



## PREGLEDNI RAD / REVIEW

# Mikrobne zajednice i biofilmovi

## Microbial Communities and Biofilms

Lejla Duraković<sup>1\*</sup>, Zijad Duraković<sup>2</sup>, Mihaela Blažinkov<sup>3</sup>, Marijan Bošnjak<sup>1</sup>, Sanja Sikora<sup>3</sup>, Frane Delaš<sup>1</sup>, Ksenija Markov<sup>1</sup>, Andrea Skelin<sup>3</sup>, Domagoj Čvek<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10.000 Zagreb, Hrvatska

<sup>2</sup>Institut za antropologiju, Zavod za medicinsku antropologiju i epidemiologiju, Gajeva 32, 10.000 Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup>Agronomski fakultet, Zavod za mikrobiologiju, Sveučilište u Zagrebu, Svetošimunska 25, 10.000 Zagreb, Hrvatska

### Sažetak

*Sve do godine 1960. mnoga stajališta okolišne mikrobiologije bila su postupci na osnovi promatranja. U novije doba bilo je izvršnih prosudbi za razumijevanje ekonomski važnih neobičnih pojava, poput simbiotskih odnosa između bakterija iz roda *Rhizobium* i leguminoznih biljaka, dok je osnova bila temeljno razumijevanje odnosa između mikrobna rasta i fizičkih parametara, poput temperature i različitih tipova međudjelovanja između različitih mikroba u danome okolišu. Sveukupno, međutim, velik broj opažanja ostao je slabo objašnjen i po mnoge mikrobiologe činilo se da su različiti primjeri upotrijebljeni radi objašnjenja i interpretacije ponašanja mikroba u prirodnome okolišu bili manjkavi.*

*U protekla tri desetljeća situacija se bitno promijenila i svo vrijeme, na sreću okolišnih mikrobiologa, mnogi slabo razumljivi zaostaci, sada ponovo egzistiraju kao poredak razumljiv koji je iznimno proširio razumijevanje odnosa između mikroba i njihova okoliša. Dva primjera za to jesu razumijevanje tvorbe biofilma i njegova okolišna važnost i strategija preživljavanja mikroba koji ne tvore endospore.*

*Ključne riječi: mikrobne zajednice, heterogene populacije, biofilmovi, fizički stres, prehrambena industrija*

### Summary

*Until the 1960s many aspects of environmental microbiology were dealt with on an observational basis. Certainly there was a good measure of understanding of economically important phenomena, such as the symbiotic relationship between *Rhizobium* and leguminous plants, while there was a basic understanding of the relationship between microbial growth and physical parameters, such as temperature and of the various types of interaction between different microorganisms in the same environment. Overall, however, many observations remained poorly explained and, to many microbiologists, it appeared that the various paradigms used to explain and interpret the behaviour of microorganisms in natural environments were deficient. Over the past two decades, the situation has changed and while, happily for environmental microbiologists, much remains less than fully understood, there now exists a framework of knowledge which has greatly expanded the understanding of the relationship between microorganisms and their environments. Two examples are an understanding of biofilm formation and its environmental importance and of the survival strategies of non-endospore forming microorganisms.*

*Keywords: microbial communities, heterogenous populations, biofilms, physical stress, food industry*

### Uvod

Prirodni okoliš u pravilu je napučen populacijama mikroba. Oni mogu obuhvaćati široki raspon fizioloških i nutritivnih tipova, od autotrofa do heterotrofa, od psihrofila do hipertermofila i od obvezatnih aeroba preko mikroaerofilnih bakterija do anaeroba osjetljivih na kisik. Ima iznimaka od toga općenitog pravila, u pravilu gdje je okoliš bio podešavan djelovanjem čovjeka ili kada je ekstremna fizičko-kemijska priroda limitirala tipove sposobne za rast. Primjeri za ovo posljednje uključuju visokolužnata i slana jezera i vrlo kisele izvore.

