



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2005 01089**

(22) Data de depozit: **28.12.2005**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **30.12.2010** BOPI nr. **12/2010**

(41) Data publicării cererii:
30.07.2007 BOPI nr. **7/2007**

(73) Titular:
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,**
BD M. KOGĂLNICEANU, NR. 36-46,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **LAZĂR VERONICA,**
STR. G-RAL B. VLĂDOIANU, NR. 4, BL. 36,
SC. A, AP. 2, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B,
RO;

• **CHIFIRIUC MARIANA- CARMEN,**
STR. TUZLA, NR. 1, BL. 11, SC. B, AP. 56,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CERNAT RAMONA C.,**
STR. PREZAN C-TIN, BL. 102, SC. A, AP. 3,
VASLUI, VS, RO;
• **BULAI DOINA, STR. BÂLEA, NR. 10,**
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(56) Documente din stadiul tehnicii:
EP 1067385

(54) **METODĂ DE DETERMINARE A SENSIBILITĂȚII LA
SUBSTANȚE ANTIMICROBIENE A BIOFILMELOR
BACTERIENE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de determinare, în mediu lichid, a sensibilității la substanțe antimicrobiene a microorganismelor aderente și incluse în biofilme dezvoltate pe substraturi inerte din punct de vedere nutrițional, cu aplicații în medicină, industria farmaceutică și alimentară, și în domeniul ecologiei. Metoda conform invenției cuprinde următoarele etape: aderența celulelor microbiene la un suport inert, imersat într-un mediu de cultură adecvat tipului de microorganism testat și/sau parametrului urmărit; adăugarea diferitelor concentrații de antibiotice sau de alte substanțe antimicrobiene; incubarea în condiții de temperatură și aerare corespunzătoare tipului de microorganism testat;

îndepărtarea bacteriilor neaderate, prin spălare, și adăugarea de mediu de cultură steril peste substratul cu microorganisme aderente; reincubare în condiții adecvate; determinarea gradului de aderență a celulelor la substrat, prin măsurarea densității optice a mediului de cultură; determinarea rezistenței la substanțe antimicrobiene a celulelor incluse în biofilme, prin măsurarea densității optice a culturilor obținute, comparativ cu culturile martor, dezvoltate în mediu fără substanțe antimicrobiene.

Revendicări: 1
Figuri: 6



1 Prezenta invenție se referă la o metodă de determinare a sensibilității la substanțe
antimicrobiene a biofilmelor bacteriene, dezvoltate pe un substrat inert, imersat în mediu
3 lichid. Metoda are aplicații în medicină, industria farmaceutică și alimentară.

Biofilmul reprezintă o comunitate microbiană sesilă, compusă din celule care sunt în
5 mod ireversibil atașate la un substrat, la o interfață sau unele de altele, care sunt înglobate
într-o matrice de substanțe polimerice, extracelulare, produse de către aceste celule și care
7 prezintă un fenotip modificat, în privința ratei de creștere și a transcrierii genelor (Donlan și
Costerton, 2002).

9 Fenomenele de aderență și formare a biofilmelor au fost studiate la un număr impor-
tant de bacterii patogene, întrucât legarea acestora de celulele sensibile sau aderența la dis-
11 pozitve medicale reprezintă etapa inițială și o precondiție obligatorie a procesului infecțios.

Biomaterialele sunt utilizate în mod frecvent în medicină, pentru substituirea țesu-
13 turilor, prin diferite dispozitive protetice, temporare sau permanente, dar și în scop terapeutic
și în tehnicile exploratorii invazive (Donlan și Costerton, 2002).

15 Biofilmele bacteriene, dezvoltate pe biopolimerii utilizați în medicină, determină infecții
asociate implanturilor, care sunt dificil de tratat. Calitatea de substrat inert se referă la faptul
17 că aceste materiale, de regulă, nu pot fi folosite ca nutrienți de către bacterii, dar, în fapt,
aceste materiale sunt active din punct de vedere fizico-chimic și pot modula direct aderența
19 bacteriană sau să interacționeze cu mecanismele de apărare ale gazdei. Substratul inert are
o serie de proprietăți fizico-chimice, care influențează adsorbția inițială a bacteriilor și
21 formarea consecutivă a biofilmelor.

