

Bakteryjny biofilm oraz inne elementy i mechanizmy pozwalające na przeżycie drobnoustrojom w warunkach ekstremalnych

ANTONI J. FUROWICZ, ANNA BOROŃ-KACZMARSKA*, MAGDALENA FERLAS, DANUTA CZERNOMYSY-FUROWICZ, ANNA POBUCEWICZ

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego, ul. Doktora Judyma 24, 71-466 Szczecin
*Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Nauk o Zdrowiu Pomorskiej Akademii Medycznej, ul. Arkońska 4, 71-455 Szczecin

Furowicz A. J., Boroń-Kaczmarska A., Ferlas M., Czernomysy-Furowicz D., Pobucewicz A.

Bacterial biofilm as well as other microbiol elements and mechanisms of survival in extreme conditions

Summary

Frequent failures in the treatment of human and animal infections with antibiotics give little reason for optimism as to the perspectives of this kind of therapy. It is estimated that biofilms, which are the most common factor responsible for such diseases, demonstrate up to 1000-fold higher drug resistance than dispersed populations of the same bacteria species. A relatively slow development of new antibiotics suggests the need for a new approach in anti-infection therapy, alternative to the therapy with "classical" antibiotics. There is a growing interest in applying natural components of plant and animal immune systems. Nowadays, a challenge for medicine and microbiology is to discover new agents that would increase the effectiveness of anti-film therapy. These studies could verify current views on biofilms and their role in some infectious diseases of humans and animals.

Keywords: biofilms, animal and human infections, anti-biofilm therapy

Wiele gatunków bakterii wywołujących zakażenia człowieka i zwierząt wykazuje fizjologiczną lub nabytą oporność na antybiotyki. Dotyczy to zwłaszcza szczepów szpitalnych. Jest to jeden z zasadniczych elementów strategii drobnoustrojów w ich walce o zachowanie gatunku. Szczególnie niebezpieczne zjawisko stanowi pojawienie się kompleksowej zakaźnej oporności na antybiotyki, determinowanej przez plazmidy, przenoszone z komórki do komórki bakteryjnej w procesie koniugacji przez nukleinowe czynniki przeniesienia oporności (Resistance Transfer Factor – RTF).

Równie groźnym zjawiskiem jest pojawienie się u bakterii (głównie szczepów szpitalnych) oporności na dezynfektanty. Szereg drobnoustrojów wykorzystuje je jako doskonałe źródło węgla lub azotu. Dotyczy to zwłaszcza szczepów *Pseudomonas aeruginosa*, dla których źródłem azotu są czwartorzędowe zasady amonowe, a węgiel jest pobierany z preparatów zawierających heksachlorofen (6, 20). Natomiast dla bakterii *Acinetobacter baumannii* zasadniczym źródłem węgla jest alkohol. Tak więc nie tylko nie hamuje on

rozwoju tych pałeczek, ale może stymulować ich witalność (19). Jeszcze innym zjawiskiem związanym ze wzrostem zjadliwości niektórych bakterii i grzybów jest ich udział w różnych zakażeniach w formie biofilmu. Ta trójwymiarowa makrokolonia bakterii odizolowana macierzą pozakomórkową, nieprzepuszczającą elementów odpornościowych (przeciwciał, fragmentów dopełniacza) stanowi także „biologiczną zapórę” dla niektórych chemioterapeutyków (1, 7, 10, 12, 17).

Struktura i właściwości biofilmu

Stwierdzono, iż biofilmy powstają na granicy różnych faz, najczęściej: ciała stałego i powietrza, cieczy i powietrza oraz dwóch cieczy różniących się gęstością. Tworzą je skupiska drobnoustrojów (bakterii lub grzybów), uporządkowane przestrzennie (8, 12, 17, 19). Drobnoustroje te wytwarzają pozakomórkową macierz EPS (extracellular polymeric substances) wokół pojedynczych mikrokolonii i następnie, po ich połączeniu, określonego biofilmu. Izoluje ona te skupiska bakterii od innych drobnoustrojów oraz ma

