

Obstojnost biofilmov

Biofilm Stability

Štefan **PINTARIČ**

POVZETEK

Nastajanje biofilmov predstavlja posebne razmere, ki omogočajo mikroorganizmom, da so obstojni na površinah ob običajnih postopkih sanitacije. S tem se povečuje tako možnost kontaminacije površin kot tudi njihovega raznosa v hrano. Lahko pa pride tudi do vnosa mikroorganizmov z biofilmom v organizem ljudi in živali, s čemer povzroči težave pri postoperativnih stanjih ali drugih posegih. V članku predstavljam značilnosti biofilmov z njihovimi lastnostmi, ki so potrebne za pravilen pristop in uspeh sanitacije.

KLJUČNE BESEDE:

Biofilm, Sanitacija, Dezinfekcija

ABSTRACT

Biofilm generation presents special circumstances that allow microorganisms to persist in areas with normal procedures for sanitation. This increases both the risk of contamination of surfaces as well as their costume in food. You can also occur with the introduction of micro-organism in biofilms in humans and animals, thus cause difficulty in postoperative states or other interventions. The article presents the characteristics of biofilms with their properties, which are necessary for the correct approach and the success of sanitation.

KEY WORDS:

Biofilm, Sanitation, Disinfection

Received: 17. 9. 2010
Accepted: 16. 10. 2010

Univerza v Ljubljani,
Veterinarska fakulteta,
Inštitut za higieno okolja in živali z
etologijo,
Gerbičeva 60, 1000 Ljubljana
e-mail: stefan.pintaric@vf.uni-lj.si

UVOD

Biofilmi so heterogene mikrobne združbe, ki so se uspele prilagoditi različnim življenjskim razmeram. Predvsem njihova mikrobna heterogenost in sposobnost ustvarjanja eksopolisaharidne zaščitne plasti, pripomore k njihovi stabilnosti. Odstranjevanje biofilmov s površin je zaradi njihove obstojnosti na različne vplive še vedno težavna naloga. Čeprav poznamo preko 150 spojin, ki imajo biocidni učinek, le redki izmed njih učinkovito odstranjujejo strukturo biofilmov, k čemur pripomore tudi prisotnost nečistoče. Njihova pogosta prisotnost predstavlja za ljudi in živali nevarnost kontaminacije živil in surovin, saj se postopki sanitacije izvajajo rutinsko. Za uspešno zoperstavljanje organiziranim mikrobnim združbam je pomembno, da poznamo mehanizme nastajanja biofilmov, da se jim lahko zoperstavljamo.

GLAVNE ZNAČILNOSTI BIOFILMOV

Za uspešno zoperstavljanje organiziranim mikrobnim združbam je pomembno, da poznamo mehanizme nastajanja biofilmov, da se jim lahko zoperstavljamo.

Biofilm se lahko v laboratorijskih razmerah dnevno razširi za nekaj milimetrov.

Biofilm so tanke plasti na površinah, sestavljene iz hranilnih snovi in mikroorganizmov. Proces nastajanja biofilma je postopen. Pogosteje zasledimo nastajanje biofilma na površinah, ki jih oblivajo tekočine. Hitrost nastajanja biofilma je večja s povečevanjem koncentracije hranilnih snovi v tekočinah. Pri tem se povečuje nalaganje hranilnih snovi na površinah. Kmalu za tem se zaradi elektrostatičnih privlačnih sil začnejo površinam približevati mikroorganizmi, ki se hitro utrdijo na hranilni površini tudi s pomočjo mikrobnih organelov. Po neločljivi pritrditvi na površini so nekateri mikroorganizmi sposobni ustvariti zaščitne plasti iz eksopolisaharidov, s katerimi se obvarujejo pred škodljivimi vplivi okolice, kar je tudi razlog za otežene postopke čiščenja, dezinfekcije in delovanja antibiotikov. Se pa hitrost nalaganja hranilnih snovi na površini poveča, če je biofilm na površinah že prisoten [1].

Poleg zaščitne vloge imajo eksopolisaharidi pomembno vlogo pri zadrževanju hranilnih snovi, potrebnih za vzdrževanje in širjenje biofilma. Biofilm se lahko v laboratorijskih razmerah dnevno razširi za nekaj milimetrov. Na širitev in velikost biofilma vpliva sestava mikrobne populacije in sožitje mikroorganizmov. V raziskavah ugotavljajo, da so biofilmi z eno vrsto mikroorganizmov površinsko manjši in manj obstojni [1,2].

