

## ADHEZIJA BAKTERIJ NA LESNE PREMASE

## ADHESION OF BACTERIA TO WOOD COATINGS

Klemen Bohinc<sup>1\*</sup>, David Kekec<sup>2</sup>, Marko Petrič<sup>2\*\*</sup>

UDK 630\*829.1:577:539.61

Original scientific article / Izvirni znanstveni članek

Received / Prispelo: 6. 11. 2019

Accepted / Sprejeto: 28. 11. 2019

## Izvleček / Abstract

**Izvleček:** Bakterijska adhezija na površinah in pozneje nastanek biofilma predstavljata glavni vzrok kroničnih okužb z negativnim vplivom na zdravje ljudi. S tem izzivom se srečujemo tudi pri izbiri in izdelavi pohištva, kjer stremimo k razvoju izdelkov s takšnimi površinami, na katere naj se bakterije ali drugi mikroorganizmi praviloma ne bi oprijemali. Predmet naše raziskave je bil testirati izbrana premazna sredstva za les (laneno olje, vodna lazura, nitrocelulozni lak, nanopremaz) na adhezijo bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa*, kjer smo kot testno površino uporabili vezano bukovo ploščo. Topografijo testne površine in število oprijetih bakterij *P. aeruginosa* smo opazovali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) in na posnetkih SEM identificirali in prešteli bakterije. Rezultati nakazujejo, da se je največje število bakterij oprijelo na površini, premazani z lanenim oljem. Za potrditev in pridobitev relevantnih rezultatov bodo v prihodnosti potrebne obširnejše in bolj poglobljene študije.

**Ključne besede:** les, nanopremaz, laneno olje, nitrocelulozni lak, adhezija bakterij, *Pseudomonas aeruginosa*

**Abstract:** Bacterial adhesion to surfaces and subsequent biofilm formation are the main causes of chronic infections with a negative impact on human health, and this is a problem in the process of manufacturing furniture. This is an important issue, relevant also to the selection and production of furniture, where there is a focus on the development of products with antibacterial surfaces to which microorganisms do not adhere. The focus of our research was to test selected wood coatings (linseed oil, water-borne stain, nitrocellulose varnish, nano-coating) with regard to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*, where we used a beech plywood as the test surface. The topography of the test surfaces and the number of adhered bacteria were observed on SEM micrographs. The results indicate that the maximum number of bacteria adhered to the surface coated with linseed oil. In the future, extensive and in-depth studies will be needed to confirm and obtain the required results.

**Keywords:** wood, nano-coating, linseed oil, acrylic stain, nitrocellulose lacquer, bacterial adhesion, *Pseudomonas aeruginosa*

## 1 UVOD

## 1 INTRODUCTION

Starajoča se populacija skupaj s pričakovanji po boljšem življenjskem standardu povečuje potrebe po izdelkih, ki bodo izboljšali kvaliteto življenja, zdravje in higienske razmere. Da bi starejšim ter osebam s posebnimi potrebami omogočili aktivno in kolikor je le mogoče samostojno življenje, narašča potreba po pohištvu z integriranimi bioaktivnimi funkcijami (De Jaeger, 2017). V to skupino sodi tudi pohištvo z antibakterijskimi površinami

(De Jaeger, 2017a). S tega vidika so gotovo zelo pomembne raziskave adhezije bakterij na različne površine, saj so bakterijske infekcije zelo pomemben izziv na področju javnega zdravja (Blackledge et al., 2013). Bakterijska adhezija na površine in pozneje nastanek biofilma sta glavna vzroka kroničnih okužb (Gu & Ren, 2014), ki negativno vplivajo na zdravje ljudi in povzročajo razne zdravstvene težave. Pogostokrat smo takšnim okužbam najbolj izpostavljeni v okoljih kot so bolnišnice, javne kuhinje, pisarne, šole in ne nazadnje stanovanjski prostori, kjer lahko bakterije kljub skrbi za čistočo tvorijo biofilme, bodisi na delovnih površinah, tleh, inventarju, pohištvu (Singh & Dawson, 2011; Bohinc et al., 2014; Alarfaj et al., 2016). Bakterijska adhezija je tako postala velik problem tako v različnih industrijskih panogah kot v zasebnih sta-

<sup>1</sup> Univerza v Ljubljani, Zdravstvena fakulteta, Zdravstvena 5, 1000 Ljubljana

\* e-pošta: klemen.bohinc@zf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za lesarstvo, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana

\*\* e-pošta: marko.petric@bf.uni-lj.si

novanjskih prostorih (Garrett et al., 2008; Myszka & Czaczyk, 2011; Bohinc et al., 2014).

Namen članka je zato v prvem delu osvetliti pomembnost poznavanja procesov adhezije bakterij na površine različnih materialov. V drugem delu članka pa podajamo rezultate preliminarne raziskave, s katero smo ugotavljali, ali lahko obstoječe uveljavljene metode za določanje bakterijske adhezije uporabimo tudi za les, površinsko obdelan z nekaterimi površinskimi premazi in ali je te metode potrebno prilagoditi tem specifičnim podlagam. Prav tako smo ugotavljali, kakšna je adhezija bakterij vrste *Pseudomonas aeruginosa* na površino vezane bukove plošče in plošče, ki smo jo površinsko obdelali z nekaterimi izbranimi premazi. Zaradi majhnega števila preskušancev rezultatov nismo statistično ovrednotili, tako smo najprej želeli ugotoviti, ali obstajajo indikacije za morebitno različno dovzetnost različnih premazov za oprijem bakterij.

## 1.1 ADHEZIJA BAKTERIJ NA POVRŠINE RAZLIČNIH MATERIALOV

### 1.1 ADHESION OF BACTERIA ON SURFACES OF VARIOUS MATERIALS

Do kolonizacije bakterij in nastanka biofilmov na različnih površinah pride tako, da se bakterijske celice pritrdijo na površino, ki jim zagotavlja optimalne pogoje za razmnoževanje. Proces bakterijske adhezije je odvisen od fizikalnih in kemijskih interakcij med bakterijami in površino, na katero se bodo oprijele. Če bodo za določeno vrsto mikroorganizmov pogoji optimalni, bodo kolonizirali površino in tvorili biofilme. Kljub vsemu lahko adhezijo bakterij na različne površine z nadzorom in primerno izbiri površine tudi preprečimo (Bohinc et al., 2014).

Na adhezijo vplivajo najrazličnejše lastnosti površin kot so npr. površinski naboj, prosta površinska energija, hrapavost in topografija ali celo togost (Song et al., 2015). Avtorji ugotavljajo, da se v splošnem adhezija bakterij zmanjša, če so površine hidrofobne, hrapavost površine nanometrsko ter prosta površinska energija čim manjša. V literaturi najdemo študije o oprijemu bakterij na najrazličnejše materiale, kot so npr. steklo (Bohinc et al., 2014; Oder et al., 2015), nerjavno jeklo (Fink et al., 2015; Bohinc et al., 2016), silicijev dioksid s plastmi polielektrolita (Kovačević et al., 2016), površine biomaterialov (Reid, 1997), ali npr. polietilen tereftalat (Gil-

lett et al., 2015). Številne študije so preučevale vpliv hrapavosti specifičnih površin na adhezijo bakterij. Bohinc et al. (2016) so raziskovali vpliv različnih hrapavosti ploščic nerjavnega jekla. Površino ploščic so spremenili s tridimenzionalnim poliranjem, krtačenjem, brušenjem in elektro poliranjem. Ploščice so prelili z bakterijsko kulturo in jih inkubirali pri 37 °C za 24 ur. Ugotovili so, da večja hrapavost površine signifikantno vpliva na adhezijo bakterij. Podobne rezultate beležijo pri raziskavi, izvedeni na steklenih površinah. Z večanjem hrapavosti steklene površine se adhezija bakterij povečuje (Bohinc et al., 2014). Na primeru nerjavnega jekla so Fink et al. (2015) proučevali vpliv toka tekočine in temperature za odstranitev bakterij z jeklenih nerjavčnih površin dveh različnih hrapavosti. Ugotovili so, da s turbulentnim tokom odstranijo značilno več bakterij kot z laminarnim tokom. Sredstvo, ki so ga uporabljali za izpiranje, je bil fosfatni pufer. Velik vpliv na odstranitev bakterij je imela tudi temperatura, kjer se je za najbolj učinkovito izkazala višja temperatura (37 °C). Prav tako so bila objavljena poročila o mikrobnih adheziji na različne premaze, polimerne filme, ipd. Kar nekaj let se nanaša na aplikacije v dentalni medicini (Pereira et al., 2011; Chau et al., 2014), veliko člankov pa je s področja premazov proti obraščanju morskih organizmov oz. antivegetativnih premazov (Dobretsov & Thomason, 2011; Xu et al., 2016). Po našem znanju je v literaturi manj poročil o adheziji bakterij na polimerne filme, ki so po svojih lastnostih podobni tistim, ki jih uporabljamo v obliki premazov za les. Tako so Bakker et al. (2003) raziskovali depozicijo treh morskih sevov bakterij z različno vodoodbojnostjo celičnih sten iz umetne morske vode na poliuretanske premaze različne površinske napetosti in modula elastičnosti. Z adhezijo bakterij na funkcionalizirane poliuretane so se ukvarjali Flemming et al. (1999). Med pomembnimi dejavniki za adhezijo se je pokazala tudi prisotnost adhezivnih proteinov. V drugi študiji (Teixeira et al., 2006) so raziskovali adhezijo bakterij na urea-uretanske kopolimerne filme z elastomernimi lastnostmi in pokazali, da običajen pojav povečanja stopnje adhezije bakterij z naraščajočo hrapavostjo ne velja v vseh primerih. Izkazalo se je, da pri tem materialu za adhezijo pomembno vlogo igrata tako topografija površine, kakor tudi ločitev vodoodbojne in hidrofilne faze elastomera. Podobne raziskave so bile izvedene tudi na filmih poli(metil metakrilat)-a

