

Biofilm – organizacija života bakterija u prirodnim ekosistemima

Dubravka Milanov,^{1*} Ružica Ašanin,² Branka Vidić,¹ Dejan Krnjajić,²
Jelena Petrović¹

¹ Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Novi Sad

² Fakultet veterinarske medicine, Beograd

Kratak sadržaj

U svim prirodnim ekosistemima, uključujući i organizme ljudi i životinja, bakterije pokazuju tendenciju vezivanja za površine i formiranja struktura poznatih pod nazivom „biofilm”. Formiranje biofilma je genetski regulisan proces u životu bakterija, odigrava se u nekoliko faza i zahteva intercelularnu komunikaciju. U biofilm zajednici bakterije pokazuju drugačije osobine u odnosu na svoje slobodno suspendovane dvojnike, pre svega zbog drugačijeg profila transkripcije gena i povećane otpornosti na antibiotike i sredstva za dezinfekciju. Otkriće mikrobnih biofilмова menja pogled na život bakterija, na koje se sve manje gleda kao na jednoćelijske organizme, a sve više kao na višećelijske zajednice koje po nekim osobinama imitiraju primitivno eukariotsko tkivo. Poslednjih decenija beleži se porast infekcija izazvanih bakterijama koje stvaraju biofilmove, a koje odlikuje hronični tok i recidivirajući karakter. Konvencionalni metodi ubijanja bakterija antibioticima i biocidima uobičajeno su neefektivni kod bakterija organizovanih u biofilmu.

Ključne reči: bakterije, biofilm, infekcije

* e-mail: dubravka@niv.ns.ac.yu

Biofilm – organisation of bacteria life in natural eco systems

Dubravka Milanov,¹ Ružica Ašanin,² Branka Vidić,¹ Dejan Krnjajić,²
Jelena Petrović¹

¹Scientific Veterinary Institute „Novi Sad”, Novi Sad, Rumenački put 20

² Faculty of Veterinary Medicine, Belgrad

Abstract

In all natural ecosystems, including both humans and animals, bacteria show a tendency to bind on the surface and form a structure known as biofilm. Biofilm formation is a genetically regulated process in the life of bacteria and has several phases demanding intercellular communication. In biofilms bacteria express different characteristics comparing to their free suspended counterparts, due to different gene transcription profile and increased resistance towards antibiotics and disinfectants. Discovery of microbial biofilms has changed our understanding of bacteria, that are not viewed only as unicellular organisms, but more as a multi-cellular community that in some characteristics imitates primitive eukaryotic tissue. In the last decades there is an increasing evidence on infections caused by bacteria that form biofilms, and have a chronic course with possibility of recidives. Conventional methods of killing microbes by antibiotics and biocides is usually ineffective in bacteria organized in biofilms.

Key words: bacteria, biofilm, infection

UVOD

Naše razumevanje života bakterija uglavnom se bazira na saznanjima stečenim ispitivanjem čistih kultura bakterija koje rastu na podlogama bogatim hranljivim sastojcima. Karakteristike koje bakterije pokazuju dok rastu pod ovim uslovima svojstvene su njihovom planktonskom fenotipu. Izolacija bakterija iz njihovih prirodnih staništa i umnožavanje u čistoj kulturi, omogućilo je tokom proteklog stoleća ispitivanje njihovih funkcionalnih i morfoloških karakteristika, identifikaciju nebrojenih vrsta i rasvetljavanje pojedinih aspekata patogeneze oboljenja izazvanih ovim vrstama mikroorganizama. Međutim, u svim prirodnim ekosistemima bakterije pokazuju tendenciju vezivanja za žive i nežive površine i formiranja struktura poznatih pod nazivom biofilm. Uklopljene u biofilm, bakterije se bitno razlikuju od svojih slobodno suspendovanih, planktonskih dvojnika i ova dva životna stila predstavljaju dva različita bakterijska fenotipa.

