

Bojana Vujović^{1*}, Željka Rudić¹, Igor Kljujev²,
Dobrica Rajković², Mile Božić¹, Vera Raičević²

¹Institut za vodoprivredu Jaroslav Černi, Beograd – Pinosava,
Srbija, ²Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, Beograd –
Zemun, Srbija

Naučni rad

ISSN 0351-9465, E-ISSN 2466-2585

UDC:631.497

doi: 10.5937/ZasMat1603449V



Zastita Materijala 57 (3)

449 - 454 (2016)

Potencijal formiranja biofilmova *Pseudomonas aeruginosa* iz životne sredine

IZVOD

Stvaranje biofilmova predstavlja jednu od glavnih osobina *Pseudomonas aeruginosa* koja omogućava ovoj bakteriji preživljavanje u različitim, često nepovoljnim uslovima životne sredine. Međutim, formiranje biofilmova predstavlja i faktor rizika u mnogim oblastima industrije, posebno prehrambene, pošto prisustvo čvrstih površina pruža dobre uslove za formiranje biofilma. Kako je poznato da izolati *P. aeruginosa* koji potiču iz različitih uzoraka poreklom iz životne sredine imaju različit potencijal da formiraju biofilme, u ovom radu je ispitana sposobnost formiranja biofilmova četiri izolata ove bakterije i izvršena njihova klasifikacija u odnosu na ovu osobinu. Primenjen je statički test u mikrotitar pločama u trajanju od 24 sata u različitim uslovima temperature (37°C i 22°C), pH (6 i 7) i koncentracije NaCl (1 i 2%). Dobijeni rezultati su pokazali da izolati *P. aeruginosa* imaju različitu sposobnost da formiraju biofilme, da je masa formiranih biofilmova bila veća na 22°C, kao i da promenjeni uslovi sredine nisu inhibirali stvaranje biofilmova.

Ključne reči: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilmovi, statički model.

1. UVOD

P. aeruginosa je Gram-negativna, štapičasta, asporogena monotriha dužine 1 - 5 μm, dijametra 0,5 - 1,0 μm, široko rasprostranjena u različitim sredinama. Sposobnost korišćenja širokog spektra organskih jedinjenja kao izvora hrane, omogućava ovoj bakteriji da kolonizuje i ekološke niše u kojoj su hranljive materije limitirane. *P. aeruginosa* je prisutna u sredinama kao što su zemljište, voda, ljudski i životinjski organizmi, biljke, otpad i bolnice [1]. Jedna od osnovnih taksonomskih karakteristika ove bakterije je produkcija pigmenata rastvorljivih u vodi, a najpoznatiji su piocijanin plavo-zelene boje, pioverdin žuto-zelene i piorubin crveno-braon boje. Takođe, jedna od značajnih identifikacionih karakteristika bakterije je karakterističan miris (miris grožđa ili cveta lipe) poreklom od 2-aminoacetofenona. *P. aeruginosa* oksiduje glukozu bez pojave gasa, laktoza-negativna je, oksidaza i katalaza pozitivna. *P. aeruginosa* je obligatan aerob, sa mogućnošću i anaerobne respiracije, koristeći nitrata

ili druga jedinjenja kao akceptore elektrona. Optimalna temperatura rasta je na 42°C, i ova karakteristika uz produkciju piocijanina je osnovna razlika između vrste *P. aeruginosa* i drugih *Pseudomonas* spp. Sposobnost formiranja biofilmova je jedna od glavnih kompetitivnih prednosti *P. aeruginosa* u preživljavanju različitih uslova spoljašnje sredine, otpornosti na delovanje različitih antimikrobnih agenasa [2] i virulencije. Mikroorganizmi imaju prirodnu sklonost da se pričvrste za vlažnu površinu, multiplikuju i grade glikokaliks pretežno od mikrobnih egzopolisaharida (EPS) uz dodatak proteina, nukleinskih kiselina, lipida, jona i ćelijskih ostataka formirajući biofilme [3,4]. Glikokaliks je od velike važnosti za bakterije i pruža im zaštitu od spoljašnjih uticaja, kao što su isušivanje i antimikrobni agensi, ali može poslužiti i kao rezervoar nutrijenata [5].

