



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Zuzanna Ewa Sycz

Wpływ triterpenów pentacyklicznych
na uropatogenne pałeczki Gram-ujemne

ROZPRAWA DOKTORSKA



UNIwersYTET MEDYCZNY
IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII I PARAZYTOLOGII LEKARSKIEJ

Zuzanna Ewa Sycz

**Wpływ triterpenów pentacyklicznych
na uropatogenne pałeczki Gram-ujemne**

ROZPRAWA DOKTORSKA

zbiór opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych

Promotor: dr hab. Dorota Wojnicz

Promotor pomocniczy: dr Dorota Tichaczek-Goska

Wrocław 2022

*Pragnę przekazać podziękowania najważniejszym Osobom,
które umożliwiły mi postawienie pierwszych kroków na naukowej drodze
i na przestrzeni 4 ostatnich lat trwały przy mnie, wskazując kierunki dalszego rozwoju.*

*Składam wyrazy szacunku i wdzięczności Pani Promotor **dr hab. Dorocie Wojnicz**
oraz Pani Promotor pomocniczej **dr Dorocie Tichaczek-Goska**
za wszechstronną opiekę naukową w trakcie studiów doktoranckich
i czuwanie nad każdym etapem realizacji projektu badawczego,
którego owocem jest niniejsza rozprawa doktorska.*

*W szczególności dziękuję Pani Docent i Pani Doktor za przyjęcie mnie pod swoje skrzydła,
stworzenie warunków do pracy, podzielenie się wiedzą i doświadczeniem
oraz nauczanie laboratoryjnego warsztatu.*

*Z całego serca dziękuję Paniom za wszelką udzieloną pomoc i wsparcie jakie od Was otrzymałam,
za poświęcony mi czas oraz za okazane zaufanie, otwartość i życzliwość.*

*Serdeczne podziękowania za wyrażenie zgody na podjęcie studiów doktoranckich
i przyjęcie mnie do swojego Zespołu kieruję do **Pana prof. dr hab. Andrzeja Hendricha**,
Kierownika Katedry i Zakładu Biologii i Parazytologii Lekarskiej
oraz Dziekana Wydziału Lekarskiego Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu.
Szczerze dziękuję Panu Profesorowi za przychylność i szansę, którą otrzymałam.*

*Dziękuję również pozostałym **Pracownikom Katedry** za przyjazną atmosferę,
która przyczyniła się do pomyślnego ukończenia tego doktoratu.*

*Rozprawę doktorską dedykuję moim Najbliższym – **Mężowi Przemkowi i Córeczce Paulince**,
z podziękowaniem za to, że są i swoją obecnością przypominają mi o tym, co w życiu najważniejsze.*

SPIS TREŚCI

strona

1. NOTA INFORMACYJNA	5
2. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ	6
3. WPROWADZENIE	7
4. ZAŁOŻENIA i CELE PROJEKTU BADAWCZEGO	20
4.1. Założenia	20
4.2. Cel główny	20
4.3. Cele szczegółowe	20
5. MATERIAŁY i METODY	22
5.1. Materiały	22
5.1.1. Szczepy bakteryjne	22
5.1.2. Podłoża hodowlane	22
5.1.3. Odczynniki	22
5.2. Metody	23
5.2.1. Wyznaczenie wartości MIC (<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>) oraz MBC (<i>Minimal Bactericidal Concentration</i>) metodą mikrorozcieńczeń	23
5.2.2. Przygotowanie hodowli biofilmowych	23
5.2.3. Przeżywalność bakterii w hodowlach planktonowych	24
5.2.4. Przeżywalność bakterii w hodowlach biofilmowych	25
5.2.5. Oznaczenie ilości wytworzonej masy biofilmowej metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem fioletu krystalicznego (CV)	25
5.2.6. Oznaczenie aktywności metabolicznej bakterii w biofilmie metodą spektrofotometryczną z użyciem chlorku 2,3,5-trifenyloctetrazoliowego (TTC)	26
5.2.7. Ocena zmian morfologicznych bakterii przy użyciu mikroskopu świetlnego	27
5.2.8. Analiza statystyczna	27
6. PUBLIKACJE ZAWARTE W ROZPRAWIE DOKTORSKIEJ	29
6.1. Artykuł nr 1. <i>Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes – asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals.</i>	29
6.2. Artykuł nr 2. <i>Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient – asiatic acid?</i>	59
6.3. Artykuł nr 3. <i>Does secondary plant metabolite – ursolic acid exhibit antibacterial activity against uropathogenic Escherichia coli living in single- and multispecies biofilms?</i>	84
7. OCENA EFEKTYWNOŚCI DZIAŁANIA KWASU AZJATYKOWEGO (AA) i URSOLOWEGO (UA) w HODOWLACH BIOFILMOWYCH	105
7.1. Jednogatunkowych <i>E. coli</i> CFT073 (ATCC 700928), <i>E. cloacae</i> ATCC-BAA 2468 i <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25000	105

7.2. Dwugatunkowych <i>E. coli</i> CFT073 + <i>E. cloacae</i> ATCC-BAA 2468	111
7.3. Dwugatunkowych <i>E. coli</i> CFT073 + <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25000	119
7.4. Trzygatunkowych <i>E. coli</i> CFT073 + <i>E. cloacae</i> ATCC-BAA 2468 + <i>P. aeruginosa</i> ATCC 25000	128
8. ANALIZA PORÓWNAWCZA i PODSUMOWANIE WYNIKÓW	138
8.1. Porównanie wartości MIC oraz MBC wyznaczonych dla AA i UA	138
8.2. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalność <i>E. coli</i> w biofilmach	138
8.3. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalność <i>E. cloacae</i> w biofilmach	143
8.4. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalność <i>P. aeruginosa</i> w biofilmach	147
8.5. Porównanie wpływu AA i UA na ilość wytworzonej masy biofilmowej	151
8.6. Porównanie wpływu AA i UA na aktywność metaboliczną bakterii w biofilmach	156
9. WNIOSKI	162
10. WYNIKI DODATKOWYCH EKSPERYMENTÓW i PROPONOWANE KIERUNKI DALSZYCH BADAŃ	165
11. STRESZCZENIA	169
11.1. Streszczenie w języku polskim	169
11.2. Streszczenie w języku angielskim (<i>Summary</i>)	170
12. WYKAZ SKRÓTÓW; SPIS TABEL, WYKRESÓW, RYSUNKÓW i FOTOGRAFII	172
13. BIBLIOGRAFIA	178
14. NOTA BIOGRAFICZNA i DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTKI	185
15. ZAŁĄCZNIKI	194
15.1. Opinia Komisji Bioetycznej	194
15.2. Oświadczenia współautorów	196

1. NOTA INFORMACYJNA

Niniejszą rozprawę doktorską stanowi zbiór trzech powiązanych tematycznie artykułów naukowych, opisujących badania zrealizowane w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w anglojęzycznych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, a ich łączna wartość współczynnika wpływu (*Impact Factor*, IF) wynosi 18,653. Cykl składa się z dwóch artykułów oryginalnych i jednego przeglądowego, a Doktorantka jest pierwszym autorem wszystkich trzech publikacji. Oświadczenia współautorów, zawierające informacje o ich wkładzie merytorycznym, znajdują się w załączniku nr 15.2.

Na realizację projektu badawczego, będącego podstawą rozprawy doktorskiej, otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej UMW (nr protokołu: 182/2019).

Źródła finansowania:

Badania oryginalne przeprowadzono w ramach Grantu badawczego dla Młodych Naukowców UMW pt.: „Wpływ triterpenów pentacyklicznych na uropatogenne pałeczki Gram-ujemne” (nr projektu: STM.A060.20.060), który został sfinansowany ze środków Ministerstwa Zdrowia.

Artykuł przeglądowy opublikowano w ramach programu „Regionalna Inicjatywa Doskonałości” (numer projektu: 016/RID/2018/19), finansowanego ze środków Ministerstwa Edukacji i Nauki.

2. WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

Artykuł nr 1

“Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes - asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals.”

Zuzanna Sycz, Dorota Tichaczek-Goska, Dorota Wojnicz

Biomolecules **2022** Vol.12 no.1, art.98 [29 s.]

DOI: 10.3390/biom12010098

Impact Factor: **6,064**

Punkty KBN/MNiSW: **100,00**

Artykuł nr 2

“Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient - asiatic acid?”

Zuzanna Sycz, Dorota Tichaczek-Goska, Anna Jeziarska-Domaradzka, Dorota Wojnicz

Biomolecules **2021** Vol.11 no.12, art.1754 [24 s.]

DOI: 10.3390/biom11121754

Impact Factor: **6,064**

Punkty KBN/MNiSW: **100,00**

Artykuł nr 3

“Does secondary plant metabolite - ursolic acid exhibit antibacterial activity against uropathogenic *Escherichia coli* living in single- and multispecies biofilms?”

Zuzanna Sycz, Dorota Wojnicz, Dorota Tichaczek-Goska

Pharmaceutics **2022**, Vol.14 no. 8, art. 1691 [20 s.]

DOI: 10.3390/pharmaceutics14081691

Impact Factor: **6,525**

Punkty KBN/MNiSW: **100,00**

Łączna wartość IF: **18,653**

Suma punktów KBN/MNiSW: **300,00**

3. WPROWADZENIE

W ostatnich latach nastąpił wzrost zainteresowania naturalnymi źródłami pochodzenia substancji leczniczych. W dobie wzrostu oporności bakterii na antybiotyki intensywnie poszukuje się efektywnie działających, a jednocześnie bezpiecznych dla organizmu człowieka związków roślinnych, które mogłyby stać się skutecznym narzędziem zarówno w zapobieganiu jak i leczeniu chorób o etiologii bakteryjnej. Uważa się, że produkty roślinne stosowane w ramach fitoterapii mogą wspomagać standardową farmakoterapię. Szczególne zainteresowanie wiąże się z możliwością ich wykorzystania w zwalczaniu przewlekłych i/lub nawracających stanów zapalnych spowodowanych tworzeniem biofilmów bakteryjnych [1].

Wobec stale rosnącego zapotrzebowania na nowe i skuteczne antybiotyki, jedną z obiecujących gałęzi poszukiwań są triterpeny pentacykliczne (TP), wielopierścieniowe związki organiczne pochodzenia roślinnego, wykorzystywane w tradycyjnej fitoterapii ze względu na szerokie spektrum cennych właściwości leczniczych. Rośliny bogate w TP, do których należą m. in. wąkrota azjatycka (*Centella asiatica*) i mącznica lekarska (*Arctostaphylos uva-ursi*) są często stosowane profilaktycznie w postaci suplementów diety i nutraceutyków, a także jako środki wspomagające leczenie wielu chorób, zwłaszcza o podłożu zapalnym [2-4].

Należące do grupy TP kwas azjatykowy (AA, *ang. asiatic acid*) i kwas ursolowy (UA, *ang. ursolic acid*) wykazują różnorodne aktywności biologiczne, w tym działanie przeciwbakteryjne [5-14]. Warto jednak podkreślić, że eksperymenty opisane dotychczas w dostępnej literaturze koncentrowały się głównie na tzw. formach planktonowych – bakteriach żyjących w zawieszynie. Tylko w części prac określono działanie AA lub UA na zdolność bakterii do tworzenia biofilmów jednogatunkowych. Wyniki różnych badań dotyczących wpływu AA i UA na formy planktonowe i biofilmowe bakterii chorobotwórczych dla człowieka przedstawiono w pracy przeglądowej (artykuł nr 1), wchodzącej w skład niniejszej rozprawy doktorskiej [15]. Warto także zwrócić uwagę, że niewielu autorów sprawdziło wpływ tych kwasów na wielogatunkowe konsorcja biofilmowe [16-18].