wpływ na zwiększenie ich oporności na oddziaływanie antybiotyków oraz elementów odpornościowych (8). Biofilmy mają charakter trójwymiarowych struktur, w których głównym składnikiem jest woda (od 75% do 90% masy). Mogą one występować na powierzchni różnych wszczepionych materiałów, jak: implanty stomatologiczne, cewniki, rozruszniki, protezy stawowe i inne (19). Często zasiedlają jednak przewody (pokarmowy, moczowo-płciowy, oddechowy) oraz narządy człowieka i zwierząt (19). Uważa się, iż infekcje z udziałem określonego biofilmu (bakteryjnego, grzybiczego, rzadziej mieszanego) charakteryzują się m.in.: lokalnym występowaniem, obecnością drobnoustrojów przylegających do określonych powierzchni w formie „łączących się” kolonii (odizolowanych od środowiska przez EPS), wzrostem oporności mikroorganizmów na antybiotyki, na które wrażliwe są *in vitro* bakterie tego samego gatunku, wyosobnione od badanego pacjenta (17). Wydaje się, iż określenie biofilmu przez Nikolaeva i wsp. (12) jako „miasta mikroorganizmów” (city of microbes), które jest izolowane przez „mur graniczny” (EPS) w sposób obrazowy dobrze przedstawia istotę tego elementu.

Rola biofilmu w patogenezie chorób człowieka i zwierząt

Omawiając rolę biofilmów w patogenezie infekcji człowieka, Trafny (17) wymienia trzy grupy zakażeń. Są to zakażenia w otolaryngologii, infekcje oskrzelo-płucne u chorych na mukowiscydozę oraz zakażenia ran przewlekłych, zwłaszcza odleżynowych i, wg Neuta i wsp. (10), ran po zabiegach ortopedycznych. Nie we wszystkich przypadkach można z całą pewnością udowodnić obecność i funkcje klasycznego biofilmu. Należy wymienić nierzadko występujący brak charakterystycznych dla biofilmów polimerów EPS, zwłaszcza w zakażeniach górnych dróg oddechowych, występowanie biofilmów niepatogennych oraz wielogatunkowych. Najczęstsze zakażenia w otolaryngologii z udziałem biofilmu były wywoływane przez: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* oraz *Staphylococcus aureus*, ponadto bakterie z rodzajów *Prevotella*, *Veillonella*, *Propionibacterium* i *Actinomycetes* (17). Odnotowano, że charakterystyczną cechą bakterii występujących w biofilmach nie jest obniżona ich aktywność metaboliczna, przekładająca się na zmniejszenie ich wirulencji. Przeciwnie, szereg szczepów *P. aeruginosa* charakteryzuje się wzmożoną syntezą aktywnych proteaz i pioverdyny. Dotyczy to także niektórych szczepów *Candida albicans* oraz innych gatunków drożdżaków. Stwierdzono, iż komórki bakteryjne występujące w biofilmie mogą prezentować nawet 1000 razy większą oporność na antybiotyki aniżeli ta sama bakteria rozwijająca się w planktonowej formie (19). Zdolność bakterii oraz grzybów do syntezy biofilmu jest w znacznym stopniu uważana za ich czynniki przetrwania i wirulencji, bardzo ważne w patogenezie za-

każenia (8). Uważa się, iż biofilmy odgrywają istotną rolę aż w ponad 60% wszystkich infekcji bakteryjnych. Dotyczy to także zakażeń powstałych w wyniku wykorzystywania obwodowych oraz centralnych cewników naczyniowych, jak również cewników moczowych, ponadto w rezultacie zastosowania różnych implantów. Odnotowano, że wśród chorobotwórczych szczepów *Acinetobacter baumannii*, wyosobnionych od hospitalizowanych pacjentów, istnieje znaczne zróżnicowanie właściwości do syntezy biofilmu. Zakłada się, że wytwarzanie biofilmu przez ten gatunek bakterii może mieć poważny wpływ na jej przetrwanie na różnych powierzchniach w środowisku szpitalnym oraz ogranicza oddziaływanie czynników przeciwbakteryjnych, głównie antybiotyków oraz preparatów odkażających (17). Jest to bardzo istotne z klinicznego punktu widzenia, ponieważ bakteria ta jest fizjologicznie i w sposób nabyty oporna na wiele antybiotyków. Wytwarza m.in. karbapenemazy, hydrolizujące karbapenemy, co prowadzi do powstawania oporności na te antybiotyki (19).

