

Właściwości biofilmu bakteryjnego warunkujące oporność na antybiotyki oraz metody jego zwalczania

Ewelina Czyżewska-Dors¹, Arkadiusz Dors¹, Małgorzata Pomorska-Mól²

z Zakładu Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach¹ oraz Katedry Nauk Przedklinicznych i Chorób Zakaźnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu²

Na całym świecie niezliczona liczba drobnoustrojów powoduje wiele ostrych i przewlekłych zakażeń u ludzi i zwierząt dzięki zdolnościom do tworzenia dynamicznej, przestrzennie złożonej i wielowarstwowej struktury zawierającej bakterie otoczone macierzą zbudowaną głównie z polimerów cukrów i białek (extracellular polymeric substances – EPS; 1). Obecnie wiadomo, że w środowisku naturalnym ponad 99% bakterii występuje w formie biofilmu, a nie jak sądzono prawie do końca XX w. w postaci pojedynczych, rozproszonych komórek określanych planktonem (2). Formowanie biofilmu przez patogenne bakterie jest uważane za główny czynnik wirulencji, zabezpieczający nie tylko przed niesprzyjającymi warunkami środowiska oraz mechanizmami odpowiedzi immunologicznej gospodarza, ale również przed ukierunkowanym działaniem środków przeciwbakteryjnych (3). Obecnie szacuje się, że zakażenia o podłożu biofilmowym odpowiadają za około 80% wszystkich zakażeń dotyczących zwierzęta i ludzi (4).

Biofilm może powstać na powierzchni żywych komórek, gdyż jego formowanie jest cechą naturalną wszystkich bakterii tworzących mikroflorę skóry i błon śluzowych. Również bakterie chorobotwórcze wnikające do organizmu w postaci planktonicznej, po wstępnym etapie adhezji do komórek gospodarza, tworzą we wrotach zakażenia biofilm (5). Bakterie formujące biofilm są również w stanie trwale i skutecznie kolonizować powierzchnie abiotyczne, co nasila problem zakażeń o podłożu biofilmowym z racji coraz powszechniejszego stosowania w medycynie ludzi i weterynaryjnej biomateriałów w postaci cewników moczowych, cewników naczyniowych, układu zastawkowego do drenażu komorowego, stentów oraz implantów itp.

Kolejnym ważnym aspektem zakażeń bakteryjnych z towarzyszącym biofilmem jest fakt, że około 61% zakażeń odnotowywanych u ludzi ma pochodzenie zoonotyczne (6). Przykładem zakażenia odzwierzęcego o podłożu biofilmowym są przewlekłe, trudno gojące się rany powstałe na skutek pogryzienia przez psa lub kota. Wydłużenie czasu gojenia tak powstałych ran związane jest z chorobotwórczym potencjałem występującego na zębach wielogatunkowego biofilmu, czyli płytki nazębnej (7). Kolejnym przykładem jest zakażenie układu moczowego człowieka uropatogennym szczepem *Escherichia coli* izolowanym od psa. Badania eksperymentalne wykazały, że biofilm formowany przez ten szczep wykazuje cytotoksyczność wobec komórek nabłonka pęcherza moczowego (8). Powyższe dane podkreślają rolę zakażeń o podłożu biofilmowym u ludzi

Properties of bacterial biofilm conditioning resistance to antimicrobial agents and methods of biofilm elimination

Czyżewska-Dors E.¹, Dors A.¹, Pomorska-Mól M.², Department of Swine Diseases, National Veterinary Research Institute, Pulawy¹, Department of Preclinical Sciences and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Poznań University of Life Sciences²

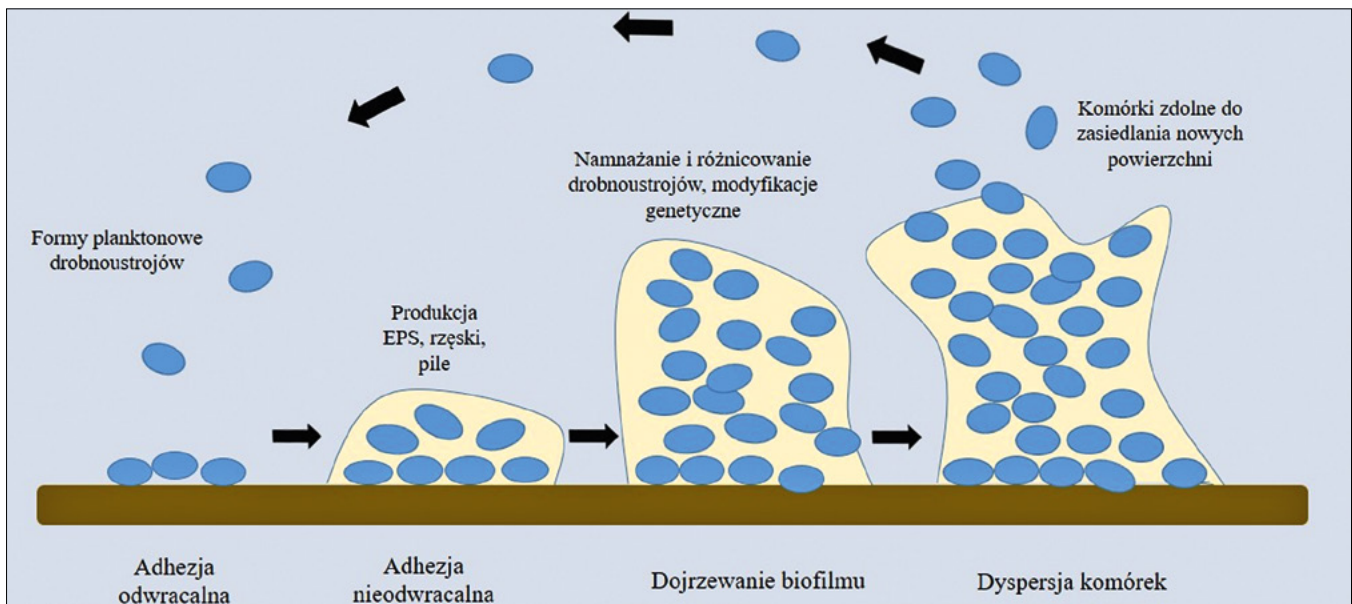
Bacterial biofilm is defined as a sessile, tridimensional microbial community that is attached to the abiotic or living surface and composed of bacteria embedded in a polysaccharide matrix. This polymicrobial community has an altered phenotype and is physiologically different from planktonic growing bacteria. It is known that 99% of all bacteria forming biofilms, with only 1% existing in the planktonic state. Biofilm-forming bacteria has increased resistance to inconvenient environmental conditions, antimicrobial agents and host's immune system. According to epidemiological studies bacterial biofilm is responsible for about 80% of infections affecting animal and human and approximately 61% of human biofilm infections are of zoonotic origin. This article presents the current understanding of biofilm formation. It is considered a crucial approach to develop techniques for biofilm eradication and for better control of biofilm-related infections in animals and humans.

