

Received: 2014.07.03
Accepted: 2015.03.18
Published: 2015.06.16

Fagowe depolimerazy polisacharydów – charakterystyka i zastosowanie

Phage associated polysaccharide depolymerases – characteristics and application

Agnieszka Maszewska

Zakład Immunobiologii Bakterii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Bakteriofagi zostały odkryte prawie 100 lat temu i ciągle budzą zainteresowanie; intensywnie prowadzi się badania nad dwiema grupami enzymów fagowych uszkadzających komórkę bakteryjną. Pierwszą są lizyny odpowiedzialne za niszczenie bakterii i uwolnienie wirusów. Drugą grupą to depolimerazy polisacharydów (DP) degradujące otoczkowe i strukturalne polisacharydy, w tym egzopolisacharydy (EPS) będące dominującym składnikiem biofilmu. Depolimerazy polisacharydów mogą być związane z fagiem lub występować w postaci wolnej, a ich wytwarzanie odbywa się konstytutywnie lub jest indukowane obecnością polisacharydu. Pod względem aktywności DP dzielą się na hydrolazy (polisacharazy) lub liazy polisacharydów. Enzymy te są bardzo zróżnicowaną grupą pod względem swoistości substratowej, masy cząsteczkowej czy wrażliwości na czynniki fizykochemiczne. Fagi i wytwarzane przez nie DP wykazują ogromny potencjał jako środki do zwalczania bakterii otoczkowych powodujących ciężkie infekcje – posocznice, zapalenie opon mózgowych, płuc oraz jako nowa grupa preparatów antybiofilmowych. Pozbawiając bakterie otoczki, obniżają ich zjadliwość, czyniąc je bardziej podatnymi na działanie układu odpornościowego makroorganizmu. Różnorodność bakterii i wytwarzanych przez nie egzopolisacharydów tworzących biofilmy wymaga stosowania swoistych fagów wytwarzających specyficzne DP. Problem swoistości DP i samych bakteriofagów można rozwiązać, stosując koktajle fagowe lub wprowadzając do genomu wirusów geny kodujące enzymy degradujące różne egzopolisacharydy bakteryjne istotne w tworzeniu biofilmu lub poszerzające zakres gospodarzy. Obiecujące wyniki przynosi łączne stosowanie DP lub fagów je wytwarzających z innymi środkami przeciwbiofilmowymi. Ukierunkowuje to dalsze badania zmierzające do opracowania skutecznej metody walki z biofilmami bakteryjnymi. Fagowe DP mogą być również wykorzystane do typowania bakterii lub do określania struktury wytwarzanych przez nie polisacharydów.

Słowa kluczowe:

bakteriofag • fagowe depolimerazy polisacharydów • otoczka • biofilm • egzopolisacharydy

Summary

Bacteriophages have been of interest as agents combating undesirable bacteria since their discovery nearly 100 years ago. Currently, intensive research is being conducted into two groups of phage enzymes, which cause damage to bacterial cells. The first group includes lysins responsible for breaking down the cell wall in order to release progeny phages and the second is polysaccharides depolymerases (PDs), which degrade capsular and structural polysaccharides, including exopolysaccharides (EPS) – a dominant bacterial biofilm component. PDs can be attached to a phage tail or present as a free form diffused to the medium, their production takes place constitutively or is induced by the polysaccharide presence. PDs belong to two groups of enzymes: hydrolases (glycanases) or polysaccharide lyases. These enzymes are a very heterogeneous group with regard to substrate specificity, the molecular weight or sensitivity

to physical and chemical factors. Phages producing PDs act against encapsulated infectious bacteria and have a great potential as a new class of anti-biofilm agents. Polysaccharide depolymerases depriving bacteria of the capsule, reduce their virulence and sensitize them to the immune system. The variety of biofilms forming bacteria and exopolysaccharides produced by them requires the use of specific phages producing DP. The problem of DP and phages specificity can be solved by using phage cocktails or introducing into the virus genome genes encoding enzymes degrading various bacterial exopolysaccharides important in the biofilm formation or broadening the host range. The use of DP or a DP-producing phage combined with other antibiofilm agents brings promising results. This indicates a direction for further research to develop effective methods to combat bacterial biofilms. Phage-borne PDs can be used for determination of the bacterial polysaccharides structure or efficient capsular typing.

Keywords: bacteriophage • phage's polysaccharide depolymerases • capsule • biofilm • exopolysaccharides

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1157422>

Word count: 4864
Tables: 2
Figures: 1
References: 99

Adres autorki: dr Agnieszka Maszewska, Zakład Immunobiologii Bakterii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: agmasz@biol.uni.lodz.pl

WPROWADZENIE

Bakteriofagi (fagi) – wirusy niszczące bakterie – zostały odkryte niezależnie przez Fredericka W. Tworta w 1915 oraz Felixa d'Herelle'a w 1917 roku. Bakteriofagi są szeroko rozpowszechnione w środowisku naturalnym, występują również w organizmach ludzi i zwierząt. Liczbę cząstek fagowych na świecie szacuje się na 10^{31} [1]. Wirusy bakteryjne są zbudowane z kwasu nukleinowego (jedno- lub dwuniciowego DNA lub RNA) otoczonego białkowym kapsydem, w przypadku niektórych fagów również białkowo-lipidową osłonką. The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) w 2009 r. zaklasyfikował fagi do 10 rodzin: *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Microviridae*, *Corticoviridae*, *Tectiviridae*, *Leviviridae*, *Cystoviridae*, *Inoviridae* i *Plasmaviridae*. Pierwsze trzy rodziny tworzą rząd *Caudovirales*, do którego należy 96% dotychczas opisanych fagów zbudowanych z główki i ogonka, mających dwuniciowe DNA. Pozostałe 4% fagów ma budowę wielościenną, nitkowatą lub pleomorficzną [1].

Bakteriofagi namnażają się wyłącznie w żywych i wrażliwych na wirusa bakteriach; proces ten może przebiegać na kilka sposobów. Dotychczas wyróżniono 4 cykle rozwojowe fagów – lityczny, lizogenny, pseudolizogenny oraz przewlekłej infekcji [17,97]. Do celów terapeutycznych są przydatne tylko fagi lityczne, ponieważ bakteriofagi łagodne mogą powodować zmianę właściwości bakterii, np. przez transfer genów bakterie mogą nabyć oporność na antybiotyki lub zwiększyć swoją wirulencję [59,61]. Intensywny rozwój fagoterapii trwający do lat 40 ubiegłego stulecia został zahamowany w chwili

odkrycia przez Fleminga penicyliny. Rozkwit antybiotykoterapii i niejednoznaczne wyniki leczenia bakteriofagami, wynikające z ówczesnych ograniczeń metod badawczych, znacznie zmniejszyły przeprowadzanie leczenia fagami. Jednak masowe i często nieuzasadnione stosowanie antybiotyków przez ostatnie dziesięciolecie doprowadziło do pojawiania się wielolekoopornych szczepów bakterii, takich jak metycyloooporne szczepy *S. aureus* (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) czy wankomycynooperne szczepy *Enterococcus* (Vancomycin-Resistant *Enterococcus*, VRE) [3,15,85,94]. Problemem też jest wzrastająca oporność na leki grupy bakterii określonej skrótem ESKAPE: *Enterococcus faecalis*, *S. aureus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Escherichia coli* [16,50]. Opisane problemy spowodowały ponowne zainteresowanie się bakteriofagami i możliwością ich wykorzystania w terapii infekcji bakteryjnych [59,62,70,94]. Dwa główne ośrodki na świecie zajmujące się fagoterapią to wrocławski Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN [14,61,62] oraz Instytut Bakteriofagów, Mikrobiologii i Wirusologii im. George Eliava w Tbilisi (Gruzja) [50,80].

Bakteriofagi mają wiele cech, które czynią je użytecznym narzędziem terapeutycznym [58,89,94]. Jedną z ważniejszych jest duża swoistość fagów – zdolność do zainfekowania jednego lub rzadziej kilku rodzajów różnych szczepów bakterii. Dzięki tej właściwości nie niszczą naturalnej flory człowieka. Oporność bakterii na fagi jest mniejszym problemem niż na antybiotyki, ponieważ fagi jako organizmy żywe również mogą ewoluować, przez co powstają nowe genotypy zdolne do ponownego infekowania danego szczepu. Inną ważną zaletą bakteriofa-

gów jest ich szybkość i stosunkowo tania metoda izolacji, w przeciwieństwie do antybiotyków, których uzyskanie i wprowadzenie do leczenia zajmuje kilka lat i jest kosztowne. Jedną z bardziej znaczących cech fagów jako czynnika antybakteryjnego jest zdolność do wykładniczego wzrostu, co oznacza, że wraz z nasileniem wzrostu bakterii wzrasta liczba wirusów, natomiast w chwili zmniejszania się liczby komórek gospodarza maleje liczba fagów [18,80]. Doniesienia literaturowe z ostatnich kilku lat wskazują na możliwość stosowania bakteriofagów w zapobieganiu lub zwalczaniu biofilmów bakteryjnych [4,12,19,23,27,28,36,69,76]. Jest to niezwykle ważne odkrycie, ponieważ biofilmy przez to, że powstają na różnych powierzchniach stałych, takich jak: tkanki, biomateriały, w tym cewniki dożylnie czy urologiczne, endoprotezy, instalacje przemysłowe czy powierzchnia roślin uprawnych stanowią ogromny problem kliniczny, przemysłowy i ekonomiczny [31,77,78,99].