Stare filogenetycznie pałeczki gatunku *Pseudomonas*, przebywające dawniej głównie w wodzie i glebie oraz pasożytujące na roślinach, adaptując się do organizmu człowieka lub zwierząt stanowią groźną grupę drobnoustrojów o silnych właściwościach inwazyjnych i toksycznych, szerokiej oporności na antybiotyki oraz na dezynfektanty (20). Szczególne zagrożenie bakterie te stanowią w środowisku szpitalnym, gdzie najczęściej bytują w miejscach o dużej wilgotności i znacznym napowietrzeniu: umywalkach, nawilżaczach powietrza i klimatyzatorach, w ssakach, rurach respiratorów oraz w wodzie wodociągowej. Drobnoustroje te wykazują zdolność do wytwarzania biofilmu, nieprzepuszczającego elementów odpornościowych (przeciwciał, dopełniacza, leukocytów), ograniczającego oddziaływanie antybiotyków oraz neutralizującego reaktywne formy tlenu (ROS) (20).

W ostatnich latach zaobserwowano wzrost częstości izolacji gronkowców (zwłaszcza *Staphylococcus aureus*) z mleka krów, u których rozwinęło się zapalenie gruczołu mlekowego. Duża liczba czynników wirulencji tych drobnoustrojów (zarówno związanych z budową ściany komórkowej, jak i wydzielanych jako egzotoksyny), również zdolność do tworzenia biofilmu oraz występowanie mechanizmów umożliwiających uniknięcie odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu, czynią drobnoustrój ten jednym z najgroźniejszych patogenów bakteryjnych. Odnotowano, iż gronkowcowy biofilm sprzyja utrzymywaniu stanu zapalnego w gruczole mlekowym na skutek zmniejszenia wrażliwości bakterii na fagocytozę oraz leki przeciwbakteryjne (4).

Za potencjalną chorobotwórczość bakterii z gatunku *Yersinia* odpowiada także zdolność do adhezji i tworzenia biofilmu przez te drobnoustroje (9). Bakterie te izolowane były zarówno od zdrowych, jak i chorych zwierząt, ponadto odnotowano przypadki

występowania tych drobnoustrojów na roślinach, w glebie, wodach powierzchniowych, wodzie pitnej czy żywności. Zachorowania u zwierząt przybierają niekiedy postać epizootii, najczęściej mają postać ostrych lub przewlekłych biegunek, rzadziej zmian skórnych w postaci rumienia oraz zapalenia stawów. Do zakażenia człowieka dochodzi najczęściej na skutek spożycia pokarmu (pochodzenia roślinnego czy zwierzęcego) lub wody zanieczyszczonych pałeczkami *Yersinia*. Za główny rezerwuuar *Y. enterocolitica* i źródło zakażenia dla człowieka uważa się świnię. Zakażenie pałeczkami *Y. pseudotuberculosis* u człowieka może mieć postać zatrucia pokarmowego, zapalenia jelit, bakteriemii czy posocznicy o stopniu nasilenia zależnym od stanu odporności chorego, jak również patogennych właściwości drobnoustroju (3).

Pałeczki *Listeria monocytogenes* należą do grupy wewnątrzkomórkowych fakultatywnych patogenów bakteryjnych. Wykazują one powinowactwo do komórek centralnego układu nerwowego i ciężarnej macicy zarówno kobiet, jak i samic innych gatunków ssaków, zwłaszcza owiec. Wiele zakażeń człowieka ma charakter odzwierzęcy (21). Infekcje dotyczą głównie wymienionych układów i często mają przebieg ostry, kończący się zejściem śmiertelnym. Coraz częściej obserwuje się zakażenia pokarmowe występujące po spożyciu produktów zwierzęcego bądź roślinnego pochodzenia, kontaminowanych listeriami (3). Drobnoustroje te namnażają się na powierzchni przedmiotów nieożywionych oraz w przewodzie pokarmowym człowieka i zwierząt w postaci mikrokolonii otoczonych glikolipidową warstwą glikokaliksu. Po połączeniu pojedynczych kolonii powstaje biofilm. Podobnie jak u innych gatunków bakteryjnych, zwiększa on oporność listerii na antybiotyki, oddziaływanie immunoglobulin oraz chroni przed fagocytozą. W przewodzie pokarmowym ułatwia kolonizację oraz inwazję w głąb jelita (1, 3, 15, 17).

