

**Eva Krzyżewska¹, Marta Książczyk², Anna Kędziora²,
Bożena Futoma-Kołocho², Gabriela Bugla-Płoskońska^{2*}**

¹Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych,
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu
²Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego

Wpłynęło w kwietniu 2015 r.

1. Wprowadzenie. 2. Oporność mikroorganizmów na biocydy. 3. Oporność bakterii na biocydy determinowana przez geny znajdujące się na plazmidzie. 4. Zmiana ultrastruktury składników osłon komórkowych, jako odpowiedź komórki bakterii na działanie biocydów. 4.1. Modyfikacje lipopolisacharydu bakterii Gram-ujemnych. 4.2. Modyfikacje białek błony zewnętrznej oraz pompy efflux jako główny system oporności na biocydy bakterii Gram-ujemnych. 5. Biofilm bakteryjny jako strategia ochronna przed działaniem substancji biobójczych. 6. Oporność krzyżowa bakterii na biocydy i antybiotyki. 7. Podsumowanie

Modifications of cell structure of microorganisms induced by biocides

Abstract: Interactions between bacterial cells and antimicrobial agents, including disinfectants, are still not well investigated and understood, especially in terms of bacterial insusceptibility to biocides. Facing increasing and deepening multidrug resistance phenomenon among pathogenic bacteria, disinfection is one of the most popular and effective non-antibiotic control and elimination method of pathogen dissemination. If disinfection is supposed to be an alternative solution to antibiotic therapy, it needs to be confirmed that multidrug resistance would not be replaced by an even more dangerous phenomenon, i.e. microbial resistance to biocides. Hence, it is essential to investigate this issue. Recently, there have been a lot of research about interactions between microorganisms and biocides, which is reflected in the numerous publications available in the Pub-Med database (649 from years 2009–2014). What is more, since 2013/2014 the BacMet database, which contains sequences and information about genes associated with microbial susceptibility to biocides, is available on-line. Better understanding of bacterial molecular response to biocides might reveal some unknown and important interactions.

1. Introduction. 2. Resistance to biocides. 3. Biocide resistance determined by genes contained on plasmids. 4. Changes of bacterial cell envelope in response to biocides. 4.1. Modification of bacterial lipopolysaccharides. 4.2. Modifications of outer membrane proteins and efflux pumps as the main system of bacterial resistance to biocides of Gram-negative bacteria. 5. Bacterial biofilm as a protective strategy against biocides. 6. Cross-resistance of bacteria to biocides and antibiotics. 7. Summary

Słowa kluczowe: biocydy, oporność bakterii, środki dezynfekcyjne

Key words: biocides, bacterial resistance, disinfectants

1. Wprowadzenie

Biocydy stanowią grupę związków chemicznych pochodzenia syntetycznego lub naturalnie występujących w przyrodzie, które są stosowane w zwalczaniu szkodliwych organizmów (bakterii chorobotwórczych, grzybów, pierwotniaków, gryzoni) [77]. Kontrola chemiczna mikroorganizmów jest powszechnie stosowana w poszczególnych sektorach przemysłu (spożywczym, chemicznym), zdrowia publicznego (szpitalach, gabinetach lekarskich i kosmetycznych), oraz życia codziennego (miejscach użyteczności publicznej, gospodarstwach domowych). Dezynfekcja to proces, w którym następuje redukcja liczby form wegetatywnych (bez form przetrwalnych) drobnoustrojów dezynfekowanej powierzchni lub przedmiotu do poziomu bezpiecznego dla użytkowników. Proces ten może być prowadzony metodami: fizycznymi (np. promieniowanie UV, tem-

peratura, para wodna), mechanicznymi (np. filtracja) lub chemicznymi (środki dezynfekcyjne) [36, 66, 77].

Środki dezynfekcyjne stanowią grupę związków chemicznych (tj. alkohole, aldehydy, kwasy organiczne, fenole, związki kationowe), które wykazują różną reaktywność i toksyczność względem mikroorganizmów. Komercyjnie dostępne środki dezynfekcyjne mogą zawierać w swoim składzie, jako substancje czynne jeden lub kilka związków chemicznych, takich jak: fenole, aldehydy, chlorowcopochodne i fluoropochodne, czwartorzędowe związki amoniowe (*Quaternary Ammonium Compounds*, QAC's), związki utleniające, czy metale ciężkie. Obecność kilku substancji czynnych w środkach dezynfekcyjnych zwiększa spektrum działania i skuteczność danego preparatu [46, 47]. Jednoznaczne określenie mechanizmu działania biocydów na komórki drobnoustrojów jest problematyczne biorąc pod uwagę ogromne zróżnicowanie związków chemicznych zali-

* Autor korespondencyjny: Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski, ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; tel.: +48 71 3756 323; e-mail: gabriela.bugla-ploskonska@uwr.edu.pl

Tabela I

Związki chemiczne najczęściej stosowane w preparatach dezynfekcyjnych oraz ich mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego, na podstawie [15, 17, 69, 76]

Grupa chemiczna	Substancje aktywne	Mechanizm działania
Alkohole	etanol, izopropanol	denaturacja białek, uszkodzenie błony komórkowej
Aldehydy	glutaraldehyd, formaldehyd	wiązanie do grup aminowych białek, zaburzenie w funkcjonowaniu osłon komórkowych, zmiany w strukturze materiału genetycznego, hamowanie transportu komórkowego
Biguanidy	chlorheksydyna	zmiana przepuszczalności osłon komórkowych, denaturacja białek cytoplazmatycznych, wytrącanie kwasów nukleinowych
Fenole	fenol, krezol i ich pochodne	uszkodzenie błony cytoplazmatycznej, denaturacja białek, koagulacja cytoplazmy
Związki chloru	chloramina, podchloryn sodu, podchloryn wapnia	denaturacja białek, uszkodzenie materiału genetycznego
Związki jodu	jodyna, jodofory	denaturacja białek
Substancje utleniające	ozon, nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy	denaturacja białek, niszczenie struktury lipidów i kwasów nukleinowych
IV-rzędowe związki amoniowe	chlorek benzalkoniowy, chlorek benzetonowy	uszkodzenie osłon komórkowych, oddziaływanie z fosfolipidami błonowymi, denaturacja białek, niszczenie struktury kwasów nukleinowych, aktywacja enzymów autolitycznych

czanych do środków dezynfekcyjnych. Biocydy mogą działać zarówno bakteriostatycznie, jak i bakteriobójczo, co zależy przede wszystkim od stężenia roztworu roboczego danego preparatu [67]. W Tabeli I zamieszczono zestawienie związków chemicznych najczęściej stosowanych jako środki dezynfekcyjne, z zaznaczeniem ogólnych mechanizmów ich działania przeciwdrobnoustrojowego. Działanie bakteriobójcze środków dezynfekcyjnych jest niespecyficzne i skierowane na struktury, które odpowiadają za utrzymanie ogólnej integralności i funkcjonalności komórki. Elementami tymi są: ściana komórkowa, błona cytoplazmatyczna oraz cytoplazma wraz ze strukturami komórkowymi [14, 40, 47]. Biocydy zazwyczaj wchodzi w niespecyficzne oddziaływania chemiczne z poszczególnymi komponentami komórek mikroorganizmów. Na przykład glutaraldehyd lub srebro niespecyficznie reagują z resztami aminowymi lub tiolowymi białek bakteryjnych. W efekcie może nastąpić zaburzenie lub zahamowanie poszczególnych procesów metabolicznych bądź uszkodzenie struktur komórkowych [15].

Środki dezynfekcyjne dzieli się na dwie główne klasy: związki utleniające (*oxidizing agents*) nukleofilowe lub elektrofilowe i odpowiednio związki nieutleniające (*non-oxidizing agents*) [46]. Związki utleniające, np. nadtlenek wodoru, chlor i chlorowcopochodne, dwutlenek chloru, podchloryn sodu, kwas nadoctowy, ozon czy jodofory powodują utlenianie grup funkcyjnych poszczególnych składników budujących komórki mikroorganizmów. W wyniku tego procesu, dochodzi w szybkim tempie do wielu nieodwracalnych uszkodzeń, a w efekcie końcowym do eliminacji drobnoustrojów. Związki utleniające odznaczają się bardzo

dużą reaktywnością oraz bardzo szerokim spektrum działania. Wykazują aktywność względem praktycznie wszystkich grup mikroorganizmów: wegetatywnych komórek bakterii Gram-dodatnich (w tym prątków), jak i bakterii Gram-ujemnych, wirusów, grzybów, a nawet spor bakteryjnych. Chlor i jego pochodne stanowią powszechnie używane w przemyśle, jaki i gospodarstwach domowych środki dezynfekcyjne. Kwas podchloryny dyfunduje przez osłony powierzchniowe mikroorganizmów, a następnie na terenie cytoplazmy wchodzi w reakcje z innymi składnikami komórkowymi (białka, kwasy nukleinowe, lipidy) powodując ich utlenienie oraz hamując produkcję ATP zaburzając tym samym procesy oddychania komórkowego [19]. Podobne działanie, jak związki chloru, wykazuje ozon, który posiada wysoką aktywność biologiczną, a przy tym jest w niewielkim stopniu szkodliwy dla środowiska [50].

