

# EFFETTO SUL BIOFILM AMBIENTALE DI UNA COLTURA MICROBICA APPLICATA NELL'AMBIENTE DELLA SALA PARTO

## *EFFECT ON THE ENVIRONMENTAL BIOFILM OF A MICROBIAL CULTURE FARROWING ROOM AMBIENCE*

BAZZOLI A.<sup>1</sup>, PLATEAU J.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Lallemand Animal Nutrition, Italia

<sup>2</sup>Lallemand Animal Nutrition, Francia

**Parole chiave:** Biofilm positivo, ambiente microbico, parto.

**Key words:** Positive biofilm, microbial environment, farrowing

**Riassunto:** I biofilm hanno un importante impatto su una vasta gamma di aree di applicazione, ad esempio nel campo biomedico umano e nell'industria alimentare inclusa la produzione di materie prime da produzioni zootecniche nonché l'allevamento. Scopo del presente studio è quello di valutare l'effetto di una miscela microbica a base di *Bacillus spp* e *Pediococcus spp.*, nel controllo dello sviluppo e contaminazione del biofilm ambientale in un allevamento suino. Due sale parto di 50 m<sup>2</sup> e 7 scrofe ciascuna sono state prese in considerazione. Una delle due sale, denominata Trattamento è stata trattata con il prodotto subito dopo la disinfezione mentre la stanza Controllo dopo la disinfezione non ha ricevuto alcun trattamento. Sono stati effettuati un totale di 40 tamponi ambientali per la ricerca di: *Pediococcus spp.*, *E. coli*, *Enterobacteriacee*, *Streptococcus spp* e *Staphylococcus spp.* I tamponi sono stati effettuati su due differenti superfici ( pavimento grigliato e pareti divisorie) in 3 differenti momenti: prima dell'entrata degli animali (T0), 24 ore dopo l'entrata degli animali (T1), e quattro giorni dopo l'entrata (T4). Tra le popolazioni ricercate i pediococchi sono risultati i più presenti e sono stati riscontrati solo nella stanza trattata per entrambe le superfici con differenze significative, rispetto alla stanza controllo a T1 (p= 0.03) e a T4 (p=0.03). Per quanto riguarda le due superfici, il pavimento grigliato è sembrata essere la superficie più contaminata rispetto alle pareti divisorie. In questo caso la stanza controllo aveva una contaminazione maggiore per streptococchi a T4 (p=0.03) e una tendenza a maggior contenuto in stafilococchi sempre a T4 (p= 0.057). Le pareti divisorie non hanno mostrato differenze significative tra i due trattamenti.

**Abstract:** Biofilms have a strong impact in a large range of areas such as the human biomedical fields and the food industry including the raw material production from livestock and farming. The aim of this study was to test the effects, of a mix of bacteria based on *Bacillus spp.* and *Pediococcus spp.*, on biofilm development and contamination on a swine farm. Two farrowing rooms of 50 m<sup>2</sup> and 7 sows each were selected. One of the two rooms, called Treatment, received the application of the product just after the disinfection, whereas the Control room after the disinfection did not receive any treatment. A total of 40 environmental swabs were taken to screen the presence of: *Pediococcus spp.*, *E. coli*, *Enterobacteriacee*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.* The swabs were applied to two different surfaces (slatted floor and plastic wall) in 3 different times: before animal entrance (T0), 24 hours after animal entrance (T1) and four days after animal entrance (T4). Among the investigated populations, *Pediococcus spp.* was the most relevant and occurred only on treated room on both surfaces, with significant differences, compared to the control room, at T1 (p= 0.03) and at T4 (p= 0.03). Regarding the two surfaces, the slatted floor seems to be more contaminated

compared to the plastic walls. In this case, the control room had a higher contamination of *Streptococcus* spp. at T4 ( $p= 0.03$ ) and a trend for higher *Staphylococcus* spp. at T4 ( $p= 0.057$ ). The plastic walls did not show any significant differences between two treatments.