Biofilm jelitowy, właściwości ochronne i udział w zakażeniach

Biofilmy ze względu na ich rolę w procesach zachodzących w przewodzie pokarmowym człowieka i innych ssaków można podzielić na: ochronne (naturalne), zapobiegające zakażeniom florą patogenną oraz odpowiedzialne za stan chorobowy (16). Biofilmy naturalne zawierają z reguły wiele gatunków mikroorganizmów wykazujących często w stosunku do siebie właściwości symbiozy. Natomiast biofilmy biorące udział w zakażeniach syntetyzowane są przeważnie przez jeden gatunek bakterii oddziaływujący konkurencyjnie na inne gatunki (19). W pierwszym etapie syntezy biofilmu naturalnego, która stanowi przyleganie (adhezję) drobnoustrojów do stałej powierzchni, odnotowuje się między drobnoustrojami zjawisko symbiozy. Proces tworzenia tego biofilmu rozpoczynają bakterie o dobrze rozwiniętych właściwościach adhezyjnych. Następnie do ich mikrokolonii przylegają

komórki tego samego lub też odmiennych gatunków drobnoustrojów. Między drobnoustrojami często występuje zjawisko konkurencji w celu opanowania określonej niszy ekologicznej. Chorobotwórcze szczepy *E. coli* (enterotoksyczne oraz enteropatogenne) biorą natomiast udział w syntezie biofilmów związanych z procesami zakażenia.

Funkcje ochronne biofilmu jelitowego polegają głównie na blokowaniu receptorów w kontekście zasiedlania ich przez bakterie patogenne (m.in. *Salmonella sp.*, *Shigella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Escherichia sp.*), oddziaływaniu antagonistycznym w stosunku do tych bakterii oraz pozytywnym wpływie na układ odpornościowy przewodu pokarmowego (GALT). Ta ostatnia cecha jest związana m.in. z tzw. fenomenem tolerancji pokarmowej. Polega on na wyciszaniu odpowiedzi immunologicznej na rozpuszczalne antygeny pokarmowe, które są spożywane w ogromnej ilości przez człowieka i zwierzęta. Jednocześnie układ odpornościowy jelita bardzo efektywnie rozpoznaje i niszczy antygeny drobnoustrojów chorobotwórczych (18). Należy jednak pamiętać, iż w odróżnieniu od biofilmu naturalnego (ochronnego) pojawienie się jelitowych biofilmów bakteryjnych, zawierających drobnoustroje chorobotwórcze, może być przyczyną szeregu bardzo groźnych zakażeń. Wymienić można biofilmy zawierające verocytotoksyczne lub enterotoksyczne szczepy *E. coli*. Wywoływane przez nie infekcje człowieka lub zwierząt mają ciężki przebieg i kończą się nierzadko zejściem śmiertelnym (3). Równie groźne są biofilmy rozwijające się na powierzchni innych tkanek, często pierwotnie uszkodzonych, takich jak rany oparzeniowe czy odleżynowe. Dotyczy to także powierzchni wielu urządzeń medycznych. Jak już wspomniano, oporność drobnoustrojów występujących w biofilmie jest najczęściej większa aniżeli bakterii egzystujących w tkankach w innej formie. Infekcje takie określa się niekiedy jako „trudne do leczenia”. Do czynników etiologicznych odpowiedzialnych za takie zakażenia zalicza się pałeczki Gram-ujemne: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, ponadto gronkowce (*S. aureus* i *S. epidermidis*), paciorkowce oraz grzyby drożdżopodobne z rodzaju *Candida*. Wymienione drobnoustroje wyjątkowo szybko syntetyzują biofilmy (1, 15).