Materialele amorfe, așa cum sunt majoritatea biopolimerilor, au o suprafață cu rugo-
23 zitate mare, neregularitățile suprafeței favorizând aderența bacteriană. Aceste materiale sunt
hidrofobe, ceea ce influențează în sens pozitiv aderența bacteriilor, a căror suprafață celu-
25 lară are un caracter hidrofob, bacterii cu un caracter mai puțin virulent față de un substrat
celular. Dimpotrivă, virulența acestora este mai mare atunci când aceste bacterii aderă și
27 colonizează materialele hidrofobe, prin interacțiuni hidrofobe.

La baza biofilmelor dezvoltate pe substraturi inerte, celulele sunt mai înfometate
29 comparativ cu cele aderate la un substrat celular, astfel că moartea și autoliza celulelor
bazale, producerea de gaze în grosimea biofilmului contribuie la destabilizarea acestuia și
31 la detașarea de fragmente, responsabile de diseminările la distanță. Aceste fenomene
explică, de exemplu, modul cum se produce contaminarea apei din rețeaua de distribuție,
33 chiar atunci când, la intrarea în rețea, apa corespunde standardelor din punct de vedere
microbiologic. Aceleași fenomene pot conduce, în cazul infecțiilor asociate dispozitivelor
35 protetice, la diseminări la distanță și infecții generalizate.

Una din cele mai importante consecințe ale formării biofilmelor rezidă în faptul că
37 celulele incluse în astfel de pelicule sunt mai rezistente atât la mecanismele de apărare ale
gazdei, cât și la dozele convenționale de antibiotice, antiseptice, dezinfectante, biocizi.
39 Astfel, s-a constatat că eficiența multor agenți antibacterieni, incluzând celulele fagocitare
din sânge, anticorpii, biocizii, antibioticele, este mult redusă dacă sunt folosiți împotriva bio-
41 filmelor față de celule planctonice (Yasuda și colab., 1993). Mecanismul acestei protecții sau
rezistențe la factori antimicrobieni, pentru care termenul mai corect ar fi de recalcitrantă sau
43 rezistență fenotipică, foarte diferită de rezistența propriu-zisă la antibiotice, determinată
genetic, este în continuare controversat. Explicația include formarea unei bariere de
45 penetrație de către glicocalix și modificarea statutului fiziologic al rezidenților din biofilme sau
combinarea ambilor factori (Donlan și Costerton, 2002). Sensibilitatea redusă a bacteriilor
47 în biofilme se poate datora și unei alte bariere care poate să apară dacă în biofilm este
prezentă o enzimă detoxifiantă sau dacă celulele din profunzimea biofilmului au o fiziologie
49 diferită (ca răspuns la condițiile locale) în comparație cu celulele dispersate, ceea ce
determină sensibilități diferite față de multe substanțe antimicrobiene (Costerton et al., 1999).

RO 123145 B1

Când biofilmele din infecțiile cronice s-au dezvoltat, chemoterapia trebuie să se bazeze pe doze de antibiotice necesare omorării bacteriilor din biofilme și nu pe cele care pot ucide celulele libere neprotejate, doze determinate prin testele de rutină de testare a sensibilității bacteriene la antibiotice.

Toate antibioticele de pe piață au fost testate și selectate pentru abilitatea acestora de a ucide bacteriile planctonice, prin metoda clasică, standardizată, recomandată de CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute, anterior NCCLS - Committee for Clinical Laboratory Standards*), realizată pe celule dispersate, crescute rapid, pe un mediu artificial bogat în nutrienți. Această metodă permite stabilirea unei concentrații minime inhibitorii (C.M.I.), active față de celulele planktonice, dar ineficiente asupra biofilmelor (Nickel și colab, 1985; Gander, 1996).