Biofilmovi predstavljaju dobro organizovane zajednice mikroorganizama. U prirodi se javljaju kao monospecijski, izgrađeni iz jedne bakterijske vrste, ili kao zajednice velikog bakterijskog diverziteta. Sposobnost formiranja biofilmova je jedna od karakteristika kojom se pravi razlika među sojevima *P. aeruginosa*. Mnogi autori su pokazali da većina izolata ima ovu sposobnost (97 %), kao i da je najveći broj (oko 40 %) visoko biofilm-produkujućih sojeva [6].

*Autor za korespondenciju: Bojana Vujović

E-mail: bojana.vujovic@agrif.bg.ac.rs

Rad primljen: 07. 04. 2016.

Rad prihvaćen: 10. 05. 2016.

Rad je dostupan na sajtu: www.idk.org.rs/casopis

Prisustvo biofilma je relevantan faktor rizika u prehrambenoj industriji zbog moguće kontaminacije prehrambenih proizvoda patogenim mikroorganizmima ali i mikroorganizmima izazivačima kvarenja hrane. Prisustvo čvrstih površina na postrojenjima za preradu hrane, odgovarajuća vlaga, stalno prisustvo sirovine i izvora nutrijenata, pružaju dobre uslove za formiranje biofilma u prehrambenoj industriji. Ovo se odnosi i na formiranje biofilмова od strane vrsta roda *Pseudomonas* [7] u postrojenjima za preradu hrane, gde predstavljaju rezervoar mikroorganizama i služe kao potencijalni izvor kontaminacije sirovina i prerađevina u različitim fazama proizvodnje hrane. Osim toga, prisutnost biofilma može dovesti do kvarenja hrane, ekonomskih gubitaka, smanjenja roka trajanja proizvoda ili prenosa patogena [8]. Bakterije u biofilmu su uglavnom dobro zaštićene od spoljašnjih faktora stresa, kao što su ultraljubičasti zraci, dehidracija ili antimikrobni i dezinfekcioni agensi zbog čega ih je izuzetno teško otkriti i uništiti. Različita industrijska postrojenja imaju probleme sa rastom biofilмова, što dovodi do velikih troškova čišćenja i održavanja. Ovo uključuju različite grane industrije, kao što su prehrambena, vodoprivredna, industrija papira, optičkih sredstava, oblast stomatologije i medicine, a takođe su ljudi izloženi biofilmovima i u kućnom okruženju. Kvarenje proizvoda, smanjena efikasnost proizvodnje, korozija, neprijatni mirisi, infekcije, zapušavanje cevovoda i kvarenje opreme su neki od primera uzrokovanih štetnim biofilmom.

Cilj ovog rada je utvrđivanje potencijala i sposobnosti formiranja biofilмова *P. aeruginosa* izolovanih iz životne sredine.

2. EKSPERIMENTALNI DEO

U ovom radu je izvršena identifikacija i prikazana sposobnost formiranja biofilмова četiri izolata *P. aeruginosa* poreklom iz različitih uzoraka životne sredine: ČA_SE_1 iz sedimenta akumulacije vode za piće „Čalije“, D_V_8 iz površinske vode reke Dunav, SO_AM_6 iz aktivnog mulja postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda fabrike „Somboled“ iz Sombora i B_PV_2 iz uzorka vode za piće iz bušenog bunara iz Valjeva. Uzorci su sakupljeni u toku 2015. godine. Uzorkovanje je urađeno pod aseptičnim uslovima u sterilnu PVC ambalažu – 500 mL vode u flašama i oko 400 g čvrstih uzoraka u sterilnim vrećama. Po dolasku u laboratoriju, uzorci su skladišteni u frižideru na temperaturi od 4°C. U cilju uspešnije izolacije, izvršeno je obogaćenje uzoraka u Luria-Bertani (LB) bujonu (Trypton 10 g L-1, Ekstrakt kvasca 5 g L-1, NaCl 10 g L-1, pH=7,2), pri čemu su tečni uzorci mešani u LB bujonu 1:2 (v/v), dok su čvrsti mešani u odnosu 1:9 (w/v) u toku 24h, na 37°C u orbitalnom šejkeru (120 rpm). Izolacija *P. aeruginosa* je izvršena inokulacijom obogaćene kulture na Cetrimide agaru