Još je van Leeuwenhoek 1684. godine zapazio mikroorganizme na površini zubne gleđi (*animacules in scurf on teeth*), što bi se moglo smatrati prvim otkrićem biofilma kojeg stvaraju mikroorganizmi. Izučavanje biofilma praktično je započelo tek sa razvojem elektronske mikroskopije i fotomikroskopije visoke rezolucije, a prva istraživanja uglavnom su se bazirala na prirodne vodene ekosisteme, sisteme distribucije vode, tretmane otpadnih voda i dentalne plakove. Tokom poslednje dve decenije prihvaćena je hipoteza o značaju bakterija koje formiraju biofilm u etiologiji nekih hroničnih infekcija, pa se medicinska mikrobiologija nadovezala na istraživanja iz oblasti ekologije mikroorganizama i industrijske mikrobiologije. Time je prihvaćen koncept da bakterije slično rastu u svim ekosistemima, uključujući i žive organizme.

DEFINICIJA BIOFILMA

Teoriju biofilma postavili su Costerton i sar. 1978. godine i definisali ga kao strukturnu zajednicu bakterijskih ćelija koje su vezane za nežive ili žive površine i uklopljene u polimerni matriks koji same proizvode. Donlan i Costerton su 2002. godine postavili novu, dopunjenu definiciju po kojoj je biofilm zajednica mikroorganizama koji su ireverzibilno vezani za površinu, međufazu ili nešto drugo, koji su uklopljeni u matriks ekstracelularne polimerne supstancije i koji pokazuju izmenjeni fenotip u odnosu na brzinu rasta i transkripciju gena.

FORMIRANJE BIOFILMA

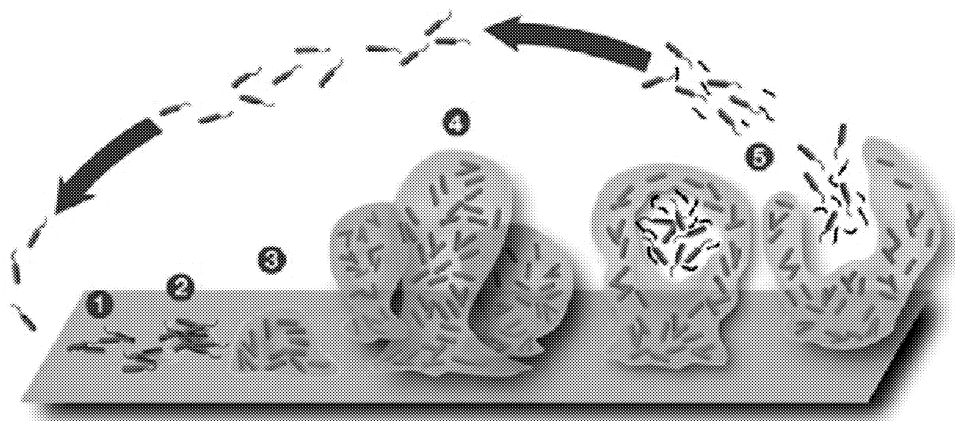
Biofilm može da se formira na svim biotskim i abiotskim površinama koje su u kontaktu sa tečnostima, na površini mekih tkiva u organizmu, biljkama, mineralnim površinama, stenama u slatkim i slanim vodama, mlekovodima, naftnim cevima, biomedicinskim implantatima, kontaktnim sočivima, kao i voda/vazduh međufazi. Formiranje biofilma je složen proces koji se odigrava u nekoliko faza. Neki autori kondicioniranje površine smatraju prvim korakom u formiranju biofilma, iako on predstavlja interakciju površine i njene okoline, odnosno taloženje organskih i neorganskih polimera iz tečnosti koje će omogućiti naknadno prikačivanje mikroorganizama. Adhezija bakterija, po McEldowney i Fletcher (1987) biće na taj način uslovljena kompatibilitetom makromolekula kondicionirane površine sa površinskim osobinama bakterije, što može ili da olakša ili da redukuje bakterijsku adheziju na supstrat. Odličan primer prirodnog kondicioniranja (preduslovljavanja) je *acquired pellicle* (stečena opnica) koja se razvija na zubnoj gleđi. Ona je sastavljena od albumina, lizocima, glikoproteina, fosfoproteina, lipida i tečnosti gingivalnih napuklina. Bakterije oralne šupljine koloniziraju ovu „opnicu“ kroz nekoliko sati ekspozicije. Mittelman (1998) navodi da u živom organizmu ulogu kondicioniranja površine imaju suze, pljuvačka, intravaskularna tečnost, respiratorni sekreti i urin. Takođe, inicijalna populacija bakterija koja se već vezala za površinu deluje kao kondicioni sloj, jer može omogućiti sledećoj vrsti prikačivanje ćelijom na ćeliju.

