biofilma ostaje nedetektovan. Pokušaj Borucki i sar. (2003) da produkciju matriksa kod sojeva *L. monocytogenes* utvrde upotrebom boje specifične za ugljene hidrate (rutenijum crveno), pokazao je nedovoljnu osetljivost na sistemu mikrotitracionih ploča. Takođe, Borucki i sar. (2003), kao i Broschat i sar. (2005) ostavljaju otvoreno pitanje da li test na mikrotitracionim pločama meri trodimenzionalnu strukturu biofilma ili prosto količinu ćelija vezanih za površinu. Uprkos navedenih ograničenja, ovaj test je opšte prihvaćen, jer je adhezija na supstrat *conditio sine qua non* za formiranje biofilma.

Nedostatak se odnosi i na činjenicu da test nije standardizovan, što otežava upoređivanje rezultata čak i kada se u ispitivanjima koriste isti sojevi bakterija. U Tabeli 2. prikazujemo neke od uslova testova na mikrotitracionim pločama, opisanim u literaturi za vrste *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*.

Tabela 2. Uslovi korišćeni u testovima na mikrotitracionim pločama sa kristal violet bojom, opisanih za ispitivanje produkcije biofilma kod bakterijskih vrsta *L. monocytogenes* i *S. Aureus*.

Vrsta bakterije	Hranljiva podloga	Vreme inkubacije	Temp. inkubacije	Konc. KV (%)	Rastvarač boje	Referenca:
L. monocytog.	MWB	40h	30°C	0,1	95% etanol	Borucki i sar., 2003
L. monocytog.	MWB	20 i 40h	32°C	1	95% etanol	Đorđević i sar., 2002
L. monocytog.	TSB	24h	35°C	1	33% glaci-jalna sir-četna kis.	Stepanović i sar., 2004
L. monocytog.	TSB	48h	20°C	1	95% etanol	Harvey i sar., 2007
S. aureus	TSB	18h	37°C	0,1	-	Fox i sar., 2005
S. aureus	TSB	18h	37°C	0,25	-	Oliveira et.al., 2006
S. aureus	TSB	24h	37°C	0,2	33% glaci-jalna sir-četna kis.	Stepanović i sar., 2000
S. aureus	TSB	24h	37°C	1	-	Vasudevan i sar., 2003