(Iguerb & Bertrand, 2008) in ostalih poli(metakrilat)-ov (Ibanescu et al., 2016).

Precej pozornosti je pritegnila adhezija mikrobov na les. Soumya et al. (2012) so raziskovali medfazno prosto površinsko energijo med mikrobnimi celicami in površinami lesa šestih različnih vrst (cedrovina, hrastovina, bukovina, jesenovina, borovina in tikovina) z namenom napovedi, kateri bakterijski sevi imajo večjo zmožnost oprijema na površine lesa. Ugotovili so, da o adheziji mikrobov na les ni mogoče podati splošnih sklepov in da je oprijem bakterij zelo specifičen, tako glede na vrsto bakterije kot tudi vrsto lesa. Ista skupina avtorjev (Soumya et al., 2012a) se je tudi sicer ukvarjala z adhezijo bakterij na cedrovino. Kandelbauer & Widsen (2009) sta obravnavala različne metode, ki so ali bi lahko bile na voljo za izboljšanje higienskih lastnosti lesnih materialov, ki so prekriti z melaminskimi prevlekami. Vendar se avtorja nista ukvarjala z mehanizmi adhezije, temveč predvsem z vprašanjem, kako povečati antibakterijske lastnosti takih površin.

Očitno je, da je oprijem bakterij na lesne premaze specifična tema, ki bi v prihodnosti morala biti obravnavana bolj temeljito.

## 1.2 ADHEZIJA BAKTERIJ IN TVORBA BIOFILMA

### 1.2 ADHESION OF BACTERIA AND FORMATION OF BIOFILM

Proces adhezije je osnovan na kemijskih in fizikalnih interakcijah med mikroorganizmi in kontaktno površino. Gre za tako imenovani prvi korak vezave mikroorganizmov na površino (Bohinc et al., 2014) ter kolonizacije in nastajanja biofilmov (Hori & Matsumoto, 2010). Med mikroorganizmi predstavljajo bakterije glavne gradnike biofilmov (Hori & Matsumoto, 2010). Proces oprijemanja bakterijskih celic na površino določajo različni dejavniki kot so: lastnosti površine in mikrotopografija, sestava površine, hrapavost, površinska napetost, hidrofobnost, bakterijski površinski naboj, velikost in lastnosti celice (giblivosť bakterij), masni transport, temperatura, pH, vlažnost ... (Palmer et al., 2007). Bistvenega pomena je fizikalno-kemijska lastnost bakterijske celice oz. lastnost njene celične stene. Pri tem je zelo pomemben polimer peptidoglikan, ki določa lastnosti celične stene. Glede na koncentracijo oz. prisotnost peptidoglikana v bakterijskih celičnih stenah razlikujemo po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije. Zelo visoke koncentracije le-te

ga vsebuje celična stena po Gramu pozitivnih bakterij, v nasprotju s celičnimi stenami po Gramu negativnih bakterij. Značilnost celične stene po Gramu negativnih bakterij je kompleksnejša ovojnica, kjer je citoplazma omejena s tanko plastjo iz peptidoglikana, ki jo ločuje od zunanje celične membrane. Kakorkoli pa prisotnost peptidoglikana in ostalih makromolekul (teihoična kislina, lipoteihoična kislina, lipoproteini in lipopolisaharidi, encimi ter mikolna kislina), predstavljajo pomembne gradnike celičnih sten bakterij, saj so v večini polielektroliti, ki določajo površinski naboj celične stene. Na primer, če je površinski naboj celične stene negativen, naboj površine pa pozitiven, le-to neugodno vpliva na adhezijo, kar pogojuje elektrostatična odbojna sila, ki drži bakterijske celice na kratki razdalji v stran od površine. Elektrostatični odboj med celico in površino lahko bakterije premagajo s pomočjo molekularnih interakcij adhezinov (fimbriji, flagele ali lipopolisaharidi - LPS), ki so lokalizirani na celični steni (Hori & Matsumoto, 2010; Bohinc et al., 2014).

Temeljna faza bakterijske adhezije je v splošnem opisana z dvostopenjskim modelom kinetične vezave. Prva oz. začetna faza je opisana kot hitra in enostavna reverzibilna interakcija med površino bakterijske celice ter kontaktno površino. Na adhezijo bakterij imajo vpliv v glavnem Van der Waalsove sile, elektrostatske sile, hidrofobni učinki in kontaktne interakcije. V glavnem interakcijo proste energije pri procesu adhezije opredeljujeta dva minimuma. V fazi prvega minimuma so bakterije šibko in reverzibilno vezane na površino, kar predstavlja kemijske interakcije med bakterijami in površino na razdalji približno 10 nm. V drugi fazi potekajo interakcije med tako imenovanimi adhezijskimi beljakovinami na površini bakterijskih adhezinov (pili ali fimbriji) in vezavnimi molekulami na površini kontaktnega materiala na razdalji pod 1 nm. V tej fazi so bakterije močno in ireverzibilno adherirane (Bohinc et al., 2014).

Tvorba in nastajanje biofilma se začne, ko se bakterije oprimejo določene površine (Palmer et al., 2007; Tolker-Nielsen, 2014), kjer so prisotna hranila (Bohinc et al., 2014). Biofilme sestavljajo celice in zunajcelične polimerne snovi, ki so produkti bakterij (Garrett et al., 2008; Tolker-Nielsen, 2014). V naravi okoli 99 % mikroorganizmov tvori biofilm (Garrett et al., 2008) oz. tako imenovane mikrobne skupnosti, ki so združene v svojih zunajceličnih pro-

duktih (Tolker-Nielsen, 2014). Ena izmed ključnih lastnosti biofilmov je ta, da lahko bakterije v neugodnih razmerah preživijo (Garrett et al., 2008), ter da jih le-ti ščitijo pred protimikrobnimi vplivi (Garrett et al., 2008; Tolker-Nielsen, 2014). Večjo odpornost bakterij v biofilmih povezujejo s počasnejšo rastjo bakterij v globljih slojih biofilma in z matriksom biofilma, ki ga obdaja, ter tako s tem omejuje penetracijo škodljivih delcev v notranjost (Jefferson, 2004). Myszka & Czaczyk (2011) opredeljujeta formiranje biofilma kot petstopenjski proces. Prvo stopnjo procesa predstavlja vezava planktonskih mikroorganizmov na trdne površine, prvi stopnji sledi druga s pritrditvijo bakterij s proizvodnjem zunajceličnih polimerov. Pri tretji stopnji gre za zgodnji razvoj biofilma, medtem ko se pri četrti stopnji mikrobne skupnosti razvijejo v zrel biofilm. Zadnja, peta stopnja tega procesa pa je disperzija celic iz biofilma v okolico.

### 1.3 VPLIVI NA ADHEZIJO BAKTERIJ

#### 1.3 INFLUENCES ON ADHESION OF BACTERIA

Za dobro razumevanje adhezije bakterij na materialne površine je potrebno poznati značilnosti površine. Med parametri omenimo najprej hrapavost površin, ki jo lahko izmerimo z mikroskopom na atomsko silo ali s profilometrom. Napravi delujeta na principu kontaktnega gibanja tipala po merjeni površini in shranjevanju premikov v pomnilnik podatkov. Iz izmerjenih premikov lahko izračunamo aritmetično srednjo hrapavost  $R_a$  ali hrapavost  $R_q$ . V večini primerov se na bolj hrapave površine adherira več bakterij kot na bolj gladke površine. Z naraščajočo hrapavostjo se namreč večja tudi razpoložljiva površina za bakterijsko adhezijo (Bohinc et al., 2014, Bohinc et al., 2016). Neregularnosti in defekti na površini dodatno povečajo stopnjo adhezije, saj se na ta način verjetnost za oprijem površine še poveča.