Danas je prihvaćeno da se autohtona mikroflora najvećeg broja okoliša razvila u prostorno organiziranim fizičko-kemijskim gradijentima (Keith i sur., 1987.; Taylor i sur., 2009); razlika preko koje su ti gradijenti stvoreni vrlo značajno varira. Mikrobni filmovi (biofilmovi) mogu biti debeli samo nekoliko mikrometara u okolišu s malom količinom nutrijenata, dok mrvice tla, mikrobni spletovi, flokule mulja i biofilmovi u okolišu bogatu nutrijentima, makroskopskih su, umjesto mikroskopskih dimenzija. Gradijenti se mogu proširiti i na više od neko-

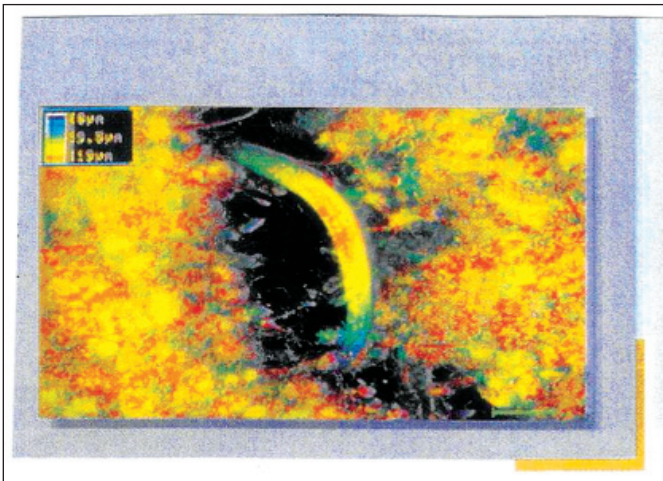
liko metara. Takve situacije, koje uključuju slojevita jezera, odlagališta mulja i geotermalna vrela, mogu se promatrati kao izdvojeni ali važni okoliši.

To je postojanje fizičko-kemijskoga gradijenta koji omogućuje razvoj i istodobno postojanje heterogene populacije mikroba. Mikrobna je populacija organizirana i horizontalno i vertikalno u ovisnosti o smjeru gradijenta. U velikom broju okoliša nalazi se širok raspon i prisutno je golemo mnoštvo različitih fizioloških i nutritivnih tipova mikroba i s jasno proturječnim načinima života oni mogu rasti u zatvorenu susjedstvu. To je napose značajan fenomen u fizički malim okolišima gdje gradijenti mogu biti vrlo visoki. Gradijent kisika kroz male čestice tla, primjerice, omogućuje rast aeroba, mikroaerofila i anaeroba unutar fizički vrlo kratkog raspona.

### Biofilmovi

Svojedobno je bio predlagan velik broj definicija biofilma. Drži se da je najprihvatljivija ona da je biofilm zajednica mikroba umetnuta u kalup načinjen od organskog polimera, koji je pričvršćen na površinu (Slika 1).

Corresponding author: [lejla.durakovic@pbf.hr](mailto:lejla.durakovic@pbf.hr)



**Slika 1.** Mikrobi unutar biofilma. Laserska fotomikrografija nematoda okruženog mikrobnom zajednicom u biofilmu. U gornjem lijevom kutu dana je ljestvica u boji koja prikazuje biofilm – plavom je bojom označeni sloj neposredno uz površinu, a crvenom je označena dubina sloja (Carpenter i Cerf, 1993)

**Figure 1.** Microbes inside the biofilm. Laser photomicrography of nematode surrounded by microbial community in biofilm. In upper left corner there is a coloured scale which represents biofilm – coloured blue is marked a layer directly to the surface, and coloured red is marked a layer depth (Carpenter and Cerf, 1993)

Stupanj do kojega se bakterije pričvršćuju na površine i rast i razmnožavanje ostalih stanica ovisi o raspoloživim nutrijentima. Nutrijenti su prijeko potrebni za razmnožavanje stanica i za tvorbu egzopolisaharida koje tvore i tako osiguravaju kalup za biofilm i pričvršćivanje. Metabolički aktivne bakterije imaju snažan afinitet za pričvršćivanje na površine, napose “divljih” tipova stanica u prirodnom okolišu. U velikom broju okoliša koji su ograničeni nutrijentima (oligotrofički) organske molekule teže koncentraciji na raspoloživim supstratima i stoga stimuliraju rast lokaliziranih biofilмова. U okolišu s vrlo malom količinom raspoloživih nutrijenata bakterije ne teže pričvršćivanju na površine.

Velik se broj fizioloških promjena pojavljuje u mikroba izravno nakon adhezije; te promjene rastu s vremenom. Najveći broj biofilмова u prirodnim obitavalištima sadrži povezane mikrobe i oni su heterogeni u strukturi i kemijskom sastavu. U svim slučajevima, međutim, glavni konstituent kalupa jest voda. Preostatak sadrži različite izvanstanične polimere uključujući glikoproteine i polisaharide, priroda kojih je slabo razumljiva. Oni se u pravilu opisuju kao izvanstanične polimerne tvari (IPT) i obasežu 50-95% suhe tvari biofilma. U prošlosti, smatralo se da su mikrobi bili manje ili više jednoliko rasprostranjeni kroz biofilm. To je bio slučaj u nekim okolnostima, ali u pravilu je struktura zbirka mikrokolonija, odvojena “vodenim kanalima”.