Keywords: bacterial biofilm, antimicrobial resistance, therapeutic strategies.

i zwierząt oraz wskazują potrzebę poznania mechanizmów formowania i funkcjonowania biofilmu jako kluczowego postępowania niezbędnego do opracowania skutecznych i bezpiecznych strategii prewencji i zwalczania, zapobiegania oraz przeciwdziałania skutkom obecności tej formy życia drobnoustrojów.

Formowanie biofilmu

Powstawanie struktury biofilmu jest procesem wieloetapowym zależnym od budowy i właściwości powierzchni kolonizowanej, a także od właściwości mikroorganizmów. Tworzenie biofilmu składa się z czterech etapów (ryc. 1). W pierwszym etapie swobodnie pływające bakterie w formie planktonicznej osiadają i przyczepiają się do podłoża. Początkowo komórki wiążą się z podłożem na zasadzie niespecyficznych, odwracalnych oddziaływań, takich jak: siły grawitacyjne, elektrostatyczne, hydrofobowe van der Waalsa. W tej fazie istotną rolę odgrywają zewnątrzkomórkowe struktury bakteryjne, zwłaszcza białkowe wyrostki – fimbrie. Występujące na fimbriach grupy hydrofobowe ułatwiają bakteriom pokonywanie siły odpychania pomiędzy ujemnie naładowanymi komórkami gospodarza i powierzchnią drobnoustroju.



Ryc. 1. Następnie ma miejsce swoista reakcja pomiędzy adhezynami bakterii a podłożem. Ścisłe przyleganie komórek drobnoustroju do podłoża przez odpowiednio długi czas sprawia, że powstałe połączenie staje się nieodwracalne. Stopień przylegania zależy w większości przypadków od gatunku drobnoustroju i liczby komórek, szybkości przepływu cieczy oraz cech fizykochemicznych danej powierzchni. W tej fazie dochodzi do wytwarzania przez drobnoustroje pozakomórkowej substancji polisacharydowej (extracellular polymeric substance – EPS) określanej macierzą zewnątrzkomórkową. Po nieodwracalnym związaniu się komórek z podłożem i wytworzeniu EPS obserwuje się namnażanie i różnicowanie drobnoustrojów. Tempo i zakres zwiększania się warstw komórek tworzących biofilm zależy m.in. od: szybkości przepływu cieczy, zawartości czynników odżywczych w podłożu, dostępności żelaza, pH, osmolalności, zawartości tlenu, stężenia leków przeciwbakteryjnych oraz temperatury otoczenia. W końcowym etapie formowania biofilmu komórki bakteryjne odczepiają się od uformowanej struktury i w wyniku przemieszczenia się z krwią czy innymi płynami ustrojowymi dokonują ekspansji na nowe powierzchnie, dając początek nowemu biofilmowi (9, 10).

Struktura biofilmu

Dojrzały biofilm jest zwartą, trójwymiarową strukturą złożoną z kilku do kilkudziesięciu warstw bakterii tego samego lub różnych gatunków, żyjących w EPS. Pomiędzy poszczególnymi strukturami biofilmu znajduje się sieć kanałów wypełnionych płynem, łączących wnętrza biofilmu ze środowiskiem, w którym się znajduje, oraz rozprzeczających w obrębie biofilmu tlen oraz składniki odżywcze.

Ważnym składnikiem biofilmu jest EPS tworząca rusztowanie dla jego trójwymiarowej struktury i odpowiadająca za przyleganie do powierzchni oraz utrzymanie spójności w jego wnętrzu.

W dojrzałym biofilmie bakterie stanowią około 10%, a EPS około 90% całej masy. Głównymi składnikami EPS są: polisacharydy, białka, zewnątrzkomórkowe

DNA (eDNA), glikoproteiny, lipidy oraz kwasy lipotejchowe i lipopolisacharydy (LPS). Ponadto znaczną część macierzy (około 97%) stanowi woda chroniąca biofilm przed wysuszeniem (11, 12, 13).

Komponenty macierzy chronią drobnoustroje przed otaczającym środowiskiem, w tym czynnikami: fizycznymi (np. promieniowanie UV), chemicznymi (leki, środki dezynfekcyjne), biologicznymi (bakteriofagi, pierwotniaki, czynniki układu odpornościowego gospodarza). Ponadto uczestniczą w procesie powstawania oraz dojrzewania biofilmu, stabilizują strukturę biofilmu, a także są źródłem składników odżywczych i wody. Wykazano, że hydrofilowe egzopolimery zatrzymują w obrębie struktury biofilmu wodę, która może zostać wykorzystana przez drobnoustroje w momencie odwodnienia środowiska wzrostu bakterii. Ponadto EPS w przypadku braku substancji odżywczych może być źródłem pierwiastków biogenych (11, 12, 14).

Zjawisko „quorum sensing”

Znaczącą rolę w procesie formowania i funkcjonowania biofilmu odgrywa zjawisko „quorum sensing” (QS) znane też m.in. jako „wyczuwanie liczebności”. Quorum sensing należy rozumieć jako system komunikacji pomiędzy drobnoustrojami z udziałem związków chemicznych, regulowany przez określone geny w odpowiedzi na liczebność populacji drobnoustrojów. Poza formowaniem biofilmu mechanizm QS reguluje także inne właściwości bakterii, m.in. sporulację, wytwarzanie bakteriocyn, apoptozę oraz wirulencję (15).

