

## MIESZANY BIOFILM JAMY USTNEJ

Paula Bigos\*, Róża Czerwińska, Magdalena Pajączkowska, Joanna Nowicka

Katedra i Zakład Mikrobiologii, Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski

Wpłynęło w grudniu 2020, zaakceptowano w styczniu 2021 r.

**Streszczenie:** Jama ustna jest skolonizowana przez ponad 700 gatunków bakterii. Występują one pod postacią pojedynczych komórek lub tworzą wielogatunkowe biofilmy. Tworzenie biofilmu, jego nieprawidłowy rozrost w połączeniu z zaburzonym funkcjonowaniem mechanizmów obronnych naszego organizmu oraz zaburzeń w składzie ilościowym i jakościowym mikrobioty jamy ustnej może prowadzić do rozwoju próchnicy, zapalenia dziąseł, parodontozy czy peri-implantitis. W pracy omówiono etapy tworzenia biofilmu oraz wzajemne oddziaływania mikroorganizmów w tej zorganizowanej społeczności. Omówiono również znaczenie wielogatunkowego biofilmu w zakażeniach jamy ustnej i co bardzo istotne, metody jego zwalczania.

1. Biofilm – definicja, etapy tworzenia, porozumiewanie się mikroorganizmów w biofilmie. 2. Biofilm w różnych częściach ciała organizmu człowieka. 3. Wielogatunkowy biofilm jamy ustnej. 4. Zakażenia jamy ustnej związane z biofilmem wielogatunkowym. 5. Zapobieganie i metody zwalczania biofilmu jamy ustnej. 5.1. Profilaktyka i właściwa higiena jamy ustnej. 5.2. Terapia alternatywna zakażeń jamy ustnej związanych z tworzeniem biofilmu. 6. Podsumowanie

### MIXED ORAL BIOFILM

**Abstract:** The oral cavity is colonized by more than 700 bacterial species. They occur in the form of individual cells or form multispecies biofilms. The formation of biofilm, its abnormal growth combined with impaired functioning of the defense mechanisms of the body and disorders in the quantitative and qualitative composition of the oral microbiota can lead to the development of caries, gingival inflammation, parodontosis or peri-implantitis. The paper discusses the stages of biofilm formation as well as microbial interactions within this organized community. It also addresses the significance of multispecies biofilm in oral infections and, very importantly, the methods to combat it.

1. Biofilm – definition, formation stages, microbial communication within biofilm. 2. Biofilm in different parts of the human body. 3. Multispecies oral biofilm. 4. Oral infections associated with multispecies biofilm. 5. Prevention and methods of combating oral biofilm. 5.1. Prophylaxis and proper oral hygiene. 5.2. Alternative therapy of biofilm-related oral infections. 6. Summary

**Słowa kluczowe:** biofilm, mikroorganizmy, płytką nazębną, zakażenia

**Keywords:** biofilm, microorganisms, plaque, infections

### 1. Biofilm – definicja, etapy tworzenia, porozumiewanie się mikroorganizmów w biofilmie

Już w 1933 roku Arthur T. Henrici obserwując bakterie w środowisku wodnym, zauważył, że większość z nich to agregaty przylegające do zanurzonych w wodzie przedmiotów [34, 70]. Podobne obserwacje poczynili w 1940 r. H. Heukelekian i A. Heller [30]. Już wtedy zauważono, że bakterie tworzące trwałe struktury zaczynają wykazywać odmienne właściwości aniżeli te same drobnoustroje występujące pod postacią pojedynczych komórek [13, 70]. Warto dodać, że prawdziwą naturę biofilmu najprawdopodobniej odkrył już Antoni van Leeuwenhoek, co ciekawe, niewiele wiedząc o bakteriach [70].

Od momentu zainicjowania badań nad biofilmem widzenie tej specyficznej formy bytowania bakterii

i grzybów zmieniało się. Początkowo określany jako mikroorganizmy otoczone śluzem, obecnie jako złożony organizm, zdolny do reakcji na wszystko to co dzieje się w jego otoczeniu. Najczęściej biofilm jest określany jako skupiska komórek, które związane są z powierzchnią stałą i otoczone wydzielanymi substancjami zewnątrzkomórkowymi. Bakterie i grzyby bytujące pod postacią tej zorganizowanej społeczności potrafią umiejętnie porozumiewać się między sobą, co daje możliwość szybkiej odpowiedzi na docierające z otoczenia sygnały [34, 44]. Przez długi czas sądzono, że biofilm powstaje tylko na podłożu abiotycznym lub na tkankach w ustroju gospodarza. Obecnie wiadomo, że niektóre mikroorganizmy mają zdolność tworzenia biofilmu bez udziału powierzchni stałej [34, 39].

W naturalnym środowisku bytowania ponad 99% bakterii występuje w formie biofilmu [75] i obecnie

\* Autor korespondencyjny: Paula Bigos, Student Wydziału Lekarskiego, Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów działające przy Katedrze i Zakładzie Mikrobiologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Lekarski, ul. Chałubińskiego 4, 50-368 Wrocław; tel. 71 784 00 65; e-mail: bigospaula@gmail.com

ten „styl życia bakterii” należy uznać za główny traktując występowanie w formie pojedynczych komórek jako fazę przejściową [15]. Bakterie w biofilmie charakteryzują się znacznie większym potencjałem przetrwania [15].

Biofilmy są wszechobecne [15], znacząco wpływając na nasze zdrowie jak i przemysł [13]. Ich rozwój może przynosić zarówno korzyści jak i skutki negatywne. Wykazano ich obecność na różnych powierzchniach, w różnych środowiskach, zarówno tych naturalnych jak i stworzonych przez człowieka, w tym również w środowisku szpitalnym [13, 30]. Obecność w tym ostatnim szczególnie martwi, ponieważ wiąże się niewątpliwie z ryzykiem zakażeń szpitalnych [30]. Jest to bardzo istotne, ponieważ prawie 80% zakażeń jest związana z tworzeniem struktur biofilmu [71]. Tego rodzaju zakażenia, często o przewlekłym i nawracającym charakterze, wymagają indywidualnego podejścia. Wynika to przede wszystkim z różnic we właściwościach bakterii tworzących biofilm w porównaniu do tych samych mikroorganizmów, ale bytujących pod postacią pojedynczych komórek [70].

Z punktu klinicznego najważniejsze, cechy biofilmu to jego duża oporność na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, szczególnie na antybiotyki. Okazuje się, że drobnoustroje w formie biofilmu mogą być nawet 1000x bardziej odporne w porównaniu do ich odpowiednika w formie planktonowej (pojedyncze, rozproszone komórki) [40, 59, 71]. Poza tym z biofilmem, a dokładnie z mikroorganizmami, które go tworzą, nie radzi sobie nasz układ immunologiczny. Biofilm chroni komórki bakterii przed mechanizmami obronnymi układu immunologicznego człowieka [40] utrudniając penetrację przeciwciał w głąb jego struktur a także uniemożliwiając proces fagocytozy. Problemem jest także fakt, że dojrzały biofilm może ulegać fragmentacji a oderwane agregaty biofilmu lub pojedyncze komórki go tworzące mogą się osadzać w zupełnie nowym miejscu, często odległym od pierwotnej lokalizacji toczącego się zakażenia [59].

Większość autorów uważa, że proces tworzenia biofilmu składa się z 5 etapów [71]. Dwa pierwsze, czyli adhezja niespecyficzna i specyficzna, wydają się kluczowe. Kolejne fazy to: tworzenie mikrokolonii (akumulacja), dojrzewanie (maturacja), oderwanie komórek z dojrzałego biofilmu i ich wędrówka w poszukiwaniu nowych miejsc do zasiedlenia (dyspersja) [41, 71].

Adhezja nieswoista, inaczej „faza łączenia”, to głównie interakcje fizykochemiczne jakie zachodzą pomiędzy powierzchnią abiotyczną lub tkanką a komórką drobnoustroju. Ta odwracalna faza zachodzi najczęściej w wyniku oddziaływań elektrostatycznych, oddziaływań hydrofobowych lub Lewisa, wiązań van der Waalsa i napięcia powierzchniowego lub udziału sił grawitacyjnych [41].

W „fazie unieruchomienia”, czyli inaczej adhezji specyficznej mają miejsce natomiast nieodwracalne, swoiste interakcje typu receptor-ligand, które zachodzą pomiędzy zewnątrzkomórkowymi strukturami bakterii (adhezyny, lektyny) a komórkowymi receptorami. W przypadku biomateriału istotnym wydaje się fakt pokrywania jego powierzchni przez warstwę białek macierzy pozakomórkowej, co ma miejsce po kontakcie biomateriału z płynami ustrojowymi i tkankami [41].

Akumulacja zachodzi dzięki proliferacji komórkowej, adhezji między komórkami drobnoustrojów i wydzielaniem przez nie zewnątrzkomórkowego śluzu. Pod wpływem śluzu bakterie zaczynają zlepiać się między sobą, w dalszym etapie śluz zaczyna pokrywać również zaadherowane komórki. Pokryte śluzem bakterie ulegają zmianom i zróżnicowaniu. Bakterie, które bytują głęboko we wnętrzu biofilmu mają ograniczony dostęp tlenu i ograniczony dostęp składników odżywczych – zaczynają u nich dominować beztlenowe szlaki metaboliczne [1, 41].