Wykazano, że antybakteryjne działanie TP na planktonowe formy bakterii związane jest ze zmniejszeniem zdolności przylegania ich do powierzchni i tworzenia biofilmu. Najnowsze badania pokazują, że przeciwbakteryjną aktywność AA przypisuje się uszkodzeniu błony bakteryjnej oraz zwiększonemu wyciekowi jonów K^+ i nukleotydów z komórki bakterii [19]. Stwierdzono również, że UA może zmniejszać żywotność i integralność strukturalną biofilmów poprzez zajmowanie centrum katalitycznego glukozylotransferaz [20] lub tłumienie ekspresji genów *gft* [16], a w konsekwencji hamowanie tworzenia macierzy biofilmowej.

Tymczasem jak powszechnie wiadomo, w warunkach naturalnych zarówno biofilmy tworzone przez bakterie komensalne, jak i patogenne zazwyczaj nie stanowią jednogatunkowego konsorcjum lecz składają się z wielu gatunków mikroorganizmów. Z tego względu, przeprowadzone w ramach niniejszej

pracy doktorskiej badania dotyczyły przykładowych biofilmów wielogatunkowych, jakie mogą powstawać podczas zakażeń układu moczowego (ZUM, *ang. urinary tract infection*, UTI). Czynnikiem etiologicznym większości przewlekłych i/lub nawracających ZUM są uropatogenne szczepy bakteryjne, które dzięki zdolnościom adhezyjnym przylegają do uroepitelium, tworząc biofilm wielogatunkowy. Eradykacja takiego mieszanego gatunkowo biofilmu za pomocą standardowej farmakoterapii jest problematyczna i często kończy się niepowodzeniem. Trudności terapeutyczne występują przede wszystkim u pacjentów zacewnikowanych w przebiegu tzw. odcewnikowego ZUM (*ang. catheter-associated urinary tract infections*, CAUTI). Dominujący udział w etiologii tych zakażeń mają stanowiące przedmiot zainteresowania niniejszej pracy pałeczki Gram-ujemne, które posiadają szereg cech wirulencji warunkujących przyleganie bakterii do komórek uroepitelialnych, w szczególności są to uropatogenne szczepy *Escherichia coli* (*ang. uropathogenic strains of E. coli*, UPEC), którym towarzyszą inne gatunki m.in. *Enterobacter cloacae* i *Pseudomonas aeruginosa* [21-23].

E. coli (pałeczka okrężnicy) to bakteria Gram-ujemna, względnie beztlenowa, niesporująca, wytwarzająca polisacharydową otoczkę i struktury powierzchniowe (rzęski i fimbrie) oraz wykazująca zdolność do ruchu, który jest ważnym czynnikiem wirulencji warunkującym rozprzestrzenianie się bakterii w organizmie gospodarza [24-26]. *E. coli* wytwarza równocześnie kilka typów fimbrii, które ze względu na funkcje dzielą się na następujące grupy: fimbrie płciowe typu F (uczestniczące w koniugacyjnym przekazywaniu materiału genetycznego); fimbrie adhezyjne (m.in. typu 1, typu P, curli, typu S i F1C, typu 3) oraz rodzina fimbrialnych adhezyn Dr. Fimbrie adhezyjne i adhezyny fimbrialne są istotne w kolonizacji organizmu gospodarza. Ponadto fimbrie warunkują również ruch drgający (*ang. twitching motility*), czyli odmienny od ruchu rzęsek sposób poruszania się [27-30].

Oprócz adhezyn fimbrialnych, bakterie Gram-ujemne mogą wytwarzać również adhezyny niefimbrialne, których forma morfologiczna nie przypomina wypustek, lecz bezpostaciową otoczkę komórki. Są one składnikami błony zewnętrznej ściany komórkowej, wiążą się do swoistych receptorów obecnych na powierzchni komórki gospodarza, co warunkuje kolonizację i ochronę przed usunięciem bakterii. Do adhezyn niefimbrialnych *E. coli* należą adhezyny z rodziny Afa (np. AfaI-III), związane z amorfotycznymi strukturami błony zewnętrznej bakterii. Białka błony zewnętrznej *E. coli*, takie jak Upa (*ang. Uropathogenic E. coli autotransporter*), antygen Ag43, Iha (*ang. Iron-regulated homologue adhesion*) to adhezyny niefimbrialne należące do rodziny autotransporterów (*ang. autotransporter proteins*, AT), związanych z systemem sekrecji typu V (T5SS, *ang. type V secretion system*). Do adhezyn niefimbrialnych należą również intminy α i γ , lektyny oraz kwas tejchojowy [27, 28, 30].

Większość szczepów *E. coli* to drobnoustroje niechorobotwórcze (niepatogenne) wchodzące w skład flory fizjologicznej człowieka. Występują w dużych ilościach w warstwie śluzu jelita grubego, gdzie uczestniczą w trawieniu pokarmu i w produkcji witamin z grup B i K. Jednak przy osłabieniu odporności organizmu, szczepy te mogą osiedlać się również poza układem pokarmowym, kolonizując skórę, błonę śluzową jamy ustnej, układu oddechowego, okolice ujścia cewki moczowej, co stanowi ryzyko rozwoju

infekcji. Szczególnie groźne jest przedostanie się *E. coli* do otrzewnej, opon mózgowo-rdzeniowych czy krwioobiegu [27-29].

Niektóre szczepy *E. coli* w procesie ewolucji nabywają geny, dzięki którym stają się chorobotwórcze (patogenne, zjadliwe). Są to geny kodujące tzw. czynniki wirulencji bakterii odpowiedzialne za adhezję drobnoustrojów do nabłonka dróg moczowych gospodarza, jak również geny kodujące zdolność bakterii do tworzenia biofilmu, co sprzyja długotrwałej kolonizacji i utrzymywaniu się w drogach moczowych. Geny te mogą być zlokalizowane na ruchomych elementach genetycznych, tj. w obrębie chromosomalnych wysp patogenności (*ang. pathogenicity island, PAI*), na plazmidach, transpozonach lub bakteriofagach, co zapewnia możliwość ich horyzontalnego transferu na niechorobotwórcze szczepy *E. coli*, a nawet na pałeczki innych gatunków [27, 31-36].

Jednym z chorobotwórczych wiotypów *E. coli* są UPEC – uropatogenne, często hemolizujące szczepy, posiadające charakterystyczne czynniki wirulencji oraz mające zdolność namnażania wewnątrzkomórkowego. UPEC są najczęstszym czynnikiem etiologicznym ZUM niezależnie od wieku pacjenta i pochodzenia zakażenia (pozaszpitalne czy szpitalne); odpowiadają za ponad 90% niepowikłanych ZUM u młodych kobiet; 70% pozaszpitalnych, niepowikłanych ZUM; 66% powikłanych ZUM i ostrych odmiedniczkowych zapaleń nerek (OOZN, *pyelonephritis*). Ok. 80% UPEC powodujących ostre zapalenie pęcherza moczowego posiada fimbrie typu 1, które warunkują adhezję do nabłonka pęcherza. Natomiast w moczu chorych na niepowikłane OOZN stwierdza się obecność szczepów posiadających fimbrie typu P, które umożliwiają adhezję bakterii do komórek nerki. Przyczyną ZUM mogą być także wiotypy DAEC (*ang. diffusely adhering E. coli*) – szczepy *E. coli* o rozsianym typie adhezji, zdolne do dyfuzyjnej adhezji oraz NTEC (*ang. necrotoxicogenic E. coli*) – martwicowe szczepy *E. coli* [27, 32-37].

E. cloacae to bakteria Gram-ujemna, tak jak *E. coli* należąca do rodziny *Enterobacteriaceae*. Większość szczepów *E. cloacae* jest niechorobotwórcza i wchodzi w skład fizjologicznej flory jelita grubego, występuje również na skórze i w ustnej części gardła. Jednak przy osłabieniu odporności organizmu gospodarza, *E. cloacae* może powodować zakażenia oportunistyczne, do których oprócz ZUM należą zakażenia przyranne, wtórne zapalenia płuc, posocznica, a także zakażenia szpitalne (m.in. u pacjentów wentylowanych mechanicznie). *E. cloacae* wyróżnia się na tle rodziny *Enterobacteriaceae* naturalną, wysoką opornością na antybiotyki z grupy β -laktamów, produkuje bowiem chromosomalne β -laktamazy (cefalosporynazy) AmpC, które warunkują oporność na ampicylinę, amoksycylinę i cefalosporyny I generacji. *E. cloacae* odznacza się również zdolnością do szybkiego nabywania i rozprzestrzeniania plazmidów kodujących β -laktamazy o tzw. rozszerzonym spektrum substratowym (ES β L, *ang. extended spectrum β -lactamase*), które hydrolizują większość antybiotyków zawierających pierścień β -laktamowy, tj. penicyliny, cefalosporyny i monobaktamy, z wyjątkiem cefamycyn i karbapenemów. Szczepy *E. cloacae* ES β L(+) są trzecim (po *E. coli* i *K. pneumoniae*) głównym

lekoopornym patogenem z rodziny *Enterobacteriaceae*, będącym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych [38-41].

P. aeruginosa (pałeczka ropy błękitnej) to bakteria Gram-ujemna, należąca do rodziny *Pseudomonadaceae*. W odróżnieniu od rodziny *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* są bakteriami pierwotnie tlenowymi, niefermentującymi glukozy ani laktozy, nie wytwarzającymi indolu oraz oksydazo-dodatnimi (wytwarzają oksydazę cytochromową). *P. aeruginosa* posiada jedną umieszczoną biegunowo rzęskę, zapewniającą zdolność do ruchu oraz produkuje barwniki (piocyjaninę i piowerdynę), będące również czynnikami wirulencji [27, 42-46].

Pałeczki *P. aeruginosa* są szeroko rozpowszechnione w środowisku (w glebie i wodzie oraz na powierzchni roślin i rzadziej na skórze zwierząt), zasiedlają gnijącą materię organiczną, zlewy i toalety. Co bardzo istotne, nie wchodzi w skład mikrobiomu zdrowych ludzi, jednak jako bakterie oportunistyczne w krótkim czasie (zazwyczaj poprzez jamę nosową) mogą kolonizować organizmy osób z prawidłową, a także z obniżoną odpornością. U osób z prawidłową odpornością mogą wywołać infekcje w obrębie ucha środkowego i zewnętrznego (tzw. ucho pływaka), *P. aeruginosa* jest także jednym z najczęstszych patogenów wywołujących bakteryjne zapalenie rogówki u osób noszących soczewki kontaktowe. U osób z obniżoną odpornością powodują zakażenia układu oddechowego, ran oparzeniowych, kości i stawów, wsierdzia, opon mózgowo-rdzeniowych, ropień mózgu i sepsę. Zakażenie *P. aeruginosa* stanowi szczególnie istotny problem u osób chorych na mukowiscydozę, bowiem stwierdza się je aż u 80-90% dorosłych pacjentów. *P. aeruginosa* jest również czynnikiem etiologicznym ZUM u osób dorosłych oraz u dzieci, u których czynnikiem ryzyka jest stosowanie antybiotyków w profilaktyce lub leczeniu w ciągu ostatnich 2 miesięcy. Pałeczka *P. aeruginosa* odpowiada za ok. 10% zakażeń szpitalnych, co plasuje ją na 4 miejscu spośród najczęściej izolowanych patogenów klinicznych. Wśród osób hospitalizowanych problem ten dotyczy zwłaszcza pacjentów zaintubowanych lub zacewnikowanych [47-52].

Ze względu na wysoką nieprzepuszczalność ściany i błony komórkowej oraz wytwarzanie β -laktamaz, *P. aeruginosa* posiada naturalną oporność na antybiotyki β -laktamowe. Ponadto ok. 20% szczepów *P. aeruginosa* produkuje enzym PSE-1 (ang. *Pseudomonas specific enzyme*), zwany również karbenicylazą II (CARB-2), który hydrolizuje karbenicylinę, oksacylinę, piperacylinę i tykarcylinę. Dodatkowo, szczepy szpitalne dzięki przekazywaniu plazmidów, nabywają oporność na cefalosporyny wyższych generacji i karbapenemy [42, 48, 49, 53].