Biofilmovi koji se prenose na njihove stanovnike pomažu stabilnosti okoliša i sadrže najveći broj heterogenih mikrobnih zajednica. Biofilmovi također služe kao fizička zaštita mikrobnih stanica od vanjskih faktora poput ultravioletnog (UV) zračenja i topline i svode na najmanju mjeru efekte promjena fizikalnih parametara poput pH-vrijednosti, a daju i zaštitu od inhibicijskih tvari. Zaštita od inhibitora može biti napose važna gdje se mikrobnost kontrolira s pomoću biocida i dez-

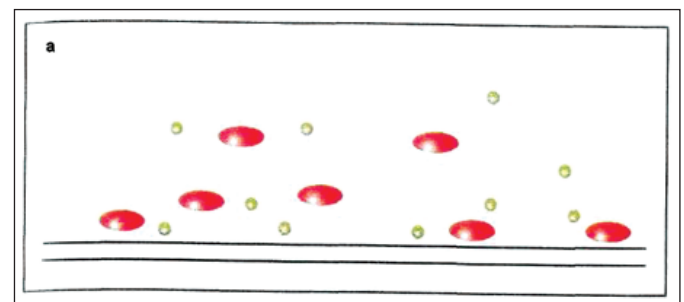
inficijenasu, ali oni su također iznimno važni u omogućavanju preživljavanja bakterija nakon onečišćenja.

Osim toga, hvatanje vode s pomoću biofilмова minimalizira rizik od dehidracije. To je napose značajno po mikrobe u vodenom okolišu što je povremeno izložen isušivanju, a i u tlima koja su podložna sezonskoj dehidraciji. Kao i u zaštiti od fizičkih i kemijskih stresova, biofilmovi zaštićuju bakterije od faga (Hicks i Rowbury, 1987). Oni također mogu biti zaštita od litičkih i parazitskih bakterija te i od eukariotskih grabežljivaca. U skorašnje doba, mikrobnost grabežljivci mogu imati goleme koristi od velikih populacija bakterija u blizini biofilмова kao rezultat ljuštenja vanjskih slojeva i oslobađanja stanica kćeri.

Difuzija nutrijenata kroz biofilmove teži da bude spora i samo su limitirane količine raspoložive mikrobima u dubokim slojevima. Metaboličke aktivnosti takvih stanica jesu limitirane i njihov status je opisan kao “nepokretan” (Lewis i Gattie, 1990). Taj status ima prednost što bakterije nisu predmet natjecanja. Istodobno, biofilmovi su vrlo djelotvorni u hvatanju nutrijenata u obliku organskih i anorganskih molekula ili zasebnih čestica. To rezultira iz sveukupnog negativnog naboja na polisaharidnim molekulama unutar kalupa biofilma.

Tvorba biofilмова slijedi definirani postepeni slijed što se razlikuje od kemijski inertnih površina i u živom tkivu. Temeljna razlika leži u činjenici da je samo nespecifična adhezija uključena u okoliš, a specifična je adhezija kao proces u razvoju biofilмова u prirodnome okolišu objašnjena vrlo iscrpno (Barbieri i sur., 2007).

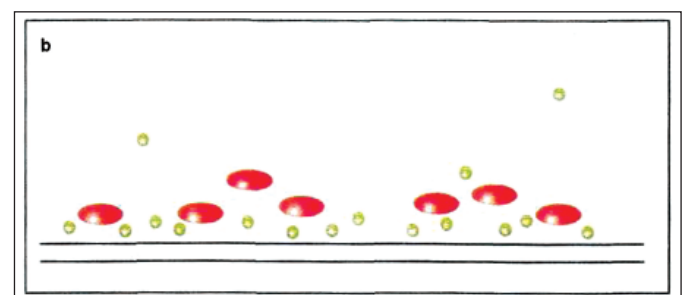
Tvorba biofilma na kemijski inertnim površinama uključuje četiri stadija: transport, adsorpciju molekula, adheziju mikroba i kolonizaciju (Slika 2 a-d).