Maturacja to zmiany i zróżnicowania pomiędzy komórkami mikroorganizmów, które tworzą biofilm. Widoczne są różnice w metabolizmie tych drobnoustrojów, które znajdują się w głębszych warstwach biofilmu (metabolizm beztlenowy) w porównaniu z komórkami warstw szczytowych (metabolizm tlenowy). Biofilm staje się bardzo różnorodny pod względem aktywności komórek go tworzących: obecne są zarówno komórki martwe, komórki w stanie uśpienia, komórki o metabolizmie beztlenowym jak i komórki o metabolizmie tlenowym [59].

Kiedy biofilm staje się dojrzały i osiąga krytyczną dla siebie wielkość następuje oddzielenie i przemieszczanie się do środowiska całych jego fragmentów lub bakterii uwolnionych z jego dystalnych warstw (dyspersja). Nie do końca znane są mechanizmy jakie prowadzą do dyspersji biofilmu. Kluczowe wydają się niekorzystne dla bakterii warunki jakie panują w obrębie biofilmu – brak składników odżywczych lub utrudniony ich przepływ a także silna konkurencja – które „zmuszają” do poszukiwania bardziej korzystnych nisz [58]. Oderwane fragmenty mogą przemieszczać się np. ze strumieniem krwi i zapoczątkować infekcję w zupełnie innym, nowym miejscu. Efektem tego mogą być zakażenia narządowe i ogólnoustrojowe [10, 41, 59, 71].

Ogromną rolę w procesie tworzenia biofilmu jak i w jego funkcjonowaniu odgrywa system chemicznej komunikacji między mikroorganizmami. Fenomen porozumiewania się drobnoustrojów, istotny dla przeprowadzenia wielu procesów fizjologicznych, został odkryty w 1970 roku [5]. Quorum sensing (QS), bo o nim mowa, to zjawisko chemicznej komunikacji bakterii przy udziale cząsteczek sygnalizujących (autoinduktorów). Proces ten daje możliwość dynamicznego reagowania na zmiany zachodzące w środowi-

sku zewnętrznym a także na procesy mające miejsce we wnętrzu biofilmu. Poprzez autoinduktor mikroorganizmy w sposób kontrolowany regulują przebieg procesów fizjologicznych lub ekspresję czynników chorobotwórczości w zależności od liczebności bakterii. Kiedy bakterie osiągną właściwą liczbę, inaczej kworum, a co za tym idzie stężenie autoinduktora przekroczy wartość progową, następuje kontrolowana zmiana ekspresji genów co daje możliwość współdziałania danej populacji bakterii [59].

Warto dodać, że system quorum sensing występuje u bakterii tego samego jak i innych gatunków i daje szansę, skoordynowanej regulacji istotnych procesów życiowych w całej populacji.

## 2. Biofilm w różnych częściach ciała organizmu człowieka

Tak jak zaznaczono wcześniej biofilmy są wszędzie obecne [15] a ich rozwój może przynosić zarówno korzyści jak i skutki negatywne. Wielogatunkowy biofilm w organizmie człowieka jest tworzony przez mikrobiotę bytującą w jamie ustnej – głównie na powierzchni zębów, w jelitach, w pochwie lub na skórze [60, 68, 69].

Mikroflorę przewodu pokarmowego stanowi ponad 1000 gatunków mikroorganizmów. Komensalne wielogatunkowe drobnoustroje biofilmu jelitowego, chronią przed przewlekłymi chorobami przewodu pokarmowego, zatrzymują wodę w organizmie, stymulują odporność gospodarza, produkują witaminy (witamina K, biotyna), biorą udział w rozkładzie pokarmu. Biofilm jelit tworzą m. in. bakterie z rodzaju *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* i *Streptococcus* [14, 35].

Zdolność tworzenia biofilmu jest charakterystyczna także dla bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus*. Bakterie te kolonizują jelita, pochwę i chronią przed zakażeniami przewodu pokarmowego, zakażeniami układu moczowego a także chorobami przenoszonymi drogą płciową [35]. Występujące w pochwie *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus johnsoni* i *Lactobacillus iners*, pomagają w ochronie błony śluzowej przed patogenami, ponieważ ich metabolity (kwasy organiczne, nadtlenek wodoru, bakteriocyny) działają przeciwdrobnoustrojowo [17, 35, 63].

Biofilm jest również dominującą formą bytowania drobnoustrojów występujących na powierzchni zdrowej skóry. Do drobnoustrojów obecnych na skórze osób dorosłych możemy zaliczyć gronkowce koagulazo-ujemne, (z przewagą *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus haemolyticus* i *Staphylococcus capitis*) bakterie z rodzaju *Corynebacterium* i *Pseudomonas* a także *Cutibacterium acnes*.

Naturalna mikroflora skóry spełnia funkcję ochronną i immunomodulacyjną [60].

Biofilm został uznany za problem medyczny pod koniec lat 60. XX w. [46]. Do chorób związanych z tworzeniem biofilmu należą m.in. choroby przyzębia (będą one omówione w dalszej części pracy) a także infekcje płuc u pacjentów z mukowiscydozą. Biofilm może być obecny w ranie przewlekłej, w przewlekłych infekcjach dotyczących układu moczowo-płciowego, w chorobach otolaryngologicznych, w infekcjach oka [2, 3, 14, 17, 21, 23, 26, 38, 46, 55, 60, 65]. Biofilm utworzony na elementach obcych, czyli biomateriałach wprowadzonych do organizmu człowieka (np. implanty stomatologiczne, cewniki naczyniowe, implanty ortopedyczne, cewniki moczowe, wewnątrzmaciczne wkładki antykoncepcyjne, implanty kardiologiczne) może prowadzić do choroby okołointplantowej [3, 21, 46, 53].

Mukowiscydoza to rzadka choroba genetyczna spowodowana mutacją genu CFTR, który odpowiada za właściwy transport soli i wody w komórkach. W rezultacie organizm chorego wytwarza w płucach nadmiernie lepki i gęsty śluz, który zalega w oskrzelach i staje się doskonałym podłożem dla rozwoju bakterii [14]. Dominującym patogenem przewlekłego zapalenia płuc u chorych na mukowiscydozę jest *Pseudomonas aeruginosa*. Bakteria ta ma doskonałe mechanizmy adaptacyjne, jest oporna na antybiotykoterapię i niestety proces leczenia nie jest w stanie wyeliminować tych pałeczek z płuc. Biofilm utworzony przez *P. aeruginosa* jest w stanie osiągnąć średnicę większą niż 100 µm [46]. Często obserwuje się koinfekcję *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* i *Candida albicans* [21]. Podczas przewlekłego zakażenia o etiologii *P. aeruginosa* następuje ciągłe niszczenie tkanki płuc, co w konsekwencji doprowadza do spadku czynności tego narządu [14].

Czynnikami etiologicznymi infekcji ran są często drobnoustroje wchodzące w skład mikrobiomu skóry. Zwykle w ranach dochodzi do zakażeń mieszanych, w których uczestniczą drobnoustroje tlenowe, jak i bez-tlenowe. Mieszane zakażenie również może rozwinąć się przez początkową infekcję grzybiczą, prowadzącą do pęknięć naskórka, co znacznie ułatwia bakteriom wniknięcie do głębiej położonych tkanek. Ostatecznie dochodzi do powstania trudno gojących się ran przewlekłych, często skolonizowanych przez wiele gatunków drobnoustrojów [2]. Biofilm w ranie utrudnia proces gojenia głównie poprzez zaburzone procesy immunologiczne, zakłócony mechanizm odbudowy skóry, ziarninowanie i naskórkowanie rany [2]. Do najczęściej występujących ran przewlekłych należą: odleżyny (powstające w następstwie długotrwałego ucisku, u osób unieruchomionych, leżących), owrzodzenia żyłne podudzi (będące wynikiem zmniejszonego dopływu krwi do kończyn dolnych w wyniku miażdżycy) lub zespół stopy cukrzycowej [14, 23, 65].



W ranach przewlekłych biofilm może obejmować tkanki powierzchniowe, w których jako pierwszy kolonizuje *S. aureus* jak również tkanki głębokie, które preferuje *P. aeruginosa* [14, 23, 65]. Egzopolisacharyd PIA (ang. polysaccharide intracellular adhesin) wytwarzany przez gronkowca złocistego wpływa na pogorszenie stanu rany [2]. Możliwość przeżycia *P. aeruginosa* w mieszanym biofilmie zależy od jego zdolności wytwarzania pirocyjaniny lub cyjanowodoru, które hamują wzrost *S. aureus*. Pałeczka ropy błękitnej podobnie antagonistycznie działa na *S. epidermidis* [2]. W ranach przewlekłych strukturę biofilmu mogą tworzyć także *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Acinetobacter baumannii* a także bakterie beztlenowe *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus* spp. i *Actinomyces* spp. [2, 23]. W stopie cukrzycowej *C. albicans* wspiera wzrost bakterii beztlenowych *B. fragilis* a także *Clostridium perfringens* [23].

Biofilm może również być obecny w ranie oparzeniowej. Głównym czynnikiem etiologicznym zakażeń ran oparzeniowych jest *P. aeruginosa* [65]. W ranach tych często biofilm rozwija *C. albicans* oraz *S. aureus*. Warto zaznaczyć, że sterole wydzielane przez *C. albicans* przyczyniają się do wzrostu *S. aureus* w biofilmie, natomiast farnezol hamuje tworzenie biofilmu przez gronkowca złocistego.