Drugi parameter je hidrofobnost. Le-to določimo z merjenjem mejnega kota. Na površino kane kapljico kapljevine in z goniometrom izmerimo kot med površino kapljevine in površino materialne površine. Bakterije s hidrofobnimi lastnostmi preferirajo interakcijo s hidrofobnimi površinami. Hidrofilne bakterije imajo preferenco, da se oprijejo hidrofilne površine. Poleg tega se hidrofobne bakterije bolje in močnejše oprimejo površine kot hidrofilne (Van Loosdrecht et al., 1987); stopnja

bakterijske adhezije je povezana z naraščanjem hidrofobnosti bakterijske površine.

Tretji parameter je naboj kontaktne površine in površine bakterij. Eksperimentalno določimo naboj iz pretočnega potenciala. Ob naelektreni površini v stiku z elektrolitsko raztopino nastane difuzna električna dvojna plast. vzdolž nabite materialne površine povzročimo tlačno razliko in vzpostavimo volumski tok mobilnega dela električne dvojne plasti. V raztopini nabitih ionov volumski tok povzroči prevladujoče kopičenje protiionov v smeri volumskega toka tekočine. Apliciramo električno polje, ki povzroči električni tok v smeri, nasprotni smeri volumskega toka tekočine. V ravnovesnem stanju sta oba tokova enaka; jakost električnega polja doseže ravnovesno vrednost. Iz jakosti določimo pretočni potencial. Iz potenciala lahko približno izračunamo površinsko gostoto naboja. V veliki večini primerov so bakterije negativno naelektrene. Naboj kontaktnih površin pa je močno odvisen od pH raztopine, ki je v kontaktu s samo površino. Zaradi elektrostatske sile pozitivno nabite materialne kontaktne površine delujejo s privlačno silo na negativno naelektrene bakterijske površine. Nasprotno negativne površine prispevajo odbojno komponento sile na negativno nabite bakterije (Kovačević et al., 2016).

## 2 MATERIAL AND METHODS

### 2 MATERIAL IN METODE

#### 2.1 MATERIALI

##### 2.1 MATERIALS

Kot podlago smo uporabili vezano bukovo ploščo debeline 4 mm. Uporabili smo pet ploščic dimenzij 100 mm × 100 mm. Adhezijo bakterij smo ugotavljali na nepremazanih površinah ter na površinah, obdelanih z naslednjimi premazi: laneno olje (proizvajalec Chemcolor d.o.o., Sevnica, Slovenija), nitrocelulozni oz. celulozno nitratni lak za les (proizvajalca Ilva, Milano, Italija), vodno lazuro Silvanol tankoslojni akrilni premaz za les na vodni osnovi (Silvaprodukt d.o.o., Ljubljana, Slovenija) in bezbarvno impregnacijsko sredstvo za doseganje vodoodbojnosti lesa nanopremaz Silles (Chemcolor d.o.o., Sevnica, Slovenija) na osnovi organofunkcionalnih fluoriranih silanov.

Za teste adhezije bakterij smo izbrali standardni bakterijski sev bakterije *Pseudomonas aeruginosa* iz zbirke ATCC 27853 (češka zbirka mikroorga-

nizmov, Brno, Češka republika), ki je bil izoliran iz krvne kulture. Vrsta *P. aeruginosa* spada v družino Pseudomonadaceae in rod *Pseudomonas*. V naravi bakterije iz rodu *Pseudomonas* najdemo v zemlji, vodi, zraku in živilih, bogatih z beljakovinami (Kapun Dolinar, 2001). *P. aeruginosa* je po Gramu negativen bacil, ki je izjemno prilagodljiv. Zaradi številnih različnih metabolnih (presnovnih) poti lahko preživi in se prilagodi v več različnih okoljih (Yahr & Parsek, 2006). Najbolj tem bakterijam ugaja vlažno okolje kot so na primer pitna voda, umivalniki, razpoke v tleh, raztopine za infuzijo. So odporne proti velikemu številu dezinfekcijskih sredstev, kar predstavlja velik problem zaradi težke odstranitve z okuženih mest. Zato se pogosto prenaša v bolnišnicah (Kapun Dolinar, 2001). Spada med oportunistične patogene, kar pomeni, da okuži organizem, kadar je njegov imunski sistem oslavljen. So koliformni nesporulirajoči bacili, ukrivljeno paličaste oblike, velikosti od 0,5  $\mu\text{m}$  – 1,0  $\mu\text{m}$  do 1,5  $\mu\text{m}$  – 4,0  $\mu\text{m}$ . Gibljejo se s pomočjo enega ali več polarnih bičkov (Madigan et al., 2006). Uporabili smo trdno hranilno gojišče proizvajalca Biolife, Italija, katerega izdelek je tudi uporabljeno tekoče gojišče oz. hranilni bujon brez glukoze.

## 2.2 ZASNOVA EKSPERIMENTALNEGA DELA

### 2.2 DESIGN OF THE EXPERIMENTAL WORK

Prvotno smo nameravali preveriti oprijem bakterij na nepremazane površine lesa in na površine, premazane s šestimi različnimi premazi. Le-te bi nanесли na kovinske ploščice in jih tako premazane izpostavili bakterijam. Kovinske podlage so v praksi primernejše za slikanje površine z elektronskim mikroskopom. Zaradi lažje primerjave pa bi površino še dodatno obarvali z barvilom kristal vijolični (barvanje po Gramu). Na ta način bi se bakterije značilno obarvale in na tako obdelani ter obarvani površini z bakterijami bi kasneje lahko natančno izmerili velikost površine, prekrivane z bakterijami. Vendar pa se je tak način izkazal za neprimerne. Nekateri od izbranih premaznih sistemov za les na kovinskih površinah (ploščicah) niso tvorili filma, premazana površina pa se je nagubala. Nagubanost površine bi naše delo zelo otežila, saj ne bi dobili primerljivih rezultatov s tistimi površinami, ki se niso nagubale. Zato smo se odločili samo za leseno podlago. Površin nismo obarvali zaradi prepustnosti premaznih sistemov in s tem zvezanega potencialnega obarvanja podlage.

## 2.3 PRIPRAVA VZORČNE POVRŠINE

### 2.3 SAMPLE SURFACE PREPARATION

Na štiri vzorčne ploščice smo nanесли po enega izmed štirih uporabljenih premaznih sredstev. Za kontrolo smo eno ploščico pustili brez premaznega sredstva. Vsak premazni sistem smo na posamezno vzorčno ploščico nanесли dvakrat. Po prvem nanosu smo premazano površino pustili stati 24 ur. Po 24 urah smo vzorce rahlo pobrusili (P240) ter ponovno nanесли isto premazno sredstvo na enako ploščico. Premazane površine vzorčnih ploščic smo po treh tednih od nanosa premaznega sredstva razrezali na manjše dimenzije (10 mm  $\times$  10 mm). Te smo na straneh, ki so bile brez premaznega sredstva, zaščitili z epoksidnim premazom. Pripravljene vzorčne ploščice smo nato pritrdili v petrijevke. Sledila je sterilizacija. Petrijevke z vzorci smo postavili v laminarij, kjer smo jih obsevali z UV svetlobo. Vzorce so bili UV svetlobi izpostavljeni z obeh strani. Najprej smo za eno uro izpostavili premazano površino vzorčne ploščice, po eni uri obsevanja smo vzorce obrnili ter še eno uro obsevali drugo, nepremazano stran vzorca.

## 2.4 PRIPRAVA BAKTERIJSKE KULTURE IN IZPOSTAVITEV BAKTERIJAM

### 2.4 PREPARATION OF THE BACTERIAL CULTURE AND EXPOSURE TO BACTERIA

Priprava prekonočne bakterijske kulture in izpostavitve vzorcev bakterijam sta potekali v mikrobiološkem laboratoriju na Zdravstveni fakulteti v Ljubljani. Metodologija dela ter priprava sta bili povzeti po protokolu Kubota et al. (2008) in Bohinc et al. (2014), z nekaterimi modifikacijami. Sev bakterije smo prenesli na hranilno gojišče in ga inkubirali pri 37 °C za 24 ur. Po postopku inkubacije smo kolonijo testnega seva bakterije prenesli s trdnega hranilnega gojišča v hranilni bujon brez glukoze in ga dalje inkubirali za 24 ur pri 37 °C. Nato smo pripravili po pet paralelnih petrijevk za vsako skupino premaznih sredstev in eno za nepremazano površino. V vsako petrijevko smo namestili po tri vzorčne ploščice iz posamezne obravnavane skupine. Po eno petrijevko v paralelki posamezne skupine smo nalili s tekočim gojiščem z bakterijami, drugo petrijevko v paralelki pa smo nalili s tekočim gojiščem brez bakterij.