K nalaganju mikroorganizmov na površino pripomorejo tudi fizikalno-kemijske razmere. S preučevanjem specifičnih mikroorganizmov so ugotovili vpliv pH in temperature na nalaganje na površine. Najugodnejše pH vrednosti za nalaganje *Pseudomonas fragi* so med 7 in 8. Podobno so ugotovili pri *Yersinii enterocolitici* in *Listerii monocytogenes*. Optimalna temperatura za nalaganje *Yersiniae enterocolitice* na površine iz nerjavne pločevine je 21 °C. Pri temperaturi 35 °C kot pri 10 °C je bilo nalaganje manjše. Podobne ugotovitve navajajo v raziskavi, kjer so preučevali vpliv temperature na nalaganje mikroorganizma *Deleya mariana*. Ugotovljena optimalna temperatura za nalaganje na površino je 25 °C. Slabšo adhezijo ugotavljajo pri 19 °C in 37 °C [1].

Čeprav eksopolisaharidna zaščitna plast varuje mikroorganizme pred zunanjimi vplivi, je prepustna za transport hranilnih snovi in kisika iz

okolice. V nasprotni smeri, pa vrača razgradne snovi in ogljikov dioksid. Z raziskavami strukture mikrokolonij v biofilmu so ugotovili obstoj t.i. vodnih kanalčkov, preko katerih se vrši transport hranilnih snovi in plinov v mikrokolonije. Z rastjo biofilma se začnejo spreminjati razmere v njem. Debelitev biofilma otežuje prehajanje kisika, pri čemer se postopoma v spodnjih plasteh ustvarjajo anaerobni pogoji [2].

V procesih razvoja biofilma se deli biofilma lahko oddvojijo od površine in se preselijo na nova mesta. Da se določen del biofilma lahko oddvoji je potreben učinek encimov. Procesom oddvajanja od površine pripomorejo intenzivnost pretoka in vrtinčenje tekočin na površini biofilma, prisotnost kemičnih snovi v tekočini in spremembe na površini materiala, na katerem je biofilm. Sproščeni mikroorganizmi se s pomočjo tekočinskega toka preselijo na novo lokacijo, kjer se začnejo novi procesi nastajanja biofilma [3,4].

Zaradi mešane mikrobne združbe bi pričakovali, da so procesi, ki se odvijajo v biofilmu, naključni. Vendar je proces nastajanja biofilma natančen in gensko uravnan. V številnih genetskih in molekularnih raziskavah skušajo razvozlati mehanizem nastajanja biofilma. Z razumevanjem teh mehanizmov raziskovalci pričakujejo, da bodo lahko ciljno pristopili k reševanju problematike nastajanja biofilma. V poskusu avtorjev, kjer so uporabili *Streptococcus mutans*, so preučevali pomen posameznih genov pri nastajanju biofilma. Z inaktivacijo posameznih genov, so ugotovili njihov pomen pri nastajanju biofilma. Podobne navedbe zasledimo pri preučevanju nastajanja biofilma *E. coli* in *Actinobacillus actinomycesetemcomitans*. Preučevanje nastajanja biofilma pri *Bacillus subtilis* kaže, da je proces krmiljen s sporulacijskim transkripcijskim faktorjem, ki je bistven pri sporulacijskih procesih. Z mutacijo regulatorja opažajo poleg nesposobnosti sporulacijskih procesov tudi nesposobnost ustvarjanja biofilma, mutiranega *B. subtilis*. Podobne raziskave so bile opravljene tudi na *E. coli*, kjer so z mutacijo gena dosegli nesposobnost pritrjevanja na površino. Ustvarjanje biofilma je tudi razlog za odpornost pri zdravljenju okužb s *Candida albicans*, in zdravljenju cistične fibroze, tvorbi biofilma pri *Pseudomonas aureofaciens*, in pri *Vibrio cholerae* [3,4,5,6].

Vendar pa je začetek nastajanja biofilma odvisen od vpliva okolja, v katerem se mikroorganizmi znajdejo. Vplivi okolja v nekaterih mikroorganizmih pod nadzorom genov sprožijo nastajanje kinolonskih in homoserinskih laktonskih spojin, ki vplivajo na nastajanje biofilma. Sproščanje kinolonov in homoserinskih laktonov omogoča, da se pri sosednjih mikroorganizmih sočasno odvijajo enake aktivnosti (razmnoževanje, ustvarjanje virulence, ustvarjanje metabolitov idr.), kar je pomembno za obstoj samega biofilma [7].