Warto zauważyć, że *E. cloacae* i *P. aeruginosa* należą do grupy bakterii odznaczających się wyjątkową lekoopornością (tzw. patogenów alarmowych), zdolnych do „ucieczki” przed działaniem większości dostępnych antybiotyków. Zostały one określone przez Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych (ang. *Infectious Diseases Society of America*, IDSA) akronimem ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterobacter* spp. [54].

Oprócz wspomnianych UPEC, również *E. cloacae* i *P. aeruginosa* wyposażone są w mechanizmy adaptacyjne wspierające uropatogenezę, tj. umożliwiające bakteriom pokonanie barier obronnych organizmu ludzkiego, przeżycie w świetle układu moczowego oraz namnożenie się w nim. Zjadliwość uropatogennych pałeczek Gram-ujemnych warunkują czynniki wirulencji, które mogą one być związane z powierzchnią komórki bakteryjnej, jak immunogenna otoczka, lipopolisacharyd (LPS), fimbrie (typu 1, typu P, curli, typu S, typu F1C, typu 3, typu F17, typu F9, AUF, typu IV), adhezyny fimbrialne z rodziny Dr oraz niefimbrialne z rodzin Afa i AT; białka błonowe; bądź mogą być z niej z wydzielane, jak: toksyny (α -hemolizyna, CNF-1, SPATE, SLT), system pobierania żelaza (siderofory), białka należące do systemów sekrecji typów I-VI (*ang. type I-VI secretion system*, T1-6SS), pompy wielolekowe oraz enzymy rozkładające antybiotyki. Oprócz wymienionych wyżej swoistych czynników wirulencji, również czynniki niespecyficzne, takie jak zdolność do poruszania się, właściwości hydrofobowe i ujemny ładunek powierzchni komórek bakteryjnych, ułatwiają adhezję do błon śluzowych gospodarza oraz powierzchni abiotycznych (np. cewników) [23, 27, 28, 30, 32, 34, 45, 55].

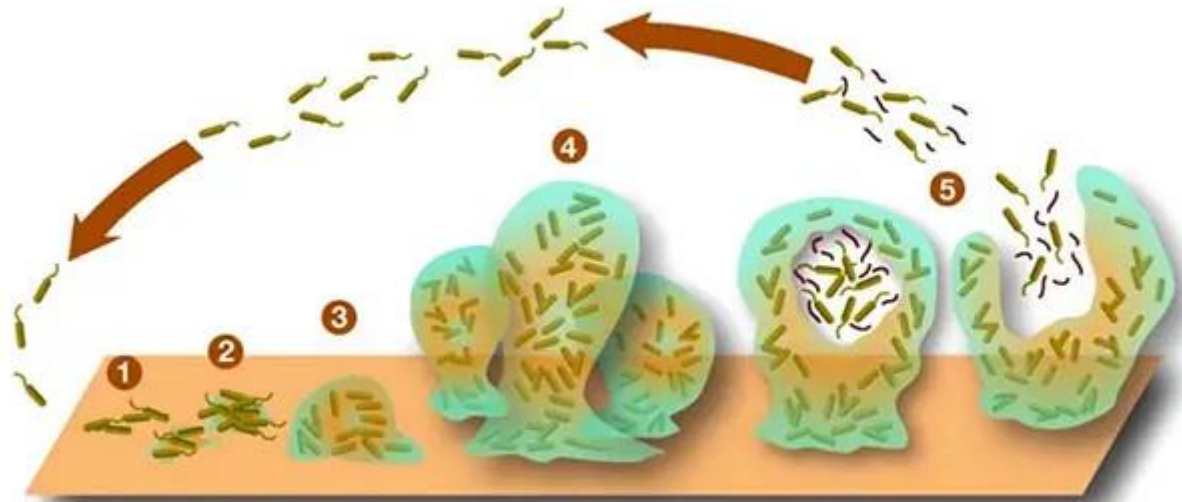
Za kontrolę ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji odpowiada zjawisko *quorum sensing* (QS). Jest to mechanizm komunikacji między sąsiadującymi bakteriami, który umożliwia także kontrolowanie powstawania biofilmu, wytwarzania metabolitów wtórnych, funkcjonowania systemów wydzielniczych i mechanizmów adaptacji do sytuacji stresowych, m. in. konkurencji lub kooperacji międzybakteryjnej. *P. aeruginosa* posiada co najmniej trzy połączone ze sobą systemy QS: Las, Rhl i Pqs. Częsteczkami sygnałowymi tj. autoinduktorami (AI) w tych systemach są odpowiednio: lakton N-(3-okso-dodekanoilo)-L-homoseryny (3-okso-C12-HSL), lakton N-butanoilo-L-homoseryny (C4-HSL) i 2-heptylo-3-hydroksy-4-chinolon (PQS). Systemy te kontrolują ekspresję genów związanych z wirulencją i biofilmem, regulując w ten sposób wytwarzanie czynników wirulencji takich jak: egzoenzymy, egzotoksyna A, LPS, elastaza, fenazyny (m.in. piocyjanina), lektyny, ramnolipidy (RHL), kwasy tłuszczowe (kwas cis-2-dekanowy i kwas cis-11-metylo-2-dodekanowy), siderofory, antybiotykooporność oraz zewnątrzkomórkowe polisacharydy (alginian, Psl i Pel) zaangażowane w tworzenie biofilmu [42-45, 49-51, 56-62].

Dzięki czynnikom wirulencji bakterie uropatogenne mają zdolność do kolonizacji dróg moczowych gospodarza, ponieważ umożliwiają im one przyłączenie się do specyficznych receptorów obecnych na uroepitelium, a następnie uwolnienie się przed zakończeniem procesu jego złuszczenia. Pierwszym krokiem w patogenezie ZUM jest adhezja tj. ścisłe i nieodwracalne przyleganie bakterii do tkanki nabłonkowej gospodarza. Jest to proces dynamiczny, ponieważ zapoczątkowuje uruchamianie przezbłonowych szlaków sygnalizacyjnych; skutkuje wytwarzaniem wielu cytokin, mediatorów stanu zapalnego oraz czynników stymulujących proces dojrzewania komórek dendrytycznych, prowadzący do przekształcenia ich w aktywne komórki prezentujące antygen, w następstwie czego wrodzony układ odpornościowy zostaje pobudzony do obrony przeciwbakteryjnej. Po dokonaniu adhezji, bakterie ściśle związane z komórkami gospodarza uwalniają LPS, co wywołuje odpowiedź zapalną i przyciąga

neutrofile w tę okolicę. Fagocytozie bakterii przez neutrofile zapobiega warstwa ochronna zbudowana z otoczki polisacharydowej i mikrootoczki z kwasu sjałowego, co przedłuża odpowiedź zapalną. Po adhezji niektóre patogeny żyją zewnątrzkomórkowo, podczas gdy inne penetrują do wnętrza niefagocytyjących komórek (nabłonkowych, fibroblastów, komórek śródbłonka). Proces ten doprowadza do: rozprzestrzeniania się infekcji w komórkach nabłonkowych, miejscowej infekcji warstwy podśluzówkowej, ogólnoustrojowej infekcji wywołanej rozprzestrzenianiem się bakterii chorobotwórczych w organizmie gospodarza. Długotrwałej kolonizacji i utrzymywaniu się w drogach moczowych sprzyja zdolność bakterii do tworzenia biofilmu, składającego się z mikrokolonii otoczonych egzopolisacharydami lub alginianem [27, 28, 30, 32, 34, 45, 50, 51, 61].

Zdolność bakterii do adhezji do powierzchni oraz tworzenia przylegających do niej kolonii po raz pierwszy opisał Antonie van Leeuwenhoek w 1650 r., ale termin biofilm został zastosowany dopiero w 1977 r., kiedy to William Costerton zauważył, że zdecydowana większość bakterii w alpejskim jeziorze żyła w formie osiadłej przylegając do skał, a nie jako swobodnie unoszące się formy planktonowe [63-65]. Biofilm bakteryjny został zatem zdefiniowany jako zespół wzajemnie komunikujących się mikroorganizmów osiadłych na określonym podłożu, przylegających do siebie i otoczonych warstwą substancji organicznych i nieorganicznych, produkowanych przez te drobnoustroje. Biofilm składa się z agregatów komórek bakteryjnych zatopionych w heterogennej macierzy pozakomórkowej (*ang. extracellular polymeric substance*, EPS), zwanej również macierzą zewnątrzkomórkową (*ang. extracellular matrix*, ECM), w skład której wchodzi m.in.: polisacharydy, białka, lipidy, zewnątrzkomórkowe DNA i surfaktanty. Udział poszczególnych składników macierzy różni się w zależności od składu gatunkowego biofilmu, istnieją także składniki specyficzne dla danego szczepu, np. kwas alginowy (β -1,4-D-mannuronowy) produkowany przez *P. aeruginosa*. Macierz stanowi 75-90% biofilmu, pozostała część biomasy to agregaty komórek bakteryjnych [30, 51, 60, 61, 66-70].

Jak przedstawiono na Rysunku nr 1, powstawanie biofilmu jest procesem wieloetapowym: 1) początkowe przywiązanie (adhezja odwracalna); 2) adhezja nieodwracalna, agregacja, produkcja i akumulacja EPS; 3) dojrzewanie I (tworzenie mikrokolonii); 4) dojrzewanie II (tworzenie macierzy); 5) rozproszenie/dyspersja/migracja/uwalnianie się. Biofilm jest strukturą dynamiczną, rozprzestrzeniającą się, dlatego też mikroorganizmy w postaci agregatów bądź pojedynczych komórek mogą odrywać się od szczytowej warstwy biofilmu i przemieszczać w celu znalezienia bardziej dogodnego miejsca do rozwoju. W ten sposób następuje rozproszenie struktury biofilmu po kolonizowanej powierzchni, co powoduje ekspansję zakażenia. Rozprzestrzenianie się biofilmu może odbywać się poprzez: toczenie, falowanie, rozpraszanie, odrywanie, płynięcie [30, 46, 56, 62, 65-68, 70-77].



Rysunek nr 1. Etapy tworzenia biofilmu (opis w tekście) [71].

Biofilmy mogą zasiedlać powierzchnie biotyczne (np. tkanki organizmu gospodarza), jak i abiotyczne (np. biomateriały, takie jak: cewniki urologiczne, naczyniowe i do dializy otrzewnowej; implanty i endoprotezy; sztuczne zastawki i rozruszniki serca; elementy sprzętu medycznego do sztucznej wentylacji i pomp infuzyjnych, a nawet soczewki kontaktowe). Biofilm jako struktura wielowarstwowa, złożony jest z wielu populacji mikroorganizmów, znajdujących się na różnych etapach rozwoju, a ponadto może być utworzony przez komórki jednego lub wielu (nawet kilkunastu) gatunków drobnoustrojów. Jak wiadomo, zarówno biofilmy naturalnie występujące w organizmie człowieka jak i biofilmy utworzone przez patogenne drobnoustroje zazwyczaj nie tworzą monokulturowego konsorcjum, lecz składają się z kilku gatunków mikroorganizmów [23, 66, 72, 75, 78, 79].

Głównym powodem, dla którego bakterie tworzą biofilm, jest strategia obronna przed niekorzystnymi warunkami zewnętrznymi czy brakiem niezbędnych substancji odżywczych. Kolejną korzyścią płynącą z życia w skupisku jest możliwość wymiany materiału genetycznego i przekazywania genów kodujących oporność na antybiotyki albo sygnały stymulujące do rozmnażania czy tworzenia kolonii. Komórki bakterii, żyjące w postaci biofilmu, wykazują odmienne cechy w porównaniu do form planktonowych, wolnożyjących w zawieszynie. Komórki osiadłe na podłożu podlegają zmianom fenotypowym, które warunkują ich zjadliwość oraz obniżają wrażliwość na antybiotyki. Charakteryzują się również zmienionym metabolizmem w stosunku do form planktonowych oraz wysoką tolerancją na niesprzyjające warunki środowiskowe (zmiany temperatury, promieniowanie UV, niska wilgotność, stres osmotyczny). Stają się również niedostępne dla układu immunologicznego gospodarza (makrofagi, przeciwciała) [23, 31, 66, 72, 77, 80].

