

MIKROBIÁLNE BIOFILMY: VZNIK, ŠTRUKTÚRA A SELEKČNÁ VÝHODNOSŤ *MICROBIAL BIOFILMS: FORMATION, STRUCTURE AND A SELECTIONAL ADVANTAGE*

KAŠLÍKOVÁ Katarína^{1,2}, SLOBODNÍKOVÁ Jana¹, MELUŠ Vladimír¹, KRAJČOVIČOVÁ Zdenka¹

¹ *Fakulta zdravotníctva, Trenčianska univerzita Alexandra Dubčeka v Trenčíne, Trenčín*

² *Vysoká škola zdravotníctva a sociálnej práce sv. Alžbety, Bratislava, študentka doktorandského štúdia*

ABSTRAKT

Mikrobiálne biofilmy sú v poslednom desaťročí predmetom intenzívnych štúdií hlavne z dvoch dôvodov. Prvým a základným dôvodom je vedecký záujem pochopiť život, koexistenciu a vzájomné vplyvy baktérií, ktoré žijú v mnohobunkových komunitách. Druhým dôvodom je tvorba biofilmu, ktorý spôsobuje značné problémy v medicínskom a priemyselnom prostredí, pretože baktérie v biofilme môžu odolávať antibiotickej liečbe, hostiteľskej imunitnej odpovedi a biocídnemu účinku. Znalosť environmentálnych podnetov, genetických prvkov a molekulárnych mechanizmov, ktoré sa podieľajú na tvorbe biofilmu je potrebná pre racionálny návrh stratégií na elimináciu biofilmov alebo na inhibíciu ich tvorby. Z mnohých faktorov, ktoré sa podieľajú na procese tvorby biofilmu sa v našom prehľadovom článku zameriavame na vznik a štruktúru biofilmu, na faktory, ktoré ovplyvňujú jeho rast a taktiež sumarizujeme aktuálne poznatky o selekčných výhodách biofilmu vzhľadom k rezistencii mikroorganizmov.

Kľúčové slová: Biofilm. Rezistencia na antibiotiká. Biocidy.

ABSTRACT

Microbial biofilms have been the subject of intense studies over the past decade, mainly for two reasons. The first and fundamental reason is the scientific interest in understanding the life, coexistence and mutual influences of bacteria which live in multi-cell communities. The second reason is the formation of biofilm, which causes considerable problems in the medical and industrial environment because bacteria in biofilm can withstand antibiotic treatment, host immune response and biocidal effect. Knowledge of environmental stimuli, genetic elements and molecular mechanisms involved in biofilm formation is necessary for the rational design of strategies to eliminate biofilms or inhibit their formation. Of the many factors involved in the biofilm formation process, our minireview focuses on the emergence and structure of biofilm, on the factors that influence its growth, and also summarizes current knowledge about the selective advantages of biofilm due to the resistance of microorganisms.

Key words: Biofilm. Resistance to antibiotics. Biocides.

ÚVOD

Väčšina mikroorganizmov existuje v biofilmoch, ktoré sú tvorené spoločenstvami mikroorganizmov žijúcich v samovoľne produkovanej extracelulárnej polymérnej matici pripojenej k pevnému živému alebo neživému povrchu. Mikroorganizmy žijúce v biofilme na rozdiel od planktonických buniek menia fenotyp, preto sú rezistentnejšie na

liečbu antibiotikami a priebeh infekcií spôsobených biofilmami môže byť podstatne ťažší [1].

Biofilmy sú odolné voči antibiotickej liečbe kvôli mechanizmom viacerých tolerancií (fenotypová rezistencia). To spôsobuje pretrvávanie infekcií vyvolaných biofilmami, aj napriek expozícii antibiotikom, ktorá predučuje vývoj rezistencie na antibiotiká (genetická rezistencia). Pochopenie vzájomného pôsobenia fenotypových a genetických mechanizmov rezistencie pôsobiacich na biofilmy, ako aj zhodnotenie rôznorodosti environmentálnych podmienok biologických infekcií, ktoré ovplyvňujú účinnosť antibiotík je potrebné na optimalizáciu antibiotickej liečby infekcií spôsobených biofilmami [2].