Do środków dezynfekcyjnych nieutleniających zalicza się np. czwartorzędowe związki amoniowe, biguanidyny, związki amfoteryczne, alkohole, aldehydy oraz fenol i jego pochodne. W ogólnym schemacie działania tej grupy związków następuje przenikanie danej substancji przez osłony komórkowe i jednocześnie dochodzi do zakłócenia przepuszczalności błony cytoplazmatycznej komórki mikroorganizmu, czego rezultatem może być wyciek drobnocząsteczkowych składników komórkowych do przestrzeni peryplazmatycznej, np. zasad azotowych i/lub jonów potasowych. Na tym etapie zostają zahamowane podziały komórek. Przy wystarczającym stężeniu środka dochodzi do koagulacji białek cytoplazmy i zablokowania podstawowych funkcji metabolicznych komórki mikroorganizmu, co doprowadza do jej śmierci [14, 47, 77].

2. Oporność mikroorganizmów na biocydy

Bakterie mogą nabywać oporność na środki dezynfekcyjne podobnie jak na antybiotyki i chemioterapeutyki. W kontroli rozprzestrzeniania się chorób infekcyjnych konieczne jest zbadanie związku pomiędzy lekoopornością mikroorganizmów, a ich opornością na biocydy. Oporność bakterii na biocydy jest zjawiskiem znanym i opisanym w literaturze. Schwaiger i wsp. [74] wykazali, że szczepy *Enterococcus faecium* i *Enterococcus faecalis* izolowane zarówno od pacjentów hospitalizowanych, jak i z produktów spożywczych, gospodarstw hodowlanych, czy terenów rolniczych, cechowała znacznie zmniejszona wrażliwość na czwartorzędowe sole amoniowe. Narui [53] w swoich badaniach dowiódł, że metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, MRSA) są odporne na kwas podchloryny, chlorheksydynę oraz związki chloru. Stickler [78] z kolei opisał zmniejszoną wrażliwość na triklosan szczepów *Proteus mirabilis* izolowanych z cewników. Wiąże się z tym obawa, że mikroorganizmy mogą być niewrażliwe na biocydy nawet, jeśli te są stosowane w stężeniach zdefiniowanych przez producenta, jako aktywne przeciwdrobnoustrojowo. Jest to realne zagrożenie zdrowia publicznego, gdyż nieskuteczna dezynfekcja może być przyczyną zachorowań nawet o charakterze epidemicznym [24]. Dlatego ważne jest poznawanie mechanizmów oporności bakterii na środki dezynfekcyjne, gdyż może być to wykorzystane w projektowaniu nowych związków dezynfekcyjnych lub strategii i rozwiązań zaradczych, które będą zapobiegać generowaniu oporności bakterii na biocydy lub umożliwią przełamanie mechanizmów oporności.

W tym kontekście istotne są badania nad molekularnymi mechanizmami i uwarunkowaniami zmniejszonej wrażliwości drobnoustrojów na związki chemiczne stosowane w dezynfekcji. W ostatnich latach powstały liczne prace nad tym zagadnieniem, o czym świadczy znaczna liczba publikacji z lat 2009–2014, wynosząca 649 pozycji w bazie Pub-Med. Publikacje obejmują prace przeglądowe oraz badania eksperymentalne dotyczące wrażliwości mikroorganizmów na związki biobójcze, prowadzone w warunkach *in vitro* [7, 37, 51, 82, 85] oraz w miejscach praktycznego stosowania dezynfekcji chemicznej [54, 72, 74]. Badanie oporności biofilmów bakteryjnych względem biocydów jest istotne ze względu na powszechne występowanie tych form na terenie obszarów poddawanych intensywnym procesom dezynfekcji chemicznej. Szczególnie w ostatnich latach (2013–2014) liczne zespoły badawcze [10, 22, 29, 52, 55] skoncentrowały się nad badaniem wrażliwości mikroorganizmów żyjących w biofilmach (jako najpowszechniejszej formy występowania drobnoustrojów w środowisku zewnętrznym) na biocydy.

Badania nad opornością mikroorganizmów względem środków dezynfekcyjnych dotyczą nie tylko bakterii. Tung i wsp. [79] wykazali, że tak powszechnie stosowane środki dezynfekcyjne, jak etanol i czwartorzędowe związki amoniowe, mają stosunkowo niską skuteczność w inaktywacji ludzkich norowirusów wywołujących ostre infekcje pokarmowe. Badane norowirusy wykazywały także zmniejszoną wrażliwość na działanie kwasu podchlorynowego, szczególnie w porównaniu do mysiego norowirusa. Zaś ekspozycja ludzkiego wirusa brodawczaka HPV na 11 powszechnie dostępnych i stosowanych środków dezynfekcyjnych wykazała, że większość preparatów dezynfekcyjnych stosowanych w placówkach szpitalnych i gabinetach dentystrycznych, a także środki o właściwościach potencjalnie sterylizujących, nie powodowały eliminacji wirusa HPV (za wyjątkiem pochodnych fenolu i środków zawierających związki srebra) [48].

Oporność na biocydy może stanowić stałą, charakterystyczną cechę danej grupy mikroorganizmów, tzw. naturalną oporność (*intrinsic resistance*). Charakteryzują się nią spory bakteryjne o złożonej, wielowarstwowej budowie osłon zewnętrznych oraz prątki (*Mycobacterium* spp.), posiadające kwasooporną ścianę komórkową [70]. Mikroorganizmy, naturalnie wrażliwe na biocydy mogą nabyć oporność na te substancje poprzez wykształcenie odpowiednich mechanizmów. Mechanizmy te mogą być uwarunkowane różnorodnymi czynnikami i powstawać jako konsekwencja:

- **zmian fenotypowych.** Ten typ oporności na biocydy manifestowany przez bakterie może znacząco zmieniać się pod wpływem takich bodźców jak: utrudniona dostępność składników odżywczych i tlenu, faza wzrostu, w jakiej znajdują się bakterie oraz występowanie mikroorganizmów w postaci biofilmów. Bakterie w odpowiedzi na czynniki stresowe wykazują wówczas zwiększoną oporność na różnego rodzaju związki przeciwdrobnoustrojowe, co wynika prawdopodobnie ze zmian w strukturze czy elementach składowych powierzchniowych osłon komórkowych, warunkujących zmniejszoną przepuszczalność dla związków toksycznych [27].

- **zmian indukowanych.** W odpowiedzi na stres selekcyjny, jakim jest ekspozycja bakterii zwłaszcza na niskie, subinhibitorowe stężenia biocydów może nastąpić wykształcenie mechanizmów warunkujących zmniejszoną wrażliwość na dane związki. Działanie biocydów na mikroorganizmy indukuje dwa podstawowe mechanizmy oporności: nadekspresję pomp efflux (głównie u bakterii Gram-ujemnych) oraz produkcję przez bakterie enzymów inaktywujących biocydy [26, 31].

- **zmian chromosomalnych.** Mutacje w obrębie genów kodujących miejsca docelowego działania biocydów w komórkach bakteryjnych powodują brak

wrażliwości takich komórek na dane związki. Także nadekspresja genów kodujących pompy efflux może być uwarunkowana mutacjami punktowymi, a nie tylko zmianami indukowanymi [28].

• **zmian plazmidowych (liczba, skład).** Bakterie mogą nabywać obcy materiał genetyczny wraz z ruchomymi elementami genetycznymi takimi jak plazmidy, które mogą zawierać m.in. geny oporności na związki przeciwdrobnoustrojowe. W konsekwencji może nastąpić horyzontalne rozprzestrzenianie się wśród populacji bakterii oporności związanej głównie z nadekspresją genów kodujących pompy efflux oraz genów kodujących enzymy inaktywujące biocydy [28, 25].

Stosowanie antybiotyków, chemioterapeutyków, czy biocydów może sprzyjać selekcji bakterii o fenotypie oporności. Pojawia się jednak niejednoznaczność w sprawie nazewnictwa patoadaptantów, które pod wpływem presji selekcyjnej środowiska uruchomiły mechanizmy umożliwiające przetrwanie niekorzystnych warunków (np. subinhibitorowych stężeń biocydów) w postaci molekularnych zmian, jakie zachodzą w obrębie komórki. Nie są to już w sposób oczywisty komórki macierzyste, a po usunięciu czynnika selekcyjnego mogą powrócić do formy wyjściowej. W odróżnieniu od komórek zmutowanych, w których nastąpiły genetyczne zmiany warunkujące trwałą cechę oporności, przyjęło się nazywać te formy adaptantami lub patoadaptantami. Niejednokrotnie jednak stosuje się te terminy zamiennie, opisując adaptanty również mutantami [2, 45].