Ze względu na odmienną dostępność tlenu w poszczególnych warstwach biofilmu, można wyróżnić komórki charakteryzujące się wzrostem tlenowym lub beztlenowym, a także komórki o znacznie spowolnionym metabolizmie, mające tzw. fenotyp „uśpiony” (*ang. dormant phenotype*) oraz komórki

martwe, z których w wyniku lizy uwalniane jest DNA, wzmacniające macierz zewnątrzkomórkową. W głębszych warstwach biofilmu z utrudnionym dostępem do tlenu, dochodzi do uaktywnienia szlaków beztlenowych (fermentacji, denitryfikacji, desulfurylacji), podczas których powstaje mniej energii, przez co obniżone są takie parametry jak: szybkość podziałów komórek bakteryjnych, aktywność metaboliczna i produkcja toksyn. Komórki o spowolnionym metabolizmie mają zwiększoną tolerancję na te spośród związków przeciwbakteryjnych, których mechanizm działania polega na hamowaniu metabolizmu. Wysoka oporność biofilmu na antybiotyki wynika z obecności w najgłębszych warstwach biofilmu niewielkiej populacji (ok. 1%) komórek przetrwałych (*ang. persisters cells*). Są to tzw. komórki superodporne, „uparte”, niezdolne do wzrostu w sytuacji ograniczonej podaży substancji odżywczych, charakteryzujące się niską aktywnością metaboliczną, co osłabia efekt działania środków przeciwdrobnoustrojowych. Dzięki wysokiej oporności na antybiotyki komórki te mogą przeżyć w obecności bójących stężeń antybiotyków i ponownie odtworzyć biofilm po zakończeniu cyklu terapeutycznego. Odbudowane w ten sposób biofilmy cechują się wysoką opornością już na bardzo wczesnym etapie swego rozwoju [59, 69, 73, 80-82].

Zewnętrzna warstwa EPS stanowi mechaniczną barierę, utrudniającą przenikanie cząsteczek antybiotyków do głębszych warstw biofilmu. Macierz posiada ogólny ładunek ujemny, co umożliwia jej wiązanie cząsteczek leku i hamowanie ich wnikania w głąb biofilmu. Wchodzące w jej skład egzopolisacharydy posiadają wolne grupy funkcyjne, m.in. -OH, -COOH, C=O, -O-, C-(O, N) i OH-(C-O-C), które mogą wychwytywać i wiązać cząsteczki antybiotyku zanim dotrze on do bakterii. Ponadto komórki otoczone EPS również mają utrudnioną prezentację miejsca docelowego wiązania cząsteczek leku. Obecność macierzy powoduje, że drobnoustroje tworzące biofilm stają się również niedostępne dla układu immunologicznego gospodarza. Do komórek położonych w najgłębszych warstwach dociera zbyt niskie stężenie antybiotyku, które nie działa bójąco, jednak prowadzi do selekcji komórek opornych. Namnażają się one i rozprzestrzeniają w obrębie biofilmu oraz przekazują geny oporności bakteriom wrażliwym, z którymi sąsiadują. Ponadto, zbyt niskie stężenia antybiotyków mogą stymulować produkcję polisacharydu, będącego głównym składnikiem śluzu, który fizycznie unieruchamia cząsteczki środków przeciwbakteryjnych. Dodatkowo, kumulacja dużej liczby komórek bakterii w stosunkowo małej objętości biofilmu, skutkuje wysokim stężeniem produkowanych przez nie enzymów rozkładających antybiotyki [30, 60, 75, 76, 80, 83-86].

Reasumując, struktura biofilmu oraz niska aktywność metaboliczna żyjących w nim bakterii powodują, że minimalne stężenia: hamujące i bakteriobójcze (*ang. Minimal Inhibitory Concentration – MIC; Minimal Bactericidal Concentration – MBC*), czyli stężenia leków niezbędne do zahamowania wzrostu/zabicia komórek bakteryjnych w populacji biofilmu są wielokrotnie (nawet 100-1000 razy) wyższe od bójących stężeń tych samych leków w stosunku do form planktonowych. Tak wysokie dawki antybiotyków nie mogą być stosowane w farmakoterapii zakażeń człowieka ze względu na ich toksyczność [80, 82, 86-88].

Biofilmy wielogatunkowe są szczególnie trudne do zwalczania, ponieważ oprócz zmiany ekspresji genów występuje również horyzontalna wymiana materiału genetycznego (np. genów oporności na poszczególne antybiotyki) między bakteriami żyjącymi w biofilmie, jak również szereg innych oddziaływań międzykomórkowych, zarówno synergistycznych jak i antagonistycznych [31, 59, 70].

Z powodów omówionych wyżej, patogeny rozwijające się w postaci biofilmu stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Szczególnie groźne są biofilmy wielogatunkowe, będące czynnikami etiologicznymi zakażeń przewlekłych, nawracających i szpitalnych. Przewlekły i/lub nawracający charakter zakażeń związanych z powstawaniem biofilmów wynika z tego, że bakterie tworzące biofilm są odporne zarówno na działanie antybiotyków, jak i na mechanizmy odpornościowe gospodarza, przez co po podaniu antybiotyku giną tylko te komórki, które oderwały się od powierzchni biofilmu i zaczęły rozprzestrzeniać po organizmie, natomiast przeżywają komórki nadal zlokalizowane w biomacie biofilmu. Z tego powodu, po krótkotrwałym zaniku objawów, następuje szybki nawrót choroby. Nawet 60-80% przewlekłych i/lub nawracających zakażeń jest związanych z powstawaniem biofilmów (*ang. Biofilm Related Infections, BRI*), są to m.in. zapalenie płuc, wśierdzia, ZUM, szpiku kostnego oraz ran oparzeniowych. Problemy z leczeniem przewlekłych i/lub nawracających infekcji powodowanych przez bakterie żyjące w biofilmie, wynikają nie tylko z trudności penetracji leków przez ich strukturę, ale również mogą być spowodowane zmianą ekspresji genów kodujących czynniki wirulencji, genów mających istotne znaczenie w procesie tworzenia i rozwoju struktury biofilmu oraz genów kodujących transportery leków oraz białka regulatorowe [59, 80, 82, 86, 89].

Biofilm bakteryjny stanowi często przyczynę niepowodzeń w leczeniu przewlekłych i/lub nawracających ZUM, w tym CAUTI. ZUM należą do najczęściej występujących chorób infekcyjnych, zaraz po zakażeniach dróg oddechowych. Wg danych Światowej Organizacja Zdrowia (*ang. World Health Organization, WHO*), stanowią 40-50% wszystkich zakażeń szpitalnych (*ang. hospital-acquired urinary tract infections, HAUTI*) i 10-20% pozaszpitalnych (ambulatoryjnych). Spośród HAUTI aż 75-80% stanowią CAUTI. Częstość występowania pozaszpitalnych ZUM zależy od płci i wieku pacjenta. Szacuje się, że ok. 50% kobiet, 12% mężczyzn i 10% dzieci doświadcza w życiu epizodu ZUM. Ze względu na groźne następstwa, takie jak posocznica czy nieodwracalne zmiany morfologiczne i czynnościowe w obrębie miąższu nerek, prowadzące do ich niewydolności i dalej do nadciśnienia tętniczego, diagnostyka i leczenie ZUM stanowią istotny problem kliniczny [22, 90-94].

ZUM dotyczą głównie płci żeńskiej, ze względu na budowę anatomiczną cewki moczowej (jest ona krótsza niż u płci męskiej) oraz jej położenie blisko odbytu i pochwy co powoduje, że okolice jej ujścia są stale zasiedlone przez bakterie. Ponadto krótka cewka moczowa sprzyja nawrotom zakażeń i ułatwia bakteriom kolonizację wyższych odcinków układu moczowego. Dlatego też niezależnie od wieku, ZUM występują przede wszystkim u płci żeńskiej, jedynym wyjątkiem jest okres noworodkowy, kiedy to chłopcy chorują 5-krotnie częściej niż dziewczynki, co zwykle związane jest z wadami wrodzonymi układu moczowo-płciowego i mniejszą odpornością noworodków płci męskiej. Natomiast od 2-3

miesiąca życia tendencja ta ulega odwróceniu i ZUM występuje nawet 50 razy częściej u płci żeńskiej. Ok. 30% kobiet przynajmniej kilka razy w życiu przechodzi ZUM, a 25-50% cierpi na wielokrotne nawroty tej choroby. Po 60 roku życia częstość zachorowań u mężczyzn zwiększa się (co jest związane z zaburzeniami w odpływie moczu na skutek powiększenia gruczołu krokowego), jednak mimo tego starsze kobiety chorują 2-krotnie częściej niż starsi mężczyźni [22, 90-95].

Stanowiące przedmiot zainteresowania niniejszej pracy pałeczki Gram-ujemne, częściej niż inne gatunki bakterii, są odpowiedzialne za wszelkie rodzaje ZUM: pozaszpitalne, HAUTI oraz CAUTI. W ok. 95% przypadków ZUM są skutkiem infekcji spowodowanej przez pojedynczy szczep bakteryjny, natomiast ok. 5% to zakażenia mieszane [93, 96].

Najczęstszą etiologię ZUM stanowią Gram-ujemne pałeczki jelitowe z rodziny *Enterobacteriaceae*, wśród których dominuje *E. coli*, zwłaszcza szczepy uropatogenne (UPEC). W niepowikłanych ZUM *E. coli* odpowiada za 75-95% przypadków, podczas gdy w powikłanych jej udział spada do 21-66%, a znacząco rośnie wówczas odsetek innych pałeczek Gram-ujemnych z rodziny *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella* spp. (2-17%), *Enterobacter* spp. (2-10%), *P. mirabilis* (1-12%), *Citrobacter* spp. (ok. 5%), *Providencia* spp. oraz pałeczek niefermentujących: *P. aeruginosa* (2-19%) i *Acinetobacter* spp. [90, 91, 93, 94, 95, 97, 98].

Spośród bakterii Gram-dodatnich za niepowikłane ZUM odpowiadają przede wszystkim *Enterococcus* spp. (1-5%) i *Streptococcus agalactiae* tzw. GBS (1-5%), a u kobiet w wieku rozrodczym *Staphylococcus saprophyticus* (10-20%), natomiast w etiologii powikłanych ZUM najczęściej izoluje się *Enterococcus* spp. (1-23%), *Staphylococcus* spp. inne niż *S. saprophyticus*, *Streptococcus* spp. i *Corynebacterium urealyticum* [90, 91, 93, 94, 95, 97, 98].

Wśród drobnoustrojów odpowiedzialnych za szpitalne ZUM również dominuje *E. coli* (30-50%), jednak duży udział mają także wielolekooporne *Enterobacter* spp., *Acinetobacter* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Serratia marcescens*, *Providencia* spp., a także *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., grzyby: *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans* i *Aspergillus* spp., pierwotniaki i adenowirusy [90, 91, 93, 94, 97-99].

U chorych z cewnikiem wprowadzonym na stałe do pęcherza moczowego dominującą przyczyną CAUTI jest *E. coli* (24-50%), natomiast *E. cloacae* i *P. aeruginosa* są czynnikami etiologicznymi 14-35% CAUTI. Wraz z przedłużającym się czasem utrzymywania cewnika w drogach moczowych zwiększa się częstość zakażeń innymi drobnoustrojami: *Candida* spp. (12-17%), *Proteus* spp. (4-20%), *Enterococcus* spp. (ok. 14%), *Klebsiella* spp. (ok. 10%), *Staphylococcus* spp. (ok. 4%), *Morganella morganii*, *S. marcescens*, *Edwardsiella* spp., *Moraxella* spp., *Yersinia* spp., *Burkholderia* spp., *Corynebacterium* spp., *Achromobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Stenotrophomonas* spp. Dlatego też ZUM u pacjentów długotrwale cewnikowanych mają najczęściej etiologię mieszaną [79, 90, 91, 93, 94, 97-103].

