

Received: 29.11.2018
Accepted: 22.03.2019
Published: 26.08.2019

Biofilm i metody jego eradykacji

Biofilm and methods of its eradication

Wojciech Szlauer¹, Ewa Obłąk¹, Emil Paluch¹, Katarzyna Baldy-Chudzik²

¹ Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław, Polska

² Katedra Mikrobiologii i Genetyki, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, Zielona Góra, Polska

Streszczenie

Mikroorganizmy występują w środowisku naturalnym w postaci planktonicznej lub tworzą biofilmy, czyli zbiorowiska komórek otoczonych zewnątrzkomórkową macierzą. Możliwe jest to dzięki zjawisku quorum sensing, czyli zdolności drobnoustrojów do szacowania własnego zagęszczenia i zmiany ekspresji genów w odpowiedzi na nie. Wewnątrz takiej struktury mikroorganizmy są chronione przed szkodliwymi warunkami środowiska, zmienia się także ich profil metaboliczny i poziom ekspresji poszczególnych genów, co zwiększa patogenność organizmów zasocjowanych w postaci biofilmu. Są bardzo dużym zagrożeniem dla pacjentów szpitalnych, gdyż zdolne są do zasiedlania powierzchni abiotycznych, takich jak cewniki i endoprotezy i mogą być przyczyną infekcji.

Dotychczasowe metody walki z drobnoustrojami za pomocą antybiotyków i fungicydów tracą skuteczność, zarówno z powodu rosnącej lekooporności szczepów istotnych klinicznie, ale także samej właściwości biofilmu. Dlatego konieczne są poszukiwania nowych i skutecznych metod (fizycznych, chemicznych i biologicznych) eradykacji biofilmów.

Biofilm • Quorum sensing • *Candida albicans* • *Pseudomonas aeruginosa*

Słowa kluczowe:

Summary

Microorganisms occur in the natural environment in the form of planktonic or create biofilms, i.e. communities of cells surrounded by the extracellular matrix. This is possible due to the phenomenon of quorum sensing, i.e. the ability of microorganisms to estimate their own density and change the expression of genes in response to them. Within such a structure, microorganisms are protected against harmful environmental conditions, their metabolic profile and the level of expression of individual genes are also changed, which leads to an increase in the pathogenicity of organisms associated in the form of biofilms. They pose a huge threat to hospital patients because they are capable of residing abiotic surfaces, such as catheters and endoprostheses, and can cause infection.

The current methods of combating microbes with antibiotics and fungicides lose their effectiveness, both due to the increasing drug resistance of clinically relevant strains, but also to the very properties of biofilms. This determines the need to search for new and effective methods (physical, chemical and biological) to eradicate biofilms.

biofilm • Quorum sensing • *Candida albicans* • *Pseudomonas aeruginosa*

Keywords:

GICID	01.3001.0013.1605
DOI:	10.5604/01.3001.0013.1605
Word count:	7025
Tables:	3
Figures:	4
References:	103

Adres autorki: dr hab. Ewa Obłąk, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: ewa.oblak.microb@gmail.com

WSTĘP

Biofilm jest strukturą powszechnie występującą w środowisku naturalnym. Tworzy go wielokomórkowa (często niejednorodna pod względem gatunkowym) społeczność o charakterze przestrzennym. Struktura biofilmu nazywana jest również błoną biologiczną. Wytwarzany jest zarówno przez bakterie, jak i grzyby. Mikroorganizmy zasocjowane w formie biofilmu wykazują zwiększoną oporność na czynniki fizyczne i chemiczne, co powoduje występowanie trudnych do zwalczania infekcji. Biofilm może występować na dowolnym typie powierzchni (organicznej lub nieorganicznej), np. tkanki miękkie, powierzchnie zębów, implanty, endoprotezy, cewniki. Przekrój gatunkowy jest zróżnicowany, od jednego do kilku, a nawet kilkunastu różnych gatunków. Struktura ta powstaje nie tylko w obrębie przedstawicieli tych samych królestw, ale dzięki oddziaływaniom między związkami wytwarzanymi przez mikroorganizmy możliwe są tzw. biofilmy międzygatunkowe oraz międzyrodzajowe np. *Streptococcus mutant* oraz *Candida albicans* [40]. Ze względu na zwiększoną oporność bakterii rezydujących w postaci biofilmu, a także jego powszechność, istotnym wydaje się opracowanie i wdrożenie skutecznych, nowoczesnych metod zwalczania tych struktur, w sytuacjach, gdy dotychczasowe sposoby zawodzą.

W artykule omówiono struktury i funkcje biofilmu wytwarzanego przez patogenne szczepy bakterii i grzybów na różnych powierzchniach oraz nowoczesne techniki jego eradykacji.

ZNACZENIE BIOFILMU

Znaczenie biofilmu w medycynie

Biofilm jako wielokomórkowa struktura może być formowany przez wiele drobnoustrojów (baterii i/lub grzybów), zarówno w środowisku zewnętrznym jak i w organizmie człowieka. Wytworzony na różnych powierzchniach abiotycznych i biotycznych, jest trudny w eradykacji, a to jest dużym problemem. Według danych NIH (National Institutes of Health, USA) biofilm jest odpowiedzialny za prawie 80% infekcji wywołanych przez mikroorganizmy oraz za 65% infekcji szpitalnych [68]. Zakażenia te mają ogromny wpływ nie tylko na zdrowie publiczne, ale i na istotny wzrost kosztów leczenia [72].

Dotychczasowe sposoby zwalczania biofilmu tracą na skuteczności w związku ze zjawiskiem wielolekooporności szczepów istotnych klinicznie. Ponadto, sama struktura jak i metabolizm komórek wewnątrz biofilmu utrudniają skuteczne wykorzystanie antybiotykoterapii. Biofilm jest wytwarzany przez komórki drobnoustrojów, aby ochronić przed czynnikami zewnętrznymi. Wewnątrz biofilmu, dzięki macierzy, wytworzone jest stabilne środowisko chroniące częściowo przed: wysychaniem, promieniowaniem UV, szkodliwymi związkami chemicznymi, wahaniami pH i temperatury. Komórki drobnoustrojów, odizolowane od środowiska zewnętrznego, często stają się bardzo odporne na różne środki dezynfekcyjne oraz antybiotyki. Zazwyczaj w wewnętrznej strukturze biofilmu mogą występować swoiste komórki drobnoustrojów, tzw. persister cells - są to komórki żywe, lecz nieaktywne metabolicznie przez określony czas np. pod wpływem presji antybiotyku. Takie komórki, po ustaniu działania czynnika selekcyjnego, znów mogą się stać aktywne i odtworzyć strukturę biofilmu.

Tworzenie się biofilmu umożliwia patogenom kolonizację wielu środowisk oraz przetrwanie trudnych warunków zewnętrznych. Eradykacja biofilmów jest bardzo trudna w praktyce, dlatego ważnym aspektem jest poszukiwanie alternatywnych terapii przeciwbiofilmowych, dających często jedyną szansę na ograniczenie uporczywych zakażeń związanych m.in. z patogenami oportunistycznymi.

O wadze problemu świadczą wysokie nakłady finansowe skierowane na walkę z biofilmem, czego przykładem jest projekt No Mor Film koordynowany przez Unię Europejską [72].

Biofilm jako czynnik zakażeń

Patogenne bakterie oraz grzyby mogą tworzyć biofilm zarówno na powierzchni komórek i tkanek ludzkich, jak i na powierzchniach abiotycznych np. urządzeniach medycznych stosowanych w klinice. Niesie to spore zagrożenie, zwłaszcza w przypadku endoprotez oraz cewników, gdyż ułatwia to drogę patogenom do wnętrza organizmu. Ryzyko wzrasta ze względu na powszechność takich zabiegów oraz wspomnianej wcześniej oporności szczepów patogennych na antybiotyki.

Zakładane cewniki mogą zostać zakażone przez patogeny dzięki ich adhezji do powierzchni abiotycznych, aczkolwiek stopień adhezji zależy od zastosowanych materiałów. Wykazano np., że *Candida albicans* łatwiej ulega adhezji do cewników wykonanych z lateksu lub elastomerów silikonowych, a wykorzystanie poliuretanu lub 100% silikonu znacznie utrudnia przyleganie komórek, w porównaniu do najczęściej stosowanego polichlorku winylu [48].

Założone cewniki, które uległy zakażeniu biofilmem mogą stanowić śmiertelne zagrożenie dla pacjenta. W USA z powodu infekcji wywołanych przez *C. albicans* rokrocznie wskaźnik śmiertelności wynosi około 0,4 na 100 000 osób, co stanowi prawie połowę przypadków śmiertelnych wywołanych przez kandydozy. Na infekcje grzybicze wywoływane głównie przez gatunki z rodzaju *Candida*, *Aspergillus* oraz *Cryptococcus* szczególnie narażeni są pacjenci z niedoborami odporności [79].

Jednym z istotnych czynników zachorowalności i śmiertelności są szpitalne infekcje układu krwionośnego (BSI, bloodstream infections). Jedno z większych badań populacyjnych przeprowadzonych w USA, dostarczyło precyzyjnych danych, obrazujących sytuację infekcji szpitalnych tego kraju. Wykazały, że największym czynnikiem ryzyka były cewniki centralnych naczyń krwionośnych (72% zakażeń), obwodowych naczyń krwionośnych (35% zakażeń), a cewniki w tętnicach około 16% osób spośród 25 000 przypadków; 46% badanych korzystało z cewników moczowych. Infekcje układu krwionośnego w 87% przypadków były jednogatunkowe, najczęściej czynnikiem etiologicznym BSI były Gram-dodatnie bakterie (65%), następnie bakterie Gram-ujemne (25%), a pozostałe przypadki wywoływały grzyby (10%).

Zauważono też częstsze infekcje wywołane przez patogeny odporne na antybiotyki dotychczas skuteczne do ich zwalczania [92].

Wrotami infekcji w ludzkim ciele mogą być nie tylko tkanki o przerwanej ciągłości, jak w przypadku cewników, ale i warstwa nabłonka. Przykładem może być nabłonek przedni rogówki ludzkiego oka oraz infekcje u osób stosujących soczewki kontaktowe. U 20 osób cierpiących na mikrobowe zapalenie rogówki badaniu poddano stosowane przez nich soczewki kontaktowe oraz pojemniki do ich przechowywania. Najczęściej biofilm występował na pojemnikach, bo aż u 17 osób, natomiast do zainfekowania soczewek doszło u 11 osób. Podobnie było z gęstością powstałego biofilmu, który widocznie gęstszy był na powierzchni pojemników. Wykazano również brak istotnej różnicy między obecnością biofilmu, a higieną użytkowania soczewek przez badanych. Spośród izolowanych mikroorganizmów najczęściej oznaczano pałeczki, m.in. *Pseudomonas aeruginosa*, znajdowano także różne drożdżaki i strzępki grzybów, a u 8 pacjentów wykazano obecność pierwotniaka z rodzaju *Acanthamoeba* [34, 103].

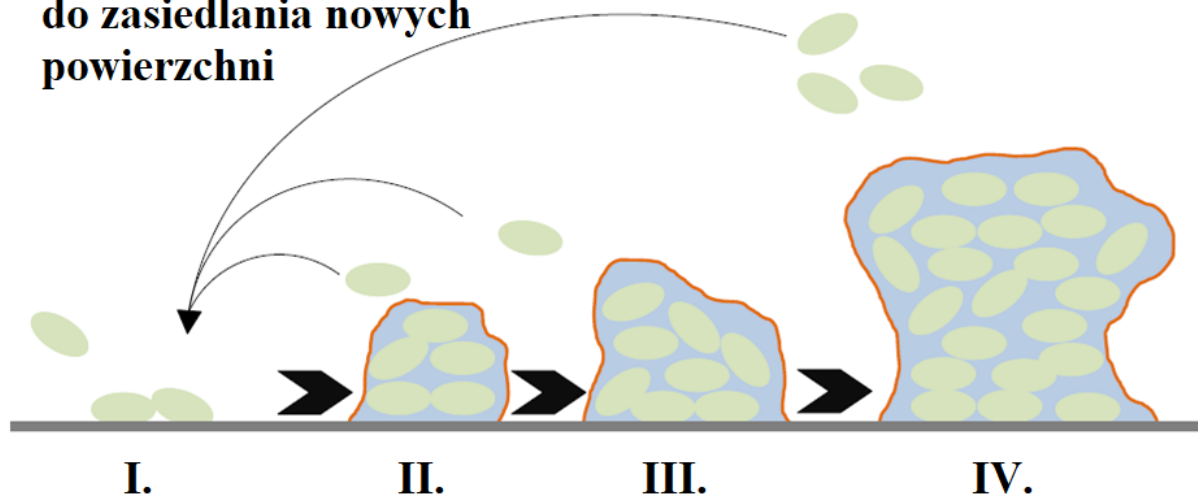
Biofilm może być związany z infekcjami skóry, w tym z infekowaniem miejsc pooperacyjnych czy ran pooperacyjnych. U diabetyków chronicznie owrzodzeniu stopy cukrzycowej najczęściej towarzyszy powstawanie biofilmów mieszanych (z udziałem kilku gatunków mikroorganizmów). Ponadto u diabetyków wykrywano biofilm w blaszkach miażdżycowych tętnic, co jest głównym czynnikiem wpływającym negatywnie na krążenie i postęp choroby. Jednak najczęstszymi chorobami wywołanymi przez biofilm są infekcje jamy ustnej (zapalenie dziąseł, zapalenie przyzębia) oraz próchnica zębów. Choroby jamy ustnej mogą być również związane z etiologią chorób sercowo-naczyniowych, zapaleniem wsierdza, udarem a także ogólnoustrojowymi chorobami zapalnymi (np. reumatoidalnym zapaleniem stawów) [11].