Niektóre elementy inicjacji biofilmu przez *Pseudomonas aeruginosa* oraz rozwój tych bakterii w środowisku „biofilmopodobnym”

Drobnoustrój ten wywołuje u człowieka oraz u innych ssaków chroniczny stan zapalny oskrzeli, który w efekcie końcowym może być przyczyną torbielowatego zwłóknienia płuc. Chorobie tej towarzyszą miejscowe zaburzenia funkcjonowania układu odpornościowego (6, 20). W pierwszej fazie zakażenia stosunkowo rzadko dochodzi do pokonania przez bakterie śluzówki oskrzeli. *Pseudomonas aeruginosa* rozwija się w formie mikrokolonii związanych z jonami

wapnia. Obecność wapnia jest z kolei uzależniona od występowania śluzowego żelu alginatowego, który zawiera DNA i tchawiczo-oskrzelową mucynę. Żel ten przylega ściśle do śluzówki oskrzeli. Połączenie się pojedynczych mikrokolonii powoduje pojawienie się biofilmu (makrokolonii), stanowiącego swego rodzaju „niezależne państwo” (1, 6, 12). Chroni ono *P. aeruginosa* przed obronnymi mechanizmami organizmu ssaka, stanowiąc dodatkowo elektrolitową barierę dla antybiotyków (12, 16). Wiele uszkodzeń tkanki jest efektem wolnego uwalniania i oddziaływania bakteryjnych proteaz, które niszczą śluzówkę oskrzeli i powodują nadmierne wydzielanie mucyny przez komórki kubkowe (6). Natomiast mechanizmy immunopatologiczne, powodujące dalsze zaburzenia, są także związane z obecnością *P. aeruginosa*. Dochodzi do długotrwałego oddziaływania antygenowego śluzu związanego z przebywaniem tych bakterii w oskrzelach. Odnawia się, z jednej strony, nadmiar kompleksów immunologicznych (IgG + antygen), z drugiej – niedobór dopełniacza, który niszczyłby antygeny (6). Nadmierne pobudzenie makrofagów przez IgG (F_c) jest przyczyną dalszego niszczenia komórek nabłonka przez ich proteazy. Zwiększająca się populacja komórek *P. aeruginosa* występujących w biofilmie wywołuje hipersekrecję mucyny przez komórki kubkowe nabłonka oskrzeli (6).

Optymalnymi elementami stymulującymi rozwój pałeczek *Pseudomonas* jest środowisko wilgotne, dobrze napowietrzane, zawierające proteiny. Wymienione środowisko występuje w szpitalach, stąd też obecność na niektórych oddziałach, zwłaszcza oparzeniowym, szpitalnych, prezentujących znaczną oporność na antybiotyki oraz dezynfektanty (1, 6, 20). Zbliżone środowisko można odnotować w mrożonym nasieniu używanym w inseminacji zwierząt, głównie bydła i świń (14). W wyniku badań własnych, realizowanych przez szereg lat (1978-2007), odnotowano bardzo częste występowanie w nasieniu szczepów *P. aeruginosa* (5, 14) i gronkowców (13). Nie stwierdzono natomiast z reguły negatywnego ich wpływu na zdrowotność unasiennianych zwierząt oraz strukturę plemników, chociaż, według niektórych autorów, obecność tych bakterii w nasieniu nie jest całkowicie obojętna i może prowadzić do pewnych zaburzeń (13, 14). Środowisko nasienia jest optymalne dla rozwoju bakterii omawianego gatunku: jest ono bogate w białko, wilgotne, dostatecznie napowietrzane. Szczepy *P. aeruginosa* są psychrotrofami, ponadto wytrzymują proces zamrażania oraz wykazują oporność na wiele antybiotyków, również na niektóre używane do konserwacji nasienia (14). Tak więc fizykochemicznie nasienie zwierząt prezentuje niektóre cechy śluzu występującego na powierzchni nabłonków przewodu pokarmowego, oddechowego i moczowo-płciowego, dlatego też można założyć, że posiada właściwości „środowiska biofilmopodobnego”.