Wyniki badań wskazują, że mikroorganizmy wytwarzają sygnały chemiczne zwane autoinduktorami, których wzrost stężenia zależy od liczebności rozwijającej się populacji bakterii (16, 17). Po przekroczeniu progowego stężenia autoinduktorów (co świadczy o osiągnięciu przez populację mikroorganizmów odpowiedniej liczebności, czyli kworum) dochodzi do skoordynowanej zmiany ekspresji genów, niezbędnej do efektywnego współdziałania całej populacji (18).

System komunikacji QS występuje u bakterii tego samego gatunku, jak i różnych gatunków (19). Wykazano,

że system przekazywania cząstek sygnałowych jest inny u bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, co determinowane jest odmienną strukturą ściany komórkowej (20). Funkcje autoinduktorów u bakterii Gram-ujemnych pełnią acylowane laktony homoseryny (AHL), natomiast u bakterii Gram-dodatnich specyficzne oligopeptydy powstałe w wyniku trawienia większych prekursorów białkowych. Autoinduktory służą do komunikowania się komórek w populacjach określonych szczepów oraz gatunków, natomiast komunikowaniu się komórek w mieszanych, międzygatunkowych populacjach bakterii uczestniczy cząsteczka sygnałowa AI-2. Uważa się, że ten sposób globalnej, skoordynowanej regulacji ważnych procesów życiowych w całej populacji komórek pozwolił bakteriom osiągnąć niektóre właściwości organizmów wielokomórkowych, stąd autoinduktory określane są jako „hormone like molecules”. Dlatego też biofilm uważany jest za prymitywny organizm wielokomórkowy (18, 21, 22).

Oporność biofilmu na substancje przeciwdrobnoustrojowe

Istotną właściwością komórek bakteryjnych stanowiących integralną część biofilmu jest ich zwiększona oporność na działanie czynników zewnętrznych, w tym antybiotyków. W porównaniu z formami planktonowymi bakterie wzrastające w formie biofilmu cechuje zwiększona, nawet 1000-krotnie, oporność wobec antybiotyków (23, 24). Stosowanie antybiotyków do walki z biofilmem może zmniejszyć liczbę komórek bakterii w biofilmie, jednak nie prowadzi do całkowitej jego eradykacji, czego konsekwencją jest rozwój przewlekłych i/lub nawracających zakażeń. Wysoka tolerancja biofilmu na działanie antybiotyków zależy od gatunku bakterii, fazy wzrostu drobnoustrojów, obecności EPS, indukcji mechanizmów oporności, produkcji enzymów degradujących antybiotyki oraz obecności subpopulacji komórek przetrwałych (persister cells; 9, 25, 26, 27, 28).

Macierz zewnątrzkomórkowa stanowi mechaniczną barierę uniemożliwiającą dyfuzję antybiotyku w głąb biofilmu, stąd też destrukcji ulegają jedynie komórki bakterii występujące na powierzchni. Natomiast bakterie osiadłe w głębszych warstwach są w stanie przetrwać zastosowaną antybiotykoterapię. Przykładem wpływu EPS na efektywność antybiotykoterapii jest biofilm *P. aeruginosa* rozwijający się u pacjentów z mukowiscydozą. Pałeczki *P. aeruginosa* wytwarzają trzy główne polisacharydy: Pel, Psl i alginian, pełniące różne funkcje w biofilmie. Spośród nich alginian (substancja o charakterze śluzowym) uważany jest za niezwykle ważny czynnik wirulencji *P. aeruginosa* (29). Alginian chroni mikroorganizmy przed opsonizacją przez przeciwciała gospodarza oraz zapobiega dyfuzji antybiotyków w głąb biofilmu. Szczepy syntetyzujące ten związek są nawet 1000 razy bardziej odporne na antybiotyki (np. tobramycynę) w porównaniu z bakteriami niesyntetyzującymi śluzu (30). Kolejnym przykładem może być egzopolimer – cepacian wytwarzany przez *Burkholderia cepacia* complex (Bcc), który jest odpowiedzialny za inhibicję przeciwbakteryjnego działania

peptydów przeciwdrobnoustrojowych oraz osłabianie chemotaksji neutrofilów. Ponadto związek ten jest akceptorem reaktywnych form tlenu (12).

Macierz biofilmu może pełnić również rolę aktywnej chemicznej bariery. Wykorzystując odmienną ładunków elektrycznych reagujących ze sobą cząstek, anionowa macierz może biosorbpcjonować i immobilizować jony metali ciężkich, kationowe peptydy przeciwdrobnoustrojowe oraz antybiotyki (np. aminoglikozydy).

Kolejnym czynnikiem warunkującym oporność biofilmów bakteryjnych na antybiotyki jest zróżnicowanie metaboliczne bakterii w obrębie biofilmu. Komórki mikroorganizmów, zwłaszcza występujące w jego głębszych warstwach, mając ograniczony dostęp do tlenu i składników odżywczych, obniżają tempo wzrostu i przechodzą w stan zbliżony do anabiozy. Ta zredukowana aktywność metaboliczna może przyczynić się do zwiększonej tolerancji wobec antybiotyków, których celem jest modyfikacja procesów zachodzących w komórce, takich jak replikacja i translacja DNA. Stosowane w leczeniu różnych chorób antybiotyki wykazują swoje działanie głównie wobec aktywnych metabolicznie rosnących komórek. Zmniejszona aktywność metaboliczna bakterii występujących w głębszych warstwach biofilmu może prowadzić do rozwoju oporności na antybiotyki i jego przetrwania.

Jednym z niedawno odkrytych mechanizmów warunkujących oporność bakterii na antybiotyki jest obecność aktywnych białek o właściwościach pompy (drug efflux pumps). Działanie pomp efluksowych mające na celu utrzymanie wewnątrzkomórkowej homeostazy polega na wypompowywaniu poza komórkę ubocznych produktów przemiany materii, autoinduktorów oraz substancji toksycznych, w tym antybiotyków. Pompy efluksowe różnią się budową, liczbą struktur transbłonowych, swoistością substratową oraz mechanizmem działania. Ze względu na liczbę komponentów transbłonowych, lokalizację, źródła energii, usuwane substancje podzielone zostały na 6 klas: MFS (major facilitator superfamily), SMR (small multidrug resistance family), MATE (multidrug and toxic compound extrusion family), ABC (ATP binding cassette superfamily), RND (resistance nodulation cell division family) i DMT (drug metabolite transporter; 31).