Marshall i sar. (1971) su predložili dvostepeni, od vremena zavisni model adhezije morskih bakterija na staklenu površinu i on je generalno prihvaćen za sve oblike vezivanja bakterija na različite supstrate. Po ovom modelu, prvo se odigrava jedna prolazna, reverzibilna asocijacija između bakterije i površine, na koju se nadovezuje ireverzibilno vezivanje posredovano produkcijom ekstracelularne supstancije.

Prijanjanje i posledično vezivanje bakterija za površinu može biti aktivno ili pasivno, zavisno od ćelijske pokretljivosti. Pasivno vezivanje je uslovljeno gravitacionom silom, difuzijom i dinamikom tečnosti, dok na aktivno vezivanje utiču osobine ćelijske površine baterija, tj. flagele, pili, adhezini, proteini, kapsule i površinsko naelektrisanje. Mittelman (1998) prvu fazu reverzibilnog vezivanja opisuje kao inicijalnu, slabu interakciju između bakterijske ćelije i supstrata posredovanu van der Waals i elektrostatičkim silama, kao i hidrofobnim interakcijama. Ovu primarnu adheziju Dunne (2002) naziva fazom spajanja (*docking stage*).

U funkciji vremena veza između bakterija i supstrata jača, čineći vezivanje ireverzibilnim procesom. Ta druga faza, koju Dunne (2002) naziva i „fazom zaključavanja“ (*locking phase*), rezultat je produkcije ekstracelularne polimerne supstancije (EPS), glikokaliksa ili matriksa biofilma. Preko EPS-a bakterijsko vezivanje za supstrat uključuje sile kratkog dometa kao što su dipol-dipol interakcije, hidrogenske veze, jonsko i kovalentno vezivanje. Matriks biofilma je visoko hidriran i po svom sastavu on je predominantno voda. Kada je potpuno hidriran sadrži 85-95% vode, zatim polisaharide, proteine, fosfolipide, teihoičnu i nukleinske kiseline i druge polimere. Većinu matriksa biofilma čine šećeri: glukoza, galaktoza, manoza, fruktoza, ramnoza, N-acetilglukozamin i drugi (<http://www.biofilm.org/>). Carpentier i Cerf (1993) opisuju EPS kao trodimenzionalno polje koje okružuje i usidrava za površinu vezane bakterije, sprečava isušivanje i obezbeđuje zaštitu stanovnika biofilma od pretnji kao što su biocidi, antibiotici, antitela, deterdženti, bakteriofagi ili predatori kao što su slobodno-živeće amebe i bela krvna zrnca.