(Merck, Nemačka). Zasejana kultura je inkubirana 24 sata na 42°C nakon čega su tipične kolonije *P. aeruginosa*, identifikovane na osnovu karakterističnih morfoloških karakteristika, reizolovane do dobijanja čistih kultura. Primarna identifikacija do nivoa vrste je izvršena na osnovu morfoloških karakteristika rasta kolonija na Cetrimide agaru, rezultata bojenja ćelija po Gram-u i biohemijskih osobina dobijenih primenom API testa (20NE, Biomeux, Francuska) i očitavanja na API WEB-u. Izolovane kulture, suspendovane u LB bujonu su čuvane u 20 % glicerolu na -80°C.

Sposobnost formiranja biofilмова je testirana u trajanju od 24 sata, na temperaturama od 22°C (sobna temperatura) i 37°C. Takođe je testirana sposobnost formiranja biofilмова u toku 24 sata pri različitim uslovima pH (pH 7 i pH 6) i sadržaja NaCl (1 i 2%), kako na 22°C tako i na temperaturi od 37°C. Za testove je korišćen LB bujon, kao i modifikacija ovog bujona kada je promenjena vrednost pH (pH 6) i koncentracije NaCl (finalna koncentracija NaCl 2%). U svim ogledima je primenjen statički model rasta biofilмова, kolorimetrijski metod sa Kristal violetom, u sterilnim mikrotitar pločama sa 96 otvora po modifikovanom protokolu [9]. Bunarići mikrotitar ploče su inokulisani sa 200 µL bakterijske kulture inkubirane preko noći (na 37°C, 120 rpm), OD₆₅₀=0,3 - 0,4 (≈10⁹ cfu/mL). Nakon inkubacije, sadržaj iz bunarića je ispranjen a otvori isprani dva puta sa 250 µL PBS pufera kako bi se odstranile zaostale planktonske ćelije bakterije. Nakon sušenja na vazduhu, formirani biofilm je fiksiran dodavanjem 250 µL metanola u trajanju od 15 minuta i ponovo sušen na vazduhu. Bojenje formiranog biofilma je obavljeno korišćenjem 200 µL 0,4% kristal-violeta tokom 15 minuta. Boja je isprana vodom, a resuspenzija boje u biofilmu je izvršena sa 250 µL 33% sirćetnom kiselinom u toku 20 minuta. Apsorbanca je očitana na čitaču mikrotitar ploča ELx808, BioTek (SAD), na talasnoj dužini λ=630 nm. Svi eksperimenti su urađeni u tri ponavljanja, a rezultati tumačeni na osnovu srednjih vrednosti očitanih vrednosti apsorbanci, a kao referentni soj je korišćen *P. aeruginosa* ATCC 27853.

U radu su prikazane srednje vrednosti dobijenih merenja. Takođe, u radu je prikazan relativan odnos izmerenih vrednosti apsorbanci u odnosu na standardni biofilm-neprodukujući soj *P. aeruginosa* ATCC 27853 i izvršena klasifikacija izolata *Pseudomonas aeruginosa* na biofilm-neprodukujuće, slaboprodukujuće, srednjeprodukujuće i visokoprodukujuće sojeve [10] na sledeći način:

- OD (izolata) ≤ OD (standarda) = biofilm-neprodukujući izolat
- OD (standarda) ≤ OD (izolata) ≤ 2OD (standarda) = slabo biofilm-produkujući izolat

- 2OD (standarda) ≤ OD (izolata) ≤ 4OD (standarda) = srednje biofilm-produkujući izolat
- 4OD (standarda) ≤ OD (izolata) = visoko biofilm-produkujući izolat.

3. REZULTATI I DISKUSIJA

Sposobnost formiranja biofilмова je obrađivano u velikom broju radova [11,12]. Rezultati ovih istraživanja ukazuju da izolati *P. aeruginosa*, posebno oni koji potiču iz različitih životnih sredina, pokazuju i razlike u sposobnosti formiranja biofilмова. Međutim, opisano je i oko 2% sojeva koji nemaju ovu sposobnost [10].