Przebieg ZUM zależy od umiejscowienia infekcji w układzie moczowym, rodzaju i stopnia nasilenia objawów klinicznych, wieku i płci pacjenta oraz chorób towarzyszących. Tradycyjnie wyróżnia się 3 rodzaje objawowego ZUM: ograniczające się do dolnego odcinka dróg moczowych (zapalenie cewki i pęcherza moczowego tj. *cystitis*), obejmujące górne drogi moczowe (OOZN tj. *pyelonephritis*) oraz najcięższą postać tj. posocnicę moczową (*urosepsis*). Szczepy wywołujące *pyelonephritis* mają większą różnorodność genów kodujących czynniki wirulencji niż szczepy wywołujące *cystitis* [91, 93, 94, 97].

Ze względu na przebieg kliniczny i wysokość znamiennej bakteriurii, klasyfikacja ZUM wg Europejskiego Towarzystwa Urologicznego (ang. *European Association of Urology*, EAU) wyróżnia: 1) niepowikłane zapalenie pęcherza moczowego; 2) nawracające niepowikłane zapalenie pęcherza moczowego; 3) niepowikłane ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek (OOZN) znane też jako zakażenie cewkowo-śródmiaższowe nerek (najczęściej jednostronne); 4) ostre niepowikłane zapalenie pęcherza moczowego; 5) powikłane (przewlekłe, długotrwałe) ZUM; 6) bakteriomocz bezobjawowy (ang. *asymptomatic bacteremic UTI*, ABUTI). Należy wyróżnić także HAUTI i CAUTI [92, 93, 95, 97, 98, 103, 104].

Nawracające zapalenie pęcherza moczowego oznacza 3 i więcej nawrotów w ciągu roku u kobiet bez dodatkowych czynników ryzyka (w tym ciąży, anatomicznych lub czynnościowych nieprawidłowości dróg moczowych). U 30-44% kobiet po pierwszym incydencie ZUM nawrót występuje zwykle w ciągu 3 miesięcy, a u 48% w ciągu 12 miesięcy. Szacuje się, że 77% nawrotów wywoływanych jest przez ten sam szczep *E. coli*, w 23% przypadków dochodzi do reinfekcji nowym szczepem bakterii. Ponowne zakażenie (reinfekcja) to ZUM spowodowane innym drobnoustrojem uropatogennym niż wyizolowany z moczu podczas poprzedniego zakażenia (niezależnie od okresu, jaki upłynął) lub ZUM, którego objawy wystąpiły po upływie 14 dni od zakończenia leczenia poprzedniego zakażenia (nawet jeżeli czynnikiem etiologicznym jest ten sam drobnoustrój). U 15-50% pacjentów z ostrym zapaleniem pęcherza rozwija się OOZN, a u 12% z tych pacjentów dochodzi później do bakteriemii. Z kolei u ok. 30% pacjentów z OOZN rozwija się bakteremia, która może doprowadzić do posocnicy, a nawet do śmierci. ZUM powikłane (przewlekłe) to ZUM u osoby z anatomicznym lub czynnościowym utrudnieniem odpływu moczu, bądź z upośledzeniem ogólnoustrojowych lub miejscowych mechanizmów obronnych, a także ZUM wywołane nietypowymi lub lekoopornymi drobnoustrojami, ZUM w czasie ciąży i porodu, HAUTI bądź CAUTI, ZUM u pacjenta po przeszczepie lub z cukrzycą. ABUTI to znamieny bakteriomocz u osoby bez jakichkolwiek objawów klinicznych ZUM, występuje u ok.: 5% młodych kobiet, 16% kobiet i 19% mężczyzn powyżej 70 roku życia, 30% pacjentów hemodializowanych, 50% kobiet i 40% mężczyzn przebywających w domach opieki oraz u wszystkich pacjentów zacewnikowanych ponad 2 tygodnie [92, 93, 97, 98, 103, 104].

Mogą występować burzliwe objawy ZUM, ale przebieg choroby może być też bezobjawowy (szczególnie dotyczy to postaci nawrotowej). Objawy kliniczne ZUM mogą być swoiste: dysuria

(trudności w oddawaniu moczu), częstomocz, nagłe i/lub bolesne parcie na pęcherz, ból podczas mikcji; bolesność okolicy nadłonowej, ból i tkliwość w okolicy lędźwiowej, dodatni objaw Goldflama (bolesność okolicy lędźwiowej na wstrząsanie), nykturia (oddawanie moczu częściej niż 2 razy w trakcie odpoczynku nocnego), mimowolne oddawanie moczu (głównie u starszych kobiet z wypadaniem macicy); lub nieswoiste (tj. ogólne, zlokalizowane poza układem moczowym): gorączka, dreszcze, bóle brzucha, nudności i wymioty, biegunka lub zaparcia, a nawet bóle głowy. U dzieci i osób starszych mogą pojawić się dodatkowe objawy nieswoiste: niepokój, utrata łaknienia, żółtaczka patologiczna, zmiany skórne krocza [91, 93, 94, 97].

Wystąpienie CAUTI związane jest z cewnikiem moczowym, wprowadzanym do pęcherza przez cewkę moczową w celu odprowadzenia moczu. Jednorazowe cewnikowanie niesie za sobą 1-5% ryzyko wystąpienia ZUM. Jednak ok. 12-25% hospitalizowanych dorosłych pacjentów będzie miało założony na stałe cewnik moczowy w pewnym momencie hospitalizacji. Częstość występowania ZUM w tej grupie chorych jest większa i wynosi już 3-10% na każdy dzień utrzymywania cewnika w drogach moczowych. Im dłuższy jest czas cewnikowania, tym pewniejsze zakażenie, a najważniejszym czynnikiem ryzyka rozwoju CAUTI jest długotrwałe (7-28-dniowe) stosowanie cewnika moczowego. Odsetek CAUTI zmniejszają przede wszystkim krótkie lub przerywane cewnikowanie i stosowanie zewnętrznych systemów cewnikowania. Najczęściej stosowany ciągły system cewnikowania cewnikami Foley'a z zastawką refluksową niesie ze sobą 80-100% ryzyko zakażenia. Diagnostyka CAUTI wywołanych przez biofilm utworzony na powierzchni cewnika urologicznego jest skomplikowana, a leczenie często nieskuteczne. CAUTI są szczególnie niebezpieczne z uwagi na możliwość wystąpienia szeregu powikłań: zapalenie gruczołu krokowego, zapalenie jąder i najądrzy, OOZN, zapalenie wsierdzia, zapalenie kości i szpiku, septyczne zapalenie stawów, zapalenie wnętrza gałki ocznej, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, sepsa [79, 91-94, 98-103].

Do rozpoznania ZUM konieczne jest stwierdzenie obecności bakterii w moczu w mianie przekraczającym umowną granicę (jest to tzw. znamienna bakteriuria). O zakażeniu świadczy bowiem pojawienie się i namnożenie znamiennej liczby drobnoustrojów chorobotwórczych w dowolnym odcinku układu moczowego, poza okolicą zewnętrznego ujścia cewki moczowej. Ustalenie jednej wartości CFU/ml, która u wszystkich grup pacjentów oznaczałaby znamiennej bakteriurię, nie jest jednak możliwe. Zgodnie z wytycznymi EAU, krytyczna wartość uropatogenów w próbce pobranej ze środkowego strumienia moczu powinna przekraczać 10^4 CFU/ml dla mężczyzn, a u kobiet zmienia się od 10^3 CFU/ml w ostrym niepowikłanym ZUM do 10^5 CFU/ml w powikłanym ZUM. Zatem m.in. od wysokości znamiennej bakteriurii zależy rozpoznanie danego rodzaju ZUM [91, 93, 94, 97, 102, 103].

Z powodu wszystkich aspektów omówionych w niniejszym wprowadzeniu, poszukiwane są związki pochodzenia roślinnego, które mogłyby stanowić strategię alternatywną wobec antybiotykoterapii, wspomagać ją oraz zapobiegać tworzeniu biofilmu lub ułatwiać jego eradykację. Uzasadnione są zatem zaplanowane w niniejszej pracy doktorskiej innowacyjne, wielokierunkowe badania wpływu AA i UA

na uropatogenne pałeczki Gram-ujemne, żyjące w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Z tego względu zakres zaprojektowanych eksperymentów jest pionierski, a otrzymane wyniki będą wartościowe, ponieważ w znacznym stopniu uzupełnią luki w aktualnym stanie wiedzy na temat biofilmów wielogatunkowych.

4. ZAŁOŻENIA i CELE PRACY

4.1. Założenia

Niniejsza praca doktorska stanowi kontynuację badań dotyczących przeciwbakteryjnego działania AA i UA, prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu. Dotychczasowe prace naukowe Zespołu pod kierunkiem dr hab. Doroty Wojnicz [105-108], zostały w niniejszej pracy rozszerzone o dodatkowe szczepy uropatogenne i tworzone przez nie biofilmy wielogatunkowe.

Na podstawie wyników wcześniejszych eksperymentów naukowych Zespołu przewidywano, że:

1. Obecność szczepów *E. cloacae* i/lub *P. aeruginosa* będzie wpływać na wzrost szczepu *E. coli* w biofilmach wielogatunkowych.
2. Wzrost badanych szczepów bakterii w biofilmach jedno- i wielogatunkowych zostanie zahamowany pod wpływem działania AA i UA.

Biorąc pod uwagę powyższe hipotezy wyznaczono cel główny oraz uzupełniające go cele szczegółowe.

4.2. Cel główny

Celem głównym badań podjętych w ramach pracy doktorskiej było określenie wzajemnych zależności między szczepami bakterii *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*, żyjącymi w biofilmach jedno- i wielogatunkowych oraz określenie wpływu AA i UA na strukturę i funkcjonowanie tych biofilmów.

Eksperymenty zostały przeprowadzone na biofilmach 6-96 – godzinnych, tj. na wszystkich etapach ich rozwoju (adhezji/agregacji, dojrzewania, dyspersji/migracji). Zbadane zostały biofilmy jednogatunkowe oraz dwu- i trzygatunkowe, w których poszczególne szczepy bakterii hodowane były od początku (od czasu t_0) razem, a pomiarów dokonywano po 6, 24, 48, 72 i 96 h inkubacji.

4.3. Cele szczegółowe

Realizację celu głównego zaplanowano poprzez następujące cele szczegółowe:

Cel nr 1

Charakterystyka struktury i mechanizmów funkcjonowania biofilmów jedno- (*E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*), dwu- (*E. coli* + *E. cloacae*, *E. coli* + *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) oraz analiza występowania wzajemnych stosunków (antagonistycznych lub synergistycznych) między badanymi szczepami, poprzez określenie:

- a) liczebności żywych komórek badanych szczepów w biofilmach,
- b) ilości wytworzonej masy biofilmowej,

c) aktywności metabolicznej bakterii w biofilmach.

Cel nr 2

Wyznaczenie wartości MIC i MBC dla AA i UA wobec badanych szczepów bakterii.

Cel nr 3

Zbadanie wpływu AA i UA na strukturę i mechanizmy funkcjonowania hodowanych w obecności danego kwasu biofilmów jedno- (*E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*), dwu- (*E. coli* + *E. cloacae*, *E. coli* + *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) oraz na występowanie wzajemnych stosunków (antagonistycznych lub synergistycznych) między badanymi szczepami, poprzez określenie zmian zachodzących pod wpływem AA lub UA w:

- a) przeżywalności poszczególnych szczepów w biofilmach hodowanych w obecności AA lub UA,
- b) ilości masy biofilmowej wytworzonej w obecności AA lub UA,
- c) aktywności metabolicznej bakterii w biofilmach rosnących w obecności AA lub UA,
- d) morfologii pałeczek rosnących w obecności AA lub UA.

Cel nr 4

Analiza porównawcza struktury biofilmów oraz mechanizmów ich funkcjonowania na różnych etapach ich rozwoju przy braku i w obecności AA lub UA. Ocena efektywności działania kwasów.