Razvoj biofilma rezultat je adhezencije novih planktonskih ćelija u kombinaciji sa kontinuiranim rastom već vezanih ćelija. Potencijal rasta jednog bakterijskog biofilma limitiran je raspoloživošću hraniva u neposrednoj okolini, perfuzijom ovih sastojaka do bakterijskih ćelija i uklanjanjem metaboličkih produkata. Ako su okolnosti povoljne za uspešan rast i aglomeraciju, biofilm se razvija u organizovanu strukturu i taj proces se naziva maturacija ili sazrevanje biofilma. Deibel i Schoeni (2003) procenjuju da se u uslovima kontinuiranog priliva hraniva, biofilm formira brzo i razmatra kao „zreo“ za 24 sata, a za više dana može nastaviti da raste do milimetarskih proporcija. Povremeno delovi biofilma mogu da skliznu sa površine zahvaljujući dinamici toka i efektu spiranja tečnosti, dejstvom hemikalija ili zbog promena uslova u biofilmu. Oslobođene bakterije mogu ostati u tečnosti kao kontaminanti ili se preneti do drugih lokacija gde će otpočeti ponovo formiranje biofilma. Neki autori čak planktonski fenotip bakterija smatraju samo mehanizmom za rasprostranjivanje.



Slika 1: Faze formiranja bifilma

1. Stadijum reverzibilnog vezivanja; 2. Stadijum ireverzibilnog vezivanja (produkcija EPS); 3. Umnožavanje bakterija; 4. Sazrevanje (maturacija) biofilma; 5. Odvajanje delova biofilma.

(izvor: www.erc.montana.edu/biofilmbok/)

Watnick i Kolter (2000), Deibel i Schoeni (2003) napominju da biofilm ne treba shvatiti kao nepokretnu gomilu ćelija, već kao jednu funkcionalnu životnu zajednicu koja jednom kada se formira, dalje živi svoj život i demonstrira visoku vrednost aktivnosti. Costerton i sar. (1995) i Trachoo i sar. (2003) zaključuju da zajednica biofilma pokazuje jednostavnu homeostazu, cirkulatorni sistem, izmenu genetičkog materijala i metaboličku kooperaciju. Zbog funkcionalne koordinacije, Costerton i sar. (1995) zreo biofilm upoređuju sa primitivnim eukariotskim tkivom.

STRUKTURA ZRELOG BIOFILMA

Biofilmovi su u početku smatrani homogenim strukturama podjednake debljine, ali to u većini slučajeva nije tako. Termin „biofilm“ je neku ruku pogrešan naziv, zato što on nije kontinuiran monosloj površinske naslage. Struktura biofilma zavisi od unutrašnjih (genetskih) i spoljašnjih (fizičko-hemijskih) faktora. Struktura biofilma bitno zavisi od koncentracije hraniva, na osnovu čega su definisana tri razvojna modela (<http://www.ffos.hr/~gpalijan/Stranica02Frame-1>). Najjednostavniji biofilmovi nastaju na zubnim površinama u uslovima visoke, ali periodične koncentracije hraniva, kao jednolična prevlaka vanćelijskog polimera u kome su bakterije različito raspoređene. Biofilmovi na zidovima vodovodnih cevi u uslovima niske koncentracije hranljivih sastojaka predstavljaju drugi razvojni model. Ovi biofilmovi se sastoje od mestimično razvijenih tornjeva EPS-a sa bakterijama koje se izdižu iz ravni tanke, jednolične prevlake. Treći model se razvija u uslovima stalne visoke koncentracije hraniva i smatra se najčešćim tipom razvoja biofilma. Prema ovom modelu, rastom mikrokolonija nastaju pečurkaste strukture od polimera i bakterija.

Unutrašnjost presecaju tuneli koji se mestimično otvaraju na površini koja je izbrazdana kanalima. Ovakva organizacija omogućava strujanje vode kroz čitav sloj čija debljina iznosi od par desetina do par hiljada mikrometara, i komunikaciju sa okolnom vodom koja donosi hraniva i odnosi metaboličke produkte. Svojim izgledom, zreli mikrobní biofilmovi podsećaju na koralne grebene mora.