Tipične kolonije izolovanih *P. aeruginosa* korištenih u ovom radu su bile dijametra 4 - 5 mm, jasno ograničenih ivica, sjajne površine, sluzave konzistencije, plavo-zelene boje i prijatnog mirisa cveta lipe. Nakon bojenja po Gramu, uočeno je da su pojedinačne ćelije štapićastog oblika i Gram-negativne. Očitavanjem rezultata reakcija API testa, utvrđeno je da izolovane bakterije pripadaju vrsti *P. aeruginosa*, sa preciznošću od 96,7 – 99,9 % (tabela 1).

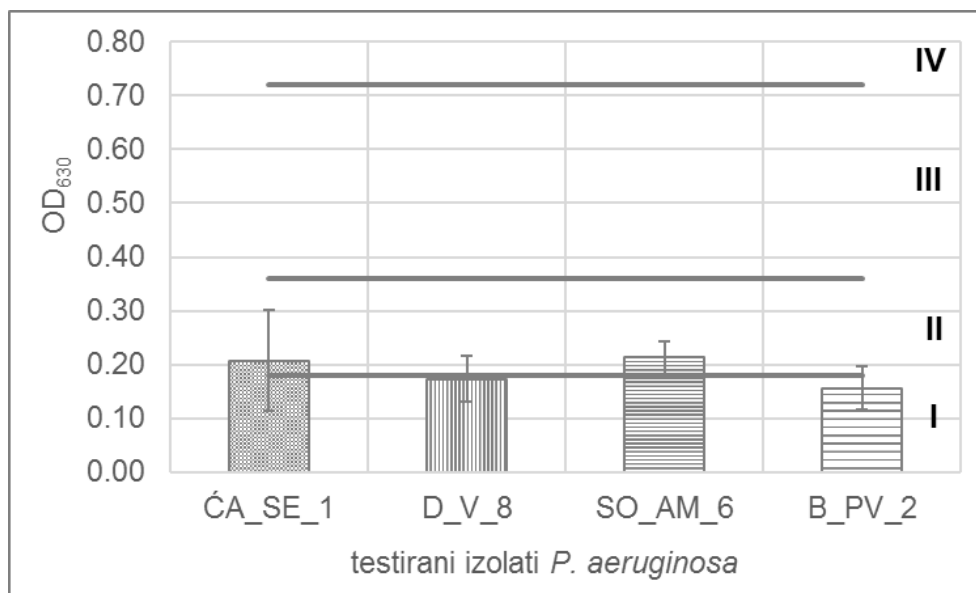
Svi izolati su bili oksidaza i katalaza pozitivni, negativni na indol produkciju triptofana i acidifikaciju glukoze a pozitivni na arginin dehidrogenazu, eskulin negativni i sposobni da hidrolizuju želatin. Svi testirani izolati su bili sposobni da oksiduju D-glukozu, D-manitol, glikonat, L-malat i usvajaju citrat, a nisu imali sposobnost fermentacije L-arabinoze, D-manoze i maltoze.

Tabela 1 - Sličnosti izolata *Pseudomonas aeruginosa* prema rezultatima API testa

IZOLATI	API WEB <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%)
ĆA_SE_1	99,9%
D_V_8	96,7%
SO_AM_6	98,9%
B_PV_2	99,9%