Niestety metoda zwalczania bakterii z użyciem naturalnego wroga, jakim są fagi nie jest pozbawiona wad [59,61]. Podstawowym problemem jest wybór fagów, które można użyć tak, by potencjalne patogeny były na nie wrażliwe oraz odpowiednie dobranie miana fagów i sposobów ich aplikacji. Ze względu na dużą swoistość fagów jest konieczna dokładna identyfikacja czynnika chorobotwórczego oraz określenie jego fagowrażliwości, co jest czasochłonne i ogranicza komercyjne stosowanie fagów. Ponadto swoistość fagów jest poważnym utrudnieniem w przypadku zwalczania infekcji czy biofilmów mieszanych. Rozwiązaniem jest stosowanie koktajli fagowych, czyli mieszanek kilku fagów zwalczających bakterie powodujące dany typ zakażenia. Można również poszukiwać fagów o szerokim zakresie gospodarzy lub modyfikować je genetycznie przez wprowadzenie w ich genom genów poszerzających zakres gospodarzy [57,74]. Problem, który napotyka fagoterapia to szybkie usuwanie fagów z organizmu związane głównie z nieswoistym wychwytywaniem wirusów przez komórki układu siateczkowo-śródbłonkowego wątroby i śledziony [61]. Wykazano jednak, że wielokrotne pasażowanie fagów u myszy, pozwala na uzyskanie wariantów fagów charakteryzujących się wydłużonym okresem półtrwania w surowicy [60]. Z badań przeprowadzonych na myszach wynika ponadto, że pokrywanie kapsydów glikolem polietylenowym (PEG) [48] lub wprowadzanie za pośrednictwem mutacji niewielkiej zmiany w sekwencji aminokwasów w białku strukturalnym kapsydu, wydłużają czas trwania fagów w układzie krążenia myszy [95]. Na skuteczność terapii fagowej mają wpływ również powstające w czasie kuracji przeciwciała antyfagowe, które ją obniżają [61]. Możliwe jest wyeliminowanie tego przez stosowanie większych dawek fagów lub zamianę na faga o innej swoistości antygenowej, ale podobnym zakresie działania antybakteryjnego. Przed zastosowaniem faga w terapii należy wykluczyć obecność w jego genomie genów kodujących bakteryjne czynniki wirulencji czy warunkujących oporność na antybiotyki [89]. Zaleca się więc stosowanie w leczeniu infekcji fagów, których genom został poznany. Bardzo ważne jest two-

żenie bibliotek fagowych zawierających pełną informację na temat poszczególnych wirusów [55]. Ponieważ stosowanie bakteriofagów nadal budzi wiele kontrowersji, jednocześnie prowadzi się badania nad wykorzystaniem enzymów fagowych niszczących komórkę bakteryjną jako potencjalnych czynników leczniczych lub środków dezynfekcyjnych [13,14,32,34,35].

Badania nad enzymami wydzielanymi przez fagi koncentrują się na lizynach wytwarzanych podczas ostatniej fazy cyklu, odpowiedzialnych za lizę bakterii i uwolnienie wirusów potomnych oraz depolimerazach polisacharydów (DP), które degradują otoczkowe i strukturalne polisacharydy, w tym egzopolisacharydy (EPS) będące dominującym składnikiem biofilmu bakteryjnego. Lizyny znalazły zastosowanie głównie w zwalczaniu bakterii Gram-dodatnich, ponieważ błona zewnętrzna bakterii Gram-ujemnych zapobiega ich aktywności [13,14,34,35]. Pojawiające się doniesienia literaturowe wskazują jednak, że problem można rozwiązać, stosując np. EDTA jako czynnik destabilizujący błonę, a uzyskane w pracach nad endolizynami aktywnymi wobec bakterii Gram-ujemnych wyniki są bardzo obiecujące [96]. Dwa rodzaje białek – holiny i endolizyny są zaangażowane w degradację powłok bakteryjnych i uwolnienie fagów potomnych. Holiny to niskocząsteczkowe hydrofobowe białka degradujące błonę cytoplazmatyczną, przez co umożliwiają endolizynom dostęp do peptydoglikanu, który jest przez nie trawiony. Endolizyny wykazują różną aktywność enzymatyczną: N-acetylmuramidazy (lizozym lub lityczna transglikozylaza) i endo- β -N-acetyloglukozamidazy – rozcinających wiązanie β 1,4-glikozydowe w peptydoglikanie, endopeptydazy – tnącej mostki peptydowe, amidazy N-acetylmuramyl-L-alaninowe – odcinającej wiązanie amidowe między L-alaniną a resztą N-acetylmuramylową. Oprócz dwóch ostatnich pozostałe można zaliczyć do depolimeraz polisacharydów (DP).

Fagowe depolimerazy polisacharydów to badane obecnie na szeroką skalę enzymy rozkładające wielocukry zarówno wchodzące w skład osłon komórkowych bakterii (otoczki, LPS, peptydoglikan), jak i wydzielane przez bakterie do środowiska (polisacharydy stanowiące macierz biofilmu). Szczególne zainteresowanie budzą DP degradujące polisacharydy otoczkowe i macierzy biofilmu. Są grupą potencjalnych środków do zwalczania trudnych infekcji związanych z tworzeniem biofilmu oraz bakterii otoczkowych powodujących ciężkie zakażenia, takie jak posocznica, zapalenie opon mózgowych, płuc, szpiku, septyczne zapalenie stawów i odmiedniczkowe zapalenie nerek. Zdolność bakteriofaga mającego DP do degradacji bakteryjnych egzopolisacharydów stwierdzono już prawie 60 lat temu [2]. Od tego czasu opisano wiele depolimeraz polisacharydów wykrytych u fagów infekujących, m.in. *E. coli* [11,24,39,51,67,75,84], *P. aeruginosa* [6,7,37], *Pseudomonas agglomerans* [44], *Pseudomonas putida* [27], *Klebsiella* [43,47,54,82], *Streptococcus* [33,52], *Rhizobium trifolii* [5], *Erwinia amylovora* [90], *Azotobacter vinelandii* [29] czy *Vibrio cholerae* O139 [53].

CHARAKTERYSTYKA FAGOWYCH DEPOLIMERAZ POLISACHARYDÓW

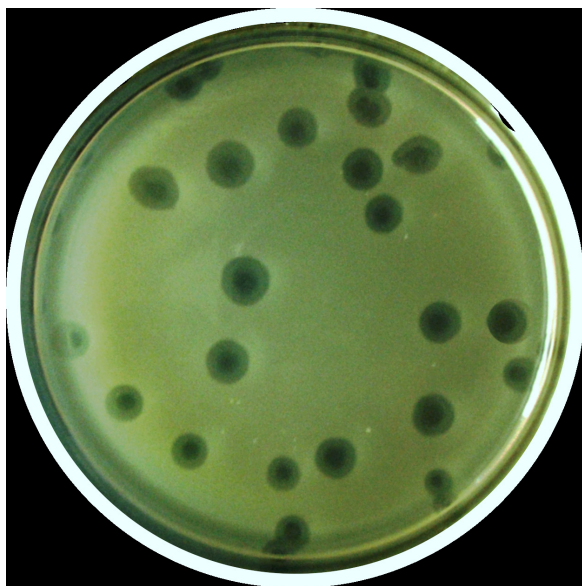
Fagowe depolimerazy polisacharydów są najczęściej umiejscowione na płycie podstawowej faga lub na jego włóknie, mogą również występować w postaci wolnej dyfundującej do podłoża [20]. Przykładowo bakteriofagi F1 i 29 zakażające bakterie *E. coli* wytwarzają depolimerazy w postaci wolnej i związanej z wirusem, natomiast fag infekujący *P. aeruginosa* wytwarza tylko depolimerazę związaną z cząstką wirusa [2,8,11]. Wytwarzanie DP może być konstytutywne lub indukowane obecnością substratu – polisacharydu. Adams i Park zaobserwowali, iż badany bakteriofag wytwarza depolimerazę podczas infekcji wszystkich wrażliwych na niego szczepów *Klebsiella pneumoniae* [2]. Sutherland i Wilkinson opisali faga F1, który wytwarzał DP tylko podczas namnażania na szczepie *E. coli* s53 wydzielającym śluz [84]. Po zakażeniu fagiem bakterii *E. coli* s23 niewytwarzających śluzu, w hodowli nie stwierdzono obecności enzymu. Gdy do hodowli *E. coli* s23 dodano oczyszczony polisacharyd szczepu s53, zaobserwowano wytwarzanie przez faga F1 depolimerazy, przy czym na znacznie niższym poziomie niż w hodowli szczepu s53. Oznacza to, że jeśli bakteria nie wytwarza egzopolisacharydu, depolimeraza jest zbędna podczas zakażenia komórki gospodarza i w związku z tym bakteriofag F1 jej nie wytwarza. Na podstawie badań Sutherland i Wilkinson stwierdzili, że DP odgrywa rolę w uwalnianiu wirusów potomnych i infekowaniu większej liczby następných bakterii [84].

Łysinki fagów wytwarzających depolimerazy polisacharydów są otoczone strefą opalizującego halo (ryc. 1), która powstaje w wyniku nadmiernego wydzielania depolimerazy dyfundującej do podłoża i pozbawiającej bakterie otoczek [47]. W obszarze halo stwierdzono występowanie zarówno fagów, jaki i żywych bakterii. Zaobserwowano, że w chwili, gdy bakterie wchodzi w fazę stacjonarną, namnażanie fagów spowalnia, jednocześnie ich depolimerazy nadal rozkładają EPS, powodując tworzenie halo, które powiększa się w czasie wskutek dyfundowania fagów ze strefy pierwotnej lizy bakterii. Zatem na wielkość halo ma wpływ ilość wytwarzanego enzymu i liczba fagów powstałych w pojedynczej łysince, a to zależy od wydajności adsorpcji danego wirusa, okresu latencji i liczby wyrzutu fagów [27].