Najlepiej zbadanym przykładem biofilmu tworzonego przez bakterię *E. coli* jest patogeneza chorób układu moczowego. Zdolność do kolonizowania cewki moczowej

Tabela 1. Najczęstsze patogeny spotykane w wybranych czynnikach niedoboru odporności [79]

Patogen	Czynnik niedoboru odporności
<i>Candida</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp.	Uszkodzenie śluzówki
<i>Candida</i> spp. <i>Trichosporon</i> spp. <i>Aspergillus</i> spp. i inne pleśnie	Dysfunkcyjne neutrofile
<i>Cryptococcus</i> spp. Grzybyc endemiczne	Wady komórek pośredniczących w odpowiedzi immunologicznej
<i>Zygomycetes</i> <i>Candida</i> spp.	Zaburzenia metaboliczne
<i>Aspergillus</i> spp. i inne pleśnie Grzybyc endemiczne	Ekspozycja na patogen
<i>Candida</i> spp.	Młody lub podeszły wiek (<1 lub >70)

Komórki planktoniczne zdolne do zasiedlania nowych powierzchni



Ryc. 1. Etapy formowania biofilmu bakterii: I - adhezja odwracalna, II - adhezja nieodwracalna, III - dojrzewanie, IV - dyspersja (wg [49] zmodyfikowano)

wej oraz przetrwania w niesprzyjających warunkach (odporność na strumień moczu, antybiotyki) jest głównym czynnikiem infekcji i zależy od obecności licznych czynników wirulencji u *E. coli* [58].

Zagrożenie niosą ze sobą także ciała obce wewnątrz naszego organizmu. Dzieje się tak w przypadku implantów, np. piersi, około 2–2,5% komplikacji po zabiegu spowodowanych jest przez drobno-ustroje [97]. Głównym czynnikiem etiologicznym jest *Propionibacterium acnes* (57,5% przypadków), *Staphylococcus epidermidis* (41%) oraz *E. coli* (1,5%) [23]. Poza medycyną estetyczną problem dotyka ortopedię, gdyż wstawiane sztuczne protezy stawów wiążą się z ryzykiem infekcji rzędu 0,39% przy wszczepieniu protezy stawu kolanowego oraz 0,97% przy wymianie takiej protezy na nową [98]. Bakterie izolowane z zakażeń poprzeczopowych to koagulazoujemne gronkowce stanowiące 30–43% infekcji oraz *Staphylococcus aureus* – 12–23% infekcji [62].

Wszelkiego rodzaju interwencje chirurgiczne w strukturę kości mogą natomiast prowadzić do zapalenia szpiku kostnego. Najczęstszym źródłem zakażeń jest *S. aureus*, odpowiedzialny za zarówno ostre, jak i przewlekłe infekcje szpiku oraz stawów. Dochodzić do nich może po naruszeniu struktury kości w chwili wstawiania sztucznego stawu, śrubowania złamanej kości lub uzupełnianiu ubytków z użyciem cementu akrylowego. Może to także doprowadzić do infekcji oportunistycznej komensalnymi koagulazoujemnymi gronkowcami skórnymi, z powodu lokalnego osłabienia, będącego wynikiem interwencji lekarza [7].

ETAPY POWSTAWANIA BIOFILMU

Etapy formowania się biofilmu bakteryjnego

Pierwszym etapem powstawania biofilmu bakteryjnego jest adhezja (ryc. 1), początkowo odwracalna, możliwa dzięki obecności adhezyn, fimbrii, curli, receptorów powierzchniowych komórek organizmu gospodarza, a także różnorodnych oddziaływań: hydrofobowych, sił van der Waalsa i innych. Istotną rolę odgrywa także quorum sensing (QS), czyli zjawisko komunikowania się mikroorganizmów za pomocą cząstek sygnałowych – w charakterze autoinduktorów. Wykrycie ich przez receptory komórkowe wpływa na ekspresję genów, aktywując te, które niezbędne są przy formowaniu struktury biofilmu, a wyciszając zbędne, jak np. obecność rzęsek [76]. Warunkiem niezbędnym do adhezji jest także kondycjonowanie powierzchni, czyli pokrycie jej warstwą substratów stanowiącą dla mikroorganizmów pożywkę, mogą to być białka, glikoproteiny, lipidy lub inne biomolekuły [17].

Etap drugi rozpoczyna się po kilku minutach (ryc. 1), gdy adhezja staje się nieodwracalna pod wpływem zwiększenia się siły oddziaływań hydrofobowych dzięki ubytkom wody w przestrzeni między mikroorganizmem a powierzchnią, aktywnej zmiany położenia komórki w taki sposób, aby rejony o większych zdolnościach do adhezji były skierowane w stronę docelowej przestrzeni, a także przez makromolekularne zmiany w obrębie struktur wiążących [43]. W trzecim etapie dojrzewania biofilmu dochodzi do tworzenia się zewnątrzkomórkowej macierzy EPS (extracellular polymeric substances). W jej skład wchodzi białka, kwasy nukleinowe, celulozy, włókna curli (np. u *E. coli*), enzymy, lipidy oraz polisacha-

rydy. Macierz EPS jest rusztowaniem, na którym mogą się osadzać kolejne elementy biofilmu, pozwala także na stworzenie swego rodzaju kanałów i szczelin, przez które odbywa się transport substancji odżywczych, enzymów, produktów metabolicznych oraz cząstek sygnałowych. Ma postać żelu o zawartości wody do 98% [29], co zapewnia wodne środowisko mikroorganizmom, a także spowalnia dyfuzję tlenu, który zostaje wykorzystany przez aeroby zanim dotrze głębiej, umożliwiając rozwój anaerobów w niżej położonych warstwach [20]. Trójwymiarowa struktura zależy od składu gatunkowego, a także chemicznego, np. zmodyfikowany szczep *E. coli* K 12 W3110 wytwarzający celulozę tworzył biofilm o wysokich i długich grzbietach oraz skomplikowanej sieci zmarszczek, podczas gdy ten sam, ale niezmodyfikowany szczep formował kruchą podzieloną na sieć koncentrycznych kopuł strukturę [88].

Do tego etapu komórki przeprowadzają wciąż intensywny podział mitotyczny, który jednak powoli ustaje w kolejnym stadium – w trakcie dojrzewania biofilmu (ryc. 1). Formy planktoniczne mają zdecydowanie krótszy czas generacji, *Pseudomonas aeruginosa* w temperaturze 37°C podwaja liczbę w ciągu około 40 min [99], jednak w postaci biofilmu czas ten wzrasta do 6 lub 9 h, przy czym dla około 10% komórek do ponad 10 h [9, 34].

Dojrzała postać biofilmu składa się z komórek o różnych właściwościach metabolicznych, które różnią się nie tylko na poziomie gatunkowym, ale również w obrębie jednego gatunku – odmienny jest profil genów ulegających ekspresji. Różnica widoczna jest nie tylko w porównaniu do form wolno żyjących, ale także zależna od umiejscowienia wewnątrz struktury. Ekspresja genów u *P. aeruginosa* różni się w zależności od trybu życia bakterii: około 0,5% genów jest aktywowanych, a 0,5% ulega represji w komórkach żyjących w biofilmie. Istotne jest także to, że niektóre z genów w obecności antybiotyku tobramycyny ulegały odmiennej ekspresji – 6 ulegało represji, a 14 aktywacji przy siedmiokrotnie niższym stężeniu leku niż wymagany był dla form planktonicznych, oznacza to, że zmianie ulegać może również czułość niektórych systemów regulatorowych komórek [36].

Rozłożenie komórek w trójwymiarowej strukturze wpływa na lokalne warunki, które mogą się różnić w poszczególnych strefach biofilmu. Wpływ takiego mikrośrodowiska na drobnoustroje jest podstawą istnienia przestrzennej różnicy w poziomie ekspresji genów. Badano poziom produktów genów *acpP*, *aprA* oraz *phzA1* u *P. aeruginosa* w zależności od głębokości poniżej powierzchni biofilmu. Produkt genu *acpP* niezbędny jest do transportu kwasów tłuszczowych, a więc i do syntezy błony komórkowej, natomiast *aprA* oraz *phzA1* regulowane są przez zjawisko QS. Podwyższony poziom ekspresji genów w górnych warstwach wskazuje na większą aktywność metaboliczną komórek tam obecnych, a także najprawdopodobniej na szybsze i częstsze podziały komórkowe niezbędne do procesu dyspersji biofilmu [54].

Ostatnim etapem rozwoju biofilmu jest dyspersja (ryc. 1), polegająca na uwalnianiu się komórek ze struktury biofilmu w celu zasiedlenia nowych środowisk. Drobnoustroje są uwalniane *de facto* w trakcie każdego etapu, na różne sposoby – zarówno pasywne jak i aktywne. Spośród pasywnych wyróżnić można abrazję (łac. *abrasio*, zeskrobywanie), polegającą na ścieraniu się zewnętrznych warstw na skutek sił tarcia cząstek zawieszonych w medium, erozję biofilmu jako wynik ciągłej utraty komórek z powodu przepływu np. wody. Gdy siła tarcia płynu jest zbyt duża oddzieleniu ulec może większy fragment macierzy zewnątrzkomórkowej wraz z zawartymi w niej drobnoustrojami lub cała struktura, wówczas występuje tzw. starcie się biofilmu. Mikroorganizmy mogą zostać także uwolnione z biofilmu, gdy jego struktura zostanie naruszona przez inne organizmy żywiące się biofilmem, takie jak orzęski *Tetrahymena pyriformis* [78, 81].

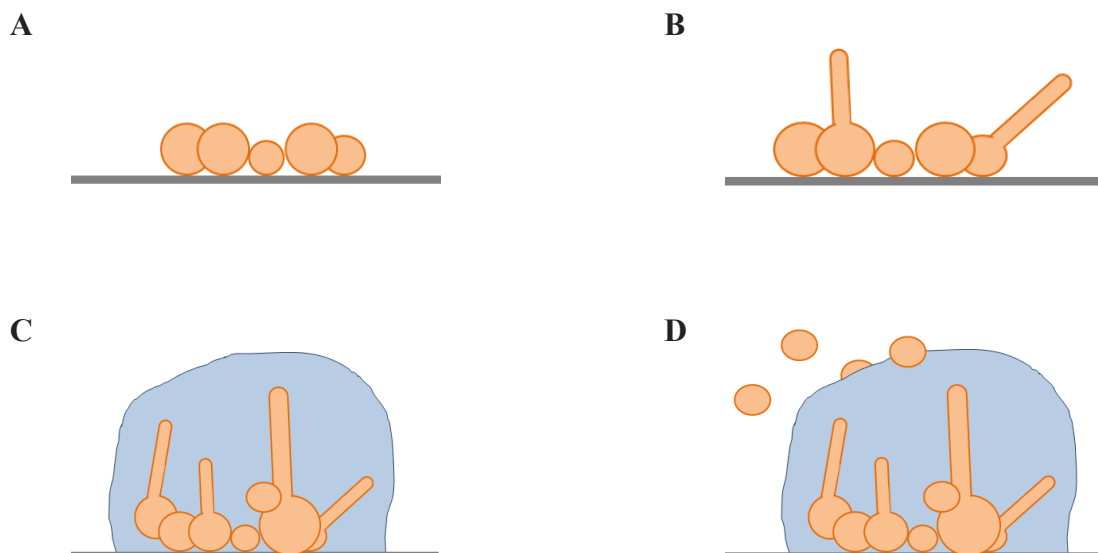
Aktywne sposoby uwalniania się z biofilmu wymagają zazwyczaj obecności enzymów pozwalających rozluźnić sieć macierzy zewnątrzkomórkowej ECM (Extra Cellular Matrix) lub trawiących adhezyny, umożliwiając tym samym uwolnienie się komórek. Jednym z takich enzymów jest celulaza wytwarzana przez *P. putida*, która degraduje celulozę zawartą w macierzy zewnątrzkomórkowej. *P. putida* wytwarza także proteinazę K zdolną do proteolizy adhezyny LapA. Dyspersja taka zachodzi zazwyczaj pod wpływem bodźca ze środowiska, takiego jak np. wzrost stężenia źródła węgla, pojawienie się różnych jonów np. Fe^{2+} lub cząsteczek sygnałowych QS [78].

