

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2021 00557

(22) Data de depozit: 16/09/2021

(41) Data publicării cererii:
28/02/2022 BOPI nr. 2/2022

(71) Solicitant:

• UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE
ȘI MEDICINĂ VETERINARĂ A BANATULUI
"REGELE MIHAI I AL ROMÂNIEI" - DIN
TIMIȘOARA, CALEA ARADULUI NR. 119,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE
URGENȚĂ PIUS BRÎNZEU TIMIȘOARA -
CENTRUL ONCOGEN,
BD. LIVIU REBREANU, NR. 156,
TIMIȘOARA, TM, RO

(72) Inventatori:

• HUȚU IOAN, STR. GH. LAZĂR, NR. 34,
ET. VIII, AP. 69, TIMIȘOARA, TM, RO;
• PANAITESCU CARMEN,
BD. TAKE IONESCU, NR. 41, AP. 1,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• TĂNASIE GABRIELA, STR. MUNTENIEI,
BL. C30, AP. 2, TIMIȘOARA, TM, RO;

• GAȘPAR CRISTINA MIRABELA,
STR. CORNET, BL. 67, SC. A, ET. 2, AP. 8,
LUGOJ, TM, RO;
• ZAMBORI CSILLA,
STR. DIACONU CORESI, NR. 44B, SC. B,
ET. 4, AP. 9, TIMIȘOARA, TM, RO;
• TATU CARMEN SOFICA, STR. SOMEȘ,
NR. 5, TIMIȘOARA, TM, RO;
• ANGHIEL SIMONA SANDA,
STR. MARTIR VASILE BALMUȘ, NR. 32-44,
SC. C, AP. 8, TIMIȘOARA, TM, RO;
• GAVRILIUC OANA-ISABELLA,
STR. MARTIR IOAN MERIUȚAC, BL. B27,
SC. A, AP. 3, TIMIȘOARA, TM, RO;
• PĂUNESCU VIRGIL,
STR. AUGUST TREBONIU LAURIAN, NR. 7,
AP. 2, TIMIȘOARA, TM, RO

(74) Mandatar:

CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ TUDOR ICLĂNZAN,
PIAȚA VICTORIEI NR. 5, SC. D, AP. 2,
TIMIȘOARA, TM

(54) **CASETĂ MICROBIOLOGICĂ DE ASIGURARE
A MICROCLIMATULUI PENTRU CREȘTEREA
ȘI DEZVOLTAREA BIOFILMELOR BACTERIENE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o casetă microbiologică care asigură microclimatul pentru creșterea și dezvoltarea bacteriilor producătoare de biofilm în diferite incubatoare sau termostate, caseta având aplicabilitate în domeniul medicinei umane și veterinare, al microbiologiei și al igienei. Caseta microbiologică conform invenției este constituită din două corpuri (1 și 2) cave, de preferință de forma unor cutii paralelipipedice asamblate împreună prin clipsare, având poziționat între ele un grătar (3), prevăzut perimetral cu o garnitură (10) siliconică, realizat din material plastic sau metalic autoclavabile la temperatura de 120°C, care delimitează două spații: un spațiu superior în care se amplasează microplăcile (11) cu mediile de cultură și bacteriile care este izolată de exterior printr-o fereastră prevăzută cu filtrul (4), corpul (1) fiind prevăzut cu o gaură (7) amplasată lateral cu garnitură, în care este amplasat un termometru (5) uscat care controlează temperatura mediului din casetă, și un spațiu inferior care conține o cantitate (9) de apă suficientă pentru asigurarea umidității și inerției termice a parametrilor de

microclimat necesari creșterii și dezvoltării corecte a biofilmelor bacteriene, temperatura apei (9) fiind măsurată cu ajutorul unui termometru (6) umed cu fitil amplasat lateral pe corpul (2) printr-o gaură (7) prevăzută cu garnitură.

Revendicări: 5

Figuri: 3

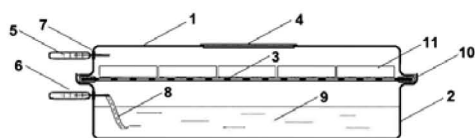


Fig. 1

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art. 32 din Legea nr. 64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art. 23 alin. (1) - (3).