### **INTRODUZIONE:**

Lo stato planctonico, ovvero libero, è stato considerato per molto tempo lo stato fisiologico principale in cui è possibile ritrovare i microrganismi nell'ambiente. Tuttavia, diversi studi hanno dimostrato che il biofilm è una strategia comunemente utilizzata da molti microrganismi per stabilizzarsi, diffondersi e colonizzare i diversi ambienti. La capacità di formare un biofilm è ora considerata attributo universale dei microrganismi [1]: al mondo oltre il 90% della massa microbica risiede all'interno di un biofilm [2].

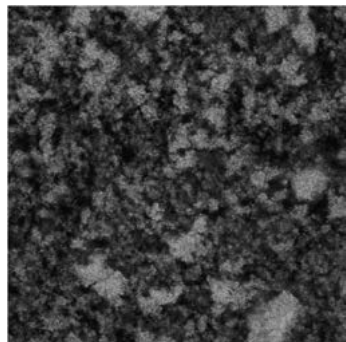
I biofilm hanno un importante impatto su una vasta gamma di aree di applicazione, ad esempio nel campo biomedico umano e nell'industria alimentare inclusa la produzione di materie prime da produzioni zootecniche [3]. Negli anni è stata data scarsa attenzione ai biofilm presenti in allevamento: la maggior parte della ricerca è stata orientata a patologie umane legate a biofilm, in realtà questi sono responsabili di elevate perdite economiche anche all'industria zootecnica [4].

#### *Definizione di biofilm e matrice*

Il biofilm viene definito, e generalmente accettato, come comunità strutturata di batteri e/o altri microrganismi: alghe, funghi, immersi in una matrice polimerica autoprodotta ed attaccata ad una superficie inerte e/o viva [5].

**Figura 1:** *Biofilm di Staphylococcus epidermidis – microscopia confocale [6].*

**Figure 1:** *Staphylococcus epidermidis biofilm- confocal microscopy [6].*



La matrice polimerica extracellulare è principalmente composta da acqua (più del 97%), esopolisaccaridi, proteine e acidi nucleici. La composizione della matrice inoltre può variare in funzione del tipo di specie di microrganismi ma anche dalle condizioni di crescita [7]. Nella Figura 1 è riportato come esempio un biofilm mono specie di *Staphylococcus epidermidis*.

#### *Formazione del biofilm e dinamiche*

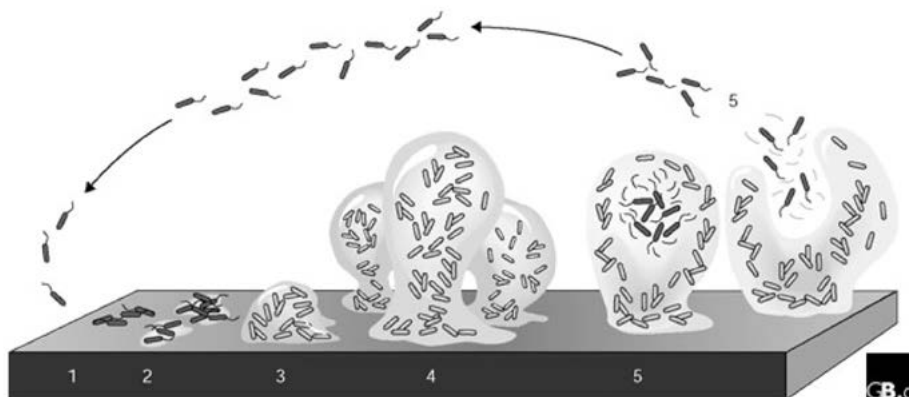
Il processo di formazione di un biofilm è un processo multifase complesso e descritto nella Figura 2. Il modello corrente di formazione di un biofilm è basato su osservazioni ottenute utilizzando diverse specie batteriche.