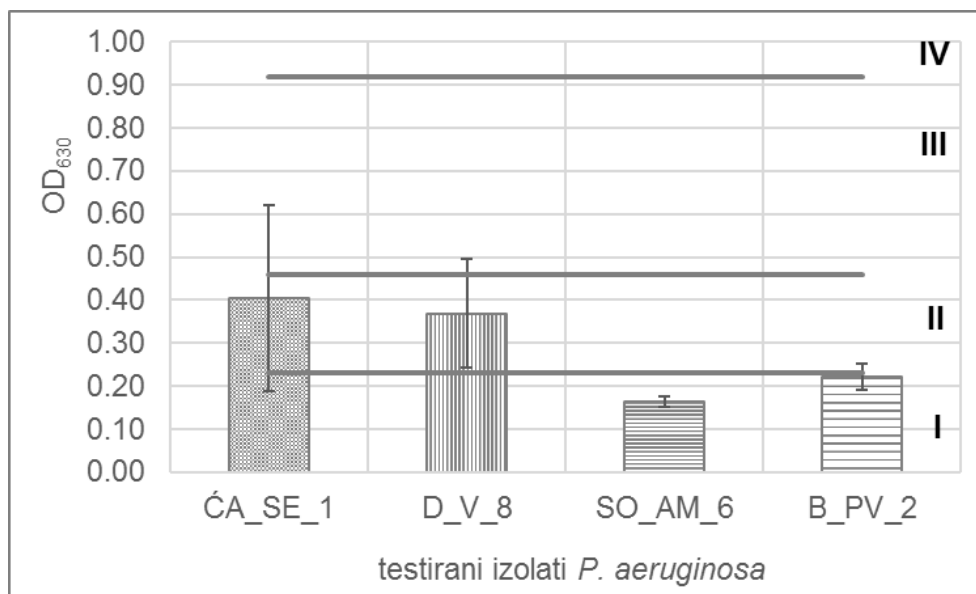
Poznato je da temperatura ima veliki uticaj i značaj za rast i razvoj mikroorganizma. Uslovi temperature pre svega utiču na odvijanje metaboličkih procesa, a takođe utiču na brzinu usvajanja nutrijenata, delovanja enzima i fizičkih karakteristika komponenata u okolini ćelije. U radu je testirana sposobnost formiranja biofilмова na 37 i 22°C.

Srednje vrednosti izmerenih apsorbanci testiranih izolata na 37°C su pokazale da su najveću sposobnost formiranja biofilмова imali izolat iz sedimenta, ĆA_SE_1 ($_{(OD630)} = 0,21 \pm 0,09$) i aktivnog mulja, SO_AM_6 ($_{(OD630)} = 0,21 \pm 0,03$), dok je srednja vrednost apsorbance izolata iz površinske vode, D_V_8 iznosila ($_{(OD630)} = 0,17 \pm 0,04$), a izolata iz vode za piće B_PV_2 ($_{(OD630)} = 0,16 \pm 0,04$). Predstavljanjem sposobnosti formiranja biofilma u odnosu na ATCC 27853 je konstatovano da su svi testirani izolati biofilm-neprodukujući, odnosno slabo-biofilm produkujući (Grafikon 1) pri ovim uslovima temperature.



Grafikon 1 - Mogućnost formiranja biofilмова izolata *P. aeruginosa* na 37°C

Histogrami predstavljaju srednje vrednosti izmerenih apsorbanci, dok vertikalne linije označavaju vrednosti standardne devijacije. Horizontalne linije predstavljaju granične vrednosti u odnosu na ATCC 27853, a u odnosu na koje je izvršena klasifikacija izolata na: I - biofilm-neprodukujuće, II - slabo-biofilm-produkujuće, III - srednje biofilm-produkujuće izolate i IV - visoko biofilm-produkujuće izolate



Grafikon 2 - Mogućnost formiranja biofilмова izolata *P. aeruginosa* na 22°C

Histogrami predstavljaju srednje vrednosti izmerenih apsorbanci, dok vertikalne linije označavaju vrednosti standardne devijacije. Horizontalne linije predstavljaju granične vrednosti u odnosu na ATCC 27853, a u odnosu na koje je izvršena klasifikacija izolata na: I - biofilm-neprodukujuće, II - slabo-biofilm-produkujuće, III - srednje biofilm-produkujuće izolate i IV - visoko biofilm-produkujuće izolate

Rezultati ovog rada su pokazali da testirani izolati imaju veću sposobnost formiranja biofilмова na 22°C u odnosu na 37°C. Najbolja sposobnost formiranja biofilмова je konstatovana na izolatu ČA_SE_1, gde je srednja vrednost izmerenih apsorbanci iznosila $(OD_{630}) = 0,40 \pm 0,22$ a zatim na izolatu D_V_8 gde je vrednost apsorbanci bila $(OD_{630}) = 0,37 \pm 0,13$. Niža sposobnost formiranja biofilмова je konstatovana na izolatu B_PV_2 od $(OD_{630}) = 0,22 \pm 0,03$, a najniža na izolatu iz aktivnog mulja, SO_AM_6 $(OD_{630}) = 0,16 \pm 0,01$. Primenjujući klasifikaciju u odnosu na referentni soj *P. aeruginosa*, izolati SO_AM_6 i B_PV_2 pripadaju grupi biofilm-neprodukujućih, odnosno slabo-produkujućih izolata, dok su izolati ČA-SE_1 i D_V_8 okarakterisani kao slabo, odnosno srednje biofilm-produkujući izolati (Grafikon 2).