17

CASETĂ MICROBIOLOGICĂ DE ASIGURARE A MICROCLIMATULUI PENTRU CREȘTEREA ȘI DEZVOLTAREA BIOFILMELOR BACTERIENE

Invenția se referă la un dispozitiv simplu de asigurare a microclimatului pentru creșterea bacteriilor producătoare de biofilm în diferite incubatoare sau termostate. Domeniul de aplicabilitate specific este cel al medicinei umane și veterinare, microbiologiei și igienei.

Biofilmele sunt populații/comunități bacteriene care produc o matrice extracelulară, prin intermediul căreia se atașează la diferite suprafețe (*Donlan 2012*). Acestea generează numeroase probleme atât în sistemul medical („device-related infections”), cât și în alte sectoare de activitate (industria alimentară, sistemele de distribuție a apei potabile etc. - *Fux 2005, Imre 2020, Flemming 2002*).

Bacteriile producătoare de biofilm sunt răspunzătoare de majoritatea infecțiilor nosocomiale și recurente. Biofilmul, constituit dintr-o matrice aderentă exopolizaharidică, este principalul factor de virulență care stă la baza acestor infecții. Atașarea bacteriilor la suprafețe biotice (celulele gazdei) sau abiotice (instrumentar, aparatură medicală) constituie prima etapă în formarea biofilmului, urmată de agregare, prin intima atașare a celulelor bacteriene una de cealaltă. Agregarea continuă pe măsură ce biofilmul se maturează. Această etapă este urmată de dispersie (inițiată în anumite condiții, precum prezența modulinelor fenol-solubile), moment în care celulele bacteriene sesile revin la forma planctonică. În forma sesilă, înglobate în biofilm, bacteriile sunt mult mai rezistente la agenți antimicrobieni decât în forma planctonică (*Kirmusaoğlu 2019*).

De-a lungul timpului, au fost dezvoltate numeroase modele *in vitro* pentru studiul formării și dezvoltării biofilmelor bacteriene (*McLean 2004*). În mod



curent, pentru identificarea fenotipică a bacteriilor producătoare de biofilm, sunt utilizate două metode: însămânțarea pe medii de cultură ce au în compoziție colorantul roșu de Congo (*Freeman 1989*) și tehnica în plăci de microtitrare (*Christensen 1985*). În timp ce prima metodă permite identificarea preponderent a stafilococilor producători de biofilm, cea de-a doua se adresează oricărei specii bacteriene de interes (*Flemming 2002*).

Tehnica în plăci de microtitrare a înlocuit cu succes prima metodă de evaluare macroscopică a biofilmelor bacteriene, care presupunea utilizarea eprubetelor din plastic (*De Castro Melo 2013*). Această metodă permite evaluarea cantitativă a matricei, împreună cu celulele viabile și neviabile (assay-uri pentru evidențierea biofilmului și biomasei), a celulelor bacteriene viabile (teste de viabilitate) și a compoziției matricei extracelulare (biomasă), pe baza colorațiilor specifice (teste de cuantificare a matricei) (*Peeters 2008*).

Tehnica în plăci de microtitrare cu cristal violet (CV) este o metodă indirectă de cuantificare a biofilmului și biomasei, care se formează pe întreaga suprafață a godeurilor (pe pereți și la bază) (*Christensen 1985, Stepanovic 2000*). Cristalul violet este un colorant bazic, care se atașează la moleculele și polizaharidele cu sarcină electrică negativă din matricea extracelulară, cât și la peretele celulelor bacteriene viabile și neviabile, înglobate în biofilm (*Li 2003, Pitts 2003*). Deși i-au fost aduse modificări de-a lungul timpului, pentru a-i spori acuratețea (*Stepanovic 2000*), această metodă încă prezintă dezavantajul „efectului de margine / marginal”. „Efectul marginal” se traduce prin obținerea în godeurile marginale ale plăcii de microtitrare a unor densități optice mai mari, comparativ cu centrul plăcii. Acest fenomen apare, în primul rând, din cauza faptului că godeurile marginale sunt mai bine ventilate, existând astfel mai mult oxigen care să susțină creșterea bacteriană. Pe de altă parte, atunci când se practică incubarea plăcilor pentru mai mult de 24 de ore, se produce evaporarea lichidului din aceste godeuri marginale, fenomen ce determină atașarea celulelor planctonice la pereții godeurilor și obținerea unor rezultate fals pozitive și



neomogene. Întrucât asupra nivelului de oxigenare din centrul plăcii este greu de intervenit, fără a ridica probleme de contaminare, majoritatea încercărilor de reducere a „efectului de margine” s-au bazat pe asigurarea în placă sau în mediul în care aceasta este incubată a unei umidități relative ridicate, care să minimalizeze evaporarea (Shukla 2017).