5. MATERIAŁY i METODY

5.1. Materiały

5.1.1. Szczepy bakteryjne

W badaniach wykorzystano trzy uropatogenne szczepy referencyjne, pochodzące z Amerykańskiej Kolekcji Kultur Typowych (ATCC, *American Type Culture Collection*):

- *Escherichia coli* CFT073 (ATCC 700928), wyizolowany z krwi i moczu pacjentki z ostrym odmiedniczkowym zapaleniem nerek (ang. *acute pyelonephritis*);
- *Enterobacter cloacae* ATCC-BAA 2468, wyizolowany z moczu ludzkiego;
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25000, wyizolowany z moczu pacjenta zacewnikowanego.

5.1.2. Podłoża hodowlane

W badaniach stosowano następujące podłoża hodowlane stałe i płynne:

- agar chromogeny różnicujący Chromogenic Coliform CFS 1424 (producent: Graso Biotech, Starogard Gdański, Polska);
- bulion tryptozowo-sojowy TSB Trypticasein Soy Broth (producent: Biocorp sp. z o. o., Warszawa, Polska);
- agar tryptozowo-sojowy TSA Trypticasein Soy Agar (producent: Biocorp sp. z o. o. Warszawa, Polska);
- bulion wzbogacony (producent: SIS-Biomed, Warszawa, Polska);
- agar wzbogacony Lab-Agar (producent: Biocorp sp. z o. o. Warszawa, Polska);
- bulion MHB Mueller-Hinton Broth II (producent: International Diagnostic Group plc, UK).

5.1.3. Odczynniki

W badaniach stosowano następujące odczynniki chemiczne:

- kwas azjatykowy (AA) czystość $\geq 97\%$ (producent: Sigma-Aldrich, Poznań, Polska);
- kwas ursolowy (UA) czystość $\geq 90\%$ (producent: Sigma-Aldrich, Poznań, Polska);
- PBS (ang. *Phosphate Buffered Saline*), buforowany roztwór soli fizjologicznej, tj. 20 mM bufor fosforanowy o pH 7,4 z 0,14M NaCl, sterylne (producent: IliTD PAN, Wrocław, Polska);
- 1% roztwór fioletu krystalicznego (CV) (producent: Sigma-Aldrich, Poznań, Polska);
- 10% roztwór chlorku 2,3,5-trifenyloctetrazoliowego (TTC) (producent: Merck Millipore, Warszawa, Polska);
- 96% etanol;
- odczynniki do metody Grama: fiolet krystaliczny, płyn Lugola, fuksyna karbolowa.

5.2. Metody

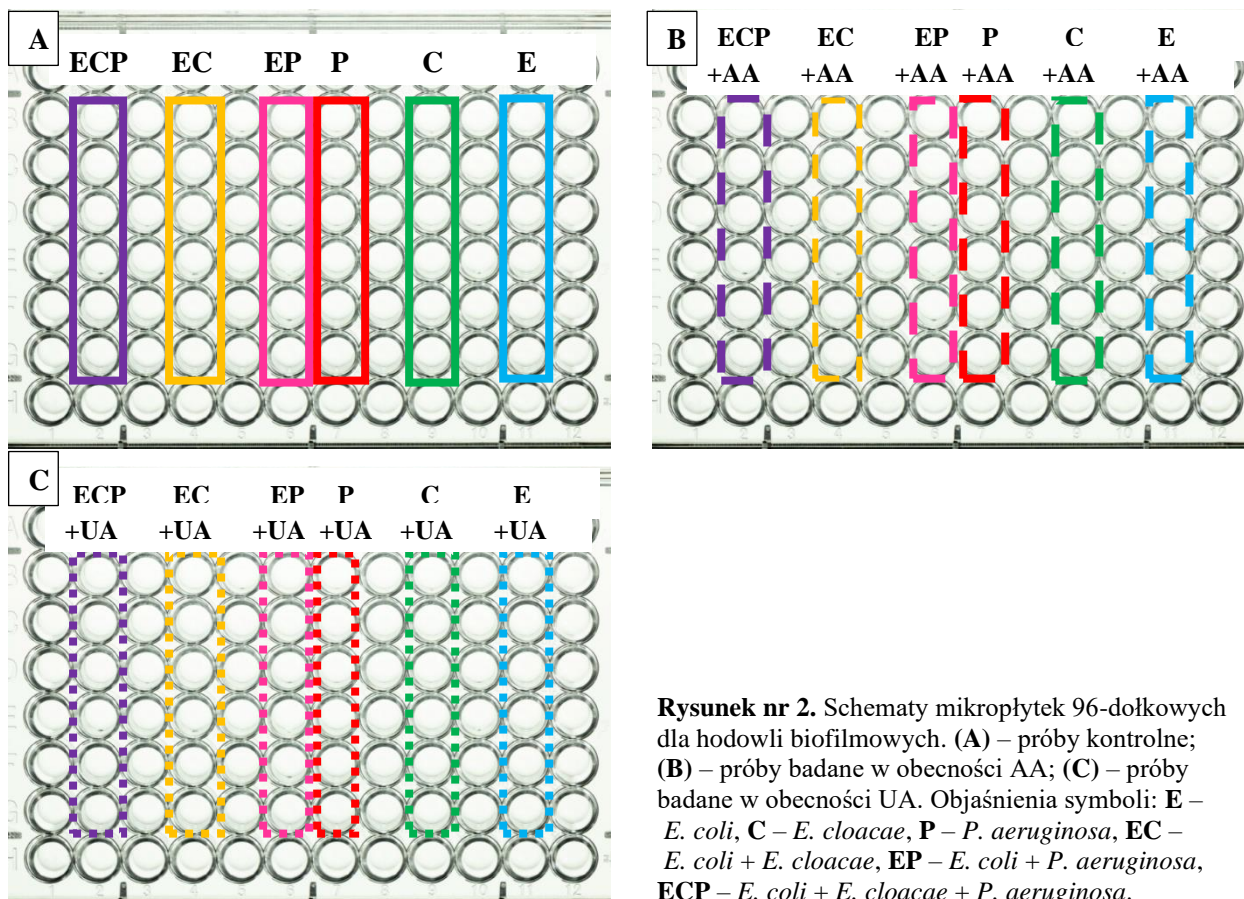
5.2.1. Wyznaczenie wartości MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*) oraz MBC (*Minimal Bactericidal Concentration*) metodą mikrorozcieńczeń

Do określenia wartości MIC i MBC dla AA i UA wobec badanych drobnoustrojów zastosowano metodę 2-krotnych mikrorozcieńczeń w bulionie MHB, zalecaną przez CLSI (*ang. Clinical and Laboratory Standards Institute*) [109].

5.2.2. Przygotowanie hodowli biofilmowych

Hodowle prowadzono w 96-dołkowych polistyrenowych mikroplótkach titracyjnych przez 6, 24, 48, 72 i 96 h, w następujących kombinacjach: biofilmy jednogatunkowe (*E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*), dwugatunkowe (*E. coli* + *E. cloacae*; *E. coli* + *P. aeruginosa*) oraz trzygatunkowe (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) (Rysunek nr 2 i 3).

Zestawy biofilmowe kontrolne nie zawierały kwasu, natomiast próby badane zawierały kwas w stężeniu $0,5 \times \text{MIC}$. Do każdej próby dodawano zawiesinę bakteryjną o gęstości 0,5 w skali McFarlanda. Do każdego dołka mikroplótki dodawano zatem: 150 μl podłoża (TSB - dla prób kontrolnych, kwas rozcieńczony w TSB - dla prób badanych) oraz 15 μl zawiesiny bakteryjnej o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda. W trakcie trwania eksperymentu hodowle biofilmowe „dokarmiano” co 24 h, dodając do każdego dołka 15 μl TSB.



Rysunek nr 2. Schematy mikroplótek 96-dołkowych dla hodowli biofilmowych. (A) – próby kontrolne; (B) – próby badane w obecności AA; (C) – próby badane w obecności UA. Objasnienia symboli: E – *E. coli*, C – *E. cloacae*, P – *P. aeruginosa*, EC – *E. coli* + *E. cloacae*, EP – *E. coli* + *P. aeruginosa*, ECP – *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*.

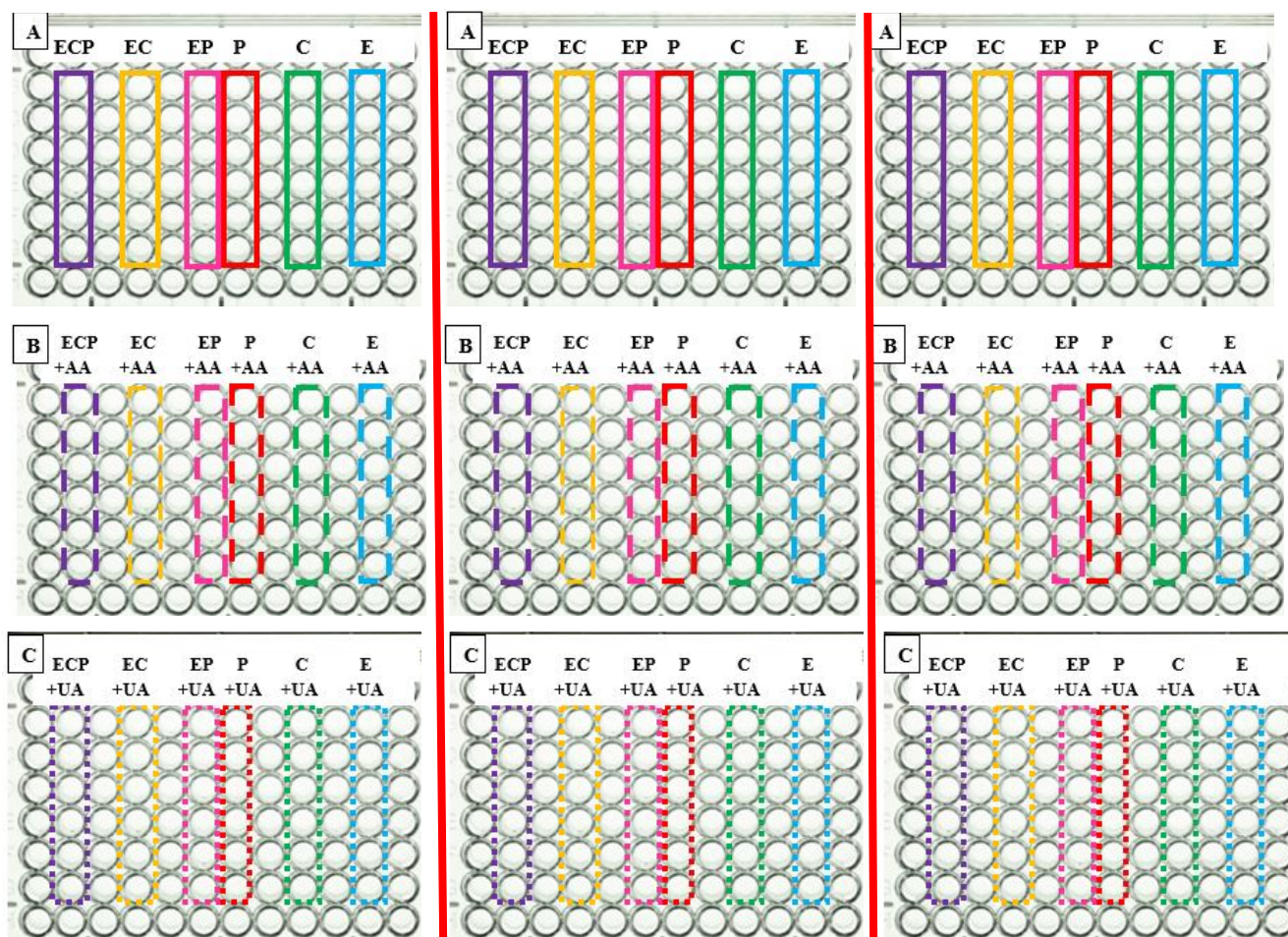
Hodowle biofilmowe (45 mikroplytek)

po upływie każdego z czasów inkubacji: t_6 , t_{24} , t_{48} , t_{72} i t_{96} przeznaczano:

3 mikroplytki (A, B, C)
wykorzystane do określenia liczby
CFU/ml (podrozdział 5.2.4.)

