

Tvorba biofilmu a odpoveď na oxidačný stres u kmeňov *Pseudomonas aeruginosa* a *Vibrio cholerae* non-O1 v závislosti na kultivačných médiách

Hošťacká A., Čížnár I.

Slovenská zdravotnícka univerzita, Bratislava

Súhrn

Ciel: Cieľom štúdie bolo vyhodnotenie vplyvu 6 kultivačných médií (komplexné – 5, minerálne – 1) na tvorbu biofilmu a na odpoveď na oxidačný stres u *Pseudomonas aeruginosa* (3 kmene) a *Vibrio cholerae* non-O1 (3 kmene).

Metodika: Tvorbu biofilmu sme kvantitatívne vyhodnotili testom absorpcie kryštálovej violete. Odpoveď baktérií na oxidačný stres vyvolaný peroxidom vodíka sme hodnotili ako zónu vyčistenia obklopujúcu disk po 24 hodinovej inkubácii pri 37 °C.

Výsledky: Najvyššiu tvorbu biofilmu u oboch bakteriálnych druhov sme zistili po kultivácii v tryptónovo-sójovom médiu (TSM), resp. v tryptónovo-sójovom médiu obohatenom o 8 % glukózy (TSM +GL), najnižšiu v minerálnom médiu (MM). Kmene *V. cholerae* non-O1 boli v priemere 1,4-3,4 krát citlivejšie v odpovedi na oxidačný stres v závislosti na médiu v porovnaní s kmeňmi *P. aeruginosa*. Zloženie kultivačného média výrazne neovplyvnilo reakciu vibrií na oxidačný stres vyvolaný H₂O₂ na rozdiel od *P. aeruginosa*. Najvyššiu rezistenciu na H₂O₂ u *P. aeruginosa* v priemere sme zistili po kultivácii v peptónovej vode, najcitlivejšie boli bunky po kultivácii v TSM + GL a v MM.

Záver: Zloženie kultivačného média ovplyvnilo tvorbu biofilmu u oboch bakteriálnych druhov a výraznejšie ovplyvnilo aj odpoveď na oxidačný stres u *P. aeruginosa*.

Kľúčové slová: *Pseudomonas aeruginosa* – *Vibrio cholerae* non O1 – kultivačné médium – biofilm – oxidačný stres.

Summary

Hošťacká A., Čížnár I.: Biofilm Formation and Response to Oxidative Stress in *Pseudomonas aeruginosa* and *Vibrio cholerae* non-O1 Depending on Culture Media

Objective: To evaluate the effect of six culture media (five complex and one mineral) on biofilm formation and response to oxidative stress in *Pseudomonas aeruginosa* (3 strains) and *Vibrio cholerae* non-O1 (3 strains).

Methods: Biofilm formation was quantitatively determined by a crystal violet absorption assay. The bacterial response to oxidative stress evoked by hydrogen peroxide was visualized as a zone of clearing around the disc after 24 h incubation at 37°C.

Results: For both of the bacterial species studied, biofilm formation was the highest after cultivation in tryptone soya broth (TSM) or in TSM supplemented with 8% glucose (TSM+GL), being the lowest in mineral medium (MM). *V. cholerae* non O1 strains were 1.4 to 4.3 times more responsive on average to oxidative stress depending on culture medium as compared with *P. aeruginosa* strains. The culture medium had no significant effect on H₂O₂ evoked by response to oxidative stress in vibrios in contrast to *P. aeruginosa*. In *P. aeruginosa*, the highest mean resistance to H₂O₂ was observed after cultivation in peptone water while the most sensitive cells were found after incubation in TSM+GL and MM.

Conclusion: The culture medium composition influenced biofilm formation in both of the bacterial species tested and had a considerable effect on response to oxidative stress in *P. aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* – *Vibrio cholerae* non O1 – culture medium – biofilm – oxidative stress.

Pseudomonas aeruginosa patriaci medzi oportúnne patogény spôsobuje značnú chorobnosť a úmrtnosť hlavne u pacientov so zníženou imunitou a je jednou z najčastejších gramnegatívnych baktérií spojených s nozokomiálnymi infekciami [9, 10, 14, 22]. Táto baktéria môže byť zodpovedná za lokálne ako aj diseminované infekcie. Väčšina kmeňov *P. aeruginosa* sa vyznačuje značným stupňom rezistencie na široké spektrum antimikrobiálnych látok [11]. Jeden z hlavných dôvodov perzistencie a prežívania *P. aeruginosa* v pľúcach pacientov je rast týchto baktérií v biofilme [25]. Virulencia *P. aeruginosa* je multifaktoriálna a v niektorých prípadoch kontrolovaná komunikačným mechanizmom – quorum sensing [21].