**Figura 2:** Fasi del ciclo di un Biofilm [8].

1: Adesione reversibile dei batteri, 2: Adesione irreversibile dei batteri, 3: Prima fase di maturazione, 4: Biofilm completamente maturo con architettura complessa, 5: Dispersione di singole cellule mobili

**Figure 2:** Biofilm cycle steps [8].

1: Reversible bacteria attachment, 2: Irreversible bacteria attachment, 3: First maturation phase, 4: Fully mature biofilm with complex architecture, 5: Dispersion of single motile cells



Durante le prime fasi di formazione del biofilm, le cellule batteriche che riescono ad aderire irreversibilmente ad una superficie iniziano a formare micro colonie per divisione cellulare; quindi iniziano a produrre una matrice polimerica extracellulare. L'architettura tridimensionale di un biofilm maturo è eterogenea e costituita da canali d'acqua che creano gradienti decrescenti dalla parte esterna del biofilm fino agli strati più profondi, adesi alla superficie di supporto, permettendo così il trasporto di ossigeno e nutrienti [9]. La modalità di crescita dei batteri all'interno di un biofilm è più lenta rispetto alla forma libera, dovuta appunto a questi gradienti di elementi nutritivi e/o all'ossigeno. Inoltre, la fase di dispersione permette a gruppi di microrganismi di staccarsi dal biofilm per mantenersi su di uno specifico ambiente e/o così colonizzare altre superfici, ma la stessa caratteristica può causare infezioni ricorrenti nei casi di malattia [10].

Un'altra interessante caratteristica specifica è la comunicazione "da cellula a cellula" denominata "quorum sensing", un tipo di comunicazione dipendente dalla densità cellulare. Questa caratteristica permette ai batteri di un biofilm di comunicare tra di loro ma anche di organizzare una risposta collettiva agli stimoli dell'ambiente [11]. Piccole molecole chimiche di segnale vengono prodotte e rilasciate nell'ambiente dai batteri. L'aumento di queste molecole di segnale è commensurato alla densità delle cellule nel biofilm. Specifici sensori batterici sono in grado di riconoscere la concentrazione del segnale con conseguente consapevolezza della densità totale all'interno del biofilm. Raggiunta una soglia critica nella concentrazione del segnale, viene attivato simultaneamente un meccanismo di regolazione dell'espressione genetica che porta all'adattamento del comportamento dell'intera popolazione batterica. Il meccanismo è utilizzato nella formazione del biofilm, ma anche in altre fasi della vita microbica ad esempio per indurre simbiosi, virulenza, competenza, coniugazione, produzione di antibiotici, motilità, sporulazione [12]. Recenti progressi nel campo, indicano che la comunicazione "da cellula a cellula" via quorum sensing può avvenire, non solo all'interno della stessa specie, ma anche tra specie diverse.

## *Importanza dei biofilm in produzione animale*

Gli allevamenti animali, per le loro condizioni ambientali, rappresentano dei luoghi favorevoli allo sviluppo di biofilm su ogni tipo di attrezzatura. Questi infatti sono caratterizzati da molteplici superfici con numerose asperità e presenza di umidità, calore e ampia fonte di materiale organico (alimenti, deiezioni, lettiere, ecc.). Inoltre, la presenza di eventuali impianti di ventilazione e degli stessi animali, può contribuire alla disseminazione del biofilm. Anche piccoli animali od insetti provenienti dell'esterno possono introdurre specie diverse di microrganismi e concorrere alla formazione del biofilm.

Nella pratica attuale, le correnti tecnologie abbinate a regolari processi di pulizia e disinfezione permettono di eliminare la maggior parte dei batteri. Tuttavia la matrice del biofilm è considerata uno dei maggiori fattori di resistenza dei batteri grazie alla sua capacità di agire come barriera contro le più diverse aggressioni. Ad esempio esso protegge i differenti strati di batteri, evitando il contatto con gli agenti antimicrobici. E' stato dimostrato che i batteri presenti all'interno di un biofilm, rispetto a batteri presenti in forma libera, sono da 10 a 1000 volte più resistenti agli antimicrobici come antibiotici [13] e disinfettanti [14].

Quando questi microrganismi sono potenzialmente patogeni o indesiderati, la formazione di biofilm e la loro presenza in esso è considerata un rischio e deve essere assolutamente evitata, specialmente in ambienti sensibili o nei locali d'allevamento destinati a fasi critiche (sale parto, svezzamenti, locali sovraffollati, ecc.). Chillaci e Vitale nella loro review del 2012 riportano che molti patogeni correlati alla salute animale, zoonosi e zoonosi alimentari trasmesse da Gram negativi come *Campylobacter spp.*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, e Gram positivi come *Staphylococcus spp.* e *Listeria monocytogenes*, sono in grado di formare biofilm [15]. Biofilm indesiderati o patogenici possono rappresentare perciò delle problematiche, proprio per le loro caratteristiche di resistenza e disseminazione.