Shukla și col. (2017) au reușit obținerea unor rezultate mai omogene prin depunerea în godeurile marginale a cantității maxime de apă distilată sterilă. Deși eficientă, această perfecționare de metodă prezintă dezavantajul reducerii marcante a suprafeței utilizabile a plăcii de microtitrare.

Incubarea în camera climatică, cu asigurarea unei umidități relative de peste 85-90%, constituie o altă încercare de prevenire a evaporării excesive din godeurile marginale (Shukla 2017). Aceste echipamente însă nu sunt un „must have” în orice laborator, pe de-o parte, iar pe de altă parte prezintă dezavantajul unor oscilații mari de temperatură, în scopul menținerii umidității relative la valorile setate. Într-o sinteză recentă a literaturii de specialitate, cu privire la factorii ambientali care influențează formarea biofilmelor bacteriene, Abdallah și col. 2014 subliniază importanța temperaturii, umidității relative, a disponibilității nutrienților, concentrației de oxigen, a pH-ului mediului și a tipului de suprafață pentru formarea biofilmului de către bacteriile patogene, precum *S. aureus* (Abdallah 2014). În ceea ce privește efectele variației de temperatură asupra formării biofilmului în cazul *S. aureus*, acestea rămân incerte, cu discrepanțe între studiile întreprinse în acest sens. Unii autori susțin că, pe suprafața polistirenilui, producția de biofilm-biomasă a fost mai crescută la 37°C, comparativ cu 25°C (Choi 2013, Vazquez-Sanchez 2013). Alții, în schimb, raportează un număr mai crescut de celule viabile aderente la biofilm, pe suprafața oțelului inoxidabil, la 25°C, comparativ cu 37°C (Pagedar 2010). Da Silva Meira și col. (2012) susțin însă că nu există un efect cert al temperaturii de incubare (7 și 28°C) asupra formării de biofilm, în cazul *S. aureus* (Da Silva Meira 2012).



Este cunoscută invenția US20060166358A1 care prezintă o modalitate de incubare pentru microorganisme pentru a forma un biofilm în godeurile unor plăci prin asigurarea curgerii unui flux de mediu de creștere și prin modificarea repetată a direcției fluxului de lichid și un test realizat din biofilmul rezultat. Microorganismele sunt incubate pentru a forma un biofilm pe plăci cu godeuri dispuse în rânduri, fiecare rând cu mai multe godeuri, asigurând în același timp un flux de mediu lichid de creștere pe fiecare rând de godeuri și o analiză făcută din biofilmul rezultat. Sensibilitatea biofilmului la preparatul antimicrobian poate fi determinată prin tratarea rândurilor de godeuri cu reactiv antimicrobian înainte de efectuarea testului, prin tratarea fiecărui rând de godeuri cu un preparat antimicrobian diferit și a fiecărui godeu de pe rând cu o concentrație diferită de preparat antimicrobian.

Este cunoscută invenția WO2012024897A1 care oferă o metodă de preparare a unui biofilm, care cuprinde: inocularea unei probe de bacterii sursă pe un substrat, prin picurare directă a probei de bacterii sursă pe substrat și cultivarea probei de bacterii sursă într-un flux de mediu de cultură non-ciclic pentru a forma un biofilm pe substrat. Invenția oferă, de asemenea, un dispozitiv pentru formarea unui biofilm și utilizări ale biofilmului în testarea și screening-ul preparatelor antimicrobiene. Dispozitivul și metoda prezentei invenții economisesc timp pentru creșterea culturii, diminuează contaminarea, astfel încât poate fi utilizată pentru a se produce biofilme fără a fi nevoie de mediu anaerob sau de ajustarea pH-ului în mediul de cultură.

În invenția WO2016076842A1 – model *in vitro* de biofilm oral în spațiile interdentare și utilizarea acestuia este dezvăluit un model de biofilm care include: un suport și o multitudine de perechi de substrat atașate la un suport, în care un biofilm oral se formează pe perechile de substrat, în care perechile de



substrat includ fiecare un prim element și un al doilea element și în care primul element și al doilea element al fiecărei perechi de substrat sunt dispuse astfel încât să formeze un spațiu între cele două elemente. Sunt, de asemenea, furnizate metode pentru evaluarea formării biofilmelor orale, utilizând modelul de biofilm oral *in vitro* și metode pentru testarea agenților, cum ar fi compozițiile orale, privind reducerea biofilmului utilizând model de biofilm oral.