MWB - Modified Welshimers broth

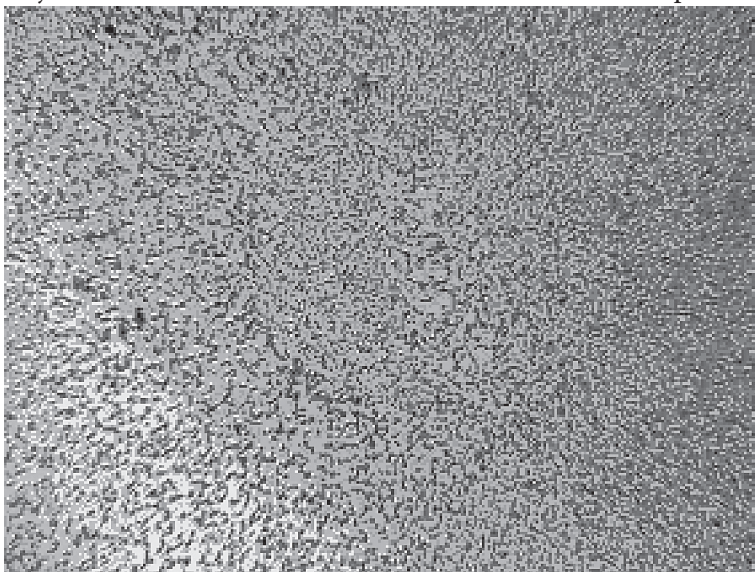
KV- kristal violet

TSB – tripton soja bujon

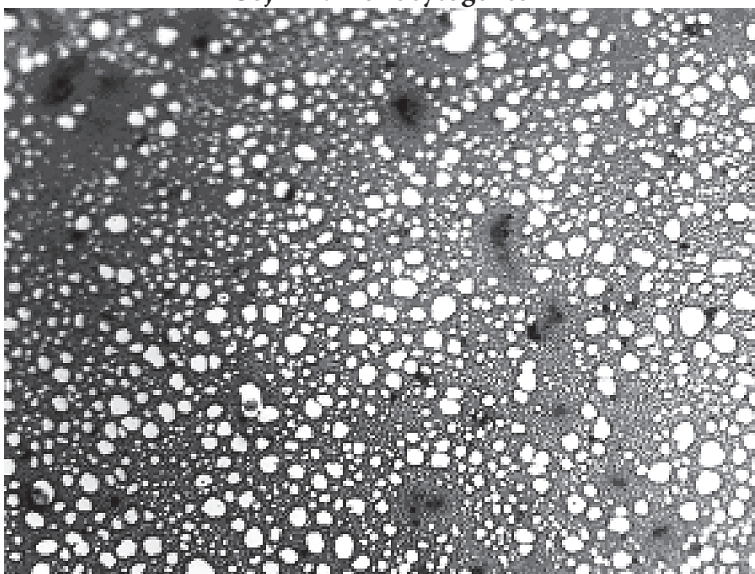
Procedure korišćene u ovom ispitivanju, primenjene na sojeve *P. aeruginosa*, nisu se pokazale pogodnim zbog visokih varijacija kod ponavljanja testa, tako da smo ovu bakterijsku vrstu dalje ispitili samo elektronskom mikroskopijom.

Svetlosna mikroskopija

Pregledom struktura koje su ispitivani izolati bakterija formirali na površinama polistirenskih ploča, potvrđeni su rezultati dobijeni u testu na mikrotitracionim pločama. Slike 1. i 2. prikazuju primere slabih, umerenih i jakih biofilm producera, prema kalkulacijama izvedenim iz rezultata testa na mikrotitracionim pločama.

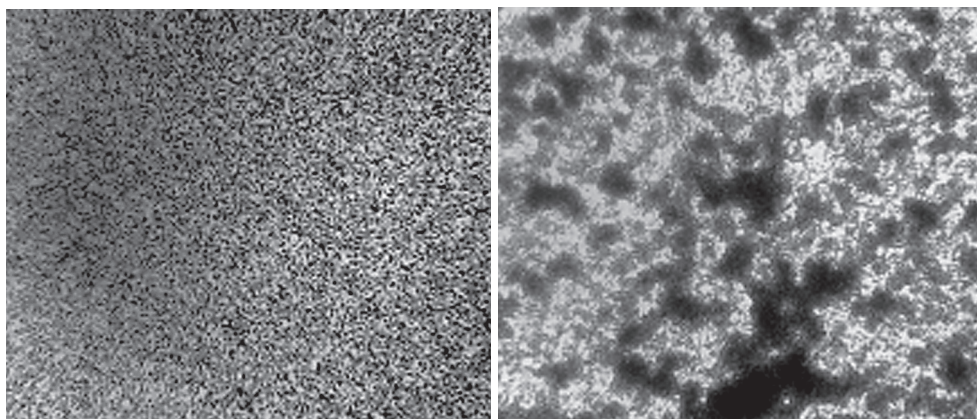


Soj K *L. monocytogenes*



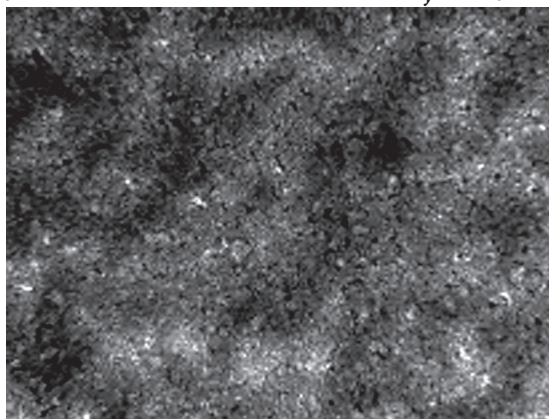
Soj 785/05 *L. monocytogenes*

Slika 1. Svetlosna mikroskopija (20x): izolati *L. monocytogenes* (slab i umeren biofilm producer) na površini polistirena, inkubacija 48 h na temperaturi od 37°C u TSB-YE.