Direktna posmatranja živih biofilmova konfokalnom laser mikroskopijom, u rasponu od laboratorijski proizvedenih biofilmova jedne bakterijske vrste do kompleksnih biofilmova sastavljenih od većeg broja vrsta kakvi postoje u prirodnim ekosistemima, pokazala su da je osnovna biofilm struktura univerzalna i da su varijacije minorne. Ova tehnika u kombinaciji sa primenom fluorescentnih boja, kao što je na primer akridin-oranž, omogućuje istraživačima kvantifikaciju vijabilnih ćelija u biofilmu. Specifična antitela konjugovana fluorescentnim bojama omogućavaju identifikaciju određenih mikroorganizama u mešanoj biofilm zajednici. Lawrence i sar. (1991) su primenom ove metode i biofilmova *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens* i *Vibrio parahaemolyticus*, kreirali sliku arhitekture biofilma koji postoji u prirodi, otkrićem jedne pečurkaste strukture sa tornjevima, postoljima i vodenim kanalima. U ovim studijama biofilm je proizveden u komorama sa kontinuiranim protokom tečnosti. Svaki biofilm je pokazao varijacije u dubini, u odnosu ćelijskog i nećelijskog materijala, visoku hidriranost i 73-98% nećelijskog materijala, uključujući vodene kanale i egzopolisaharide. Tolker-Nielsen i Molin (2000) navode da je svaka mikrobná biofilm zajednica jedinstvene strukture, iako se neki strukturni atributi razmatraju kao univerzalni. Arhitektura biofilma se menja u vremenu i prostoru, a njegova heterogena struktura sastoji se od mikrokolonija bakterija uklopljenih u EPS i odvojenih od drugih kolonija vodenim kanalima. U većini slučajeva baza biofilma je gusta, neprozirna, muljava struktura 5-10 µm debljine. Kolonije bakterija, oblika pečurke ili kupe, uzdižu se na visinu od 100–200 µm sa mrežom kanala kojima putuju voda, hranljive materije, enzimi, metaboliti i kiseonik.

KARAKTERISTIKE I PREDNOSTI ŽIVOTA U BIOFILMU

1. Intercelularna komunikacija

Ćelije u biofilmu međusobno komuniciraju putem produkata koji su u stanju da difunduju iz jedne u drugu ćeliju. Regulacija ekspresije gena koja će rezultirati prelaskom ćelije iz planktonske faze u biofilm, čvrsto je povezana sa vanćelijskom koncentracijom ovih signalnih molekula (autoinducera). Inicijacija ekspresije gena tek pri graničnoj koncentraciji međućelijskih signalnih molekula (autoinducera) naziva se eng. *quorum sensing*. Ova pojava prvi put je otkrivena početkom sedamdesetih godina prošlog veka kod morske simbiotske svetleće bakterije *Vibrio fischeri*. U početku se smatralo da je takav mehanizam svojstven samo regulaciji bioluminiscencije ovih vibriona, a kasnije je utvrđena veza između mehanizama koji regulišu pojavu bioluminiscencije i formiranja biofilma. Danas je poznato da autoindukcija pri postignutom „kvorumu“ tj. graničnoj koncentraciji autoinducera,

reguliše i procese sinteze antibiotika, ekspresije faktora virulencije, adsorpcije egzogene DNA, konjugacije, kretanja, rasta, stvaranja spora, toksina i dr. Intercelularno signaliziranje je kritičan faktor u diverzitetu i distribuciji bakterija u multi-species biofilmu.

Postoje dva osnovna tipa autoinducerskih molekula. Kod gram pozitivnih bakterija to su kratki peptidni lanci, a gram negativne bakterije koriste acil-homoserin laktone (AHL). Ista bakterija može da sintetiše različite AHL. Te bakterije mogu „osećati“ ne samo gustinu sopstvene, već i drugih populacija bakterija u svom okruženju. Neke biljke stvaraju i otpuštaju u svoju okolinu materije koje inhibiraju sistem autoindukcije, onemogućavajući na taj način razvoj biofilma na svojoj površini. Ovi hemijski signali (bakterijski analozi hormonima) mogli bi biti potencijalno mesto delovanja u razvoju strategije borbe protiv bakterijskih biofilmova.