Vzorčne ploščice so bile izpostavljene bakterijam različno dolgo in sicer: spiranje takoj, ob času (t<sub>0</sub>), inkubiranje pri 37 °C 10 ur pri aerobnih pogojih (t<sub>10</sub>) in inkubiranje pri 37 °C 18 ur pri aerobnih

pogojih (t18). Po izpostavitvi vzorčnih ploščic bakterijam smo odvzete ploščice po (t0), (t10) in (t18) spirali s trikrat po 20 ml destilirane vode. Namen spiranja je bil odstranitev gojišča in neoprijetih bakterij ter preprečitev nadaljnega oprijema bakterijskih celic na testne površine. Po spiranju smo vzorce najprej osušili s sušilnikom za lase, da za nadaljnje preskuse ni bilo prisotne vlage. Ker pa ima les higroskopne lastnosti, so vzorčne ploščice med izpostavitvijo in spiranjem absorbirale dodatno vlago. Posledično se je pri lesenih ploščicah pojavil problem odvečne vlage v vzorcih in smo vzorce zato dodatno osušili v vakuumskem sušilniku.

## 2.5 ANALIZA ADHEZIJE BAKTERIJ NA POVRŠINI VZORCEV Z VRSTIČNIM ELEKTRONSKIM MIKROSKOPOM (SEM)

### 2.5 ANALYSIS OF THE BACTERIAL ADHESION ON SURFACES OF THE SPECIMENS WITH A SCANNING ELECTRON MICROSCOPE

Oprijem bakterij na testiranih premaznih sredstvih na leseni podlagi smo opazovali in pregledali z vrstičnim elektronskim mikroskopom (SEM) FEI Quanta 250 v laboratoriju Oddelka za lesarstvo na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Pred začetkom opazovanja smo na vzorce s standardno opremo (Quorum technologies Q150R) nanесли tanek sloj zlata. Snemanje je bilo izvedeno pri nizkem vakuumu ( $6 \times 10^{-4}$  Pa), s pospeševalno napetostjo 5 kV. Razdalja med opazovano površino vzorca in elektronsko puško je bila približno 10 mm. Cilj opazovanja

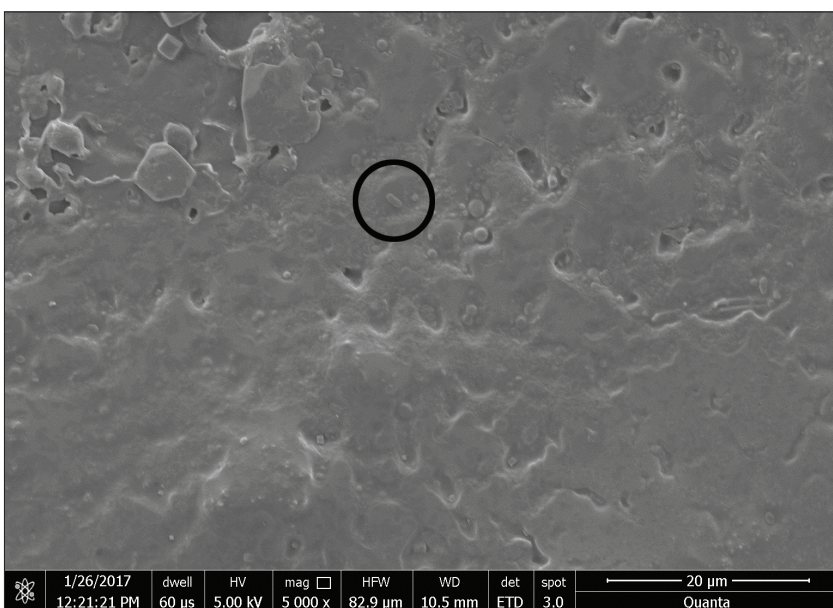
vzorcev s SEM je bil iskanje oblik, ki bi ustrezale bakterijam. Oblike, ki so predstavljale bakterije na površinah vzorcev, izpostavljenih 18 h, so popolnoma prekriale površino. Na vzorcih, katerih površina je bila izpostavljena 10 h, smo bakterije opazili le na določenih mestih, večinoma pa le na enem mestu. Za štetje bakterij smo izvedli kvantitativno analizo, kjer smo na posnetkih SEM obkroževali adherirane bakterije. Za analizo smo uporabili po en SEM posnetek za vsak posamezni sistem.

Zaradi nekoliko slabše kakovosti posnetkov SEM statistične analize podatkov ni bilo možno izvesti. Tako vrednosti, podane v preglednici 1, niso kazalniki, ki bi nam lahko potrdili, katera površina je bolj prijazna bakterijam. Na primer: na določeni površini, veliki  $100 \mu\text{m}^2$ , je bilo 100 oblik, ki so predstavljale bakterije. Celotna površina vzorca je merila  $1.000.000 \mu\text{m}^2$ , kjer smo le na določenih delih zasledili nekaj oblik bakterij, zato ni bilo mogoče ugotoviti, ali se na to površino bakterije bolj ali manj adherirajo.

## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 3 RESULTS AND DISCUSSION

Kot že omenjeno smo površine vezane bukove plošče bakterijam izpostavljali v treh različnih časovnih intervalih, in sicer t0, t10 in t18 (v urah). Posnetki SEM so bili narejeni pri 5.000, 10.000, 15.000 in 20.000-kratnih povečavah. Na površinah, ki smo jih sprali takoj po izpostavitvi (t0), smo opazili le manjše število bakterij v planktonski obliki na do-



Slika 1. SEM posnetek lesene površine, premazane s premaznim sredstvom – vodna lazura, vzorec izpiran takoj po izpostavitvi *P. aeruginosa* (t0), 5.000-kratna povečava.

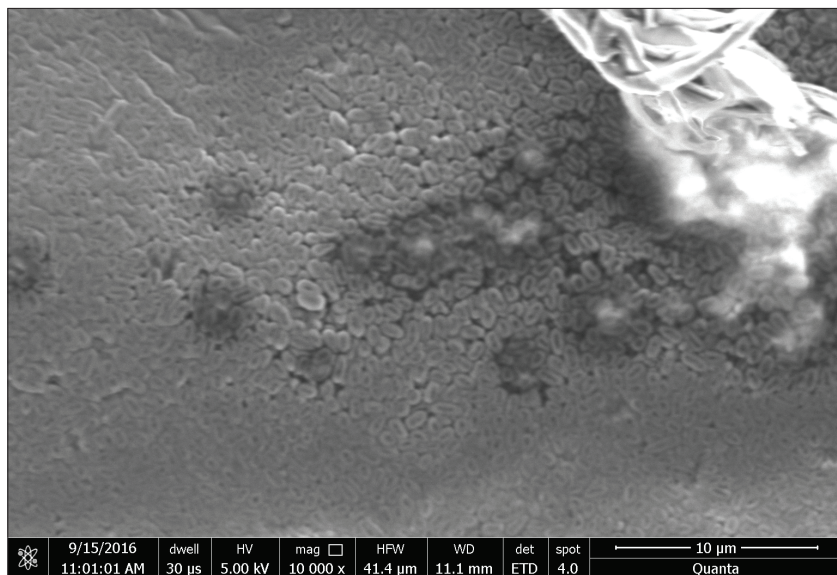
Figure 1. Scanning electron micrograph of a surface of laminated beech wood, finished with the waterborne stain, exposed to bacteria *P. aeruginosa*. (t0) and immediately washed; magnification: 5,000x.

ločenih segmentih premazane testne površine. Kot primer je na sliki 1 SEM posnetek lesene premazane površine z vodno lazuro pri 5.000-kratni povečavi. Predvidevamo, da je na premazani površini le ena bakterijska celica, ki smo jo označili s črnim krogom. To domnevo potrjuje tudi rastna krivulja, pri kateri v času  $t_0$  bakterije še ne tvorijo adhezije posameznih bakterij in se pojavljajo le posamezno (Bohinc et al., 2014).