Powstawanie biofilmu u grzybów jednokomórkowych

Formowanie się biofilmu u grzybów przebiega w pierwszej fazie podobnie jak u bakterii. Przyleganie komórek grzybowych zachodzi dzięki obecności różnorodnych adhezyn, zarówno do powierzchni biologicznych jak i sztucznych (ryc. 2A).

Wzmocniona adhezja komórek wpływa na zapoczątkowanie procesu filamentacji i wytwarzanie komórek o wydłużonym kształcie (ryc. 2B). Rozpoczyna się tzw. faza inicjacji powstania biofilmu. Jest to istotny moment, ponieważ powstające w ten sposób wydłużone formy służą później do wzmocnienia struktury, ułatwiają także adhezję następnym organizmom. Zachodzą u nich częste podziały, bowiem komórki znajdujące się u podstawy stanowią będą punkt zaczepienia całej struktury do powierzchni.

W czasie rozwoju biofilmu u grzybów, podobnie jak u bakterii, następuje wytwarzanie ECM (ryc. 2C). Elementy składowe macierzy zewnątrzkomórkowej to makromolekuły: białka (55%), cukry (25%), lipidy (15%) oraz kwasy nukleinowe (5%) [57, 102]. Macierz spełnia te same funkcje jak dla bakterii ochronne i strukturalne. Zauważalne są także różnice w ekspresji różnych genów u form planktonicznych w porównaniu do osiadłych.



Ryc. 2. Etapy tworzenia biofilmu *C. albicans*: A - adhezja nieodwracalna do powierzchni; B - inicjacja filamentacji; C - dojrzewanie biofilmu; D - dyspersja dojrzałego biofilmu (wg [48] zmodyfikowano)

Zwiększona ekspresja zauważalna jest dla 1599 genów, a zmniejszona dla 636 u *C. albicans* wewnątrz biofilmu [71].

Ostatnim etapem jest dyspersja form kolistych, która pozwala pozyskać nowe siedliska dla mikroorganizmów (ryc. 2D). Jednak, podobnie jak w modelu bakteryjnym, dyspersja zachodzi na każdym etapie powstawania struktury, a nie tylko w dojrzałym biofilmie.

Większe zagęszczenie komórek wewnątrz biofilmu, fizyczna bariera w postaci ECM oraz zmieniony profil ekspresji genów i spowolniony metabolizm wpływają na patogenność szczepów *C. albicans* zwiększając ich oporność na stosowane powszechnie fungicydy. Powstają komórki persister cells, które pozwalają odtworzyć biofilm w chwili, gdy stężenie leków przeciwgrzybiczych spadnie poniżej skutecznego poziomu. Wyjątkowa oporność tych komórek wynika z tego, że ich metabolizm został spowolniony, zahamowana została synteza białek, z wyjątkiem tych niezbędnych do wzrostu, odpowiedzi na czynniki stresowe oraz odpowiedzialnych za wirulencję. Ich poziom nawet wzrósł w porównaniu do siostrzanych komórek w biofilinie [55].

Znaczenie quorum sensing dla rozwoju biofilmu

Mikroorganizmy, zarówno bakterie jak i grzyby, mają zdolność szacowania własnego zagęszczenia w danym środowisku, dzięki zjawisku quorum sensing (QS). Polega ono na wydzielaniu do środowiska autoinduktorów, które są rozpoznawane przez inne drobnoustroje w środowisku. Zjawisko QS może wystąpić zarówno u bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych oraz u grzybów, np. *C. albicans* [35]. Autoinduktory, czyli cząstki sygnałowe to dla bakterii Gram-ujemnych głów-

nie acylowane laktony homoseryny (AHL) [21, 96], dla Gram-dodatnich oligopeptydy [50], a u grzybów *C. albicans* rolę autoinduktora pełni np. farnesol [35].

Autoinduktory mają wpływ na ekspresję genów, mogą działać zarówno jako promotory, jak i inhibitory. Możliwe jest także działanie cząstek sygnałowych między gatunkami, a nawet królestwami, np. AHL *P. aeruginosa* wpływa na *C. albicans*, hamując przejście do postaci strzępkowej [35].

Quorum sensing u bakterii Gram-ujemnych składa się z dwóch czynników regulatorowych: białko regulatorowe (białko R) oraz cząstki autoinduktora (AI). Akumulacja autoinduktora w komórce jest proporcjonalna do zagęszczenia komórek, wzrastając do wartości progowej, po przekroczeniu której następuje wiązanie AI z białkiem R, które indukuje ekspresję genu docelowego (ryc. 3). Białko R składa się z dwóch domen: N-końcowej oddziałującej z AI oraz C-końcowej wiążącej DNA [21, 96].

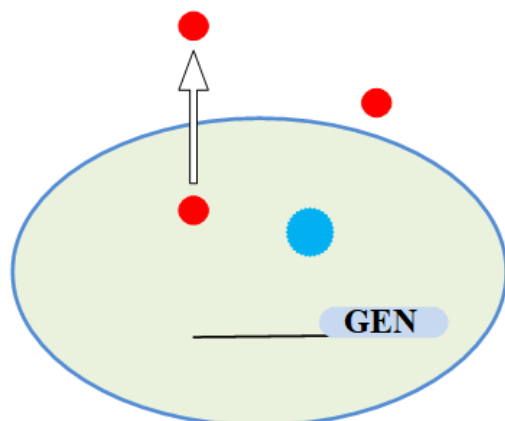
Geny ulegające regulacji przez zjawisko QS mogą odpowiadać za różne cechy fenotypowe, oprócz wspomnianych wcześniej cech niezbędnych przy formowaniu się biofilmu [76], mogą to być np. bioluminescencja u *Vibrio fischeri* [12], wytwarzanie fenazy przez *P. aureofaciens* 30–84 [10], a także tworzenie otoczki i wirulencja u *Erwinia stewartii* [82].

SPOSOBY BADANIA BIOFILMU IN VITRO ORAZ IN VIVO

Metody używane do obserwacji struktury oraz składu biofilmu

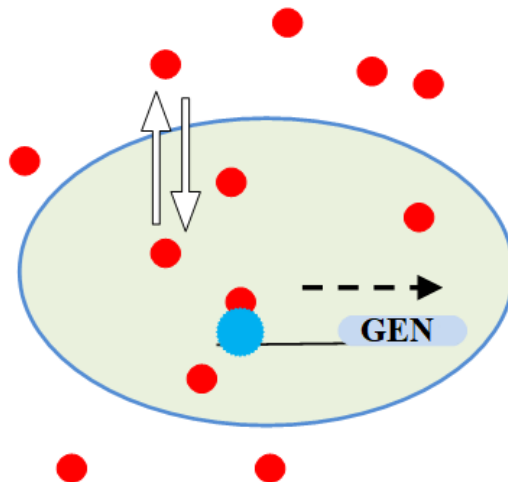
Po raz pierwszy zaobserwowano biofilm za pomocą prostego mikroskopu optycznego. Sposób ten długo

**Niskie zagęszczenie komórek =
niskie stężenie AI**



Brak transkrypcji

**Wysokie zagęszczenie komórek =
wysokie stężenie AI**



Transkrypcja docelowego genu

- **Czynnik transkrypcyjny, białko R**
- **Cząsteczka autoinduktora, AI**

Ryc. 3. Zasada regulacji ekspresji genów zależna od zjawiska quorum sensingu Gram-ujemnych organizmów (wg [21] zmodyfikowano)

był jedynym dostępnym narzędziem badawczym, jednak wraz z rozwojem nauki i wiedzy na temat tych struktur znacznie powiększył liczbę dostępnych metod. Opracowano wiele metod obrazowania struktury, badania procesów w niej zachodzących, metabolizmu komórek oraz składu gatunkowego i chemicznego.

W obrębie samej mikroskopii optycznej nastąpiło wiele zmian, głównie wykorzystanie rodzaju światła. Zaczęto wykorzystywać promieniowanie spoza zakresu widzialnego, z obu jego krańców – podczerwone oraz ultrafioletowe. Do uwidocznienia struktur stosuje się także fluorochromy, które po wzbudzeniu światłem o odpowiedniej dla nich długości same dają barwny obraz w mikroskopie fluorescencyjnym [70].

Wiązką obrazującą w mikroskopie jednak nie musi być promieniowanie elektromagnetyczne, a funkcję tę może pełnić wiązka elektronów, tak jak to się dzieje w mikroskopii elektronowej. Dwa jej rodzaje: transmisyjna i skaningowa dają wgląd w struktury niemożliwe do zobrazowania za pomocą mikroskopii świetlnej. Obrazy przez nie uzyskane są odpowiednio dwu- i trójwymiarowe, przekrój przez preparat i jego powierzchnię [4].

Mikroskopia sił atomowych umożliwia natomiast z dużą precyzją obrazować biofilm, ale jedynie jego powierzchnię. Ostrze dźwigni o grubości od kilku do kilkuset atomów przesuwane jest po powierzchni preparatu, a jej drgania odczytywane są optycznie bądź z wykorzystaniem materiałów piezoelektrycznych, a następnie ukażywane w postaci obrazu na monitorze komputera [44].

Wspomniane wyżej metody obserwacji są jednak ograniczone zazwyczaj do badania powierzchni, należy pamiętać, że biofilm jest skomplikowaną strukturą przestrzenną, składającą się z kanałów, otworów i szczelin. Opracowano kilka narzędzi pozwalających spojrzeć w głąb trójwymiarowej sieci macierzy zewnątrzkomórkowej. Poza wspomnianą wcześniej transmisyjną mikroskopią elektronową, która pozwala zobaczyć dwuwymiarowy przekrój przez wnętrze biofilmu, jedną z tych metod jest obrazowanie z wykorzystaniem rentgenowskiego promieniowania oraz substancji kontrastowej wprowadzanej do wnętrza biofilmu, która przenikając przez sieć kanałów uwidocznia ich topografię [27]. Stosuje się także używany powszechnie w medycynie rezonans magnetyczny, który pozwala uniknąć ingerencji w badaną próbkę, dając jednocześnie szczegółowy jej obraz, dwu- i trójwymiarowy [63].

Poza obserwacją bezpośrednią biofilmu można także zbadać inne jego parametry, takie jak masa. Aby zmierzyć wagę tak drobnych struktur wykorzystuje się mikrowagi kwarcowe lub korzysta z kamertonów kwarcowych. Obie metody polegają na badaniu zmian częstotliwości drgań kryształów kwarcu pod wpływem nagromadzonego biofilmu, które pozwalają na dosyć precyzyjny pomiar jego masy [80].

Spektrofotometria pozwala natomiast zobrazować ogólny poziom rozwoju biofilmu, za pomocą barwników, takich jak np. fiolet krystaliczny lub względną liczbę żywych komórek aktywnych metabolicznie, zdolnych do redukcji soli tetrazolowej lub resazuryny [93].

Najbardziej istotne z punktu widzenia zwalczania biofilmu jest badanie zarówno składu gatunkowego, jak i metabolizmu drobnoustrojów wchodzących w jego skład. Wykorzystuje się do tego zdobycze biologii molekularnej, może to być reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, polymerase chain reaction) pomocna przy jakościowym oznaczaniu populacji biofilmu czy elektroforeza pozwalająca zbadać obecne w nim białka [54]. Do badań wielogatunkowych biofilmów wykorzystuje się metodę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH, fluorescent *in situ* hybridization). Pozwala nie tylko wskazać obecność konkretnego gatunku, ale i określić dystrybucję organizmów danego gatunku w całej objętości biofilmu, a w przypadku korzystania np. z dwóch sond ewentualne współwystępowanie tych dwóch gatunków, co może być pomocne przy określaniu układu przestrzennego struktury [30].