Pompy efluksowe występują zarówno u bakterii Gram-ujemnych, jak i Gram-dodatnich. U bakterii Gram-ujemnych białka transportowe tworzą potrójną strukturę, złożoną z białka wewnętrznej błony cytoplazmatycznej, białka zewnętrznej błony tworzącego kanał transportowy oraz z białka przestrzeni periplazmatycznej, łączącego oba wcześniejsze białka. U bakterii Gram-dodatnich pompy efluksowe są mniej skomplikowane, zbudowane z pojedynczego białka błonowego (31, 32). Pompy efluksowe charakteryzują się swoistością substratową. Niektóre z nich mogą być lekoswoiste i eksportować konkretną, charakterystyczną dla danego białka klasę związków antybakteryjnych, natomiast inne zdolne są wypompowywać antybiotyki należące do różnych klas (33, 34). Przykładowo występująca u *P. aeruginosa* pompa MexAB-OprM związana jest z opornością struktury biofilmu na działanie aztreonamu, gentamycyny, tetracykliny oraz tobramycyny, a pompa efluksowa PA1874-1877 z opornością

na działanie cyprofloksacyny, gentamycyny oraz tobramycyny (35).

Znaczącą rolę w zjawisku oporności biofilmu na antybiotyki odgrywiają komórki przetrwałe, tzw. persisters. Komórki te stanowią niewielką liczbowo część populacji biofilmu. Z racji tego, że nie wykazują wzrostu (stan spoczynku), zdolne są tolerować bardzo wysokie stężenia antybiotyków. Komórki persisters nie są mutantami bakterii opornych na antybiotyki, lecz rodzajem komórek o dzikim fenotypie, które powstają stochastycznie w populacji klonalnej genetycznie identycznych komórek. Powstawanie komórek przetrwałych mogą indukować różne czynniki stresowe, np. głódzenie, stres oksydacyjny i ciepły oraz aktywacja modułów toksyna-antytoksyna. Stosowane do walki z biofilmem antybiotyki zabijają komórki planktonowe oraz znaczą ilość komórek zawieszonych w biofilmie, pozostawiając komórki persisters nienaruszone. Po zaprzestaniu terapii antybiotykowej komórki persisters reaktywują się ze stanu uśpienia, odbudowują biofilm, co w konsekwencji prowadzi do nawrotu zakażenia (9).

Zaobserwowano, że w oporności biofilmu na substancje przeciwdrobnoustrojowe uczestniczy także systemem QS. Wykazano, że wysoka tolerancja biofilmu *P. aeruginosa* na działanie antybiotyków związana jest z formowaniem wielolekoopornych komórek persisters w odpowiedzi na molekuly sygnałowe AHL. Ponadto potwierdzono, że zastosowanie inhibitorów QS zwiększa wrażliwość biofilmu *P. aeruginosa* na działanie antybiotyków (36, 37). Jednakże związek QS i molekuł sygnałowych z opornością biofilmu na substancje przeciwdrobnoustrojowe nie jest w pełni wyjaśniony i wymaga dalszych badań.

Terapia przeciwbiofilmowa

Drobnoustroje występujące w biofilmie charakteryzują się wysoką opornością na działanie środków przeciwdrobnoustrojowych oraz odpowiedź układu immunologicznego gospodarza (28). Antybiotykoterapia wciąż stanowi najpowszechniejszą metodę walki z zakażeniami bakteryjnymi, jednak jej efektywność niszczenia biofilmu jest ograniczona. Badania *in vitro* i *in vivo* wykazały, że minimalne stężenie hamujące (MIC) i minimalne stężenie bójcze (MBC) dla komórek bakteryjnych biofilmu są zazwyczaj znacznie wyższe (około 10–1000 razy) niż dla ich form planktonowych (24, 38, 39). Zaobserwowane różnice są wynikiem odmiennych profili farmakokinetycznych i farmakodynamicznych środków przeciwdrobnoustrojowych pomiędzy biofilmem a formą planktoniczną. Użycie w terapii antybiofilmowej wysokich dawek antybiotyków nie jest praktykowane z racji możliwych powikłań w postaci uszkodzenia i dysfunkcji nerek oraz wątroby. Dlatego też odnalezienie skutecznej i bezpiecznej terapii przeciwbiofilmowej stało się nowym wyzwaniem dla świata nauki.

Terapia fagowa

Jedną z efektywnych terapii przeciwbiofilmowych stosowanych u ludzi oraz zwierząt jest terapia fagowa (fagoterapia). Bakteriofagi infekują i namnażają się

wyłącznie w komórkach bakteryjnych wrażliwych na danego faga. W komórce gospodarza możliwe są 4 cykle życiowe fagów – lityczny, lizogeny, pseudolizogeny oraz przewlekłego zakażenia. Spośród wymienionych cykli życiowych jedynie cykl lityczny, w którym zachodzi namnażanie fagów, prowadzi do śmierci komórki gospodarza. Unikalną właściwością bakteriofagów jest ich duża swoistość – zdolność do zakażenia jednego gatunku bakterii. Dzięki tej właściwości eliminowane są tylko patogenne szczepy bakterii bez niszczenia naturalnej flory gospodarza, co ma miejsce podczas klasycznej antybiotykoterapii. Kolejną, niezwykle istotną właściwością fagów jest zdolność do wykładniczego wzrostu, co oznacza, że wraz z nasileniem wzrostu bakterii wzrasta liczba wirusów, natomiast w chwili zmniejszania się liczby komórek maleje liczba fagów. Fundamentalną cechą fagów jest zdolność do zabijania bakterii antybiotykkoopornych. Właściwość ta związana jest z mutacjami w genomie faga, co daje możliwość adaptacji do ewoluujących komórek bakteryjnych. Liczne badania *in vitro* i *in vivo* potwierdziły skuteczność terapii fagowej w walce z biofilmem, zarówno dla bakterii wrażliwych, jak i opornych na standardową antybiotykoterapię (40, 41, 42, 43, 44, 45).