Zakażenia układu moczowego (ZUM) związane z tworzeniem struktur biofilmu należą do przewlekłych i nawracających [17, 21, 38, 53]. Na tego rodzaju infekcje narażeni są głównie pacjenci cewnikowani [21, 53]. Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi ZUM są głównie Gram-ujemne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Wśród nich należy wymienić *Escherichia coli*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Providencia stuartii*, *K. pneumoniae*, bakterie z rodzaju *Serratia* oraz pałeczki niefermentujące *P. aeruginosa* i *Acinetobacter* spp. [21, 46]. *S. aureus* i *S. epidermidis* odpowiedzialne są za około 50–70% infekcji związanych z tworzeniem biofilmu na cewnikach moczowych [53].

Bakteryjne zapalenie pochwy (waginoza bakteryjna) związane jest z obecnością mieszanego biofilmu na nabłonku pochwy. Najczęściej dotyczy kobiet w wieku rozrodczym. Może być przyczyną poronień, przedwczesnych porodów lub niepłodności. W zakażeniu tym dominuje *Gardnerella vaginalis* [17]. Prawdopodobnie należy ona do wczesnych gatunków kolonizujących. Inne beztlenowce takie jak *Prevotella bivia*, *Atopobium vaginae* i *Megasphaera* współistnieją w biofilmie jako późni kolonizatorzy. Tak jak w wyżej opisywanych infekcjach bakteryjnych tak i w przypadku waginozy bakteryjnej leczenie przynosi krótkotrwałą poprawę a w większości przypadków następuje nawrót choroby [38].

Tworzenie biofilmu może być przyczyną nawracających infekcji ucha środkowego. Za infekcje te odpo-

wiedzialne są *Streptococcus pneumoniae*, *H. influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *S. epidermidis* i *P. aeruginosa* [21]. Natomiast czynnikiem etiologicznym w przewlekłym zapaleniu błony śluzowej nosa jest *S. aureus* i *P. aeruginosa*. Wszystkie te gatunki mogą tworzyć biofilm na błonach śluzowych, co utrudnia znacznie proces leczenia. Tworzenie biofilmu istotne jest również w patogenezie przewlekłego zapalenia zatok przynosowych. Dolegliwości chorobowe wywołane są przez *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. influenzae* i grzyby *Candida* spp. [3].

Do przewlekłych infekcji związanych z tworzeniem biofilmu należą także infekcje oka. Występują przede wszystkim u osób noszących szkła kontaktowe [21, 26]. Bakteryjne infekcje oka obejmują zapalenie wnętrza gałki ocznej, zapalenie spojówek, zapalenie rogówki, zapalenie powiek, oczodołowe zapalenie tkanki łącznej. Mikroorganizmy odpowiedzialne za tego rodzaju infekcje należą zarówno do bakterii Gram-dodatnich jak i Gram-ujemnych. Głównymi patogenami są *S. aureus* i *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. marcescens*, *Moraxella* spp., *H. influenzae*, *S. pneumoniae* [26]. *S. aureus*, *P. aeruginosa* i *S. marcescens* są główną przyczyną tworzenia biofilmów na powierzchni soczewek kontaktowych [21, 26].

Zakażenia okołowszczepowe są wywoływane przez drobnoustroje, które przyłączając się do powierzchni implantu żyją w postaci biofilmu. Do zakażenia dochodzi najczęściej podczas procedury implantacji a źródłem mikroorganizmów jest skóra pacjenta. Najczęstszymi czynnikami etiologicznymi zakażeń okołointplantowych są gronkowce: *S. aureus* i *S. epidermidis* [58]. Leczenie tego rodzaju zakażeń często wymaga przedłużonej antybiotykoterapii i interwencji chirurgicznej. Mogą być także przyczyną wielu powikłań takich jak nieprawidłowy wzrost odłamów kostnych, zapalenie skóry lub błon śluzowych a także zakażenia systemowe [58].

### 3. Wielogatunkowy biofilm jamy ustnej

Jama ustna dziecka tuż po urodzeniu jest wolna od mikroorganizmów. Źródłem drobnoustrojów, które z czasem zaczną kolonizować jamę ustną, jest przede wszystkim matka, ale może też być środowisko lub personel medyczny [19].

Mikrobiota jamy ustnej zmienia się w zależności od naszego wieku i tym samym stanu uzębienia. Jako pierwsze jamę ustną zasiedlają paciorkowce, często określane drobnoustrojami pionierskimi. Ich obecność stwarza dobre warunki do kolonizacji przez inne mikroorganizmy. U rocznego dziecka do głównych składników mikrobioty jamy ustnej należą paciorkowce, gronkowce, bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Neisseria* oraz niektóre beztlenowce. Podczas wyrzynania zębów, kiedy pojawiają się kolejne nisze – po-

wierzchnia szkliwa i szczelina dziąsłowa – zachodzą kolejne zmiany. Paciorkowce i inne drobnoustroje preferujące tkanki twarde kolonizują szkliwo zęba, te zaś dla wzrostu których konieczne jest środowisko beztlenowe zasiedlają szczelinę dziąsłową (np. bakterie z rodzaju *Prevotella* lub *Porphyromonas*). Gdy wraz z wiekiem zaczynamy tracić zęby skład mikrobioty jamy ustnej jest zbliżony do tego z którym mamy do czynienia u małego dziecka jeszcze przed pojawieniem się zębów. Pojawiające się na tym etapie uzupełnienia protetyczne wpływają na zwiększenie się liczby grzybów z rodzaju *Candida* [19, 33].

Według wielu badaczy, mikrobiota jamy ustnej jest na tyle dobrze zorganizowana, że może być traktowana jak rodzaj prymitywnego organizmu wielokomórkowego. Wykazuje właściwości, których nie można przypisać pojedynczym gatunkom. Złożoność procesów zachodzących pomiędzy poszczególnymi składowymi mikrobioty jamy ustnej zapewnia wyjątkową oporność na zmiany warunków środowiska co ma istotny wpływ na utrzymanie zdrowia jamy ustnej [47].

Mikrobiotę jamy ustnej u człowieka dorosłego tworzy ponad 700 gatunków bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, zarówno tlenowych jak i beztlenowych. Bakterie kolonizują twardą powierzchnię zębów, tkanki miękkie błony śluzowej jamy ustnej, bruzdę dziąsłową, język, policzki, podniebienie i migdałki [11, 57]. Najczęstszymi bakteriami wchodzącymi w skład mikrobioty zdrowej jamy ustnej są bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Gemella*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Treponema*, *Lactobacterium*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacterium* i *Propionibacterium* [11]. Skład mikroorganizmów różni się u poszczególnych osób i tak jak wspomniano wcześniej także zmienia się wraz z wiekiem [66].

Na profil mikroorganizmów wpływa wiele czynników, wśród których wymienić należy m.in. reaktywność układu odpornościowego gospodarza, stan zdrowia, przebyte terapie lekami bakteriobójczymi lub bakteriostatycznymi, poziom wydzielania śliny, rodzaj stosowanej diety, położenie geograficzne, status społeczny oraz dbałość o higienę jamy ustnej [47, 50]. Przykładem naturalnego biofilmu jest płytka nazębna. Chroni ona przed patogenami wnikającymi z zewnątrz, przy prawidłowym przepływie śliny i odpowiedniej higienie jamy ustnej. Gdy te czynniki zostają zaburzone płytka nazębna rozrastając się zaburza normalny przepływ śliny co przyczynia się do kolonizacji patogennych mikroorganizmów [74].

Rozwój płytki nazębnej to wieloetapowy proces, w którym różne gatunki mają przypisane określone funkcje, umożliwiające tworzenie i rozwój rozbudowanego wielogatunkowego biofilmu [47]. Rozpoczyna się

od pokrycia powierzchni zęba błonką nabytą (pellicule). Proces ten zachodzi w ciągu kilku minut po wyszczotkowaniu zębów. Błonka zawiera głównie glikoproteiny śliny (mucyna), aglutyniny, fosfoproteiny, enzymy (amylaza), oraz receptory dla adhezyn bakteryjnych [11, 18, 48, 74]. W kolejnym etapie drobnoustroje zaczynają przylegać do powierzchni błonki. „Wcześni kolonizatorzy” adherują do osłonki nabytej za pomocą specyficznych mechanizmów receptor-adhezyna. Są to głównie bakterie z rodzaju *Streptococcus*, *Eikenella*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Prppionibacterium*, *Veillonella* [74]. Ten etap jest odwracalny do momentu, kiedy bakterie pionierskie, przede wszystkim *Streptococcus mutans*, zaczął wydelać polimery białkowo-cukrowe do otoczenia. Dochodzi wówczas do adhezji nieodwracalnej, gdzie komórki bakterii przylegają ściśle do błonki nabytej i wzajemnie do siebie [74]. „Późni kolonizatorzy” rozpoznają na powierzchni bakterii pionierskich polisacharydy i białka receptorowe i przyłączają się do nich tworząc koagregaty. Zdolności takie przypisuje się bakteriom z rodzaju *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* [74]. Następuje przyrost biomasy i dojrzewanie biofilmu [11, 16, 47]. Płytkę nazębną potrzebuje kilku tygodni, żeby „dojrzała”, czyli ustaliła się w niej równowaga gatunkowa [51]. Wraz z dojrzewaniem biofilmu zmienia się jego skład. Zmniejsza się liczba bakterii należąca do wczesnych kolonizatorów (m.in. *Streptococcus* spp.) a zwiększa liczba późnych kolonizatorów (m.in. bakterie z rodzaju *Actinomyces* i *Corynebacterium*) [14, 57]. Z czasem biofilm ulega mineralizacji i powstaje kamień nazębny, który jest mocno związany z powierzchnią zęba a jego kryształki są podobne do tych, które tworzą szkliwo i zębinę. Tworzenie kamienia dodatkowo przyspieszane jest przez obecność obumarłych bakterii oraz metabolitów bakteryjnych. Warto zaznaczyć, że kamień sprzyja retencji płytki nazębnej oraz ma negatywny wpływ na przyzębie [20, 58].