Uzyskanie depolimeraz polisacharydów jest pierwszym etapem badań mających na celu ich charakterystykę. DP bardzo często są związane z fagiem dlatego stosowano różne metody oparte na działaniu związków chemicznych (kwasów, zasad czy DMSO) na faga w celu oddzielenia enzymu od wirusa [71]. Natomiast Kassa i Chhibber, wykorzystując stosunkowo dużą oporność depolimeraz fagowych na działanie wysokiej temperatury, zaproponowali sposób izolacji tych enzymów oparty na inkubacji fagów w temperaturze 60°C przez 30 minut [47]. Technika ta okazała się równie skuteczna jak wcześniej stosowana wykorzystująca kwas jako czynnik odłączający enzym od faga, a w przeciwieństwie do niej nie wymaga stosowania niebezpiecznych odczynników

chemicznych. Ponadto jej prostota, niskie koszty wykonania i niezawodność, czynią tę metodę użytecznym narzędziem do izolacji różnych depolimeraz polisacharydów. Bakteriofagowe enzymy degradujące bakteryjne egzopolisacharydy stanowią bardzo zróżnicowaną grupę pod względem swoistości substratowej, masy cząsteczkowej czy wrażliwości na czynniki fizykochemiczne (tabela 1). Masa cząsteczkowa poszczególnych DP jest bardzo różna, np. depolimeraza faga ERA103 ma masę 21 kDa, natomiast DP faga K1F, będąca trimerem, aż 328 kDa (tabela 1) [39,90]. Zakres pH, w którym DP wykazują aktywność jest stosunkowo szeroki i mieści się między 5,0 a 9,0, natomiast optymalne pH na ogół jest zbliżone do obojętnego lub lekko kwaśne. Optymalna temperatura działania DP zależy m.in. od zakażanego przez faga gospodarza. Wrażliwość fagowych depolimeraz polisacharydów na działanie wysokiej temperatury jest również bardzo zróżnicowana. Aktywność DP faga 2 *Pseudomonas* pozostawała na poziomie 50% po inkubacji w temperaturze 70°C przez 5 minut, podczas gdy DP faga infekującego *E. coli* ulegała w tych warunkach całkowitej inaktywacji [6,84]. Ciekawym przykładem pod względem oporności na wysoką temperaturę jest DP wytwarzana przez faga P13 infekującego szczep *Klebsiella* K13, która po inkubacji faga przez 30 minut w temperaturze 70°C zachowała 90% aktywności, podczas gdy bakteriofag ulegał całkowitej inaktywacji [54]. Podczas oczyszczania tej depolimerazy z użyciem złoża Q-Sepharose Fast Flow otrzymano dwie frakcje białek zdolnych do degradacji EPS. Jednak tylko jedna frakcja E2, po poddaniu ultrafiltracji z punktem odcięcia białek 100 kDa, zachowała aktywność depolimerazy w przesączu. Autorzy założyli, że depolimeraza faga P13 występuje w postaci wolnej i związanej z cząstką faga lub ewentualnie fag wytwarza dwie depolimerazy [54].

Depolimerazy fagowe pod względem aktywności można podzielić na dwie grupy: hydrolazy, inaczej zwane polisacharazami oraz liazy polisacharydów [81]. Polisacharazy (najczęściej endoglukozydazy, endogalaktozydazy lub endoramnozydazy) hydrolitycznie rozkładają charakterystyczne dla danego polisacharydu wiązania glikozydowe. Natomiast liazy rozszczepiają wiązanie między monosacharydem przy czwartym atomie węgla (C₄) kwasu uronowego, z jednoczesnym wprowadzeniem podwójnego wiązaniem między czwartym a piątym atomem węgla tego kwasu [81]. Ponieważ depolimerazy fagowe mogą wykazywać endo- i egzoktywność, odpowiednio szybko lub wolno degradują EPS. Większość fagowych DP, podobnie jak wytwarzające je fagi, charakteryzuje się dużą swoistością. Oznacza to, że działają na polisacharydy bakterii, dla których je pierwotnie wyizolowano. Powstające w wyniku działania DP produkty zależą od budowy trawionego substratu oraz od charakteru wiązania, które jest przez nie przecinane. Niekiedy pod wpływem działania DP obserwuje się zmniejszenie lepkości śluzu wytwarzanego przez bakterie, przy czym nie powstają żadne konkretne produkty, takie jak oligosacharydy czy cukry redukujące. Wskazuje to na niszczenie wewnętrznych wiązań polisacharydu, przy czym



Ryc. 1. Łysinki otoczone strefą opalizującego halo

powstające produkty są stosunkowo duże [41]. Bartell i Orr, badając depolimerazy PDB₂, PDB₆, PDB₇, PDB₉, PDB₁₀ wyizolowane z hodowli różnych szczepów *P. aeruginosa* zakażonych innymi fagami, wykazali, że wszystkie hydrolizowały jeden typ śluzu z trzech badanych, uwalniając przy tym heksozoaminy [8]. Jednak uzyskane wyniki z zastosowaniem ówczesnych metod nie wykluczały powstawania innych produktów. Jedną z najintensywniej obecnie badanych depolimeraz – ze względu na specyfikę działania – jest endosialidaza lub endo-N-acetylonneuraminidaza (endoN). Do 2012 r., kiedy Park i wsp. po raz pierwszy opisali wytwarzanie endosialidazy przez bakterie *Pseudomonas fluorescens* JK-0412 [68], enzym ten wykrywano tylko u fagów swoistych wobec *E. coli* K1, a jego obecności nie stwierdzono u żadnego innego organizmu żywego [79]. Endosialidaza swoiście rozpoznaje i hydrolizuje wewnętrzne wiązanie α -2,8 polimeru kwasu sialowego (polySia) tworzącego otoczkę bakterii *E. coli* K1. Dotychczas opisano ponad 20 fagów mających gen depolimerazy degradującej otoczkę *E. coli* K1 [32]. Ze względu na specyficzne działanie enzym jest bardzo użytecznym narzędziem wykorzystywanym w neurobiologii, onkobiologii oraz inżynierii tkankowej [45]. Depolimeraza wytwarzana przez faga F₄₀ infekującego szczep *K. pneumoniae* serotyp 2 jest natomiast mannozydazą hydrolizującą wiązanie D-mannoza-1 \rightarrow 4-D-glukoza, przez co oddziela z polisacharydu tetrasacharyd, będący podstawową jednostką tego wielocukru [82]. Obecność grup acetylowych w polisacharydzie nie wpływała na aktywność enzymu. Następnym przykładem jest depolimeraza polisacharydów wytwarzana przez bakteriofaga 29 będącą glukanazą [11]. Enzym ten działa swoiście na polisacharyd otoczkowy *E. coli* Bi161/42 (O9:K29[A]:H⁻), rozkładając wiązanie β -D-glukozydo-(1 \rightarrow 3)-D-kwas glukuronowy uwalniając oligosacharydy z powtórzonych 1-, 2- lub 3-krotnie heksozasacharydów. Bardzo interesujące są fagi, które zawierają dwa różne enzymy będące

DP, np. fag ϕ K1-5 zakażający dwóch różnych gospodarzy, ponieważ na włóknach ogonka ma endosialidazę, która pozwala na infekcję szczepów *E. coli* wytwarzających polisacharyd K1 oraz drugi enzym – liazę K5 tnącą wiązanie N-acetylo-heparosan-4-GlcA-(β 1,4)GlcNAc(α 1) [75]. Innymi przykładami fagów wytwarzających dwie depolimerazy polisacharydów są ϕ K5 rozkładające otoczki wytwarzane przez szczepy *E. coli* K5 i K95 oraz fag ϕ K20 wykazujący aktywność enzymatyczną wobec antygenów K20 i K5 *E. coli* [66,67,87].

AKTYWNOŚĆ DP WOBEC BAKTERII OTOCZKOWYCH

W postaciach planktonowych bakterii wytwarzających wielocukrowe otoczki, fagowa depolimeraza polisacharydów wiąże się z polimerem otoczkowym, powodując jego rozkład i dotarcie faga do powierzchni komórki. Wtedy bakteriofag łączy się z receptorem występującym na powierzchni ściany komórkowej i zakaża bakterię [44]. Potem może nastąpić cykl lityczny lub lizogenny w zależności od typu faga i panujących warunków. Depolimerazy polisacharydów wytwarzane przez różne fagi mogą hydrolizować EPS innych szczepów bakterii niewrażliwych na wirusy wytwarzające dany enzym [84]. Zjawisko takie zaobserwowano m.in. u fagów infekujących różne szczepy *E. coli* oraz *Aerobacter cloacae*. Okazało się, że EPS badanych szczepów *E. coli* s17, s53 i K12 oraz *A. cloacae* 5920 wykazywały duże podobieństwo pod względem budowy chemicznej, wszystkie zawierały fukozę, glukozę, galaktozę i kwas glukuronowy w porównywalnych ilościach [84]. Bartell i Orr porównywali swoistość działania 6 wyizolowanych depolimeraz polisacharydów: PDB₂, PDB₆, PDB₇, PDA₈, PDB₉, PDB₁₀, wytwarzanych przez fagi zakażające różne szczepy *P. aeruginosa* [8]. Bakterie te wytwarzały trzy typy zewnątrzkomórkowych polisacharydów oznaczone A, B i C. Autorzy wykazali, że żadna z badanych depolimeraz nie działała na wytwarzany przez część szczepów polisacharyd C, tylko PDA₈ rozkładała polisacharyd A, a pozostałe 5 polisacharyd B. Były to jedne z pierwszych badań wskazujące na różnorodność pod względem budowy chemicznej polisacharydów *P. aeruginosa*. Oznacza to, że DP fagowe mogą być wykorzystywane w pracach nad określaniem struktury polisacharydów bakteryjnych.