Rezultati ispitivanja drugih autora [10] ukazuju na sličan odnos među kliničkim izolatima *P. Aeruginosa*. Od 74 ispitana izolata, 68 % je okarakterisano kao slabo-produkujući, a samo su dva izolata bila okarakterisana kao srednje-produkujući. Sanchez i sar. [13] ispitujući kliničke izolate su zaključili da 83 % *P. aeruginosa* ima sposobnost formiranja biofilмова, pri čemu je srednja vrednost izmerene biomase biofilмова iznosila $0,142 \pm 0,094$ što je u opsegu rezultata dobijenih u ovom radu.

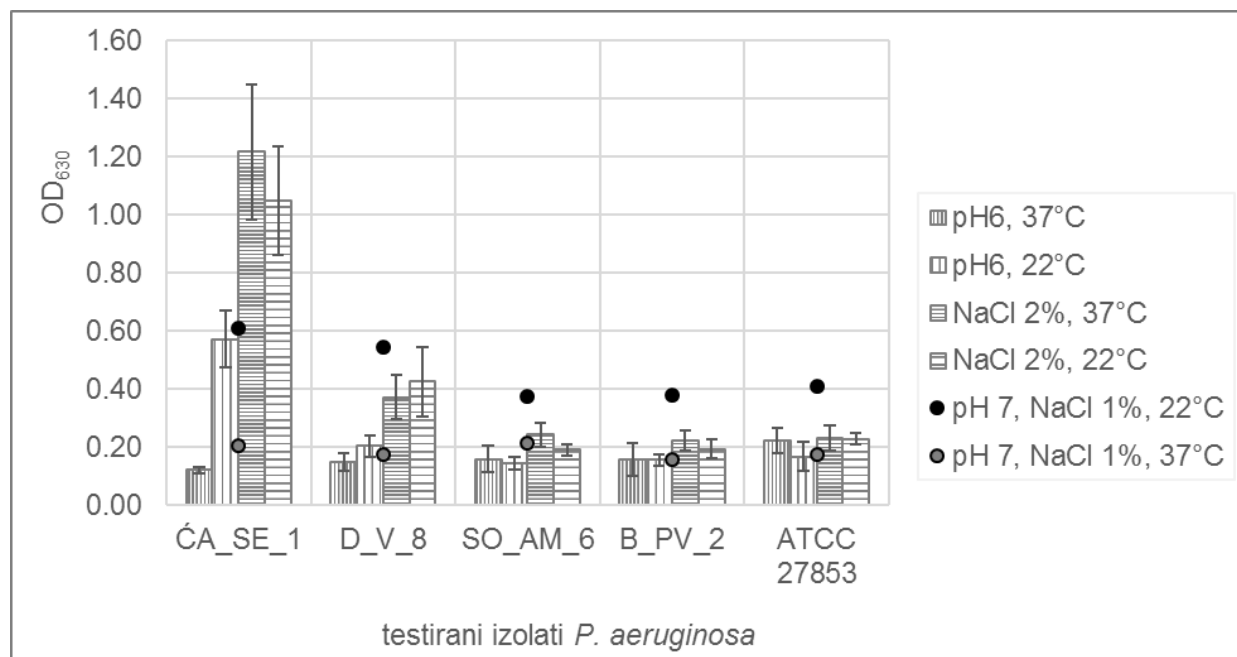
Rezultati ovog rada su pokazali da je niža temperatura stimulatивно delovala na formiranje biofilмова, a do sličnih rezultata su došli i Hostacka i sar. [14] koji su objavili da je na 37°C i do 98 % smanjena mogućnost produkcije biofilмова. Jedan

od mogućih objašnjenja je u činjenici da su na nižim temperaturama karakteristike polisaharida uniformne čime se povećava mogućnost inicijalne interakcije bakterije i supstrata, a time je povećana i mogućnost adhezije [15].