Soj 113/4 *S. aureus*

Soj 1531/82 *S. aureus*



Soj 977/8 *S. aureus*

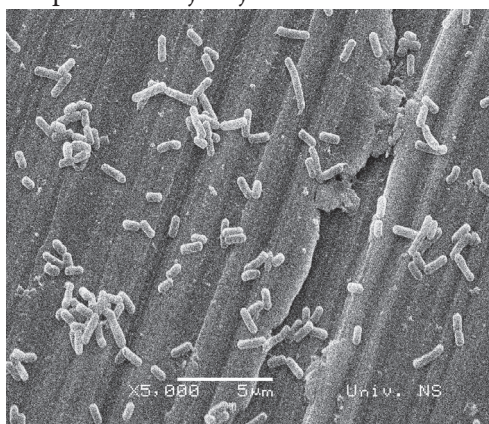
Slika 2. Svetlosna mikroskopija (20x): izolati *S. aureus* (izolat koji ne produkuje biofilm; slab i jak biofilm producer) na površini polistirena, inkubacija 24 h na temperaturi od 37°C u TSB-YE.

Iako zbog dvodimenzionalne slike svetlosna mikroskopija nije tehnika izbora za pregled biofilмова, ipak je i na ovaj način bilo moguće razlikovanje slabih, umerenih i jakih biofilm producera. Na slikama je jasno uočljivo da slabi biofilm produceri pokrivaju površinu polistirena u vidu pojedinačno nakačenih ćelija ili ćelijskog monosloja, dok umereni biofilm produceri bolje koloniziraju supstrat i formiraju mrežaste strukture sa manjim ili većim ćelijskim agregatima. Jaki biofilm produceri u potpunosti prekrivaju površinu, ali trodimenzionalnost strukture biofilma može samo da se naslućuje. Formiranje više slojeva ćelija ili ćelijskih agregata, može objasniti i više vrednosti optičke prozračnosti dobijene u testu na mikrotitracionim pločama. Para-

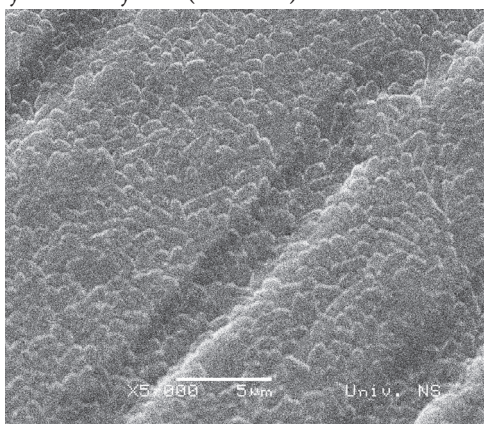
Izuzetna upotreba ove dve metode ima tu prednost, kako navode Harvey i sar. (2007), što pruža informacije koje nisu očigledne (vidljive) u spektrofotometrijskim rezultatima.

Skening elektronska mikroskopija

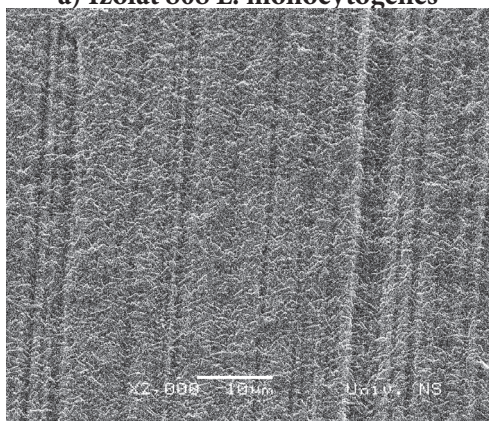
Skening elektronskom mikroskopijom utvrđene su značajne razlike kod izolata *Listeria monocytogenes* u njihovoj sposobnosti da formiraju biofilm na hidrofilnoj površini nerđajućeg čelika. Tako su se neki izolati vezali za površinu u vidu pojedinačnih ćelija (Slika 3a); drugi su ravnomerno kolonizirali supstrat u vidu ćelijskog monosloja (Slika 3b); neki su pokazali uz dobru sposobnost kolonizacije supstrata i tendenciju ka formiranju ćelijskih agregata (Slika 3c), a neki su formirali pojedinačne trodimenzionalne ćelijske agregate svojstvene biofilmu, pri čemu se zapaža znatan deo površine koja nije kolonizirana bakterijskim ćelijama (Slika 3d).