W uszkodzeniu komórek bakterii oraz macierzy biofilmu znaczącą rolę odgrywiają enzymy fagowe – lizyny i depolimerazy polisacharydów (DP). Lizyny odpowiedzialne są za niszczenie bakterii i uwolnienie wirusów potomnych, a DP degradują otoczkowe i strukturalne polisacharydy, w tym EPS biofilmu (46, 47). Z racji, że w środowisku biofilmy formowane są z różnych gatunków bakterii, efektywność fagoterapii, pomimo zastosowania mieszaniny różnych fagów, nie zawsze przynosi pożądane rezultaty (48, 49). Z tego też powodu podjęto próby łączenia terapii fagowej z np. antybiotykoterapią, środkami dezynfekcyjnymi, jonami metali (50, 51). Wyniki badań wykazały, że niskie stężenie cefotaksymu (CTX) prowadziło do 7-krotnego zwiększenia liczby fagów potomnych uwolnionych podczas lizy zakażonego, uropatogennego szczepu *E. coli* w porównaniu z liczbą fagów uzyskanych podczas zakażenia bakterii hodowanych na podłożu bez dodatku antybiotyku (50). Synergizm działania fagów z antybiotykami został nazwany synergizmem fagowo-antybiotykowym (Phage-Antibiotic Synergy, PAS). Synergizm działania fagów i chemioterapeutyków wykazano także w stosunku do biofilmu bakteryjnego. Łączne zastosowanie bakteriofaga T4 i CTX skutkowało znacząco wyższym stopniem degradacji biofilmu w stosunku do monoterapii CTX. Z kolei przy eradykacji biofilmu *Klebsiella pneumoniae* B5055 zaobserwowano, że amoksycylina do 4. dnia inkubacji efektywniej niszczy biofilm w porównaniu z fagami, natomiast w kolejnych dniach inkubacji skuteczniejsze w eliminacji biofilmu okazały się bakteriofagi (52). Łączne zastosowanie fagów wraz z cyprofloksacyną również okazało się efektywniejsze w walce z biofilmem *K. pneumoniae* niż działanie samego antybiotyku (47). Poza antybiotykami synergistyczny efekt działania przeciwbiofilmowego wykazano przy łącznym zastosowaniu fagów i środków dezynfekcyjnych, m.in.: chloru, podchlorynu, czwartorzędowych związków amoniowych (48, 53).

Laktoferyna

Substancją o potwierdzonych właściwościach przeciwbiofilmowych jest laktoferyna (Lf). Laktoferyna jest białkiem odporności nieswoistej wrodzonej, występującym w płynach i wydzielinach śluzowych ssaków, m.in. w sianie, mleku, łzach, ślinie, nasieniu. Magazynowana jest w ziarnistościach drugo- i trzeciorzędowych granulocytów obojętnochłonnych. Laktoferyna należy do rodziny transferyn i tak jak inne białka z tej rodziny, posiada bardzo duże powinowactwo do jonów żelaza. Sekwestracja żelaza przez laktoferynę uniemożliwia wykorzystanie tego metalu przez drobnoustroje (w tym biofilm), co zaburza ich prawidłowy wzrost i z tą zdolnością wiązania żelaza niegdyś łączono jej właściwości bakteriostatyczne (54). Obecnie wiadomo, że laktoferyna wykazuje także właściwości bakteriobójcze niezależne od sekwestracji żelaza (55). W przypadku bakterii Gram-ujemnych laktoferyna wiąże się z białkami obecnymi na powierzchni bakterii, prowadząc do uwolnienia LPS. Konsekwencją powyższego jest wzrost przepuszczalności błony komórkowej i uwrażliwienie na zmiany ciśnienia osmotycznego, działanie lizozymu oraz innych czynników o właściwościach antibakteryjnych. Niszczenie bakterii Gram-dodatnich odbywa się poprzez łączenie się fragmentów białka posiadających dodatni ładunek z błoną komórki bakteryjnej. Po związaniu błona komórkowa ulega zniszczeniu (56).

W literaturze przedmiotu odnaleźć można dane wskazujące na synergistyczne działanie laktoferyny i antybiotyków w walce z biofilmem. Zaobserwowano, że laktoferyna ALX-109 (kombinacja laktoferyny z hipotiocyanianem) wzmacnia zdolność tobramycyny i aztreonamu do hamowania formowania oraz redukcji dojrzalego biofilmu *P. aeruginosa* PAO1 wyizolowanego od pacjentów z mukowiscydozą. Zastosowanie samej laktoferyny ograniczało formowanie się biofilmu *P. aeruginosa* PAO1, jednak nie wpływało na dezintegrację dojrzalego biofilmu (57). Również użycie w terapii wyłącznie tobramycyny i/lub aztreonamu nie ograniczało toczącego się procesu zapalnego w drogach oddechowych. Synergistyczny efekt działania odnotowano także dla laktoferyny i rifampicy w odniesieniu do biofilmu Bcc (58). Odkrycie współdziałania laktoferyny i rifampicy było niezwykle istotne, gdyż Bcc cechuje się wrodzoną opornością na wiele klas antybiotyków i środków dezynfekcyjnych, co znacznie komplikuje leczenie zakażeń bakteryjnych. Synergizm działania odnotowano także dla laktoferyny i ksylitolu. Jednoczesne zastosowanie obu substancji zaburzało wzrost biofilmu oportunistycznego szczepu *P. aeruginosa* oraz MRSA wyizolowanych z przewlekłych, trudno gojących się ran (59, 60).

Inhibitory quorum sensing

Obecnie do walki z biofilmem wykorzystuje się także inhibitory systemu QS (quorum sensing inhibitors, QSIs). Ingerencja w system QS jest obiecującą metodą kontroli formowania biofilmu i związanych z nim zakażeń. Interferencja w QS przebiega na różnych płaszczynach, m.in. hamowanie generowania sygnału,

ingerencja w dystrybucję sygnału, blokowanie receptorów sygnałowych oraz hamowanie odpowiedzi na molekuly sygnałowe. Główną zaletą QSI w porównaniu z antybiotykami jest brak indukcji bakterii opornych. Zaobserwowano, że wiele związków chemicznych produkowanych przez rośliny, algi, wodorosty ma zdolność ingerencji w prawidłowe funkcjonowanie QS. Przykładem hamowania systemu QS jest zdolność biosyntezy halogenowanych furanonów przez wodorost morski *Delisea pulchra* występujący u wybrzeży Australii. Halogenowane furanony jako kompetycyjne analogi AHL, konkurując o miejsce wiązania na białku receptorowym LuxR, skutecznie zapobiegały tworzeniu biofilmu przez bakterie Gram-ujemne (22). Zakres działania furanonów obejmuje także zaburzenie działania AI-2 pomiędzy bakteriami Gram-ujemnymi i Gram-dodatnimi. Oprócz naturalnych furanonów ich syntetyczne analogii także charakteryzuje zdolność zaburzania QS (61).