Bakteriálne biofilmy sú spájané so širokou škálou infekcií, ako sú prípady súvisiace s používaním zdravotníckych prístrojov a pomôcok (napr. katétre alebo protetické kĺby, rôzne implantáty), s chronickými tkanivovými infekciami alebo s infekciami, ku ktorým dochádza v pľúcach pacientov s cystickou fibrózou [3].

VZNIK BIOFILMU

Vznik a vývoj biofilmu je komplexný a dynamický proces, ktorý je potrebné študovať, pretože lepšie pochopenie vlastností biofilmu môže byť dôležité pre vývoj nových terapeutických stratégií [4].

Tvorba biofilmu je regulovaná rôznymi genetickými a environmentálnymi faktormi. Genetické štúdie ukázali, že bakteriálna mobilita, bunkové membránové proteíny, extracelulárne polysacharidy a signalizačné molekuly hrajú významnú úlohu pri tvorbe biofilmu [5].

Characklis a Marshal [6] popísali niekoľkostupňový proces vývoja biofilmu, ktorý zahŕňa tvorbu počiatočnej kondicionačnej vrstvy, reverzibilnú a nezvratnú adhéziu baktérií a prípadné oddelenie buniek od zrelého biofilmu. Základom pri tvorbe biofilmu je podkladová vrstva na ktorej biofilm rastie. Môže byť zložená z mnohých organických alebo anorganických častíc. Podklad poskytuje biofilmu živiny, ktoré podporujú rast bakteriálnej komunity.

Počiatočná fáza vo vývoji biofilmu trvajúca len niekoľko minút je interakcia medzi planktónnymi bunkami a povrchom substrátu. Taktiež sa nazýva aj ako reverzibilná adsorpcia, pretože niektoré baktérie prilnú na povrch podkladu len na krátku dobu a potom sa odpoja. Tvorba charakteristického biofilmu nastáva po adhézii, kedy dochádza ku zmene regulácie génov. U tých génov, ktoré sa podieľajú na tvorbe extracelulárneho polyméru, je stimulovaná expresia [7].

V druhej fáze dochádza k nevratnému pripojeniu, baktérie sú pevne prichytené k povrchu podkladu a strácajú pohyblivosť. Bakteriálne bunky sa navzájom pripájajú k substrátu, a tým začína tvorba bakteriálnych mikrokolónií. Maturácia je tretou fázou tvorby biofilmu, vytvára sa v nej matrica extracelulárneho polysacharidu. Zvyšuje sa počet mikrokolónií, stávajú sa viacvrstvovými a ich hrúbka môže dosahovať až 10 μm . Táto fáza trvá tri dni. V ďalšej fáze, dozrievania, bakteriálne mikrokolónie narastú na ich maximálnu veľkosť a hrúbku [8].

Počas tvorby biofilmu sa v baktériách mení syntéza povrchových proteínov, mastných kyselín, fosfolipidov a produkcia niektorých enzýmov a polysacharidov. Cyklus tvorby biofilmu je ukončený uvoľňovaním dcérskych buniek do prostredia, čo môže byť indukované nedostatkom živín alebo mechanickými vplyvmi prostredia. Biofilm sa týmto spôsobom rozširuje ďalej po pevnom povrchu [9].

ŠTRUKTÚRA BIOFILMU

Základnú stavebnú jednotku biofilmu tvoria bakteriálne mikrokolónie, oddelené od komunity bakteriálnych buniek exopolysacharidovou substanciou. Mikrokolónie sú vo väčšine prípadov tvorené viacerými druhmi baktérií zakotvenými v extracelulárnej polysacharidovej matrici a poprepávané vodnými kanálkami. Vodné kanáliky fungujú v biofilme ako jednoduchý distribučný systém obehového systému živín a zároveň dostávajú von z biofilmu škodlivé metabolity. Súčasťou biofilmovej matrice sú aj mŕtve bunky, teikové kyseliny z bunkovej steny, DNK a N-acetylglukózamín z hostiteľských produktov. Exopolysacharidová matrica chráni bunky biofilmu pred rôznymi negatívnymi environmentálnymi podmienkami ako je napr. UV žiarenie, prudké zmeny v hodnotách pH, teplota a pod. [10].