3 mikroplytki (A, B, C)
wykorzystane do określenia masy
biofilmowej (podrozdział 5.2.5.)

3 mikroplytki (A, B, C) wykorzystane
do określenia aktywności metabolicznej
(podrozdział 5.2.6.)



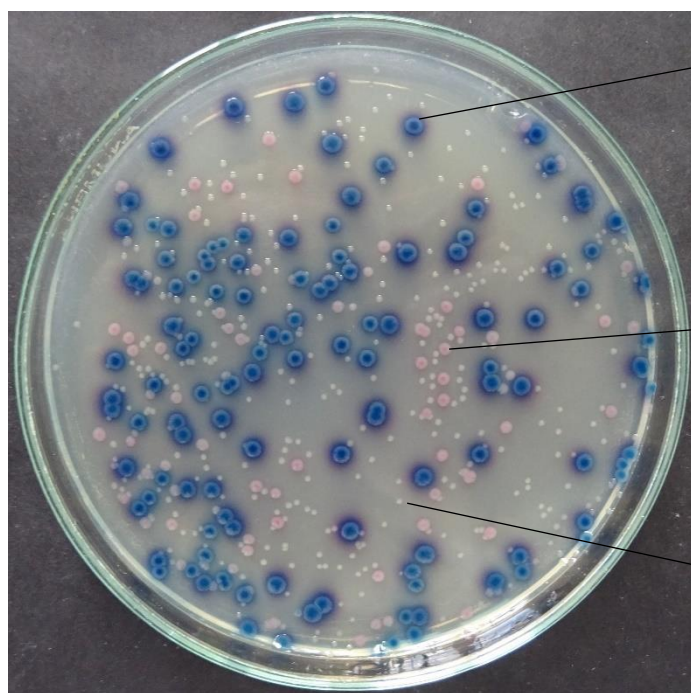
Rysunek nr 3. Schemat doświadczenia dla hodowli biofilmowych jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Objasnienia symboli jak pod Rysunkiem nr 2.

5.2.3. Przeżywalność bakterii w hodowlach planktonowych

Z zawiesin bakteryjnych o gęstości optycznej 0,5 w skali McFarlanda pobierano po 100 μl do eppendorfek zawierających po 500 μl odpowiedniego podłoża płynnego i inkubowano w 37 $^{\circ}\text{C}$ w łaźni wodnej z wytrząsaniem. Z tak przygotowanej zawiesiny wyjściowej, co godzinę przez 8 h (od czasu t_0 do t_8) pobierano po 10 μl do eppendorfek zawierających po 990 μl PBS, uzyskując rozcieńczenie 10^{-2} , z którego przygotowywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych aż do 10^{-8} (tzw. metoda seryjnych rozcieńczeń). Z każdego rozcieńczenia pobierano 100 μl i wykonywano posiew powierzchniowy głaszczką na szalkach z odpowiednim podłożem stałym. Po inkubacji w 37 $^{\circ}\text{C}$ przez 24 h zliczano kolonie, a po uwzględnieniu danego rozcieńczenia i posiewanej objętości otrzymywano wynik wyrażony w CFU/ml.

5.2.4. Przeżywalność bakterii w hodowlach biofilmowych

Hodowle przygotowywano postępując wg punktu 5.2.2. Po danym czasie inkubacji, tj. 6, 24, 48, 72, 96 h, hodowle biofilmowe delikatnie odpłukiwano w celu usunięcia komórek niezwiązanych z macierzą biofilmową. Następnie, osadzony na ściankach dołków mikro płytek biofilm zeszkrobywano ręcznie sterylną szpatułką [110], przenoszono do eppendorfek i zawieszano w PBS uzyskując po 600 μl zawiesiny, którą vortexowano przez 3 min., aby równomiernie rozprowadzić biofilm. Z tak przygotowanej zawiesiny wyjściowej, pobierano po 10 μl do eppendorfek zawierających po 990 μl PBS, uzyskując rozcieńczenie 10^{-2} , z którego przygotowywano szereg rozcieńczeń dziesiętnych aż do 10^{-8} . Z każdego rozcieńczenia pobierano 100 μl i wykonywano posiew powierzchniowy głaszczką na szalkach z podłożem różnicującym. Po inkubacji w 37 °C przez 24 h zliczano kolonie poszczególnych szczepów (Zdjęcie nr 1), a po uwzględnieniu danego rozcieńczenia i posiewanej objętości otrzymywano wynik wyrażony w CFU/ml. Z w/w zawiesiny wyjściowej pobierano także po 20 μl na szkiełko podstawowe, w celu przygotowania preparatów barwionych metodą Grama.



E. coli – kolonie **granatowe**
(obecna β -D-galaktozydaza i β -glukuronidaza)

E. cloacae – kolonie **różowe**
(obecna tylko β -D-galaktozydaza)

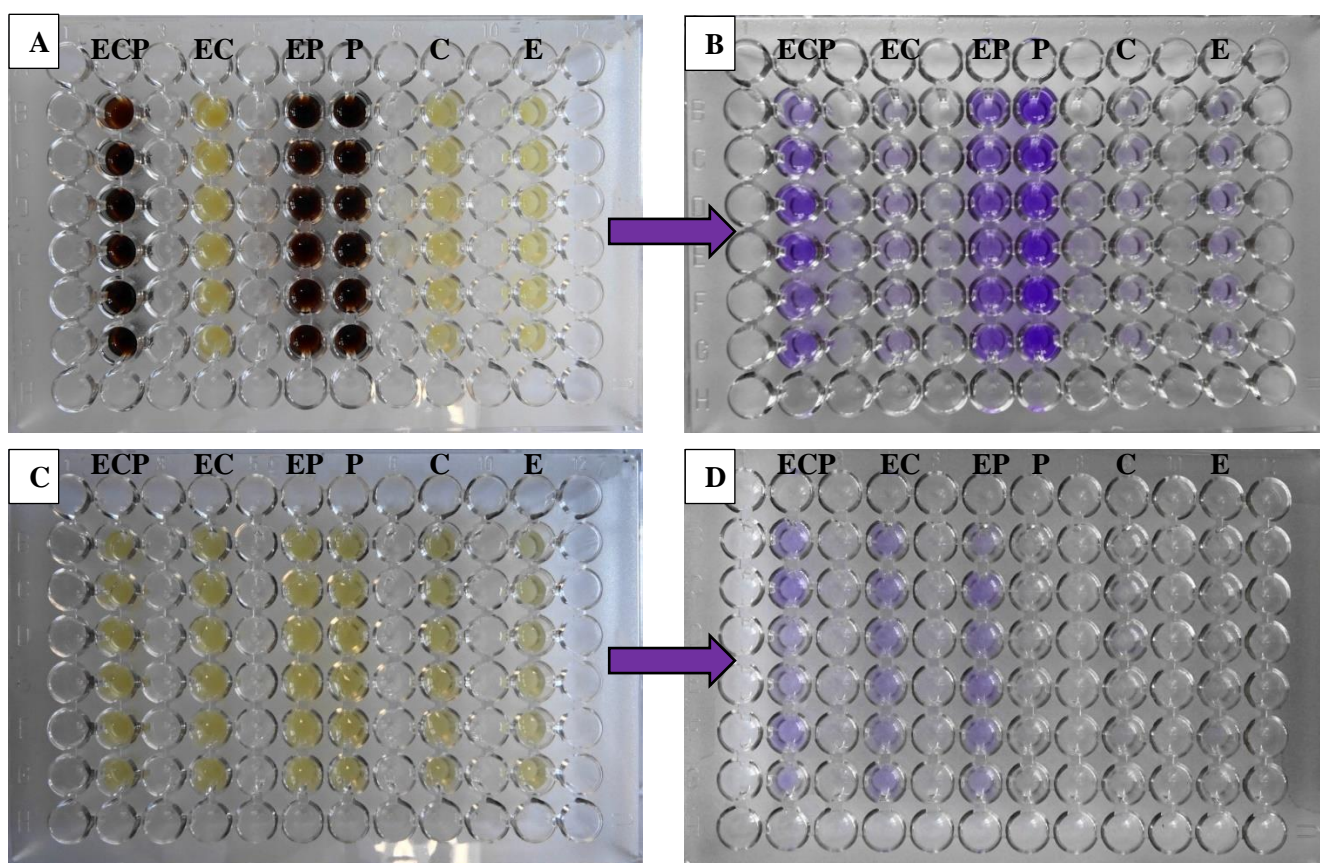
P. aeruginosa – kolonie **białe** (niezabarwione)
(brak w/w enzymów)

Zdjęcie nr 1. Kolory kolonii badanych szczepów na podłożu różnicującym.

5.2.5. Oznaczenie ilości wytworzonej masy biofilmowej metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem fioletu krystalicznego (CV)

Hodowle przygotowywano postępując wg punktu 5.2.2. Po upływie danego czasu inkubacji, tj. 6, 24, 48, 72 lub 96 h (Zdjęcie nr 2 A i C), z dołków mikro płytek usuwano zawiesinę komórek planktonowych poprzez odwrócenie płytki i 3-krotne delikatne przepłukanie pustych dołków PBS. Następnie do każdego dołka dodawano po 200 μl 1% fioletu krystalicznego (CV) i inkubowano w 37 °C przez 15 min., w celu wnikięcia CV w strukturę biofilmu. Po tym czasie, w celu pozbycia się niezwiązanego barwnika, płytki odwracano i 3-krotnie przepłukiwano PBS. Następnie do każdego dołka dodawano po

200 µl 96% etanolu, aby z macierzy biofilmu wyekstrahować pozostały CV. Mikroplątki inkubowano w temp. pokojowej przez 15 min. Po tym czasie, wyeluowane roztwory barwnika przenoszono do nowych mikroplątek (Zdjęcie nr 2 B i D) i mierzono ich gęstość optyczną OD (*ang. optical density*) przy długość fali 590 nm na czytniku mikroplątek (HiPo MPP-96® BIOSAN, Łotwa). Na podstawie wartości OD biofilmów, każdy szczep zaliczano do jednej z grup $OD \leq OD_{cut}$ – szczep nie produkuje biofilmu; $OD_{cut} < OD \leq 2 \times OD_{cut}$ – słaba produkcja biofilmu; $2 \times OD_{cut} < OD \leq 4 \times OD_{cut}$ – średnia produkcja biofilmu; $4 \times OD_{cut} < OD$ – silna produkcja biofilmu. Wartość OD_{cut} jest sumą OD_{avg} (średniej OD dla próby ślepej tj. podłoża TSB) i 3-krotnego iloczynu odchylenia standardowego średniej OD dla TSB [111-113].