Din aceste considerente, este absolut necesară găsirea unei metode adecvate de testare a sensibilității la antibiotice a bacteriilor atașate de substratul natural al acestora (reprezentat, de exemplu, de un anumit material din care este confecționat un anumit dispozitiv protetic), sub formă de biofilme sau de microcolonii, și care să fie scăldate de un mediu lichid, care să-l aproximeze pe cel natural (Xu și colab. 1988; Costerton și colab., 1989; Ceri și colab., 1999; Stewart și colab., 1999). O astfel de metodă ar permite stabilirea unei concentrații minime, eficiente, față de biofilme. De exemplu, modelul propus de Ceri, privind determinarea biofilmelor experimentale (**US 6051423**, 2000 - Biofilm assay - by Ceri et al), necesită utilizarea unor camere cu șanțuri orizontale sau în meandre inundate de un curent de lichid al cărui sens de curgere este permanent schimbat. Pentru a urmări activitatea antibiofilm a unui anumit compus, acesta este adăugat într-unul dintre șanțuri, iar gradul de dezvoltare este comparat cu al unui biofilm martor, dezvoltat în absența oricărei substanțe antimicrobiene. Într-un alt model (**ES 209198 A1**, 1998, Process for assaying antimicrobial agents in relation to bacteria which grow in bilayers, Amorena et al.), biofilmele se dezvoltă pe pereții din plastic ai unei plăci cu 96 de godeuri, însă măsurarea gradului de dezvoltare al biofilmului necesită o metodă specială de detecție a ATP-ului bacterian prin luminimetrie, metodă scumpă, care nu este la dispoziția laboratoarelor obișnuite de microbiologie. De asemenea, au fost elaborate modele de dezvoltare *in vitro* a biofilmelor pe bile magnetice imersate în mediul de cultură, care ulterior sunt manipulate în diferite scopuri, cu ajutorul unui magnet (**WO 2004111264 A1**, Bacterial biofilm assay employing magnetic beads, Surette M. et al.), dar această metodă este laborioasă și nu poate fi utilizată în rutina pentru determinarea sensibilității bacteriilor aderate la diferite substanțe. Există, de asemenea, metode speciale care permit cuantificarea biofilmelor formate de bacteriile gram negative sau fungi pe diferite tipuri de eșantioane (**EP 1067385 A2**, Method for the quantification of the biofilm load on sample bodies, Seipp H.M. et al.), prin măsurarea cantității de endotoxine (LPS sau 1,3 β-D glucan) prin testul LAL, test extrem de scump, utilizat la noi în țară doar în industria farmaceutică, ca test de pirogenitate pentru soluțiile injectabile.

Dezavantajele soluțiilor tehnice existente, prezentate mai sus, constau, așadar, în aceea că:

1) nu sunt adecvate pentru determinarea de rutină a sensibilității și rezistenței la antibiotice a bacteriilor aderate și incluse în biofilme;

2) sunt laborioase;

3) sunt costisitoare, implicând un consum mare de materiale specifice.

Problema tehnică, pe care o rezolvă invenția, constă în conceperea unei metode de determinare cantitativă a sensibilității biofilmelor la un anumit antibiotic.

Soluția adoptată de solicitant, pentru rezolvarea problemei tehnice, constă în realizarea unui mediu cu microorganisme aderate la un substrat inert care poate fi imersat în mediu lichid.