V súčasnosti sú popísané dve najčastejšie sa vyskytujúce štruktúry biofilmu: typ honey-like a mushroom-shaped.

Mushroom-shaped štruktúra je odvodená od tvaru huby skladajúcej sa z hlúbika a klobúka. Pomyselný hlúbik je tvorený nepohyblivými subpopuláciami buniek, klobúk predstavuje pohyblivé subpopulácie, ktoré sa na vrchol dostali pohybom po nepohyblivých bunkách. Štruktúra bola pozorovaná u *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* a *Caulobacter crescentus*. Tento model predpokladá tvorbu hubovitých štruktúr od okamihu inokulácie baktérií, pričom sa hubovité štruktúry formujú iba v obmedzenom rozsahu v závislosti od úrovne živín a počiatkovej hustoty „hubových stoniek“. Tým sa otvára možnosť variability tvorby priestorových vzorov v bakteriálnych kolóniách s prihliadnutím na významný vplyv environmentálnych faktorov [11,12].

Ďalšia štruktúra zvyšujúca mechanickú stabilitu biofilmu má tvar šesťuholníka, pripomínajúceho včelie plasty. Honey-like typ štruktúry tvoria hlavne *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* a *Listeria monocytogenes* [13].

Faktory ovplyvňujúce rast biofilmu

Rôzne signály z prostredia ako napríklad dostupnosť niektorých živín, prítomnosť kyslíka, hydrodynamika, teplota a pH sa podieľajú na regulácii tvorby biofilmu. Štúdie o tvorbe biofilmu u *Listeria monocytogenes* uvádzajú, že príliš nízka alebo príliš vysoká hladina fosfátov v životnom prostredí znižuje tvorbu biofilmu, zatiaľ čo prítomnosť sacharidov manózy a trehalózy naopak tvorbu biofilmu stimulovala [14].

Tvorba biofilmu u *Escherichia coli* je regulovaná prítomnosťou kyslíka. V prípade nedostatku kyslíka sa biofilm netvorí, pretože baktérie nedokážu prilnúť k povrchu substrátu. Štúdie zamerané na vplyv teploty na *Listeria monocytogenes* ukázali, že biofilm sa netvoril ak bola teplota vysoká, pretože proces spájania baktérií so substrátom bol inhibovaný. Ekologické pH je tiež dôležité pre tvorbu biofilmu, čo potvrdili štúdie uskutočnené na *Vibrio cholerae*. Optimálne pH pre množenie *Vibrio cholerae* je 8,2, ak je hodnota pH menšia ako 7, schopnosť tejto baktérie tvoriť biofilm je znížená kvôli faktu, že bakteriálne bunky strácajú v kyslom prostredí svoju mobilitu. Na rozdiel od *Vibrio cholerae*, baktérie *Staphylococcus epidermidis* a *Escherichia coli* nepotrebujú alkalické prostredie, aby sa mohli množiť, keďže tvoria biofilm napr. na uretrálnych katétroch, kde pH moču je kyslé [15-17].

Ďalší z faktorov ovplyvňujúci tvorbu biofilmu je koncentrácia glukózy. Tým, že je biofilm polymorfny, tak prispôsobuje svoju štruktúru v závislosti od množstva živín, ktoré boli preukázané pomocou experimentov s rôznymi koncentraciami glukózy. Ak je koncentrácia glukózy vysoká, mikrokolónie rastú rýchlo a následne sa výrazne zvyšuje aj hrúbka biofilmu. Opätovným znížením koncentrácie glukózy sa pôvodná štruktúra biofilmu obnoví [18].