Exemplele prezentate în stadiul tehnicii asigură dezvoltarea diferitelor tipuri de biofilme, dar nu asigură condițiile de unitate microbiologică și nici controlul umidității în micro-mediul unității microbiologice și sunt mijloace tehnice destul de complexe și costisitoare.

Problema tehnică a invenției este realizarea unui produs de tipul unei casete care se constituie ca o unitate microbiologică care asigură condiții propice (temperatură, umiditate și presiune a aerului) de creștere și dezvoltare, fără contaminarea biofilmelor bacteriene.

Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene ce conține niște plăci cu bacterii într-un spațiu cu microclimat controlat este constituită din niște corpuri cave, de preferință de formă paralelipipedică, asamblate împreună prin clipsare pe garnitura unui grătar. Grătarul delimitează două spații – unul superior, în care are loc amplasarea plăcilor cu medii și bacterii pe durata incubăției și care este izolat de mediul exterior prin intermediul unei ferestre cu filtru și un spațiu inferior în care se dispune o cantitate de apă suficientă pentru asigurarea umidității și inerției termice în scopul menținerii parametrilor de microclimat necesari creșterii și dezvoltării corecte a biofilmelor bacteriene. În spațiul superior temperatura mediului din casetă este măsurată printr-un termometru



uscat, amplasat lateral pe corp printr-o gaură cu o garnitură, iar în spațiul inferior temperatura apei este măsurată printr-un termometru umed cu fitil, amplasat lateral pe corp printr-o gaură prevăzută cu o garnitură.

Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creștere și dezvoltare a biofilmelor bacteriene are un grătar prin care se delimitează cele două spații ale corpurilor superior și inferior. Acesta asigură comunicarea între ele, fiind realizat din material plastic autoclavabil sau metalic prevăzut perimetral cu o garnitură care permite închiderea etanșă a corpurilor superior și inferior ale casetei microbiologice.

Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene conform invenției prezintă următoarele avantaje:

- permite crearea unor unități microbiologice independente, diminuând riscul de contaminare a probelor (bacterii diferite) care se află concomitent în echipamentul de incubare / termostat;
- îmbunătățește microclimatul în ceea ce privește variațiile de temperatură care pot apărea la momentul deschiderii incubatorului / termostatului ca urmare a creării unui micro-mediu și a inerției termice a apei din rezervor;
- menține umiditatea la nivel constant pe toată durata formării biofilmului bacterian;
- permite creșterea și dezvoltarea bacteriilor în condiții de aerobioză / anaerobioză (dacă filtrul se înlocuiește cu o membrană etanșă).

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției în legătură cu figurile care reprezintă:

Fig.1. Schema casetei ce definește unitatea microbiologică pentru creșterea biofilmelor bacteriene.

Fig.2. Schema grătarului de separare a corpurilor casetei.

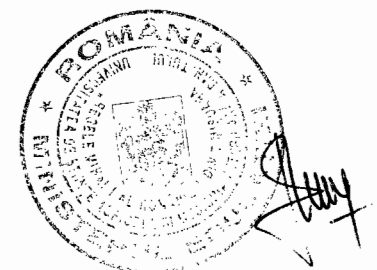


Fig.3. Schema filtrului tip sandwich.

Fig.4. Schema de ansamblu, de reprezentare desfășurată a elementelor componente ale ferestrei de ventilație.

Invenția de față are rolul de a asigura eficient umiditatea și temperatura necesare creșterii bacteriilor în mediul de cultură adecvat, evitând contaminările care pot surveni în cadrul incubatoarelor/termostatelor.

Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene (fig.1) este constituită dintr-un set de două corpuri de formă cavă, unul superior 1 și unul inferior 2, care se închid etanș unul față de celălalt prin clipsare pe un grătar 3 prevăzut perimetral cu o garnitură siliconică 10 (Fig 2). Caseta, ca unitate microbiologică, în care corpul superior este delimitat de corpul inferior de grătarul 3 formează două camere, una superioară, în care sunt amplasate plăcuțele cu godeuri în care se află mediile de cultură, mediile de control și bacteriile formatoare de biofilm și una inferioară, în care se află apă în cantitate suficientă pentru menținerea umidității în unitatea microbiologică și pentru a asigura o inerție termică în casetă.