**Slika 2.** Prikaz tvorbe biofilma (Lewis i Gattie, 1990)

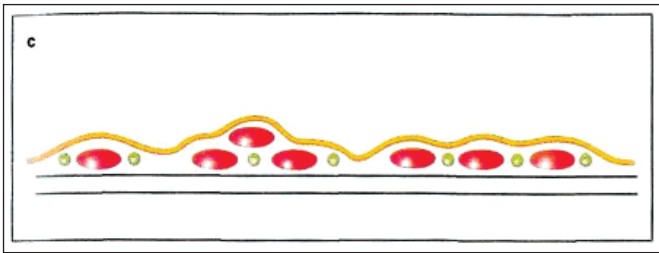
**Figure 2.** Representation of biofilm formation (Lewis and Gattie, 1990)  
a) Suspenzija bakterija (crveno) i raspršenog materijala (zeleno) nanosena je na površinu supstrata.

a) Initially both bacteria (red) and particulate material (green) are suspended freely above the surface to be colonized.

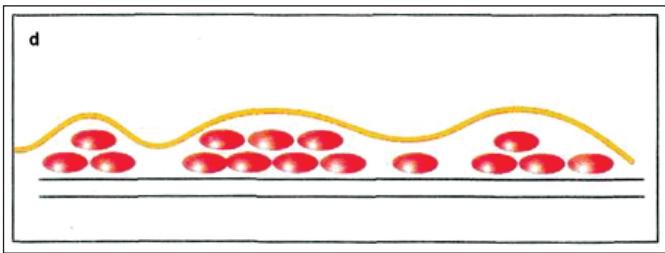


b) Koncentriranje na površini supstrata.

b) Following a there is a concentration to the surface.



c) Nakon toga slijedi tvorba "mladog" biofilma.  
c) Following b there is the formation of the "young" biofilm.



d) Kako se stanice kontinuirano razmnožavaju, biofilm se zgusnjava u točku na kojoj se pojavljuje "ljuštenje".  
d) As cell multiplication continues, the biofilm thickens to the point as which "sloughing of" occurs.

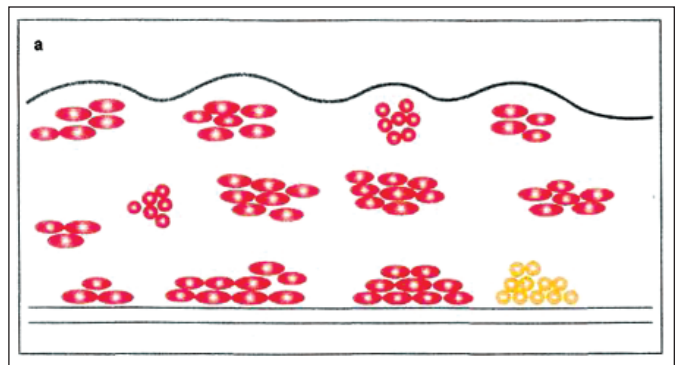
Transport uključuje pokretanje molekula, inertnih čestica i mikroba na površini na kojoj se biofilm naknadno stvara i obaseže nekoliko postupaka. To slijedi nakon adsorpcije molekula što se pojavljuje istodobno. Nagomilavanje molekula na čvrsto-tekućoj unutrašnjoj strani može se opisati kao "film u dobru stanju". Iznosi mikrobnoga rasta povišeni su visokom koncentracijom nutrijenata na unutrašnjoj strani. Adhezija se pojavljuje puno polaganije nego adsorpcija i uključuje dva odvojena stadija. U prvome, reverzibilnom stanju bakterije se neprekidno kreću zbog Brownova gibanja i lako se uklanjaju čišćenjem ili nekim drugim mehaničkim postupcima. Drugi stadij se ponaša kao ireverzibilan i uključuje puno jače povezivanje. Stupanj adhezije individualnih tipova mikroba određen je osobinama površine koje su determinirane izvanstaničnim polimernim tvarima. One također variraju u suglasju s fazom rasta stanice.

Poznate su i iznimke, ali u najvećem broju slučajeva, IPT se oslobađaju na kraju eksponencijalnog rasta ili tijekom stacionarne faze, dajući prednost adheziji na hidrofobne površine. To je spojivo s otkrićem koje, sugerira da su submerzne površine u morskome okolišu u pravilu prvotno kolonizirane malim stanicama; mala veličina stanice u pravilu je povezana s izgladnjivanjem (Roszak i Colwell, 1987). Kolonizacija je konačan stadij i vodi izravno tvorbi biofilma. Organizam koji proizvodi IPT razmnožava se unutar razvijenog kalupa, konačno tvoreći mikrokolonije. Iznosi kolonizacije variraju značajno, a vrijeme nužno za tvorbu ravnotežnog stanja nalazi se u rasponu od nekoliko sati do nekoliko mjeseci.