Bakteriálny druh *Vibrio cholerae* zahrňuje jednak neškodné vodné kmene ako aj kmene spôsobujúce epidémie a globálne pandémie cholery. V súčasnosti patrí cholera do skupiny „reemerging“ (znova sa objavujúcich) infekcií [24]. Doteraz toto ochorenie postihlo viac ako 75 krajín a prakticky každý kontinent. Tzv. non-O1 vibriá sa vyznačujú biochemickými a morfológickými vlastnosťami veľmi podobnými choleroým (séroskupina O1), avšak neaglutinujú s polyvalentným O1 antisérom. Tieto non-O1 séroskupiny sú väčšinou spojené so sporadickými prípadmi hnačky a extraintestinálnych infekcií [15, 19]. V roku 1992 sa objavilo *V. cholerae* non-O1 séroskupina O139 a spôsobilo epidémie cholery [1]. Predpokladá sa, že epidemické kmene *V. cholerae* vznikajú z environmentálnych netoxigénnych kmeňov v dôsledku získania faktorov virulencie. Epidemické a pandemické kmene obsahujú ostrovy patogenity, ktoré sa nenachádzajú u nepatogénnych kmeňov [16, 18].

P. aeruginosa a *V. cholerae* predstavujú dva ekologicky odlišné typy. Zatiaľ čo *P. aeruginosa* preferuje pre svoje prežívanie pevné povrchy vonkajšieho prostredia, *V. cholerae* je typický patogén z vodného prostredia. Obidva patogény nachádzajú v týchto prostrediach odlišné podmienky pre tvorbu faktorov podmieňujúcich ich prežívanie a súčasne pre pôsobenie na hostiteľa. Na modele in vitro predstavujúcom odlišné kultivačné média sme sa zamerali na tvorbu biofilmu a na odpoveď na oxidačný stres u týchto dvoch odlišných bakteriálnych druhov *P. aeruginosa* a *V. cholerae* non-O1.

Materiál a metodika

Bakteriálne kmene *P. aeruginosa* boli izolované od pacientov (2643- vred, 2736- hnis, 3456- moč.). Pri identifikácii kmeňov (Mikrobiologický ústav LF UK a FN v Bratislave) sa použil BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID systém (Becton, Dickinson, USA) a Neferm test 24 (Lachema, Česko). Kmene

V. cholerae non-O1 boli izolované z vodného prostredia a identifikované konvenčnými biochemickými testami (Národné referenčné centrum pre *Vibrionaceae* Regionálny úrad verejného zdravotníctva, Komárno).

Podmienky kultivácie. Použili sme tieto kultivačné média:

Peptónová voda (PV) [28]

Mozgovo-srdcová infúzia (MSI) (Oxoid, CM 225)

Muellerov-Hintonov bujón (MHB) (Oxoid, CM 405)

Tryptónové-sójové médium (TSM) (Oxoid, CM 129)

Tryptónové-sójové médium obohatené o 8 % glukózy (TSM+GL)

Minerálne médium (MM) obsahujúce acetát a asparagín ako jediné zdroje uhlíka a dusíka [26].

Bakteriálnu suspenziu (0,2 ml, $A_{600} = 0,5$ (absorbancia pri 600 nm) pre komplexné média, 1 ml, $A_{600} = 1$ pre MM) sme inkubovali s 9,8 ml, resp. 9 ml média pri 37 °C, 24 hod. Po kultivácii sme bakteriálne suspenzie použili v teste na vyhodnotenie oxidačného stresu. Sedimenty bakteriálnych buniek získané po centrifugácii suspenzií sme premyli, upravili na hodnotu absorbancie 0,8 a použili na sledovanie tvorby biofilmu.