Fagi wytwarzające DP mogą być również użytecznym narzędziem w typowaniu bakterii otoczkowych. Przykładem jest fag 0507-KN2-1, który swoiście rozpoznaje polisacharyd otoczkowy KN2 *K. pneumoniae*, przy jednoczesnym braku reakcji ze szczepami reprezentującymi 78 innych serotypów polisacharydów otoczkowych tych bakterii [43]. Stwierdzono również oporność otrzymanego mutantu *K. pneumoniae* Ca0507 CSP⁻ niewytwarzającego polisacharydu KN2 na tego faga. Wyniki te potwierdzają hipotezę, że bakteriofag 0507-KN2-1 może być wykorzystywany do rozróżniania szczepu zawierającego otoczkę KN2 od pozostałych serotypów *K. pneumoniae*.

Szczepy *E. coli* K1, mające otoczkę zbudowaną z polimeru kwasu sialowego, odpowiadają za około 85% przypad-

Tabela 1. Przykłady fagowych depolimeraz polisacharydów

Fag	Gospodarz	Aktywność enzymatyczna	Masa kDa	Optymalne pH (zakres pH)	Inne cechy	Piśmiennictwo
F1	<i>E. coli</i> s23	-	-	7,0 (6,0-7,5)	brak aktywności po inkubacji enzymu w temp. 70°C, 5 min	[84]
2	<i>P. aeruginosa</i> B1	-	180	7,5	50% aktywności enzymu po inkubacji w temp. 70°C, 5 min	[6]
K-2	<i>A. aerogenes</i> 4047	glukanohydrolaza	379	5,2	-	[98]
brak nazwy	<i>A. vinelandii</i> Wyss	liaza	30-35	7,7 (7,0-8,5)	-	[29]
29	<i>E. coli</i>	-	245	-	po trawieniu EPS depolimerazą powstają oligosacharydy z powtórzonych 1-, 2- lub 3-krotnie heksasacharydów	[11]
ERA103	<i>E. amylovora</i>	-	21	6,0 (3,0-8,0)	optymalna temp. działania enzymu: 30°C	[90]
E	<i>E. coli</i> K1	endosialidaza	208	5,5	jony Ca ²⁺ hamują aktywność enzymu	[88]
K1F	<i>E. coli</i> K1	endosialidaza	328	-	trimer	[39]
φK5A	<i>E. coli</i> KS	liaza KfIA	66,9	8,5 (6,0-9,0)	po trawieniu EPS depolimerazą powstają produkty o niskiej masie cząsteczkowej	[24]
Profag	<i>S. equi</i>	liaza hialuronianu SEQ2045	42	7 (5,0-7,5)	optymalna temp. działania enzymu: 37°C, 50% aktywności po inkubacji enzymu w temp. 44°C	[52]
H4489A	<i>S. pyogenes</i>	liaza hialuronianu	40	5,5 (4,0-7,0)	optymalna temp. działania enzymu: 37°C, jony Mg ²⁺ lekko wzmagają działanie enzymu, jony Cu ²⁺ , Ni ²⁺ , Co ²⁺ hamują aktywność enzymatyczną	[33]
PT-6	<i>P. aeruginosa</i>	liaza alginianu	37	-	enzym zmniejsza lepkość śluzu o 62-66% w ciągu 15 min	[37]
DEP	<i>K. pneumoniae</i> B5055	-	36	7,5 (7,0-8,0)	17% aktywności po inkubacji enzymu w temp. 65°C, 30 min	[47]
P13	<i>Klebsiella</i> K13	-	62-65	6,5 (5,5-8,0)	optymalna temp. działania enzymu: 60°C; K ⁺ , Na ⁺ , Ca ²⁺ wzmagają aktywność enzymu	[54]

ków posocznicy i zapalenia opon mózgowych u noworodków wywoływanych przez *E. coli*, charakteryzujących się wysokim wskaźnikiem śmiertelności. Mushtaq i wsp., wykorzystując model zwierzęcy (noworodki szczurów) wykazali, że pojedyncza dawka fagowej endosialidazy E (endoE) podana 24 godziny po zakażeniu zwierząt, obniżała współczynnik śmiertelności w ciągu 7 dni eksperymentu z 80-100% do 0-10% [65]. Autorzy sugerowali, że endoE przez pozbawienie *E. coli* K1 otoczki, obniża zjadliwość tych bakterii i czyni je bardziej podatnymi na działanie układu odpornościowego, np. fagocytozę przez makrofagi. Depolimerazy fagowe znajdują również zastosowanie w walce z patogenami roślin, np. *Erwinia*

amylovora, odpowiedzialnymi za wywoływanie zarazy ogniowej. Wykazano, że DP, niszcząc wytwarzane przez bakterie *E. amylovora* otoczki, pozbawiają je głównego czynnika wirulencji i przez to przyczyniają się do ich eliminacji z roślin [90]. Innym przykładem są fagowe liazy hialuronianu, które degradują zbudowane tylko z tego związku otoczki *Streptococcus pyogenes* i *Streptococcus equi* [33,52]. Większość genów kodujących hialuronidazy jest umiejscowiona w profagach. Obecnie duże zainteresowanie budzą depolimerazy degradujące polisacharydy otoczkowe bakterii z rodzajów *Klebsiella* – bakterii powodujących wielolekooporne zakażenia szpitalne i alginian otaczający komórki śluzowych szczepów *Pseudomonas*

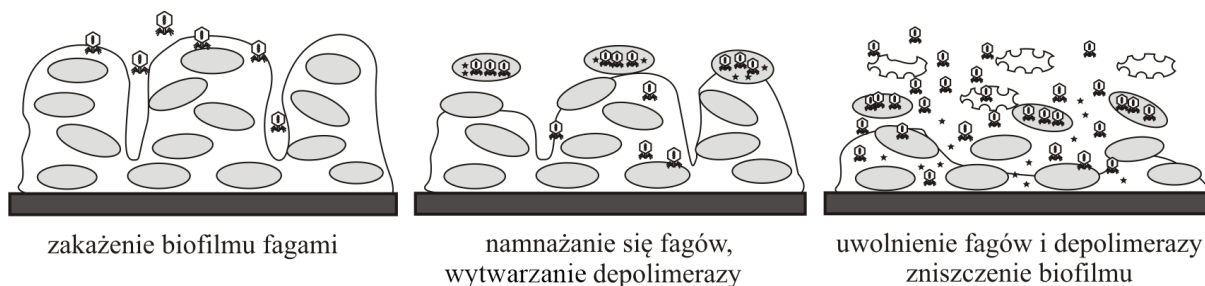
odpowiedzialnych za groźne zakażenia w przebiegu mukowiscydozy [37,43,47,91].

FAGI WYTWARZAJĄCE DP KONTRA BIOFILM

Uważa się, że większość bakterii w środowisku naturalnym występuje w postaci biofilmu. Biofilm tworzy się wtedy, kiedy bakterie wolno pływające osiadają na powierzchni stałej, np. błonach śluzowych, implantach medycznych, cewnikach, roślinach, rurach itp. i tworzą wielokomórkowe skupiska otoczone zewnątrzkomórkowym polimerem, stanowiącym prawie 90% całej biomasy [49]. Składa się głównie z egzopolisacharydów (EPS), ponadto w jego skład wchodzi białka, tłuszcze, kwasy nukleinowe, części bakterii, np. pile czy fragmenty powierzchni, na której tworzy się biofilm. Macierz chroni bakterie przed działaniem czynników zewnętrznych, takich jak antybiotyki, środki dezynfekcyjne czy składniki układu odpornościowego. Oporność bakterii w biofilmie na antybiotyki jest nawet kilka tysięcy razy większa w porównaniu do postaci planktonowych [21,64]. Zjawisko jest związane ze zmniejszonym metabolizmem, hamowaniem dyfuzji antybiotyków przez egzopolimery, syntezą enzymów rozkładających antybiotyki. W biofilmie pojawiają się komórki przetrwałe, tzw. *persisters cells*, które pozwalają na odtworzenie biofilmu po zakończeniu działania na niego środkiem bakterio-bójczym [42]. Zwalczając infekcje związane z wytworzeniem biofilmu, konieczne należy długotrwale stosować wysokie dawki antybiotyków, co nie zawsze przynosi pożądany skutek. Inaczej sytuacja przedstawia się w przypadku stosowania fagów, które przemieszczają się w biofilmie kanałami wodnymi, a posiadane przez nie depolimerazy polisacharydów degradują EPS, przez co fagi docierają do wszystkich warstw biofilmu (ryc. 2) [4,30,44,83]. W związku z samopowielaniem się wirusa teoretycznie do zwalczania biofilmu wystarczy jedna dawka faga. Carson i wsp. wykazali zdolność bakteriofagów do niszczenia dojrzałego biofilmu *E. coli* i *Proteus mirabilis* oraz zapobiegania jego powstawaniu na cewnikach urologicznych [19]. Autorzy uważali, że wiek biofilmu nie wpływa na aktywność lityczną fagów. Dotychczas przedstawiono dwie strategie walki z biofilmem z wykorzystaniem fagów [30]. Pierwsza dotycząca zapobiegania tworzeniu biofilmu na biomateriale jest oparta na pokrywaniu cewników obojętnym hydrożelem, który następnie jest „impregnowany” fagami. Druga

dotyczy zwalczania już wytworzonego biofilmu przez traktowanie go zawiesiną faga lub fagów. Inna koncepcja walki z biofilmem bakteryjnym, obecnie intensywnie sprawdzana, opiera się na stosowaniu reprezentujących nową grupę środków antybiofilmowych: fagach wytwarzających depolimerazy polisacharydów lub na samych tych enzymach (tabela 2).