Metody hodowli biofilmu *ex situ*: *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*

Niezbędne do badań patogenów na biofilmie jest wytworzenie go w warunkach laboratoryjnych. Pobranie np. od chorego pacjenta pozwoli jedynie zbadać skład gatunkowy, a niemożliwe będzie badanie innych właściwości mikroorganizmów zasocjowanych w postaci biofilmu, takich jak oporność na antybiotyki czy metabolizm. Potrzebne są zatem metody pozwalające na hodowle biofilmu *ex situ* w laboratorium, co umożliwi wykonanie badań na większych, a co najważniejsze powtarzalnych próbach, umożliwiając zmianę warunków w czasie badania. Istotnym elementem jest stworzenie środowiska jak najbardziej podobnego do tego, które występuje w naturalnym otoczeniu patogenów, niezależnie czy jest to powierzchnia sprzętu medycznego czy tkanek np. ludzkich.

Modele *in vivo*

Najbliższe naturalnym warunkom do rozwoju biofilmu w ciele pacjenta są modele *in vivo*. Wykorzystywanie ludzi do badań nad patogenami jest nieetyczne, dlatego zaczęto korzystać z organizmów modelowych. Do badań biofilmu infekującego poszczególne tkanki ssaków wykorzystuje się głównie szczury i myszy, choć nie tylko

(tab. 2). Spośród naczelnych często wykorzystywany jest makak jawajski, np. do badania chronicznego zapalenia ucha środkowego [51].

Dla medycyny przydatne są również badania nad formowaniem się biofilmu na urządzeniach medycznych zainstalowanych u organizmów modelowych, co pozwala opracować metody ich zabezpieczania przed infekcją, a także obrazuje schemat infekcji w warunkach najbliższych naturalnym. Polega to na wszczępieniu np. modelu protezy do organizmu szczura i zainfekowanie go bakteriami zdolnymi do uformowania biofilmu. Bada się w ten sposób cewniki, endoprotezy, implanty, rozruszniki serc, a także soczewki kontaktowe, śruby i cementy ortopedyczne.

Wykorzystuje się do tego głównie szczury, myszy i króliki, choć czasem także naczelne. Zdarzają się badania nad kolonizacją implantów wykonanych z różnych materiałów na ludziach - zdrowych ochotnikach wyrażających zgodę na zainstalowanie tytanowych szyn wewnątrz jamy ustnej, w okolicy żuchwy. Do zamontowanych szyn przyczepia się dyski wykonane z materiałów stanowiących obiekt badań [51].

Badaniom poddawany jest także biofilm na modelach organizmów niebędących ssakami, co jest wynikiem wielu dyskusji na temat etyki i wątpliwego moralnie stosowania organizmów wyższych do badań nad patogenami (tab. 2). Zaczęto korzystać z organizmów prostszych – od jednokomórkowych orzęsków *Tetrahymena pyriformis* [64], przez rośliny, takie jak lucerna [37], wielokomórkowe nicienie *Caenorhabditis elegans* [61], aż po stawonogi *Drosophila melanogaster* [47] i ryby *Danio rerio* [45].

Modele *in vitro*

Problemy etyczne nie dostarczają modele *in vitro*, które nie wymagają żadnego organizmu żywego do bycia 'gospodarzem' badanego biofilmu. Metody hodowli poza ustrojem organizmów dostarczają podstawowych informacji na temat struktury, fizjologii i formowania się biofilmów. Inną ich zaletą jest niski koszt utrzymania, łatwość w prowadzeniu eksperymentu oraz możliwość prowadzenia badań na wielu próbach, co pozwala na uzyskanie wiarygodnych odczytów. Pomimo pewnego uproszczenia w porównaniu do modelu *in vivo* zachowane zostały charakterystyczne cechy biofilmu: różnice w gradiencie stężeń substancji odżywczych, metabolitów i gazów, duże zagęszczenie komórek oraz wytwarzanie zewnątrzkomórkowej macierzy. Modele *in vitro* można podzielić na trzy rodzaje:

- Zamknięty, inaczej statyczny. Jest to np. hodowla w podłożu płynnym w probówkach lub w dołkach płytki mikrotitracyjnej, przy czym zaletą tej ostatniej jest możliwość przeprowadzenia stosunkowo łatwo, szybko i bezpośrednio badań pozwalających ująć ilościowo masę

Tabela 2. Zwierzęce modele badawcze oraz zakażenia wybranych tkanek spowodowane przez drobnoustroje tworzące biofilm [70]

Model badawczy	Zakażenia tkanek
Mysz	Zwłóknienie torbielowate płuc, infekcje przewodów moczowych, przewlekłe infekcje ran, zapalenie zatok przynosowych
Szczur	Zwłóknienie torbielowate płuc, infekcje przewodów moczowych, przewlekłe infekcje ran
Królik	Przewlekłe infekcje ran, zapalenie zatok przynosowych
Owca	Zapalenie zatok przynosowych
Świnia	Zwłóknienie torbielowate płuc, przewlekłe infekcje ran

biofilmu (korzystając np. z fioletu krystalicznego) lub obecność żywych komórek (za pomocą np. redukcji soli tetrazolowej).

- Otwarty, inaczej dynamiczny lub przepływowy. Pozwala na dłuższą hodowlę biofilmu, gdyż zapewnia odprowadzenie zbędnych produktów metabolicznych oraz napływ świeżej pożywki, na zasadzie hodowli ciągłej. Jednak w porównaniu do modelu zamkniętego wymaga bardziej zaawansowanego sprzętu, np. pompy perystaltycznej, a także pewnych umiejętności technicznych, jednocześnie uniemożliwiając szybkie i łatwe badania dużej liczby prób.

- Mikrokosmos (microcosms) najbardziej skomplikowana z metod *in vitro*, jednak łącząca także cechy modeli *in vivo*, celem której jest bardziej dokładna imitacja środowiska *in situ*. Model często składa się z kilku gatunków oraz czynnika, który jest obecny także w naturalnym dla drobnoustroju środowisku, np. dodatek hydroksylu-apatytu oraz śliny w celu odtworzenia warunków panujących w jamie ustnej przy badaniu biofilmu nazębego [84]. Powierzchnię abiotyczną w tym modelu można także pokryć np. warstwą ludzkich komórek nabłonka pęcherza, stwarzając środowisko bliskie temu *in vivo*, co ułatwia badanie infekcji pęcherza moczowego [8]. Potencjalnie zarówno otwarty jak i zamknięty model można zastosować w systemie mikrokosmosu. Największą zaletą jest możliwość uzyskania skomplikowanych i niejednorodnych warunków występujących *in vivo*.

Modele *ex vivo*

Między modelami *in vitro* a *in vivo* znajdują się systemy *ex vivo*, które polegają na pobraniu organu lub tkanki z organizmu (najczęściej od myszy lub świni) i umieszczeniu w sztucznym środowisku w celu dalszego badania lub przeprowadzania doświadczeń (tab. 3). System często pomijany, którego zaletą jest precyzyjna kontrola warunków w porównaniu do modeli *in vivo* oraz lepsze zobrazowanie warunków środowiska w zestawieniu do *in vitro*, może być stosowany do eksperymentowania na żywych organizmach. Pozwala na dokładne prześledzenie i zbadanie kolonizacji bakteriami tkanek, takich jak nabłonek tchawicy, śluzówka macicy, nerki lub zęby [51].

ZWALCZANIE BIOFILMU

Właściwości fizykochemiczne biofilmu

Biofilm jest skomplikowaną, usieciowaną strukturą składającą się z różnego rodzaju substancji, które mają wpływ na wiele jego właściwości, takich jak hydrofobowość i zmniejszona przepuszczalność gazów [27], a także znacznie spowolnione tempo przenikania antybiotyków, np. piperacyliny w biofilmie *P. aeruginosa* [51]. Sieć EPS działając jak gęste sito, nie tylko spowalnia przenikanie związków bójczych, ale także powoduje spadek ich stężenia w głębszych partiach struktury [31], co może aktywować systemy obronne mikroorganizmu zanim osiągnięte zostanie stężenie zdolne zabić komórkę, a także generować oporność na dany antybiotyk. Organizmy w postaci osiadłej są także lepiej chronione przed działaniem środków dezynfekujących i metali ciężkich. Na przykład dwugatunkowy biofilm *P. aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae* znacznie spowalniał dyfuzję chloru, uniemożliwiając wyrównanie się gradientu stężeń między wnętrzem a zewnętrzną częścią biofilmu, gdyż stężenie w środku dochodziło co najwyżej do 20% stężenia poza strukturą [19]. Metale ciężkie, takie jak cynk, miedź i ołów wykazywały słabszą toksyczność dla komórek *P. aeruginosa* PAO1 chronionych przez sieć EPS [34]. Jednak macierz zewnątrzkomórkowa nie chroni przed każdym czynnikiem antymikrobowym. Badano pod tym kątem egzopolisacharydy budujące biofilm u *P. aeruginosa* PT-1252 oraz *P. elodea*. Podczas, gdy spowalniają one dyfuzję antybiotyków aminoglikozydowych (takich jak gentamycyna i tobramycyna) oraz polipeptydowych (polimyksyna b i kolistyna), to nie redukują w znacznym sposób przenikania makrolitów, kwinalinów czy β-laktamów [22]. Ważne są także warunki, w których rozwija się biofilm, gdyż tworzony przez *S. aureus* w hodowli statycznej miał grubszą warstwę EPS w porównaniu do hodowli przepływowej. Utrudniało to ludzkim leukocytom penetrację do wnętrza struktury, a nawet gdy proces wystąpił, komórki nie były zdolne do fagocytowania bakterii [91].

Metody zwalczania biofilmu

Oczywistym wydaje się to, jak istotna z punktu widzenia zdrowia publicznego, ale także i ekonomii, jest skuteczna walka z biofilmem, głównie wytwarzanym przez organizmy

Tabela 3. Wybrane metody *ex vivo* badania biofilmów [70]

Metoda	Charakterystyka	Zalety	Zastosowanie
Kanały korzenia zębowego	Zęby osadzone w kicie silikonowym, stale przepłukiwane	Stale przepłukiwane (warunki jak w jamie ustnej), pozwala na obserwację	Badanie usuwania biofilmu nazębnego, leczenie infekcji kanałów korzenia zębowego
Zastawka serca	Pobrane świńskie zastawki serca	Pozwala badać interakcje pionierskich bakterii z tkanką zastawki, możliwa obserwacja pod SEM	Badanie postępu zapalenia wsierdza
Kandydozy śluzówki macicy	Królicze narządy rodne umieszczone na płytkach do hodowli tkankowych	Ułatwiona obserwacja pod mikroskopem	Model rozwoju kandydoz

obligatoryjnie lub oportunistycznie patogenne. Najprostszą klasyfikacją sposobów zwalczania jest podział na metody fizyczne, chemiczne lub biologiczne, w zależności od czynnika użytego do walki z biofilmem. Drugi podział w obrębie wcześniej wymienionego to kategoryzacja momentu, w którym dana metoda jest skuteczna, od zapobiegania adhezji do powierzchni, przez zahamowanie wzrostu, aż po usunięcie dojrzałej postaci biofilmu. Należy jednak pamiętać, że niektóre strategie korzystają np. z czynników fizycznych i chemicznych jednocześnie, aby zwiększyć skuteczność [58].

Metody fizyczne

Do tej grupy należą sposoby walki wykorzystujące czynniki fizyczne, takie jak temperatura, zarówno wysoka jak i niska, siły mechaniczne czy promieniowanie elektromagnetyczne. Stosowane są głównie do zwalczania powstałego już biofilmu, lub zabijają zaadherowane komórki zanim rozpoczną tworzenie struktury.