Controlul temperaturii și umidității se realizează prin intermediul a două termometre. Termometrul uscat 5 este introdus printr-un orificiu prevăzut cu o garnitură siliconică 7 în camera superioară, în care sunt amplasate plăcuțele cu medii de cultură și bacterii, iar termometrul umed este introdus printr-un orificiu prevăzut cu o garnitură siliconică în camera inferioară, în care se află apă pentru menținerea umidității; senzorul termometrului este umectat de un fitil care rămâne în contact cu apa din corpul inferior (rezervorul unității microbiologice). Stabilirea valorii umidității se poate face simplu, cu ajutorul unei diagrame care consideră temperaturile înregistrate la termometrul uscat și la cel umed. Pentru asigurarea funcțiilor de barieră biologică și pentru întreținerea mediului aerob se utilizează filtrul 4, cu o suprafață de minimum 5% din aria feței superioare a



casetei, dispus în sandwich între două grătare pe corpul superior al casetei (Fig.3).

Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene este constituită, de preferință, din materiale transparente și autoclavabile și are două corpuri închise ermetic, dar care beneficiază de aer prin intermediul unor guri de aerisire prevăzute cu filtre. Cele două corpuri ale cutiei sunt asamblate prin strângere pe o garnitură sub forma unei unități microbiologice constituite din:

- un corp superior, de regulă paralelipipedic (cu lungime și lățime adecvate dimensiunii și numărului plăcilor introduse – de preferat multiplu de L și l al microplăcii utilizate și h de cel puțin de trei ori înălțimea microplăcii), care formează o cameră, în care pot fi amplasate diferite tipuri de plăcuțe în care se află mediile și bacteriile utilizate pentru formarea biofilmului care în partea superioară are prevăzută o gaură acoperită de un filtru și, în lateral, un orificiu prevăzut cu o garnitură pentru termometrul uscat;

- un grătar din plastic autoclavabil sau metalic care permite separarea camerei corpului superior de camera corpului inferior (rezervorul de apă), prevăzut perimetral cu o garnitură care permite închiderea etanșă a celor două corpuri ale unității microbiologice - deasupra grătarului sunt amplasate într-un singur strat unul sau mai multe rânduri (dependent de dimensiunile unității microbiologice) de microplăci, recomandat cu aceleași bacterii;

- un corp inferior, de regulă paralelipipedic și de aceeași formă cu corpul superior, care se constituie în rezervorul de apă al unității microbiologice prin care se asigură umiditatea și inerția termică necesare dezvoltării filmului bacterian care în partea superioară are un orificiu prevăzut cu o garnitură pentru termometrul umed;

- un filtru fixat pe partea superioară a corpului superior printr-un ansamblu de tip sandwich format între un element superior discontinuu 401,



hârtia de filtru 402, locașul pentru filtru al corpului superior 403 care se formează odată cu introducerea unor piciorușe 405 prin orificiile filtrului (404) în găurile prevăzute la nivelul corpului superior 406 și glisarea piesei 401 cu filtrul 402 peste locașul 403, până când capul cuielor 405 fixează elementele într-un ansamblu de tip sandwich;

- un termometru uscat care se atașează camerei superioare;
- un termometru umed prevăzut cu un fitil care ajunge în rezervorul corpului inferior (rezervorul unității microbiologice).

Spre exemplificare, rezultatele obținute prin creșterea și formarea de biofilm în primele 36 ore de către o tulpină bacteriană *S. aureus* supusă incubației în caseta microbiologică (unitatea microbiologică - UM), în termostat (T), dar cu eliminarea influențelor marginale (*edge effect*= acronim EE) și camera climatică (CC) oferă densități optice (măsurate cu ajutorul echipamentului TECAN NanoQuant Microplate®) care susțin avantajele utilizării invenției. Analiza statistică (*ANOVA - one way between subjects*) rulată după variabila independentă - tipul incubației UM, T, EE și CC - și densitatea optică măsurată după primele 36 ore, ca variabilă dependentă, relevă importanța tipului incubației - $F(3, 236) = 140,82$ la $p = 0,000$. Testul *Tukey* subliniază faptul că densitatea optică în UM ($1,17 \pm 0,33$) este mai mare decât densitățile optice din T ($0,57 \pm 0,21$ la $p = 0,000$), CC ($0,45 \pm 0,10$ la $p = 0,000$) și EE ($1,00 \pm 0,21$ la $p = 0,018$).