Wartą uwagi naturalną substancją ingerującą w QS jest ekstrakt z czosnku – ajoen. Związek ten zmniejsza produkcję molekuł sygnałowych w biofilmie *P. aeruginosa* oraz wykazuje synergizm działania z tobramycyną w hamowaniu formowania biofilmu (62). Kolejną ważną zaletą QSI jest ich wpływ na wzrost wrażliwości biofilmu na działanie antybiotyków. Jednoczesne zastosowanie inhibitora QS FS3 i daptomycyny w celu zapobiegania formowania biofilmu *S. aureus* na protezach naczyniowych prowadziło do obniżenia wartości MIC i MBC dla daptomycyny (63). Wykazano także, że QSIs interferujące z AHL zwiększają efektywność działania tobramycyny wobec biofilmu *P. aeruginosa* i Bcc (64).

Inhibitory pomp efluksowych

Mając na uwadze znaczenie pomp efluksowych w oporności biofilmu na antybiotykoterapię, podjęto badania nad substancjami blokującymi ich działanie – inhibitory pomp efluksowych (efflux pump inhibitors, EPIs). Hamowanie działania pomp efluksowych może być osiągnięte m.in. poprzez zakłócenie ekspresji białek niezbędnych do budowy pompy, blokowanie zewnętrznych kanałów biorących udział w wypompowywaniu antybiotyków, zmianę struktury antybiotyku mającą na celu ograniczenie jego powinowactwa do wiązania z białkiem transportowym, dezintegrację elementów składowych pompy, ograniczenie dostępu do źródeł energii oraz zastosowanie substancji chemicznych o wyższym od antybiotyku powinowactwie do białek transportowych pompy. Dotychczas udało się zidentyfikować kilka grup związków chemicznych hamujących działanie pomp efluksowych, do których należą m.in. peptydomimetyki, chinoliny, arylopieryzyny i pirydopirymidyny. Jedną z pierwszych poznanych substancji o właściwościach inhibujących działanie EP był MC-207,110 należący do peptydomimetyków. Mechanizm działania MC-207,110 polega na konkurencyjnym łączeniu się z miejscem wiązania dla antybiotyków (głównie cyprofloksacyny i lewofloksacyny) na białku transportowym pompy, co skutkuje wypompowywaniem tego związku poza komórkę i wzrostem stężenia antybiotyku wewnątrz komórki (65). Niestety ze względu na znaczną toksyczność EPI

ich zastosowanie w terapii zakażeń o podłożu biofilmowym jest ograniczone.

Terapia fotodynamiczna i ultradźwiękowa

Obiecującą, alternatywną metodą zwalczania zakażeń związanych z formowaniem biofilmu jest terapia fotodynamiczna (photodynamic therapy, PDT). Opiera się ona na działaniu nietoksycznych barwników zwanych fotocuczulaczami, które pod wpływem światła widzialnego generowanego przez niskoenergetyczne źródła w obecności tlenu prowadzą do powstawania związków o charakterze cytotoksycznym, głównie tlenu singletowego oraz wolnych rodników. Rolę fotoutleniaczy mogą pełnić porfiryny, ich prekursorzy oraz pochodne, chloryny, ftalocyjaniny, barwniki fenotiazynowe. Zaletą PDT jest brak selekcji bakterii opornych na działanie fotoutleniaczy (66). Na podstawie badań *in vitro* stwierdzono znacznie większą skuteczność PDT w eliminacji biofilmu w porównaniu z klasycznymi antybiotykami. Terapia fotodynamiczna okazała się efektywną metodą eliminacji bakterii formujących płytkę nazębną oraz biofilmów formowanych m.in. przez *P. aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, w tym szczepów metycyloopornych (MRSA). Wyniki badań potwierdziły także, że łączne zastosowanie PDT i wankomycyny charakteryzuje się wyższą efektywnością w eliminacji biofilmu *S. aureus* z powierzchni implantów w porównaniu z monoterapią (67).

W ostatnim czasie podejmowane są próby wykorzystania ultradźwięków (ultrasound, US) jako metody wspomagającej efektywność klasycznej antybiotykoterapii w walce z biofilmem. Mechanizm działania US prowadzący do wzrostu aktywności antybiotyków związany jest głównie z indukcją kawitacji, wysokiego ciśnienia, naprężeń oraz powstawaniem wolnych rodników i wzrostem temperatury (68). Efektem działania US na komórki są zmiany w błonie komórkowej (wzrost przepuszczalności), zmiany właściwości wzrostu komórek, modyfikacje dróg syntezy makrocząsteczek i ultrastruktury komórkowej oraz uszkodzenia DNA. Z dostępnych danych wynika, że zastosowanie US ułatwia m.in. transport wankomycyny przez biofilm *S. epidermidis* RP62A, co prowadzi do eliminacji znacznego odsetka komórek bakteryjnych i zmniejszenia gęstości biofilmu (69, 70).

Podsumowując, można jednoznacznie stwierdzić, że biofilm bakteryjny jest dominującą formą życia bakterii ułatwiającą im przyjmowanie i przetwarzanie składników pokarmowych, usuwanie potencjalnie szkodliwych produktów przemiany materii, stwarzającą dogodne warunki środowiskowe dla szybkiego wzrostu oraz zapewniającą niszę chroniącą przed negatywnym wpływem czynników środowiska, w tym działaniem antybiotyków. Zmniejszona wrażliwość komórek bakteryjnych biofilmu na większość obecnie stosowanych leków przeciwbakteryjnych obniża skuteczność prowadzonego leczenia, co powoduje komplikacje terapeutyczne. Dlatego też kluczowe dla ochrony zdrowia ludzi i zwierząt oraz ograniczenia indukcji opornych na antybiotyki szczepów bakterii jest poznanie mechanizmów odpowiedzialnych za rozwój i wysoką tolerancję biofilmu na działanie substancji

przeciwdrobnoustrojowych. Zdobyta wiedza będzie szansą na wdrożenie efektywnych metod walki z zakażeniami o podłożu biofilmowym.