VPLIVI BIOFILMOV

Veliko raziskav je usmerjenih v preučevanje pomena bakterijskih biofilmov, saj predstavljajo v industrijskih procesih resen problem. Težave se kažejo v mehanski ovirah, slabšanju prevajanja toplote, biološkem obremenjevanju kovinskih delov opreme in delov iz umetnih snovi z mikroor-

Debelitev biofilma otežuje prehajanje kisika, pri čemer se postopoma v spodnjih plasteh ustvarjajo anaerobni pogoji.

Proces nastajanja biofilma je natančen in gensko uravnan.

Začetek nastajanja biofilma je odvisen od vpliva okolja, v katerem se mikroorganizmi znajdejo.

Poleg obremenjevanja vode z mikroorganizmi, pripomore biofilm k večjim izgubam energije ob gretju vode in večjim obremenitvam strojne opreme pri uporabi filtrov v živilskopredelovalni industriji.

Rezultati raziskave francoskih avtorjev so pokazale, da prisotnost biofilma poleg bakterijskih okužb lahko povzroča tudi izločanje endotoksinov ob izvajanju dialize.

ganizmi, kar pomeni posebej v živilski industriji možnost kontaminacije živil z mikroorganizmi [7].

Zaradi svoje zgradbe se biofilm zoperstavlja delovanju zunanjih vplivov. Vzroki za njegovo trdovratnost so:

- ustvarjanje eksopolisaharidne plasti, ki varuje mikroorganizme pred zunanjimi vplivi,
- kemična reakcija in fizikalna absorpcija eksopolisaharida z biocidi povzroči inaktivnost biocidov in s tem njegovo neučinkovitost,
- prisotnosti hranilnih snovi, ki so potrebne za njegov obstoj in
- gensko uravnan proces pritrjevanja mikroorganizmov na površino.

Biofilm nastaja tudi v vodovodnem sistemu, posebej na mestih, kjer je pretok vode upočasnen oziroma je občasno prekinjen. Rezultati študij kažejo, da niti visoke količine preostalega klora v vodi ne pripomorejo k preprečitvi nastajanja biofilma. V nadaljevanju ugotavljajo, da poleg obremenjevanja vode z mikroorganizmi, pripomore biofilm k večjim izgubam energije ob gretju vode in večjim obremenitvam strojne opreme pri uporabi filtrov v živilskopredelovalni industriji [8].

Biofilmi povzročajo resne zaplete tudi pri presajanju ortopedskih inplantatov. Tako je poleg priprave imunskega sistema organizma bila potrebna kompleksna antibiotična terapija z namenom preprečiti postoperativne komplikacije. Zato so v inplantate iz polimetilmetakrilata dodajali antibiotike, ki so se sproščali v nizkih odmerkih. Ugotovili so, da je sproščanje nizkih koncentracij antibiotikov pri bolnikih z inplantati vzrok za rezistenco na številne antibiotike [9,10].

Vzroke trdovratnih vnetij srednjega ušesa pri otrocih pripisujejo tudi biofilmu, ki ga ustvari *Hemophylus influenzae*. V poskusu so uporabili činčile, ki so jih okužili s kulturo mikroorganizmov izoliranih iz ušesa otrok. Ko so na činčilah ugotovili vnetje sluhovoda, so na njegovi površini dokazali prisotnost biofilma, ki ga je povzročil *Hemophylus influenzae*. Ameriški avtorji poročajo o pomenu biofilma *Mycobacterium chelonae* in *Methylobacterium mesophilicum*, ki je prisoten na površini endoskopov. V večjih zdravstvenih ustanovah potekajo postopki čiščenja in razkuževanja endoskopov v samodejnih čistilnih sistemih. Ugotavljajo, da samodejni higienizacijski sistemi raznašajo *M. chleoneae* in *M. mesophilicum* na površino endoskopov. Zato za zaključek sanitacije priporočajo uporabo perocetne kisline kot sredstva za razkužbo endoskopov. Prisotnost biofilma lahko povzroči resne zaplete pri cevni sistemih dializnih aparatov. Rezultati raziskave francoskih avtorjev so pokazale, da prisotnost biofilma poleg bakterijskih okužb lahko povzroča tudi izločanje endotoksinov ob izvajanju dialize [11,12].