RO 123145 B1

1 Metoda de determinare a sensibilității la substanțe antimicrobiene a biofilmelor bac-
2 teriene, dezvoltate pe un substrat inert, imersat în mediu lichid, conform invenției, cuprinde
3 următoarele etape:

4 a) punerea în contact a unei suspensii microbiene de densitate cunoscută cu un
5 suport inert de dimensiuni cunoscute, sterilizat în prealabil și imersat într-un volum fix de
6 mediu de cultură lichid, ales dintre bulion simplu, nutritiv și mediu Muller Hinton, repartizat
7 în plăci cu 6 sau 24 godeuri;

8 b) adăugarea fie la începutul experimentului, fie după o perioadă de incubare la 37°C,
9 timp de 3 h, a diferite concentrații de antibiotice sau alte substanțe antimicrobiene;

10 c) incubarea la 37°C a sistemului tulpină microbiană: suport inert: antibiotic, timp de
11 24 h, perioadă de timp necesară acțiunii antibioticului;

12 d) îndepărtarea mediului de cultură lichid și a microorganismelor dezvoltate în sus-
13 pensie și spălarea suportului inert, pentru îndepărtarea bacteriilor neaderate;

14 e) adăugarea de mediu de cultură steril peste suportul inert, colonizat cu microorga-
15 nisme aderate și reincubarea la 37°C, timp de 24 h;

16 f) măsurarea densității optice a mediului de cultură la 600 nm, în vederea aprecierii
17 gradului de viabilitate a celulelor bacteriene, incluse în biofilm, în funcție de densitatea
18 mediului de cultură;

19 g) compararea valorilor densității optice, măsurată la 600 nm, a culturilor obținute în
20 mediu cu diferite concentrații de substanțe antimicrobiene, comparativ cu culturile martor
21 dezvoltate în mediu de cultură lichid, fără adaos de antibiotice, în scopul aprecierii eficienței
22 antibiofilm a unei anumite concentrații de antibiotic.

23 Invenția prezintă următoarele avantaje:

24 - metoda permite determinarea calitativă sau cantitativă a sensibilității la substanțe
25 antimicrobiene a oricărui tip de microroganisme aderate la orice tip de substrat inert care
26 poate fi imersat în mediu lichid, fiind așadar foarte utilă în selectarea biomaterialelor cu
27 proprietăți fizico-chimice adecvate, care să prevină sau să întârzie colonizarea microbiană,
28 și în orientarea clinicianului în alegerea corectă a terapiei unei infecții apărute la un pacient
29 cateterizat sau în luarea deciziei de îndepărtare a cateterului colonizat;

30 - metoda este ușor de realizat în condițiile dotării existente în laboratoarele de micro-
31 biologie clinică, ori de câte ori este izolată o tulpină microbiană dintr-o infecție cu producere
32 de biofilme;

33 - metoda este ieftină, necesitând, în plus față de materialele existente în mod normal
34 într-un laborator de spital cu dotare minimală, plăci de plastic cu godeuri care pot fi coman-
35 date chiar la producători interni (Incerplast), și poate fi realizată cu maximă reproductibilitate
36 de un tehnician de laborator instruit; în situații urgente, plăcile cu godeuri pot fi înlocuite de
37 orice alt sistem închis, în funcție de tipul și forma de prezentare a materialului inert, folosit
38 ca substrat pentru aderența microbiană (de exemplu tuburi, flacoane Erlenmayer etc.);

39 - metoda poate fi utilizată pentru selecția antibioticelor sau asocierilor de antibiotice
40 eficiente față de bacterii incluse în biofilme (cu determinarea CMI, CMB pe celule aderate
41 și biofilme) sau pentru testarea eficienței față de bacteriile incluse în biofilme a unor
42 substanțe antimicrobiene de origine vegetală, pre- sau probiotice, substanțe chimice nou-sin-
43 tetizate, inhibitori ai adezinelor etc.;

44 - metoda poate fi utilizată pentru studiul influenței factorilor de mediu asupra capa-
45 cității de aderență și de formare a biofilmelor pe dispozitive protetice, utilizate în medicină
(pH, presiune osmotică, temperatură, presiunea parțială a oxigenului etc.).

RO 123145 B1

Metoda conform invenției realizează o determinare corectă a sensibilității la substanțe antimicrobiene a microorganismelor aderate pe diverse suporturi inerte, deoarece metodele standardizate conform normelor CLSI nu permit o evaluare corectă a sensibilității bacteriilor aderate la substrat (Lazar și colab., 2002).

