

Potencjalne wykorzystanie roślinnych olejków eterycznych w zwalczaniu zakażeń z udziałem biofilmów drobnoustrojów

Aleksandra Budzyńska, Barbara Różalska

z Katedry Immunologii i Biologii Infekcyjnej Instytutu Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii Uniwersytetu Łódzkiego

Co to jest biofilm?

Większość bakterii, grzybów i pierwotniaków występujących w środowisku naturalnym jest związana z powierzchnią stałą, w postaci tzw. biofilmów. Są to trwałe, zwykle wielowarstwowe skupiska mikrokolonii komórek otoczonych zewnątrzkomórkowym amorficznym polimerem. Tworzą w efekcie wysoce zorganizowane i dynamiczne struktury przestrzenne, przyjmujące wygląd wysokich kolumn, postaci grzybkowatych, rzadziej występują jako monowarstwa drobnoustrojów. Niezależnie od rodzaju ekosystemu, w którym biofilm powstaje, stadia jego tworzenia są podobne. Pierwszym etapem jest przyleganie komórek drobnoustrojów do powierzchni. Ich adhezja do podłoża abiotycznego i wzajemna agregacja komórek uwarunkowana jest na ogół fizykochemicznymi interakcjami nieswoistymi (często odwracalnymi). Natomiast adhezja mikroorganizmów do komórek w tkankach, skutkująca adhezją trwałą, wymaga udziału ich swoistych adhezyń i receptorów obecnych na danej powierzchni biologicznej. W optymalnych warunkach mikrośrodowiska następnym etapem jest dojrzewanie biofilmu, co oznacza zwiększanie gęstości komórek, spoiwości struktury i zróżnicowania fenotypowego mikroorganizmów znajdujących się w różnych jej miejscach. Podczas fazy dojrzewania biofilmu następuje dalszy przyrost objętości polimeru pozakomórkowego, aż do całkowitego otoczenia powstałych mikrokolonii. Na tym etapie w skład całego biofilmu mogą wchodzić, oprócz mikroorganizmów, komórki gospodarza, liczne substancje organiczne, tj. białka, kwasy nukleinowe, wielocukry, lipidy, wytrącone minerały itp. Wiele biofilmów uzyskuje w ten sposób wspomnianą wyżej złożoną strukturę przestrzenną, w której poszczególne skupiska mikroorganizmów poprzedzielane są specjalnymi „kanałami wodnymi” zapewniającymi dostęp substancji odżywczych i odpływu produktów przemiany materii na całej grubości warstwy. W tej fazie dojrzalsi pojedyncze komórki lub ich agregaty w sposób kontrolowany

opuszczają biofilm, aby tworzyć nowe skupiska, niekiedy w odległych mikroniszach środowiska zewnętrznego lub zasiedlonego organizmu wyższego (1, 2).

Jak wspomniano, biofilmy są obecne nie tylko na różnorodnych wilgotnych powierzchniach abiotycznych, ale również *in vivo* w różnych ontocenozach człowieka i zwierząt. Tkanki zwierzęce są jednymi z bardziej „atrakcyjnych” naturalnych powierzchni dla utrzymywania się biofilmu, ponieważ pozostają we względnej homeostazie, są wilgotne i bogate w składniki odżywcze. Przykładem biofilmów fizjologicznie korzystnych są populacje zasiedlające zdrową skórę, jamę ustną, nosogardziel, śluzówkę przewodu pokarmowego czy dróg moczowo-płciowych. Z kolei, przejściowa kolonizacja uszkodzonych tkanek lub ciał obcych umieszczonych w organizmie (wszczepów medycznych) jest obojętna, dopóki pozostaje pod skuteczną kontrolą mechanizmów nadzoru immunologicznego. Natomiast w przypadku zaistnienia warunków stresowych (różnej natury) skutkujących obniżeniem zdolności obronnych gospodarza, może dojść do rozwoju zakażeń z udziałem biofilmu. Przykładem takich patologii u człowieka są np. zakażenia towarzyszące stosowaniu biomateriałów medycznych (cewniki, dreny, protezy, zespolenia naczyń i kostne itp.), przewlekłe zakażenia otolaryngologiczne (gardła, zatok, ucha) i zakażenia oskrzelowo-płucne. Do tej kategorii należą też nawracające zakażenia urologiczno-ginekologiczne, przewlekłe zakażenia skóry i różnego typu ran oraz wiele innych. Z racji uwarunkowań biochemiczno-immunologicznych to właśnie mikrourazy skóry i błon śluzowych oraz większe, szczególnie trudno gojące się rany, są sprzyjającym środowiskiem dla powstania biofilmu. Stanowią bowiem szerokie wrota zakażenia z łatwo dostępnymi dla drobnoustrojów składnikami odżywczymi, a zalegająca zazwyczaj warstwa martwiczej tkanki i płynu wysiękowego jest dogodną powierzchnią dla ich adhezji, jednocześnie ograniczając penetrację leków i zastosowanych antyseptyków (2, 3, 4).