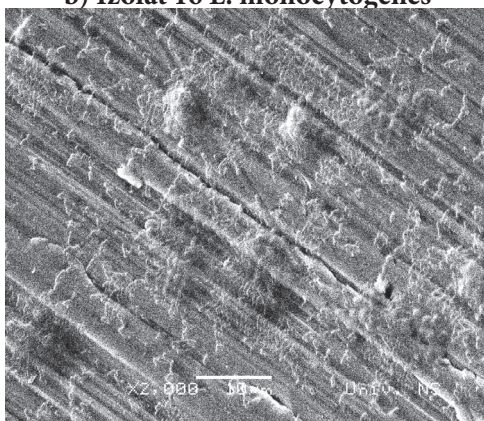
a) Izolat 808 *L. monocytogenes*



b) Izolat 16 *L. monocytogenes*



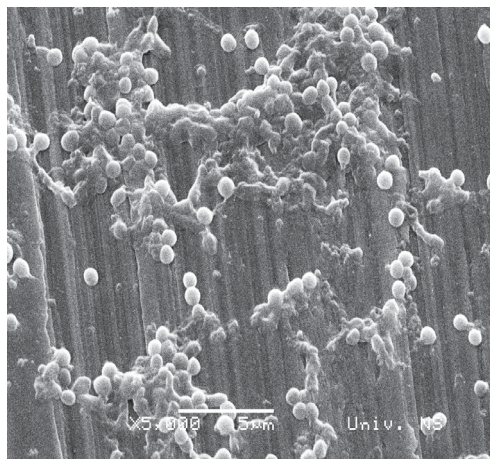
c) Izolat 154 *L. monocytogenes*



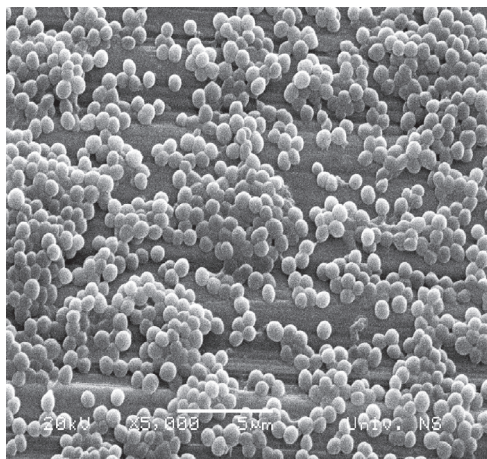
d) Izolat 593/05 *L. monocytogenes*

Slika 3. Skening elektronska mikroskopija biofilмова izolata *L. monocytogenes* formiranih na nerđajućem čeliku za 5 dana inkubacije na temperaturi od 37°C u TSB-YE.

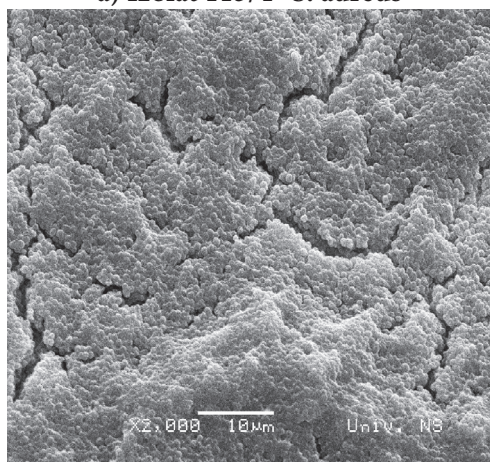
Slabi biofilm produceri *S. aureus* su mestimično kolonizirali površinu nerđajućeg čelika u vidu manjih ili većih ćelijskih nakupina (Slika 4. a i b). Jak biofilm producer (soj 977/8) je formirao gust biofilm sastavljen od brojnih slojeva ćelija (Slika 4c, d).