Piśmiennictwo

- Gowrishankar S., Kamaladevi A., Balamurugan K., Pandian S.K.: In vitro and in vivo Biofilm characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patients associated with pharyngitis infection. *Biomed. Res. Int.* 2016, 2016, 1289157.
- Li Y-H., Tian X.: Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors* 2012, 12, 2519–2538.
- Hoyle B.D., Costerton J.W.: Bacterial resistance to antibiotics: the role of biofilms. *Prog. Drug Res.* 1991, 37, 91–105.
- Abdullahi U.F., Igwenagu E., Mu'azu A., Aliyu S., Umar M.I.: Intrigues of biofilm: A perspective in veterinary medicine. *Vet. World.* 2016, 9, 12–18.
- Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J.: Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2013, 67, 736–741.
- Garcia A.B., Percival S.L.: Zoonotic infections: The role of biofilm. *Biofilm Vet. Med.* 2011, 6, 69–110.
- Zambori C., Tirziu E., Nichita I., Cumanasoiu C., Gros R.V., Seres M., Mladin B., Mot D.: Biofilm implication in oral diseases of dogs and cats. *Anim. Sci. Biotechnol.* 2012, 45, 208.
- Nam E.H., Ko S., Chac J.S., Hwang C.Y.: Characterization and zoonotic potential of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 23, 422–429.
- Dufour D., Leung V., Lévesque C.M.: Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics.* 2012, 22, 2–16.
- Maciejewska M., Bauer M., Dawgul M.: Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego. *Post. Mikrobiol.* 2016, 55, 3–11.
- Vu B., Chen M., Crawford R.J., Ivanova E.P.: Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules.* 2009, 14, 2535–2554.
- Moryl M.: Egzopolimery macierzy biofilmu jako czynniki wirulencji mikroorganizmów w rozwoju chorób człowieka. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2015, 69, 1485–1498.
- Okshevsky M., Meyer R.L.: The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.* 2015, 41, 341–352.
- Zhurina M.V., Gannesena A.V., Zdorovonko E.L., Plakunova V.K.: Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms. *Microbiology.* 2014, 83, 713–722.
- Li Y-H., Tian X.: Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. *Sensors.* 2012, 12, 2519–2538.
- Stańkowska D., Kaca W.: Systemy komunikacji międzykomórkowej bakterii Gram-ujemnych i ich znaczenie w ekspresji cech fenotypowych. *Post. Mikrobiol.* 2005, 44, 99–111.
- Matejczyk M., Suchowierska M.: Charakterystyka zjawiska quorum sensing i jego znaczenie w aspekcie formowania i funkcjonowania biofilmu w inżynierii środowiska, budownictwie, medycynie oraz gospodarstwie domowym. *Bud. Inż. Środ.* 2011, 2, 71–75.
- Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia.* 2007, 4, 40–52.
- Koźłwan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochrona Środ.* 2011, 33, 4–14.
- Kołodnyński J., Jankowski S.: Systemy międzykomórkowej sygnalizacji u bakterii. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005, 14, 343–348.
- Nikolaev Y.A., Plakunov V.K.: Biofilm – „City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology.* 2007, 76, 125–138.
- Myszka K., Czaczyk K.: Mechanizm quorum sensing jako czynnik regulujący wirulencję bakterii Gram-ujemnych. *Postępy Hig. Med. Dośw.* 2010, 64, 582–589.
- Govan J.R., Deretic V.: Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 1996, 60, 539–574.
- Høiby N., Ciofu O., Johansen H.K., Song Z.J., Moser C., Jensen P.Ø., Molin S., Givskov M., Tolker-Nielsen T., Bjarnsholt T.: The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral Sci.* 2011, 3, 55–65.
- Brown M.R., Allison D.G., Gilbert P.: Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: A growth-rate related effect? *J. Antimicrob. Chemother.* 1988, 22, 777–780.
- Boles B.R., Singh P.K.: Endogenous oxidative stress produces diversity and adaptability in biofilm communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008, 105, 12503–12508.
- Driffield K., Miller K., Bostock J.M., O'Neill A.J., Chopra I.: Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008, 61, 1053–1056.

28. Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O.: Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2010, **35**, 322–332.
29. Orgad O., Oren Y., Walker S.L., Herzberg M.: The role of alginate in *Pseudomonas aeruginosa* EPS adherence, viscoelastic properties and cell attachment. *Biofouling*. 2011, **27**, 787–98.
30. Karatan E., Watnick P.: Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009, **73**, 310–347.
31. Soto S.M.: Importance of biofilms in urinary tract infections: New therapeutic approaches. *Adv. Biol.* 2014, **54**, 3974.
32. Li X.Z., Nikaido H.: Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs* 2004, **64**, 159–204.
33. Wasążnik A., Grinholc M., Bielawski K.P.: Czynne usuwanie leku z komórki jako jeden z mechanizmów oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe i metody jego zwalczania. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2009, **63**, 123–133.
34. Jarmuła A., Obląk E., Wawrzycycka D., Gutowicz J.: Oporność wielolekowa związana z aktywnym usuwaniem leków z komórek drobnoustrojów. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2011, **65**, 216–227.
35. Zhang L., Mah T.F.: Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *J. Bacteriol.* 2008, **190**, 4447–4452.
36. Bjarnsholt T., Jensen P.Ø., Burmølle M., Hentzer M., Haagensen J.A., Hougen H.P., Calum H., Madsen K.G., Moser C., Molin S., Høiby N., Givskov M.: *Pseudomonas aeruginosa* tolerance to tobramycin, hydrogen peroxide and polymorphonuclear leukocytes is quorum-sensing dependent. *Microbiology*. 2005, **151**, 373–383.
37. Möker N., Dean C.R., Tao J.: *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum sensing molecules. *J. Bacteriol.* 2010, **192**, 1946–1955.
38. Hengzhuang W., Wu H., Ciofu O., Song Z., Høiby N.: In vivo pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infection. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2012, **56**, 2683–2690.
39. Hengzhuang W., Wu H., Ciofu O., Song Z., Høiby N.: Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2011, **55**, 4469–4474.
40. Alemayehu D., Casey P.G., McAuliffe O.: Bacteriophages phiMR299–2 and phiNH–4 can eliminate *Pseudomonas aeruginosa* in the murine lung and on cystic fibrosis lung airway cells. *MBio*. 2012, **3**, e00029–12.
41. Brussow H.: Bacteriophage – host interaction: from splendid isolation into a messy reality. *Curr. Opin. Microbiol.* 2013, **16**, 500–506.
42. Burrows B., Harper D.R., Anderson J., McConville M., Enright M.C.: Bacteriophage therapy: potential uses in the control of antibiotic-resistant pathogens. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2011, **9**, 775–785.
43. Seth A.K., Geringer M.R., Nguyen K.T., Agnew S.P., Dumanian Z., Galiano R.D., Leung K.P., Mustoe T.A., Hong S.J.: Bacteriophage therapy for *Staphylococcus aureus* biofilm-infected wounds: a new approach to chronic wound care. *Plast. Reconstr. Surg.* 2013, **131**, 225–234.
44. Soothill J.: Use of bacteriophages in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 2013, **11**, 909–915.
45. Yilmaz C., Colak M., Yilmaz B.C.: Bacteriophage therapy in implant-related infections: an experimental study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 2013, **95**, 117–125.
46. Yan J., Mao J., Xie J.: Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. *BioDrugs*. 2014, **28**, 265–274.
47. Maszewska A.: Fagowe depolimerazy polisacharydów – charakterystyka i zastosowanie. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2015, **69**, 690–702.
48. Tait K., Skilmann L.C., Sutherland I.W.: The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. *Biofouling*. 2002, **18**, 305–311.
49. Kay M.K., Erwin T.C., McLean R.J., Aron G.M.: Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011, **77**, 821–829.
50. Comeau A.M., Tétart F., Trojet S.N., Prère M.F., Krisch H.M.: Phage-antibiotic synergy (PAS): β -lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS One*. 2007, **2**, e799.
51. Kamal F., Dennis J.J.: Burkholderia cepacia complex Phage-Antibiotic Synergy (PAS): antibiotics stimulate lytic phage activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015, **81**, 1132–1138.
52. Bedi M.S., Verma V., Chhibber S.: Amoxicillin and specific bacteriophage can be used together for eradication of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2009, **25**, 1145–1151.
53. Zhang Y., Hu Z.: Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, **110**, 286–295.
54. Baker E.N., Baker H.M.: Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol. Life Sci.* 2005, **62**, 2531–2539.
55. Arnold R.R., Cole M.F., Mcghee J.R.: A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science*. 1977, **197**, 263–265.
56. Borkowska A.: Laktoferyna w kale jako wykładnik aktywności procesu zapalnego w nieswoistych zapaleniach jelit u dzieci. Praca doktorska, Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci AMG Gdańsk, 2008.
57. Moreau-Marquis S., Coutermarsh B., Stanton B.A.: Combination of hypothiocyanite and lactoferrin (ALX-109) enhances the ability of tobramycin and aztreonam to eliminate *Pseudomonas aeruginosa* biofilms growing on cystic fibrosis airway epithelial cells. *J. Antimicrob. Chemother.* 2015, **70**, 160–166.
58. Caraher E.M., Gumulapurapu K., Taggart C.C., Murphy P., McClean S., Callaghan M.: The effect of recombinant human lactoferrin on growth and the antibiotic susceptibility of the cystic fibrosis pathogen *Burkholderia cepacia* complex when cultured planktonically or as biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, **60**, 546–554.
59. Ammons M.C., Ward L.S., Fisher S.T., Wolcott R.D., James G.A.: In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2009, **33**, 230–236.
60. Ammons M.C., Ward L.S., Dowd S., James G.A.: Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with lactoferrin and xylitol inhibits the ability of bacteria to respond to damage resulting from lactoferrin iron chelation. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2011, **37**, 316–323.
61. Wu H., Moser C., Wang H-Z., Høiby N., Song Z.-J.: Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 2015, **7**, 1–7.
62. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., Sintim H.O.: Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Med. Chem.* 2015, **7**, 647–71.
63. Cirioni O., Mocchegiani F., Cacciatori L., Vecchiet J., Silvestri C., Baldassarre L., Ucciferri C., Orsetti E., Castelli P., Provinciali M., Vivarelli M., Fornasari E., Giacometti A.: Quorum sensing inhibitor FS3-coated vascular graft enhances daptomycin efficacy in a rat model of staphylococcal infection. *Peptides*. 2013, **40**, 77–81.
64. Brackman G., Cos P., Maes L., Nelis H.J., Coenye T.: Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, **55**, 2655–2661.
65. Askoura M., Mottawea W., Abujamel T., Taher I.: Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan J. Med.* 2011, **6**, 10.
66. Grinholc M., Szramka B., Kurlenda J., Graczyk A., Bielawski K.P.: Bactericidal effect of photodynamic inactivation against methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* is strain dependent. *J. Photochem. Photobiol. B*. 2008, **90**, 57–63.
67. Di Poto A., Sbarra M.S., Provenza G., Visai L., Speziale P.: The effect of photodynamic treatment combined with antibiotic action or host defence mechanisms on *Staphylococcus aureus* biofilms. *Biomaterials*. 2009, **30**, 3158–3166.
68. Miłowska K.: Ultradźwięki – mechanizm działania i zastosowanie w terapii sonodynamicznej. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2007, **61**, 338–349.
69. He N., Hu J., Liu H., Zhu T., Huang B., Wang X., Wu Y., Wang W., Qu D.: Enhancement of vancomycin activity against biofilms by using ultrasound-targeted microbubble destruction. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011, **55**, 5331–5337.
70. Dong Y., Chen S., Wang Z., Peng N., Yu J.: Synergy of ultrasound microbubbles and vancomycin against *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, **68**, 816–826.

Dr n. wet. Ewelina Czyżewska-Dors,
e-mail: eczyzewska@piwet.pulawy.pl