Potential use of essential oils to fight infections involving biofilms of microorganisms

Budzyńska A., Różalska B., Department of Immunology and Infectious Biology, Institute of Microbiology, Biotechnology and Immunology, University of Lodz

The purpose of this paper was to present a new alternative for treating bacterial chronic infections with biofilm formation. Biofilm formation by microbes is their significant pathogenic factor, especially important in chronic infections. Due to the high resistance of biofilm and the frequent failures of chemotherapy, it seems necessary to take recourse to unconventional treatment methods involving e.g. the use of some phytocompounds. In particular it would be valuable to achieve a synergistic effect with chemotherapeutics or to diminish the virulence of the pathogens. In chronically infected wounds treatment it is important not so much the total eradication of pathogens, but keeping their population below a specified threshold quantities which may threaten the development of invasive infection. Not without significance is the possibility to reveal the immunomodulating activity of phytochemicals used. As it is known from clinical observations of wounds and ulcers, topical antiseptic preparations, including essential oils, work well in preventing infection and help to systemic chemotherapy. We believe that improving the efficacy of chemotherapy and the development of standards for alternative treatment of biofilm-type infections, by using a combination of substances which do not cause drug resistance, is a challenge of modern medicine. An important aspect of research in this area, ensuring the reliability of results is to adjust the methodology parameters to the physicochemical properties of studied products acting on the complex structure of biofilms.

Keywords: chronic infections, biofilms, alternative therapies, essential oils.

Dlaczego zakażenia z udziałem biofilmu są trudne do eradykacji?

Odpowiedzi na powyżej postawione pytanie i co można zaproponować w zamian, poszukuje się od wielu lat. Wiadomo, że wysoce wzmożona oporność struktury biofilmu dotyczy zarówno działania większości antybiotyków i chemioterapeutyków, wielu środków antyseptycznych i dezynfekcyjnych, jak i efektorowych składników humoralnych i komórkowych układu odpornościowego. Aktualnie wiemy, że mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska są złożone i zależą zarówno od rodzaju mikroorganizmu, miejsca patologii tkankowej, statusu immunologicznego organizmu, jak i rozważanej grupy terapeutycznej leku. Mianowicie, może zachodzić ograniczona penetracja antybiotyku w biomasę; mniejsza podatność na ich działanie z racji zwolnionego metabolizmu drobnoustrojów znajdujących się w głębszych warstwach

biofilmu; wzrasta ekspresja potencjalnych genów oporności. Akceptowana jest też teoria pojawiania się w biofilmie komórek wykazujących nie tyle większą oporność, ile tolerujących dane stężenie antybiotyku (persisters, komórki „uparte”), które po zaprzestaniu działania antybiotyku, odbudowują biofilm od nowa, powodując utrwalenie się zakażenia przewlekłego (2, 4, 5).

Czy fitozwiązki mogą być alternatywą wobec klasycznej antybiotyko-/chemioterapii?

Wobec oczywistego wyczerpywania się możliwych klasycznych opcji w terapii zakażeń przebiegających z udziałem biofilmów wciąż poszukuje się nowych rozwiązań. Coraz częściej rozważa się wykorzystanie w tym celu naturalnie istniejących produktów wchodzących w skład układu obronnego roślin i zwierząt oraz wzorowanych na nich nowych związków chemicznych. Zaletą może być ich skuteczne działanie, zwykle niezależne od preferowanego fenotypu danego drobnoustroju (osiadłego lub rozproszonego) i reprezentowanego profilu lekowrażliwości. Co ważne, z racji wielokierunkowego działania większości naturalnych produktów biobójczych, istnieje znikome zagrożenie generowaniem mechanizmów oporności patogenów. Za celowością terapeutycznego wykorzystania surowców naturalnych, np. fitozwiązków, przemawiają też inne argumenty. Ich stabilna pozycja wynika przede wszystkim ze sprawdzonego (już w medycynie ludowej) działania leczniczego związanego z szerokim spektrum aktywności biologicznej. Produkty roślinne (nalewki, odwary, ekstrakty, olejki eteryczne) oprócz aktywności przeciwdrobnoustrojowej często cechują się działaniem przeciwzapalnym, przeciwbólowym oraz immunomodulującym (6, 7).