W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania [21, 31, 32], których rezultaty wskazują na znaczącą rolę mechanizmów o podłożu genetycznym, w oporności bakterii na środki dezynfekcyjne. Na podstawie wyników dotychczasowych eksperymentów prowadzonych w warunkach *in vitro*, przypuszcza się, że ekspozycja bakterii na biocydy skutkuje zmianami na poziomie ekspresji genów. Przypuszczalnie konsekwencjami tego są wzrost oporności drobnoustrojów na biocydy, a także narastanie zjadliwości bakterii. Powyższe założenia zostały potwierdzone eksperymentami Wang i wsp. [80], w których populacje *Salmonella* Typhimurium i *Salmonella* Enteritidis poddawano działaniu związków chloru o właściwościach utleniających, a następnie określano zmiany w transkryptomie badanych szczepów za pomocą wybranych badań genetycznych (metody hybrydyzacji, ilościowy Real-Time PCR, mikromacierze DNA) w porównaniu do szczepów nie podlegających działaniu stresu oksydacyjnego. Pod wpływem subinhibitorowych stężeń związków chloru u szczepów *Salmonella* Enteritidis oraz *Salmonella* Typhimurium następowały zmiany w ekspresji wielu genów związanych z metabolizmem komórkowym i wirulencją. Do najbardziej istotnych zmian należały: wzrost ekspresji genów związanych z formowaniem klasteru Fe-S, biosynteza

niektórych aminokwasów (cysteiny) oraz obniżenie poziomu ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę lipopolisacharydu (LPS) [80]. Podobne rezultaty uzyskano dla szczepu *Escherichia coli* O157:H7, który wykazywał zwiększoną oporność na związki przeciwdrobnoustrojowe po ekspozycji na związki utleniające [81]. Działanie czwartorzędowymi związkami amoniowymi na populację *S. enterica*, spowodowało selekcję wariantów o zmniejszonej wrażliwości na biocydy jak i antybiotyki, co wynikało z nadekspresji genów kodujących pompy efflux [37]. Podobnie ekspozycja komórek *Listeria monocytogenes* na wybrane biocydy: nadtlenki, związki chloru i czwartorzędowe związki amoniowe, wpłynęła na zwiększenie poziomu ekspresji genów wirulencji badanych bakterii [39].

Na przełomie 2013 i 2014 roku stworzono i udostępniono bazę danych BacMet [57] zawierającą informacje o genach związanych z opornością mikroorganizmów względem biocydów, w tym także antybiotyków i chemioterapeutyków. W bazie BacMet zgromadzone są aktualnie sekwencje 704 genów związanych z opornością na biocydy a także na metale ciężkie, zweryfikowane na podstawie literatury naukowej oraz 40 556 sekwencji potencjalnych genów oporności na związki przeciwbakteryjne. Przy sekwencjach poszczególnych genów oporności znajdują się informacje o: charakterystyce molekularnej, funkcji danego genu oraz rodzaju oporności, jaki warunkuje [57].

W dalszej części niniejszej pracy przedstawiono molekularne mechanizmy oporności (stała cecha uwarunkowana genetycznie, determinująca brak wrażliwości bakterii na określoną substancję przeciwdrobnoustrojową) lub zmniejszonej wrażliwości (cecha będącą mechanizmem adaptacyjnym bakterii w odpowiedzi na działanie substancji przeciwdrobnoustrojowej o najczęściej charakterze zmian fenotypowych, fizjologicznych, które mogą zostać utracone przez bakterie po zaprzestaniu działania na nie czynnika stresującego) mikroorganizmów na biocydy.

3. Oporność bakterii na biocydy determinowana przez geny znajdujące się na plazmidzie

Zmniejszona wrażliwość na działanie biocydów może być nabyta przez bakterie poprzez zmiany genetyczne, obejmujące transfer czynników genetycznych warunkujących oporność (plazmidy, transpozony) oraz mutacje chromosomalnego lub plazmidowego DNA. Zazwyczaj, nabyta oporność na biocydy jest wynikiem takich mechanizmów jak: degradacja lub modyfikacja enzymatyczna biocydu, aktywny wyrzut biocydów z komórek bakteryjnych oraz stosunkowo rzadko spotykana zmiana miejsca docelowego dla działania biocydu [28].

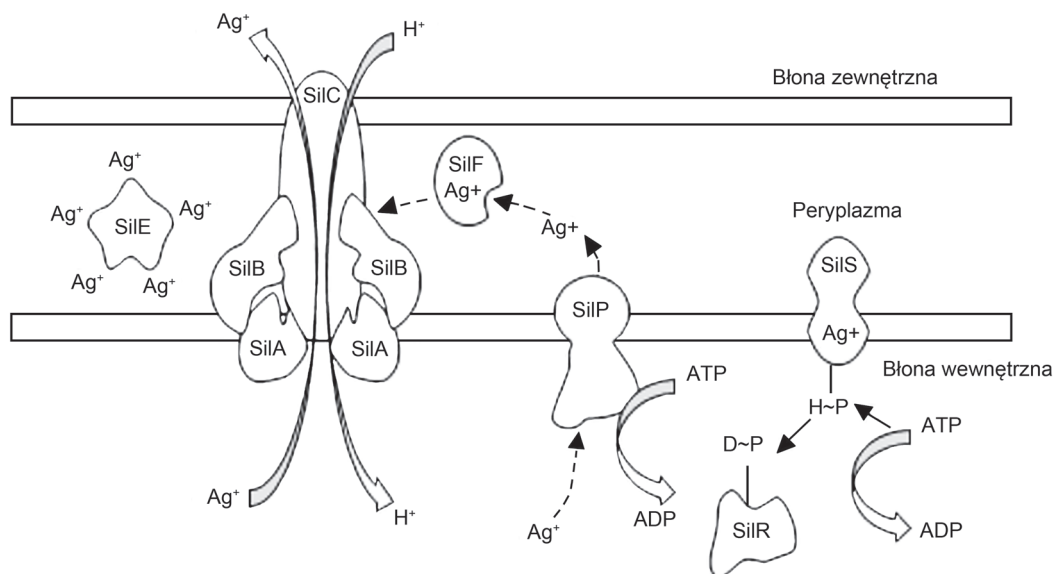
Oporność na biocydy może być uwarunkowana przez horyzontalny transfer genów (*Horizontal Gene Transfer*, HGT), głównie przez nabywanie plazmidów, na których są zlokalizowane geny oporności. Pierwsze doniesienia o tym, że geny chroniące przed szkodliwym działaniem biocydów mogą być zlokalizowane na plazmidach, dotyczyły oporności na metale ciężkie. Oporność względem metali ciężkich: miedzi, srebra, rtęci może rozprzestrzeniać się wśród bakterii poprzez HGT. Szczepy *E. coli* i *Pseudomonas syringae* stawały się odporne na miedź poprzez nabycie plazmidów zawierających geny oporności odpowiednio *pco* dla *E. coli* i *cop* dla *P. syringae*. Także dzikie szczepy *Enterococcus* spp. mogły nabywać plazmidy zawierające gen *trcB*, co warunkuje aktywny wyrzut miedzi z komórek tych ziarniaków [30]. Transfer genów odpowiedzialnych za nabywanie oporności na środki dezynfekcyjne może nastąpić poprzez rozprzestrzenianie się w populacji genów kodujących pompy efflux o szerokim spektrum substratowym zlokalizowanych na plazmidach. Geny *qacA* i *qacB* zostały zidentyfikowane odpowiednio na plazmidach wielooporności pSK1 i pSK23, których nabycie przez mikroorganizmy skutkuje wzrostem oporności na wiele antybiotyków oraz biocydów jak np. czwartorzędowe sole amoniowe czy metale ciężkie [28, 68]. Bakterie *E. coli* ze zidentyfikowanym plazmidem RP1 wykazują zmienioną strukturę LPS oraz zmniejszoną ekspresję genów poryn błony zewnętrznej, przez co szczepy te posiadają zwiększoną oporność na działanie fenolu, chlorheksydyny i cetrymidu [65].