Biofilm jest dinamičan umjesto statičan i on nedvojbeno podliježe promjenama u ovisnosti o vremenu. Vanjska površina se neprekidno mijenja kako se stanice ljušte i smanjuju i prijanjaju. Stanice koje se ljušte i smanjuju u pravilu su hidrofilnije stanice kćeri. Biofilmovi mogu, stoga, nesumnjivo osiguravati stalan inokulum stanica kćeri. To je po okoliš iznimno važno jer takve stanice, prilagođene na određeni okoliš, jesu korisne

za iniciranje tvorbe biofilma na novim površinama, poput smanjivanja grananja u riječnoj struji, ili postojanju površina koje, u nekim slučajevima, nisu prethodno kolonizirane.

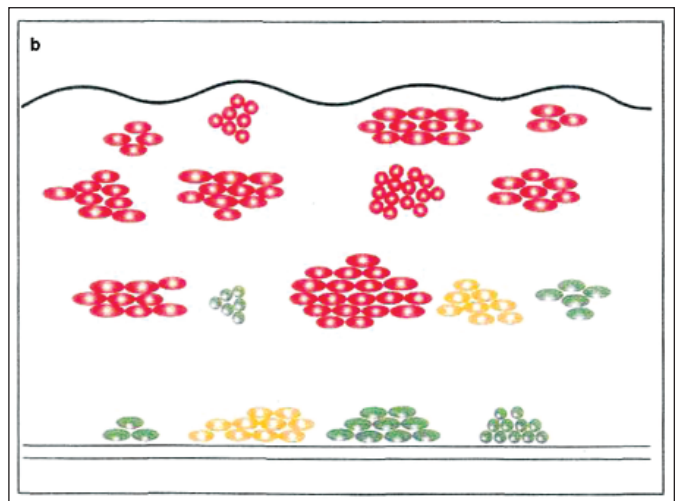
Usprkos ljuštenju, biofilmovi teže povećanju debljine, što dovodi do promjena u fizičko-kemijskom gradijentu. Na zbivanja unutar biofilma može utjecati čitav niz faktora, uključujući promjene nutrijenata i iskoristivosti  $O_2$  i pH-vrijednosti. U slučaju nutrijenata, stanice zatvaraju površinu biofilma i uzimaju dostatno za osnovnu reprodukciju, za razliku od situacije u dubljim slojevima gdje razina nutrijenata može biti dostatna samo za održavanje, ili čak manja. Ako debljina biofilma raste, uvjeti unutar ispod površinskog sloja se mijenjaju (Slika 3 a-b).



Slika 3. Prikaz limitiranja nutrijenta u biofilmovima (Roszak i Colwell, 1987)

Figure 3. Representation of nutrient limitation in biofilms (Roszak and Colwell, 1987)

a) Čak i u relativno novouspostavljenom biofilmu neke stanice u donjem sloju postaju "nepokretne" (žuto obojene stanice na slici).  
a) Even in a relatively newly established biofilm some cells in the lower layer become "quiescent" (coloured yellow in the figure).



b) Ako najgušći dio na slici 3 raste, neke kolonije u donjem sloju postaju "ugibajuće" (zeleno obojene na slici) dok se povećava broj kolonija u stadiju "mirovanja".

b) As the thickens in 3 increases, some colonies in the lower layers become "moribund" (coloured green in the figure) while an increasing number move to the "quiescent" state.

Najočevidniji efekt jest da je iskoristivost nutrijenata smanjena što dovodi do preuranjene aktivnosti stanica koje stoga postaju nepokretne. Taj efekt nije potpun i bakterijske



stanice s malim zahtjevima za nutrijentima, ili koje su se brže prilagodile na alternativne supstrate, kontinuirano će se razmnožavati u tijeku duljeg vremenskog razdoblja i tako promijeniti ravnotežu unutar vrsta. U nekoj točki, međutim, debeo film postaje lomljiv i ljušti se od supstrata. Debljina biofilma raste vrlo brzo u tijeku perioda kada je dostupna velika količina nutrijenata koja favorizira aktivan rast stanica u unutrašnjim slojevima biofilma. Postojanost biofilma može, međutim, reducirati debljinu što rapidno dovodi do točke na kojoj difuzija nutrijenata u dubljim slojevima djelotvorno prestaje i u tim slojevima mikrobi ugibaju.