Skład biofilmu mocno różni się w zależności od lokalizacji [36]. Czynniki selekcyjnymi są tu m.in. dostępność składników odżywczych, niedostępność tlenu oraz tzw. przecieki koronowe śliny [20, 43]. Mikroorganizmy występujące na szczycie zęba tworzą biofilm pod- i naddziąsłowy. Płytkę naddziąsłową zdominowana jest przez paciorkowce Gram-dodatnie np. *S. mutans*, *Streptococcus salivarius* i bakterie z rodzaju *Lactobacillus*. Najczęściej spotyka się w niej 15 rodzajów bakterii, spośród nich m.in. bakterie z rodzaju *Actinomyces*, *Campylobacter*, *Capnocytophaga*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Granulicatella*, *Neisseria*, *Prevotella*, *Streptococcus*, *Veillonella* [12, 36]. Przestrzeń poddziąsłowa odcięta jest od dopływu bogatej w składniki odżywcze śliny, zamiast tego odżywiana jest przez płyn szczelinowy dziąsłowy bogaty m.in. w białka i glikoproteiny [8, 32, 36, 37]. W płytce poddziąsłowej

dominują bakterie proteolityczne i anaerobowe G (-), głównie bakterie z rodzaju *Actinobacillus*, *Campylobacter*, *Filifactor*, *Fusobacterium*, *Parvimonas*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella* i *Treponema* [32].

Między drobnoustrojami tworzącymi biofilm zachodzi wiele interakcji co wpływa na gęstość bakterii w dojrzałej płytce. Są to zależności zarówno antagonistyczne jak konkurencja (o składniki pokarmowe, miejsce przyłączenia się), ale również synergistyczne, czyli kooperacja [29]. W reakcjach konkurencji biorą udział bakteriocydy, kwasy organiczne, nadtlenek wodoru a także różnego rodzaju enzymy [19, 47, 52, 74]. Przykładem oddziaływania synergistycznego jest np. komunikacja metaboliczna.

Bakteriocydy wytwarzane przez *S. mutans* i *S. salivarius*, mają działanie bakteriobójcze na szereg bakterii obecnych w jamy ustnej [37]. Innym przykładem wzajemnego oddziaływania mikroorganizmów jest synergizm między *S. mutans* i *C. albicans*. Zauważono wzmocnienie inwazyjności *C. albicans* oraz promowanie rozrostu biomasy bakteryjnej [18, 25, 29]. Wytwarzany nadtlenek wodoru przez paciorkowce, głównie *S. sanguinis* może mieć znaczenie podczas tworzenia płytki nazębnej poddziąsłowej. Obecność środka utleniającego ogranicza rozwój bakterii beztlenowych (np. *Porphyromonas gingivalis*) [37]. Synergizm między *C. albicans* i *S. mutans* może zwiększać zjadliwość mieszanych biofilmów tworzących się na powierzchni zębów, przy czym *S. mutans* ma hamujący wpływ na filamentację *C. albicans* w biofilmach mieszanych [5].

Paciorkowce jamy ustnej pośredniczą w adhezji do tkanek jamy ustnej, jak również do innych bakterii i grzybów. *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* i *Streptococcus sanguinis*, mogą bezpośrednio oddziaływać z *C. albicans*. Wykazano, że *S. oralis* i *C. albicans* razem tworzą silniejsze biofilmy, niż każdy z tych mikroorganizmów osobno. Koinfekcja *S. oralis* i *C. albicans* prowadzi do wzmożonej inwazji tkanek błony śluzowej. Może to być wynikiem uwolnienia kalpajny, degradującej połączenia E-kadheryn w komórkach nabłonka, umożliwiając dostęp do nabłonka zarówno komórkom grzybów jak i bakterii. *S. oralis* jest również zdolny do indukowania filamentacji *C. albicans*. *S. gordonii* może wiązać się bezpośrednio z *P. gingivalis* i komunikować się z nim za pośrednictwem wydzielanych czynników, nasilając jego patogenne działanie prowadzące do chorób przyzębia. *S. gordonii* bierze udział w silnej interakcji koagregacyjnej z *Actinomyces oris* [50].

Wraz z różnymi gatunkami paciorkowców *Actinomyces* spp. należą do pierwszych kolonizatorów powierzchni i tkanek jamy ustnej. *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus* i *Actinomyces oris* współagregują z *C. albicans*. Wykazano, że niektóre metabolity wytwarzane przez

*A. naeslundii* i *A. viscosus* i wydzielane w dużych stężeniach hamują wzrost *C. albicans*. Gdy stężenie metabolitów jest mniejsze zaobserwowano pobudzenie wzrostu grzybów z rodzaju *Candida*. *Actinomyces* spp. mogą także koagregować z paciorkowcami jamy ustnej, głównie z *S. oralis*. Wskazuje to na możliwość współdziałania *C. albicans* zarówno z *S. oralis*, jak i z bakteriami z rodzaju *Actinomyces*.

Wykazano, że *Fusobacterium nucleatum* hamuje tworzenie strzępek u grzybów z rodzaju *Candida*. Grzyby natomiast osłabiają odpowiedź makrofagów indukowanych przez *F. nucleatum*. To wzajemne osłabienie zjadliwości może przynieść korzyści obu mikroorganizmom – długoterminowy komensalizmowi w jamie ustnej. Trzeba zaznaczyć, że *F. nucleatum* koagreguje z prawie wszystkimi innymi bakteriami jamy ustnej.

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, główny czynnik etiologiczny przewlekłego zapalenia przyzębia może hamować tworzenie strzępek u *C. albicans*. *C. albicans* natomiast zwiększa inwazję *P. gingivalis* odpowiedzialnego za choroby przyzębia [50].

W biofilmie mieszanym wytwarzane przez mikroorganizmy (głównie paciorkowce) metabolity pomagają innym gatunkom czerpać energię potrzebną do wzrostu. Kwas mlekowy będący produktem przemiany materii paciorkowców i pałeczek kwasu mlekowego, jest głównym źródłem energii dla *A. actinomycetemcomitans* i *Veillonellae* [37].

Wiele interakcji międzygatunkowych między bakteriami jamy ustnej prowadzi do zmian w ekspresji genów w jednym lub obu organizmach partnerskich. W przypadku interakcji między *Veillonellae* a paciorkowcami, regulacja genów najwyraźniej wpływa na magazynowanie węglowodanów przez paciorkowce [37].

#### 4. Zakażenia jamy ustnej związane z biofilmem wielogatunkowym

Jeśli biofilm się rozwinie, może się nieprawidłowo rozrastać i powodować zakażenia. W sprzyjających warunkach istnieje ryzyko rozwinięcia zapalenia dziąseł, paradontozy, peri-implantitis. Zakażenia jamy ustnej mogą także szerzyć się drogą krwionośną i powodować zakażenia ogólnoustrojowe [43].

W wyniku nadmiernego spożycia węglowodanów, niedostatecznej higieny jamy ustnej oraz spadku przepływu śliny dochodzi do rozwoju zmian próchnicznych. Węglowodany fermentują do kwasów organicznych, co zapewnia zakwaszenie mikrośrodowiska, a w konsekwencji przewagę gatunków kwasotwórczych i kwasoopornych w biofilmie przy spadku ogólnej różnorodności gatunkowej. Organizmy kwasotwórcze i kwasooporne posiadają zdolność budowania pozakomórkowych polisacharydów z cukrów dostarczanych



z pożywieniem. Biorą one udział w tworzeniu macierzy międzykomórkowej biofilmu, zapewniają ustabilizowanie płytki na powierzchni zęba lub są zapasowymi substancjami wykorzystywanymi do pozyskiwania energii w przypadku ograniczonego dostępu do cukrów [43, 64]. Za główne bakterie próchnicotwórcze uważa się: *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium dentium*, *Scardovia wiggsiae*. Nowe doniesienia mówią także o udziale w zmianach próchnicznych bakterii z rodzaju *Schlegelella* oraz *Pseudoramibacter*. Należy zaznaczyć, że sama obecność wymienionych gatunków nie jest równoznaczna z wystąpieniem zmian próchnicznych, ponadto próchnica może wystąpić bez udziału każdego z nich. Nadzędne znaczenie ma zaburzenie homeostazy biofilmu nazębnego na korzyść bakterii kwasotwórczych [43]. Nieleczona próchnica może powodować penetrację bakterii związanych z biofilmem w głąb zęba, powodując w konsekwencji zapalenie miazgi zębowej, która może doprowadzić do martwicy zęba [7, 19, 43, 64].