Aceeași analiză statistică (*ANOVA - one way between subjects*) efectuată după 72 ore relevă importanța tipului incubației - $F(3, 236) = 358,82$ la $p = 0,000$. Testul *Tukey* subliniază faptul că densitatea optică la 72 ore în UM ($0,28 \pm 0,24$) este mai mare decât densitățile optice din T ($1,33 \pm 0,38$ la $p = 0,000$), CC ($0,45 \pm 0,04$ la $p = 0,000$) și EE ($1,26 \pm 0,22$ la $p = 0,000$).

Analiza statistică ANOVA cu măsurători repetate (*AKA within-subjects effects*) după 36, 48 și 72 ore de incubație, efectuată după tipul incubației, ca



variabilă independentă și densitățile optice, ca variabilă dependentă, au confirmat diferențele semnificative ale densităților optice generate de tipul incubației (CC, T, EE și UM) - $F(1.831, 432.225) = 197.629$, la $p = 0,000$.

Experimentele exemplificate permit rejecția ipotezei nule care susține că nu sunt diferențe semnificative în densitatea optică ca urmare a tipului de incubație. Conform rezultatelor obținute, creșterea cea mai bună (exprimată prin densitatea optică cea mai mare) a avut loc în unitatea microbiologică de producere a biofilmului bacterian (UM).

Sistemul conform invenției poate fi utilizat pentru orice tip de bacterie, orice tip de plăcuțe și dispozitive de producere a biofilmului bacterian și permite utilizarea concomitentă a incubatorului/termostatului cu diferite tulpini bacteriene, fiecare în unitatea microbiologică proprie, facilitând formarea biofilmului bacterian în condiții de umiditate constantă și cu variații minime de temperatură. Sistemul conform invenției este recomandat în special pentru studiul rezistenței la preparate antimicrobiene al diferitelor tulpini bacteriene producătoare de biofilme.

Bibliografie:

1. Donlan RM, Costerton JW: Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15:167–193;
2. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P: Survival strategies of infectious biofilms. Trends Microbiol 2005; 13:34–40; Imre K, Herman V, Morar A: Scientific Achievements in the Study of the Occurrence and Antimicrobial Susceptibility Profile of Major Foodborne Pathogenic Bacteria in Foods and Food Processing Environments in Romania: Review of the Last Decade. BioMed Research International 2020; Flemming HC: Biofouling in water systems — cases, causes and countermeasures. Appl Microbiol Biotechnol 2002; 59:629–640



✕

3. Kırmusaoglu, Sahra. (2019). The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. 10.5772/intechopen.84411.
4. McLean RJC, Bates CL, Barnes MB, McGowin CL, Aron GM 2004: Methods of studying biofilms. Microbial Biofilms. ASM Press.
5. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT: New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J Clin Pathol 1989; 42:872-874.
6. Christensen GD, Simpsonv WA, Yonger JJ, Baddor LM, Barrett FF, Melton DM, Beachey EH: Adherence of coagulase-negative Staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of Staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol 1985; 22:996-1006;
7. de Castro Melo P, Ferreira LM, Filho AN, Zafalon LF, Vicente HI, de Souza V: Comparison of methods for the detection of biofilm formation by Staphylococcus aureus isolated from bovine subclinical mastitis. Braz J Microbiol 2013; 44(1):119-24. doi: 10.1590/S1517-83822013005000031;
8. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T: Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods 2008; 72(2):157-65. doi: 10.1016/j.mimet.2007.11.010;
9. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M: A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 2000; 40:175–179.
10. Li X, Yan Z, Xu J: Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of Candida albicans. Microbiology 2003; 149:353–362.