Podstawową metodą pozbywania się wielu mikroorganizmów jest wykorzystanie wysokiej temperatury do śmierci drobnoustrojów przez denaturację białek. Znaczenie ma tu przede wszystkim temperatura do jakiej ogrzewa się materiał, który ma być oczyszczony, ale też czas w jakim wystawiony będzie na działanie ciepła. Poddanie biofilmu *P. aeruginosa* PAO1 działaniu temperatury 80°C w łaźni wodnej przez 30 min powodowało spadek CFU aż o 6 rzędów wielkości w porównaniu do kontroli przy 37°C, natomiast po upływie 15 min tylko o 4 rzędy [74]. Jednak wykorzystana metoda z użyciem łaźni wodnej nie jest możliwa do zastosowania dla materiałów znajdujących się wewnątrz organizmu człowieka. Trwają badania nad zastosowaniem magnezytu (Fe_3O_4) do pokrywania nim powierzchni implantów medycznych. Nanocząsteczkami magnezytu z polistyrenem powleka się powierzchnię docelową, którą w razie infekcji można poddać działaniu zmiennego pola elektromagnetycznego, to wzbudza cząsteczki magnezytu i wytwarza ciepło, aż do temperatury 80°C, jednocześnie unieszkodliwiając biofilm. Metoda skutecznością jest porównywalna do poprzedniej, jednak implikuje także problemy związane z ewentualnymi oparzeniami wewnętrznymi tkanek otaczających endoprotezę, jednak dopiero testy *in vivo* zweryfikują możliwości stosowania tej metody [14].

Techniką zwalczania biofilmu, posługującą się siłami mechanicznymi do zabicia komórek wewnątrz struktury, jest sonikacja. Metoda ta wykorzystuje ultradźwięki, czyli fale dźwiękowe o częstotliwości powyżej 20 tys. Hz, do generowania zjawiska kawitacji akustycznej. Wewnątrz cieczy powstają pęcherzyki gazów o wysokim ciśnieniu, które po czasie implodują powodując lokalnie wzrost temperatury aż do około 5000°C i obniżenie ciśnienia. Różnica ciśnień po implozji pęcherzyka kawitacyjnego prowadzi do powstania fal uderzeniowych o ciśnieniu dochodzącym do 50 MPa, które rozchodząc się w medium powodują rozerwanie całych komórek, a także uszkodzenie struktur wewnątrzkomórkowych [32]. Zastosowanie tej metody pozwala zabić organizmy wewnątrz biofilmu [65], jednak po raz kolejny specyfika infekcji utrudnia wykorzystanie samej sonikacji do walki z biofilmem, choć opracowano urządzenia generujące drgania stałych cewników dróg moczowych o częstotliwości do 100 000 Hz. Połączenie sonikacji z jednoczesnym zastosowaniem antybiotyków powoduje eradykację do 85% bakterii z biofilmu. Metoda wykorzystuje to, że ultradźwięki rozluźniają strukturę macierzy zewnątrzkomórkowej, pozbawiając bakterie ochrony przed antybiotykiem, który dzięki temu wykazuje lepszą skuteczność niż antybiotyk i wibracje osobno [6]. Niemniej jednak, pomimo pewnych trudności w zastosowaniu sonikacji do zwalczania biofilmu, może ona być wykorzystana do analizy infekcji endoprotez. Sonikacja usuniętej endoprotezy z użyciem fal o niższych częstotliwościach powoduje rozbicie struktury biofilmu i uwolnienie z niej komórek, które następnie można wykorzystać do oznaczenia składu gatunkowego, wykonania antybiogramów i innych metod zależnych od hodowli z większą czułością niż klasyczne metody pozyskania próbek [83].

Powstawanie biofilmu na powierzchni zębów może być, oprócz próchnicy zębów [49], także źródłem infekcji, zwłaszcza u osób o obniżonej odporności. Osoby poddane mechanicznej wentylacji płuc z użyciem respiratora narażone są na zapalenie płuc związane z przemieszczeniem się drobnoustrojów z jamy ustnej w głąb dolnych dróg oddechowych [85]. Aby temu zapobiec najczęściej stosuje się różnego rodzaju płyny

do płukania jamy ustnej, lecz najbardziej skuteczne jest mechaniczne usunięcie biofilmu za pomocą szczoteczki do zębów, przy czym skuteczność zależy może od składu gatunkowego biofilmu, który należy usunąć [95].

Ważna jest także struktura powierzchni, gdyż porowata łatwiej ulega kolonizacji z powodu grubszej warstwy kondycjonującej znajdującej się w zagłębieniach [17], a także zwiększa powierzchnię kontaktu komórek i chroni je, np. przed przepływem śliny w jamie ustnej [24]. Rozmiar porów na powierzchni także ma znaczenie, gdyż te o wielkościach rzędu 15–25 nm, nie tylko nie ułatwiają adhezji, ale też ją uniemożliwiają. Płaska, aluminiowa powierzchnia o porach tej wielkości hamowała adhezję *E. coli* O157:H7 ATCC 43894, *E. coli* K12, *Listeria monocytogenes* 10403S, *S. aureus* 9144 oraz *S. epidermidis* ATCC 35984. Dobre właściwości antyadhezyjne wykazywały także powierzchnie ultragładkie, o porach mniejszych niż 1 nm, co może wskazywać na istotność dokładnego polerowania powierzchni np. endoprotez [28].

Promieniowanie UV jest wykorzystywane powszechnie do dezynfekcji, głównie powierzchni np. blatów lub podłóg. Podstawą skuteczności jest szkodliwe działanie na DNA komórek. Ultrafiolet to promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali 10–400 nm, które w kontakcie z DNA tworzy wiązania między dwiema sąsiadującymi tyminami w obrębie jednej nici, co powoduje mutacje, a ostatecznie śmierć komórki [101]. Podczas gdy naświetlanie promieniowaniem UV jest skuteczne w zwalczaniu np. infekcji dermatofitami [16], w walce z biofilmami stosuje się naświetlanie pulsacyjne. Lampy takie emitują światło z zakresu podczerwieni, widzialne oraz ultrafioletowe, przy czym około 54% energii to UV, w trzech pulsach na sekundę, każdy trwający około 360 μs. Wykazano ich skuteczność w zwalczaniu biofilmów *E. coli* O157:H7 EDL933 oraz *L. monocytogenes* V7 z powierzchni m.in. sałaty [66]. Szkodliwe działanie promieniowania UV niestety nie rozróżnia DNA człowieka od patogenu, więc jego zastosowanie ogranicza się głównie do sterylizowania żywności. Zastosowanie znajduje także promieniowanie z zakresu światła widzialnego, wykorzystywane w metodach terapii lub inaktywacji fotodynamicznej. Polegają na zaaplikowaniu fotosensybilizatorów lub barwników (fotouczulaczy), które są następnie poddawane działaniu promieniowania o odpowiedniej dla nich długości, powodując ich przejście w stan wzbudzony. Wywołuje interakcję leku/barwnika z tlenem, a następnie powstawanie reaktywnych form tlenu (ROS, reactive oxygen species) i rodników hydroksylowych [100]. Utworzone w ten sposób ROS uszkadzają m.in. białka w komórce, prowadząc do jej śmierci, przy czym najsukuteczniejsze są w fazie logarytmicznej wzrostu [94]. Można także uniknąć podawania substancji z zewnątrz, wykorzystując naturalnie występujące w komórkach mikroorganizmów barwniki z grupy porfiryn. Mogą zostać wzbudzone światłem widzialnym o barwie niebieskiej, o długości fali 400 nm i wtedy mogą powodować powstawanie ROS jak

po użyciu fotosensybilizatorów podanych z zewnątrz. Po zastosowaniu tej metody na bakterii *Helicobacter pylori* ATCC 43504, śmierci uległo 99,999% komórek [53], jednak w walce z grzybami, np. *C. albicans* metoda jest mniej skuteczna [100].

Ze skutków działania promieniowania UV, aktywności reaktywnych form tlenu oraz naładowanych cząstek na patogeny korzyści czerpie metoda wykorzystująca zimną plazmę o ciśnieniu atmosferycznym. Plazma powstała z mieszanki 99,5% helu z 0,5% tlenu wykazywała silne działanie bójcze na komórki *P. aeruginosa* PAO1 znajdujące się wewnątrz biofilmu, skuteczność wynosiła 99,99%.

Mimo że pióropusz plazmy skierowany na biofilm miał tylko około 5 mm średnicy, to strefa zahamowania wzrostu dochodziła do kilku centymetrów średnicy, co może wskazywać, że działanie reaktywnych form pochodzących z plazmy nie ogranicza się tylko do widocznego pióropusza plazmy.

Działanie zimnej plazmy o ciśnieniu atmosferycznym nie jest jeszcze dokładnie wyjaśnione, najprawdopodobniej wykorzystuje wspomniane wcześniej ROS, promieniowanie UV powstające w strumieniu plazmy oraz obecność naładowanych cząstek. Może znaleźć zastosowanie w odkażaniu abiotycznych powierzchni, ale też, z powodu niskiej temperatury i ciśnienia, przy odkażaniu tkanek zainfekowanych patogennymi biofilmami [2].

Metody chemiczne

Metody chemiczne wykazują aktywność na każdym z etapów rozwoju biofilmu. Mogą wpływać na proces adhezji, ale także na wzrost i podział komórek. Niestety wspomniane wyżej właściwości biofilmu, wielolekooporność oraz odmienny profil fizjologiczny organizmów wewnątrz powodują, że dotychczas stosowane fungicydy oraz antybiotyki tracą skuteczność. Fungicydy, takie jak amfoterycyna B, flukonazol oraz worykonazol hamując syntezę błon komórkowych uniemożliwiają wzrost i podział grzybów, jednak słabiej działają na komórki *C. albicans* ATCC 90028 oraz *C. glabrata* ATCC 582, nie będąc w stanie całkowicie odkażać ceownika zainfekowanego tymi szczepami. Szczep *C. parapsilosis* OY8-68, który intensywniej wytwarzał warstwę śluzu był odporny na terapię wspomnianymi fungicydami [69]. Podobnie jest z antybiotykami, które stają się coraz mniej skuteczne. Szacuje się, że około 50% infekcji *E. coli*, *K. pneumoniae* oraz *S. aureus* wywołana jest przez szczepy odporne na większość powszechnie stosowanych antybiotyków [90]. Niezbędne więc jest wprowadzenie do powszechnego użytku innego rodzaju substancji, na które mikroorganizmy nie będą odporne lub terapia kombinowana z użyciem kilku substancji. Dla przykładu moksyflokscyna lub daptomycyna osobno nie mogły eradykować biofilm *S. aureus*, lecz w terapii połączonej z klarytromycyną działały skutecznie [42]. Wadą antybiotyków jest także ich działanie głównie na komórki dzie-

łącze się, podczas gdy w biofilmie wiele z nich znajduje się w fazie stacjonarnej wzrostu. Większą skuteczność wykazują bakteriocyny, białkowe substancje o właściwościach antybakteryjnych. Sonorezyna zabija komórki *S. aureus* oraz *E. coli* w fazie stacjonarnej przez zwiększenie przepuszczalności ich błon komórkowych [13].

Oprócz terapii kombinowanych i pozyskiwania nowych substancji zdolnych do zabicia komórek wewnątrz biofilmu, poszukuje się także sposobów na zwiększenie skuteczności działania leków przez ułatwienie im wnikania do komórek lub ochronę przed czynnikami fizykochemicznymi biofilmu. Jedną z takich metod jest zastosowanie liposomów, pęcherzyków składających się z podwójnej błony złożonej z fosfolipidów, wypełnionych lekami cytotoksycznymi lub fungicydami. Liposomy łatwo łączą się z błonami komórkowymi, dostarczając substancje czynne bezpośrednio do wnętrza komórek, ułatwiając ich zabicie [26]. Podobne właściwości mają mikro- i nanoemulsje. Otaczają lek monowarstwą hydrofilową lub hydrofobową, ułatwiając ich przenikanie. Modyfikacja polegająca na zawarciu wewnątrz dodatkowo lipidów w stanie stałym w temperaturze pokojowej, które unieruchamiają lek to tzw. nanocząsteczki stałych lipidów [26].

Grupa cyklicznych oligosacharydów, tak zwane cyklodekstryny (CD) także są zdolne do transportowania substancji czynnej do wnętrza struktury, chroniąc ją przed szkodliwymi czynnikami. Oligosacharydy te mają kształt stożka, przy czym wnętrze jest hydrofobowe, a część zewnętrzna hydrofilowa. Właściwości te pozwalają tworzyć tzw. kompleksy inkluzyjne, czyli struktury składające się z kilku cząsteczek CD zwróconych czubkami do zewnątrz. W środku powstaje przestrzeń, w której transportowany jest lek, z dala od szkodliwego działania środowiska [26].