De asemenea, determină corect sensibilitatea la antibiotice a biofilmelor formate de o anumită tulpină microbiană pe eșantioane de substrat inert, sterilizate în prealabil. Metoda conform invenției este adecvată pentru determinarea cantitativă a sensibilității biofilmelor la un anumit antibiotic, deoarece folosește o gamă de concentrații binare ale aceluiași antibiotic, care să cuprindă atât valorile subinhibitorii (Csl) (care nu inhibă creșterea microbiană, dar pot influența sinteza adevizinelor și capacitatea de aderență), concentrația minimă inhibitoare (CMI) care să inhibe creșterea și multiplicarea microorganismelor și concentrația minimă bactericidă (CMB) care să distrugă microorganismele, cât și concentrații superioare CMB, având în vedere rezistența crescută a biofilmelor la concentrațiile de substanțe antimicrobiene active pe microorganisme planctonice.

Se prezintă, în continuare, semnificația fig. 1...6, după cum urmează:

- fig. 1 reprezintă schema modelului experimental de testare a influenței substanțelor antibiotice în diferite concentrații asupra bacteriilor aderate la un substrat inert;

- fig. 2 prezintă reprezentarea grafică a valorilor absorbantei măsurate la 600 nm a culturilor bacteriene, dezvoltate, în funcție de prezența soluțiilor de antibiotic (cloramfenicol) cu diferite concentrații, adăugate în sistem după o perioadă de preincubare a eșantioanelor de cateter cu inoculul bacterian;

- fig. 3 prezintă reprezentarea grafică a valorilor absorbantei măsurate la 600 nm a culturilor bacteriene, dezvoltate, în funcție de prezența soluțiilor de antibiotic (cloramfenicol) cu diferite concentrații, adăugate în sistem după o perioadă de preincubare a eșantioanelor de cateter cu inoculul bacterian;

- fig. 4 reprezintă valoarea absorbantei măsurate la 600 nm a culturilor de *Pseudomonas aeruginosa*, cultivate în prezența gentamicinei (CMI) în suspensie și în prezența fragmentelor de cateter;

fig. 5 reprezintă valoarea absorbantei măsurate la 600 nm a culturilor de *Pseudomonas aeruginosa*, cultivate în prezența gentamicinei (CMB) în suspensie și în prezența fragmentelor de cateter;

fig. 6 reprezintă valoarea absorbantei măsurate la 600 nm a culturilor de *Pseudomonas aeruginosa*, cultivate în prezența gentamicinei (4xCMB) în suspensie și în prezența fragmentelor de cateter.

Se dau, în continuare, două exemple de realizare a metodei conform invenției, în legătură și cu fig. 1...6.

Exemplul 1. *Determinarea sensibilității la antibiotice a unor tulpini de enterobacterii aderate la un substrat inert, reprezentat de secțiuni de cateter urinar.*

S-a realizat studiul comparativ al sensibilității la diferite concentrații de cloramfenicol a unor tulpini de enterobacterii, prin metoda clasică recomandată de CLSI, care utilizează celule în suspensie, și prin metoda propusă, care utilizează bacterii aderate sub formă de biofilme dezvoltate pe eșantioane de cateter urinar. Culturile bacteriene au fost introduse în cele două variante experimentale, conform schemei prezentate în fig. 1. În acest scop, 50 ml de suspensie bacteriană de densitate 0,5 MacFarland au fost repartizați peste 2,5 ml de bulion simplu, repartizat în plăci cu 6 godeuri, în care au fost de asemenea introduse, în mod steril, fragmente de cateter urinar de silicon (Pharma-Plast, Malaezia) de 0,5 cm lungime. Ulterior, au fost adăugate fie la începutul experimentului (varianta experimentală I), fie după

o perioadă de incubare la 37°C, timp de 3 h (varianta experimentală II), diferite concentrații de cloramfenicol corespunzătoare CSI, CMI și CMB, pentru a acționa asupra biofilmului format pe substratul inert, reprezentat de eșantionul de cateter. După 24 h de incubare la 37°C, s-a extras mediul de cultură, eșantioanele au fost spălate de 4 ori cu apă fiziologică sterilă, după care s-a adăugat aceeași cantitate de 2,5 ml de bulion steril, plăcile fiind în continuare incubate timp de 24 h la 37°C, după care s-a determinat densitatea culturilor obținute, prin măsurarea absorbantei la 600 nm.