Produkcia biofilmu. Tvorbu biofilmu sme kvantitatívne vyhodnotili testom absorpcie kryštálovej violete. Relatívny obsah biofilmu sme určili z koncentrácie tejto farbičky eluovanej z odfarbených buniek v mikrotitračných platničkách kombináciou metód podľa O' Tooleho a Koltera [20] a Bonafonteho et al. [3] s miernymi modifikáciami. Bakteriálne bunky získané centrifugáciou 24 hodinových bakteriálnych suspenzií kultivovaných v rôznych médiách sme premyli, resuspendovali v ATM (adherence test medium) (60 mM NaCl, 30 mM NaHCO₃, 20 mM KCl, 111 mM glukóza, pH 8,4) a upravili na $A_{600} = 0,8$. Takto upravenú bakteriálnu suspenziu (100 µl) sme inokulovali do piatich separátnych jamiek sterilnej polystyrénovej mikrotitračnej platničky a inkubovali 18 hod pri 37 °C. Potom sme zvyšok bakteriálnej kultúry vyliali a vytvorený biofilm sme 3krát opatrne premyli s PBS (pufrovaný fyziologický roztok), fixovali na vzduchu (15 min) a farbili roztokom 0,1% kryštálovej violete (20 min). Nenaviazanú farbičku sme odstránili opláchnutím (3krát) s PBS. Po vysušení platničky (15 min) sme kryštálovú violet naviazanú na biofilm solubilizovali pridaním 200 µl zmesi etanol/acetón (80/20) (10 min) a merali sme absorbanciu obsahu každej jamky (100 µl) pri 550 nm. Absorbancia eluovanej farbičky z naviazaných buniek bola indikátorom relatívnej koncentrácie bakteriálnych buniek v biofilme.

Odpoveď na oxidačný stres. Bakteriálnu suspenziu (100 µl) sme v Petriho miske rovnomerne rozotreli na povrch modifikovaného Luria agaru [2]. Na platňu sme potom položili 3 sterilné filtračné papierové disky (7 mm priemer) nasiaknuté 10 µl 30% peroxidu vodíka. Odpoveď baktérií na oxidačný stres vyvolaný reaktívnym oxidačným intermediátom sme vyhodnotili ako zónu vyčistenia obklopujúcu disky po 24 hod inkubácií pri 37 °C [13].

Výsledky a diskusia

Biofilm je dôležitá forma rastu baktérií v ich environmentálnom životnom cykle. Je to populácia mikrobiálnych buniek rastúca na pevnom povrchu a uzavretá do amorfnej extracelulárnej matrice, ktorá je vytvorená z polymérnych látok (polysacharidy, bielkoviny, DNA) produkovaných mikroorganizmami [7]. V biofilme predstavujú baktérie fenotyp so zmenenou rastovou rýchlosťou.

Tab. 1. Vplyv kultivačného média na niektoré vlastnosti *P. aeruginosa* a *V. cholerae* non-O1**Table. 1.** The effect of culture medium on some properties of *P. aeruginosa* and *V. cholerae* non-O1

<i>P. aeruginosa</i>			Médium	<i>V. cholerae</i> non-O1		
Oxidačný stres ^x (mm)	Biofilm (A ₅₅₀) ^{xx}	Kmeň		Kmeň	Biofilm (A ₅₅₀) ^{xx}	Oxidačný stres ^x (mm)
8,3±0,6	0,317±0,004	2643	PV	84/233	0,386±0,004	23,3±0,6
7,3±0,6	0,201±0,004		MSI		0,387±0,002	20,7±1,2
9,0±1,2	0,252±0,005		MHB		0,186±0,003	18,7±0,6
8,3±0,6	0,358±0,005		TSM		0,417±0,003	21,7±0,6
12,7±0,6	0,400±0,005		TSM+GL		0,411±0,005	21,7±0,6
15,0±0	0,071±0,003		MM		0,177±0,004	19,7±0,6
7,3±0,6	0,345±0,001	2736	PV	10/116	0,207±0,003	28,0±0
7,3±0,6	0,337±0,003		MSI		0,156±0,002	27,7±0,6
7,7±0,6	0,245±0,003		MHB		0,146±0,002	28,0±0
9,7±0,6	0,369±0,003		TSM		0,316±0,002	18,7±0,6
15,7±0,6	0,374±0,003		TSM+GL		0,385±0,004	24,3±0,6
14,3±0,6	0,084±0,002		MM		0,144±0,002	20,3±0,6
7,0±0	0,176±0,004	3456	PV	D/04 1	0,341±0,003	24,3±0,6
11,0±1,2	0,176±0,004		MSI		0,144±0,003	24,3±0,6
7,0±0	0,162±0,003		MHB		0,146±0,003	22,0±0
15,0±0	0,384±0,003		TSM		0,346±0,003	24,7±0,6
18,7±0,6	0,396±0,003		TSM+GL		0,347±0,003	25,7±0,6
15,7±0,6	0,104±0,004		MM		0,098±0,002	24,0±0