U radu je testiran i uticaj pH sredine na formiranje biofilмова. Poznato je da bakterije imaju sposobnost uticaja na interne i eksterne vrednosti pH, promenom aktivnosti i sintezom proteina uključenih u različite procese u ćeliji [16] što ukazuje da bakterije imaju mehanizme koji omogućavaju populaciji da se prilagodi na male promene u pH sredine, dok su ekstremne i nagle promene pH letalne.

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da je produkcija biofilмова pri umereno kiseloj reakciji bila uspešnije na 22°C kod izolata ČA_SE_1 i D_V_8, približno jednake biomase kod izolata SO_AM_6 i B_PV_2, dok je referentni soj uspešnije formirao biofilmove na 37°C u uslovim snižene pH vrednosti (Grafikon 3). Međutim, u odnosu na biofilmove formirane pod standardnim uslovima (pH 7 – prikazano kružnim markerima na Grafikonu 3), uočava se da kiseli uslovi sredine nisu delovali inhibitory na razvoj biofilмова.

Iako neka istraživanja [17] ukazuju na inhibitory efekat NaCl (2 %, 4 %, i 7 %) na biofilmove *P. aeruginosa*, dobijeni rezultati u ovom istraživanju ukazuju da su pri ovim uslovima sredine, izolovane *P. aeruginosa* formirale kvantitativno iste ili masivnije biofilmove.



Grafikon 3 - Mogućnost formiranja biofilмова izolata *P. aeruginosa* pri izmenjenim uslovima životne sredine (pH 6 i NaCl 2%), Histogrami predstavljaju srednje vrednosti izmerenih apsorbanci, dok vertikalne linije označavaju vrednosti standardne devijacije

Srednje izmerene vrednosti apsorbance izolata ČA_SE_1 ukazuju da je ovaj izolat formirao masivnije biofilmove u uslovima povećane koncentracije soli (Grafikon 3), (OD_{630}) = $1,22 \pm 0,23$ na 37°C , odnosno (OD_{630}) = $1,05 \pm 0,19$ na 22°C , dok su biofilmovi ostalih testiranih izolata bili u okvirima vrednosti dobijenih u uslovima niže koncentracije NaCl. Srednje vrednosti izmerenih apsorbanci izolata D_V_8 su iznosile (OD_{630}) = $0,37 \pm 0,08$ na 37°C , dok je na 22°C vrednost iznosila (OD_{630}) = $0,43 \pm 0,12$. Vrednosti apsorbanci ostalih testiranih izolata su bile ujednačene i kretale se između $OD_{630} = 0,22 - 0,24$ na 37°C , odnosno $0,19 - 0,23$ na 22°C .

4. ZAKLJUČAK

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju da su izolati *P. aeruginosa* koji potiču iz različitih ekosistema sposobni da formiraju biofilmove. Dok su na temperaturi inkubacije od 37° većina izolata bili označeni kao biofilm - neprodukujući, pri nižim temperaturama inkubacije testirani izolati su označeni kao slabo ili srednje biofilm – produkujući izolati. Dobijeni rezultati takođe ukazuju da osim niže temperature i povišene vrednosti NaCl povoljno utiču na formiranje biofilмова, te da niža pH vrednost ne suzbija formiranje biofilмова. Dobijeni rezultati opisuju deo populacije *P. aeruginosa* sa teritorije Republike Srbije i ukazuju da i sojevi *P. aeruginosa* koji nisu primarno patogeni ili klinički, mogu predstavljati rizik i opasnost u različitim sferama ljudskog delovanja, te da ni u nepovoljnim uslovima ne gube potencijal za formiranje biofilмова.

Zahvalnica

Ova istraživanja su finansijski potpomognuta sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije i realizovana u okviru projekta TR 31080, kao i projekta AREA (EU Commission, No. 316004).