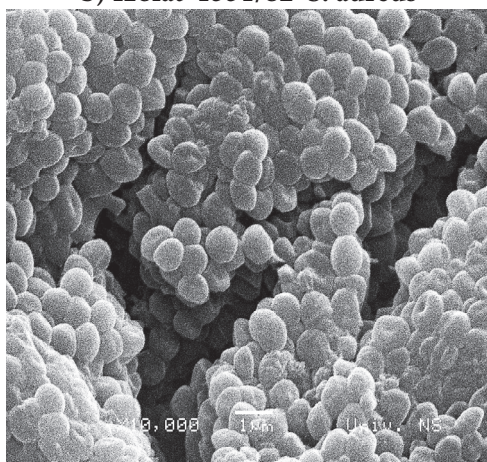
a) Izolat 113/4 *S. aureus*



b) Izolat 1531/82 *S. aureus*



c) Izolat 977/8 *S. aureus*



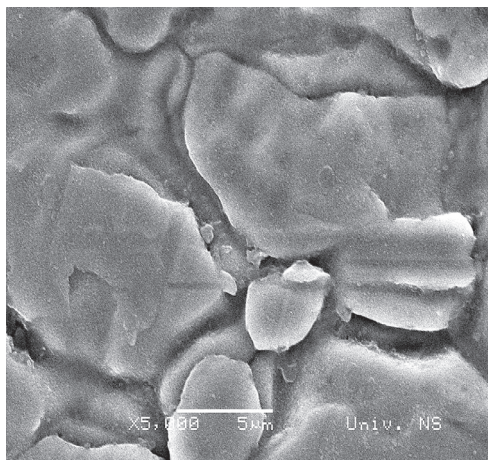
d) Izolat 977/8 *S. aureus*

Slika 4. Skening elektronska mikroskopija biofilmova izolata *S. aureus* formiranih na nerđajućem čeliku za 5 dana inkubacije na temperaturi od 37oC u TSB-YE.

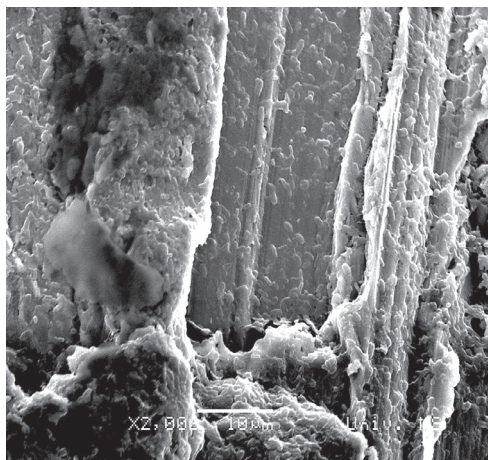
Ekstracelularna polimerična supstancija, svojstvena biofilmu, uočena je samo kod pojedinih izolata, što može biti posledica pripreme preparata. U pripremi preparata za skening elektronsku mikroskopiju koriste se rastvarači (alkohol, aceton, ksilen) za postepenu dehidraciju, zato što voda nije kompatibilna sa vakuumom koji se koristi za elektronski snop. Dehidracija rezultira značajnim deformisanjem ma-

triksa biofilma koji iz jedne visoko hidrirane strukture, po zapažanjima Donlana i Costertona (2002), prelazi u želatinoznu formu koja obavlja bakterijske ćelije i od njih se pruža u obliku niti (fibrila). Odlična svojstva rezolucije elektronske mikroskopije, uprkos navedenom ograničenju, i dalje čini ovu tehniku jednom od najčešće korišćenih u izučavanju bakterijskih biofilmova.

Skromna produkcija ekstracelularne supstancije od strane ispitanih kliničkih izolata vrste *Staphylococcus aureus*, postaje očigledna u poređenju sa vrstom *Pseudomonas aeruginosa*. Ispitani izolati ove bakterijske vrste, formirali su robusne biofilme na površini čelika, sa obilnom produkcijom guste ekstracelularne supstancije, koja u potpunosti prekriva bakterijske ćelije (Slika 5). Na površini su uočljive pukotine, žljebovi, koji odgovaraju kanalima između bakterijskih ćelija, kojima putuju hranljive materije i odvođene se toksični metabolički produkti unutar biofilma (Slika 5a). Čelije bakterija mogle su se zapaziti samo na bočnim stranicama kupona, gde nisu bile pokrivene matriksom (Slika 5b).



**a) Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*
– gornja površina kupona**



**b) Biofilm *Pseudomonas aeruginosa*
– bočna površina kupona**

Slika 5. Skening elektronska mikroskopija biofilma *Pseudomonas aeruginosa* formiranog na površini nerđajućeg čelika za 5 dana inkubacije na temperaturi od 37oC u TSB-YE.