Próby eliminacji biofilmów

Odnawia się, z jednej strony, nadmiar kompleksów immunologicznych (IgG + antygen), z drugiej – niedobór dopełniacza, który niszczyłby antygeny (6). Nadmierne pobudzenie makrofagów przez IgG (F_c) jest przyczyną dalszego niszczenia komórek nabłonka przez ich proteazy. Zwiększająca się populacja komórek *P. aeruginosa* występujących w biofilmie wywołuje hipersekrecję mucyny przez komórki kubkowe nabłonka oskrzeli (6).

Odnotowano, że tzw. zakażenia związane z obecnością biofilmu, rozwijające się u człowieka ze sprawnie działającym układem odpornościowym, nie zawsze są eliminowane; nie dochodzi mianowicie do całkowitej eradykacji drobnoustrojów. Antybiotykoterapia nie niszczy całej struktury filmu, giną tylko bakterie rozwijające się poza tą strukturą. Tak więc nie ma *de facto* możliwości zahamowania infekcji. W związku z powyższym szuka się alternatywnych metod eliminacji takich zakażeń. Zasadniczym celem jest zahamowanie kolejnych etapów syntezy biofilmów. Jako najbardziej skuteczne wymienia się (2, 11, 15):

- zapobieganie adhezji bakterii poprzez wiązanie z powierzchnią biomateriałów czynników przeciwbakteryjnych (enzymów litycznych, bakteriocyn, biosurfaktantów, eukariotycznych peptydów i białek przeciwdrobnoustrojowych); stosowanie reżimu sanitarnego w środowisku szpitalnym, co prowadzi do redukcji liczby bakterii i zapobiega kontaminacji biomateriałów; wykazano również hamujące działanie przeciwciał skierowanych przeciw adhezynom bakteryjnym i ich receptorom,

- blokowanie powstawania i działania mediatorów komunikacji międzykomórkowej (cząstkami sygnalizacyjnymi w systemie „quorum sensing” są laktony N-acetyl-homoseryny – AHL, w nowe strategie antybakteryjne włączone zostałyby więc inhibitory syntezy AHL, czynniki blokujące rozprzestrzenianie się sygnału AHL oraz elementy odpowiedzialne za zahamowanie odbierania sygnału przez blokadę odpowiednich receptorów),

- hamowanie rozwoju drobnoustrojów poprzez zastosowanie antybiotyków w monoterapii cyklicznej lub leczenia skojarzonego z nieantybiotykowymi produktami bójczymi,

- blokowanie powstawania substancji zewnątrzkomórkowej (EPS),

- niszczenie EPS i następnie całej struktury biofilmu przez zastosowanie różnych enzymów litycznych, surfaktantów, bakteriofagów i innych.

Wymienione badania realizowane w celu zatrzymania syntezy i rozwoju biofilmu wskazują na ważkość zagadnienia. W wyniku niektórych z nich otrzymano połowiczne rezultaty. Jednakże nie uzyskano do tej pory preparatu i nie opracowano metod całkowicie hamujących syntezę tej groźnej zapory bakteryjnej (1, 15).

Podsumowanie

W walce o zachowanie swojego gatunku szereg bakterii wykształciło rozmaite mechanizmy składające się na ich strategię w tym aspekcie. Są one często trudne do zdefiniowania i następnie wyeliminowania przez człowieka. Składają się na nie: coraz większa oporność na antybiotyki i dezynfektanty, wykorzystanie niektórych preparatów odkażających jako doskonałe-

go źródła węgla i azotu, rozwój wielu bakterii w różnych, teoretycznie trudnych dla ich przeżycia warunkach (niskie temperatury) oraz egzystencja w formie biofilmu, występującego nie tylko na powierzchni tkanek ludzi i zwierząt, ale także aparatury szpitalnej. Drobnoustrojami, które opanowały te niezwykle zdolności przetrwania, są najczęściej najstarsze filogenetycznie bakterie, takie jak: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* oraz inne *Acinetobacter*, jak również *Listeria monocytogenes*, dawniej opisywane jako drobnoustroje wodne i glebowe. Aktualnie wiele z nich ma charakter szczepów szpitalnych, traktując środowisko szpitalne jako miejsce, w którym utrwalają wymienione cechy oraz nabierają szeregu właściwości chorobotwórczych.