2. Ekspresija gena specifičnih za biofilm (biofilm fenotip)

Vezivanjem za površinu kod bakterija dolazi do izmenjene ekspresije gena u odnosu na planktonsku populaciju, što je od presudnog značaja za proces formiranja biofilma i njegovu strukturnu i funkcionalnu organizaciju. *Pseudomonas aeruginosa* pokazuje *up*-regulaciju gena *algC* tokom minuta od adhezije na čvrstu površinu. Ovaj gen kontroliše enzim *phosphomannomutase* koji je uključen u sintezu egzopolisaharida *alginate*. *Pseudomonas aeruginosa* u biofilmu prosečno za četiri puta povećava transkripciju *algC* gena u poređenju sa planktonskim ćelijama. Prigent-Combaret i sar. (1999) su kod biofilm vezanih ćelija *Escherichia coli* ustanovili smanjenu sintezu flagelina i povećanu produkciju jednog egzopolisaharida - kolanične kiseline (*colanic acid*). Becker i sar. (2002) su kod ćelija *Staphylococcus aureus*-a u biofilmu potvrdili *up*-regulaciju četiri gena koji kodiraju sintezu enzima uključenih u glikolizu ili fermentaciju. Pretpostavka je da *up*-regulacija nastaje zbog deficita kiseonika u biofilmu, čime se favorizuju procesi fermentacije. Hausner i Wuertz (1999) ističu da je jedna od važnih prednosti života u biofilmu ubrzana vrednost konjugacije koja je potpomognuta fizičkom blizinom ćelija. Biofilm je perfektan milje za horizontalni transfer genetičkog materijala i nastanak patogena sa novim faktorima virulencije i rezistencijom na antibiotike.

3. Povećana rezistencija bakterija u biofilmu

Važna prednost života u biofilmu je povećana otpornost bakterija na antibiotike i dezinficijense. Kako navode Mah i O'Toole (2001), bakterije u biofilmu pokazuju za 10-1000 puta veću rezistenciju na efekat antimikrobnih agenasa uključujući i antibiotike, a Donlan and Costerton (2002) izveštavaju o izvanrednoj biofilm rezistenciji na baktericidni efekat jona metala kao što su bakar i srebro. U radovima i revijama na temu biofilm rezistencije autora Costerton i sar. (1999), Lewis (2001), Mah i O'Toole (2001), Maira-Litran i sar. (2000), moguće je naći listu faktora koji se razmatraju kao odgovorni. Oni uključuju smanjen prodor antimikrobnih sredstava u biofilm, smanjenu brzinu (vrednost) rasta i ekspresiju mogućih gena rezistencije.

Minimalna baktericidna koncentracija (MBC) leka je ona koncentracija koja rezultira smanjenjem broja živih bakterija $\leq 99,9\%$ preko noći u okolnostima rasta i praktično je rezonovanje da je ubijanje većine patogena isto tako dobro kao i ubijanje svih. Preostale perzistere treba da eliminiše imunološki sistem. Perzistirajuće bakterije će postati problem *in vivo* samo u slučajevima kada imunološki sistem nije operativan. Costerton i sar. (1999) smatraju da su perzisteri u biofilmu potpuno zaštićeni fizičkom barijerom matriksa od efektoru imunološkog sistema organizma domaćina, tj. ekstracelularna polimerična supstancija štiti bakterije biofilma od opsonizacije i fagocitoze. Kada se prekine terapija, perzisteri će ponovo formirati biofilm koji će proizvoditi nove planktonske ćelije, a one vratiti simptome bolesti. Sa obzirom da je za obnovu biofilma uništenog antibakterijskim sredstvom dovoljno manje od 1% početne populacije, „žilavost“ biofilмова postaje jasnija. Biofilm infekcije se zato upoređuju sa infekcijama planktonskim ćelijama u odsustvu imunog odgovora.