S-a observat că, în cazul în care eșantioanele de cateter au fost preincubate timp de 3 h cu suspensie bacteriană, concentrațiile de cloramfenicol folosite au fost mai puțin eficiente, în comparație cu al doilea caz, atunci când soluțiile de antibiotic au fost adăugate de la început plăcilor cu eșantioane și cultură bacteriană. Rezultatele obținute (valorile absorbantei la 600 nm) sunt prezentate în fig. 2 și 3. Acest comportament poate fi explicat prin faptul că, în timpul celor trei ore de incubare, bacteriile au avut posibilitatea de a adera mai intens la catetere, formând biofilme pe suprafața acestora, care prezintă rezistență crescută la antibiotice.

Exemplul 2. Determinarea sensibilității la antibiotice a unor tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, cu diferite surse de izolare, aderate la secțiuni de cateter venos central.

S-a realizat studiul comparativ al sensibilității la diferite concentrații de gentamicină, pe un număr semnificativ de tulpini de *Pseudomonas aeruginosa*, cu diferite surse de izolare (mediul acvatic, urocultură, spută, piese de cateter, plăgi), prin metoda clasică recomandată de CLSI, care utilizează celule în suspensie, și prin metoda propusă, care utilizează bacterii aderate sub formă de biofilme dezvoltate pe eșantioane de cateter urinar. În acest scop, au fost repartizați câte 2,5 ml de bulion simplu în plăci cu 6 godeuri în care s-au realizat diluții de gentamicină, astfel încât, în același volum de mediu, concentrația finală de antibiotic să corespundă valorilor CMI, CMB și 4xCMB. Au fost folosite câte două godeuri pentru fiecare diluție de antibiotic, unul conținând numai mediul de cultură și o anumită concentrație de antibiotic, iar în cel de-al doilea, fiind introduse, în mod steril, fragmente de cateter urinar de silicon (Pharma-Plast, Malaezia) de 0,5 cm lungime. Ca martori, au fost utilizate godeuri care conțineau numai mediul de cultură și eșantionul de cateter și, respectiv, numai mediul de cultură. Mediul de cultură Muller Hinton este mediul de cultură recomandat de CLSI, pentru determinarea concentrației minime inhibitorii (C.M.I.), prin metoda diluțiilor seriale a substanței antimicrobiene, care conține: extract de carne 2,0 g/l, amidon solubil 1,5 g/l, hidrolizat de cazeină 17,5 g/l, pH 7,3±0,1. Ulterior, au fost adăugați 500 ml de suspensie bacteriană de densitate 0,5 MacFarland în toate godeurile. După 24 h de incubare la 37°C, s-a extras mediul de cultură, eșantioanele au fost spălate de 4 ori cu apă fiziologică sterilă, după care s-a adăugat aceeași cantitate de 2,5 ml de bulion steril, plăcile fiind în continuare incubate timp de 24 h la 37°C, după care s-a determinat densitatea culturilor, obținută prin măsurarea absorbantei la 600 nm.

Utilizarea metodei propuse spre brevetare, într-un studiu realizat, a confirmat faptul că bacteriile care cresc în biofilme sunt mai rezistente la gentamicină (atât la concentrații corespunzătoare CMI și CMB, cât și la concentrații înalte de 4xCMB) la tulpini care atunci când au fost testate prin metoda clasică, recomandată de CLSI, s-au dovedit sensibile la aceste concentrații de antibiotic (fig. 4...6).