Biofilm kanałów korzeniowych w warunkach fizjologicznych jest zdominowany przez bakterie tlenowe i fakultatywne beztlenowce. W wyniku zmian pH lub niedostatecznej ilości tlenu w kanale korzeniowym dochodzi do zmiany fenotypu biofilmu, z przewagą bakterii bezwzględnie beztlenowych oraz do rozwoju zakażeń, w tym parodontozy [24, 43, 52]. Za zakażenia te odpowiadają głównie bakterie z rodzajów: *Bacteroides* spp., *Prophyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Treponema* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Eubacterium* spp., i *Campylobacter* spp. W niektórych przypadkach może dojść do przedostania się bakterii z ognisk zakażenia w kanałach korzeniowych do fizjologicznie jałowej miazgi zębowej, powodując jej zapalenie. W wyniku niepowodzenia leczenia endodontycznego, nieleczonej próchnicy lub przetrwałego zakażenia tkanek okołowierzchołkowych mogą rozwinąć się zakażenia wtórne kanałów korzeniowych oraz miazgi, a profil bakteryjny tych zakażeń jest różny w zależności od przyczyny pierwotnej [19, 43, 52]. Kiedy infekcja występuje wskutek postępującej próchnicy, w początkowych etapach zakażenia biorą głównie udział bakterie próchnicotwórcze. Z czasem, z powodu niedostatecznej ilości tlenu, tlenowe bakterie próchnicotwórcze zostaną wyparte przez bakterie bezwzględnie beztlenowe. Flora bakteryjna kanałów korzeniowych znacznie zmienia się pod wpływem leczenia kanałowego. Główną przyczyną niepowodzeń w leczeniu endodontycznym jest przeciek koronowy. Do jego powstania może doprowadzić złamanie odbudowy zęba, nieszczelne wypełnienie lub korona. Przeciek koronowy umożliwia dostarczenie substancji odżywczych, co pomaga odżywić uśpionym organizmom w niewypełnionych przestrzeniach kanałów. „Wprowadza” również nowe organizmy. W ten sposób można także tłumaczyć nawrót zapalenia po leczeniu

endodontycznym [24]. Bakterie wywołujące zakażenia wtórne charakteryzują się wysoką tolerancją na szeroki zakres pH oraz niedobór substancji odżywczych. Bakteriami dominującymi są w tym przypadku bakterie z rodzajów: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* oraz grzyby, zwłaszcza *Candida* spp. [52].

Kumulacja płytki nazębnej w okolicy dziąseł prowadzi do zapalenia dziąseł i zwiększonej ilości komórek zapalnych, nasilających odpowiedź immunologiczną gospodarza, doprowadzając w konsekwencji do destrukcji tkanek przyzębia. Mikroorganizmy, które są związane ze schorzeniami przyzębia, wykorzystują białka oraz glikoproteiny gospodarza do celów odżywczych. Są to Gram (-) bakterie beztlenowe: *P. gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *Prevotella* spp., *F. nucleatum* [43, 64]. W tym przypadku dochodzi do wzrostu ogólnej różnorodności gatunkowej biofilmu [64]. Choroba objawia się bólem, krwawieniem i obrzękiem dziąseł. Jest ona w pełni odwracalna poprzez usunięcie biofilmu z powierzchni zęba oraz utrzymanie odpowiedniej higieny jamy ustnej. Postępująca choroba oraz nasilenie odpowiedzi immunologicznej powodują uszkodzenie tkanek głębszych, w tym więzadeł przyzębia. Rozwija się parodontoza, dochodzi do tworzenia się kieszeni dziąseł i przyzębia oraz wypadania zębów. Leczenie polega na wszczepieniu implantów zębów [7, 43].

Implanty są bardziej podatne na powstawanie biofilmu na ich powierzchni niż zęby naturalne. U wielu pacjentów rozwija się zapalenie tkanek okołointplantowych, tzw. peri-implantitis, które może być wczesne lub późne. Peri-implantitis wczesne jest spowodowane nieprawidłową osteointegracją implantów, co może być skutkiem użycia wadliwego materiału, zakażenia śródoperacyjnego, nieskutecznego gojenia wskutek zakażenia systemowego. Peri-implantitis późne natomiast jest to zaburzenie funkcji prawidłowo zaimplantowanego implantu, towarzyszy mu przewlekłe zakażenie tkanek otaczających. Odpowiednikiem zapalenia dziąsła w odniesieniu do tkanek okołointplantowych jest tzw. peri-implant mucositis, gdzie stan zapalny dotyczy wyłącznie tkanek miękkich, nie kości. Rozwój zakażenia może prowadzić do stopniowej destrukcji kości – peri-implantitis – odpowiednik parodontozy [7, 43]. Zakażenia związane z implantami zębowymi dotyczą 5–8% pacjentów i są spowodowane w większości przez: *S. aureus*, *Enterococcus* spp., *Peptostreptococcus micros*, *Bacteroides forsythus*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *T. denticola*, *Prevotella intermedia*, *T. forsythia*, *F. nucleatum*, *Prevotella nicrescens*, *Bacteroides* spp.

Ze względu na obfite unaczynienie dziąseł bakterie powodujące zakażenia jamy ustnej często dostają się do krwiobiegu. Bakteriemia może wystąpić na skutek agresywnego szcztokowania zębów, urazu twarzoczaszki,

powikłania parodontozy lub zabiegów dentystycznych. Zazwyczaj bakterie są eliminowane z krwiobiegu w przeciągu 30 minut i nie powodują problemów zdrowotnych. Czasami, zwłaszcza u pacjentów z grupy ryzyka, dochodzi jednak do rozwoju zakażeń innych narządów. Najpoważniejszym z nich jest bakteryjne zapalenie wsierdza, gdzie *Streptococci z gr. orale* są jednym z najczęstszych czynników etiologicznych tego rodzaju zakażeń [46]. Bakterie powodują uszkodzenie mięśnia sercowego a także elementów sztucznych (sztuczne zastawki aortalne, mitralne, urządzenia wewnątrzsercowe) [28, 65]. Skutkiem zapalenia wsierdza może być niewydolność serca oraz zatorowość naczyniowo-mózgowa [28]. Ponadto zanotowano zapalenie układu oddechowego, pokarmowego i mózgu [43].

Na uwagę zasługują wzajemne oddziaływanie grzybów i bakterii tworzących biofilm jamy ustnej oraz rola tych relacji w rozwoju zakażeń. W badaniach wykazano, że *C. albicans* i *Streptococcus* spp. wzajemnie zwiększają swoją wirulencję. Prowadzą do rozwoju kandydozy jamy ustnej, próchnicy wczesno dziecięcej, peri-implantitis. W przypadku próchnicy wczesno dziecięcej, obecność *C. albicans* oraz sacharozy synergistycznie zwiększa wirulencję *S. mutans*, w krótkim czasie doprowadzając do rozległych zmian próchnicznych [20]. Zależności te są przedmiotem dalszych badań i obserwacji.

Istnieją także zakażenia związane z tworzeniem biofilmu wyłącznie przez grzyby. Przewlekła kandydoza rumieniowa dotyczy nawet 60% pacjentów stosujących protezy zębowe i jest związana z biofilmem stworzonym przez grzyby z rodzaju *Candida*. Ogniska zapalne tworzą się na błonie śluzowej podniebienia, w pobliżu powierzchni protezy. Czynnikiem predysponującym do rozwoju zakażenia są m.in.: nieprawidłowa higiena jamy ustnej, cukrzyca, upośledzenie funkcjonowania układu odpornościowego [51].

## 5. Zapobieganie i metody zwalczania biofilmu jamy ustnej

### 5.1. Profilaktyka i właściwa higiena jamy ustnej

Terapia zakażeń jamy ustnej związanych z tworzeniem biofilmu stanowi wyzwanie dla współczesnej stomatologii. Nadrzędne znaczenie ma więc zapobieganie tego rodzaju zakażeniom, głównie poprzez ograniczenie powstawania biofilmu. Podstawową formą profilaktyki jest przede wszystkim właściwa higiena jamy ustnej, polegająca na regularnym oczyszczaniu zębów, ich uzupełnieniu oraz aparatów ortodontycznych za pomocą szczotki i pasty do zębów, nici dentystycznych oraz środków do płukania jamy ustnej. Zarówno szczoteczka jak i pasta do zębów powinny być dobrane, do indywidualnych potrzeb pacjenta. Pomocne w tym

będzie zbadanie stanu uzębienia oraz zebranie odpowiedniego wywiadu przez stomatologa lub higienistę stomatologiczną [74]. Należy także pamiętać o oczyszczaniu przestrzeni międzyzębowych za pomocą nici dentystycznych, szczoteczek międzyzębowych lub szczoteczek jednopeczkowych.

W prewencji próchnicy należy wybierać pasty do zębów oraz płyny do płukania jamy ustnej, które zawierają środki o działaniu przeciwbakteryjnych. Są to fluor, chlorheksydyna, trikloksan, fluorek cyny (II), sangwinaryna oraz sole cynku [9, 31, 74].

Nie bez znaczenia pozostaje dieta pacjenta, szczególnie ilość spożytych cukrów. Należy ograniczyć spożycie cukrów przed snem oraz między posiłkami, a ich dzienna dawka nie powinna przekraczać 40–55 g [31].