Mnohé baktérie regulujú svoje kooperačné aktivity a fyziologické procesy prostredníctvom mechanizmu nazývaného snímanie kvóra (QS, z *angl.* quorum sensing) v ktorom bakteriálne bunky navzájom komunikujú uvoľňovaním, snímaním a reagovaním na malé difúzne signálne molekuly. Schopnosť baktérií komunikovať a správať sa ako skupina pre spoločenské interakcie ako multibunkový organizmus priniesla významné výhody baktériám pri kolonizácii hostiteľa, tvorbe biofilmov, obrane proti konkurentom a adaptácii na meniace sa prostredie [19].

Zisťovanie kvóra sa objavuje ako neoddeliteľná súčasť regulačných sietí bakteriálnych génov, ktoré sú zodpovedné za adaptáciu baktérií v biofilmoch. Zistenie rozsiahleho využívania systémov snímania kvót v baktériách je rozhodujúcim faktorom pre vedenie výskumných pracovníkov pri skúmaní bakteriálneho mnohobunkového správania ako dôraz na jednotlivé bunkové biologické procesy. Avšak výskum o tom, ako baktériové snímanie kvóra funguje mechanicky v biofilmoch zaostáva. Jasnou výzvou pre túto oblasť je určiť, ktoré faktory biofilmu ovplyvňujú nástup citlivosti kvóra a následnú expresiu génov. Ďalšou kľúčovou úlohou je určiť funkčné dôsledky snímania kvóra vo viacerých druhoch biofilmov [20].

Rast biofilmu spôsobuje vznik významnej populácie baktérií s rôznorodým súborom fenotypov, často označovaných ako „varianty“. Tieto bakteriálne subpopulácie majú často vlastnosti, ktoré môžu byť prínosom pre celú komunitu. Napr. niektoré varianty nájdené u biofilmov *Pseudomonas aeruginosa* vykazujú buď zvýšenú schopnosť rozširovať alebo urýchľovať tvorbu biofilmu. Prítomnosť rôznych subpopulácií v komunite prežije v širšom spektre podmienok a potenciálnych problémov, ako by to bolo spoločenstvo pozostávajúce z jedinej genetickej alebo fenotypovej populácie. V biofilmoch *Pseudomonas aeruginosa* sa ukázalo, že niektoré varianty majú zvýšenú odolnosť voči

oxidačnému stresu. Stabilné varianty izolované z biofilmov priamo ovplyvňujúce rast biofilmu boli opísané aj v niekoľkých ďalších mikroorganizmoch, vrátane *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas putida*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* a dokonca aj u *Candida spp.* [21, 22].

SELEKČNÁ VÝHODNOSŤ BIOFILMU

Odolnosť biofilmu na antimikrobiálne látky

Od objavenia penicilínu v roku 1928 antibiotiká prešli veľkým vývojom pri liečbe akútnych bakteriálnych infekcií. Mikrobiológovia vedia určiť antibiotické účinky *in vivo* vyhodnotením minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIC) alebo minimálnej baktericídnej koncentrácie (MBC) *in vitro*. MIC a MBC posudzujú účinok antibiotík proti planktonickým organizmom v exponenciálnej rastovej fáze, a preto správne predpovedajú antibiotickú účinnosť proti rýchlo sa deliacim baktériám pri akútnych infekciách. Klinickí lekári, ktorí sa zaoberajú chronickými infekciami spojenými s biofilmom, vytvoreným napríklad na zdravotníckych prístrojoch alebo implantátoch, katédroch a pod., často nevyužívajú rovnaké liečebné postupy [23,24].

Obmedzená penetrácia antimikrobiálnych látok cez biofilmovú maticu môže v niektorých prípadoch prispieť k antimikrobiálnej tolerancii biofilmov. Hoci biofilmové matrice neinhibujú všeobecne difúziu antibiotík, obmedzená penetrácia antibiotík cez biofilmy sa môže vyskytnúť v prípadoch, keď sa antibiotiká viažu na zložky biofilmovej matrice alebo bakteriálnych membrán, ako je extracelulárna DNA alebo keď antibiotiká sú inaktivované enzýmami prítomnými v matrici, ako je beta-laktámová inaktivácia beta-laktamázami [25].