Sposobnost produkcije biofilma bakterijskih vrsta zavisi od niza promenljivih fizičko-hemijskih faktora koji se odnose i na karakteristike (tip) korišćenog supstrata. Vrednosti dobijene u testu na mikrotitracionim pločama (hidrofobni supstrat), nisu u apsolutnoj korelaciji sa rezultatima pregleda elektronskom mikroskopijom gde je kao supstrat korišćen nerđajući čelik (hidrofilni supstrat). Zbog toga je uvek korisno primeniti više tehnika ispitivanja pri proceni sposobnosti formiranja biofilma kod odabrane bakterijske vrste.

LITERATURA

1. Borucki K. Monica, Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R.: Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*, Applied and Environmental Microbiology, 69 (12), 7336-42, 2003.
2. Broschat S.L., Call D.R., Kuhn E.A., Loge F.J.: Comparison of the reflectance and Crystal Violet assays for measurement of biofilm formation by *Enterococcus*, Biofilms, 2, 177-81, 2005.
3. Carpentier B., Chassaing D.: Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises, International Journal of Food Microbiology, 97, 111-122, 2004.
4. Chmielewski R.A.N., Frank J.F.: Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2, 22-32, 2003.
5. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P.: Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, Science, 284, 1318-22, 1999.
6. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J., Baddour L.M., Barrett F.F, Melton D.M., Beachey E.H.: Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices, J. Clin. Microbiol, 22, 996-1006, 1985.
7. Cucarella C., Tormo M.A., Úbeda C., Trotonda M.P., Monzón, Peris C., Amorena B., Lasa Í., Penadés R.: Role of biofilm-associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*, Infection and Immunity, 72, 4, 2177-85, 2004.
8. Donlan R.M.: Role of biofilms in antimicrobial resistance, ASAIO J., 46, S47-S52., 2000.
9. Donlan R.M., Costerton J.W.: Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, Clinical Microbiology Reviews, 15 (2): 167-93, 2002.
10. Fox L.K., Zadoks R.N., Gaskins C.T.: Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection, Veterinary Microbiology, 107: 295-9, 2005.
11. Götz F.: *Staphylococcus* and biofilms, Molecular Microbiology, 43, 6, 1367-1378, 2002.
12. Harvey J., Keenan K.P., Gilmour A.: Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains, Food Microbiology, 24, 380-392, 2007.
13. Hausner M., Wuertz S.: High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis, Appl Environ Microbiol, 65: 3710-3713, 1999.
14. Hood S., Zottola E.: Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems, Int J Microbiol, 37, 145-53, 1997.

15. Jeong D.K., Frank J.F.: Growth of *Listeria monocytogenes* at 10oC in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments, J Food Prot, 57, 7, 576-586, 1994.
16. Leid J.G., Willson C.J., Shirtliff M.E., Hassett D.J., Parsek M.R., Jeffers A.K.: The exopolysaccharide alginate protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria from IFN-gamma-mediated macrophage killing, J. Immunol, 175, 7512-7518, 2005.
17. Mah T.F.C., O,Toole G.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, TRENDS in Microbiology, 9, 1, 34-39, 2001.
18. Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J.: Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?, The Veterinary Journal, 171, 398-407, 2006.
19. Møretrø T., Langsrud S.: *Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments, Biofilms, 1, 107-21, 2004.
20. Oliveira M., Bexiga R., Nunes S.F., Carneiro C., Cavaco L.M., Bernardo F., Vilela C.L.: Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates, Veterinary Microbiology, 118, 133-140, 2006.
21. Sasahara K.C., Zottola E.A.: Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonizing microorganism in flowing systems, J Food Prot, 56, 1022-1028, 1993.
22. Stepanović S., Vuković D., Dakić I., Savić B., Švabić-Vlahović M.: A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation, Journal of Microbiological Methods, 40, 175-179, 2000.
23. Stepanović S., Ćirković I., Ranin L., Švabić-Vlahović M.: Biofilm formation by *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* on plastic surface, Letters in Applied Microbiology, 38, 428-432, 2004.
24. Vasudevan P., Nair M.K.M., Annamalai T., Venkitanarayanan K.S.: Phenotypic and genotypic characterisation of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation, Veterinary Microbiology, 92, 179-185, 2003.

Primljeno: 15.04.2010.

Odobreno: 17.06.2010.