W 1998 r. Hughes i wsp., badając wpływ faga SF153b wytwarzającego wolną depolimerazę polisacharydów na biofilm *Enterobacter agglomerans* 53b, wykazali zdolność DP do niszczenia biofilmu [44]. Zaobserwowali, że bakteriofag wraz z DP powodował 1992-krotny spadek liczby komórek wrażliwego szczepu po 180 min od dodania faga i enzymu do biofilmu. Jednocześnie po tym czasie sam enzym spowodował 120-krotny spadek liczby komórek w biofilmie. Oceniając wpływ faga SF153b i jego DP na szczep M53b odporny na tego wirusa, ale wytwarzający EPS wrażliwy na badaną depolimerazę, autorzy zaobserwowali 61-krotne zmniejszenie liczby bakterii w biofilmie. Obecnie, dzięki zaawansowanym metodom molekularnym, możliwe jest poznanie sekwencji całych genomów bakteriofagowych. Analiza sekwencji pozwala określić czy w genomie danego faga znajdują się geny kodujące depolimerazy polisacharydów. Takim przykładem są fagi vB_SepiS-phiIPLA5 i vB_SepiS-phiIPLA7 swoiste wobec *Staphylococcus epidermidis*, u których wykryto obecność domen kodujących enzymy podobne do liaz pektynowych, potencjalnie zaangażowane w degradację EPS [38]. Przypuszczenie to potwierdzała obecność halo otaczającego ich lysinki. Badając wpływ faga vB_SepiS-phiIPLA7 na 7-dniowy biofilm szczepów niewrażliwego i wrażliwego *S. epidermidis*, oceniano liczbę bakterii planktonowych i w biofilmie. W przypadku szczepu wrażliwego całkowita liczba żywych bakterii została zredukowana do 5% po 3 godzinach inkubacji. Natomiast fag ten nie wpływał na liczbę komórek zarówno planktonowych, jak i w biofilmie szczepu niewrażliwego. W przypadku szczepu CJPB1, który wytwarzał EPS wrażliwy na działanie DP, nie zmieniła się całkowita liczba bakterii w hodowli, natomiast drastycznie zmieniły się proporcje między liczbą bakterii planktonowych i w biofilmie. Tylko 2% komórek pozostało w biofilmie, co sugeruje, że fagowa liaza zniszczyła EPS, uwalniając bakterie do podłoża [38]. Podobnie w przypadku *Campylobacter jejuni* bakterii tworzących biofilmy w rurach wodnych i instalacjach przemysłowych zaobserwowano, że bakteriofagi



Ryc. 2. Zwalczenie biofilmu przez fagi wytwarzające depolimerazy polisacharydów (wg [55] zmodyfikowano)

degradowały macierz zewnątrzkomórkową i powodowały lizę bakterii w obrębie biofilmu [76]. Hanlon i wsp. zaobserwowali, że enzymatyczna degradacja alginianu ułatwiała dyfuzję fagów w biofilmie *P. aeruginosa* [41].

Badania dotyczące wpływu bakteriofagów na biofilm bakteryjny wykazały, że odpowiednio dobrane dawki faga z właściwą depolimerazą egzopolisacharydów są podstawowe dla powodzenia terapii fagowej. Biofilm *P. putida* wykazywał największą wrażliwość na faga T7-like mającego DP po 8 godzinach inkubacji, natomiast po 24 zaobserwowano powstawanie oporności biofilmu na tego wirusa [27]. Podobnie stosowanie bakteriofaga T7 na biofilm *E. coli* w pierwszym etapie powodowało zmniejszenie liczby bakterii w biofilmie, niestety nie dochodziło do ich całkowitej eradykacji [63]. Wskazuje to na osiągnięcie w biofilmie pewnego rodzaju równowagi między wirusem a gospodarzem, co ze względów terapeutycznych jest zjawiskiem niekorzystnym. Z czasem mogą się pojawić komórki bakterii odporne na faga i warianty faga zdolne do infekowania opornych szczepów, z których dalej mogą powstać mutanty odporne na nie [46]. Przy ocenie zdolności bakteriofagów zawierających DP do eradykacji biofilmu trzeba pamiętać, że biofilmy występujące w przyrodzie przeważnie są mieszane [84]. Całkowitą eradykację biofilmu tworzonego przez szczep *Enterobacter cloacae* NCTC 5920 uzyskano dopiero po zastosowaniu mieszaniny trzech różnych bakteriofagów. Natomiast próby zniszczenia biofilmu tworzonego przez dwa gatunki *E. cloacae* NCTC 5920 i *E. agglomerans* Ent okazały się bezskuteczne nawet po zastosowaniu koktajlu trzech bakteriofagów [86]. Wyniki wskazują na potencjał terapeutyczny fagów litycznych w walce z biofilmami i zarazem konieczność stosowania odpowiednio dobranych fagów wytwarzających DP swoiście wobec egzopolisacharydów tworzących macierz danego biofilmu. Jednak zdarza się, że stosowanie samych fagów nie jest wystarczające do całkowitej eradykacji biofilmu. Proponowanym rozwiązaniem tego problemu przez wielu badaczy jest terapia skojarzona, polegająca na łączeniu bakteriofagów z innymi środkami przeciwbiofilmowymi.

FAGI WYTWARZAJĄCE DP JAKO „WSPOMAGACZE” W WALCE Z BIOFILMEM – TERAPIA SKOJARZONA

Ponieważ sposoby oparte na stosowaniu bakteriofagów jako jedyne środki antybiofilmowe nie są w pełni skuteczne, podejmowanych jest wiele prób mających na celu opracowanie skutecznych metod skojarzonych w zwalczaniu biofilmu bakteryjnego. Polegają one na łączeniu bakteriofagów lub wytwarzanych przez nie depolimeraz EPS z takimi preparatami jak antybiotyki, środki dezynfekujące, np. związki chloru czy antyagoniści żelaza (tabela 2).

Comeau i wsp. zaobserwowali, że niewielkie stężenie cefotaksymu (20 ng/ml) powodowało 7-krotne zwiększenie liczby fagów potomnych uwolnionych podczas lizy zakażonego szczepu *E. coli* MFP w porównaniu do liczby

fagów uzyskanych podczas zakażenia bakterii hodowanych w podłożu bez dodatku antybiotyku [25]. Autorzy zjawisko to określili mianem Phage-Antibiotic Synergy (PAS). Rayan i wsp. wykazali synergistyczne działanie fagów w połączeniu z antybiotykami w stosunku do biofilmu [73]. Zaobserwowali, że jednoczesne zastosowanie faga T4 i cefotaksymu spowodowało skuteczniejsze niszczenie biofilmu *E. coli* ATCC 11303 w porównaniu do samego antybiotyku. Ponadto fagi o mianie 10^4 PFU/ml i 10^7 PFU/ml powodowały obniżenie minimalnego stężenia potrzebnego do eradykacji biofilmu MBEC (the Minimum Biofilm Eradication Concentration) z 256 mg/ml na odpowiednio 128 i 32 mg/ml. Porównując nawet największe zastosowane stężenie faga T4 10^7 PFU/ml, powodowało najwyżej 0,9 log redukcję biofilmu *E. coli*. Również jednoczesne potraktowanie biofilmu *K. pneumoniae* B5055 amoksycyliną i fagami, przyniosło lepsze rezultaty w zwalczaniu biofilmu niż sama antybiotykoterapia czy fagoterapia [9]. Zaobserwowano, że amoksycyklina w porównaniu do fagów lepiej działała na biofilm do 4 dnia inkubacji, natomiast później skuteczniejsze w eradykacji biofilmu okazały się bakteriofagi. Może to być spowodowane słabą dyfuzją antybiotyku w dojrzałym biofilmie i w związku z tym ograniczonym jego działaniem. Połączone działanie fagów z ciprofloksacyną na biofilm *K. pneumoniae* również okazało się skuteczniejsze niż stosowanie samego antybiotyku [91,92]. Wytwarzane przez fagi depolimerazy polisacharydów mogą powodować zniszczenie struktury biofilmu, przez co umożliwiają fagom swobodny dostęp do bakterii [44]. W terapii skojarzonej natomiast fagi niejako torują drogę antybiotykowi, przez co dyfunduje do głębszych warstw biofilmu, uzyskując bakterioobójcze stężenie, nieosiągalne w przypadku samej antybiotykoterapii. Terapia skojarzeniowa znacząco ogranicza powstawanie wariantów opornych w porównaniu z metodami opartymi na stosowaniu jednego czynnika antybiofilmowego [92].

Jednym z powszechnie stosowanych do dezynfekcji czynników chemicznych jest chlor. Jednak w zwalczaniu biofilmów metoda ta nie zawsze przynosi pożądane skutki, ponieważ bakterie są otoczone EPS stanowiącym barierę ochronną. Zhang i Hu wykazali, że zastosowanie chloru w stężeniu 21 i 210 mg/l hamowało tworzenie biofilmu *P. aeruginosa* odpowiednio w 53 i 86%, nie powodowało jednak eradykacji 72-godzinnego biofilmu [99]. Dla porównania zastosowanie swoistego bakteriofaga hamowało tworzenie biofilmu *P. aeruginosa* w 80% i powodowało niszczenie dojrzałego biofilmu w 52%. Natomiast zastosowanie swoistych fagów w połączeniu z chlorem w obu wymienionych stężeniach zahamowało formowanie biofilmu *P. aeruginosa* powyżej 90%. Fagi w połączeniu z zastosowanym środkiem dezynfekcyjnym również bardziej niszczyły dojrzały biofilm, zaobserwowano jego ubytek w 60 i 88% odpowiednio przy stężeniu chloru 21 i 210 mg/l. Niestety w opisanym problemem jest właściwe dostosowanie stężenia chloru w zależności od rodzaju dezynfekowanej powierzchni lub przedmiotu, a co za tym idzie odpowiedni wybór faga niewrażliwego na określone stężenie chloru. Przykładem próby wyko-

Tabela 2. Przykłady wpływu fagów lub fagowych depolimeraz polisacharydów na biofilm