Rośliny, podobnie jak organizmy zwierzęce, wykształciły w drodze ewolucji mechanizmy pozwalające na unikanie efektów ataku mikroorganizmów, oparte na wytwarzaniu substancji ochronnych będących zazwyczaj produktami metabolizmu wtórnego. Obejmują one dwa główne rodzaje substancji syntetyzowanych w celu zapobiegania (prohibityny) lub naprawy zaistniałych uszkodzeń tkanek rośliny (fitoaleksyny). Związki o silnej aktywności bakterio-, grzybobójczej i bójczej zaliczane są w większości do fitoaleksyn. W obrębie tej grupy bardzo ważne wydają się olejki eteryczne, pod względem chemicznym – złożone mieszaniny substancji, z których przynajmniej jedna wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe. Największa grupa związków chemicznych wchodzących w ich skład to syntezowane z jednostek izoprenowych terpeny. Należące do tej klasy monoterpeny i seskwiterpeny, obok

diterpenów i innych związków aromatycznych lub alifatycznych, są najczęstszymi jednostkami chemicznymi identyfikowanymi w olejkach eterycznych. Ze względu na silną aktywność przeciwdrobnoustrojową warto wymienić chociażby aldehyd cynamonowy, cytral A i B, tymol, geraniol, mentol, terpinen-4-ol, linalol, menton, 1,8-cyneol, D-limonen, alfa-pinen, karwakrol, eugenol, chamazulen czy borneol. Uważa się, iż mechanizmy, przez które składniki olejków eterycznych hamują wzrost mikroorganizmów, mogą być częściowo zależne od ich lipofilności/hydrofobowości. Ta cecha umożliwia im wbudowywanie i uszkodzanie dwuwarstwy lipidowej błony komórkowej i mitochondriów lub upośledzenie działania, istotnych dla przeżycia drobnoustrojów systemów enzymatycznych i przebiegu ich szlaków metabolicznych (8, 9, 10).

Olejki eteryczne jako preparaty o aktywności przeciwbiofilmowej

Naukowe podejście do obserwacji wywodzących się z praktyki medycyny ludowej, w kwestii wykorzystania w tym celu właśnie produktów roślinnych, to jeden z bardziej obiecujących aspektów alternatywnych metod zwalczania zakażeń biofilmowych. Ten nurt badawczy realizowany jest od kilku lat w naszym zespole przez poszukiwanie fitoterapeutyków (ekstrakty roślinne bogate w związki polifenolowe oraz olejki eteryczne i ich składniki) o potencjalnej aktywności antyadhezyjnej, antybiofilmowej i biobójczej. Pozostając w temacie wykorzystania produktów roślinnych do zwalczania biofilmów, nie sposób nie wspomnieć w tym kontekście o ich zastosowaniu w leczeniu mikrourazów i ran przewlekle zakażonych. Swoją długą historię etnomedycyną w tym zakresie ma olejek eteryczny z liści drzewa herbacianego (*Melaleuca alternifolia*). Jest on również skuteczny w zwalczaniu innych schorzeń dermatologicznych o podłożu bakteryjnym, wirusowym, grzybiczym i pierwotniakowym. W literaturze można też znaleźć interesujące wyniki badań poświęconych antybiofilmowemu działaniu innych olejków eterycznych oraz wielu izolowanych z nich składników (11, 12, 13, 14). W badaniach własnych wykazano np. aktywność bójczą olejków eterycznych pozyskanych nie tylko z liści drzewa herbacianego, ale i z kwiatów lawendy (*Lavandula angustifolia*), z owocni cytrynowca zwyczajnego (*Citrus limon*) oraz ziela melisy lekarskiej (*Melissa officinalis*), użytych wobec hodowli rozproszonej i biofilmowej *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* (15). Dużo uwagi w literaturze poświęca się badaniom aktywności przeciwingrzybiczej i przeciwbakteryjnej olejków eterycznych przeciwko takim patogenom, jak

drożdżaki *Candida albicans*, różne gatunki dermatofitów i grzybów pleśniowych, bakterie *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae*, *E. coli* oraz odporne na antybiotyki szczepy gronkowców *S. aureus* (methicilin resistant *S. aureus* – MRSA) czy wankomycynooporne *Enterococcus* spp. (vancomycin resistant enterococci – VRE). Należy zauważyć, iż wszystkim z wymienionych bakterii i grzybów są zdolne w określonych warunkach tworzyć biofilmy.