Po drugi strani pa so bakterije vzorce po 18 urah izpostavitve v celoti prerastle (slika 2, vzorec, premazan z lanenim oljem). Zato v nadaljevanju predstavljamo le rezultate, dobljene s preiskavami posnetkov SEM vzorcev, ki so bili izpostavljeni bakterijam

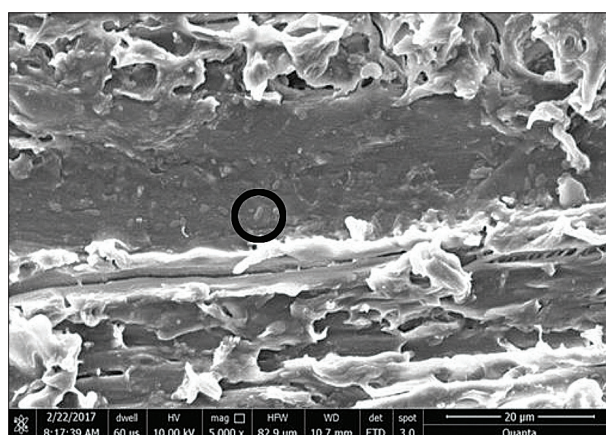
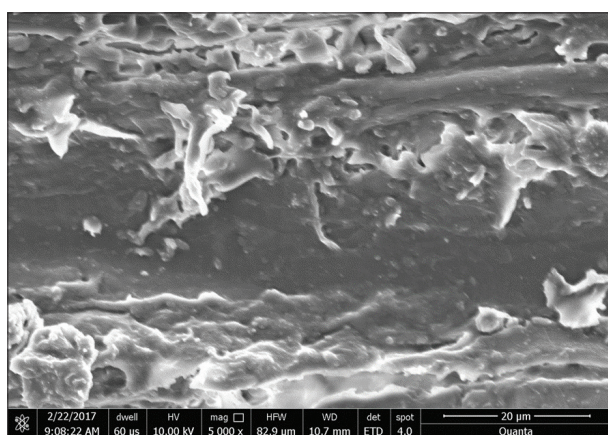
10 ur ( $t_{10}$ ), in tistih, pri katerih tekoče gojišče ni vsebovalo bakterije *P. aeruginosa*, prav tako pri  $t_{10}$ .

Vzorec, ki ga nismo premazali z nobenim od izbranih premaznih sredstev za les, je služil za kontrolo. Podobno kot pri premazanih površinah tudi na površini brez premaznega sredstva, ki ni bila izpostavljena gojišču z dodanimi bakterijami, ni bilo opaziti bakterij ali oblik, podobnih bakterijam *P. aeruginosa* (slika 3a). Na površinah nepremazane vzorca, izpostavljenega bakterijam ( $t_{10}$ ), pa smo opazili bakterije, ki smo jih obkrožili s črnim krožcem (slika 3b). Za primerjavo in natančno določitev smo posnetek povečali za 15.000-krat, kjer smo zaznali oblike, ki predstavljajo bakterije (slika 4).



Slika 2. SEM posnetek lesene površine, premazne z lanenim oljem, vzorec je bil izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* ( $t_{18}$ ), 10.000-kratna povečava.

Figure 2. SEM micrograph of wood surface, finished with linseed oil, exposed to *P. aureginosa* ( $t_{18}$ ), magnification: 10,000x



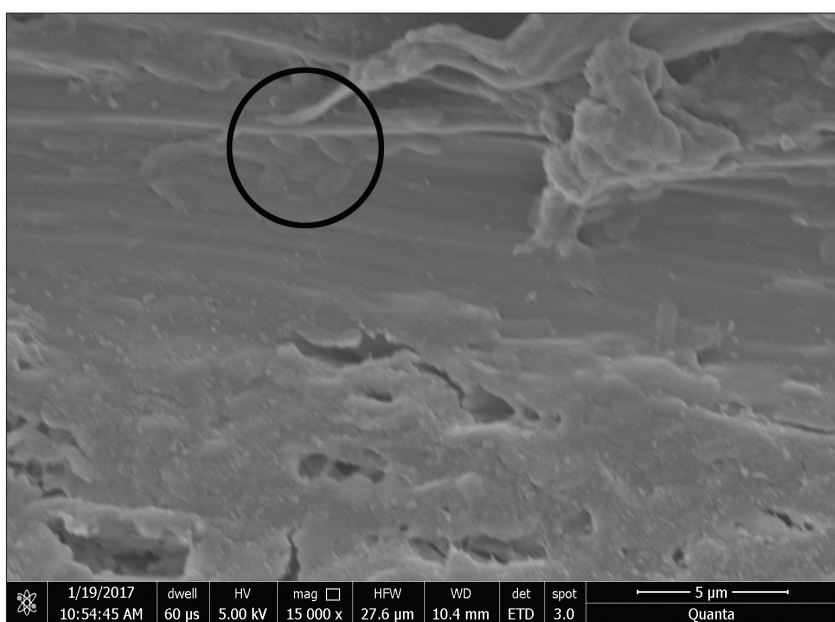
Slika 3. SEM posnetek površine brez premaznega sredstva, vzorec ni bil izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (a) in bakterijam izpostavljen vzorec (b), 5.000-kratna povečava.

Figure 3. SEM micrograph of the surface without a coating, not exposed to *P. aeruginosa* (a) and exposed to bacteria (b), magnification: 5,000x.

Na posnetku SEM (slika 5), kjer je bil vzorec, premazan z lanenim oljem, izpostavljen bakterijam (t10), lahko vidimo oblike, ki so značilne za bakterije *P. aeruginosa*. Lep primer bakterije je viden na sliki 6 pri 20.000-kratni povečavi.

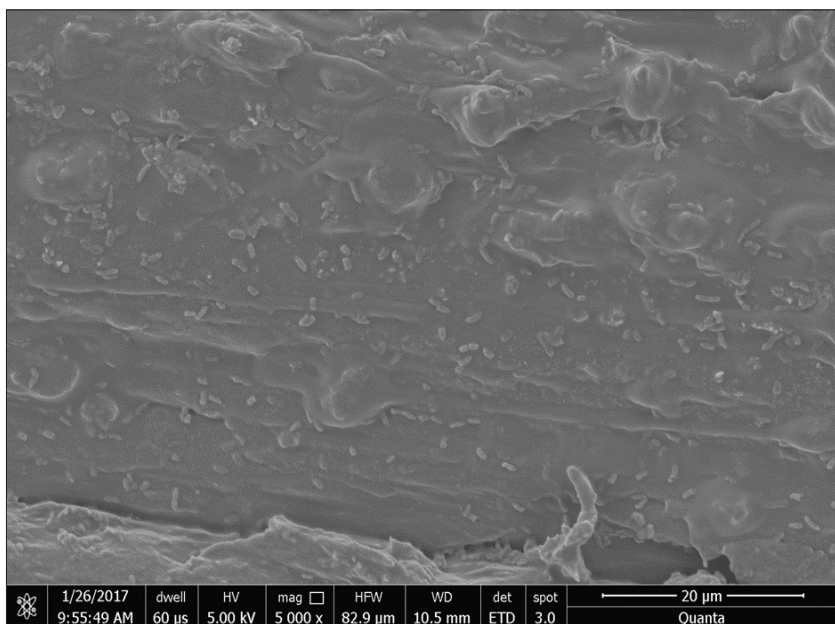
Na površini vzorca, premazanega z nitroceluloznim lakom, ki je bila 10 ur izpostavljena bakterijam, smo prav tako zasledili oblike, ki predstavljajo bakterije, razen tega pa še delce, ki jih nismo znali identificirati. Bakterije so označene s črnimi krožci, neidentificirani delci pa z rdečimi (slika 7). Na površini lesa, obdelanega z vodno lazuro, smo

tudi opazili oblike, ki niso značilne za bakterije (rdeči krožci (slika 8)), za katere predvidevamo, da so pigmentni delci. Na vzorcu, premazanem z vodno lazuro, ki je bil izpostavljen bakterijam, pa smo opazili tudi oblike, ki predstavljajo bakterije (slika 9). Nazadnje smo pregledali še površine, ki so bile premazane z nanopremazom. Primer površine vzorca, ki je bil v tekočem gojišču bakterijam izpostavljen 10 ur, je prikazan na sliki 10. Za natančno opredelitev smo isto površino posneli pri 20.000-kratni povečavi. Oblika, ki predstavlja bakterijo, ima velikost 1,6  $\mu\text{m}$  (slika 11).



Slika 4. SEM posnetek površine brez premaznega sredstva, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 15.000-kratna povečava.