## Biofilmovi i čovjek

U svim poznatim obitavalištima, bakterije preferiraju reprodukciju na površini više nego u suspenziji u tekućoj fazi. Prva istraživanja biofilma započela su godine 1940., a do godine 1970. držalo se da se tvorba biofilma zbiva u gotovo svemu prirodnom okolišu. Kamen u vodenoj struji, umetak u ljudskome tijelu, zub, cijev za vodu ili vodovod npr. jesu mjesta na kojima se razvijaju biofilmovi (Carpenter i Cerf, 1993). Dajući procjenu opsega u kojemu biofilmovi djeluju na ljude i posljedice toga djelovanja, bili su neočekivani.

S medicinskog stajališta, koloniziranje umetaka može poslužiti kao žarišna točka za potencijalne fatalne infekcije; stanice u dubokim slojevima bivaju zaštićene od antitijela i fagocitskih bijelih krvnih tjelesaca (Anwar i Costerton, 1992). Tvorba biofilma također je ključni faktor u patologiji bolesti zuba. U industriji hrane drži se da razvoj biofilma na površinama strojeva služi kao zaštita patogenima poput *Listeria monocytogenes* od sanitacijskih agenasa, dok su u mnogim industrijama biofilmovi odgovorni za velike ekonomske gubitke (Tablica 1).

S druge strane, tvorbu biofilma čovjek itekako može iskoristiti. Bakterije *Acetobacter* spp., rastući primjerice u biofilmu, odgovorne su za oksidaciju etanola u octenu kiselinu u tradicionalnoj proizvodnji octa. Još više, u modernoj industrijskoj primjeni iskorištavanje biofilma uključuje njihovu visoku djelotvornost u hvatanju molekula i malih dijelova tvari i razvoju sposobnosti razgradnje čak visoko otpornih molekula. Odabrani primjeri korisne industrijske primjene biofilma dani su u tablici 2.

S pragmatičkog stajališta, istraživanja biofilma u prehrambenoj industriji naglašavaju važnost čišćenja prije sanitizacije pribora. Ako pribor nije načinjen od materijala bitno otpornih na biološko onečišćenje, pravi biofilmovi trebaju se

**Tablica 1.** Primjeri poteškoća u industriji uzrokovanih tvorbom biofilma (Blecken i sur., 2007; Boltz i La Motta, 2007; Barros i sur., 2007; Hunsacker i Leid, 2008; Faezel i sur., 2009; Taylor i sur., 2009)

**Table 1.** Examples of industrial problems caused by biofilm formation (Blecken et al., 2007; Boltz and La Motta, 2007; Barros et al., 2007; Hunsacker and Leid, 2008; Faezel et al., 2009; Taylor et al., 2009)

Industrija Industry	Poteškoća Problem
Transport tekućina (općenito) Fluid transfer (general)	Smanjenje protoka i začepljenje cijevi Reduction of flow rates and blocking of pipes
Raspačavanje vode za piće Potable water distribution	Smanjenje protoka Reduction of flow rates Zaraze Taints Neprihvatljivi veliki brojevi bakterija Unacceptably high bacterial numbers
Proizvodnja papira Paper making	Papir loše kakvoće Poor quality paper
Meljava brašna; priprava slada; rafiniranje šećera Flour milling; malting; sugar refining	Sprečavanje postupka tvorbom sluzi Interference with operation through slime
Ljuštenje boje s brodova Ship's hulls	Brže propadanje oplata brodova Increase in fuel consumption; lower overall speeds
Čelični dijelovi, naftovodi i dr. Structural steelwork, pipelines, etc.	Ubrzana korozija Accelerated corrosion
Postupci zagrijavanja i hlađenja Heating and cooling operations	Smanjena učinkovitost Reduced efficiency
Prerada hrane Food processing	Rezervoar kvarenja i potencijalnih patogenih mikroba; moguće preživljavanje patogena u tijeku prerade hrane Reservoir of spoilage and potentially pathogenic microorganisms; possible survival of pathogens through under-processing
Tiskarstvo Printing	Začepljenje cijevi za dobavu tiskarskih bojila; smanjenje kakvoće bojila Blockage of ink supply pipes; reduced ink quality

podvrgavati sanitizaciji danima i tjednima za doseganje stabilne ravnoteže. Svojevremeno čišćenje jamči da do mikrobnih zajednica u nascentnom biofilmu sanitizatori mogu doprijeti. Oblikovanje pribora s visokouglačanim površinama također sprječava stvaranje biofilma što mikrobnim stanicama početni adsorpcijski korak čini puno težim.