W kontekście rosnącej oporności drobnoustrojów wobec dostępnych leków na szczególną uwagę zasługuje intensywnie badana możliwość wykorzystania produktów roślinnych nie tylko w roli preparatów działających bezpośrednio biostatycznie lub biobójczo, ale też jako czynników modulujących oporność drobnoustrojów lub obniżających ich wirulencję. Jak się okazuje, wiele związków roślinnych ma zdolność oddziaływania na niektóre struktury i niektóre mechanizmy odpowiedzialne za reprezentowany fenotyp oporności bakterii i grzybów na leki. Niezwykle interesujący nurt badań światowych to poszukiwanie wspomnianego wcześniej możliwego synergizmu pomiędzy olejkami eterycznymi a antybiotykami. Może on przynieść nie tylko wyraźne zahamowanie wzrostu nawet wielolekoopornych drobnoustrojów, ale też możliwość uzyskania efektu odległego w czasie tzw. efektu poantybiotykowego (post-antibiotic effect – PAE; 8, 16, 17, 18, 19).

Potrzeba weryfikacji metodyki badania aktywności przeciwdrobnoustrojowej olejków eterycznych

Z powyższych pobieżnych rozważań wynika, iż z uwagi na znaną wysoką lekooporność biofilmów, wypracowanie standardów alternatywnego leczenia zakażeń człowieka i zwierząt przebiegających z ich udziałem, stanowi ważny nurt badawczy mikrobiologii i medycyny. Jak wspomniano wcześniej, w tym zakresie tematycznym wzrasta zainteresowanie badaniem zarówno aktywności bezpośredniej różnych czynników biobójczych pochodzenia naturalnego, jak i ich połączeń z antybiotykami. W celu ewaluacji efektu ich działania na biomasę drobnoustrojów stosuje się różnorodne techniki odmienne pod względem sposobu hodowli i analizy otrzymanych biofilmów (20, 21, 22). Dobór procedury oceny żywotności biofilmu poddanego działaniu badanych substancji jest niezwykle ważny i zależy w dużym stopniu od planowanego założenia pracy.

Celem naszych już opublikowanych badań było przedstawienie metodyki służącej ocenie aktywności przeciwbiofilmowej olejków eterycznych (23, 24). Z uwagi bowiem na ich oleistą konsystencję oraz w wielu przypadkach lotność składników

ustalenie optymalnych parametrów metody badawczej staje się kluczowym elementem decydującym o wiarygodności otrzymanych wyników. Stwierdzono, że np. olejek goździkowy (*Oleum Caryophylli*) i, co ważne, jego lotne składniki wykazują aktywność przeciwbiofilmową, ocenioną w oryginalnie opracowanym teście „in-sertowym”. Na membranach insertów do płytek hodowlanych zakładano biofilmy *S. aureus* i *C. albicans*, po czym poddawano je bezpośredniemu działaniu fazy płynnej olejku (przez zanurzenie insertu) lub działaniu jego frakcji lotnej (inserty umieszczane w szczelnie zamkniętych pojemnikach, z zachowaniem wolnej przestrzeni między membraną a powierzchnią płynnego olejku). Ustalono MBEC₇₅ (minimalne stężenie eradykujące co najmniej 75% biomasy) dla fazy płynnej olejku wynosiło 3,125% (v/v). Jak się spodziewano było to stężenie wyższe, odpowiednio, 8 lub 16 razy od stężenia hamującego wzrost hodowli rozproszonych tych patogenów w czasie 24 godzinnej koinkubacji. Należy jednak zauważyć, iż ten istotny (75%) efekt redukcji żywotności biofilmu uzyskano już po ich krótko trwającej (4 godziny) ekspozycji na działanie fazy płynnej olejku goździkowego. Z kolei, stężenie frakcji lotnej tego olejku, aktywne wobec biofilmu *S. aureus* także już w czasie 4 godzin działania wynosiło 0,66%, a wobec biofilmu *C. albicans* – 1,32%. Uzyskanie w naszej pracy efektu działania frakcji lotnej olejku jest interesujące w świetle faktu planowanych przez nas badań nad zwalczaniem w ten sposób biofilmów bakteryjnych, grzybowych i biofilmów mieszanych, będących przyczyną np. przewlekłych zakażeń miejscowych. Tym bardziej jest propozycja zastosowania w celach terapeutycznych frakcji lotnej olejku wydają się uzasadnione obserwacjami klinicznymi. Wynika z nich, iż miejscowa aplikacja chemioterapeutyków w kremie, maści lub zasypcie bezpośrednio na zakażoną ranę, często może utrudniać odpływ wydzieliny, zwiększać proces zapalny i opóźnić ziarninowanie i gojenie tkanki. W tym kontekście, z uwagi na możliwe działanie drażniące lub cytotoksyczne fazy płynnej olejków, skuteczność ich frakcji lotnych może okazać się opcją terapeutyczną wartą rozważenia (23).