Jony srebra posiadają szerokie spektrum działania zarówno wobec komórek bakterii Gram-dodatnich, jak i Gram-ujemnych, w tym zarówno gatunków tlenowych jak i beztlenowych [71]. Brady [3] w swoich badaniach dowiódł, że środki dezynfekcyjne zawierające srebro (*surfaccine disinfectant spray*) skutecznie ograniczały wzrost *P. aeruginosa* oraz *S. aureus* po 30 minutach działania związku. Głównym miejscem oddziaływania srebra są komórkowe białka strukturalne i enzymatyczne, czyli białka pełniące podstawową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu mikroorganizmu. Antibakteryjna skuteczność srebra wynika z jego wiązania z grupą sulfydrolową (-SH) oraz innymi grupami funkcyjnymi wchodzącymi w skład komórkowych białek i kwasów nukleinowych [69]. W konsekwencji oddziaływania srebra z grupami funkcyjnymi dochodzi do denaturacji białek wchodzących w skład ważnych szlaków metabolicznych, białka tracą swą biologiczną aktywność, co prowadzi do śmierci komórki [5].

Jony srebra mają zdolność wiązania się ze ścianą komórkową bakterii, cytoplazmą, czy też otoczkami bakteryjnymi. Zmiany w strukturze osłon zewnętrznych komórki prowadzą do destabilizacji błony i wzrostu przepuszczalności. Srebro oddziałuje z grupami sul-

fhydrylowymi na powierzchni komórki drobnoustroju zastępując atomy wodoru, co prowadzi do powstania charakterystycznego wiązania S-Ag. W konsekwencji dochodzi do zablokowania łańcucha oddechowego i transportu elektronów, a siła protomotoryczna błony komórkowej zostaje zaburzona. W komórkach *E. coli* zaobserwowano zaburzenie siły protomotorycznej i śmierć komórki po dodaniu do hodowli bakteriologicznej AgNO_3 (20 μM) [73]. Jony Ag^+ po dostaniu się do wnętrza komórki są zdolne do oddziaływania z DNA. Srebro wchodzi w interakcje z zasadami azotowymi w DNA, w wyniku czego dochodzi do powstania formy skondensowanej kwasu nukleinowego oraz zahamowania procesu replikacji.

Pierwszy naukowy opis molekularnych podstaw oporności na srebro sporządzono na podstawie plazmidu pMG101, który wyizolowano z komórek szczepu *S. Typhimurium*. Plazmid pMG101 niosący geny oporności na antybiotyki (ampicylina, chloramfenikol, tetracyklina, streptomycyna) i metale ciężkie (srebro, rtęć) jest obecnie najbardziej poznaną strukturą warunkującą oporność bakterii na jony srebra. Badania nad przekazywaniem cechy oporności na srebro wykazały możliwość transferu plazmidu pMG101 do komórek *E. coli*, która po wbudowaniu plazmidu do własnego genomu uzyskuje cechę srebrooporności [58]. Po długotrwałej ekspozycji na wzrastające stężenia jonów Ag^+ dochodzi do zmniejszenia przepuszczalności osłon komórkowych, której przyczyną było utracenie głównych białek porynowych. Wśród doświadczalnie wygenerowanych mutantów zaobserwowano aktywnie działający system pomp efflux, który jest uznawany za jeden z podstawowych mechanizmów warunkujących oporność na metale ciężkie. Plazmid pMG101 jest determinantą genetyczną o długości około 180 kbp. Region warunkujący cechę srebrooporności sil-CFBA(ORF105aa) PRSE (Rys. 1) składa się z 9 genów, z których 8 genów oraz ich produkty białkowe scharakteryzowano na podstawie homologii do znanych mechanizmów oporności bakterii na srebro [49, 75]. Pierwszy gen *silE* koduje małe peryplazmatyczne białko, które jest zdolne do specyficznego wiązania jonów Ag^+ na powierzchni komórki, zanim wnikną do cytoplazmy. SilE wykazuje 47% podobieństwo do białka PcoE zaangażowanego w mechanizm oporności na miedź u *E. coli*. Białko SilE posiada w swojej budowie 10 reszt histydynowych zdolnych do wiązania pięciu jonów Ag^+ . Wysycenie wszystkich miejsc wiążących jonami Ag^+ prowadzi do znacznych zmian konformacyjnych (białko przyjmuje drugorzędową strukturę α -helisy) [49, 75]. Genom *silR* i *silS* przypisano funkcję regulacyjną, polegającą na kodowaniu dwuskładnikowego systemu przekazywania sygnałów. System ten składa się z błonowej kinazy histydynowej (SilS), która odbiera i przekazuje sygnał



Rys. 1. Mechanizm oporności bakterii na srebro, na podstawie [49, 75] (objaśnienia w tekście)

do regulatora transkrypcji, którym jest białko SilR [75]. Geny *silCBA* zaangażowane są w tworzenie kompleksu błonowego składającego się z trzech białek, który jest odpowiedzialny za wymianę kationowo-protonową działającą na zasadzie antyportu. Białka SilCBA należą do rodziny kationowych pomp efflux RND (*resistance nodulation and cell division*), które warunkują procesy oporności bakterii na substancje przeciwdrobnoustrojowe. System SilCBA wykazuje homologię do systemu wielolekooporności Acr u *E. coli*. Białko SilA jest dużym białkiem błonowym o długości 1048 aminokwasów. Składa się z domeny zakotwiczonej w błonie oraz domeny peryplazmatycznej, które razem tworzą kanał, jakim jony srebra przepływają z cytoplazmy do białka błony zewnętrznej SilC. Trzecie białko SilB pełni rolę łącznika, łączy białko SilA i SilC w funkcjonalną całość. Kompleks SilCBA tworzy system wyrzutu jonów srebra na zewnątrz komórki bez uwalniania ich do przestrzeni peryplazmatycznej [75]. Białko powstałe w wyniku ekspresji genu o długości 95 par zasad określa się jako SilF. Białko SilF w porównaniu z białkiem SilE wyróżnia się odmienną strukturą przestrzenną β -harmonijki oraz zdolnością do wiązania tylko jednego kationu srebra, dzięki obecności jednej reszty histydyny i dwóch reszt metioniny. Uważa się, że funkcją białka SilF jest transport jonów srebra od miejsca ich uwolnienia (białka SilP) bezpośrednio do chemiosmotycznej pompy SilCBA [49, 75]. W wyniku ekspresji ostatniego genu powstaje białko SilP, które pełni funkcję błonowej ATPazy typu P i jest odpowiedzialne za transport jonów Ag^+ z cytoplazmy do przestrzeni peryplazmatycznej. Dla genu o długości 105 par zasad, znajdującego się pomiędzy genami *silA* i *silB* nie znaleziono dotychczas homologicznego białka i funkcja genu nie została do tej pory wyjaśniona [75].

4. Zmiana ultrastruktury składników osłon komórkowych, jako odpowiedź komórki bakterii na działanie biocydów

Jedną z najbardziej prawdopodobnych przyczyn zmniejszonej wrażliwości mikroorganizmów na działanie biocydów są modyfikacje w powierzchniowych osłonach komórkowych. Struktury powierzchniowe bakterii wchodzi w bezpośrednie interakcje ze środkami dezynfekcyjnymi. Modyfikacje w budowie osłon powierzchniowych komórek bakteryjnych mają na celu zmniejszenie przepuszczalności dla różnych związków toksycznych [28, 70]. W odpowiedzi na działanie biocydów komórki bakterii wykształcają mechanizmy zmieniające strukturę poszczególnych elementów osłon komórkowych.

4.1. Modyfikacje LPS bakterii Gram-ujemnych

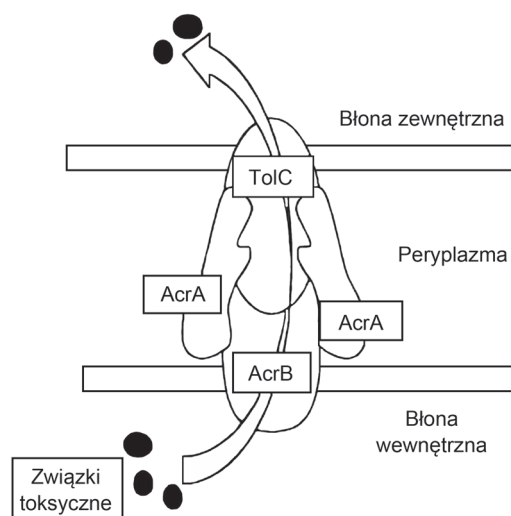
Zmiana struktury i poziomu ekspresji genów zaangażowanych w proces biosyntezy LPS wpływa znacząco na przepuszczalność osłon komórkowych bakterii Gram-ujemnych. Unikalny komponent ściany komórkowej bakterii, jakim jest LPS odpowiada za utrzymanie prawidłowej struktury i funkcji ściany komórkowej oraz za zmniejszoną wrażliwość bakterii na działanie biocydów. Nienaruszona warstwa LPS nadaje zewnętrznej powierzchni komórki bakteryjnej wypadkowy ładunek ujemny, co stanowi ochronę przed przenikaniem przez błonę zewnętrzną anionowych, hydrofobowych biocydów [43]. Mutanty *S. Typhimurium* o zmodyfikowanej długości O-swoistego łańcucha bocznego LPS wykazywały, zmienioną wrażliwość na działanie biocydów i antybiotyków w porównaniu do szczepu dzikiego. Warianty *S. Typhimurium* o LPS ze skróconym

O-swoistym łańcuchem bocznym lub całkowicie pozbawione tej części, tzw. szczepy szorstkie, charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na działanie antybiotyków oraz biocydów o charakterze hydrofobowym, w porównaniu do szczepów dzikich. Jednocześnie mutanty były odporne na związki kationowe [62, 63]. Gilbert i Brown [27] udowodnili w swoich badaniach, że wrażliwość szczepów *P. areuginosa* na chlorowcopochodne fenolu zmniejsza się wraz ze wzrostem zawartości LPS w komórkach. Zdolność chlorofenolu do przechodzenia przez osłony powierzchniowe *P. areuginosa* jest zależna od zmian w strukturze LPS badanych szczepów.