W latach 70. XX wieku wprowadzone zostały także nanocząsteczki polimerowe. Zasada ich działania jest podobna do liposomów, jednak zamiast fosfolipidów otoczkę tworzą polimery, np. biodegradowalny polikaprolakton. Wyróżnia się dwie klasy nanocząstek, nanosfery oraz nanokapsułki. Różnicą jest obecność lub brak oleistej substancji wewnątrz. Nanosfery jej nie zawierają i lek zaadsorbowany jest do ściany cząsteczki, a w nanokapsułkach substancja jest obecna i lek jest w niej rozpuszczony i/lub zaadsorbowany do ściany [26].

Powyższe metody wykazują działanie na wykształcony już biofilm, jednak większą skuteczność mogą wykazać próby zapobiegania adhezji komórek do powierzchni np. endoprotez. Poza modyfikacją struktury, np. polerowaniem, można posłużyć się różnego rodzaju substancjami chemicznymi do pokrycia powierzchni implantów lub cewników, co uniemożliwiłoby zasiedlenie ich przez patogeny. Przykładowo cewniki lateksowe pokryte hydrożelem oraz cząsteczkami srebra wykazywały zmniejszoną o 47% podatność na inwazję bakteriami odpowiedzialnymi za odcewnikowe infekcje dróg moczowych [52].

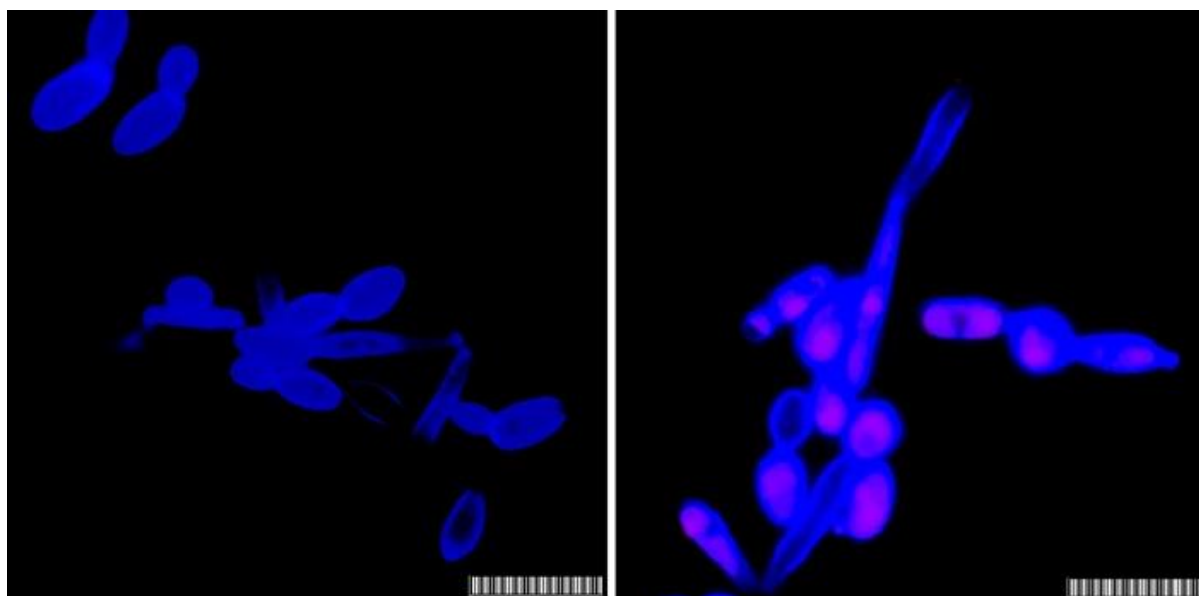
Podobne działanie wykazało badanie infekcji dróg moczowych u cewnikowanych psów. Część z nich korzystała z cewników pokrytych lakierem, który przez długi czas, stopniowo uwalniał chlorheksydynę o właściwościach bakteriobójczych [87]. Endoprotezy wykonane ze stali nierdzewnej lub tytanu mogą być także pokrywane trimetylosilanem (TMS), za pomocą powlekania plazmowego, wykorzystującego plazmę jako nośnik substancji powlekającej. Metoda ta zapewnia równomierne powłoczenie TMS na powierzchni protez. Zastosowanie powłoki TMS utrudniało tworzenie się biofilmu *S. epidermidis* ATCC 35984, który mógł utworzyć tylko monowarstwę komórek, co zwiększało wrażliwość komórek na standardowe antybiotyki, przez wyeliminowanie grubej, ochronnej warstwy macierzy zewnątrzkomórkowej [59]. Czwartorzędowe sole amoniowe jako kationowe surfaktanty (tzw. surfaktanty gemini), działają antyadhezyjnie eradykując biofilm bakteryjny i grzybowy (ryc. 4). Zastosowanie ich spowodowało, że adhezja *S. epidermidis* do powierzchni polistyrenu ograniczona została o 90%, natomiast wykształconego biofilmu usunięto 50–100%, w zależności od stężenia [73]. Fosfocholina wykazuje podobne działanie antyadhezyjne, jednak wykorzystuje właściwości zwitterjonów (jonów obojnaczych), które mogą tworzyć otoczkę hydratacyjną wokół powleczonej powierzchni, uniemożliwiając kontakt adhezyn z powierzchnią implantu lub cewnika, a także eliminując ponowne kondycjonowanie [89].

Metody biologiczne

Metody biologiczne zawierają techniki wykorzystujące enzymy, bakteriofagi oraz peptydy przeciwdrobnoustrojowe. Działają nie tylko na same komórki, ale i na macierz zewnątrzkomórkową, co pozwala na wykorzystanie ich do terapii kombinowanych.

Krótkie łańcuchy aminokwasowe, tzw. peptydy przeciwdrobnoustrojowe (AMP, antimicrobial peptides) są elementem wrodzonej odpowiedzi immunologicznej i wykazują działanie bójcze wobec bakterii, grzybów, wirusów otoczkowych, a nawet komórek nowotworowych. AMP wykazują szeroki zakres działania na komórki patogenów, mogą hamować syntezę ściany komórkowej lub ją modyfikować. Wpływają także na funkcjonowanie komórki, ponieważ zdolne są do hamowania procesów replikacji, transkrypcji, translacji, a także inhibicji enzymatycznych funkcji białek [89]. Błony komórkowe ssaków zawierają ładunek dodatni, podobnie jak AMP, co uniemożliwia peptydom interakcję z nimi, jednocześnie zachowują pełną skuteczność wobec grzybów oraz bakterii Gram-dodatnich i ujemnych [89]. Wady stosowania AMP to m.in. trudność w zastosowaniu ich jako powłoki, wrażliwość na pH oraz potencjalna toksyczność; istotne także są wysokie koszty syntezy [56].

Do walki z biofilmem bakteryjnym można wykorzystać naturalnych wrogów bakterii – bakteriofagi. To wirusy bakteryjne, które w cyklu litycznym mogą powodować śmierć komórki i uwolnienie kolejnych wirionów. Jed-



Ryc. 4. Wpływ kationowego surfaktantu wielofunkcyjnego (DMGM) na żywotność komórek biofilmu *C. albicans* na powierzchni szklanej (po lewej kontrola bez dodatku związku aktywnego, po prawej komórki *C. albicans* pod wpływem). Mikroskopia fluorescencyjna: ściany komórkowe *C. albicans* (niebieska fluorescencja) - barwienie Calcofluor White M2R, barwienie martwych jąder komórkowych - jodek propidyny (czerwona fluorescencja), słupek miarowy = 10 μm [75]

nak zwarta sieć macierzy utrudnia penetrację fagów, więc wykorzystuje się bakteriofagi do powlekania materiałów urządzeń medycznych np. cewników. Powoduje to infekcję każdej komórki bakteryjnej zdolnej do adhezji na tak zabezpieczonej powierzchni. Następnie zakażona w wyniku kontaktu z fagiem bakteria, ulega lizie uwalniając kolejne infekcyjne cząstki wirusa. Metoda wykazała zmniejszoną adhezję *S. epidermidis* 414 do powlekanych fagiem cewników, powodując spadek CFU o około 2 rzędy. Wykorzystano faga litycznego 456, który jest swoisty wobec *S. epidermidis* – powoduje lizę komórek, gdyż nie może wejść w cykl lizogeniczny. Zaletami terapii fagowej jest duża swoistość wobec komórek bakterii i znikoma cytotoksyczność wobec komórek gospodarza [15]. Bakteriofagi mogą także być wykorzystane do zainfekowania komórki bakteryjnej, którą następnie wprowadza się do biofilmu. Fag namnaża się wewnątrz komórki, a następnie powoduje jej lizę, infekując kolejne bakterie, jednak jest to skuteczne tylko w obrębie jednogatunkowych biofilmów [1].

Bakteriofagi kodują geny odpowiedzialne za syntezę lizyny, enzymu zdolnego wywołać lizę komórek. Enzymy te mogą zostać wykorzystane jako skuteczne substancje przeciwbakteryjne. Lizyna CF-301 może wyeliminować całkowicie biofilm większości szczepów *S. aureus*, a także *S. pyogenes* oraz *S. agalactiae* [86].

W celu zapobiegania powstawaniu biofilmu można wykorzystać zjawisko konkurencji. Wykazano, że dojrzały biofilm *Vibrio cholerae* C6706 El może zapobiec inwazji innych bakterii. W macierzy zewnątrzkomórkowej znajdowało się białko RmbA, które łączyło komórki potomne ze sobą oraz z polisacharydami wewnątrz macierzy

EPS, co utrudnia kolonizację wolnych bakterii. Jedynie bakterie zdolne do aktywnego ruchu mogły przylegać do zewnętrznej jego powierzchni, jednak stosunkowo łatwo ulegały oderwaniu [67]. W obrębie dwugatunkowego biofilmu może także dochodzić do oddziaływań antagonistycznych, gdy jeden z organizmów wytwarza np. bakteriocyny. Powoduje to spadek liczebności jednego z gatunków oraz zwiększenie jego wrażliwości na inne substancje przeciwdrobnoustrojowe [18]. Obie opisane metody wymagają jednak celowej kontaminacji danej powierzchni z wykorzystaniem szczepu niepatogennego, aby zapobiec powstawaniu biofilmu na danej powierzchni przez szczepy patogenne. Może to znaleźć zastosowanie w badaniach nad naturalną mikroflorą jelit oraz użyciem probiotyków, które jako flora rezydentna zapobiegałyby adhezji patogenów.

Bardziej aktywnym sposobem biologicznej walki z biofilmami jest zastosowanie modyfikowanej genetycznie *E. coli*. Bakteria zdolna jest do rozpoznania, migracji i zabicia komórek patogenu, np. *P. aeruginosa*, zarówno w postaci planktonicznej, jak i osiadłej, wewnątrz biofilmu. Swoistość uzyskana została dzięki chemotaksji dodatkowo względem cząstek sygnałowych QS wytwarzanych przez *P. aeruginosa*, a właściwości bójcze przez syntezę mikrocytyny S oraz DNazy I [41]. Podobne działanie wykazuje *Bacillus thuringiensis* 407 oraz *B. subtilis* 168 w postaci planktonicznej. Są wówczas zdolne do adhezji i penetracji biofilmu, np. *S. aureus* RN4220. Powstałe tunele zwiększają przepuszczalność macierzy, ułatwiając wnikanie środków dezynfekcyjnych, a dodatkowo *B. thuringiensis* 407 wytwarzająca lizostafinę, enzym powodujący lizę ściany komórkowej *S. aureus*, mógł eradykować biofilm w ciągu 24 h [38].

Do walki z biofilmem można zastosować enzymy degradujące komponenty macierzy zewnątrzkomórkowej, które rozluźniają strukturę oraz powodują jej rozpad. Enzymem takim jest np. dyspersyna B, produkowana przez *Actinobacillus actinomycetem-comitan*, zdolna do degradacji biofilmu *S. epidermidis* [46] lub proteinaza K, hydrolizująca białka obecne w macierzy [3].

Naruszenie struktury biofilmu jest jednym ze sposobów możliwym do wykorzystania w terapiach kombinowanych, gdy wprowadzamy jednocześnie enzym degradujący macierz zewnątrzkomórkową oraz np. antybiotyk. Wykazują zdolność wyeliminowania do 90% biofilmu, w przypadku podania DNazy I oraz cyprofloksacyny, w porównaniu do 50% skuteczności samej cyprofloksacyny. Dodatkowo, wprowadzając nanocząsteczki poli(kwasu mlekowego-ko-kwasu glikolowego) (PLGA) do biofilmu uzyskano lepsze wyniki. PLGA pokryte cyprofloksacyną oraz DNazą I zwalczały ponad 95% biofilmu *P. aeruginosa* PAO1 CECT4122 oraz *S. aureus* CECT 86 [5].