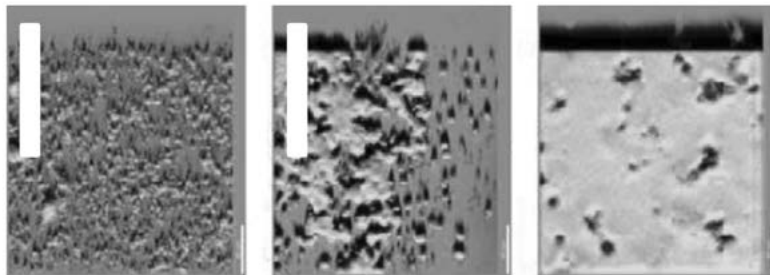
In suinicoltura è stato dimostrato che un'appropriata biosicurezza e una buona igiene possono significativamente migliorare i costi di produzione. Ad esempio, la differenza di redditività tra aziende ad elevata biosicurezza e quelle con bassa biosicurezza è stimato di circa 200€/scrofa/anno [16]. Infatti, la contaminazione dell'ambiente d'allevamento con potenziali batteri patogeni, aumenta il rischio di malattia. Per esempio, epidermiti causate da *Staphylococcus hyicus* o poliartriti da *Streptococcus suis* sono problematiche comunemente associate a situazioni di scarsa igiene in sala parto [17].

## *Biofilm positivo come soluzione innovativa per il miglioramento dell'ambiente in suinicoltura*

Creare un biofilm positivo dopo la disinfezione e prima dell'inizio del ciclo successivo può essere considerato un approccio emergente preventivo per migliorare l'ambiente microbico nelle strutture d'allevamento. L'applicazione sulle superfici di allevamento, come pavimentazioni e strutture, di microrganismi benefici, possono prevenire o limitare lo sviluppo di biofilm indesiderati, risultando in un migliore equilibrio microbico dell'ambiente, con minori rischi di contaminazione degli animali. Il requisito fondamentale che deve avere questa tipologia di batteri, è un'elevata capacità colonizzativa. A tal proposito l'utilizzo di una specifica tecnologia, The BioFilm Ring Test sviluppata da BioFilm Control® [18,19], permette di selezionare batteri con la capacità di formare biofilm positivi in meno di 24h. Tale tecnologia ha permesso di selezionare una miscela concentrata di *Bacillus spp.* e batteri lattici, *Pediococcus spp.* La miscela è appunto caratterizzata da un'elevata capacità colonizzante come mostrato in Figura 3, attraverso l'osservazione e la validazione in real time del biofilm dei batteri selezionati grazie a microscopia confocale.

**Figura 3:** Sviluppo di biofilm positivo a: T0h, T6h, T24h - Fonte: MICALIS Institute – LALLEMAND

**Figure 3:** Positive biofilm development at : T0h, T6h, T24h - Source: MICALIS Institute – LALLEMAND



### **MATERIALI E METODI:**

Il presente studio è stato effettuato al fine di valutare l'efficacia di una miscela di batteri vivi, nel controllo dello sviluppo e contaminazione del biofilm ambientale, in un contesto di campo, rappresentato da un allevamento suino. Per lo scopo è stata individuata una scrofaia a ciclo semichiuso di circa 250 scrofe situata nel cuore della Pianura Padana. All'interno della scrofaia sono state individuate due sale parto identiche, dalla superficie di 50 m<sup>2</sup> e 7 gabbie parto ciascuna. Una sala, denominata controllo, ha seguito la normale routine di pulizia e disinfezione. Nell'allevamento la routine di pulizia prevede, subito dopo lo svezzamento dei suinetti, il lavaggio con acqua pressurizzata e detergente, seguita da una prima disinfezione con soluzione acquosa di acido peracetico all'1%, il giorno successivo una seconda disinfezione con soluzione acquosa a base di quaternari d'ammonio e gluteraldeide al 2%. La seconda sala, denominata trattamento, dopo 4 ore dall'ultima disinfezione ha ricevuto una miscela a base di *Bacillus* spp. e *Pediococcus* spp. applicata su tutta la superficie e relative strutture fino ad un'altezza di 2 m dal suolo. Il prodotto è stato distribuito con normale pompa da spalla ad una dose di 0,1 g/m<sup>2</sup> di superficie nebulizzata. Le scrofe, lavate con acqua e detergente specifico, sono state introdotte nei locali dopo 3 giorni di vuoto sanitario come da normale protocollo aziendale.