4.2. Modyfikacje białek błony zewnętrznej oraz pompy efflux jako główny system oporności na biocydy bakterii Gram-ujemnych

Pompy efflux stanowią kompleksy białkowe, które w sposób czynny usuwają substancje toksyczne z komórek bakterii, z nakładem energii wytworzonej przez komórkę. Pompy te należą do pięciu rodzin: MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*small multidrug resistance family*), ABC (*ATP-binding cassette family*), MATE (*multidrug and toxic compound extrusion family*), RND (*resistance nodulation division family*), zróżnicowanych pod względem budowy, swoistości substratowej, źródła wykorzystywanej energii i mechanizmu działania [60]. Pompy te zapewniają aktywny wyrzut z komórki bakterii szerokiego spektrum różnych związków, od metabolitów komórkowych po antybiotyki i środki dezynfekcyjne, dlatego też często zamiennie używa się nazwy pompy MDR (*multiple drug resistance*) [13]. Poszczególne pompy efflux są wyspecjalizowane w usuwaniu konkretnej substancji z komórki, lub mogą mieć szeroki zakres substratowy względem wielu różnych związków toksycznych dla bakterii. Białka tworzące pompy mogą być kodowane na chromosomie bakteryjnym, wtedy system efflux ma charakter wrodzony (efflux jest naturalną cechą m.in. pałeczek jelitowych z rodziny *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* spp., *Vibrio* spp.) lub geny kodujące białka pomp są nabywane w procesie transformacji, koniugacji lub transdukcji [34].

Spośród wszystkich pomp efflux największe znaczenie w oporności na substancje przeciwdrobnoustrojowe i najszersze spektrum substratowe wykazują pompy RND bakterii Gram-ujemnych. Usuwają one z komórek mikroorganizmów zarówno antybiotyki, środki dezynfekcyjne, antyseptyczne jak i barwniki. Pompy RND charakteryzują się trójskładnikową strukturą, zbudowane są z białek wewnętrznej błony cytoplazmatycznej, białek peryplazmatycznych oraz białek błony zewnętrznej. Elementy te współpracując ze sobą usuwają określone substancje z cytoplazmy na zewnątrz komórki. Najlepiej poznany i zbadany jest system AcrAB-TolC,



Rys. 2. Budowa i mechanizm działania pompy białkowej bakterii Gram-ujemnych na przykładzie pompy AcrAB-TolC, na podstawie [4, 6, 34] (objaśnienia w tekście)

który jest jednym z najważniejszych mechanizmów oporności na związki toksyczne u pałeczek *Enterobacteriaceae* w tym u *E. coli* i *Salmonella* spp. Budowa pompy białkowej AcrAB-TolC jest przedstawiona schematycznie na rysunku 2.

AcrB jest białkiem transporterowym, zakotwiczo-nym w wewnętrznej błonie cytoplazmatycznej i otwierającym się do peryplazmy, rozpoznaje ono i wiąże substrat, a następnie umożliwia jego przedostanie się do przestrzeni peryplazmatycznej. TolC tworzy kanał przebijający błonę zewnętrzną i peryplazmę, umożliwiający wyrzut substratu na zewnątrz komórki. Zaś AcrA jest peryplazmatycznym białkiem łączącym AcrB i TolC [4, 6, 34]. Aktywność pomp AcrAB-TolC warunkuje przetrwanie bakterii jelitowych podczas ich ekspozycji na działanie soli żółciowych w żołądku. Ze względu na szerokie spektrum substratowe istnieje ryzyko, że pompy mogą usuwać „pomyłkowo” z komórek bakterii związki i substancje istotne dla prawidłowych procesów metabolicznych, jak pirogronian czy mleczan, dlatego też system efflux musi znajdować się pod odpowiednią kontrolą i regulacją komórkową [28, 34]. Przypuszcza się, że aktywność systemu efflux, a zwłaszcza pomp AcrAB-TolC bakterii Gram-ujemnych, jest regulowana przez globalne sygnały odpowiedzi stresowej. Aktywacja pomp białkowych następuje w odpowiedzi na zmiany warunków środowiskowych niszy zajmowanej przez mikroorganizmy, w wyniku ekspozycji ich na szkodliwe lub toksyczne substancje pochodzenia naturalnego jak i na związki stosowane w antybiotykoterapii lub dezynfekcji. W związku z tym pompy efflux nie są konstytutywnie ekspresjonowane przez drobnoustroje, lecz aktywacja tych białkowych kompleksów następuje w warunkach stresowych [28]. Ekspozycja mikroorganizmów na biocydy użyte

w niskich, subinhibitorowych stężeniach, szkodliwych dla bakterii indukuje ekspresję odpowiednich genów systemów efflux [13]. Przeprowadzane niezależnie od siebie liczne eksperymenty [4, 6, 34] wykazały, że nadekspresja pomp efflux AcrAB-TolC u *E. coli* i bakterii z rodzaju *Salmonella* spp. następuje po ekspozycji wyżej wymienionych bakterii na działanie subinhibitorowych stężeń biocydów. Karatzasi wsp. [38] wykazali, że ekspozycja *S. Typhimurium* na biocydy: triklosan i czwartorzędowe związki amoniowe powodowała nadekspresję pomp efflux, a także wydłużenie czasu podziałów komórkowych oraz zmniejszenie inwazyjności pałeczek *Salmonella* w stosunku do ludzkich komórek nabłonka jelita w porównaniu do szczepu dzikiego. Uzyskane warianty *S. Typhimurium* wykazywały stabilny fenotyp MDR o obniżonej wrażliwości na antybiotyki i biocydy. Randall i wsp. [61] po ekspozycji na środki dezynfekcyjne zawierające w swoim składzie aldehydy i substancje utleniające, wyizolowali warianty *S. Typhimurium* o fenotypie MDR tj. o zmniejszonej liczbie poryn w błonie zewnętrznej i nadekspresji pomp efflux. U pałeczek *E. coli* oraz *Salmonella* spp. regulacja ekspresji genów *acrAB* kodujących pompy efflux następuje z udziałem *locus mar*, który jest operonem pełniącym istotną rolę w wielolekooporności bakterii Gram-ujemnych [41]. Operon *mar* zlokalizowany jest na chromosomie wielu bakterii Gram-ujemnych, aktywowany bądź represjonowany w zależności od czynników i warunków oddziałujących na dane mikroorganizmy. Induktorami operonu *mar* są subinhibitorowe stężenia biocydów (np. czwartorzędowe sole amoniowe, triklosan), antybiotyków (np. tetracykliny, chloramfenikol) i wszelkich innych związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Aktywacja genu *mar* zależy również od fazy wzrostu, w jakiej znajdują się mikroorganizmy. Zwiększona aktywność pomp efflux która jest spowodowana zwiększoną ekspresją genów *mar* występuje na początku stacjonarnej fazy wzrostu [44]. Ponadto nadekspresję genów kodujących białka pomp efflux, białek budujących pompy efflux przejawiają komórki bakterii formujących biofilm, a zwłaszcza te zlokalizowane w jego głębszych warstwach [80]. Szczepy *P. aeruginosa* posiadają pompy efflux MexAB, MexCD lub MexEF, które odpowiadają za usuwanie z komórki różnych leków (np. tetracyklin, fluorochinolonów, antybiotyków β -laktamowych) oraz wielu innych substancji o aktywności przeciwbakteryjnej [13, 34]. Chociaż systemy efflux są najlepiej poznane i scharakteryzowane dla bakterii Gram-ujemnych, białkowe pompy występują także u bakterii Gram-dodatnich, a zwłaszcza bakterii z rodzaju *Staphylococcus* spp. Największe znaczenie w zmniejszonej wrażliwości szczepów *S. aureus* względem biocydów mają pompy efflux QacA/B i Smr, należące do rodziny pomp SMR, których substratami są między innymi QAC's, biguanidyny,

diamidyny i barwniki [8]. Badania prowadzone nad klinicznymi szczepami *S. aureus* wykazywały obecność wśród testowanych gronkowców genów *qac* i *smr* kodujących odpowiednie pompy efflux. W poszczególnych eksperymentach stwierdzano różną prevalencję danych genów [86]. Kodowane chromosomalnie pompy MDR *S. aureus* warunkują oporność na biocydy, zarówno w węższym jak i szerokim spektrum substratowym. Pompy NorA, NorB oraz MdeA i MepA rozpoznają, jako substraty czwartorzędowe sole amoniowe oraz barwniki, wypompowując je z komórek gronkowców i warunkując oporność bakterii na dane biocydy [35, 60].