RO 123145 B1

Revendicare

1

Metodă de determinare a sensibilității la substanțe antimicrobiene a biofilmelor bacteriene, dezvoltate pe un substrat inert, imersat în mediu lichid, **caracterizată prin aceea că** aceasta cuprinde următoarele etape: 3
5

a) punerea în contact a unei suspensii microbiene de densitate cunoscută cu un suport inert de dimensiuni cunoscute, sterilizat în prealabil și imersat într-un volum fix de mediu de cultură lichid, ales dintre bulion simplu, nutritiv și mediu Muller Hinton, repartizat în plăci cu 6 sau 24 godeuri; 7
9

b) adăugarea fie la începutul experimentului, fie după o perioadă de incubare la 37°C, timp de 3 h, a diferite concentrații de antibiotice sau alte substanțe antimicrobiene; 11

c) incubarea la 37°C a sistemului tulpină microbiană: suport inert: antibiotic, timp de 24 h, perioadă de timp necesară acțiunii antibioticului; 13

d) îndepărtarea mediului de cultură lichid și a microorganismelor dezvoltate în suspensie și spălarea suportului inert, pentru îndepărtarea bacteriilor neaderate; 15

e) adăugarea de mediu de cultură steril peste suportul inert colonizat cu microorganisme aderate și reincubarea la 37°C, timp de 24 h; 17

f) măsurarea densității optice a mediului de cultură la 600 nm, în vederea aprecierii gradului de viabilitate a celulelor bacteriene, incluse în biofilm, în funcție de densitatea mediului de cultură; 19

g) compararea valorilor densității optice, măsurată la 600 nm, a culturilor obținute în mediu cu diferite concentrații de substanțe antimicrobiene, comparativ cu culturile martor dezvoltate în mediu de cultură lichid, fără adaos de antibiotice, în scopul aprecierii eficienței antibiofilm a unei anumite concentrații de antibiotic. 21
23

Tulpini bacteriene:

		1	2	3	4	5	6
C.s.l.	A						
C.M.I.	B						
C.M.B.	C						
Martor	D						

Fig. 1

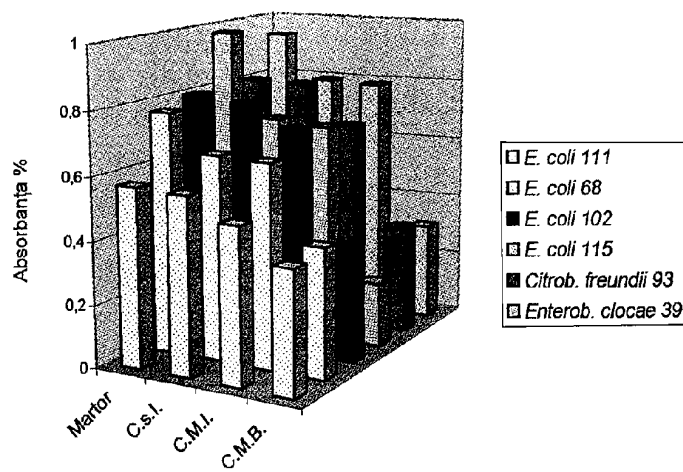


Fig. 2

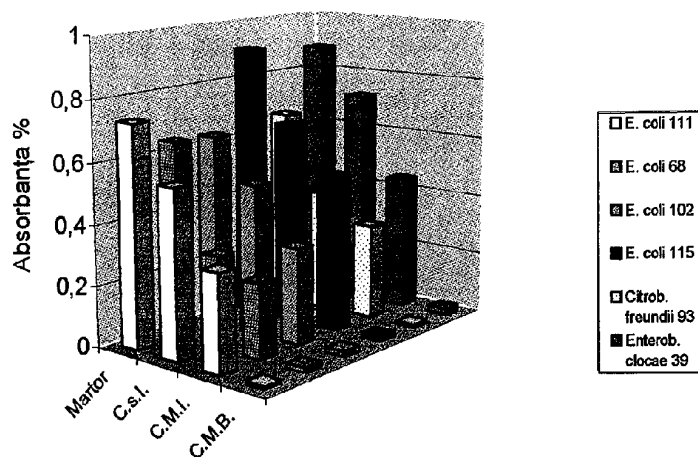


Fig. 3

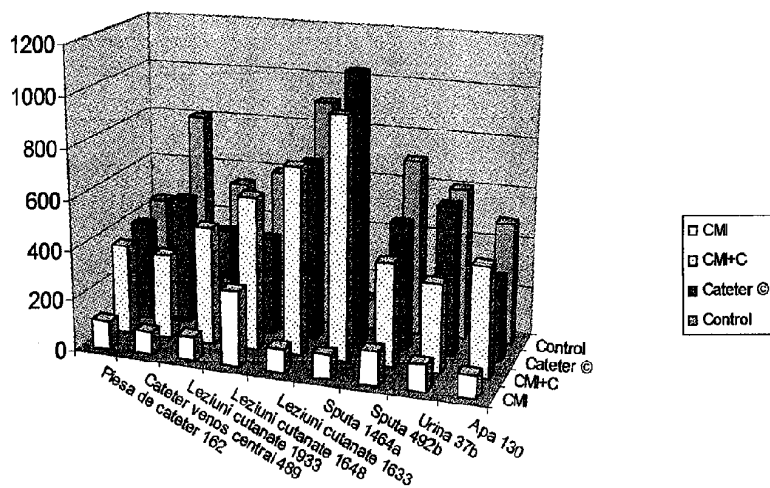


Fig. 4

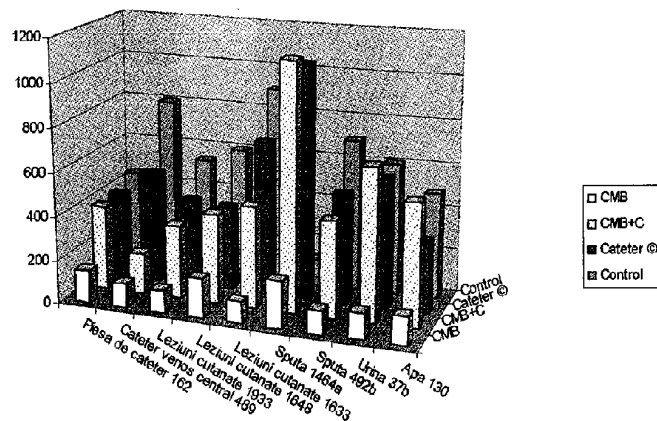


Fig. 5

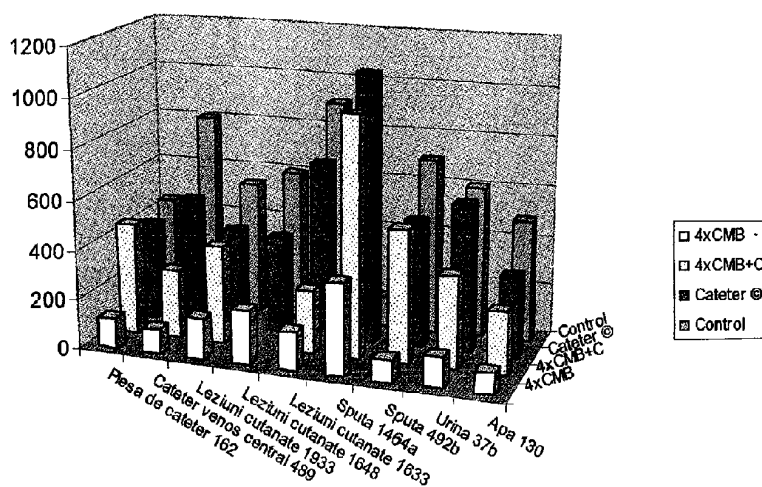


Fig. 6