Fag/enzym	Biofilm	Warunki doświadczenia	Rezultaty	Piśmiennictwo
SF153b wytwarzający DP	<i>E. agglomerans</i> 53b, M53b szczep odporny na faga wyprowadzony z 53b o wrażliwym EPS na DP	biofilm 53b ok. 10 ⁶ CFU/cm ² traktowany fagiem SF153b lub jego DP biofilm M53b ok. 10 ⁶ CFU/cm ² traktowany fagiem SF153b i DP	ocena redukcji liczby bakterii oceniana po 180 min: biofilm 53b traktowany fagiem SF153b – 1992x, DP – 120x biofilm M53b traktowany fagiem SF153b i DP – 61x	[44]
DP Ent	<i>E. agglomerans</i> Ent	biofilm hodowany przez noc w 30°C, 120 rpm traktowano DP φEnt 5 min, następnie środkami dezynfekcyjnymi: na bazie podchlorynu, niejonowym, amfoterycznym i czwartorzędowym związkiem amonowym przez kolejne 5 min	wszystkie środki odkażające w połączeniu z DP φEnt powodowały eliminację biofilmu, w przypadku zastosowanych osobno największy efekt powodowała DP, kolejno środek niejonowy, na bazie podchlorynu, amfoteryczny i czwartorzędowy związek amonowy	[86]
φ15 wytwarzający DP	<i>P. putida</i> RD5PR2, <i>P. putida</i> PpG1	24-godzinny i 48-godzinny biofilm hodowany stacjonarnie, fagi dodane 10 ² , 10 ⁴ lub 10 ⁶ PFU/studzienkę, inkubacja 2-24 godz. w temp. 30°C	24-godzinny biofilm bardziej podatny na działanie faga; największy ubytek biofilmu po 8 godz. inkubacji z fagiem o mianie 10 ⁴ (38 i 87 %) i 10 ⁶ (55 i 96 %); po 24 godz. zaobserwowano odtwarzanie się biofilmu - pojawianie się oporności na faga	[27]
Brak nazwy	<i>P. aeruginosa</i>	początkowa liczba bakterii 2x10 ⁸ CFU i fagów 3x10 ⁷ PFU/ml, chlor 21 i 210 mg/L zapobieganie tworzeniu biofilmu: mieszanina bakterii, fagów i chloru, inkubacja 50 godz., temp. pokojowa niszczenie biofilmu: do 72 godz. biofilmu hodowanego w temp. 37°C dodawano fagi i chlor, po 72 godz. w temp. pokojowej	chlor redukował tworzenie biofilmu w ok. 53 i 86 % odpowiednio w stężeniu 21 i 210 mg/L, natomiast nie niszczył dojrzałego biofilmu fagi zapobiegały tworzeniu w 80% i zwalczały w 50% mieszanina fagów z chlorem 210 mg/L powodowała zahamowanie tworzenia biofilmu w 94% i niszczenie prawie w 88%	[99]
Brak nazwy	<i>K. pneumoniae</i> B5055	biofilm hodowany od 1 do 8 dni, fag MOI 0,01 z lub bez amoksycykliną 512 mg/ml	redukcja liczby bakterii w biofilmie: antybiotyk: 2,97 ± 0,11 log fag: 3,51 ± 0,19 log antybiotyk + fag: 5,49 ± 0,27 log	[9]
Genetycznie modyfikowane: T7 _{control} T7 _{DspB}	<i>E. coli</i> TG1	test MBEC biofilm hodowany na kołeczkach 24 godz., w temp. 35°C, 150 rpm fagi 10 ³ /kołeczek, inkubacja 24godz., w temp. 35°C	redukcja biofilmu w porównaniu do biofilmu nietraktowanego fagami: T7 _{control} – 5,6x; T7 _{DspB} – 14,5x redukcja biofilmu przez T7 _{DspB} w porównaniu do T7 _{control} – 2,6x (P = 5,4x10 ⁻⁸)	[55]

DP - depolimeraza polisacharydów, EPS - egzopolisacharyd; CFU - jednostka koloniotwórcza (colony-forming unit); PFU - jednostka łysinkotwórcza (plaque-forming unit); rpm – liczba obrotów na minutę (revolutions per minute)

rzystania fagów, a konkretnie wytwarzanej przez nie depolimerazy polisacharydów do walki z biofilmem są badania Taita i wsp. [86]. Autorzy wykazali, że zastosowanie DP faga φEnt w połączeniu z różnymi środkami dezynfekcyjnymi, takimi jak: preparat zawierający podchloryn, niejonowy i amfoteryczny środek odkażający, czwartorzędowe związki amoniowe powodowało całkowitą lub prawie całkowitą eradykację biofilmu *E. agglomerans* Ent. Z zastosowanych środków osobno najsilniej niszczyła biofilm DP, a najsłabiej amfoteryczny środek odkażający i czwartorzędowe związki amoniowe (4-5 razy słabiej w porównaniu do DP).

Inna proponowana metoda skojarzona opiera się na stosowaniu z fagami czynników limitujących bakteriom dostęp do pierwiastków biogenych, np. żelaza. Udowodniono, że żelazo jest pierwiastkiem niezbędnym do życia bakterii i tworzenia przez nie biofilmu. Jony żelaza odpowiadają za przejście bakterii z postaci planktonowej w osiadłą i stabilizację polisacharydów w macierzy biofilmu [10]. Hancock i wsp. [40] wykazali, że dodanie do podłoża jonów Zn (II) lub Co (II), pierwiastków wykazujących większe niż żelazo powinowactwo do białka Fur – głównego kontrolera wychwytu żelaza, hamowało tworzenie przez *E. coli* biofilmu [40]. Zasto-

sowanie w metodzie skojarzonej CoSO_4 i faga KPO1K2 wytwarzającego DP spowodowało całkowitą eradykację jedno- i 2-dniowego biofilmu *K. pneumoniae* B5055, czego nie obserwowano w przypadku użycia CoSO_4 albo faga [22]. Zaobserwowana w niewielkim stopniu eradykacja biofilmu w przypadku działania na niego fagiem NDP niewytwarzającym DP w obecności jonów kobaltu wskazuje na istotną rolę depolimerazy w niszczeniu biofilmu *K. pneumoniae* B5055. Prawdopodobnie depolimeraza degradując macierz biofilmu, ułatwia dyfuzję jonów kobaltu do jego głębszych warstw. Niestety terapia skojarzona nie powodowała lub tylko częściową eradykację starszego biofilmu tych bakterii.

Terapie skojarzone budzą wielkie nadzieje w walce z biofilmami bakteryjnymi, jednak w związku z bardzo złożoną strukturą i funkcjonowaniem biofilmów konieczne są dalsze badania nad możliwymi do wykorzystania w terapii czynnikami antybakteryjnymi, takimi jak: różnego typu antybiotyki, związki chelatujące lub antagoniści pierwiastków biogenych, środki odkażające, bakteriocyny, związki pochodzenia roślinnego, np. polifenole czy peptydy o właściwościach antybakteryjnych.

DOSKONALENIE FAGÓW ZA POMOCĄ INŻYNIERII GENETYCZNEJ

Mimo obiecujących wyników badań nad zastosowaniem fagów wytwarzających DP czy samych enzymów w zwalczaniu bakterii otoczkowych czy biofilmów bakteryjnych, wykorzystanie ich na szeroką skalę jest ograniczone w związku z dużą swoistością depolimeraz. Nawet mała zmiana lub różnica w budowie polisacharydu między szczepami bakterii, powoduje niewrażliwość na działanie danej depolimerazy [72]. Jednak problem można rozwiązać, wykorzystując metody inżynierii genetycznej, które pozwalają na wprowadzenie do genomu faga określonych genów nadających wirusom pożądane właściwości [57]. Scholl i wsp., wprowadzając do genomu faga T7 – swoistego wobec szczepów *E. coli* B i K12 – gen kodujący K1-5 endosialidazę, poszerzyli zakres jego gospodarzy, umożliwiając mu zakażanie szczepów *E. coli* wytwarzających polisacharyd otoczkowy K1 [74]. Lu i Collins w wyniku modyfikacji genetycznej uzyskali faga T7_{DSPB} wytwarzającego enzym – dyspersynę B (naturalnie wytwarzaną przez *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) hydrolizującą polimer β -1,6-N-acetyl-D-glukozoaminy, adhezynę bakteryjną istotną w tworzeniu biofilmu i utrzymaniu jego integracji przez takie bakterie, jak *Staphylococcus* czy *E. coli* [55]. Okazało się, że fag T7_{DSPB} jest skuteczniejszy w niszczeniu biofilmu niż fag T7. Ci sami badacze

otrzymali z łagodnego faga M13mp18 mutantą ϕ lexA3 charakteryzującą się nadekspresją białka lexA3, będącego represorem bakteryjnego systemu naprawy DNA – SOS [56]. Fag ϕ lexA3 zwiększał skuteczność antybiotyków z trzech powszechnie stosowanych grup: chinolonów – ofloksacyny, aminoglikozydów – gentamycyny i β -laktamów – ampicyliny w stosunku do bakterii wykazujących na nie oporność oraz bakterii występujących w biofilmie. Obecnie dostępne metody biologii molekularnej stwarzają w zasadzie nieograniczone możliwości komponowania bakteriofagów o pożądanych właściwościach. Z tego względu bardzo ważne jest poznawanie genomów znanych i nowo odkrywanych fagów oraz tworzenie bibliotek fagowych.