Prisotnost biofilmov igra pomembno vlogo pri koroziji materialov. Navedbe madžarskih avtorjev govore o pomenu sulfreduktornih mikroorganizmov pri koroziji materialov. Ob preučevanju vpliva tekoče in stoječe pitne vode na cevi iz nerjavnega materiala so ugotavljali prisotnost kovinskih ionov, predvsem železa, molibdena, niklja in kroma. Omenjeni ioni so bili prisotni v biofilmih, ki so se ustvarili na površini nerjavnega

materiala v primeru stoječe in tekoče vode, le da je bila koncentracija ionov višja pri stoječi vodi [13,14].

KAKO UGOTOVITI PRISOTNOSTI BIOFILMA

Pri ugotavljanju prisotnosti biofilma za raziskovalne kot praktične namene uporabljamo glede na njegovo obstojnost na površini, več metod. Za preučevanje biofilmov v raziskavah uporabljamo invazivne in neinvazivne metode. Z invazivnimi metodami grobo posežemo v strukturo biofilma. Namen teh metod je določiti prisotnost mikroorganizmov (kvantitativno) oziroma ugotoviti vrsto mikroorganizmov (kvalitativno). Bistvo neinvazivnih metod je preučevanje biofilma in pri tem ne poškodovati njegove strukture. Tovrstne metode omogočajo raziskovalcem preučevanje procesov, ki se odvijajo v biofilmu. Pri tem najpogosteje uporabljamo konfokalno lasersko mikroskopijo, magnetno resonanco, elektronsko mikroskopijo in druge [15].

Za ugotavljanje prisotnosti biofilma v praksi, uporabljamo brise za določanje prisotnosti mikroorganizmov na površinah, UV svetilke za ugotavljanje fluorescence beljakovinskih snovi in določanje vrednosti ATP z metodo bioluminiscence. Slednja dobiva vse večji praktični pomen predvsem v živilsko predelovalni industriji za takojšnje ugotavljanje higienskega stanja površin pred začetkom proizvodnega procesa [16].

METODE ODSTRANJEVANJA BIOFILMA

V mnogih raziskavah so preučevali možnosti odstranjevanja biofilma. V grobem jih lahko razdelimo na fizikalne, kemične in biološke.

Fizikalne metode odstranjevanja biofilma

Pri odstranjevanju biofilmov so raziskovalci uporabljali številne fizikalne metode, kot so super visoki magnetni valovi, ultrazvok, visoke električne pulzacije, vendar brez večjega uspeha. Fizikalne načine odstranjevanja biofilma so dopolnjevali z uporabo antibiotikov in s tem dosegli boljšo učinkovitost pri odstranjevanju biofilma.

Ponovno lahko opazimo dela avtorjev, kjer so preučevali učinek visokotlačnega čiščenja. Na površini z biofilmom *Pseudomonas aeruginosa* in *Staphylococcus aureus* so uporabljali različne tlake. Ugotovili so, da pri čiščenju z delovnimi tlaki 34,5 bar, 51,7 bar in 68,9 bar ni značilnih razlik v primerjavi z delovnim tlakom 17,2 bar. Preučili so tudi vpliv oddaljenosti šobe od površine za doseganje največjega čistilnega učinka. Razdalja naj bi bila med 125 mm in 250 mm od površine. Zanimal jih je tudi vpliv časa pri postopku čiščenja. V tem so uporabljali delovni tlak 17,2 bar in ugotavljali učinek časa na biofilm. Ugotovitve kažejo, da ni značilnih razlik, če se s tlačno šobo zadržujejo na mestu čiščenja 1 ali 10 sekund. Tudi če so za čiščenje uporabljali alkalne, kisle ali nevtralne detergente niso ugotovili boljšega učinka pri odstranjevanju biofilma s površine.

V raziskavah so raziskovalci preučevali vpliv hrapavosti površin in nastajanje biofilma v živilskopredelovalni industriji, ki jih predpisuje evrop-

Za preučevanje biofilmov v raziskavah uporabljamo invazivne in neinvazivne metode.

Tudi če so za čiščenje uporabljali alkalne, kisle ali nevtralne detergente niso ugotovili boljšega učinka pri odstranjevanju biofilma s površine.

ska direktiva EEC 93/43. S prisotnostjo testnih mikroorganizmov so ugotavljali razlike pri čiščenju površin različne kakovosti, ki jih priporoča omenjena direktiva. Ugotovili so, da pri čiščenju površin, ki jih predpis priporoča za stene in tla, ni značilnih odstopanj. V nadaljnjih raziskavah poročajo, da je vrsta nečistote glavni dejavnik, ki vpliva na uspešnost čiščenja [13].