Piśmiennictwo

1. Banin E., Brady K. M., Greenberg E. P.: Chelator – induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72, 2064-2069.
2. Bartoszewicz M.: Powstawanie biofilmu bakteryjnego i jego konsekwencje nowym wyzwaniem współczesnej medycyny. *Diagnosta Laboratoryjny* 2008, 1, 18-20.
3. Boroń-Kaczmarek A., Furowicz A. J.: Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową. PZWL, Warszawa 1999, 132-153.
4. Dziekiewicz-Mrugasiewicz M.: Znaczenie adhezji oraz tworzenie biofilmu przez *Staphylococcus aureus* w zapaleniu gruczołu mlekowego. *Medycyna Wet.* 2009, 65, 84-87.
5. Furowicz A. J.: Investigation on aeruginocin typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from the frozen bull semen in Poland. *Pseudomonas Newsletter (USA)* 1979, 4, 4-5.
6. Furowicz A. J.: Zarys mikrobiologii i epidemiologii oparzeń. Ośrodek Rehabilitacji, Repty Śl. 1979.
7. Fux C. A., Costerton J. W., Steward P. S., Stoodley P.: Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 2005, 13, 34-40.
8. Gołąb J., Jakóbisiak M., Lasek W.: Immunologia. PWN, Warszawa 2002.
9. Kot B., Jakubczak A., Domińska M., Kobylko M.: Adhezja i tworzenie biofilmu przez różne biotypy *Yersinia enterocolitica*. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 800-803.
10. Neut D., Van der Mei H. C., Bulstra S. K., Busscher H. J.: The role of small – colony variant in failure to diagnose and treat biofilm infections in orthopedics. *Acta Orthop.* 2007, 78, 299-308.
11. Niedzielski A. i wsp.: Rola biofilmu bakteryjnego w patogenezie wysiękowego zapalenia ucha środkowego. *Otorynolaryngologia* 2006, 5, 103-106.
12. Nikolaev Y. A., Plakunov V. K.: Biofilm – „City of microbes” or an analogue of multicellular organism? *Microbiology* 2007, 76, 125-138.
13. Nowakowski W., Wierzbowski S., Heczko P. B., Bulanda M., Furowicz A. J.: Właściwości szczepów gronkowców wyosobnionych z nasienia buhajów. *Medycyna Wet.* 1980, 36, 362-364.
14. Pobuciewicz A., Nawrotek P., Czczott-Urban A., Udała J., Furowicz A. J., Czernomysy-Furowicz D.: *Pseudomonas aeruginosa* jako flora bytująca w nasieniu zwierząt z uwzględnieniem patogenności zarazka. *Medycyna Wet.* (w druku).
15. Różalska B., Walencka E.: Alternatywne do antybiotykoterapii sposoby eradykacji biofilmów. *Post. Microbiol.* 2008, 47, 371-378.
16. Sadowska B., Różalska B.: Biofilm jelitowy – czy można i trzeba ingerować w jego skład i funkcjonowanie? *Post. Mikrobiol.* 2008, 47, 359-364.
17. Trafny E. A.: Rola biofilmu w patogenezie zakażeń człowieka. *Post. Mikrobiol.* 2008, 47, 353-357.
18. Weiner H. L., Mayer L. F.: Oral tolerance: mechanisms and applications. *Introduction. Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996, 778, 13-18.
19. Wróblewska M.: Znaczenie kliniczne bakterii z rodzaju *Acinetobacter* – nowe zagrożenia. *Post. Mikrobiol.* 2008, 47, 345-352.
20. Young V. M.: *Pseudomonas aeruginosa* – ecological aspects and patient colonization. Raven Press Books, New York 1977.
21. Zaremba M. L., Borowski J.: *Mikrobiologia lekarska*. PZWL, Warszawa 1997, 214-315.

Adres autora: prof. dr hab. Antoni J. Furowicz, ul. Monte Cassino 16A/2, 70-466 Szczecin; e-mail: dfurowicz@wp.pl