PODSUMOWANIE

Fagi wytwarzające depolimerazy polisacharydów lub same te enzymy mogą stanowić nową klasę środków antybiofilmowych i/lub leków przeciwko patogennym bakteriom wytwarzającym otoczki. Fagowe enzymy rozkładające egzopolisacharydy, mimo że same nie zabijają bakterii, to degradując otoczki bakteryjne czy macierz biofilmu, umożliwiają dostęp do drobnoustrojów środkiem bakteriobójczym czy czynnikom układu odpornościowego makroorganizmu, które działając pojedynczo, często okazują się nieskuteczne. W związku z różną aktywnością enzymatyczną fagowe depolimerazy polisacharydów mogą również być użytecznym narzędziem w badaniach struktury chemicznej polisacharydów, wytwarzaniu oligosacharydów z polisacharydów czy diagnostyki bakterii. Izolacja nowych fagów i wytwarzanych przez nie enzymów jest stosunkowo prosta i tania w porównaniu do procesu otrzymania nowego antybiotyku. Zaletą i zarazem wadą fagów i wytwarzanych przez nie DP jest duża swoistość. Pozytywne jest, że nie niszczą w przeciwieństwie do antybiotyków naturalnej flory gospodarza. Jednak swoistość fagów i DP ogranicza ich szerokie stosowanie. Problem można rozwiązać przez stosowanie odpowiednio przygotowanych koktajli fagowych lub za pośrednictwem modyfikacji genetycznej poszerzać zakres gospodarzy fagów. W związku z powyższym bardzo ważne jest tworzenie bibliotek fagowych. Bardziej obiecujące wyniki w zwalczaniu biofilmów uzyskano, wykorzystując terapię skojarzoną w porównaniu do stosowania samych bakteriofagów czy ich depolimeraz. Wskazuje to kierunek dalszych badań mających na celu opracowanie skutecznej metody wykorzystującej bakteriofagi w walce z biofilmami bakteryjnymi.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Ackermann H.W.: Bacteriophage taxonomy. *Microbiol. Australia*, 2011; 32: 90-94
- [2] Adams M.H., Park B.H.: An enzyme produced by a phage-host cell system. II. The properties of the polysaccharide depolymerase. *Virology*, 1956; 2: 719-736
- [3] Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013; <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> (18.06.2014)
- [4] Azeredo J., Sutherland I.W.: The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2008; 9: 261-266
- [5] Barnett Y.M., Humphrey B.: Exopolysaccharide depolymerases induced by *Rhizobium* bacteriophages. *Can. J. Microbiol.*, 1975, 21: 1647-1650
- [6] Bartell P.F., Lam G.K., Orr T.E.: Purification and properties of polysaccharide depolymerase associated with phage-infected *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.*, 1968; 243: 2077-2080
- [7] Bartell P.F., Orr T.E.: Origin of polysaccharide depolymerase associated with bacteriophage infection. *J. Virol.*, 1969, 3: 290-296
- [8] Bartell P.F., Orr T.E.: Distinct slime polysaccharide depolymerases of bacteriophage-infected *Pseudomonas aeruginosa*: evidence of close association with the structured bacteriophage particle. *J. Virol.*, 1969; 4: 580-584
- [9] 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
- [10] Berlutti N., Morea C., Battistoni A., Sarli S., Cipriani P., Superti F., Ammendolia M.G., Valenti P.: Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 2005; 18: 661-670
- [11] Bessler W., Fehmel F., Freund-Mölbelt E., Knüfermann H., Sirim S.: *Escherichia coli* capsule bacteriophages IV. Free capsule depolymerase 29. *J. Virol.*, 1975; 15: 976-984
- [12] Betts A., Vasse M., Kaltz O., Hochberg M.E.: Back to the future: evolving bacteriophages to increase their effectiveness against the pathogen *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Evol. Appl.*, 2013; 6: 1054-1063
- [13] Borysowski J., Łobocka M., Międzybrodzki R., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Potential of bacteriophages and their lysins in the treatment of MRSA. Current status and future perspectives. *Bio-drugs*, 2011; 25: 347-355
- [14] Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp. Biol. Med.*, 2006; 231: 366-377
- [15] Boucher H.W., Corey G.R.: Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46: S344-S349
- [16] Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., Edwards J.E.Jr, Gilbert D., Rice L.B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J.: Bad bugs, no drugs: no ESCAPE! An update from the infectious diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48: 1-12
- [17] Brzozowska E., Bazan J., Gamian A.: Funkcje białek bakteriofagowych. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 167-76
- [18] Carlton R.M.: Phage therapy: past history and future prospects. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 1999; 47: 267-274
- [19] Carson L., Gorman S.P., Gilmore B.F.: The use of lytic bacteriophages in the prevention and eradication of biofilms of *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2010; 59: 447-455
- [20] Castillo F.J., Bartell P.F.: Localization and functional role of the *Pseudomonas* bacteriophage 2 depolymerase. *J. Virol.*, 1976; 18: 701-708
- [21] Chen L., Wen Y.: The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. *Int. J. Oral. Sci.*, 2011; 3: 66-73
- [22] Chhibber S., Nag D., Bansal S.: Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage. *BMC Microbiol.*, 2013; 13: 174
- [23] Chibeu A., Lingohr E.J., Masson L., Manges A., Harel J., Ackermann H.W., Kropinski A.M., Boerlin P.: Bacteriophages with the ability to degrade uropathogenic *Escherichia coli* biofilms. *Viruses*, 2012; 4: 471-487
- [24] Clarke B.R., Esumeh F., Roberts I.S.: Cloning, expression, and purification of the K5 capsular polysaccharide lyase (KfLA) from coliphage K5A: evidence for two distinct K5 lyase enzymes. *J. Bacteriol.*, 2000; 182: 3761-3766
- [25] 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
- [26] Cornelissen A., Ceyskens P.J., Krylov V.N., Noben J.P., Volckaert G., Lavigne R.: Identification of EPS-degrading activity with in the tail spikes of the novel *Pseudomonas putida* phage AF. *Virology*, 2012; 434: 251-256
- [27] Cornelissen A., Ceyskens P.J., T'Syen J., Van Praet H., Noben J.P., Shaburova O.V., Krylov V.N., Volckaert G., Lavigne R.: The T7-related *Pseudomonas putida* phage ϕ 15 displays virion-associated biofilm degradation properties. *PLoS One*, 2011; 6: e18597
- [28] Curtin J.J., Donlan R.M.: Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2006; 50: 1268-1275
- [29] Davidson I.W., Lawson C.J., Sutherland I.W.: An alginate lyase from *Azotobacter vinelandii* phage. *J. Gen. Microbiol.*, 1977; 98: 223-229
- [30] Donlan R.M.: Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. *Trends Microbiol.*, 2009; 17: 66-72
- [31] Donlan R.M.: Biofilm elimination on intravascular catheters: important considerations for the infectious disease practitioner. *Clin. Infect. Dis.*, 2011; 52: 1038-1045
- [32] Drulis-Kawa Z., Majkowska-Skrobek G., Maciejewska B., Delattre A.S., Lavigne R.: Learning from bacteriophages – advantages and limitations of phage and phage-encoded protein applications. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2012; 13: 699-722
- [33] El-Safory N.S., Lee G.C., Lee C.K.: Characterization of hyaluronate lyase from *Streptococcus pyogenes* bacteriophage H4489A. *Carbohydrate Polymers*, 2011; 84: 1182-1191
- [34] Fenton M., Ross P., McAuliffe O., O'Mahony J., Coffey A.: Recombinant bacteriophage lysins as antibacterials. *Bioeng. Bugs.*, 2010; 1: 9-16
- [35] Fischetti V.A.: Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2010; 300: 357-362
- [36] Fu W., Forster T., Mayer O., Curtin J.J., Lehman S.M., Donlan R.M.: Bacteriophage cocktail for the prevention of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* on catheters in an *in vitro* model system. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010; 54: 397-404
- [37] Glonti T., Chanishvili N., Taylor P.W.: Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginate capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Appl. Microbiol.*, 2010; 108: 695-702