Z kolei, w naszej innej wcześniej opublikowanej pracy, badano wrażliwość *C. albicans* i *C. glabrata* na wybrane leki antymikotyczne w ich połączeniu z olejkami eterycznymi – geraniowym (*Oleum Geranii*) lub goździkowym (*Oleum Caryophylli*) i ich najbardziej aktywnymi składnikami. Do oceny efektu synergistycznego flukonazolu oraz worykonazolu i olejków (w fazie płynnej lub lotnej) zastosowano standardową metodę paskową (gradientowo-dyfuzyjną), w modyfikacjach własnych. Stwierdzono, że np. olejek geraniowy użyty w stężeniu ½

MIC wobec *C. albicans* spowodował spadek wartości MIC flukonazolu z 12,0 mg/l do 0,064 mg/l oraz worykonazolu z 0,125 mg/l do 0,006 mg/l. Wychodząc z założenia, iż w niektórych olejkach eterycznych frakcje najbardziej aktywne stanowią związki lotne, dokonano następnej modyfikacji metody. Dla wykazania synergizmu antymikotyków i olejków/składników w fazie lotnej wykorzystano metodę odwróconej szalki Petriego. W tym celu nasycono krążek biuły roztworem olejku w stężeniu ½ MIC i umieszczono na wieczku szalki. Stworzono w ten sposób kontrolowaną ilościowo mikroatmosferę nad podłożem z posiewem powierzchniowym *Candida* spp. Uzyskano efekt synergistyczny leków i frakcji lotnej olejków, przejawiający się kilkakrotnym obniżeniem wartości MIC antymikotyków. Metodyka opisana powyżej może być równie użyteczna w badaniach dotyczących synergistycznego działania dowolnych antybiotyków, antyseptyków i nowych związków potencjalnie aktywnych wobec innych rodzajów grzybów oraz bakterii (24).

Podsumowanie

Tworzenie biofilmu przez bakterie i grzyby jest istotnym czynnikiem ich chorobotwórczości, szczególnie zaznaczającym się w patogenezie zakażeń przewlekłych. Ze względu na wysoką oporność biofilmu i częste niepowodzenia antybiotykowo-/chemioterapii, konieczne wydaje się poszukiwanie niekonwencjonalnych metod leczenia, np. z wykorzystaniem produktów roślinnych. W szczególności byłoby cenne, aby przez ich zastosowanie osiągnąć efekt synergii z lekami tradycyjnymi lub spowodować zmniejszenie zjadliwości patogenów. W terapii zakaźnych stanów zapalnych i ran przewlekłe zakażonych istotna jest nie tyle całkowita eradykacja patogenów, co utrzymanie ich populacji poniżej określonego progu ilościowego, stanowiąc zabezpieczenie przed rozwojem zakażenia. Nie bez znaczenia jest możliwe jednoczesne ujawnienie się aktywności immunomodulującej zastosowanych fitozwiązków. Jak wiadomo z obserwacji klinicznych, miejscowo stosowane preparaty antyseptyczne dobrze sprawdzają się w prewencji zakażeń oraz w leczeniu towarzyszącym chemioterapii systemowej ran i owrzodzeń z cechami infekcji. Uważamy, że poprawa skuteczności chemioterapii zakażeń „biofilmowych” i dalszy rozwój standardów alternatywnego leczenia za pomocą kombinacji substancji, które nie generują oporności na leki, jest wyzwaniem współczesnej medycyny. Ważnym aspektem badań w tym zakresie zapewniających wiarygodność wyników, jest dostosowanie parametrów metodycznych do charakteru fizykochemicznego analizowanych produktów oddziałujących na złożoną strukturę biofilmu.