Wielolekooporność wynikająca z nadekspresji systemu efflux może być konsekwencją wzrostu cytoplazmatycznego stężenia głównego, globalnego regulatora odpowiedzi stresowej *rpoS*. Podczas działania różnorodnych czynników stresowych włączana jest ekspresja systemu aktywnego wyrzutu związków toksycznych z komórki. Tym samym zachodzi selekcja wariantów szczepów o zwiększonej aktywności pomp białkowych tzw. *bulimic bacteria* [28].

5. Biofilm bakteryjny jako strategia ochronna przed działaniem substancji biobójczych

Adhezja do powierzchni nieożywionych i tworzenie błon biologicznych tzw. biofilmów jest najczęstszą odpowiedzią bakterii na nieprzyjazny habitat [83]. Biofilm jest wyjątkową, unikalną formą występowania żywych mikroorganizmów zarówno w środowisku nieożywionym, jak i wewnątrz organizmu gospodarza. Bakterie tworzące błony biologiczne znacznie różnią się pod wieloma względami od szczepów tego samego gatunku żyjących w postaci planktonicznej [56]. Biofilmy bakteryjne w porównaniu do komórek planktonicznych wykazują od 10 do nawet 1000 razy większą oporność wobec substancji przeciwdrobnoustrojowych [1]. Błony biologiczne charakteryzują się opornością zarówno na antybiotyki, jak i wysoce reaktywne związki dezynfekcyjne (np. isotionazol, czwartorzędowe sole amoniowe, związki halogenowe). Z tego względu eradykacja biofilmów zarówno z organizmu pacjentów, jak i powierzchni nieożywionych jest istotnym problemem i wymaga zwłaszcza w drugim przypadku drastycznych metod mechanicznego usuwania z jednoczesnym użyciem biocydów o dużej aktywności biologicznej [1, 44].

Początkowo mikroorganizmy przylegają do danej powierzchni w sposób odwracalny [9]. Podczas procesu formowania się biofilmu, komórki bakterii przechodzą zmiany fizjologiczne, biochemiczne jak i genetyczne. Bakterie przylegają do danej powierzchni, następnie namnażają się tworząc mikrokolonie oraz produkują cząsteczki sygnałowe (zjawisko *quorum sensing*).

Komórki bakterii o zmienionym fenotypie lub/i genotypie w wyniku formowania się biofilmów tworzą mikrokolonie, zanurzone w zewnątrzkomórkowej macierzy (*extra cellular polymeric substances*, EPS) podzielonej siecią kanałów, zawierającej egzopolisacharydy oraz inne związki organiczne (m.in. białka, kwasy techojowe, kwasy nukleinowe, fosfolipidy) [16].

Naturalna oporność biofilmów na substancje toksyczne wynika prawdopodobnie z ich złożonej struktury, a zwłaszcza warunkowana jest przez egzopolisacharydowe matrix [1]. EPS jest gęstą elektronowo, żelowatą substancją, stanowiącą barierę fizyczną, utrudniającą dyfuzję biocydów, co uniemożliwia lub znacznie opóźnia ich dotarcie do komórek bakterii. Komórki bakteryjne zgrupowane w mikrokolonie i zlokalizowane w obrębie matrix, a zwłaszcza w głębszych warstwach biofilmów, są mniej wyeksponowane na działanie stosowanych związków bioaktywnych. Wykazano, że związki chloru cechuje znacznie spowolnione wnikanie w głąb biofilmów tworzonych jednocześnie przez *Klebsiella pneumoniae* i *P. areuginosa*. Natomiast jednogatunkowy biofilm *P. areuginosa* wykazuje zmniejszoną wrażliwość na ciprofloksacynę, w porównaniu do komórek tych bakterii żyjących w formie planktonicznej [12]. Matrix biofilmów może stanowić również barierę biochemiczną dla biocydów, jej składniki mogą wchodzić w reakcje chemiczne i neutralizować lub modyfikować właściwości określonych substancji bakteriobójczych [1, 26]. Obserwacje dowiodły [20, 33] iż, w wyniku ekspozycji biofilmów bakteryjnych na działanie kompleksów jodu, związków chloru oraz związków utleniających, związki te reagowały ze składnikami zewnątrzkomórkowego matrix biofilmów, co skutkowało spadkiem ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Ponadto w macierzy biofilmów mogą znajdować się wydzielane przez komórki bakteryjne, enzymy powodujące inaktywację lub modyfikację środków dezynfekcyjnych, antybiotyków czy innych preparatów działających na biofilm [1, 42]. Sondossi i wsp. [76] wykazali aktywność liaz i dehydrogenaz formaldehydu w macierzy biofilmów *P. areuginosa*, obecność tych enzymów powodowała wzrost oporności komórek bakterii na formaldehyd. W badaniach Cunha [11] udowodniono, że oporność biofilmów *P. areuginosa* na antybiotyki β -laktamowe jest w znacznej mierze uwarunkowana obecnością w matrix zwiększonego stężenia β -laktamaz w porównaniu do komórek planktonicznych. Zespół Rodrigues i wsp. [64] przeprowadził eksperyment w którym określono wrażliwość biofilmów *L. monocytogenes* i *S. enterica* na wybrane środki dezynfekcyjne oraz oceniono zmiany jakie zaszły w komórkach bakterii po ekspozycji na biocydy, ze szczególnym odniesieniem do zmiany ekspresji genów związanych z odpowiedzią na czynniki stresowe i genów wirulencji. Zaobserwo-

wano, że praktycznie wszystkie z testowanych biocydów, nawet te użyte w wysokich stężeniach powodujących eliminację większości mikroorganizmów w biofilmie, indukowały zwiększoną ekspresję genów wirulencji w komórkach bakteryjnych, które przetrwały ekspozycję na dane związki.

6. Oporność krzyżowa bakterii na biocydy i antybiotyki

Biocydy mogą powodować selekcję wśród bakterii szczepów antybiotykoopornych jako skutek specyficznych jak i niespecyficznych zmian w budowie ich komórek. Niektóre z mechanizmów warunkujących zmniejszoną podatność mikroorganizmów na szkodliwe działanie biocydów są determinowane przez określone geny zlokalizowane na chromosomie lub plazmidzie. Transfer genów warunkujących oporność na biocydy może powodować jednocześnie przekazanie genów oporności na antybiotyki [23]. Geny *qacA/B* kodujące pompy efflux GacA i GacB występujące głównie u szczepów *S. aureus* i determinujące oporność na biocydy, są zlokalizowane na plazmidach wielolekooporności pSK1, noszących geny oporności na aminoglikozydy, trimetoprim i antybiotyki β -laktamowe [23]. Zaś geny *smr* kodujące pompy efflux-Smr, zapewniające brak wrażliwości gronkowców na biocydy kationowe są umiejscowione na plazmidzie z genami oporności na wankomycynę (pI. 1043), który jest identyfikowany u wysoce wankomycynoopornych, klinicznych szczepów *S. aureus* [84]. Selekcja genów oporności na biocydy może powodować równoczesną selekcję genów oporności na antybiotyki kodowane na tych samych czynnikach genetycznych. W ten sposób mikroorganizmy mogą nabywać jednoczesną oporność na środki dezynfekcyjne i antybiotyki (*co-resistance*).

Oporność krzyżowa (*cross-resistance*), polega na tym, że wytworzone mechanizmy oporności wobec określonej substancji szkodliwej warunkują równocześnie całkowity lub częściowy brak wrażliwości na inne substancje należące do tej samej lub zupełnie innej klasy związków chemicznych. *Micrococcus luteus* poddany działaniu dwutlenku chloru był oporny także na kwas nadctowy i nadtlenek wodoru [59]. Pompy efflux zapewniają bakteriom oporność na szeroki zakres związków o aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Poprzez zwiększoną ekspresję genów kodujących pompy następuje nabycie przez pierwotnie wrażliwe szczepy oporności zarówno na biocydy jak i antybiotyki. Nadekspresja genów dla białek pomp efflux NorA u szczepów *S. aureus* skutkuje równoczesną zmniejszoną wrażliwością tych mikroorganizmów na czwartorzędowe sole amoniowe, barwniki oraz opornością na chloramfenikol i fluorochinolony [59, 60].