Jedną z biologicznych metod jest zahamowanie zjawiska QS przez enzymy degradujące cząstki sygnałowe, tzw. zjawisko quorum-quenching (quenching – zagłuszenie), co w następstwie doprowadzi do zablokowania komunikacji między komórkami i tworzenia biofilmu. Wykorzystać do tego można kilka rodzajów enzymów, np. do degradacji cząsteczek AHL należące do jednej z grup: acylaz, laktonaz lub m.in. oksydoreduktaz, przy czym laktonazy wykazują najniższą swoistość substratową [50]. Enzymy podawane z zewnątrz mogą jednak ulec dezaktywacji z powodu warunków panujących w biofilmie. Aby tego uniknąć najlepiej byłoby, aby enzymy te, jako białka, syntezować dopiero wewnątrz struktury. W tym celu posłużyć się można modyfikowanym fagiem T7, który koduje geny odpowiedzialne za syntezę laktonaz. Bakteriofag infekując komórkę powoduje powstawanie w niej znacznych ilości enzymów degradujących cząsteczki sygnałowe, następnie dochodzi do lizy komórki, uwolnienia kolejnych wirionów oraz

enzymów. Mechanizm ten ma zatem podwójne działanie – śmierć komórek oraz hamowanie QS tych, które przetrwały [77]. Ten sam fag, także modyfikowany, został wykorzystany do wytwarzania wspomnianej wyżej dyspersyny B i zgodnie z wcześniejszym schematem powodował miejscowe wytwarzanie enzymu, którego celem w tym wypadku była macierz zewnątrzkomórkowa, na którą działał od środka [25].

Działanie antybiofilmowe wykazują także przeciwciała, powodujące ingerencję na różnych poziomach. Hamują adhezję np. *P. aeruginosa* IFO3455 przez opsonizację [51] lub łącząc się z białkami związanymi z agregacją komórek u *S. epidermidis* RP62A [36]. Przeciwciała mogą także brać udział w zjawisku quorum-quenching, wiążąc się z cząsteczkami AHL, hamując QS [33].

PODSUMOWANIE

Biofilm wytwarzany przez patogenne szczepy bakterii i grzybów od dawna jest problemem związanym z medycyną – endoprotezami, cewnikami i innymi urządzeniami związanymi z organizmem człowieka. Odpowiedzialny jest głównie za infekcje przewlekłe, trudne do zwalczenia z powodu właściwości biofilmu.

Do walki z biofilmem wykorzystać można wiele różnorodnych metod, działających na komórki lub macierz zewnątrzkomórkową, zabijających drobnoustroje lub zapobiegające ich adhezji. Metody fizyczne, korzystające z klasycznych, dawno znanych sposobów, metody chemiczne, które opierają się na poszukiwaniu nowych substancji do walki oraz metody biologiczne, stwarzające duże nadzieje w związku z ich selektywnym działaniem.

Skuteczność opracowywanych metod może zostać zwiększona przez zrozumienie interakcji między patogenami, rozszyfrowanie zjawiska quorum-sensing oraz zmian w ekspresji genów w zależności od trybu życia.

PIŚMIENICTWO

[1] Abedon S.T.: Spatial vulnerability: Bacterial arrangements, microcolonies, and biofilms as responses to low rather than high phage densities. *Viruses*, 2012; 4: 663-687

[2] Alkawareek M.Y., Algwari Q.T., Laverty G., Gorman S.P., Graham W.G., O'Connell D., Gilmore B.F.: Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by atmospheric pressure non-thermal plasma. *PLoS One*, 2012; 7: e44289

[3] Alves-Barroco C., Roma-Rodrigues C., Balasubramanian N., Guimarães M.A., Ferreira-Carvalho B.T., Muthukumar J., Nunes D., Fortunato E., Martins R., Santos-Silva T., Figueiredo A.M., Fernandes A.R., Santos-Sanches I.: Biofilm development and computational screening for new putative inhibitors of a homolog of the regulatory protein BrpA in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2019 (w druku)

[4] Asahi Y., Miura J., Tsuda T., Kuwabata S., Tsunashima K., Noiri Y., Sakata T., Ebisu S., Hayashi M.: Simple observation of *Streptococcus mutans* biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids. *AMB Express*, 2015; 5: 6

[5] Baelo A., Levato R., Julián E., Crespo A., Astola J., Gavalda J., Engel E., Mateos-Timoneda M.A., Torrents E.: Disassembling bacterial extracellular matrix with DNase-coated nanoparticles to enhance antibiotic delivery in biofilm infections. *J. Control. Release*, 2015; 209: 150-158

[6] Bandara H.M., Harb A., Kolacny D.Jr., Martins P., Smyth H.D.: Sound waves effectively assist tobramycin in elimination of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms *in vitro*. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 2014; 15: 1644-1654

[7] Bariteau J.T., Waryasz G.R., McDonnell M., Fischer S.A., Hayda R.A., Born C.T.: Fungal osteomyelitis and septic arthritis. *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, 2014; 22: 390-401

[8] Berry R.E., Klumpp D.J., Schaeffer A.J.: Urothelial cultures support intracellular bacterial community formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 2009; 77: 2762-2772

[9] Bester E., Wolfaardt G.M., Aznaveh N.B., Greener J.: Biofilms' role in planktonic cell proliferation. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 21965-21982

- [10] Bilal M., Guo S., Iqbal H.M., Hu H., Wang W., Zhang X.: Engineering *Pseudomonas* for phenazine biosynthesis, regulation, and biotechnological applications: a review. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2017; 33: 191
- [11] Bjarnsholt T., Buhlin K., Dufrêne Y.F., Gomelsky M., Moroni A., Ramstedt M., Rumbaugh K.P., Schulte T., Sun L., Åkerlund B., Rømling U.: Biofilm formation - what we can learn from recent developments. *J. Intern. Med.*, 2018; 284: 332-345
- [12] Bose J.L., Wollenberg M.S., Colton D.M., Mandel M.J., Septer A.N., Dunn, A.K., Stabb E.V.: Contribution of rapid evolution of the *luxR-luxI* intergenic region to the diverse bioluminescence outputs of *Vibrio fischeri* strains isolated from different environments. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 77: 2445-2457
- [13] Chopra L., Singh G., Jena K.K., Sahoo D.K.: Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food bio-preservative. *Sci. Rep.*, 2015; 5: 13412
- [14] Coffel J.: Implementation and modeling of in situ magnetic hyperthermia. University of Iowa. [http://ir.uiowa.edu/etd/2058/\(07.05.2018\)](http://ir.uiowa.edu/etd/2058/(07.05.2018))
- [15] Curtin J.J., Donlan R.M.: Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2006; 50: 1268-1275
- [16] Dai T., Tegos G.P., Rolz-Cruz G., Cumbie W.E., Hamblin M.R.: Ultraviolet C inactivation of dermatophytes: implications for treatment of onychomycosis. *Br. J. Dermatol.*, 2008; 158: 1239-1246
- [17] Dang H., Lovell C.R.: Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2015; 80: 91-138
- [18] Da Re S., Valle J., Charbonnel N., Beloin C., Latour-Lambert P., Faure P., Turlin E., Le Bouguéne C., Renauld-Mongénie G., Forestier C., Ghigo J.M.: Identification of commensal *Escherichia coli* genes involved in biofilm resistance to pathogen colonization. *PLoS One*, 2013; 8: e61628
- [19] De Beer D., Srinivasan R., Stewart P.S.: Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994; 60: 4339-4344
- [20] De Beer D., Stoodley P., Roe F., Lewandowski Z.: Effects of biofilm structures on oxygen distribution and mass transport. *Biotechnol. Bioeng.* 1994; 43: 1131-1138
- [21] De Kievit T.R., Iglewski B.H.: Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infect. Immun.*, 2000; 68: 4839-4849
- [22] de la Fuente-Núñez C., Reffuveille F., Fernández L., Hancock R.E.: Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2013; 16: 580-589
- [23] Del Pozo J.L., Tran N.V., Petty P.M., Johnson C.H., Walsh M.F., Bite U., Clay R.P., Mandrekar J.N., Piper K.E., Steckelberg J.M., Patel R.: Pilot study of association of bacteria on breast implants with capsular contracture. *J. Clin. Microbiol.*, 2009; 47: 1333-1337
- [24] De Medeiros Dantas L.C., da Silva-Neto J.P., Dantas T.S., Naves L.Z., das Neves F.D., da Mota A.S.: Bacterial adhesion and surface roughness for different clinical techniques for acrylic polymethyl methacrylate. *Int. J. Dent.*, 2016; 2016: 8685796
- [25] Donlan R.M.: Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.*, 2009; 17: 66-72
- [26] Dos Santos Ramos M.A., Da Silva P.B., Spósito L., De Toledo L.G., Bonifácio B.V., Rodero C.F., Dos Santos K.C., Chorilli M., Bauab T.M.: Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *Int. J. Nanomedicine*, 2018; 13: 1179-1213
- [27] Epstein A.K., Pokroy B., Seminara A., Aizenberg J.: Bacterial biofilm shows persistent resistance to liquid wetting and gas penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 995-1000
- [28] Feng G., Cheng Y., Wang S.Y., Borca-Tasciuc D.A., Worobo R.W., Moraru C.I.: Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2015; 1: 15022-15031
- [29] Flemming H.C.: EPS - then and now. *Microorganisms*, 2016; 4: E41
- [30] Franklin M.J., Chang C., Akiyama T., Bothner B.: New technologies for studying biofilms. *Microbiol. Spectr.* 2015; 3: 4
- [31] Gade P.A., Olsen T.B., Jensen P.Ø., Kolpen M., Høiby N., Henneberg K.Å., Sams T.: Modelling of ciprofloxacin killing enhanced by hyperbaric oxygen treatment in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilms. *PLoS One*, 2018; 13: e0198909
- [32] Ganesan B., Martini S., Solorio J., Walsh M.K.: Determining the effects of high intensity ultrasound on the reduction of microbes in milk and orange juice using response surface methodology. *Int. J. Food Sci.*, 2015; 2015: 350719
- [33] Grandclément C., Tannières M., Moréra S., Dessaux Y., Faure D.: Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiol. Rev.* 2016; 40: 86-116
- [34] Grujić S., Vasić S., Čomić L., Ostojić A., Radojević I.: Heavy metal tolerance and removal potential in mixed-species biofilm. *Water. Sci. Technol.*, 2017; 76: 806-812
- [35] Hall R.A., Turner K.J., Chaloupka J., Cottier F., De Sordi L., Sanglard D., Levin L.R., Buck J., Mühlischlegel F.A.: The quorum-sensing molecules farnesol/homoserine lactone and dodecanol operate via distinct modes of action in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 2011; 10: 1034-1042
- [36] Heacock-Kang Y., Zarzycki-Siek J., Sun Z., Poonsuk K., Bluhm A.P., Cabanas D., Fogen D., McMillan I.A., Chuanchuen R., Hoang T.T.: Novel dual regulators of *Pseudomonas aeruginosa* essential for productive biofilms and virulence. *Mol. Microbiol.*, 2018; 109: 401-414
- [37] Hogardt M., Heesemann J.: Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* to a chronic pathogen of the cystic fibrosis lung. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2013; 358: 91-118
- [38] Houry A., Gohar M., Deschamps J., Tischenko E., Aymerich S., Gruss A., Briandet R.: Bacterial swimmers that infiltrate and take over the biofilm matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; 109: 13088-13093
- [39] Hu J., Xu T., Zhu T., Lou Q., Wang X., Wu Y., Huang R., Liu J., Liu H., Yu F., Ding B., Huang Y., Tong W., Qu D.: Monoclonal antibodies against accumulation-associated protein affect EPS biosynthesis and enhance bacterial accumulation of *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One*, 2011; 6: e20918
- [40] Hwang G., Liu Y., Kim D., Li Y., Krysan D. J., Koo H.: *Candida albicans* mannans mediate *Streptococcus mutans* exoenzyme GtFb binding to modulate cross-kingdom biofilm development *in vivo*. *PLoS Pathog.*, 2017; 13: e1006407
- [41] Hwang I.Y., Tan M.H., Koh E., Ho C.L., Poh C.L., Chang M.W.: Re-programming microbes to be pathogen-seeking killers. *ACS Synth. Biol.*, 2014; 3: 228-237
- [42] Jacqueline C., Caillon J.: Impact of bacterial biofilm on the treatment of prosthetic joint infection. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014; 69: i37-i40
- [43] Janissen R., Murillo D.M., Niza B., Sahoo P.K., Nobrega M.M., Cesar C.L., Temperini M.L., Carvalho H.F., de Souza A.A., Cotta M.A.: Spatiotemporal distribution of different extracellular polymeric substances and filamentation mediate *Xylella fastidiosa* adhesion and biofilm formation. *Sci. Rep.*, 2015; 5: 9856
- [44] Kamaeva A.A., Vasilchenko A.S., Deryabin D.G.: Atomic force microscopy reveals a morphological differentiation of *Chromobacterium violaceum* cells associated with biofilm development and directed by N-hexanoyl-L-homoserine lactone. *PLoS One*, 2014; 9: e103741
- [45] Kanther M., Rawls J.F.: Host-microbe interactions in the developing zebrafish. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010; 22: 10-19