Diferenciálna fyziologická aktivita baktérií v biofilmoch je ďalšou základnou príčinou antimikrobiálnej tolerancie spojennej s biofilmom. Štúdie biofilmov *Pseudomonas aeruginosa* ukázali, že metabolická aktivita baktérií je vysoká vo vonkajšej časti biofilmu, zatiaľ čo je nízka vo vnútornej časti biofilmu [26].

Mnohé antibiotiká sú zamerané na procesy, ktoré sa vyskytujú v rastúcich baktériách (napr. replikácia, syntéza bunkovej steny), biofilmové baktérie s nízkou metabolickou aktivitou vykazujú zvýšenú antimikrobiálnu toleranciu voči týmto druhom antibiotík. Biofilmy môžu vykazovať antimikrobiálne tolerančné mechanizmy, ktoré môžu súvisieť s ex-

presiou niekoľkých špecifických génov v baktériách. Napríklad gén *ndvB* u *Pseudomonas aeruginosa* PA14, ktorý kóduje enzým, ktorý sa podieľa na syntéze periplazmatických glukánov, ktoré sa viažu na tobramycín a zabraňujú bunkovej smrti sekvestrovaním antibiotika [27].

Kombinácia antimikrobiálnych látok, najmä u pacientov s cystickou fibrózou sa bežne používa s cieľom predchádzať alebo oddialiť nástup rezistencie v prípade liečby infekcií súvisiacich s biofilmom. Keďže biofilmy sú bakteriálne komunity, ktoré vykazujú nielen rôzne štrukturálne oblasti, ale aj rôzne metabolické stavy. Na ich liečbu sa kombinujú niektoré antimikrobiálne látky (ako je ciprofloxacín, tobramycín alebo β -laktámy), ktoré napadajú metabolicky aktívne vrstvy s ďalšími (ako je kolistín), ktoré prednostne usmrcujú bunky biofilmu s nízkou metabolickou aktivitou [28].

Na eradikáciu stafylokokových biofilmov vytvorených na ortopedických implantátoch je účinná kombinovaná liečba klaritromycínom a daptomycínom. Kombinácia ceftarolín plus a daptomycín alebo vankomycín s fosfomycínom vykazujú silnú aktivitu proti MRSA produkujúcim biofilm [29]. Infekcie spôsobené biofilmami často odolávajú vyšším koncentráciám antibiotík. Vyskytlo sa mnoho prípadov biofilmových infekcií ohrozujúcich ľudské zdravie vrátane infekcií kostí, tkaniva dýchacích ciest a pľúc, srdcových tkanív, stredného ucha, gastrointestinálneho traktu, oka, urogenitálneho traktu, protetických pomôcok, katétrov, implantátov a zubných ochorení. Centrum pre kontrolu a prevenciu chorôb (CDC) uvádza, že biofilmy sa podieľajú na viac ako 65% nemocničných infekcií [22-24].

Rezistencia bakteriálnych biofilmov na dezinfekčné prostriedky

Spôsob rastu biofilmu indikuje mikrobiálnu odolnosť proti dezinfekcii, ktorá môže viesť k závažným ekonomickým a zdravotným problémom. Viacstranné interakcie sa tiež podieľajú na pretrvávaní patogénov na inertných povrchoch v medicínskom alebo priemyselnom prostredí. V takýchto prípadoch je biologická kontaminácia zariadenia spojená s nozokomiálnymi a potravinovými infekciami napriek častým a intenzívnym čistiacim a dezinfekčným postupom [30].

K odolnosti proti biocídom môže prispieť pomalý rast a indukcia stresovej reakcie sprostredko-

vanej rpoS. Fyzikálna a chemická štruktúra exopolysacharidov alebo iné aspekty architektúry biofilmu, by tiež mohli poskytnúť rezistenciu vylúčením biocídov z bakteriálnej komunity. Baktérie rastúce v biofilmoch môžu vyvinúť fenotyp rezistentný na biocíd, špecifický pre biofilmy. Vzhľadom na heterogénnu povahu biofilmu je pravdepodobné, že v rámci jednej komunity existuje niekoľko mechanizmov rezistencie. Výskumy začali objasňovať, ako a prečo mikrobiálne spoločenstvá na povrchu vytvárajú rezistenciu voči antimikrobiálnym látkam [31].