- [38] Gutiérrez D., Martínez B., Rodríguez A., García P.: Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. *BMC Genomics*, 2012; 13: 228
- [39] Hallenbeck P.C., Vimr E.R., Yu F., Bassler B.O., Troy F.A.: Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly- α -2,8-sialosyl carbohydrate units. *J. Biol. Chem.*, 1987; 262: 3553-3561
- [40] Hancock V., Dahl M., Klemm P.: Abolition of biofilm formation in urinary tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates by metal interference through competition for Fur. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010; 76: 3836-3841
- [41] Hanlon G.W., Denyer S.P., Olliff C.J., Ibrahim L.J.: Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001; 67: 2746-2753
- [42] Hoiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O.: Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010; 35: 322-332
- [43] Hsu C.R., Lin T.L., Pan Y.J., Hsieh P.F., Wang J.T.: Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of *Klebsiella pneumoniae* and characterization of its polysaccharide depolymerase. *PLoS One*, 2013; 8: e70092
- [44] Hughes K.A., Sutherland I.W., Jones M.V.: Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology*, 1998; 144: 3039-3047
- [45] Jakobsson E., Schwarzer D., Jokilampi A., Finne J.: Endosialidases: versatile tools for the study of polysialic acid. *Top. Curr. Chem.*, 2012
- [46] Kashiwagi A., Yomo T.: Ongoing phenotypic and genomic changes in experimental coevolution of RNA bacteriophage Q β and *Escherichia coli*. *PLoS Genetics*, 2011; 7: e1002188
- [47] Kassa T., Chhibber S.: Thermal treatment of the bacteriophage lysate of *Klebsiella pneumoniae* B5055 as a step for the purification of capsular depolymerase enzyme. *J. Virol. Methods*, 2012; 179: 135-141
- [48] Kim K.P., Cha J.D., Jang E.H., Klumpp J., Hagens S., Hardt W.D., Lee K.Y., Loessner M.J.: PEGylation of bacteriophages increases blood circulation time and reduces T-helper type 1 immune response. *Microb. Biotechnol.*, 2008; 1: 247-257
- [49] Kostakioti M., Hadjifrangiskou M., and Hultgren S.J.: Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2013; 3: a010306
- [50] Kutateladze M., Adamia R.: Bacteriophages as potential new therapeutics to replace or supplement antibiotics. *Trends Biotechnol.*, 2010; 28: 591-595
- [51] Legoux R., Lelong P., Jourde C., Feuillerat C., Capdevielle J., Sure V., Ferran E., Kaghad M., Delpech B., Shire D., Ferrara P., Loison G., Salomé M.: N-acetyl-heparosan lyase of *Escherichia coli* K5: gene cloning and expression. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 7260-7264
- [52] Lindsay A.M., Zhang M., Mitchell Z., Holden M.T., Waller A.S., Sutcliffe I.C., Black G.W.: The *Streptococcus equi* prophage-encoded protein SEQ2045 is a hyaluronan-specific hyaluronate lyase that is produced during equine infection. *Microbiology*, 2009; 155: 443-449
- [53] Linnerborg M., Weintraub A., Albert M.J., Widmalm G.: Depolymerization of the capsular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O139 by a lyase associated with the bacteriophage JA1. *Carbohydr. Res.*, 2001; 333: 263-269
- [54] Liu Y., Li G., Mo Z., Chai Z., Shang A., Mou H.: Properties of *Klebsiella* phage P13 and associated exopolysaccharide depolymerase. *J. Ocean Univ. China*, 2014; 13: 163-168
- [55] Lu T.K., Collins J.J.: Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 11197-11202
- [56] Lu T.K., Collins J.J.: Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009; 106: 4629-4634
- [57] Lu T.K., Koeris M.S.: The next generation of bacteriophage therapy. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2011; 14: 524-531
- [58] Łysiak K.: Bakteriofagi jako alternatywa dla antybiotyków – możliwości praktycznego ich zastosowania w chirurgii stomatologicznej – przegląd piśmiennictwa. *Dent. Med. Probl.*, 2004; 41: 761-768
- [59] Maura D., Debarbieux L.: Bacteriophages as twenty-first century antibacterial tools for food and medicine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011; 90: 851-859
- [60] Merrill C.R., Biswas B., Carlton R., Jensen N.C., Creed G.J., Zullo S., Adhya S.: Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 3188-3192
- [61] Międzybrodzki R., Borysowski J., Fortuna W., Weber-Dąbrowska B., Górski A.: Terapia fagowa jako alternatywa w leczeniu zakażeń wywołanych przez bakterie antybiotykooporne. *Kardiochir. Torakochir. Pol.*, 2006; 3: 201-205
- [62] Międzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dąbrowska B., Letkiewicz S., Szufnarowski K., Pawelczyk Z., Rogoz P., Klak M., Wojtasik E., Gorski A.: Clinical aspects of phage therapy. *Adv. Virus Res.*, 2012; 83:73-121
- [63] Moons P., FASTER D., Aertsen A.: Lysogenic conversion and phage resistance development in phage exposed *Escherichia coli* biofilms. *Viruses*, 2013; 5: 150-161
- [64] Moryl M., Torzewska A., Jałmużna P., Różalski A.: Analysis of *Proteus mirabilis* distribution in multi-species biofilms on urinary catheters and determination of bacteria resistance to antimicrobial agents. *Pol. J. Microbiol.*, 2013; 62: 377-384
- [65] Mushtaq N., Redpath M.B., Luzio J.P., Taylor P.W.: Treatment of experimental *Escherichia coli* infection with recombinant bacteriophage-derived capsule depolymerase. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2005; 56: 160-165
- [66] Nimmich W.: Detection of *Escherichia coli* K95 strains by bacteriophages. *J. Clin. Microbiol.*, 1994; 32: 2843-2845
- [67] Nimmich W., Schmidt G., Krallmann-Wenzel U.: Two different *Escherichia coli* capsular polysaccharide depolymerases each associated with one of the coliphage ϕ K5 and ϕ K20. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1991; 82: 137-141
- [68] Park J.K., Choi D.J., Kim S.M., Choi H.N., Park J.W., Jang S.J., Choo Y.K., Lee C.G., Park Y.I.: Purification and characterization of a polysialic acid-specific sialidase from *Pseudomonas fluorescens* JK-0412. *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2012; 17: 526-537
- [69] Pires D., Sillankorva S., Faustino A., Azeredo J.: Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. *Res. Microbiol.*, 2011; 162: 798-806
- [70] Potera C.: Phage renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environ. Health Perspect.*, 2013; 121: a48-a53
- [71] Rieger D., Freund-Molbert E., Stirm S.: *Escherichia coli* capsule bacteriophages. III. Fragments of bacteriophage 29. *J. Virol.*, 1975; 15: 964-975
- [72] Rieger-Hug D., Stirm S.: Comparative study of host capsule depolymerases associated with *Klebsiella* bacteriophages. *Virology*, 1981; 113: 363-378
- [73] Ryan E.M., Alkawareek M.Y., Donnelly R.F., Gilmore B.F.: Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2012; 65: 395-398
- [74] Scholl D., Adhya S., Merrill C.: *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005; 71: 4872-4874
- [75] Scholl D., Rogers S., Adhya S., Merrill C.R.: Bacteriophage K1-5 encodes two different tail fiber proteins, allowing it to infect and replicate on both K1 and K5 strains of *Escherichia coli*. *J. Virol.*, 2001; 75: 2509-2515

- [76] Siringan P., Connerton P.L., Payne R.J., Connerton I.F.: Bacteriophage-mediated dispersal of *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 77: 3320-3326
- [77] Srey S., Jahid I.K., Ha S.D.: Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, 2013; 31: 572-585
- [78] Stickler D.J.: Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. *Nat. Clin. Pract. Urol.*, 2008; 5: 598-608
- [79] Stummeyer K., Schwarzer D., Claus H., Vogel U., Gerardy-Schahn R., Mühlenhoff M.: Evolution of bacteriophages infecting encapsulated bacteria: lessons from *Escherichia coli* K1-specific phages. *Mol. Microbiol.*, 2006; 60: 1123-1135
- [80] Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G.Jr.: Bacteriophage therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001; 45: 649-659
- [81] Sutherland I.W.: Polysaccharases for microbial exopolysaccharides. *Carbohydr. Polym.*, 1999; 38: 319-328
- [82] Sutherland I.W.: The exopolysaccharides of *Klebsiella* serotype 2 strains as substrates for phage-induced polysaccharide depolymerases. *J. Gen. Microbiol.*, 1971; 70: 331-338
- [83] Sutherland I.W., Hughes K.A., Skillman L.C., Tait K.: The interaction of phage and biofilms. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2004; 232: 1-6
- [84] Sutherland I.W., Wilkinson J.F.: Depolymerases for bacterial exopolysaccharides obtained from phage-infected bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 1965; 39: 373-383
- [85] Szymanek-Majchrzak K., Młynarczyk A., Młynarczyk G.: Oporność *Staphylococcus aureus* na glikopeptydy. *Post. Mikrobiol.*, 2013; 52: 171-184
- [86] Tait K., Skilmann L.C., Sutherland I.W.: The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. *Biofouling*, 2002; 18: 305-311
- [87] Thompson J.E., Pourhossein M., Waterhouse A., Hudson T., Goldrick M., Derrick J.P., Roberts I.S.: The K5 lyase KfIA combines a viral tail spike structure with a bacterial polysaccharide lyase mechanism. *J. Biol. Chem.*, 2010; 285: 23693-23969
- [88] Tomlinson S., Taylor P.W.: Neuraminidase associated with coliphage E that specifically depolymerizes the *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide. *J. Virol.*, 1985; 55: 374-378
- [89] Vandamme E.J.: Phage therapy and phage control: to be revisited urgently!! *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2014; 89: 329-333
- [90] Vandenberg P.A., Wright A.M., Vidaver A.K.: Partial purification and characterization of a polysaccharide depolymerase associated with phage-infected *Erwinia amylovora*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985; 49: 994-996
- [91] Verma V., Harjai K., Chhibber S.: Characterization of a T7-like lytic bacteriophage of *Klebsiella pneumoniae* B5055: a potential therapeutic agents. *Curr. Microbiol.*, 2009; 59: 274-281
- [92] Verma V., Harjai K., Chhibber S.: Restricting ciprofloxacin induced resistant variant formation in biofilm of *Klebsiella pneumoniae* B5055 by complementary bacteriophage treatment. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2009; 64: 1212-1218
- [93] Verma V., Harjai K., Chhibber S.: Structural changes induced by a lytic bacteriophage make ciprofloxacin effective against older biofilm of *Klebsiella pneumoniae*. *Biofouling*, 2010; 26: 729-737
- [94] Viertel T.M., Ritter K., Horz H.P.: Viruses versus bacteria – novel approaches to phage therapy as a tool against multidrug-resistant pathogens. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2014; 69: 2326-2336
- [95] Vitiello C.L., Merrill C.R., Adhya S.: An amino acid substitution in a capsid protein enhances phage survival in mouse circulatory system more than a 1000-fold. *Virus Res.*, 2005; 114: 101-103
- [96] Walmagh M., Boczkowska B., Grymonprez B., Briens Y., Drulis-Kawa Z., Lavigne R.: Characterization of five novel endolysins from Gram-negative infecting bacteriophages. *Appl. Microbiol. Biotech.*, 2013; 97: 4369-4375
- [97] Weinbauer M.G.: Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004; 28: 127-181
- [98] Yurewicz E.C., Ghalambor M. A., Duckworth D.H., Heath E.C.: Catalytic and molecular properties of a phage-induced capsular polysaccharide depolymerase. *J. Biol. Chem.*, 1971; 246: 5607-5616
- [99] Zhang Y., Hu Z.: Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with bacteriophages and chlorine. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013; 110: 286-295

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.