Al fine di valutare eventuali effetti sulla formazione del biofilm ambientale è stata predisposta la raccolta di campioni, tramite tamponi ambientali, sulle superfici del pavimento grigliato e delle pareti divisorie in plastica tra una box parto e l'altro, per un totale di 40 tamponi, effettuati da un unico operatore. Ogni tampone, attraverso una specifica gestualità standardizzata, è stato applicato su una superficie casualmente scelta di 225 cm<sup>2</sup>. I campioni sono stati prelevati in tre momenti diversi: poco prima dell'entrata delle scrofe in sala parto (T0), dopo 24 ore dall'entrata delle scrofe (T1) e a 4 giorni dall'entrata degli animali (T4). I tamponi sono poi stati direttamente consegnati ad un laboratorio accreditato, per la ricerca di: *Pediococcus* spp., *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.

Per l'analisi statistica i dati sono stati comparati utilizzando il test non parametrico Mann-Whitney. La significatività è stata dichiarata per valori di P inferiori a 0.05.

### **RISULTATI E DISCUSSIONI:**

A livello generale, osservando la contaminazione iniziale a T0, ovvero appena prima

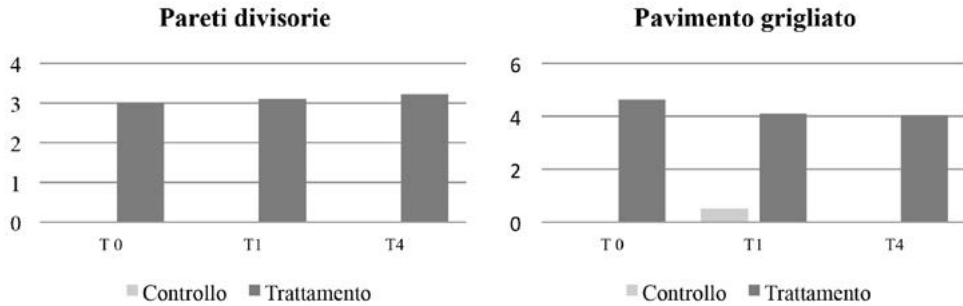
dell'entrata degli animali, non sono state osservate differenze significative, sia per tipologia di superficie analizzata sia tra le due sale parto. Da sottolineare invece come il protocollo aziendale di pulizia e disinfezione dei locali della sala parto sia da considerarsi opportuno e soddisfacente, almeno per le popolazioni microbiche osservate. In particolar modo infatti la presenza a T0 di E.coli e di streptococchi è risultata essere nulla, mentre era minima la presenza di enterobatteri e stafilococchi (Tab. 1). Situazione diversa invece per quanto riguarda la presenza di pediococchi.

		<b>Controllo a T0</b>	<b>Trattamento a T0</b>
		<i>Log UFC/cm<sup>2</sup></i>	<i>Log UFC/cm<sup>2</sup></i>
<b>E.coli spp.</b>	<i>Pareti divisorie</i>	0,0	0,0
	<i>Pavimento grigliato</i>	0,0	0,0
<b>Enterobatteriacee spp.</b>	<i>Pareti divisorie</i>	0,0	0,0
	<i>Pavimento grigliato</i>	0,0	0,8
<b>Pediococcus spp.</b>	<i>Pareti divisorie</i>	0,0	3,0
	<i>Pavimento grigliato</i>	0,0	4,6
<b>Staphilococcus spp.</b>	<i>Pareti divisorie</i>	0,8	1,1
	<i>Pavimento grigliato</i>	2,2	2,9
<b>Streptococcus spp.</b>	<i>Pareti divisorie</i>	0,0	0,0
	<i>Pavimento grigliato</i>	0,0	0,0