Hoci biocídy sú vysoko účinné na planktónnych baktériách, ich účinnosť vo vzťahu k priestorovo organizovaným biofilmom sa pripisuje mnohým faktorom, ktoré často pôsobia spoločne a ktoré zahŕňajú prítomnosť extracelulárnych polymérov, ktoré brzdia ich difúziu. Existuje tiež dôkaz, že medzidruhové interakcie v extracelulárnej matici zvyšujú toleranciu voči dezinfekčným prostriedkom pozorovaným pri biofilmoch s jedným kmeňom. Avšak špecifické mechanizmy, ktoré sú základom tejto tolerancie, sú stále slabo pochopené a ich objasnenie je zložité kvôli zložitosti a rôznorodosti týchto bioštruktúr [31].

Medzidruhové interakcie môžu v biofilme priňať ekologické výhody. Priestorová organizácia a stratifikácia nekompatibilných baktérií, ako sú aeróbne nitrifikátory a anaeróbne denitrifikátory, umožňujú ich ko-metabolizmus a degradáciu toxických zlúčenín. Antropocentrický negatívny vplyv interakcií medzi druhmi sa odráža v biofilmoch súvisiacich s chronickými infekciami. Kolonizácia natívnymi tkanivami ako sú pľúca pacientov s cystickou fibrózou, chronické rany alebo močový trakt, viacerými patogénnymi druhmi, často vyvoláva závažnejšie infekcie. Napr. koinfekcia spôsobená *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* spomaľuje hojenie rán a vyvoláva zápalovú odpoveď hostiteľa. Podobne virulencia *Staphylococcus aureus* je indukovaná v prítomnosti *Pseudomonas aeruginosa* alebo huby *Candida albicans* [32].

ZÁVER

Selekčný tlak, ktorý odborná verejnosť obvykle automaticky zaraďuje do pôsobnosti výskumu evolučnej biológie, veľmi výrazne pôsobí i na úrovni mikroorganizmov. V priebehu posledných desaťročí sme svedkami výrazného nárastu rezistencie mikroorganizmov voči antibiotikám, ktorý je dôsledkom negatívnej selekcie kmeňov, ktoré boli

senzitívne na použité antibiotiká a ich postupného nahradenia rezistentnými kmeňmi. Veľmi významnú podpornú úlohu vo vývoji rezistencie mikroorganizmov zohráva biofilm, ktorý poskytuje nielen účinnú ochranu pred negatívnymi vonkajšími vplyvmi, ale aj vhodné životné prostredie potrebné pre jeho rast a prežitie. Súčasný interdisciplinárny výskum založený na genetických analýzach, mikroskopické pozorovania a štúdie génovej expície, vyústil do pokročilých vedomostí o molekulárnom a genetickom základe vývoja a prežitie biofilmu. Veľa súvislostí však naďalej zostáva neobjasnených.

Nakoľko biofilmy môžu byť nebezpečné pre ľudský zdravie, je nevyhnutné prijímať vhodné a účinné opatrenia na ich prevenciu a elimináciu. Je to nekončiaci proces, v ktorom má veľký význam aj vzdelávanie zdravotníckych a laboratórných pracovníkov.