Bakterijski biofilmovi su nađeni na mnogim medicinskim uređajima, uključujući intravenozne katetere, medicinske implantate, kontaktne sočiva, intraokularna sočiva, materijal za šivenje i druga pomoćna medicinska sredstva. Mah i O'Toole (2001) navode da je 65% nozokomijalnih infekcija vezano za bakterijske biofilmove, a Zegans (2002) da je oko 56% kornealnih ulkusa (u USA) direktna posledica nošenja kontaktnih sočiva. Biofilmovi su odgovorni za bolesti čija je delimična lista prikazana u Tabeli 1.

Tabela 1: Neke infekcije/oboljenja ljudi izazvane bakterijama koje formiraju biofilm

Infekcije, oboljenja	Bakterijske vrste u biofilmu
Zubni karijes	Gram pozitivne koke
Periodontitis	Gram-negativna anaerobna oralna flora
Otitis media	Sojevi <i>Haemophilus influenzae</i>
Koštano-mišićne infekcije	Gram-pozitivne koke
Infekcije žučnih puteva	Enterične bakterije (<i>E. coli</i>)
Osteomyelitis	Različite bakterijske i gljivične vrste
Prostatitis	<i>E. coli</i> i druge gram-negativne bakterije
Endocarditis	<i>Streptococcus spp.</i> grupe <i>viridans</i>
Cystic fibrosis pneumonia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> i <i>Burkholderia cepacia</i>
Nozokomijalne infekcije (upotreba pomoćnih medicinskih uređaja)	
Pneumonije (odelenja intenzivne nege)	Gram-negativni štapići
Infekcije rana (ušivanje)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
Infekcija očiju (kontaktne sočiva)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> i gram pozitivne koke
Urinarne infekcije (kateterizacija)	<i>Escherichia coli</i> i druge gram-negativne vrste
Peritonitis (peritonealna dijaliza)	Različite vrste bakterija i gljivica
Intrauterine infekcije (prenete instrumentima)	<i>Actinomyces israelii</i> i druge vrste

Entotrahealna intubacija	Različite vrste bakterija i plesni
Centralni venski kateteri	<i>S. epidermidis</i> i druge vrste
Mehaničke srčane valvule	<i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>
Ortopedske intervencije	<i>S. epidermidis</i> i <i>S. aureus</i>

Costerton 2001.

Za neke infekcije životinja se takođe smatra da su u osnovi izazvane 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*). Melchior i sar. (2006) smatraju da je slab efekat primene antibiotika u lečenju infekcija mlečne žlezde izazvanih *Staphylococcus aureus*-om, u vezi sa sposobnošću ove bakterije da formira biofilm. Mikroskopski pregled tkiva mlečne žlezde kod akutne i hronične infekcije sa *Staphylococcus aureus* pokazuje da su ove bakterije locirane na epitelnim ćelijama u alveolama i mlečnim kanalima u formi nakupina, grozdova, a ove bakterijske aglomeracije mogu da se zapaze već 24 h posle intramamarnе infekcije. Vaseduvan i sar. (2003) su kod sojeva *Staphylococcus aureus* izolovanih iz mleka krava sa mastitisom ustanovili visoku prevalenciju gena koji su neophodni za formiranje biofilma.

Poslednje dve decenije istraživački naponi usmereni su na razvoj strategije kontrole i prevencije formiranja biofilma i razvoj novih metoda za procenu efikasnosti antibakterijskih tretmana. Visoke doze antimikrobnih agenasa potrebne za uklanjanje biofilm vezanih bakterija iz okruženja su nepoželjne i nisu u saglasnosti sa propisima o zaštiti životne sredine, kao što su i medicinski neprihvatljive, jer bi primena doze potrebne za ubijanje biofilm-bakterija bilo ubijanje pacijenta. Zbog toga se nove strategije zasnivaju na boljem razumevanju bakterijskog vezivanja, rasta i odvajanja od supstrata i hitno su potrebne medicini i većini industrija (<http://www.erc.montana.edu>).