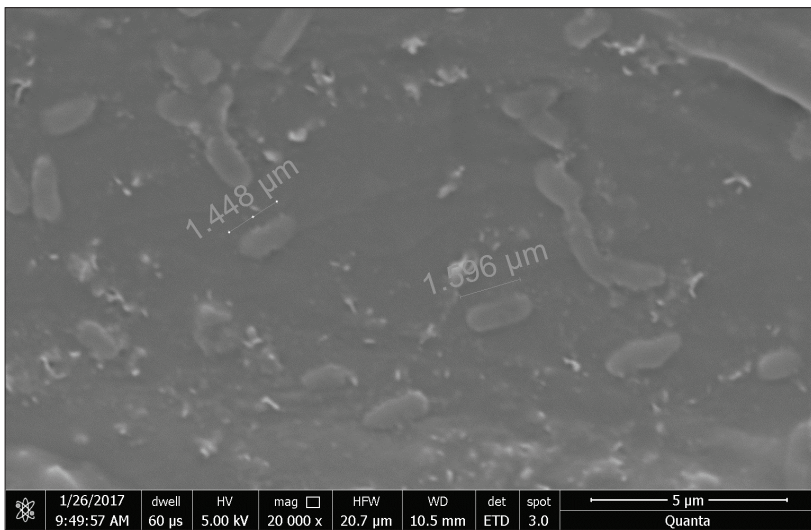
Figure 4. SEM micrograph of the surface without a coating, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 15,000x.



Slika 5. SEM posnetek površine, premazane z lanenim oljem, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 5.000-kratna povečava.

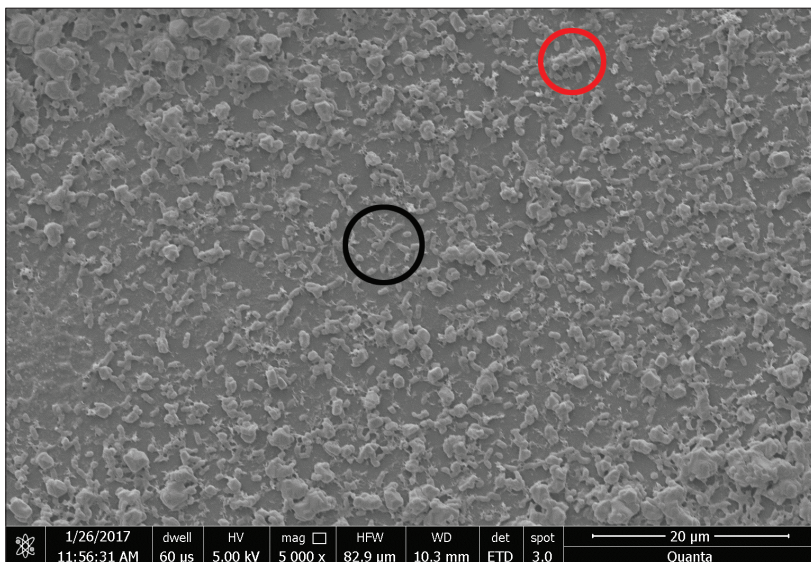
Figure 5. SEM micrograph of the surface with the linseed oil, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 5,000x.





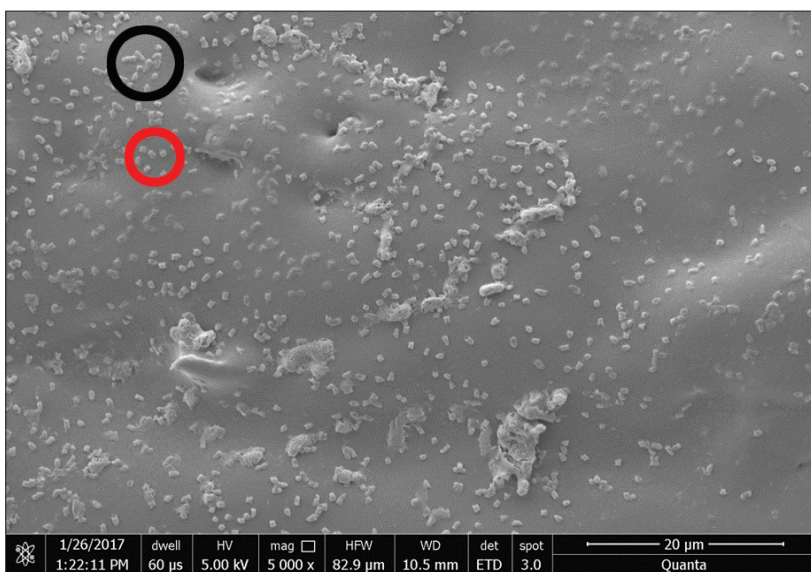
Slika 6. SEM posnetek površine, premazane z lanenim oljem, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 20.000-kratna povečava.

Figure 6. SEM micrograph of the surface with the linseed oil, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 20,000x.



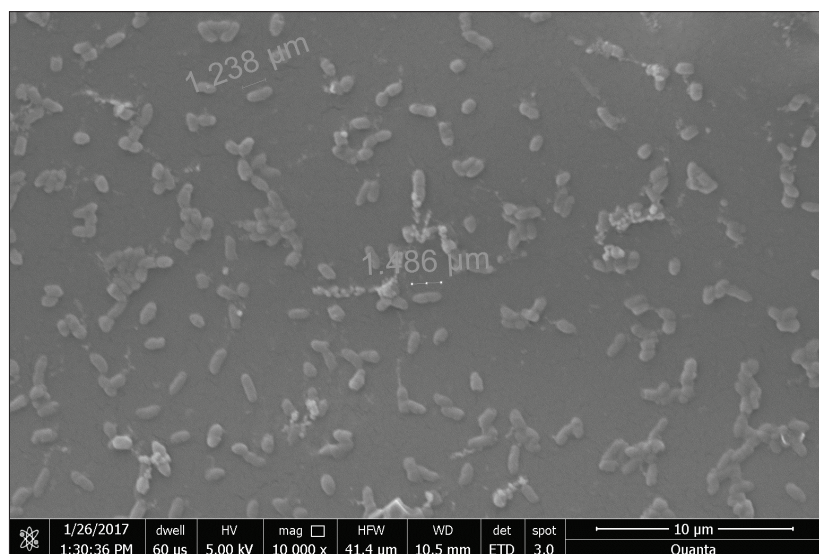
Slika 7. SEM posnetek površine vzorca z nitroceluloznim lakom, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 5.000-kratna povečava.

Figure 7. SEM micrograph of the surface with the cellulose nitrate lacquer, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 5,000x.



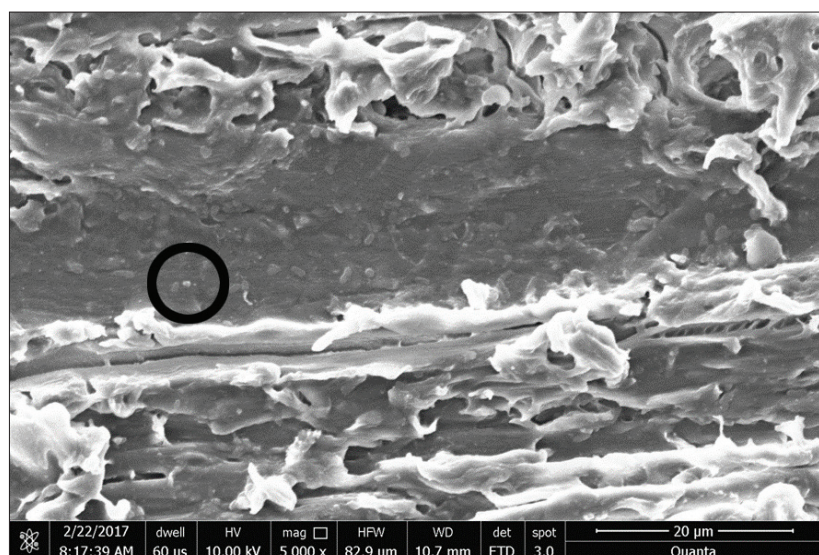
Slika 8. SEM posnetek površine vzorca, premazanega z vodno lazuro, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 5.000-kratna povečava.

Figure 8. SEM micrograph of the surface with the waterborne stain, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 5,000x.



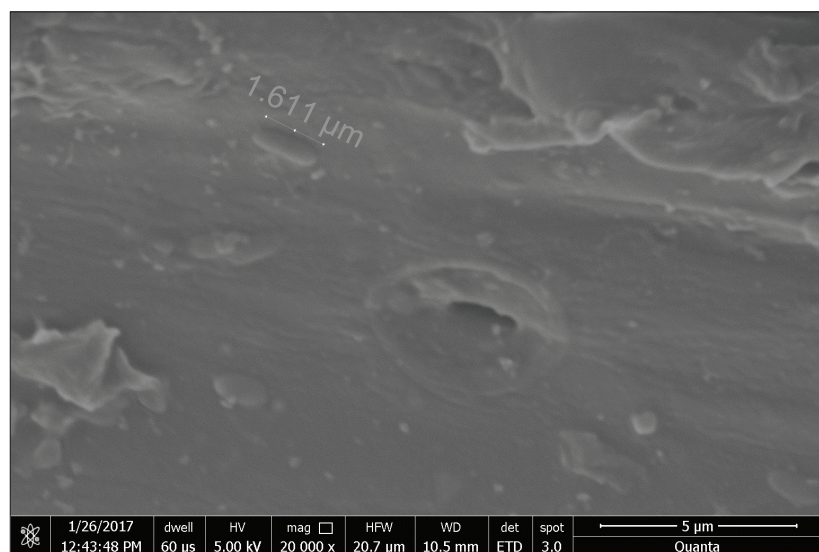
Slika 9. SEM posnetek površine vzorca, premazanega z vodno lazuro, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 10.000-kratna povečava.