7. Podsumowanie

W obliczu ciągle pogłębiającego się zjawiska lekooporności bakterii patogennych, zaostrzane są metody kontroli i ograniczania rozprzestrzeniania się mikroorganizmów, a najczęściej stosowaną metodą jest dezynfekcja chemiczna z zastosowaniem preparatów biobójczych. Powszechność występowania szczepów bakteryjnych o zmniejszonej wrażliwości na środki dezynfekcyjne jest znaczna. Występowanie zjawiska oporności bakterii na biocydy ma charakter wieloczynnikowy. Mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów adaptacyjnych warunkujących zmniejszoną wrażliwość na związki biobójcze. Zmiana ultrastruktury składników osłon komórkowych oraz tworzenie błon biologicznych stanowi obok represji biosyntezy poryn, enzymatycznej inaktywacji biocydu oraz zmiany miejsc docelowego działania biocydu tylko część mechanizmów warunkujących oporność. W związku z tym niezwykle istotne wydają się być badania nad molekularnymi mechanizmami i uwarunkowaniami zmniejszonej wrażliwości drobnoustrojów na związki chemiczne stosowane w dezynfekcji. Zgłębianie tego zagadnienia może być pomocne w optymalizacji projektowania preparatów dezynfekcyjnych o dużej skuteczności.

„Dr Bożena Futoma-Kołoch i dr Anna Kędziora są stypendystkami Projektu „Akademia Rozwoju – kluczem wzmocnienia kadr polskiej gospodarki”, współfinansowana przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego BPZ.506.50.2012.MS”.

Piśmiennictwo

- Araújo P, Lemos M., Mergulhão F, Melo L., Simões M.: Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms (w) Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, red. A. Mendez-Vilas, FORMATEX, Badajoz, 2011, s. 826–834
- Baj J., Markiewicz Z.: Biologia molekularna bakterii. PWN, Warszawa, 2006
- Brady M.J., Lisay C.M., Yurkovetskiy A.V., Sawan S.P.: Persistent silver disinfectant for the environmental control of pathogenic bacteria. *Am. J. Infect. Control.* **31**, 208–214 (2003)
- Buckley A.M., Webber M.A., Cooles S., Randall L.P., La Ragione R.M., Woodward M.J., Piddock L.J.: The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. *Cell Microbiol.* **8**, 847–856 (2006)
- Bugla-Płoskońska G., Leszkiewicz A.: Biologiczna aktywność srebra i jego zastosowanie w medycynie. *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych*, **56**, 115–122 (2007)
- Chojecka A., Jakubiec K., Jakimiak B., Röhm-Rodowald E., Kanclerski K.: Znaczenie zjawiska efflux jako mechanizmu oporności bakterii na substancje czynne środków dezynfekcyjnych. *Przegląd Epidemiologiczny*, **66**, 39–44 (2012)
- Condell O., Iversen C., Cooney S., Power K.A., Walsh C., Burgess C., Fanning S.: Efficacy of biocides used in the modern food industry to control *Salmonella enterica*, and links between biocide tolerance and resistance to clinically relevant antimicrobial compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3087–3097 (2012)
- Costa S.S., Viverios M., Amaral L., Counto I.: Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*: an Update. *Open Microbiol. J.* **7**, 59–71 (2013)
- Costerton J.W.: Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **11**, 217–221 (1999)
- Corcoran M., Morris D., De Lappe N., O'Connor J., Lalor P., Dockery P., Cormican M.: Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 1507–1514 (2014)
- Cunha B.A.: *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. *Semin. Respir. Infect.* **17**, 231–239 (2002)
- Czaczyk K., Myszka K.: Mechanizmy warunkujące oporność biofilmów bakteryjnych na czynniki antymikrobiologiczne. *Biotechnologia*, **76**, 40–52 (2007)
- Daniels C., Ramos J.L.: Adaptive drug resistance mediated by root-nodulation-cell division efflux pumps. *J. Compl. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **15**, 32–36 (2009)
- Denyer S.P., Stewart G.S.A.B.: Mechanisms of action of disinfectants. *Int. Biodeter. Biodegr.* **41**, 261–268 (1998)
- Denyer S.P.: Mechanism of action of antibacterial biocides. *Int. Biodeter. Biodegr.* **36**, 227–245 (1995)
- Donlan R.M.: Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 881–890 (2002)
- Dvorak G.: Disinfection 101. Center for Food Security and Public Health Veterinary Medicine. (2005), <http://www.cfsph.iastate.edu/Disinfection/Assets/Disinfection101.pdf> (22 lipca 2015 roku)
- Dyrektywa 98/8/WE z dnia 16 lutego 1998 r. w sprawie wprowadzania do obrotu produktów biobójczych.
- Eryilmaz M., Palabiyik I.M.: Hypochlorous acid-analytical methods and antimicrobial activity. *Trop. J. Pharm. Res.* **12**, 123–126 (2013)
- Favero M.S., Bond W.W., Peterson N.J., Cook E.H.: Scanning electron microscopic observations of bacteria resistant to iodophor solutions (w) In Proceedings of the International Symposium on Povidone. University of Kentucky, Lexington, 1983, 158–166
- Fernández-Fuentes M.A., Abriouel H., Ortega Morente E., Pérez Pulido R., Gálvez A.: Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram-positive bacteria from organic foods. *Int. J. Food. Microbiol.* **17**, 49–56 (2014)
- Fouladkhan A., Geornaras I., Sofos J.N.: Biofilm formation of O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and multidrug-resistant and susceptible *Salmonella* Typhimurium and Newport and their inactivation by sanitizers. *J. Food. Sci.* **78**, 880–886 (2013)
- Fraiese A.P.: Biocide abuse and antimicrobial resistance – a cause for concern? *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 11–12 (2002)
- Futoma-Kołoch B., Książczyk M., Maciag M., Bugla-Płoskońska G.: The risk of *Salmonella* resistance following exposure to common disinfectants: an emerging problem. *Biology International*, **53**, 54–66, (2013)
- Futoma-Kołoch B., Książczyk M.: Oporność bakterii na środki dezynfekcyjne. *Laboratorium – Przegląd Ogólnopolski*, **9–10**, 11–13 (2013)
- Gilbert P., Allison D.G., McBain A.J.: Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.* **92**, 98–110 (2002)
- Gilbert P., Brown M.R.: Influence of growth rate and nutrient limitation on the gross cellular composition of *Pseudomonas aeruginosa* and its resistance to 3- and 4-chlorophenol. *J. Bacteriol.* **133**, 1066–1072 (1978)
- Gilbert P., McBain A. J.: Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 189–208 (2003)