**Tab. 1:** *Popolazione microbica media (Log/cm<sup>2</sup>) su Pavimento grigliato e Pareti divisorie prima dell'entrata degli animali in sala parto (T0).*

**Tab. 1:** *Average microbial population (Log/cm<sup>2</sup>) on Slatted Floor and Dividing Walls before animal entrance in farrowing room (T0).*

Infatti, come mostrato nelle figure 4a e 4b, la presenza di pediococchi è stata rilevata solo nella stanza trattata per entrambe le superfici, con una contaminazione media di circa 4 Log UFC/cm<sup>2</sup> su pavimento grigliato e di circa 3 Log UFC/cm<sup>2</sup> su divisori in plastica. L'assenza di crescita di pediococchi nella stanza controllo per tutta la durata della prova indica che la colonizzazione è risultata efficace e l'applicazione del prodotto è risultata essere corretta. Inoltre la popolazione di pediococchi è risulta essere anche la più numerosa in assoluto, mentre gli stafilococchi sono risultati essere la seconda popolazione per numero e la principale per la sala controllo. In questo caso un'elevata presenza di flora positiva all'interno del biofilm ambientale, ha anche l'effetto di diluire eventuali batteri indesiderati eventualmente sfuggiti al processo di disinfezione.



**Fig. 4a e 4b:** Conta di *Pediococcus* spp. (Log/cm<sup>2</sup>) su pareti divisorie e pavimento grigliato. La popolazione di pediococchi è risultata essere presente solo nella stanza trattata, e significativamente maggiore a T1 e T4 (P<0.05). Ciò indica che il prodotto è stato efficace a creare un biofilm positivo anche in una situazione reale di allevamento.

**Fig. 4a e 4b:** *Pediococcus* spp. count (Log/cm<sup>2</sup>) on dividing walls and slatted floor. The population of *Pediococcus* was found to be present only in the treated room, and significantly higher at T1 and T4 (P < 0.05). This indicates that the product has been effective in creating a positive biofilm even in a real situation on farm.

Per quanto riguarda le superfici analizzate, il pavimento grigliato, a livello generale, è sembrato essere più contaminato rispetto alle pareti divisorie. Ciò può essere dovuto sia ad una maggior porosità dei materiali sia perché a diretta vicinanza e contatto con gli animali e le feci. Sempre per la superficie grigliata, osservando la tabella 2 è possibile notare come vi siano delle differenze significative tra la stanza controllo e quella trattata. Infatti in quest'ultima vi era una maggiore contaminazione positiva di *Pediococcus* spp. sia a T1 sia a T4 (P<0,05), come già visto in precedenza, ma anche una contaminazione di streptococchi significativamente inferiore a T4 (P<0,05) ed una forte tendenza ad una minor presenza di stafilococchi, sempre a T4 (P=0,057). Inoltre per il gruppo controllo, su pavimento grigliato, vi è un aumento significativo per la popolazione di streptococchi tra T1 e T4 ed una forte tendenza ad una maggiore popolazione di stafilococchi (P=0,057). Invece, osservando i risultati in tabella 3, risulta evidente come la carica batterica presente sulle pareti divisorie sia minima, ad eccezione dei pediococchi, significativamente maggiori per la stanza trattata. Per gli altri microrganismi ricercati le contaminazioni sono risultate essere minime e addirittura nulle per E.coli ed enterobatteri, e come conseguenza non vi sono state differenze significative tra le due stanze. Interessante però osservare che, per quanto riguarda gli stafilococchi, sembra esservi un effetto sulla velocità di crescita, come riportato in fig. 5: nella stanza trattata lo sviluppo all'interno del biofilm di questa popolazione appare più lento. A supporto di tale tesi sono però necessarie ulteriori indagini. Il fatto che non vi siano state differenza tra i due trattamenti sulle pareti divisorie è sicuramente riconducibile all'alto grado di pulizia dell'allevamento e al fatto che tali superfici non siano mai venute a contatto con gli animali durante l'arco della prova.