Powszechnym problemem stomatologicznym jest także rozwijanie się próchnicy wtórnej na skutek kumulowania się biofilmu w mikroszczelinach pomiędzy wypełnieniem pierwotnego ubytku a zdrowym zębem. Ponadto powierzchnia materiału stomatologicznego, ze względu na swoją chropowatość bardziej sprzyja odkładaniu się na niej biofilmu niż na powierzchni zdrowego szkliwa. [19] Z tego powodu dodano do materiałów dentystycznych substancje, które zawierają związki fluoru lub absorbują je z otoczenia, aby przy spadku pH je uwalniać, gwarantując działanie bakteriostatyczne. Przykładami takich związków są: giomery, cementy glass-jonomerowe, kompomery [19].

Często jednak dostępne metody zapobiegania tworzenia biofilmu nie są wystarczające, aby całkowicie wyeliminować ryzyko rozwoju zakażenia.

### 5.2. Terapia alternatywna zakażeń jamy ustnej związanych z tworzeniem biofilmu

Ogromnym zróżnicowaniem, pod względem aktywności metabolicznej, komórek tworzących biofilm, tłumaczy się jego oporność na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, przede wszystkim na antybiotyki [74]. Antybiotyk, działający na komórki szczytowych warstw biofilmu, nie będzie działał na te położone głębiej. Często do głębszych warstw biofilmu antybiotyk dociera w stężeniach sub-inhibicyjnych co uniemożliwia inaktywację drobnoustrojów, co gorsza, prowadzi do selekcji szczepów opornych. Poza tym komórki bytujące w stanie uśpienia w sposób powolny, stopniowy nabywają oporność na dany antybiotyk [74].

Bakterie występujące w postaci biofilmu wykazują zwiększoną oporność oraz tolerancję na związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, głównie antybiotyki. Wykazano, że stężenie antybiotyku niezbędne do likwidacji bakterii żyjących w biofilmie musi być co najmniej kilkaset, a nawet tysiąc razy wyższe od stężenia tego samego antybiotyku działającego na formy planktoniczne danych bakterii [74].



Nieskuteczność antybiotykoterapii jest spowodowana głównie przez obecność osłonki cukrowo-białkowej, która utrudnia penetrację substancji przeciwbakteryjnej w głąb biofilmu. Poza tym, bakterie wewnątrz biofilmu ze względu na ograniczony dostęp tlenu zwalniają procesy metaboliczne, co warunkuje nieskuteczność preparatów bakteriobójczych, które działają jedynie na komórki w stanie podziału lub aktywne metabolicznie [74]. Poprawa kliniczna jest więc wynikiem oddziaływania tylko na bakterie występujące na powierzchni biofilmu, co zmniejsza rozległość biofilmu, jednak nie eliminuje go do końca. Co więcej, zabite komórki mogą stać się źródłem pokarmu dla organizmów przetrwałych i prowadzić do powrotu struktury do wielkości pierwotnych nawet w ciągu kilku-kilkunastu godzin [49, 74]. Inna teoria mówi, że poprzez „bliski” ze sobą kontakt komórek tworzących biofilm „zasięg” powierzchni komórki, na którą będzie działać antybiotyk, jest mniejszy niż w przypadku komórek planktonowych [6]. Z niewielkiej odległości między komórkami tworzącymi biofilm oraz dużego ich zagęszczenia, na stosunkowo niewielkiej powierzchni wynika łatwość nabywania mechanizmów oporności przez komórki wrażliwe. Nierzadko, w przypadku biofilmów mieszanych, mamy do czynienia z horyzontalnym transferem genów [22]. Coraz częściej porusza się temat obecności komórek przetrwałych (persister cells) w biofilmie i ich roli w jego oporności. Komórki te, o wysokim poziomie tolerancji na różne związki o działaniu przeciwdrobnoustrojowym, występują głównie w miejscach o nieodpowiedniej dostępności składników odżywczych w biofilmie. Ograniczony wzrost tych komórek i ich duża oporność są przyczyną odnowy biofilmu po zastosowanej u pacjenta antybiotykoterapii co może skutkować nawracającymi, przewlekłymi zakażeniami [27]. Nieskuteczność antybiotykoterapii zmusza naukowców do poszukiwania innych, alternatywnych metod zwalczania biofilmu.

Coraz bardziej powszechne w gabinetach stomatologicznych staje się zastosowanie nanocząsteczek niektórych metali [19, 42, 74]. Ze względu na niewielkie rozmiary oraz możliwość modyfikacji ich struktury są one z powodzeniem wykorzystywane jako transportery leków do trudno dostępnych miejsc [42, 74]. Ponadto wykazano właściwości antibakteryjne niektórych nanocząsteczek metali, a zwłaszcza dwutlenku tytanu (IV) (TiO<sub>2</sub>NPs) oraz srebra (AgNPs) [19, 42, 74]. TiO<sub>2</sub>NPs powoduje śmierć komórek bakteryjnych poprzez destabilizację ich błony komórkowej, jednak tylko w obecności promieni UV [30]. AgNPs natomiast oprócz właściwości bakteriobójczych posiadają również właściwości grzybo- i wirusobójcze [19]. Nanocząsteczki srebra reagują z grupami tiolowymi [-sh] błon komórkowych bakterii, zmieniając ich przepuszczalność oraz blokując łańcuch oddechowy [19, 74]. Dochodzi do

zahamowania procesów oddechowych a także kumulacji we wnętrzu komórki produktów przemiany materii, co w konsekwencji prowadzi do inhibicji produkcji białek i śmierci komórki [19, 74]. Nanosrebro jest szczególnie aktywne wobec *Enterococcus faecalis*, głównej bakterii odpowiedzialnej za rozwój próchnicy wtórnej [19, 42]. Dodanie AgNPs do systemów wiążących wypełnienia endodontyczne z tkankami zęba, zapewnia eliminację drobnoustrojów pozostałych w ubytku oraz zwalczanie biofilmu powstającego w mikroszczelinach pomiędzy wypełnieniem a tkanką zęba, co zapobiega rozwojowi próchnicy wtórnej [19, 42]. Wykazano, że największą skuteczność przeciwdrobnoustrojową uzyskuje się poprzez zastosowanie nanosrebra w postaci 0,02% żelu [42], który gwarantuje przy okazji lepszą adhezję wypełnienia do zęba, a tym samym jego większą trwałość [19].

Innowacyjną terapią w medycynie i stomatologii jest terapia bakteriofagami. Wysoka swoistość bakteriofagów wobec bakterii chorobotwórczych, pozwala na selektywną eliminację bakterii bez wpływu na naturalną mikrobiotę pacjenta [54, 67, 74]. Fagi wykorzystywane w celach terapeutycznych powinny wykazywać cykl lityczny, szybko namnażać się w zainfekowanych komórkach oraz prowadzić do ich lizy z uwolnieniem dużej ilości kopii wirusa [66]. Doprowadzają do śmierci komórek bakteryjnych za pomocą enzymów – lizyn oraz depolimerazy polisacharydów. Ponieważ biofilm bakteryjny składa się z wielu gatunków bakterii, można łączyć bakteriofagi z innymi związkami przeciwdrobnoustrojowymi w celu zwiększenia efektywności leczenia. Alternatywną metodą jest rekombinacja genetyczna fagów, polegająca na wszczepieniu do ich genomu genu określonego enzymu, mającego właściwości przeciwbiofilmowe [54, 67, 74].

Kluczową rolę w formowaniu się biofilmu oraz jego adhezji do powierzchni zębowych odgrywają zewnątrzkomórkowe glukany, wytwarzane przez paciorkowce bytujące w jamie ustnej [54, 73]. Glukany można podzielić na rozpuszczalne w wodzie dekstrany (alfa-1,6-glukany) oraz nierozpuszczalne w wodzie mutany (głównie alfa-1,3-glukany) [73]. Mutany powodują absorpcję paciorkowców do powierzchni zęba, ich agregację, a także stabilizację płytki nazębnej [54, 73]. Dekstrany natomiast stanowią rezerwę cukru w przypadku jego niedoboru dla optymalnego rozwoju bakterii [73]. Wykonano obiecujące próby rozkładu mutanu, z użyciem enzymów glukanolitycznych i tym samym destabilizacji i usunięcia biofilmu. Zespół polskich naukowców przeprowadził udaną próbę eliminacji mutanu oraz biofilmu na modelu protezy za pomocą mieszaniny 3 enzymów w niewielkich stężeniach- dekstranazy, endomutazy oraz egzomutazy [73]. Opisano również badanie wykonane przez japońskich naukowców, którzy metodami inżynierii genetycznej, skonstruowali chimeryczną

glukanazę, łącząc geny kodujące dekstaranazę i mutanazę, pochodzące z różnych gatunków bakterii. Wyniki ukazały 4,1 razy wyższą skuteczność produktu rekombinowanego genu od mieszaniny enzymów [54].