Figure 9. SEM micrograph of the surface with the waterborne stain, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 10,000x.



Slika 10. SEM posnetek površine na vzorcu z nanopremazom, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 5.000-kratna povečava.

Figure 10. SEM micrograph of the surface with the nano finish, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 5,000x.



Slika 11. SEM posnetek površine na vzorcu z nanopremazom, vzorec izpostavljen bakterijam *P. aeruginosa* (t10), 20.000-kratna povečava.

Figure 11. SEM micrograph of the surface with the nano finish, exposed to *P. aeruginosa* for 10 hours (t10), magnification: 20,000x.

Preglednica 1. Število oprijetih bakterij na površinah, različnih obdelav

Table 1. The number of bacteria adhering to surfaces, different treatments

Vrsta obdelave površine	Št. posnetka SEM								Povprečje	Standardna deviacija
	1	2	3	4	5	6	7	8		
	Povečava									
	5000x	5000x	5000x	5000x	5000x	5000x	5000x	5000x		
Brez obdelave	0	13	22	0	0				7	10
Nitrocelulozni lak	112	8	97	1	5	10	0		33	49
Laneno olje	256	59	187	31	50	155		32	110	89
Vodna lazura	58	103	0	6	59	0	11		34	40
Nanopremaz	13	0	5	9	0	0	0	0	3	5

### 3.1 ŠTEVILO PRITRJENIH BAKTERIJ

#### 3.1 NUMBER OF ADHERED BACTERIA

V preglednici 1 je navedeno število bakterij, ki smo jih ugotovili na različnih posnetkih SEM oz. na površinah z različnimi obdelavami. Bakterije smo šteli na naključno izbranih površinah posameznih vzorcev, in sicer ročno, tako da smo bakterije na posnetkih SEM najprej identificirali in nato obkrožili. Za tak način smo se odločili, ker so bili posnetki SEM slabe kakovosti in zato ni bilo mogoče izvesti avtomatiziranega štetja bakterij z računalniško aplikacijo. Metodo obkroževanja smo izvedli na posnetkih SEM pri 5.000 kratni povečavi. Slike smo natisnili v visoki ločljivosti, saj so na tak način bakterije postale lažje opazne. V primerih, kjer je kvaliteta posnetkov omogočila avtomatsko prepoznavanje bakterij, pa smo bakterije prešteli s programom ImageJ.

Ugotovili smo, da so razlike v številu bakterij na posameznih posnetkih naključno izbranih površin različno obdelanih preskušancev zelo velike. Kljub temu pa so se nakazali trendi med dovtetnostjo različno obdelanih površin za oprijem bakterij. Indikacije so naslednje: na  $4.6 \times 10^{-3} \text{ mm}^2$  smo v povprečju na slikah površin lesa brez obdelave opazili le nekaj bakterij (pribl. 7), na površinah, premazanih z nitroceluloznim lakom nekaj deset bakterij (pribl. 33), na oljenih površinah je bilo bakterij največ, v povprečju okrog 110, pri površinah z lazuro je bil rezultat podoben kot v primeru površin z nitroceluloznim lakom (okrog 34 bakterij) ter pri nanopremazu Silles približno enako kot pri neobdelanih površinah (nekaj opaženih bakterij na posnetek, povp. 3). Menimo, da se največja dovtetnost za oprijem bakterij nakazuje pri oljenih površinah, precej manj,

a še vedno relativno veliko, pa je bilo bakterij na površinah, premazanih z lazuro in z nitroceluloznim lakom. Antibakterijski potencial nanodelcev v premazih je bil v literaturi že omenjen (Nosrati et al., 2017) in podobno smo opazili v tudi v naši raziskavi, saj smo na površinah z nanopremazom zaznali zelo malo oprijetih bakterij.

## 4 SKLEPI

### 4 CONCLUSIONS

Adhezija bakterij na površine in pozneje nastanek biofilma sta glavna vzroka kroničnih okužb z negativnim vplivom na zdravje ljudi. Takšnim okužbam smo najbolj izpostavljeni v bolnišnicah, javnih kuhinjah, pisarnah, šolah in ne nazadnje tudi v bivalnih prostorih. Da bi možnost adhezije bakterij na površine čim bolj zmanjšali, je najprej potrebno dobro poznavanje mehanizmov adhezije in dejavnikov, ki vplivajo na oprijem bakterij. Proces adhezije temelji na fizikalnih in kemijskih interakcijah med mikroorganizmi in kontaktno površino. Oprijemanje bakterijskih celic je odvisno od lastnosti površin in mikrotopografije, sestave površine, hrupavosti, hidrofobnosti, bakterijskega površinskega naboja, velikosti in lastnosti celice (gibljevost bakterij ...), temperature, vrednosti pH in še številnih drugih dejavnikov.

Na podlagi preliminarnih rezultatov raziskav adhezije bakterij smo ugotovili, da lahko tudi les ali lesne kompozite uporabljamo kot testne površine za preučevanje adhezije bakterij, pod pogojem, da uveljavljene metode dela prilagodimo lastnostim lesa. Prav tako velja, da je adhezijo bakterij vrste *P. aeruginosa* možno proučevati tudi na površinah

običajnih premaznih sredstev za les. Čeprav dobljenih rezultatov nismo mogli statistično ovrednotiti, se nakazuje, da so za oprijem bakterij *P. aeruginosa* med preskušeni premazi najbolj dovzetne površine, obdelane z lanenim oljem. Najmanj adheriranih bakterij pa smo po 10-urni izpostavitvi bakterijam v tekočem hranilnem gojišču opazili na površinah, ki so bile premazane z nanopremazom ali pa sploh niso bile premazane.

## 5 POVZETEK

### 5 SUMMARY

Bacterial adhesion to surfaces and subsequent biofilm formation are the main causes of chronic infections with a negative impact on human health, and this is an important topic that should be considered in the process of furniture manufacturing, especially when it is intended for use in rooms for the elderly or in hospitals. There should be a focus on the application of products with antibacterial surfaces to which the microorganisms do not adhere.

The aim of our preliminary research was to test selected wood coatings (linseed oil, water-borne stain, nitrocellulose varnish, nano-coating) with regard to the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. We used beech plywood as the test substrate. First, we wanted to find out if the existing methods for determination of bacterial adhesion on various materials can also be applied to wooden and coated wood surfaces. The test methodology followed that used in some other similar investigations, where the adhesion of bacteria to non-wooden surfaces was investigated.

The prepared samples were exposed to bacteria in a liquid nutrient medium for three different durations: they were washed immediately after exposure (0 hours, t<sub>0</sub>), after 10 hours (t<sub>10</sub>) and after 18 hours (t<sub>18</sub>). After exposure, the topography of the test surfaces and number of adhered bacteria were observed on scanning electron microscopy (SEM) micrographs.

The results indicated that the maximum number of bacteria adhered to the surface coated with linseed oil. In the future, extensive and in-depth studies will be needed to confirm and obtain more conclusive results.

## ZAHVALA

### ACKNOWLEDGEMENT

Zahvaljujemo se za finančno podporo ARRS, z raziskovalnim programom P4-0015 "Les in lignocelulozni kompoziti". Za pripravo bakterijskih vzorcev se zahvaljujemo doc. dr. Karmen Godič Torkar.