^x Zóna inhibície bakteriálneho rastu
^x The bacterial growth inhibition zone

^{xx} Absorbancia pri 550 nm
^{xx} The absorbance at 550 nm

Tab. 2. Priemerné hodnoty biofilmu a oxidačného stresu u kmeňov *P. aeruginosa* a *V. cholerae* non-O1 v rôznych kultivačných médiách**Table. 2.** Average values of biofilm and oxidative stress in *P. aeruginosa* and *V. cholerae* non-O1 strains in different culture media

<i>P. aeruginosa</i>		Médium	<i>V. cholerae</i> non-O1	
Biofilm (A ₅₅₀) ^x	Oxidačný stres ^{xx} (mm)		Oxidačný stres ^{xx} (mm)	Biofilm (A ₅₅₀) ^x
0,279±0,10	7,5±0,8	PV	25,2±2,8	0,311±0,10
0,238±0,09	8,5±2,1	MSI	24,2±4,1	0,229±0,14
0,220±0,05	7,9±1,2	MHB	22,9±4,9	0,159±0,02
0,370±0,01	11,0±2,9	TSM	21,7±3,5	0,360±0,06
0,390±0,02	15,7±3,5	TSM+GL	23,9±2,4	0,380±0,04
0,086±0,02	15,0±0,8	MM	21,3±2,5	0,140±0,05

^x Absorbancia pri 550 nm
^x The absorbance at 550 nm

^{xx} Zóna inhibície bakteriálneho rastu
^{xx} The bacterial growth inhibition zone

ťou, transkripciou génov, rezistenciou na antimikróbne látky a interakciou s obranným hositeľským systémom [8]. Tvorba biofilmu je ovplyvnená viacerými fyzikálnymi faktormi (pH, teplota, kyslík, živiny) [5, 12]. Naše výsledky ukázali, že tvorba biofilmu u reprezentantov pochádzajúcich z dvoch odlišných ekosystémov, kmeňov *P. aeruginosa* ako aj *V. cholerae* non-O1 bola závislá na kultivačnom médiu (tab. 1). V prípade *P. aeruginosa* najvyššiu produkciu biofilmu sme zaznamenali v TSM+GL (A₅₅₀ = 0,374-0,400), resp. v TSM (A₅₅₀ = 0,358-0,384). Najnižšiu tvorbu biofilmu (A₅₅₀ = 0,071-0,104) u týchto kmeňov sme jedno-

značne zistili po ich kultivácii v MM. Tvorba bakteriálneho biofilmu v ostatných komplexných médiách bola závislá na kmeni. U dvoch izolátov (2736, 3456) bola produkcia okrem TSM+GL a TSM intenzívnejšia v PV a MSI, u kmeňa 2643 v PV a MHB. Podobne u kmeňov *V. cholerae* non-O1 najvyššiu produkciu biofilmu sme pozorovali v TSM+GL (A₅₅₀ = 0,347-0,411) a v TSM (A₅₅₀ = 0,316-0,417). Za týmito médiami nasledovali PV, MSI a MHB v závislosti na kmeni vibrií. MM sa ukázalo ako menej vhodné pre tvorbu biofilmu aj u vibrií (A₅₅₀ = 0,098-0,177). U kmeňov 84/233 a 10/116 bola tvorba biofilmu v MM veľmi podob-

ná kapacite biofilmu v MHB. Tieto výsledky v súhlase s literárnymi údajmi naznačujú, že tvorbu biofilmu je potrebná prítomnosť nutrične bohatého prostredia (16). Platí to rovnako pre *P. aeruginosa* a *V. cholerae* non-O1. V nutrične bohatších médiách bola tvorba biofilmu u oboch testovaných species rôzna, ale vždy vyššia ako v MM.