## Zaključak

Heterogene zajednice jesu iznimno važne u mikrobnome svijetu budući da značajne prednosti dobivaju od predstavnika populacije. Zaista je dokazano da prostorna organizacija u biofilmovima i slične situacije omogućuju mikrobima dobivanje mnoštva koristi. Međudjelovanja između mikroba omogućuju djelotvornosti poput kometabolizma i uzajamnog opskrbljivanja hranom, dok su različite populacije manje podložne okolišnim promjenama i mogu se povratiti iz propasti puno brže nego ekosustavi koji su manje rašireni. To dovodi do dugoročne stabilnosti, iako se smatralo da najveći broj mikrobnih sustava jesu dinamične zajednice i oni su predmet stalnih kratkoročnih promjena. Promjene mogu rezultirati zbog periodičkih ili neperiodičkih zbivanja što utječu na fizičko-kemijska svojstva okoliša poput potpunih, ili gradijenata un-



**Tablica 2.** Postupci što uključuju korisnu primjenu tvorbe biofilma (Hu i sur., 2008; Gounot, 1991; Azua-Bustos i sur., 2009; Ovari i sur., 2009; Hoogenkamp i sur., 2009)

**Table 2.** Processes involving the useful exploitation of biofilm formation (Hu et al., 2008; Gounot, 1991; Azua-Bustos et al., 2009; Ovari et al., 2009; Hoogenkamp et al., 2009)

Postupak Procedure	Primjer primjene Example of usage
Pročišćavanje vode Water purification	Polagani pješčani filter Slow and sand filtration
Pročišćavanje mulja Sewage purification	Kapajući filtri Percolating filters
Pročišćavanje poljoprivrednog otpada Agricultural waste purification	Flokulacijski tornjevi Floccor towers
Pročišćavanje industrijskog otpada Industrial waste purification	Bioreaktori Bioreactors
Uklanjanje onečišćenja teških metalima (uključujući uran) Removal of heavy metal pollution (including uranium)	Biološko uklanjanje onečišćenja živom Mercury waste remediation
Dobivanje metala iz siromašnih ruda Recovery of metals from low-grade ores	Izluživanje s pomoću mikroba Microbial leaching
Proizvodnja octene kiseline iz etanola Production of acetic acid from ethanol	Tradicionalni postupak Traditional process

utar danoga okoliša. Fizičko-kemijski efekti jesu izravni (kroz izravno djelovanje na dani dio populacije) i neizravni (kroz utjecaj na međudjelovanja između članova zajednice). Može se, međutim, smatrati, da kratkotrajne promjene povećavaju dugotrajnu stabilnost.

## Literatura

Anwar H., Costerton J.W. (1992) Effective use of antibiotics in treatment of biofilm-associated infections, *American Society of Microbiology News*, **58**: 665-668.

Azua-Bustos A., Gonzales-Silva C., Mancilla R.A., Salas L. Palma (2009) Ancient Photosynthetic Eukaryote Biofilms in an Atacama Desert Coastal Cave, RE. Wynne J.J., McKay C.P., Vicuna R. *Microbial Ecology*, **58** (3): 485-496.

Barbieri D.D.S.V., Vicente V.A., Fraiz F.C., Lavoranti O.J., Svidzinski T.I.E., Pinheiro R.L. (2007) Analysis of the *in vitro* adherence of *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*, *Brazilian Journal of Microbiology*, **38** (4): 624-631.

Barros M.D.F., Nero L.A., Manoel A.V.B., d'Ovidio L., da Silva L.C., Franco B.D.G.D., Beloti V. (2007) *Listeria* spp. associated to different levels of autochthonous microbiota in meat, meat products and processing plants, *Brazilian Journal of Microbiology*, **38** (4): 603-609.

Blecken G.T., Zinger Y., Muthanna T.M., Deletic A., Fletcher T.D., Viklander M. (2007) The influence of temperature on nutrient treatment efficiency in stormwater biofilter systems, *Water Science & Technology*, **56** (10): 83-91.

Boltz J.P., La Motta E.J. (2007) Kinetics of particulate organic matter removal as a response to bioflocculation in aerobic biofilm reactors, *Water Environment Research*, **79** (7): 725-735.

Carpenter B., Cerf O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry, *Journal of Applied Bacteriology*, **75**: 499-511.