		Pavimento Grigliato		
		Controllo	Trattamento	*P-value
		Log UFC/cm <sup>2</sup>	Log UFC/cm <sup>2</sup>	
<b>E.coli spp.</b>	T1	0,0	0,4	n.s.
	T4	0,4	0,4	n.s.
<b>Enterobatteriacee spp.</b>	T1	0,0	0,0	n.s.
	T4	0,6	0,4	n.s.
<b>Pediococcus spp.</b>	T1	0,3	4,0	<0,05
	T4	0,0	3,9	<0,05
<b>Staphilococcus spp.</b>	T1	2,5	2,7	n.s.
	T4	3,6	3,0	0,057
<b>Streptococcus spp.</b>	T1	0,9a	1,3	n.s.
	T4	2,2b	1,7	<0,05

**Tab. 2:** Popolazione microbica media (Log/cm<sup>2</sup>) su Pavimento grigliato a 24 ore (T1) e a 4 giorni (T4) dopo l'entrata degli animali.

\* Significatività per valori differenti sulla stessa riga

a,b diversi per P<0,05

**Tab. 2:** Average microbial population (Log / cm<sup>2</sup>) on Slatted floor at 24 hours (T1) and at 4 days (T4) after animals entrance.

\* Significance for different values on the same row

a,b different for P <0,05

		Parete Divisoria		
		Controllo	Trattamento	*P-value
		Log UFC/cm <sup>2</sup>	Log UFC/cm <sup>2</sup>	
<b>E.coli spp.</b>	T1	0,0	0,0	n.s.
	T4	0,0	0,0	n.s.
<b>Enterobatteriacee spp.</b>	T1	0,0	0,0	n.s.
	T4	0,0	0,0	n.s.
<b>Pediococcus spp.</b>	T1	0,0	3,1	<0,05
	T4	0,0	3,1	<0,05
<b>Staphilococcus spp.</b>	T1	1,2	1,1	n.s.
	T4	1,5	1,5	n.s.
<b>Streptococcus spp.</b>	T1	0,0	0,6	n.s.
	T4	0,3	0,0	n.s.

**Tab. 3:** Popolazione microbica media (Log/cm<sup>2</sup>) su Parete divisoria a 24 ore (T1) e a 4 giorni (T4) dopo l'entrata degli animali.

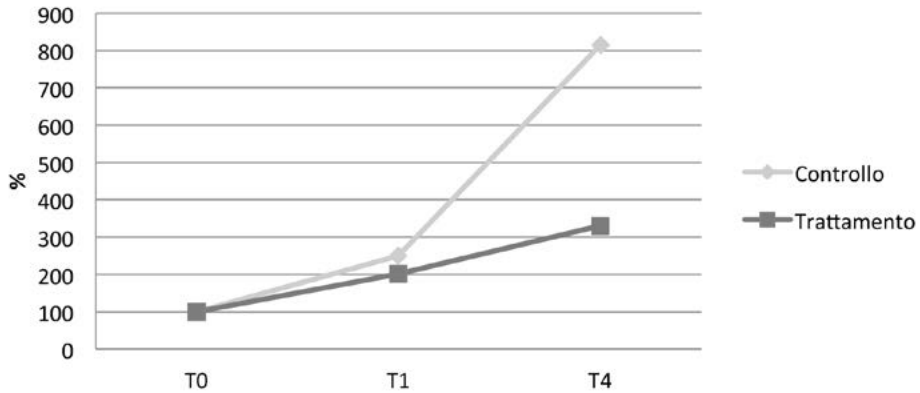
\* significatività per valori differenti sulla stessa riga

**Tab. 3:** Average microbial population (Log / cm<sup>2</sup>) on Dividing walls at 24 hours (T1) and at 4 days (T4) after animals entrance.

\* Significance for different values on the same row



### Velocità di crescita di *Staphylococcus* spp. su Pareti divisorie



**Fig. 5:** Velocità di crescita di *Staphylococcus* spp. su Pareti divisorie a T0, T1 e T4, espressa in % rispetto alla popolazione iniziale (T0). Da notare come il profilo di crescita sia differente nel controllo dove la crescita è esponenziale mentre la stanza trattata ha un incremento lineare.