Alternatywną metodą zwalczania biofilmu jest zastosowanie peptydów przeciwdrobnoustrojowych. Substancje te wykazują aktywność zarówno wobec bakterii Gram (+) jak i Gram (–), w tym wielolekoopornych, a także wobec grzybów. Mechanizm działania większości peptydów polega na zmianach w przepuszczalności błony komórkowej patogenu, doprowadzając w konsekwencji do jego śmierci [72]. Do naturalnych peptydów, których skuteczność działania została wykazana w badaniach [4], należy  $\epsilon$ -Poli-L-lizyna oraz nizyna [72]. Badania udowadniają skuteczność obu peptydów w zwalczaniu *S. mutans* in vitro [4]. Obecnie prowadzonych jest wiele prób modyfikacji enzymów naturalnych, aby zoptymalizować ich działanie przeciwbiofilmowe [72]. Jednym z tak powstałych enzymów jest specyficzny peptyd D-enancjomeryczny (DJK-5). Udokumentowano skuteczność DJK-5 wobec eliminacji biofilmu o etiologii *S. mutans* i *E. faecalis*, a także prewencji jego ponownego formowania przez 72 h [76]. Najlepsze rezultaty otrzymano po połączeniu DJK-5 z chlorheksydyną. W innych badaniach wykazano aktywność peptydów hybrydowych, powstałych z określonych fragmentów cekropiryny A oraz melityny [76], zarówno wobec wieloopornych szczepów *Acinetobacter baumannii* [62] jak i *C. albicans* [56].

Terapia fotodynamiczna (PDI) polega na zastosowaniu tzw. fotouczulaczy, czyli nieaktywnych barwników i traktowanie ich światłem o określonej długości fali w obecności tlenu. W wyniku tego powstaje tlen singletowy oraz wolne rodniki, które uszkadzają komórki tworzące biofilm [61]. W badaniach wykazano efektywność Photofrinu aktywowanego światłem laserowym o długości fali 630 nm w obniżeniu żywotności biofilmów *S. mutans* [45]. W innych badaniach szczególnie skuteczne działanie wobec biofilmu *S. mutans* wykazano przy naświetlaniu erytrozyny światłem białym w zakresie fal 500–650 nm. Ponadto zaobserwowano, że im biofilm był bardziej dojrzały tym efektywność PDI była większa, niezależnie od zastosowanego barwnika. Może to oznaczać, że fotouczulacze lepiej przenikają do rozluźnionej struktury biofilmu [61].

## 6. Podsumowanie

W naturalnym środowisku bytowania ponad 99% bakterii występuje w formie biofilmu [75]. Dotyczy to również mikroorganizmów wchodzących w skład mikrobioty naszego organizmu, szczególnie jamy ustnej. Nieprawidłowy rozrost biofilmu może prowadzić do zapalenia dziąseł, parodontozy lub periimplantitis.

Terapia zakażeń jamy ustnej związanych z tworzeniem struktur biofilmu stanowi wyzwanie dla współczesnej stomatologii. Nadrzędne znaczenie ma więc zapobieganie tego rodzaju zakażeniom, głównie poprzez ograniczenie powstawania biofilmu.

Znajomość metod profilaktyki, ale także skutecznego usuwania biofilmu są w tym względzie bardzo istotne.

## Piśmiennictwo

1. Achinas S., Charalampogiannis N., Euverink G.J.W.: A Brief Recap of Microbial Adhesion and Biofilms. *Appl. Sci.* **9**, DOI:10.3390/app9142801 (2019)
2. Ahmed A., Boateng J.: Treatment of Mixed Infections in Wounds (in) *Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications*, ed. Boateng J., John Wiley&Sons, 2020, p.91–113
3. Altin F., Yasar H., Desrosiers M.: Superantigens and Biofilms in Sinus Diseases (in) *All Around the Nose*, ed. Cingi C., Bayar Muluk N., Springer, Cham, 2020, p.179–186
4. Badaoui Najjar M., Kashtanov D., Chikindas M.L.: Natural antimicrobials  $\epsilon$ -Poly-L-lysine and Nisin A for control of oral microflora. *Probiotics Antimicro.* **1**, 143–147 (2009)
5. Barbosa J.O., Rossoni R.D., Vilela S.F.G., de Alvarenga J.A., Velloso Md.S., Prata M.C.d.A., Jorge A.O., Junqueira J.C.: *Streptococcus mutans* Can Modulate Biofilm Formation and Attenuate the Virulence of *Candida albicans*. *Plos One*, **11**, e0150457 (2016)
6. Bartoszewicz M.: Fenotypowe i genotypowe podstawy tworzenia biofilmu przez gronkowce koagulazoujemne na cewnikach moczowych i naczyniowych – ocena morfologii struktury, sposoby eradykacji. Uniwersytet Medyczny im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wrocław (2013)
7. Belibasakis G.N., Charalampakis G., Nagihan B., Stadlinger B.: Periimplant infections of oral biofilm etiology. *Adv. Exp. Med. Biol.* **830**, 69–84 (2015)
8. Berger D., Rakhmimova A., Pollack A., Loewy Z.: Oral Biofilms: Development, Control and Analysis. *High-Throughput*, **7**(3), DOI:10.3390/ht7030024 (2018)
9. Berhe N., Tefera Y., Tintagu T.: Review on biofilm formation and its control options. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* **4**, 122–133 (2017)
10. Berlanga M., Guerrero R.: Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. *Microb. Cell Fact.* **15**, DOI: 10.1186/s12934-016-0569-5 (2016)
11. Bhardwaj S.B.: Oral Biofilms. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* **7**, 643–652 (2018)
12. Bik E.M., Long C.D., Armitage G.C., Loomer P., Emerson J., Mongodin E.F., Nelson K.E., Gill S.R., Fraser-Liggett C.M., Relman D.A.: Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* **4**, 962–974 (2010)
13. Bisht K., Wakeman C.A.: Discovery and Therapeutic Targeting of Differentiated Biofilm Subpopulations. *Front. Microbiol.*, **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.01908 (2019)
14. Bjarnsholt T.: The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS*, **121**, 1–51 (2013)
15. Boudarel H., Mathias J.D., Blaysat B., Grédiac M.: Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *npj Biofilms and Microbiomes*, **4**, DOI: 10.1038/s41522-018-0062-5 (2018)
16. Brown S.A., Whiteley M.: A novel exclusion mechanism for carbon resource partitioning in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J. Bacteriol.* **189**, 6407–6414 (2007)