11. Pitts B, Hamilton MA, Zelter N, Stewart PS: A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *J Microbiol Methods* 2003; 54:269–276.
12. Shukla S, Toleti SR. An Improved Crystal Violet Assay for Biofilm Quantification in 96-Well Micro-Titre Plate. 2017; 10.1101/100214
13. Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D. et al: Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Arch Microbiol* 2014; 196:453–472.
<https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
14. Choi N-Y, Kim B-R, Bae Y-M, Lee S-Y: Biofilm formation, attachment, and cell hydrophobicity of foodborne pathogens under varied environmental conditions. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2013; 56:207–220. doi:10.1007/s13765-012-3253-4
15. Vazquez-Sanchez D, Habimana O, Holck A: Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural *Staphylococcus aureus* isolates. *Curr Microbiol* 2013; 66:110–121. doi:10.1007/s00284-012-0247-8
16. Pagedar A, Singh J, Batish VK. Surface hydrophobicity, nutritional contents affect *Staphylococcus aureus* biofilms and temperature influences its survival in preformed biofilms. *J Basic Microbiol.* 2010 Dec;50 Suppl 1:S98-106. doi: 10.1002/jobm.201000034. PMID: 20586075.
17. da Silva Meira QG, de Medeiros Barbosa I, Alves Aguiar Athayde AJ, de Siqueira-Júnior JP, de Souza EL: Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control* 2012; 25:469–475. doi:10.1016/j.foodcont.2011.11.030



[Handwritten signature]

REVENDICĂRI

1. Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene ce conține niște plăci cu bacterii (11) într-un spațiu cu microclimat controlat **caracterizată prin aceea că** este constituită din niște corpuri (1 și 2) de cave, de preferință de forma unor cutii paralelipipedice asamblate împreună prin clipsare, un grătar (3) prin care se delimitează două spații – unul superior, în care are loc amplasarea microplăcilor cu medii de cultură și bacterii (11) pe durata incubației și care este izolată față de mediul incubatorului prin intermediul unei ferestre cu filtru (4) și un spațiu inferior, în care se dispune o cantitate de apă (9) suficientă pentru asigurarea umidității și inerției termice în menținerea parametrilor de microclimat necesari creșterii și dezvoltării corecte a biofilmelor bacteriene, în spațiul superior temperatura mediului din casetă fiind controlată printr-un termometru uscat (5) amplasat lateral pe corpul (1) printr-o gaură cu garnitură (7), iar în spațiul inferior temperatura apei (9) fiind măsurată printr-un termometru umed (6) cu fitil, amplasat lateral pe corpul (2) printr-o gaură cu garnitură (7);

2. Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** grătarul (3) prin care se asigură comunicarea dar și delimitarea celor două spații ale corpurilor (1 și 2) este realizat din material plastic autoclavabil sau metalic și este prevăzut perimetral cu o garnitură (10) care permite închiderea etanșă a corpurilor (1 și 2) casetei microbiologice;

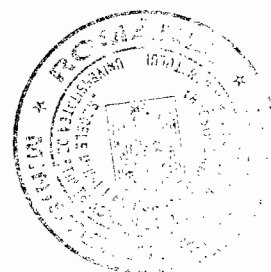
3. Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** fereastra cu filtru (4) amplasată pe partea superioară a corpului (1) este constituită ca un ansamblu de tip sandwich în care o ramă superioară (405),



formată între un element superior discontinuu (401), o hârtie de filtru (402), un locaş pentru filtru (403) al corpului superior (1) se formează odată cu introducerea unor piciorușe (405) prin orificiile unui filtru (404) în găurile prevăzute la nivelul corpului superior (1) și glisarea elementului superior discontinuu (401) cu hârtia de filtru (402) peste locaş (403), până când capul piciorușelor (405) strânge și fixează elementele ansamblului sandwich; filtrul (402) asigură condițiile de aerobioză și contribuie la diminuarea riscului de contaminare a plăcilor din unitatea microbiologică.

4. Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** la nivelul celor două corpuri (1 și 2) se permite introducerea a câte unui termometru (5 și 6), unul uscat în corpul superior (1) și unul umezit prin intermediul unui fitil, în corpul inferior (2), pentru urmărirea parametrului temperatură și calcularea parametrului umiditate în baza unei diagrame care utilizează temperaturile de la cele două termometre.

5. Caseta microbiologică de asigurare a microclimatului pentru creșterea și dezvoltarea biofilmelor bacteriene conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** întreg ansamblul este alcătuit din elemente componente autoclavabile la temperatura de 120 grade Celsius pentru cel puțin 30 de minute.