Kemijske metode odstranjevanja biofilma

V veliki meri je učinek razkužil odvisen od števila mikroorganizmov. Čim več jih je, tem slabši bo učinek dezinficijensov. Poleg števila mikroorganizmov ima pomembno vlogo tudi debelina nastalega biofilma. Raziskovalci tudi ugotavljajo, da se z naraščanjem debeline biofilma znižuje učinek razkužil. Raziskovalci prav tako ugotavljajo, da čiščenje in razkuževanje nista zadostna pri preprečevanju in odstranjevanju biofilma, ki nastaja na površinah.

Učinek razkužil je odvisen tudi od adhezije mikroorganizmov na površino, kar je potrebno upoštevati pri testiranju ustreznosti in učinkovitosti dezinfekcijskih sredstev. Če mikroorganizmi niso pritrjeni na površino, je učinek dezinficijensa neprimerno boljši. Zato je potrebno mehanično ali kemično zlomiti polisaharidno zaščito biofilma, ki ščiti mikroorganizme pred zunanjimi vplivi. Avtorji navajajo detergente, ki učinkujejo na polisaharidno zaščito in vsebujejo kelatna sredstva, kot so EDTA in etilen glikol-bis (β -aminoetil) eter. Sposobnost odstranjevanja biofilma so ugotovili tudi pri nekaterih razkužilih kot npr. perocetna kislina, klorne spojine, jodove spojine in vodikov peroksid. Pri odstranjevanju biofilma igrajo pomembno vlogo tudi pH razkužila. Značilne učinke na odstranjevanje biofilma *L. monocytogenes* so ugotovili pri vrednosti pH razkužil med 11,6 in 12,5, kar avtorji navajajo kot pomemben dejavnik sanitacije v živilsko predelovalni industriji.

V zadnjem času se vse bolj uveljavlja elektrookisgenirana voda. Zaradi svojega edinstvenega delovanja, enostavnosti uporabe in nizke toksičnosti za okolje, jo vse bolj uporabljamo tudi za odstranjevanje biofilmov. Svojo uporabnost kaže na vseh področjih živilorejske proizvodnje, posebej pri odstranjevanju trdovratnih oblik biofilmov iz cevni in napajalnih sistemov (npr. *Legionella spp.*) [15].

Biološke metode odstranjevanja biofilma

Na upočasnitev rasti biofilmov in njihovo odstranjevanje vplivajo tudi naravni furani, ki jih izloča alga *Delisea pulchra*. Med biološke načine delovanja na biofilm prištevamo tudi selektiven učinek zaščitnih starterških kultur pridobljenih iz mleka, ki zavirajo rast nekaterih patogenih mikroorganizmov v perutninskih rejah. Zasedimo lahko tudi objave raziskovalcev, ki mikroorganizme uporabljajo ob ekoloških katastrofah izlitja nafte oziroma pri obdelavi odpadnih produktov iz naftne industrije z namenom znižati obremenjevanje okolja.

Učinek razkužil je odvisen tudi od adhezije mikroorganizmov na površino, kar je potrebno upoštevati pri testiranju ustreznosti in učinkovitosti dezinfekcijskih sredstev.

Značilne učinke na odstranjevanje biofilma *L. monocytogenes* so ugotovili pri vrednosti pH razkužil med 11,6 in 12,5, kar avtorji navajajo kot pomemben dejavnik sanitacije v živilsko predelovalni industriji.

Odstranjevanje biofilma z encimi

Med biološke načine odstranjevanja biofilmov uvrščamo tudi uporabo encimov. Encimi so naravni katalizatorji, zgrajeni iz beljakovinskih molekul, in jih najdemo v vseh živih bitjih od mikroorganizmov, rastlin, živali in ljudi. Uporabo encimov najpogosteje zasledimo v živilskopredelovalni industriji, pri proizvodnji papirja in tekstilni industriji.

Vedno pogosteje so sestavni del čistilnih sredstev. Encimi so zanimivi zaradi učinkovitega delovanja pri nizkih temperaturah, delujejo v nizkih koncentracijah, so razgradljivi in razpadejo v naravi prijazne razgradne snovi. Po čiščenju z encimskimi sredstvi je površine potrebno temeljito sprati z vodo, s čimer preprečimo obremenjevanje živil z encimi (npr. proteolitičnimi), kar bi vplivalo na organoleptične in kvalitativne lastnosti živila. Kljub temu pa je uporaba encimov še nekoliko omejena predvsem zaradi njihove visoke cene in specifičnega delovanja. Zaradi heterogene sestave nečistot in biofilmov je potrebno uporabiti encimske mešanice, ki bodo delovale na vse sestavine nečistot.