29. Habimana O., Møretro T., Langsrud S., Vestby L.K., Nesse L.L., Heir E.: Micro ecosystems from feed industry surfaces: a survival and biofilm study of *Salmonella* versus host resident flora strains. *BMC Vet. Res.* **48**, 1–10 (2010)
30. Hasman H., Aarestrup F.M.: tcrB, a gene conferring transferable copper resistance in *Enterococcus faecium*: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **46**, 1410–1416 (2002)
31. Hassan K.A., Jackson S.M., Penesyan A., Patching S.G., Tetu S.G., Eijkelkamp B.A., Brown M.H., Henderson P.J., Paulsen I.T.: Transcriptomic and biochemical analyses identify a family of chlorhexidine efflux proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 20254–20259 (2013)
32. Holder D., Berry D., Dai D., Raskin L., Xi C.: A dynamic and complex monochloramine stress response in *Escherichia coli* revealed by transcriptome analysis. *Water Res.* **47**, 4978–4985 (2014)
33. Huang C.T., Yu F.P., McFeters G.A., Stewart P.S.: Nonuniform-spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2252–2256 (1995)
34. Jarmuła A., Obłąk E., Wawrzycka D., Gutowicz J.: Oporność wielolekowa związana z aktywnym usuwaniem leków z komórek drobnoustrojów. *Postępy Hig. Med. Dośw.* **65**, 216–227 (2011)
35. Kaatz G.W., Seo S.M.: Inducible NorA-mediated multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 2650–2655 (1995)
36. Kordus K., Rymarczyk-Kapuścik A.: Zastosowanie środków dezynfekcyjnych w gabinetach kosmetycznych w świetle obowiązującego prawa. *Eстетol. Med. Kosmetol.* **1**, 27–33 (2011)
37. Karatzas K.A., Randall L.P., Webber M., Piddock L.J.; Humphrey T.J., Woodward M.J., Coldham N.G.: Phenotypic and proteomic characterization of multiply antibiotic-resistant variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium selected following exposure to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 1508–1516 (2008)
38. Karatzas K.A., Webber M.A., Jorgensen F., Woodward M.J., Piddock L.J., Humphrey T.J.: Prolonged treatment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with commercial disinfectants selects for multiple antibiotic resistance, increased efflux and reduced invasiveness. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 947–955 (2007)
39. Kastbjerg V.G., Halberg-Larsen M., Gram L., Ingmer H.: Influence of sublethal concentrations of common disinfectants on expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 303–309 (2010)
40. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z.: Mikrobiologia techniczna Tom 2. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności, PWN, Warszawa, 2009
41. Ma D., Cook D.N., Hearst J.N., Nikaido H.: Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol.* **2**, 489–493 (1994)
42. Mah T.F., O'Toole G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* **9**, 34–39 (2001)
43. Maillard J.Y.: Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.* **92**, 16–27 (2002)
44. Maira-Litran T., Allison D.G., Gilbert P.: Expression of the multiple resistance operon (mar) during growth of *Escherichia coli* as a biofilm. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 243–247 (2000)
45. Markiewicz Z., Kwiatkowski Z.A.: Bakterie, antybiotyki, lekooporność, PWN, Warszawa, 2011
46. Marrs T.T., Ballantyne B.: Pesticide Toxicology and International Regulation, John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, 2004
47. McDonnell G., Russell A.D.: Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Microbiol. Rev.* **12**, 147–179 (1999)
48. Meyers J., Ryndock E., Conway M.J., Meyers C., Robison R.: Susceptibility of high-risk human papillomavirus type 16 to clinical disinfectants. *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1546–1550 (2014)
49. Mijndonckx K., Leys N., Mahillon J., Silver S., Rob Van Houdt. Antimicrobial silver: uses, toxicity and potential for resistance. *Biometals*, **26**, 609–621 (2013)
50. Moore G., Griffith C., Peters A.: Bactericidal properties of ozone and its potential application as a terminal. *J. Food. Prot.* **8**, 1015–1153 (2000)
51. Murdoch L.E., Maclean M., Endarko E., MacGregor S.J., Anderson J.G.: Bactericidal effects of 405 nm light exposure demonstrated by inactivation of *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*, and *Mycobacterium* species in liquid suspensions and on exposed surfaces. *Sci. World J.* DOI: 10.1100/2012/137805 (2012)
52. Nakamura H., Takakura K., Sone Y., Itano Y., Nishikawa Y.: Biofilm formation and resistance to benzalkonium chloride in *Listeria monocytogenes* isolated from a fish processing plant. *J. Food. Prot.* **76**, 1179–1186 (2013)
53. Narui K., Takano M., Noguchi N., Sasatsu M.: Susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates to seven biocides. *Biol. Pharm. Bull.* **30**, 585–587 (2007)
54. Neo S.Y., Lim P.Y., Phua L.K., Khoo G.H., Kim S.J., Lee S.C., Yuk H.G.: Efficacy of chlorine and peroxyacetic acid on reduction of natural microflora, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on mung bean sprouts. *Food Microbiol.* **36**, 475–480 (2013)
55. Nicholas R., Dunton P., Tatham A., Fielding L.: The effect of ozone and open air factor on surface-attached and biofilm environmental *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiol.* **115**, 555–564 (2013)
56. Olesiak P., Stępnik L.: Skuteczność wybranych związków dezynfekcyjnych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, **15**, 41–50 (2012)
57. Pal C., Bengtsson-Palme J., Rensing C., Kristiansson E., Larsson D.G.J.: BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucl. Acids Res.* **42**, 737–743 (2014)
58. Percival S.L., Bowler P.G., Russell A.D.: Bacterial resistance to silver in wound care. *J. Hosp. Infect.* **60**, 1–7 (2005)
59. Piddock L.J.: Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 629–636 (2006)
60. Poole K.: Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 20–51 (2005)
61. Randall L.P., Bagnall M.C., Karatzas K.A., Coldham N.C., Piddock L.J., Woodward M.J.: Fitness and dissemination of disinfectant-selected multiple-antibiotic-resistant (MAR) strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 156–162 (2008)
62. Roantree R.J., Kuo, T.T., MacPhee D.G.: The effect of defined lipopolysaccharide core defects up on antibiotic resistances of *Salmonella* Typhimurium. *J. Gen. Microbiol.* **103**, 223–234 (1977)
63. Roantree R.J., Kuo, T.T., MacPhee D.G., Stocker, B.A.: The effect of various rough lesions in *Salmonella* Typhimurium upon sensitivity to penicillins. *Clin.* **17**, 157 (1969)
64. Rodrigues D., Cerca N., Teixeira P., Oliveira R., Ceri H., Acedo J.: *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. *Microb. Drug Resist.* **17**, 181–189 (2011)
65. Rossouw F.T., Rowbury R.J.: Effects of the resistance plasmid R124 on the level of the OmpF outer membrane protein and on the response of *Escherichia coli* to environmental agents. *J. Appl. Bacteriol.* **56**, 63–79 (1984)
66. Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie kryteriów i sposobów klasyfikacji substancji i preparatów chemicznych. Dziennik Ustaw 2003; nr 171: poz. 666.
67. Russell A.D., Russell N.J.: Biocides: activity, action and resistance. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.* **53**, 327–365 (1995)

68. Russell A.D.: Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *J. Antimicrob. Chemother.* **49**, 597–599 (2002)
69. Russel A.D., Hugo W.B.: Antimicrobial activity and action of silver. *Progr. Med. Chem.* **31**, 351–370 (1994)
70. Russell A.D.: Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *Int. Biodeter. Biodegr.* **36**, 247–265 (1995)
71. Sagripanti J.L.: Metal based formulation with high microbial activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3157–3162 (1992)
72. Sekavec J.G., Moore W.T., Gillock E.T.: Chlorhexidine resistance in a Gram-negative bacterium isolated from an aquatic source. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **48**, 1829–1834 (2013)
73. Schreurs W.J., Rosenberg H.: Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **152**, 7–13 (1982)
74. Schwaiger K., Harms K.S., Bischoff M., Preikschat P., Mölle G., Bauer-Unkauf I., Lindorfer S., Thalhammer S., Bauer J., Hölzel C.S.: Insusceptibility to disinfectants in bacteria from animals, food and humans-is there a link to antimicrobial resistance? *Front. Microbiol.* **5**, 1–24 (2014)
75. Silver S.: Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 341–353 (2003)
76. Sondossi M., Rossmore H.W., Wireman J.W.: Observation of resistance and cross-resistance to formaldehyde and a formaldehyde condensate biocide in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. Biodeter.* **21**, 105–106 (1985)
77. Stefańska J.: Substancje czynne środków dezynfekcyjnych – mechanizmy działania, oporność drobnoustrojów. *Mikrobiologia Medycyna*, **22**, 17–24 (2000)
78. Stickler D.J., Jones G.L.: Reduced susceptibility of *Proteus mirabilis* to triclosan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 991–994 (2008)
79. Tung G., Macinga D., Arbogast J., Jaykus L.A.: Efficacy of commonly used disinfectants for inactivation of human noroviruses and their surrogates. *J. Food Prot.* **76**, 1210–1217 (2013)
80. Wang S., Phillippy A.M., Deng K., Rui X., Li Z., Tortorello M.L., Zhang W.: Transcriptomic responses of *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium to chlorine-based oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 5013–5024 (2010)
81. Wang, S., Deng K., Zaremba S., Deng X, Lin C., Wang Q., Tortorello M.L., Zhang W.: Transcriptomic response of *Escherichia coli* O157:H7 to oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 6110–6123 (2009)
82. Ward N.R., Wolfe R.L., Olson B.H.: Effect of pH, application technique, and chlorine-to-nitrogen ratio on disinfectant activity of inorganic chloramines with pure culture bacteria *Appl. Environ. Microbiol.* **48**, 508–514 (1984)
83. Watnick P., Kolter R.: Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol.* **18**, 2675–2679 (2000)
84. Weigel L.M., Clewell D.B., Gill S.R., McDougal L.K., Flannagan S.E., Kolonay J.F., Shetty J., Killgore G.E., Tenover F.C.: Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science*, **302**, 1569–1571 (2003)
85. Whitehead R.N., Overton T.W., Kemp C.L., Webber M.A.: Exposure of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to high level biocide challenge can select multidrug resistant mutants in a single step. *PloS One*, **6**, 1–9 (2011)
86. Zmantar T., Kouidhi B., Miladi H.: Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BMC Res. Notes*, **4**, 453–461 (2011)