## LITERATURA

### REFERENCES

- Alarfaj, A. A., Lee, H. H., Munusamy, M. A., Ling, Q. D., Kumar, S., Chang, Y., Chen, Y. M., Lin, H. R., Lu, Y. T., Wu, G. J., & Higuchi, A. (2016). Development of biomaterial surfaces with and without microbial nanosegments. *Journal of Polymer Engineering*, 36(1), 1–12, DOI: <https://doi.org/10.1515/polyeng-2015-0046>.
- Bakker, D. P., Huijs, F. M., de Vries, J., Klijnstra, J. W., Busscher, H. J., & van der Mei, H. C. (2003). Bacterial deposition to fluoridated and non-fluoridated polyurethane coatings with different elastic modulus and surface tension in a parallel plate and a stagnation point flow chamber. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 32(3), 179-190, DOI: [https://doi.org/10.1016/S0927-7765\(03\)00159-0](https://doi.org/10.1016/S0927-7765(03)00159-0).
- Blackledge, M. S., Worthington, R. J., & Melander, C. (2013). Biologically inspired strategies for combating bacterial biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(5), 699-706, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2013.07.004>.
- Bohinc, K., Dražič, G., Fink, R., Oder, M., Jevšnik, M., Nipič, D., Godič Torkar, K., & Raspor, P. (2014). Available surface dictates microbial adhesion capacity. *International journal of adhesion and adhesives*, 50(1), 265-272, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2014.01.027>.
- Bohinc, K., Dražič, G., Abram, A., Jevšnik, M., Jeršek, B., Nipič, D., Kurinčič, M., & Raspor, P. (2016). Metal surface characteristics dictate bacterial adhesion capacity. *International Journal of Adhesion & Adhesives*, 68(July 2016), 39–46, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijadhadh.2016.01.008>.
- Chau, N. P. T., Pandit, S., Jung, J. E., & Jeon, J. G. (2014). Evaluation of *Streptococcus mutans* adhesion to fluoride varnishes and subsequent change in biofilm accumulation and acidogenicity. *Journal of Dentistry*, 42(6), 726-734, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.03.009>.
- De Jaeger, F. (2017). Forest Based Sector Technology Platform. Strategic Research and Innovation Agenda for 2020. Brussels: Filip de Jaeger, Gérant FTP.
- De Jaeger, F. (2017a). Forest Based Sector Technology Platform. Annex to the Strategic Research and Innovation Agenda for 2020. Research and Innovation Areas. Brussels: Filip de Jaeger, Gérant FTP.
- Dobretsov, S., & Thomason, J. T. (2011). The development of marine biofilms on two commercial non-biocidal coatings: a comparison between silicone and fluoropolymer technologies. *Industrial & Biofouling*, 7(8), 869-880, DOI: <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.607233>.

- Fink, R., Odera, M., Rangus, D., Raspor, P., & Bohinc, K. (2015). Microbial adhesion capacity. Influence of shear and temperature stress. *Int. Journal of Environmental Health Research*, 25(6), 656–669, DOI: <https://doi.org/10.1080/09603123.2015.1007840>.
- Flemming, R. G., Proctor, R. A., & Cooper, S. L. (1999). Bacterial adhesion to functionalized polyurethanes. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 10(6), 679–697, DOI: <https://doi.org/10.1163/156856299x00874>.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M., & Zhang, Z. (2008). Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9), 1049–1056, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2008.04.001>.
- Gillett, A., Waugh, D., Lawrence, J., Swainson, M., & Dixon, R. (2015). Influencing the Attachment of Bacteria Through Laser Surface Engineering. Presented at ICALEO, 34<sup>th</sup> International Congress on Applications of Lasers & Electro-Optics, Atlanta, GA, USA, paper M50319.
- Gu, H., & Ren, D. (2014). Materials and surface engineering to control bacterial adhesion and biofilm formation: A review of recent advances. *Frontiers in Chemical Science and Engineering*, 8(1), 20–33. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11705-014-1412-3>.
- Hori, K., & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, 48(3), 424–434, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.11.014>.
- Ibanescu, S. A., Nowakowska, J., Khanna, N., Landmann, R., & Klok, H. A. (2016). Effects of Grafting Density and Film Thickness on the Adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to Poly(2-hydroxy ethyl methacrylate) and Poly(poly(ethylene glycol)methacrylate) Brushes. *Macromolecular Bioscience*, 16(5), 676–685, DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.201500335>.
- Iguerb, O., & Bertrand, P. (2008). Graft photopolymerization of polyethylene glycol monoacrylate (PEGA) on poly(methyl methacrylate) (PMMA) films to prevent BSA adsorption. *Surface and Interface Analysis*, 40(3-4), 386–390, DOI: <https://doi.org/10.1002/sia.2701>.
- Jefferson, K. K. (2004). What drives bacteria to produce a biofilm? *FEMS Microbiology Letters*, 236(2), 163–173, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2004.tb09643.x>.
- Kandelbauer, A., & Widsten, P. (2009). Antibacterial melamine resin surfaces for woodbased furniture and flooring. *Progress in Organic Coatings*, 65(3), 305–313, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2008.12.003>.
- Kapun Dolinar, A. (2001). Mikrobiologija. Ljubljana: Zavod Republike Slovenije za šolstvo.
- Kovačević, D., Pratnekar, R., Godič Torkar, K., Salopek, J., Dražić, G., Abram, A., & Bohinc, K. (2016). Influence of polyelectrolyte multilayer properties on bacterial adhesion capacity. *Polymers*, 8(10), 345–1-345-12, DOI: <https://doi.org/10.3390/polym8100345>.
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm Formation by Lactic Acid Bacteria and Resistance to Environmental Stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381–386, DOI: <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Brock, T. D. (2006). *Brock Biology of microorganisms*. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Myszka, K., & Czaczyk, K. (2011). Bacterial Biofilms on Food Contact Surfaces – a Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(3), 173–180, DOI: <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0018-4>.
- Nosrati, R., Olad, A., & Shakoobi, S. (2017). Preparation of an antibacterial, hydrophilic and photocatalytically active polyacrylic coating using TiO<sub>2</sub> nanoparticles sensitized by graphene oxide. *Materials Science and Engineering C*, 80(November), 642–651, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.07.004>.
- Oder, M., Kompore, B., Bohinc, K., & Godič Torkar, K. (2015). The impact of material surface roughness and temperature on the adhesion of *Legionella pneumophila* to contact surfaces. *International Journal of Environmental Health Research*, 25(5), 469–479, DOI: <https://doi.org/10.1080/09603123.2014.963035>.
- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(9), 577–588, DOI: <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0234-4>.
- Pereira, C. A., Eskelson, E., Cavalli, V., Liporoni, P. C. S., Jorge, A. O. C., & do Rego, M. A. (2011). *Streptococcus mutans* Biofilm Adhesion on Composite Resin Surfaces After Different Finishing and Polishing Techniques. *Operative Dentistry*, 36(3), 311–317, DOI: <https://doi.org/10.2341/10-285-L>.
- Reid, G. (1997). Microbial adhesion to biosurfaces. *Current Opinion in Colloid & Surface Science*, 2(5), 513–516, DOI: [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(97\)80100-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(97)80100-8).
- Singh, A. P., & Dawson, B. S. W. (2011). Probing the Wood Coating Interface at High Resolution. In: Bucur, V. (ED.) *Delamination in Wood, Wood Products and Wood Based Composites* (145–155). Dordrecht: Springer.
- Song, F., Koo, H., & Ren, D. (2015). Effects of Material Properties on Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. *Journal of Dental Research*, 94(8), DOI: <https://doi.org/10.1177/0022034515587690>.
- Soumya, E., Ibensouda, K. S., Latrache, H., & Boutahari, S. (2012). Study of Microbial Adhesion on Some Wood Species: Theoretical Prediction. *Microbiology*, 80(1) 43–49, DOI: <https://doi.org/10.1134/S0026261711010152>.
- Soumya, E., Ibensouda, K. S., Latrache, H., Meftah, H., Tahri, N. J., & Hamadi, F. (2012a). Environmental Scanning Electron Microscopy characterization of the adhesion of conidia from *Penicillium expansum* to cedar wood substrata at different pH values. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 82(4) 1707–1713, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0980-3>.
- Teixeira, P., Trindade, A. C., Godinho, M. H., Azeredo, J., Oliveira, R., & Fonseca, J. G. (2006). *Staphylococcus epidermidis* adhesion on modified urea/urethane elastomers. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition*, 17(1-2), 239–246, DOI: <https://doi.org/10.1163/156856206774879072>.
- Tolker-Nielsen, T. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections: From molecular biofilm biology to new treatment possibilities. *APMIS*, 122(138), 1–51, DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.12335>.

Van Loosdrecht, M. C., Lyklema, J., Norde, W., Schraa, G., & Zehnder, A. J. (1987). The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* 53(8), 1893–1897. PMID: PMC204020, PMID: 2444158.

Xu, G., Pranantyo, D., Xu, L., Neoh, K. G., & Kang, E. T. (2016). Antifouling, Antimicrobial, and Antibiocorrosion Multilayer Coatings Assembled by Layer-by-layer Deposition Involving Host–Guest Interaction. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 55(41), 10906-10915, DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.6b02190>

Yahr, T. L., & Parsek, M. R. (2006). *Pseudomonas aeruginosa*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., & Stackebrandt, E. (ED.) *The Prokaryotes*. New York: Springer.