LITERATURA

1. Becker P., Hufnagle W., Peters G., Herrmann M., Detection of different gene expression in biofilm-forming versus planktonic populations of *Staphylococcus aureus* using micro-representational-difference analysis, *Appl Environ Microbiol*, 67, 2958-65, 2002.
2. Carpentier B. and Cerf O., Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry, *J Appl Bacteriol*, 75, 499-511, 1993.
3. Costerton JW., Geesey GG., Cheng KJ., How bacteria stick, *Sci Am*, 238, 86-95, 1978.

4. Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Koreber D.R., Lappin-Scott H.M., Microbial biofilms, *Annu Rev Microbiol*, 49, 711-45, 1995.
5. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P., Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections, *Science*, 284, 1318-22, 1999.
6. Costerton J.W., Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection, *TRENDS in Microbiology*, 9, 2, 50-3, 2001.
7. Deibel V. and Schoeni J., Biofilms: Forming a Defense Strategy for the Food Plant, *Food Safety magazine*, 2003, Izvor: <http://www.foodsafetymagazine.com>.
8. Donlan R.M. and Costerton J.W., Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 167-93, 2002.
9. Dunne Jr W.M., FOCUS, Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately?, *Clinical Microbiology Reviews*, 15, 2, 155-66, 2002.
10. Hausner M. and Wuertz S., High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative in situ analysis, *Appl Environ Microbiol*, 65, 3710-3, 1999.
11. Lawrence J.R., Korber D.R., Hoyle B.D., Costerton J.W., Caldwell D.E., Optical sectioning of microbial biofilms, *J Bacteriol*, 173, 6558-67, 1991.
12. Lewis K., MINIREVIEW Riddle of Biofilm Resistance, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 4, 999-1007, 2001.
13. Mah T.F.C. and O'Toole G., Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents, *TRENDS in Microbiology*, 9, 1, 34-9, 2001.
14. Maira-Litran T., Allison D.G., Gilbert P., An evaluation of the potential of the multiple antibiotic resistance operon (*mar*) and the multi-drug efflux pump *acrAB* to moderate resistance towards ciprofloxacin in *Escherichia coli* biofilms, *J Antimicrob Chemother*, 45, 789-95, 2000.
15. Marshall K.C., Stout R., Mitchell R., Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces, *Journal of General Microbiology*, 68, 337-48, 1971.
16. McEldowney S. and Fletcher M., Adhesion of bacteria from mixed cell suspension to solid surface, *Arch Microbiol*, 148, 57-62, 1987.
17. Melchior M.B., Vaarkamp H., Fink-Gremmels J., Biofilms: A role in recurrent mastitis infections?, *The Veterinary Journal*, 171, 398-407, 2006.
18. Mittelman M.W., Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations, *J Dairy Sci*, 81, 2760-4, 1998.
19. Prigent-Combaret C., Vidal O., Dorel C., Lejeune P., Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 181, 5993-6002, 1999.
20. Tolker-Nielsen T., Molin S., Spatial organization of microbial biofilm communities, *Microb Ecol*, 40, 75-84, 2000.
21. Trachoo N., Biofilms and the food industry, *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 25, 6, 807-15, 2003.

22. Vaseduvan P., Nair M.L., Annamalia T., Venkitanarayanan K.S., Phenotypic and genotypic characterisation of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation, *Veterinary Microbiology*, 92, 179-85, 2003.
23. Watnick P, Kolter R, 2000, Biofilm, City of Microbes, *Journal of Bacteriology*, 182, 10, 2675-9.
24. Zegans M., The role of bacterial biofilms in ocular infections, *DNA and Cell Biology*, 21, 5-6, 415-20, 2002.

Primljeno: 02.02.2009.

Odobreno: 03.03.2009.