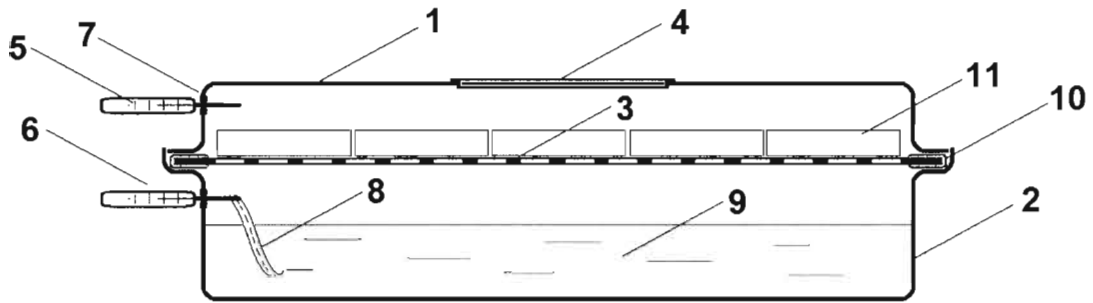


Fig 1.

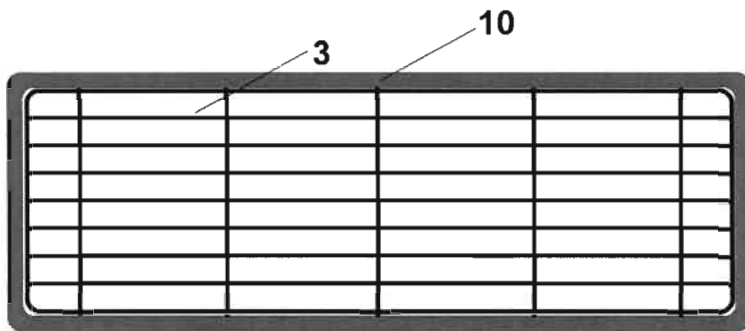


Fig 2.



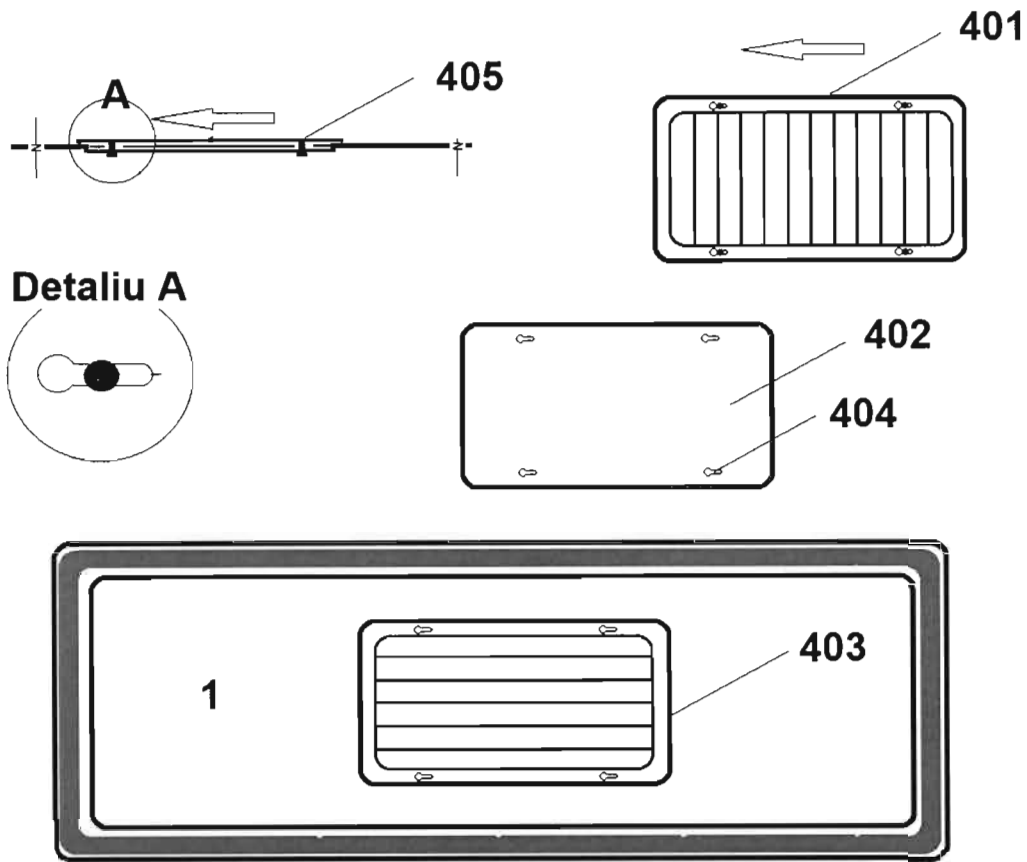


Fig 3.

F



A handwritten signature in black ink, located to the right of the official seal.