Piśmiennictwo

1. Prakash B., Veeragowda B. M., Krishnappa G.: Biofilms: A survival strategy of bacteria. *Curr. Sci.* 2003, **85**, 1299-1307.
2. Bryers J. D.: Medical biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 2008, **100**, 1-17.
3. Trafny A. E.: Rola biofilmów w patogenezie zakażeń człowieka. *Post. Mikrobiol.* 2008, **47**, 353-357.
4. Barańska-Rybak W., Kamysz W.: Rola biofilmu w ranach przewlekłych. *Zakażenia.* 2011, **4**, 75-82.
5. Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O.: Antibiotic resistance of bacterial biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010, **35**, 322-332.
6. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M.: Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem. Toxicol.* 2008, **46**, 446-475.
7. Habbu P. V., Joshi H., Patil B. S.: Potential wound healers from plant origin. *PHCOG Rev.* 2007, **1**, 271-282.
8. Reichling J., Schnitzler P., Suschke U., Saller R.: Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Forsch. Komplementmed.* 2009, **16**, 79-90.
9. Kędzia A.: Ocena działania przeciwbakteryjnego olejku goździkowego (*Oleum Caryophylli*). *Postępy Fitoterapii* 2007, **2**, 66-70.
10. Kędzia A.: Przeciwrzybcze działanie olejku geraniowego (*Oleum Geranii*). *Postępy Fitoterapii* 2010, **4**, 217-221.
11. Carson C. F., Hammer K. A., Riley T. V.: *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, **19**, 50-62.
12. Cavanagh H. M. A., Wilkinson J. M.: Biological activities of Lavender essential oil. *Phytotherapy Res.* 2002, **16**, 301-308.
13. Pinto E., Vale-Silva L., Cavaleiro C., Salgueiro L.: Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (Eugenia caryophyllus) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.* 2009, **58**, 1454-1462.
14. Tullio V., Nostro A., Mandras N., Dugo P., Banche G., Cannatelli M. A., Cuffini A. M., Alonzo V., Carbone N. A.: Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J. Appl. Microbiol.* 2007, **102**, 1544-1550.
15. Budzyńska A., Więckowska-Szakiel M., Sadowska B., Kalembe D., Różalska B.: Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol. J. Microbiol.* 2011, **60**, 35-41.
16. Denning D. W., Hope W. W.: Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol.* 2010, **18**, 195-204.
17. Harriott M. M., Noverr M. C.: *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: Effects on antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, **53**, 3914-3922.
18. Warnke P. H., Sherry E., Russo P. A., Acil Y., Wilfang J., Sivananthan S., Sprengel M., Roldan J. C., Schubert S., Bredee J. P., Springer I. N.: Antibacterial essential oils in malodorous cancer patients: Clinical observations in 30 patients. *Phytomedicine* 2006, **13**, 463-467.
19. Hendry E. R., Worthington T., Conway B. R., Lambert P. A.: Antimicrobial efficacy of eucalyptus oil and 1,8-cineole alone and in combination with chlorhexidine digluconate against microorganisms grown in planktonic and biofilm cultures. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, **64**, 1219-1225.
20. Hanning C., Follo M., Hellwig E., Al-Ahmad A.: Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *J. Med. Microbiol.* 2010, **59**, 1-7.
21. Inouye S., Abe S., Yamaguchi H., Asakura M.: Comparative study of antimicrobial and cytotoxic effects of selected essential oils by gaseous and solution contacts. *Int. J. Aromather.* 2003, **1**, 33-41.
22. Muller G., Kramer A.: Biocompatibility index of antiseptic agent by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, **61**, 1281-1287.
23. Budzyńska A., Sadowska B., Paszkiewicz M., Różalska B.: Ocena działania bójeżego fazy płynnej i frakcji lotnej olejków eterycznych na hodowle biofilmowe *Staphylococcus aureus* oraz *Candida albicans*. Własne rozwiązania metodyczne. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2011, **63**, 327-331.
24. Różalska B., Sadowska B., Więckowska-Szakiel M., Budzyńska A.: Synergizm leków przeciwrzybczych i olejków eterycznych wobec *Candida* spp., oceniany zmodyfikowaną metodą gradientowo-dyfuzyjną. *Med. Dośw. Mikrobiol.* 2011, **63**, 163-169.

Prof. dr hab. Barbara Różalska, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź, e-mail: rozab@biol.uni.lodz.pl