Faezel L.M., Baumgartner L.K., Peterson K.L., Frank D.N., Harris J.K., Pace N.R. (2009) Opportunistic pathogens in showerhead biofilms, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106** (38): 16393-16398.

Gounot A.M. (1991) Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications, *Journal of Applied Bacteriology*, **71**: 386-397.

Hicks S.J., Rowbury R.J. (1987) Bacteriophage resistance of attached organisms as a factor in the survival of plasmid-bearing strains of *Escherichia coli*, *Letters in Applied Microbiology*, **4**: 129-132.

Hoogenkamp M.A., Crielaard W., ten Cate J.M., Wever R., Hartog A.F., Renirie R. (2009) Antimicrobial Activity of Vanadium Chloroperoxidase on Planktonic *Streptococcus mutans* Cells and *Streptococcus mutans* biofilms, *Caries Research*, **43** (5): 334-338.

Hu J., Li D., Tao Y., He X.H., Wang X.M., Li X.D. (2008) Effect of Acetate on Nitrite Oxidation in Mixed-Population Biofilms, *Journal of Bioscience & Bioengineering*, **106** (6): 580-586.

Hunsaker D.H., Leid J.G. (2008) The relationship of biofilms to chronic rhinosinusitis, *Current opinion in Otolaryngology & Head & Neck Surgery*, **16** (3): 237-241.

Keith S.M., Russ M.A., Macfarlane G.T., Herbert R.A. (1987) The ecology and physiology of anaerobic bacteria isolated from Tay estuary sediments, *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, **92B**: 323-333.

Lewis D.L., Gattie D.K. (1990) Effects of cellular aggregation on the ecology of microorganisms, *American Society of Microbiology News*, **56**: 263-268.

Ovari M., Strelcić C., Wobruschek P., Zaray G. (2009) Determination of carbon in natural freshwater biofilms with total reflection X-ray fluorescence spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy*, **64** (8 Special Issue SI): 802-804.

Pierce C.G., Uppuluri P., Tristan A.R., Wormley F.L., Mowat E., Ramage G., Lopez-Ribot J.L. (2008) A simple and reproducible 96-well plate based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing, *Nature Protocols*, **3** (9): 1494-1500.

Roszak D.B., Colwell R.R. (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment, *Microbiological Reviews*, **51**: 365-379.

Taylor M., Ross K., Bentham R. (2009) *Legionella*, Protozoa and Biofilms: Interactions Within Complex Microbial Systems, *Microbial Ecology*, **58** (3): 538-547.



**Autori / Authors**

*Dr.sc. Lejla Duraković*  
*Sveučilište u Zagrebu*  
*Prehrambeno-biotehnološki fakultet*  
*Zavod za biokemijsko inženjerstvo*  
*Pierottijeva 6*

*Prof.dr.sc. Zijad Duraković*  
*Institut za antropologiju*  
*Zavod za medicinsku antropologiju i epidemiologiju*  
*Gajeva 32*  
*Zagreb*

*Doc.dr.sc. Mihaela Blažinkov*  
*Sveučilište u Zagrebu*  
*Agronomski fakultet*  
*Zavod za mikrobiologiju*  
*Svetošimunska 25*

*Prof.dr.sc. Marijan Bošnjak*  
*Sveučilište u Zagrebu*  
*Prehrambeno-biotehnološki fakultet*  
*Zavod za biokemijsko inženjerstvo*  
*Pierottijeva 6*

*Prof.dr.sc. Sanja Sikora*  
*Sveučilište u Zagrebu*  
*Agronomski fakultet*  
*Zavod za mikrobiologiju*  
*Svetošimunska 25*

*Prof.dr.sc. Frane Delaš*  
*Sveučilište u Zagrebu*  
*Prehrambeno-biotehnološki fakultet*  
*Zavod za biokemijsko inženjerstvo*  
*Pierottijeva 6*

*Doc.dr.sc. Ksenija Markov*  
*Sveučilište u Zagrebu*  
*Prehrambeno-biotehnološki fakultet*  
*Zavod za biokemijsko inženjerstvo*  
*Pierottijeva 6*

*Mr.sc. Andrea Skelin*  
*Sveučilište u Zagrebu*  
*Agronomski fakultet*  
*Zavod za mikrobiologiju*  
*Svetošimunska 25*

*Domagoj Čvek, dipl.ing.*  
*Sveučilište u Zagrebu*  
*Prehrambeno-biotehnološki fakultet*  
*Zavod za biokemijsko inženjerstvo*  
*Pierottijeva 6*