17. Campisciano G., Zanotta N., Petix V., Corich L., De Seta F., Comar M.: Vaginal microbiota dysmicrobism and role of biofilm-forming bacteria. *Front. Biosci. (Elite Ed.)*, **10**, 528–536 (2018)
18. Cavalcanti I.M., Del Bel Cury A.A., Jenkinson H.F., Nobbs A.H.: Interactions between *Streptococcus oralis*, *Actinomyces oris*, and *Candida albicans* in the development of multispecies oral microbial biofilms on salivary pellicle. *Mol. Oral Microbiol.* **32**, 60–73 (2017)
19. Chałas R., Wójcik-Chęcińska I., Woźniak M.J., Grzonka J., Świążkowski W., Kurzydłowski K.J.: Dental plaque as a biofilm – a risk in oral cavity and methods to prevent. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **69**, 1140–1148 (2015)
20. Chevalier M., Ranque S., Prêcheur I.: Oral fungal-bacterial biofilm models *in vitro*: a review, *Medical Mycology*, **56**, 653–667, (2018)
21. Choudhary P., Singh S., Agarwal V.: Microbial Biofilms (in) Bacterial Biofilms, ed. Dincer S., Özdenefe M.S., Arku A., Intech-Open, 2020, DOI: 10.5772/intechopen.90790
22. Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia*, **1**, 40–52 (2007)
23. Das T., Kimyon O., Manefield M.J.: Bacterial Biofilms on Wounds, a Major Factor That Delays Wound Healing and a Potential Threat to Human Life and Economy (in) Biofilm, Pilonidal Cysts and Sinuses. Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds, ed. Shiffman M., Low M., vol 1, Springer, Cham, 2017, p.69–88
24. Dębicka P., Lipski M., Buczkowska-Radlińska J., Trusewicz M.: Biofilm formation on root canal- review. *Ann. Acad. Med. Stetin.* **54**, 152–156 (2008)
25. Diaz P.I., Strausbaugh L.D., Dongari-Bagtzoglou A.: Fungal-bacterial interactions and their relevance to oral health: linking the clinic and the bench. *Front. Cell. Infect. Mi.* **4**, DOI: 10.3389/fcimb.2014.00101 (2014)
26. Drago L.: Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota, *Microorganisms*, **7**, DOI: 10.3390/microorganisms 7090278 (2019)
27. Dufour D., Leung V., Levesque C.M.: Bacterial Biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, **22**, 2–16 (2012)
28. Elgharably H., Hussain S.T., Shrestha N.K., Pettersson G.B.: Biofilm in Infective Endocarditis and Clinical Implications (in) Biofilm, Pilonidal Cysts and Sinuses. Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds, ed. Shiffman M., Low M., vol. 1. Springer, Cham, 2018, p. 109–120
29. Elias S., Banin E.: Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 990–1004 (2012)
30. Furtak A., Cześnikiewicz-Guzik M.: Skuteczna walka z biofilmem bakteryjnym – kluczowy element profilaktyki chorób jamy ustnej. *Med. Prakt. Stomatol.* **2**, 32–46 (2015)
31. Fields M.W., Sturman P., Anderson S.: The establishment of the CBE launched biofilms as a field of specialized research. *Biofilm*, **2**, <https://doi.org/10.1016/j.biofilm.2020.100020> (2020)
32. Ge X., Rodriguez R., Trinh M., Gunsolley J., Xu P.: Oral microbiome of deep and shallow dental pockets in chronic periodontitis. *Plos One*, **8**, e65520 (2013)
33. Gomez A., Nelson K.E.: The Oral Microbiome of Children: Development, Disease and Implications Beyond Oral Health. *Microb. Ecol.* **73**, 492–503 (2017)
34. Høiby N.: A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *APMIS*, **125**, 272–275 (2017)
35. Hussain A., Ansari A.Z., Ahmad R.: Microbial biofilms: Human mucosa and intestinal microbiota (in) New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering Microbial Biofilms: Current Research and Future Trends, ed. Yadav M.K., Singh B.K., Elsevier, 2019, p. 47–60
36. Jakubovics N.S.: Saliva as the Sole Nutritional Source in the Development of Multispecies Communities in Dental Plaque. *Microbiol. Spectr.* **3**, DOI: 10.1128/microbiolspec.MBP-0013-2014 (2015)
37. Jakubovics N.S., Kolenbrander P.E.: The road to ruin: the formation of disease-associated oral biofilms. *Oral Dis.* **16**, 729–739 (2010)
38. Jung H., Ehlers M.M., Peters R.P.H., Lombaard H., Redelinghuys M.J., Bezuidenhout J.E., Kock M.M.: Growth Forms of *Gardnerella spp.* and *Lactobacillus spp.* On Vaginal Cells. *Front. Cell. Infect. Mi.* **10**, DOI:10.3389/fcimb.2020.00071 (2020)
39. Jung Y.G., Choi J., Kim S.K., Lee J.H., Kwon S.: Embedded biofilm, a new biofilm model based on the embedded growth of bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 211–219 (2015)
40. Kelsey J., Kielian Y.T.: Biofilm-Leukocyte Cross-Talk: Impact on Immune Polarization and Immunometabolism. *J. Innate Immun.* **11**, 280–288 (2019)
41. Khatoun Z., McTiernan C.D., Suuronen E.J., Mah T.F., Emilio I. Alarcon E.I.: Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, **4**, e01067 (2018)
42. Kuang X., Chen V., Xu X.: Novel Approaches to the Control of Oral Microbial Biofilms, *Biomed. Res. Int.* DOI:10.1155/2018/6498932 (2018)
43. Larsen T., Fiehn N.E.: Dental biofilm infections – an update. *APMIS*, **125**, 376–384, (2018)
44. Majumdar S., Pal S.: Cross-species communication in bacterial world. *J. Cell. Commun. Signal.* **11**(2), 187–190 (2017)
45. Mang T.S., Tayal D.P., Baier, R.: Photodynamic therapy as an alternative treatment for disinfection of bacteria in oral biofilms. *Laser. Surg. Med.* **44**, 588–596 (2012)
46. Maresso A.W.: Biofilms (in) Bacterial Virulence, ed. Maresso A.W., Springer, Cham, 2019, p.145–153
47. Marsh P.D., Zaura E.: Dental biofilm: ecological interactions in health and disease. *J. Clin. Periodontol.* **44**, S12–S22 (2017)
48. Merta U., Wiśniewska G.: Adhezja bakterii do materiałów dentystycznych – przegląd piśmiennictwa. *Dental Forum*, **41**, 65–67 (2013)
49. Mombelli A.: Antimicrobial advances in treating periodontal diseases. *Front. Oral Biol.* **15**, 133–148 (2012)
50. Montelongo-Jauregui D., Lopez-Ribot J.L.: Candida Interactions with the Oral Bacterial Microbiota. *J. Fungi.* **4**, DOI:10.3390/jof4040122 (2018)
51. Morse D.J., Wilson M.J., Wei X., Lewis M.A.O., Bradshaw D.J., Murdoch C., Williams D.W.: Denture-associated biofilm infection in three-dimensional oral mucosal tissue models. *J. Med. Microbiol.* **67**, 364–375 (2018)
52. Neelakantan P., Romero M., Vera J., Daood U., Khan A.U., Yan A., & Cheung G.: Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *International journal of molecular sciences*, **18**(8), 1748 (2017), DOI:10.3390/ijms18081748
53. Ostrowska K., Strzelczyk A., Różalski A., Stączek P.: Biofilm bakteryjny jako przyczyna zakażeń układu moczowego – mikroorganizmy patogenne, metody prewencji i eradykacji. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **67**, 1027–1033 (2013)
54. Otsuka R., Imai S., Murata T., Nomura Y., Okamoto M., Tsumori H., Kakuta E., Hanada N., Momoi Y.: Application of chimeric glucanase comprising mutanase and dextranase for prevention of dental biofilm formation. *Microbiol. Immunol.* **59**, 28–36 (2015)
55. Palmer J.N., Gorski N.P. Biofilmy bakteryjne w przewlekłym zapaleniu zatok przynosowych, *Magazyn Otorynolaryngologiczny (special edition)*, 3–10 (2007)



56. Park Y., Lee D.G., Hahn K.S.: HP(2–9)-magainin 2 (1–12), a synthetic hybrid peptide, exerts its antifungal effect on *Candida albicans* by damaging the plasma membrane. *J. Pept. Sci.* **10**, 204–209 (2004)
57. Pasich E., Walczewska M., Pasich A., Marcinkiewicz J.: Mechanizm i czynniki ryzyka powstawania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej. *Postępy Hig. Med. Dosw.* **67**, 736–741 (2013)
58. Pokrowiecki R., Tyski S., Zaleska M.: Problematyka zakażeń okołowszczepowych. *Post. Mikrobiol.*, **53**, 123–134 (2014)
59. Rabin N., Zheng Y., Opoku-Temeng C., Du Y., Bonsu E., O Sintim H.: Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med. Chem.* **7**, 493–512 (2015)
60. Rosenthal M., Goldberg D., Aiello A., Larson E., Foxman B.: Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect. Genet. Evol.* **11**, 839–848 (2011)
61. Sadowska B., Paszkiewicz M., Więckowska-Szakiel M., Różalska B.: New strategies to combat biofilm-associated infections. Part 2. Photodynamic Therapy. *Forum zakażeń*, **5**, 279–286 (2014)
62. Saugar J.M., Rodríguez-Hernández M.J., de la Torre B.G.: Activity of cecropin A-melittin hybrid peptides against colistin-resistant clinical strains of *Acinetobacter baumannii*: molecular basis for the differential mechanisms of action. *Antimicrob. Agents Ch.* **50**, 1251–1256 (2006)
63. Sanchez B., Delgado S., Blanco-Míguez A., Lourenco A., Gueimonde M., Margolles A.: Probiotics gut microbiota and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* **61**, 1–15 (2017)
64. Sanz M., Zaura E. i wsp.: Role of microbial biofilms in the maintenance of oral health and in the development of dental caries and periodontal diseases. Consensus report of group 1 of the Joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **44**, S5–S11, (2017)
65. Săndulescu O., Săndulescu M.: Anti-biofilm Agents (in) *Biofilm, Pilonidal Cysts and Sinuses Recent Clinical Techniques, Results, and Research in Wounds*, ed. Shiffman M.A., Low M., Springer, 2020, p. 27–54
66. Shetty H., Gupta P.: Oral Biofilms: From Development to Assessment and Treatment (in) *Dental Applications of Nanotechnology*, ed. Chaughule R.S., Springer, Cham, 2018, p. 217–246
67. Szafranski S.P., Winkel A., Stiesch M.: The use of bacteriophages to biocontrol oral biofilms. *J. Biotechnol.* **250**, 29–44 (2017)
68. Trafny E.A.: Jak zdobyć i wykorzystać wiedzę o wielogatunkowych biofilmach? *Post. Mikrobiol.* **51**, 205–211 (2012)
69. Trafny E.A.: Wzajemne oddziaływania drobnoustrojów w biofilmach wielogatunkowych. *Forum Zakażeń*, **3**, 13–16 (2012)
70. Valen H., Scheie A.A.: Biofilms and their properties. *Eur. J. Oral Sci.* **126**, 13–18 (2018)
71. Verderosa A.D., Totsika M., Fairfull-Smith K.E.: Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front. Chem.* **7**, DOI: 10.3389/fchem.2019.00824 (2019)
72. Wang Z., Shen Y., Haapasalo M.: Antibiofilm peptides against oral biofilms. *J. Oral Microbiol.* **9**, DOI:10.1080/20002297.2017.1327308 (2017)
73. Wiater A., Pleszczyńska M., Szczodrak J., Bachanek T.: Removal of Denture Plaque by Selected Glucanolytic Enzymes. *Dent. Med. Probl.* **42**, 241–247 (2005)
74. Wielgościńska M., Zielińska E., Niska K., Górska M., Woźniak M.: Nowoczesne metody zwalczania biofilmu bakteryjnego jamy ustnej (in) *Na pograniczu chemii i biologii*, ed. Koroniak H., Barcidzewski J., Wydawnictwo Naukowe UAM, vol. 34, Poznań, 2015, p. 175–188
75. Wu Y., Cai P., Jing X., Niu X., Ji D., Ashry N.M., Gao C., Huang Q.: Soil biofilm formation enhances microbial community diversity and metabolic activity. *Environ. Int.* **132**, DOI: 10.1016/j.envint.2019.105116 (2019)
76. Zhang T., Wang Z., Hancock R.E., de la Fuente-Núñez C., Haapasalo M.: Treatment of Oral Biofilms by a D-Enantiomeric Peptide. *Plos One*, **11**, e0166997 (2016)