- [46] Kaplan J.B., Mlynek K.D., Hettiarachchi H., Alamneh Y.A., Biggemann L., Zurawski D.V., Black C.C., Bane C.E., Kim R.K., Granick M.S.: Extracellular polymeric substance (EPS)-degrading enzymes reduce staphylococcal surface attachment and biocide resistance on pig skin *in vivo*. *PLoS One*, 2018; 13: e0205526
- [47] Kounatidis I., Ligoxygakis P.: *Drosophila* as a model system to unravel the layers of innate immunity to infection. *Open Biol.*, 2012; 2: 120075
- [48] Kuhn D.M., Ghannoum M.A.: *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2004; 5: 186-197
- [49] Kutsch V.K.: Dental caries: an updated medical model of risk assessment. *J. Prosthet. Dent.* 2014; 111: 280-285
- [50] La Sarre, B., Federle M.J.: Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2013; 77: 73-111
- [51] Lebeaux D., Ghigo J.M., Beloin C.: Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2014; 78: 510-543
- [52] Lederer J.W., Jarvis W.R., Thomas L., Ritter J.: Multicenter cohort study to assess the impact of a silver-alloy and hydrogel-coated urinary catheter on symptomatic catheter-associated urinary tract infections. *J. Wound. Ostomy Continence Nurs.*, 2014; 41: 473-480
- [53] Lembo A.J., Ganz R.A., Sheth S., Cave D., Kelly C., Levin P., Kazlas P.T., Baldwin P.C.3rd, Lindmark W.R., McGrath J.R., Hamblin M.R.: Treatment of *Helicobacter pylori* infection with intra-gastric violet light phototherapy: a pilot clinical trial. *Lasers Surg. Med.*, 2009; 41: 337-344
- [54] Lenz A.P., Williamson K.S., Pitts B., Stewart P.S., Franklin M.J.: Localized gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008; 74: 4463-4471
- [55] Li P., Seneviratne C.J., Alpi E., Vizcaino J.A., Jin L.: Delicate metabolic control and coordinated stress response critically determine antifungal tolerance of *Candida albicans* biofilm persisters. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2015; 59: 6101-6112
- [56] Lo J., Lange D., Chew B.H.: Ureteral stents and foley catheters-associated urinary tract infections: The role of coatings and materials in infection prevention. *Antibiotics*, 2014; 3: 87-97
- [57] Lohse M.B., Gulati M., Johnson A.D., Nobile C.J.: Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2018; 16: 19-31
- [58] Lüthje P., Brauner A.: Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv. Microb. Physiol.*, 2014; 65: 337-372
- [59] Ma Y., Chen M., Jones J.E., Ritts A.C., Yu Q., Sun H.: Inhibition of *Staphylococcus epidermidis* biofilm by trimethylsilane plasma coating. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2012; 56: 5923-5937
- [60] Maciejewska M., Bauer M., Dawgul M.: Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* 2016; 55: 3-11
- [61] Marsh E.K., May R.C.: *Caenorhabditis elegans*, a model organism for investigating immunity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012; 78: 2075-2081
- [62] McConoughey S.J., Howlin R., Granger J.F., Manring M.M., Calhoun J.H., Shirliff M., Kathju S., Stoodley P.: Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future Microbiol.*, 2014; 9: 987-1007
- [63] McLean J., Ona O.N., Majors P.D.: Correlated biofilm imaging, transport and metabolism measurements via combined nuclear magnetic resonance and confocal microscopy. *ISME J.*, 2008; 2: 121-131
- [64] Mokhova E.N.: Living unicellular eukaryote *Tetrahymena pyriformis* as a model for study. *Nature Prec.*, <http://dx.doi.org/10.1038/npre.2011.4521.4> (05.04.2011)
- [65] Mosen T., Lövgren E., Widerström M., Wallinder L.: In vitro effect of ultrasound on bacteria and suggested protocol for sonication and diagnosis of prosthetic infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2009; 47: 2496-2501
- [66] Montgomery N.L., Banerjee P.: Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes* in biofilms by pulsed ultraviolet light. *BMC Res. Notes*, 2015; 8: 235
- [67] Nadell C.D., Drescher K., Wingreen N.S., Bassler B.L.: Extracellular matrix structure governs invasion resistance in bacterial biofilms. *ISME J.*, 2015; 9: 1700-1709
- [68] National Institutes of Health, USA, Research on microbial biofilms, <https://grants.nih.gov/grants/guide/pa-files/PA-03-047.html> (10.05.2018)
- [69] Nett J.E., Andes D.R.: Fungal biofilms: In vivo models for discovery of anti-biofilm drugs. *Microbiol. Spectr.*, 2015; 3: E30-E38
- [70] Neu T.R., Lawrence J.R.: Investigation of microbial biofilm structure by laser scanning microscopy. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2014; 146: 1-51
- [71] Nobile C.J., Fox E.P., Nett J.E., Sorrels T.R., Mitrovich Q.M., Hernandez A.D., Tuch B.B., Andes D.R., Johnson A.D.: A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell*, 2012; 148: 126-138
- [72] NOMORFILM: Periodic reporting for period 1 - Novel marine biomolecules against biofilm. Application to medical devices. https://cordis.europa.eu/result/rcn/196368_en.html (10.05.2018)
- [73] Obłąk E., Piecuch A., Guz-Regner K., Dworniczek E.: Antibacterial activity of gemini quaternary ammonium salts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2014; 350: 190-198
- [74] O'Toole A., Ricker E.B., Nuxoll E.: Thermal mitigation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Biofouling*, 2015; 31: 665-675
- [75] Paluch E., Piecuch A., Obłąk E., Lamach Ł., Wilk K.A.: Antifungal activity of newly synthesized chemodegradable dicephalic-type cationic surfactants. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, 2018; 164: 34-41
- [76] Papenfort K., Bassler B.L.: Quorum-sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2016; 14: 576-588
- [77] Pei R., Lamas-Samanamud G.R.: Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014; 80: 5340-5348
- [78] Petrova O.E., Sauer K.: Escaping the biofilm in more than one way: Desorption, detachment or dispersion. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2016; 30: 67-78
- [79] Pfaller M.A., Diekema D.J.: Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2007; 20: 133-163
- [80] Piasecki T., Guła G., Waszczuk K., Drulis-Kawa Z., Gotszalk T.: Quartz tuning fork as *in-situ* sensor of bacterial biofilm. *Procedia Eng.*, 2014; 87: 369-375
- [81] Raghupathi P.K., Liu W., Sabbe K., Houf K., Burmølle M., Sørensen S.J.: Synergistic interactions within a multispecies biofilm enhance individual species protection against grazing by a pelagic protozoan. *Front Microbiol.*, 2018; 8: 2649
- [82] Roper M.C.: *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*: lessons learned from a xylem-dwelling pathogen of sweet corn. *Mol. Plant. Pathol.*, 2011; 12: 628-637
- [83] Rothenberg A.C., Wilson A.E., Hayes J.P., O'Malley M.J., Klatt B.A.: Sonication of arthroplasty implants improves accuracy of periprosthetic joint infection cultures. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2017; 475: 1827-1836
- [84] Rudney J.D., Chen R., Lenton P., Li J., Li Y., Jones R.S., Reilly C., Fok A.S., Aparicio C.: A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. *J. Appl. Microbiol.*, 2012; 113: 1540-1553

- [85] Sands K.M., Twigg J.A., Lewis M.A., Wise M.P., Marchesi J.R., Smith A., Wilson M.J., Williams D.W.: Microbial profiling of dental plaque from mechanically ventilated patients. *J. Med. Microbiol.*, 2016; 65: 147-159
- [86] Schuch R., Khan B.K., Raz A., Rotolo J.A., Wittekind M.: Bacteriophage lysin CF-301, a potent antistaphylococcal biofilm agent. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 2017; 61: e02666-16
- [87] Segev G., Bankirer T., Steinberg D., Duvdevani M., Shapur N.K., Friedman M., Lavy E.: Evaluation of urinary catheters coated with sustained-release varnish of chlorhexidine in mitigating biofilm formation on urinary catheters in dogs. *J. Vet. Intern. Med.* 2013; 27: 39-46
- [88] Serra D.O., Richter A.M., Hengge R.: Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *J. Bacteriol.*, 2013; 195: 5540-5554
- [89] Singha P., Locklin J., Handa H.: A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters. *Acta Biomater.*, 2017; 50: 20-40
- [90] Smith R.A., M'ikanatha N.M., Read A.F.: Antibiotic resistance: A primer and call to action. *Health Commun.*, 2015; 30: 309-314
- [91] Speziale P., Pietrocola G., Foster T.J., Geoghegan J.A.: Protein-based biofilm matrices in *Staphylococci*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2014; 4: 171
- [92] Ullman A.J., Cooke M.L., Mitchell M., Lin F., New K., Long D.A., Mihala G., Rickard C.M.: Dressings and securement devices for central venous catheters (CVC). *Cochrane Database Syst Rev.*, 2015: CD010367
- [93] Vandecandelaere I., Van Nieuwerburgh F., Deforce D., Coenye T.: Metabolic activity, urease production, antibiotic resistance and virulence in dual species biofilms of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*, 2017; 12: e0172700
- [94] Vaze N.D., Park S., Brooks A.D., Fridman A., Joshi S.G.: Involvement of multiple stressors induced by non-thermal plasma-charged aerosols during inactivation of airborne bacteria. *PLoS One*, 2017; 12: e0171434
- [95] Verkaik M.J., Busscher H.J., Rustema-Abbing M., Slomp A.M., Abbas F., van der Mei H.C.: Oral biofilm models for mechanical plaque removal. *Clin. Oral. Investig.*, 2010; 14: 403-409
- [96] Verma S.C., Miyashiro T.: Quorum sensing in the squid-vibrio symbiosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013; 14: 16386-16401
- [97] Washer L.L., Gutowski K.: Breast implant infections. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 2012; 26: 111-125
- [98] Westberg M., Grøgaard B., Snorrason F.: Infection after constrained condylar knee arthroplasty: Incidence and microbiological findings in 100 consecutive complex primary and revision total knee arthroplasties. *J. Bone Jt. Infect.*, 2018; 3: 260-265
- [99] Yang L., Haagensen J.A., Jelsbak L., Johansen H.K., Sternberg C., Høiby N., Molin S.: In situ growth rates and biofilm development of *Pseudomonas aeruginosa* populations in chronic lung infections. *J. Bacteriol.*, 2008; 190: 2767-2776
- [100] Yin R., Dai T., Avci P., Jorge A.E., de Melo W.C., Vecchio D., Huang Y.Y., Gupta A., Hamblin M.R.: Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2013; 13: 731-762
- [101] Yokoyama H., Mizutani R.: Structural biology of DNA (6-4) photoproducts formed by ultraviolet radiation and interactions with their binding proteins. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014; 15: 20321-20338
- [102] Zarnowski R., Westler W.M., Lacmbouh G.A., Marita J.M., Bothe J.R., Bernhardt J., Lounes-Hadj Sahraoui A., Fontaine J., Sanchez H., Hatfield R.D., Ntambi J.M., Nett J.E., Mitchell A.P., Andes D.R.: Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio*, 2014; 5: e01333-14
- [103] Zimmerman A.B., Nixon A.D., Rueff E.M.: Contact lens associated microbial keratitis: practical considerations for the optometrist. *Clin. Optom.*, 2016; 8: 1-12

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.