POVZETEK

S prisotnostjo biofilmov se pogosto srečujemo v veterini, medicini, številnih industrijskih panogah in vsakdanjem življenju. Pri njihovem odstranjevanju je pomembno, v kakšnem okolju nastanejo. Tako ni vseeno, ali se srečujemo z biofilmom v veterinarski medicini, papirni ali mlečno-predelovalni industriji. Pri kontroli nastajanja biofilma je namreč pomembno kakšni mikroorganizmi in mehanizmi pripomorejo k nastanku biofilmov. Glede na to se odločamo o izbiri sredstev za odstranjevanje biofilma s površin. V postopkih čiščenja vedno pogosteje srečujemo uporabo encimskih čistilnih sredstev. Z encimskimi čistilnimi sredstvi bolj ciljno delujemo na posamezno vrsto nečistot (mlečne beljakovine, celulozo, maščobe, ...) in pri nižjih temperaturah čiščenja. Uporabljamo jih v nižjih koncentracijah in so zaradi hitrega razpada encima ekološko prijaznejša. Seveda pri čiščenju uporaba encimskih sredstev ne nadomešča mehaniskega učinka in časa, ki sta pomembna dejavnika uspešnega čiščenja.

Pri odstranjevanju biofilmov lahko uporabimo sredstva iz skupine biocidov, ki sproščajo kisik. Svojo učinkovitost pa je pokazal tudi biocid, ki ga pridobimo iz elektrooksidirane vode. S svojim širokim spektrom delovanja, enostavno uporabnostjo, brez posebne osebne zaščite, ekološke čistosti, in tudi možnosti izvajanja razkužbe ob prisotnosti živali. Perspektivni potencial se kaže v uporabi ob razkužbah cevni sistemov (katetrov, sond, vodovodnih sistemov), razkuževanju površin, saj jih ni potrebno spirati s površin, lahko jih uporabimo tudi za hladno zamegljevanje prostorov in operacijskih dvoran. Ker ni škodljiva za celice višjerazvitih organizmov pa se varnost uporabe pri nadzoru prisotnosti biofilmov še toliko bolj poveča.

Med biološke načine delovanja na biofilm prištevamo tudi selektiven učinek zaščitnih starterskih kultur pridobljenih iz mleka, ki zavirajo rast nekaterih patogenih mikroorganizmov v perutninskih rejah.

LITERATURA

- [1] Characklis W, Marshall K. Nonculturable microorganisms in the environment. Washington: ASM Press, 2000: 113-31.
- [2] Bhagwat SP, Nary J, Burne RA. Effects of mutating putative two-component systems on biofilm formation by *Streptococcus mutans* UA159. *Fems Microbiol Lett* 2001; 205 (2): 225-30.
- [3] Li YH, Hanna MN, Svensater G, Ellen RP, Cvitkovitch DG. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J Bacteriol* 2001; 183 (23): 6875-84.
- [4] Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002; 184 (1): 290-301.
- [5] Prigent-Combaret C, Vidal O, Dorel C, Lejeune P. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol* 2001; 183 (24): 7213-23.
- [6] Fong KP, Chung WSO, Lamont RJ, Demuth DR. Intra- and interspecies regulation of gene expression by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LuxS. *Infect Immun* 2001; 69 (12): 7625-34.
- [7] Branda S, Gonzales-Pastor J, Ben-Yehuda S, Losick R, in Kolter R. Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98 (20): 11621-6.
- [8] Hamon MA, Lazazzera BA. The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2001; 42 (5): 1199-209.
- [9] Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol* 2001; 9 (12): 591-6.
- [10] Goldberg J, Pier G. The role of the CFTR in susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Trends Microbiol* 2000; 8: 514-20.
- [11] Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 2001; 413 (6858): 860-4.
- [12] Monds RD, Silby MW, Mahanty HK. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Mol Microbiol* 2001; 42 (2): 415-26.
- [13] Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (4): 999-1007.
- [14] De Kievit T, Gills R, Marx S, Brown C, Iglewski B. Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (4): 1865-73.
- [15] Taormina PJ, Beuchat LR. Survival of *Listeria monocytogenes* in commercial food- processing equipment cleaning solutions and subsequent sensitivity to sanitizers and heat. *J Appl Microbiol* 2002; 92 (1): 71-80.
- [16] Ren DC, Sims JJ, Wood TK. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. *Environ Microbiol* 2001; 3 (11): 731-6.