Tvorba biofilmu v priemere u kmeňov *P. aeruginosa* v TSM ($A_{550} = 0,370$) a v TSM+GL ($A_{550} = 0,390$) nebola významne odlišná od tvorby biofilmu u kmeňov *V. cholerae* non-O1 v týchto médiách ($A_{550} = 0,360; 0,380$) (tab.2). Vyššiu produkciu biofilmu sme zaznamenali u vibrií v PV ($A_{550} = 0,311$) a v MM ($A_{550} = 0,140$) v porovnaní s *P. aeruginosa* ($A_{550} = 0,279; 0,086$), nižšiu v MHB ($A_{550} = 0,159$ vibriá, $A_{550} = 0,220$ *P. aeruginosa*). Rozdiely v tvorbe biofilmu v závislosti na zložení kultivačného média a bakteriálnych druhov zistili aj Stepanović et al. [27]. V ich experimentoch *Salmonella* spp. vytvárala viac biofilmu v médiu chudobnejšom na živiny, tvorba biofilmu u *Listeria monocytogenes* bola významnejšia v bohatšom médiu. Tvorba biofilmu je dynamický proces kontrolovaný živinami ako aj quorum sensing systémom [23]. Tieto faktory sú dôležité najmä z hľadiska morfológie biofilmu. Vytvorenie klasického diferencovaného mikrokolóniového biofilmu u *Serratia marcescens* sa pozorovalo v podmienkach slabo výživových substrátov, zatiaľ čo vláknitá architektúra biofilmu prevládala v bohatom médiu [23]. Tieto poznatky naznačujú, že baktérie rôzneho species vytvárajú biofilm v prítomnosti určitej koncentrácie výživových faktorov, ktorá je charakteristická pre dané species.

U viacerých druhov baktérií bola charakterizovaná odpoveď na oxidačný stres vyvolaný reaktívnymi oxidačnými intermediátmi, vrátane H_2O_2 [6]. Tieto látky sú produkované počas aeróbného metabolizmu, resp. počas infekcie ľudí a zvierat sú vylučované z fagocytárnych buniek. Môžu spôsobiť oxidačné poškodenie DNA, ktoré okrem iných poškodení vedie k vzniku hypermutantných baktérií rezistentných na antibiotiká [4]. Naše výsledky ukázali, že kmene *V. cholerae* non-O1 v závislosti na kultivačnom médiu boli 1,4 až 3,4 krát citlivejšie na H_2O_2 ako kmene *P. aeruginosa* (tab. 2). Kmene *V. cholerae* non-O1 nevykazovali podstatné rozdiely v odpovedi na oxidačný stres v závislosti na kultivačnom médiu. Vyššiu citlivosť prejavili bunky, ktoré rástli v PV (priemer zóny inhibície bakteriálneho rastu 25,2 mm), rezistentnejšie boli po kultivácii v MM (21,3 mm). V prípade *P. aeruginosa* sme najvyššiu toleranciu na H_2O_2 zistili u kmeňov po raste v PV (7,5 mm), najcitlivejšie boli bunky po kultivácii v TSM+GL a v MM (15,7 mm a 15 mm).

Záver

Zloženie kultivačného média ovplyvnilo tvorbu biofilmu u kmeňov *P. aeruginosa* a *V. cholerae* non-O1. Najvyššiu produkciu biofilmu pre obidva bakteriálne druhy sme pozorovali v TSM a v TSM+GL, najnižšiu v MM. Kapacita tvorby biofilmu v ostatných komplexných médiách bola závislá na bakteriálnom druhu a na kmeni. Zloženie kultivačného média podstatne neovplyvnilo odpoveď vibrií na oxidačný stres na rozdiel od kmeňov *P. aeruginosa*.

Vyslovujeme svoje poďakovanie pani A. Korenačkovej za technickú spoluprácu.

Literatúra

1. Albert, M. J., Siddique, A. K., Islam, M. S. et al. A large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* O139, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9, 1116-1122.
2. Baratéla, K. C., Saridakis, H. O., Gaziri, L. C. J., Pelayo, J. S. Effects of medium composition, calcium, iron and oxygen on haemolysin production by *Plesiomonas shigelloides* isolated from water. *J Appl Microbiol*, 2001, 90, 482-487.
3. Bonafonte, M. A., Solano, K., Sesma, B. et al. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella enteritidis*. *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 191, 31-36.
4. Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T. et al. Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49, 2276-2282.
5. Colón-González, M., Méndez-Ortiz, M. M., Membrillo-Hernández, J. Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. *Res Microbiol*, 2004, 155, 514-521.
6. Dimple, B. Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu Rev Genet*, 1991, 25, 315-337.
7. Donlan, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8, 881- 890.
8. Donlan, R. M., Costerton, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15, 167-193.
9. Gordon, S. M., Serkey, J. M., Keys, T. F. et al. Secular trends in nosocomial bloodstream infections in a 55-bed cardiothoracic intensive care unit. *Ann Thorac Surg*, 1998, 65, 95-100.
10. Govan, J. R., Nelson, L. W. Microbiology of lung infection in cystic fibrosis. *Br Med Bull*, 1992, 48, 912-930.
11. Hancock, R. E. W., Speert, D. P. Antibiotics for *Pseudomonas* and related infections. In: Dodge, J. A., Brock, D. J. H., Widdicombe, J. H., (eds): *Cystic fibrosis-current topics*. John Wiley and Sons, Toronto 1996, 245-266.
12. Harjai, K., Khandwaha, R. K., Mittal, R. et al. Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells

- of *Pseudomonas aeruginosa*. Folia Microbiol, 2005, 50, 99-102.
13. **Hassett, D. J., Schweizer, H. P., Ohman, D. E.** *Pseudomonas aeruginosa* sod A and sod B mutants defective in manganese-and-iron cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. J Bacteriol, 1995, 177, 6330-6337.
 14. **Høiby, N.** Prospects for the prevention and control of pseudomonal infection in children with cystic fibrosis. Paediatr Drugs, 2000, 2, 451-463.
 15. **Janda, J. M., Powers, C., Bryant, R. G., Abbott, S. L.** Current perspective on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. Clin Microbiol Rev, 1988, 1, 245-267.
 16. **Jefferson, K. K.** What drives bacteria to produce a biofilm? FEMS Microbiol Lett, 2004, 236, 163-173.
 17. **Jermyn, W. S., Boyd, E. F.** Molecular evolution of *Vibrio* pathogenicity island-2 (VPI-2): mosaic structure among *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* natural isolates. Microbiology, 2005, 151, 311-322.
 18. **Karaolis, D. K. R., Johnson, J. A., Bailey, C. C. et al.** A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. Proc Natl Acad Sci, USA, 1998, 95, 3134-3139.
 19. **Kerketta, J. A., Paul, A. C., Kirubakaran, V. B. et al.** Non O1 *Vibrio cholerae* septicaemia and meningitis neonate. Indian J Pediatr, 2002, 69, 909-910.
 20. **O'Toole, G. A., Kolter, R.** Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS 365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol, 1998, 28, 449-461.
 21. **Pesci, E. C., Iglewski, B. H.** Quorum sensing. In: Burns, D. L., Barbieri, J. T., Iglewski, B. H., Rappuoli, R., (eds): *Bacterial protein toxins*. ASM Press, Washington DC 2003, 55-56.
 22. **Quinn, J. P.** Clinical problems posed by multiresistant non-fermenting Gram-negative pathogens. Clin Infect Dis, 1998, 27, S117-S124.
 23. **Rice, S. A., Koh, K. S., Queck, S. Y. et al.** Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. J Bacteriol, 2005, 187, 3477-3485.
 24. **Satcher, D.** Emerging infections: getting ahead of the cure. Emerg Infect Dis, 1995, 1, 1-6.
 25. **Singh, P. K., Schaefer, A. L., Parsek, M. R. et al.** Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature, 2000, 407, 762-764.
 26. **Staples, S. J., Asher, S. E., Gianella, R. A.** Purification and characterization of heat - stable enterotoxin produced by a strain *E. coli* pathogenic for man. J Biol Chem, 1980, 255, 4716-4721.
 27. **Stepanović, S., Čirković, I., Ranin, L., Svabić-Vlahović, M.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. And *Listeria monocytogenes* on plastic surface. Lett Appl Microbiol, 2004, 38, 428-432.
 28. **Zinnaka, Y., Carpenter, C. C. J.** An enterotoxin produced by non - cholera vibrios. John Hopk Med J, 1972, 131, 403-411.
- Táto práca bola podporovaná Ministerstvom zdravotníctva SR v rámci projektu Analýza tvorby biofilmu u nozokomiálnych bakteriálnych kmeňov ako základ pre prevenciu infekcií v zdravotníckych zariadeniach č. 2005/24-SZU-02 a Agentúrou pre vedu a výskum v rámci projektu Znovu hroziace patogény-vibriá. Štúdium virulencie a možnej aktívnej imunomodulačnej ochrany APVV 0032-06.
- Do redakcie došlo 28. 5. 2007

Ing. A. Hošťacká, CSc.
Slovenská zdravotnícka univerzita
Limbová 12
833 03 Bratislava 37
Slovenská republika
e-mail: anna.hostacka@szu.sk