Pod'akovanie

Tento príspevok vyšiel s podporou projektu VEGA č. 1/0431/18 „Vzťah medzi zložením, štruktúrou a vlastnosťami anorganicko-organických nanokompozitných vrstiev pre ochranu materiálov“.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] GARRETT T.R., BHAKOO M., ZHANG Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*. 2008; 18 (9): 1049-1056.
- [2] GRANT S., HUNG D. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*. 2013; 4: 273-283.
- [3] CIOFU O., ROJO-MOLINERO E., MACIÀ M.D., et al. Antibiotic treatment of biofilm infections. *APMIS*. 2017; 125 (4): 304-319.
- [4] WATNICK K., KOLTER R. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol*. 2000; 182: 2675-2679.
- [5] DAVIES D.G., GEESEY G.G. Regulation of the alginate biosynthesis gene alg C in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*. 1995; 61: 860-867.
- [6] CHARACKLIS W.G., MARSHAL K.C. *Biofilms*. John Wiley and Sons, New York. 1990. Pages 816. ISBN 13 9780471826637.
- [7] SERRA D.O., HENGGE R. Stress responses go three dimensional – the spatial order of physiological differentiation in bacterial macrocolony biofilms. *Environ Microbiol*. 2014; 16: 1455-1471.
- [8] JASS J., SURMAN S., WALKER J.T. *Medical Biofilms: Detection, Prevention and Control*. 1st Edition. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England. John Wiley & Sons Ltd., 2003. Pages 304. ISBN 978-0-471-98867-0.
- [9] DONLAN R.M., et al. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology*. 2002; 15 (2): 167-193.
- [10] DISTEL J.W., HATTON J.F., GILLESPIE M.J. Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *Journal of Endodontics*. 2002; 28 (10): 689-693.
- [11] LEE K., YOON S.S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm a Programmed Bacterial Life for Fitness. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2017; 27 (6): 1053-1064.
- [12] ROWLAND B.M. Bacterial contamination of dental unit waterlines: what is your dentist spraying into your mouth? *Clin Microbiol Newslett*. 2003; 25: 73-77.
- [13] O'TOOLE G., KAPLAN H.B., KOLTER R. Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*. 2000; 54: 49-79.
- [14] KIM K.Y., FRANK J.F. Effect of nutrients on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel. *J Food Protect*. 1995; 58: 24-28.
- [15] LANDINI P., ZEHNDER A.J. The global regulatory hns gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol*. 2002; 184 (6): 1522-1529.
- [16] GORSKI L., PALUMBO J.D., MADRELL R.E. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69 (1): 258-266.
- [17] HOMMAIS F., LAURENT-WINTER C., LABAS V., et al. Effect of mild acid pH on the functioning of bacterial membranes in *Vibrio cholerae*. *Proteomics*. 2002; 2 (5): 571-579.
- [18] STOODLEY P., DODDS I., DE BEER D., et al. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol*. 1998; 85: 19S-28S.
- [19] YUNG-HUA L., XIAOLIN T. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms. *Sensors (Basel)*. 2012; 12 (3): 2519-2538.

- [20] BRACKMAN G., COS P., MAES L., et al. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics *in vitro* and *in vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55: 2655-2661.
- [21] YARWOOD J.M., et al. Generation of Virulence Factor Variants in *Staphylococcus aureus* Biofilms. *J Bacteriol.* 2007; 189 (22): 7961-7967.
- [22] DAVEY M.E., O'TOOLE G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64: 847-867.
- [23] KURAMITSU H.K., HE X., LUX R., et al. Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Rev.* 2007; 71: 653-670.
- [24] HOGAN D., KOLTER R. Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Curr Opin Microbiol.* 2002; 5: 472-477.
- [25] CHIANG W.C., NILSSON M., JENSEN P.O., et al. Extracellular DNA shields against aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57: 2352-2361.
- [26] WALTERS M.C., ROE F., BUGNICOURT A., et al. Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 317-323.
- [27] HENGZHUANG W., HOIBY N., CIOFU O. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of antibiotics in biofilm infections of *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and *in vivo*. *Methods Mol Biol.* 2014; 1147: 239-254.
- [28] DORING G., FLUME P., HEIJERMAN H., et al. Treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis: current and future strategies. *In J Cyst Fibros.* 2012; 11: 461-479.
- [29] SHI J., MAO N.F., WANG L., et al. Efficacy of combined vancomycin and fosfomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilms *in vivo*. *PLoS ONE.* 2014; 9: e113133.
- [30] ABDALLAH M., BENOLIEL C., DRIDER D., et al. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch. Microbiol.* 2014; 196 (7): 453-472.
- [31] BRIDIER A., BRIANDET R., THOMAS V., et al. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling.* 2011; 27 (9): 1017-1032.
- [32] PASTAR I., NUSBAUM A.G., GIL J., et al. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS ONE.* 2013; 8: e56846 .