**Fig. 5:** Growth rate of *Staphylococcus* spp. on Dividing walls at T0, T1 and T4, expressed in % of the initial population (T0). It should be noted that the growth profile is different in the control where the growth is exponential while the treated room has a linear increase.

### CONCLUSIONI:

L'utilizzo di una coltura microbica, complementare ad un corretto protocollo di pulizia e disinfezione sembra essere un valido strumento per aumentare il livello di biosicurezza dell'allevamento suino. E' infatti dimostrato che la coltura microbica limita la crescita di alcune popolazioni microbiche potenzialmente nocive e crea un biofilm con abbondante flora positiva in grado di diluire notevolmente eventuali microrganismi indesiderati ancora presenti dopo la disinfezione.

### BIBLIOGRAFIA:

1. Maukonen J., Mättö J., Wirtanen G., Raaska L., Mattila-Sandholm T., Saarela M. (2003), "Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review". *J Ind Microbiol Biotechnol.* 30, 327–356.
2. Briandet R., Fechner L., Naïtali M., Dreanno N. (2012), "Biofilms, quand les microbes s'organisent". France, QUAE, collection Carnet de sciences.
3. Richards J.J., Melander C. (2009), "Controlling bacterial biofilms". *ChemBioChem.* 10, 2287–2294.
4. Clutterbuck A.L., Woods E.J., Knottenbelt D.C., Clegg P.D., Cochrane C.A., Percival S.L. (2007) "Biofilms and their relevance to veterinary medicine". *Vet. Microbiol.* 121, 1–2, 1–17.
5. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. (1999), "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections". *Science.* 284, 1318–1322.
6. Tremblay Y., Hathroubi S., Mario J., (2014), "Bacterial biofilms: their importance in animal health and in public health". *Can J Vet Res.* 78, 110–116.
7. Karatan E., Watnick P. (2009), "Signals, regulatory networks, and materials that

- build and break bacterial biofilms”. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73, 310–347.
8. Sauer K. (2003), “The genomics and proteomics of biofilm formation”. *Genom Biol.* 4, 219.
  9. Evans L.V. (2000), “Biofilms: recent advances in their study and control”. Amsterdam, Harwood Academic Publishers.
  10. Donlan R.M. (2001), “Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process”. *Clin Infect Dis.* 33, 1387–1392.
  11. Ahmer B.M. (2004), “Cell-to cell signaling in *Eschericia coli* and *Salmonella enterica*” *Mol. Microbiol.* 52, 933–945.
  12. Miller M.B., Bassler B.L. (2001), “Quorum sensing in bacteria”. *Annu Rev Microbiol.* 55, 165–99.
  13. Olson, M. E., Ceri, H., Morck, D. W., Buret, A. G., Read, R. R. (2002), “Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics”. *Can J Vet Res.* 66, 86–92.
  14. Sanchez-Vizueté P., Orgaz B., Aymerich S., Le Coq D., Briandet R. (2015), “Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms”. *Front. Microbiol.* 6, 705.
  15. Chillaci D., Vitale M. (2012), “Biofilm Related to Animal Health, Zoonosis and Food Transmitted Diseases: Alternative Targets for Antimicrobial Strategy?” *J Microbial Biochem Technol.* 4, 7-10.
  16. Correge I., Fourchon P., Le Brun T., Berthelot N. (2012), “Biosecurity and hygiene in pig farms: current status and impact on technical and economic performances”. *Journées Recherche Porcine, France.* 44, 101-102.
  17. Cameron R.D.A. (2000), “A review of the industrialisation of pig production worldwide with particular reference to asia”. *Animal Health and Area-wide Integration.*
  18. Chavant P., Gaillard-Martinie B., Talon R., Hebraud M., Bernardi T. (2007), “A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria”. *J. Microbiol. Methods,* 68, 605-612.
  19. Azeredo J., Azevedo N.F., Briandet R., Cerca N., Coenye T., Costa A.R., Desvaux M., Di Bonaventura G., Hébraud M., Jaglic Z., Kačániová M., Knöchel S., Lourenço A., Mergulhão F., Meyer R.L., Nychas G., Simões M., Tresse O., Sternberg C. (2017), “Critical review on biofilm methods”. *Crit Rev Microbiol.* 43, 313-351.