5. LITERATURA

- [1] J.Lederberg (2000) *Pseudomonas*, knjiga Encyclopedia of Microbiology, San Diego, p. 876-891.
- [2] J.Goldberg (2002) Biofilms and antibiotic resistance: a genetic linkage. Trends in Microbiology, 10, 264.
- [3] T.Coenye, H.J.Nelis (2010) In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation, Journal of Microbiological Methods, 83, 89-105.
- [4] B.Orgaz, J.Kives, A.M.Pedregosa, I.F.Monistrol, F.Laborda, C.San Jose (2006) Bacterial biofilm removal using fungal enzymes, Enzyme and Microbial Technology, 40, 51-56.
- [5] D.G.Allison (1993) Biofilm associated exopolysaccharides, Microbiology Europe, Nov/Dec, p.16-19.
- [6] Z.Vasiljević, B.Jovičić, I.Ćirković, S.Đukić (2014) An Examination of Potential Differences in Biofilm Production among different Genotypes of *Pseudomonas aeruginosa*, Archives of Biological Science, 66 (1), 117-121.
- [7] P.Meliani, G.Bensoltane (2015) Review of *Pseudomonas* Attachment and Biofilm Formation in Food Industry, Poultry Fisheries and Wildlife Sciences, 3 (1), 2-7.

- [8] S.Stepanović, I.Cirković, V.Mijac, M.Svabic-Vlahovic, (2003) Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp, Food Microbiology, 20, 339–343.
- [9] S.Stepanović, D.Vuković, V.Hola, G.Di Bonaventura, S.Djukiv, I.Cirković, F.Ruzicka (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci, APMIS, 15, 891-899.
- [10] L.R.R.Perez, M.C.N.Costa, A.L.P.Freitas, A.L.Barth (2011) Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystitis fibrosis patients, Brazilian Journal of Microbiology, 42, 476-479.
- [11] N.E.Head, H.Yu (2004) Cross-Sectional Analysis of Clinical and Environmental Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: Biofilm Formation, Virulence, and Genome Diversity, Infection and Immunity, p.133-144.
- [12] M.V.Grosso-Becerra, C.Santos-Medellin, A.Gonzales-Valdez, G.Delgado, R. Morales Espinosa, L.Servin-Gonzalez, L.D.Alcaraz, G.Soberon-Chavez (2014) *Pseudomonas aeruginosa* clinical and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity, BMC Genomics, 15, 318-328.
- [13] C. J.Sanchez, K.Mende, M. L.Beckius, K.S.Akers, D.R.Romano, J.C.Wenke, C.K. Murray (2013) Biofilm formation by clinical isolates and the implication in chronic infections, BMS Infectious Diseases, 13, 47-59.
- [14] I.Hostacka, M.Čižnara, M.Štefkovičova (2010) Temperature and pH Affect the Production of Bacterial Biofilm, Folia Microbiologica, 55 (1), 75–78.
- [15] T.R.Garrett, M.Bhakoo, Z.Zhang (2008) Bacterial adhesion and biofilms on surfaces, Natural Science, 18, 1049-1056.
- [16] E.R.Orson (1993) Influence of pH on bacterial gene expression, Molecular microbiology, 8 (1), 5 – 14.
- [17] R. F.Martinez (2011) Effect of iron and sodium chloride on biofilm development of *Stenotrophomonas maltophilia*, College of Liberal Arts & Social Sciences Theses and Dissertations, paper 102.

ABSTRACT

POTENTIAL OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ENVIRONMENTAL ISOLATES FOR BIOFILM FORMATION

Biofilm formation is one of the main characteristic of Pseudomonas aeruginosa strains. This ability provide bacteria to survive in different, usually restrictivess environmental conditions. In the same time, biofilm forming is a risk in a many field of industry, mainly in food industry. It is known that diverse P. aeruginosa strains from various environmental sources have different potention to form biofilms. In this paper it is examined the potention to form biofilm four isolates of P. aeruginosa and based of this results, tested isolates have classificated into four groups. Biofilm formation tested in microtitar plates during the 24 hours at changed conditions of temperature (37°C and 22°C), pH (6 and 7) and concentration of NaCl (1% and 2%). Obtained results have shown that isolated P. aeruginosa have unsimilar ability to form biofilms. Biomass of formed biofilm was greater at 22°C than at 37°C. Also, acid conditions and higher concentration of salt had no inhibitory effect to biofilm forming process.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa, biofilm formation, static test.*

Scientific paper

Paper received: 07. 04. 2016.

Paper accepted: 10. 05. 2016.

Paper is available on the website: www.idk.org.rs/journal