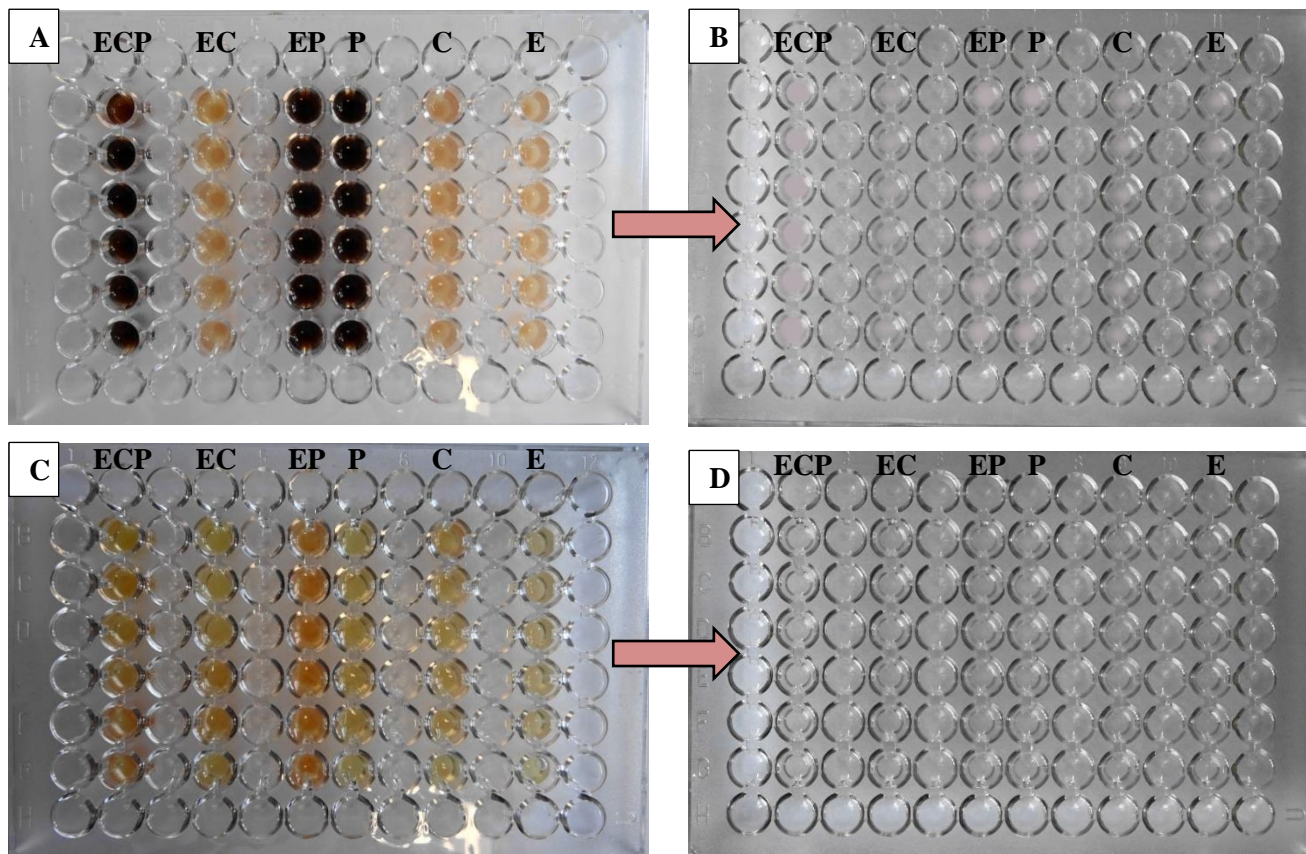


Zdjęcie nr 2. Ilość wytworzonej biomasy w biofilmach 72-godzinnych, kontrolnych (A, B) i hodowanych w obecności AA (C, D). Objasnienia symboli: E – *E. coli*, C – *E. cloacae*, P – *P. aeruginosa*, EC – *E. coli* + *E. cloacae*, EP – *E. coli* + *P. aeruginosa*, ECP – *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*.

5.2.6. Oznaczenie aktywności metabolicznej bakterii w biofilmie metodą spektrofotometryczną z użyciem chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego (TTC)

Hodowle przygotowywano postępując wg punktu 5.2.2, dodając do każdego dołka po 10 µl 10% chlorku 2,3,5-trifenylo-tetrazoliowego (TTC) na 24 h przed upływem danego czasu inkubacji. Mikroplątki inkubowano w 37 °C przez 24 h. W ciągu doby żywe (aktywne metabolicznie) komórki przeprowadzały za pomocą dehydrogenazy reakcję redukcji TTC do czerwonego trifenyloformazanu. Po upływie danego czasu inkubacji, tj. 6, 24, 48, 72 lub 96 h (Zdjęcie nr 3 A i C), z dołków usuwano zawiesinę komórek planktonowych poprzez odwrócenie płytki i 3-krotne przepłukanie pustych dołków

PBS. Następnie do każdego dołka dodawano po 200 μ l 96% etanolu. Mikro płytki inkubowano przez 15 min. w temp. pokojowej. Po tym czasie, wyeluwowane roztwory trifeniloformazanu przenoszono do nowych mikro płytek (Zdjęcie nr 3 B i D) i mierzono ilość wytworzonego produktu spektrofotometrycznie przy długości fali 490 nm na czytniku mikro płytek (HiPo MPP-96[®] BIOSAN, Łotwa) [114-116].



Zdjęcie nr 3. Ilość wytworzonego trifeniloformazanu w biofilmach 72-godzinnych, kontrolnych (A, B) i hodowanych w obecności AA (C, D). Objaśnienia symboli: **E** – *E. coli*, **C** – *E. cloacae*, **P** – *P. aeruginosa*, **EC** – *E. coli* + *E. cloacae*, **EP** – *E. coli* + *P. aeruginosa*, **ECP** – *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*.

5.2.7. Ocena zmian morfologicznych przy użyciu mikroskopu świetlnego

Z hodowli biofilmowych (punkt 5.2.4) pobrano próbki, przemyto za pomocą PBS i wykonano preparaty barwione metodą Grama. Morfologię komórek bakteryjnych w preparatach kontrolnych oraz ich zmiany morfologiczne pod wpływem kwasów, oceniano w mikroskopie świetlnym firmy Nikon Eclipse E400, przy 1000-krotnym powiększeniu, używając obiektywu $\times 100$ i okularu $\times 10$, z wykorzystaniem programu PROGRES GRYPHAX[®] wersja 2.2.0.1234, Jenoptik, Niemcy. Wykonano dokumentację fotograficzną w oświetleniu standardowym.

5.2.8. Analiza statystyczna

Każdy niezależny eksperyment (złożony z doświadczeń przedstawionych na Rysunku nr 3) powtarzano 3-krotnie (tzw. powtórzenie biologiczne). W ramach jednego powtórzenia biologicznego, w danym punkcie czasowym wykonywano wiele tzw. powtórzeń technicznych, tj. kolonie bakteryjne

zliczano z 6–8 szalek, a gęstość optyczną odczytywano z 6 dołków mikropłytki. Zatem przy 3 powtórzeniach biologicznych otrzymywano łącznie ok. 18–24 powtórzeń technicznych. Ostateczne wyniki podane w tabelach i na wykresach są wartościami średnimi uzyskanymi z powtórzeń technicznych.

Wszystkie wartości liczbowe wyrażono jako średnią arytmetyczną \pm SD (odchylenie standardowe populacyjne). Do analizy różnic statystycznych między bakteriami poddanymi działaniu AA lub UA, a próbami kontrolnymi, zastosowano nieparametryczny test ANOVA Kruskala-Wallisa, a następnie test wielokrotnych porównań wg Dunn. Wszystkie obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą programu STATISTICA wersja 13.3 (StatSoft, Kraków, Polska). Wartości $p \leq 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

6. PUBLIKACJE ZAWARTE W ROZPRAWIE DOKTORSKIEJ

6.1. Artykuł nr 1

Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes – asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals.

Zuzanna Sycz, Dorota Tichaczek-Goska, Dorota Wojnicz

Biomolecules **2022** Vol.12 no.1, art.98 [29 s.]

DOI: 10.3390/biom12010098

Impact Factor: **6,064**

Punkty KBN/MNiSW: **100,00**

Review

Anti-Planktonic and Anti-Biofilm Properties of Pentacyclic Triterpenes—Asiatic Acid and Ursolic Acid as Promising Antibacterial Future Pharmaceuticals

Zuzanna Sycz , Dorota Tichaczek-Goska *  and Dorota Wojnicz 

Department of Biology and Medical Parasitology, Wrocław Medical University, 50-345 Wrocław, Poland; sycz.zuzanna@gmail.com (Z.S.); dorota.wojnicz@umw.edu.pl (D.W.)

* Correspondence: dorota.tichaczek-goska@umw.edu.pl; Tel.: +48-71-784-15-23

Abstract: Due to the ever-increasing number of multidrug-resistant bacteria, research concerning plant-derived compounds with antimicrobial mechanisms of action has been conducted. Pentacyclic triterpenes, which have a broad spectrum of medicinal properties, are one of such groups. Asiatic acid (AA) and ursolic acid (UA), which belong to this group, exhibit diverse biological activities that include antioxidant, anti-inflammatory, diuretic, and immunostimulatory. Some of these articles usually contain only a short section describing the antibacterial effects of AA or UA. Therefore, our review article aims to provide the reader with a broader understanding of the activity of these acids against pathogenic bacteria. The bacteria in the human body can live in the planktonic form and create a biofilm structure. Therefore, we found it valuable to present the action of AA and UA on both planktonic and biofilm cultures. The article also presents mechanisms of the biological activity of these substances against microorganisms.

Keywords: asiatic acid; ursolic acid; pentacyclic triterpenes; bacterial biofilm; chronic and recurrent infections



Citation: Sycz, Z.; Tichaczek-Goska, D.; Wojnicz, D. Anti-Planktonic and Anti-Biofilm Properties of Pentacyclic Triterpenes—Asiatic Acid and Ursolic Acid as Promising Antibacterial Future Pharmaceuticals. *Biomolecules* **2022**, *12*, 98. <https://doi.org/10.3390/biom12010098>

Academic Editor: Christophe Hano

Received: 29 November 2021

Accepted: 4 January 2022

Published: 7 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

In recent years, there has been a growing interest in natural sources of medicinal substances. In the era of the growing resistance of bacteria to antibiotics, an intensive search is being made for effective and safe plant-derived compounds that could become a useful tool both in terms of prevention and treatment of diseases of bacterial aetiology. It is believed that plant products used as part of phytotherapy may support standard pharmacotherapy. Their potential use in terms of controlling chronic and/or recurrent inflammation caused by bacterial biofilm formation is of particular interest.

A bacterial biofilm is a community of intercommunicating microorganisms settled on a specific surface, adhering to each other, and surrounded by a layer of organic and inorganic substances produced by these microorganisms. The biofilm consists of aggregates of bacterial cells embedded within an extracellular polymeric substance (EPS), covering biotic and abiotic surfaces [1]. Biofilm formation proceeds in multiple stages: (1) initial adhesion (reversible adhesion); (2) irreversible adhesion, EPS production; (3) microcolony formation; (4) matrix formation; (5) dispersal [1]. A bacterial biofilm can be formed by cells of one or more microbial species. Multi-species biofilms occur in the natural environment, human body, on biomaterial surfaces, and in industrial installations. They are aetiological agents of chronic, recurrent, and nosocomial infections. Biofilms pose a significant threat to human health and life [1–3].

Problems with the treatment of chronic and/or recurrent infections caused by bacteria living in biofilm result not only from the difficulty of penetration of drugs through its structure, but they may also be caused by changes in the expression of genes encoding

virulence factors, genes that are important in the process of formation and development of the biofilm structure, and genes encoding drug transporters and regulatory proteins [4–6].

Bacterial cells forming a biofilm structure have an altered metabolism compared to forms living in the suspended matter, that is, planktonic forms. In deeper layers of the biofilm, there are super-resistant cells, “persisters”, that have low metabolic activity, which weakens the effect of antimicrobial agents, so that these cells can survive in the presence of lethal concentrations of antibiotics and re-establish the biofilm after the end of the therapeutic cycle [5,7].

The structure of the biofilm and the low metabolic activity of the bacteria living in it mean that the minimum drug concentrations necessary to inhibit their growth are even 100–1000 times higher than the concentrations of the same drugs used to eliminate bacteria that grow as planktonic forms. Such high doses of antibiotics cannot be used in the pharmacotherapy of human infections due to their toxicity [4,5,8]. Bacterial resistance to antibiotics has been a major challenge for public health, especially when associated with biofilm-forming cells that are more resistant to drug treatment. Therefore, in recent years, antimicrobial agents derived from natural sources have attracted great interest due to their potential activity against multidrug-resistant bacteria. Plant metabolites can be such effective antimicrobial compounds that act against planktonic and biofilms forms of pathogens [9–11]. Their antibacterial effects on the planktonic forms of bacteria may contribute to a reduced adherence of bacteria to the surface and biofilm formation. The newest research show that the antibacterial activity of AA is attributed to the damage to the bacterial membrane and the enhanced leakage of potassium ions and nucleotides [12]. It also has been demonstrated that UA could decrease the viability and structural integrity of biofilms by occupying the catalytic centre of glucosyltransferases [13] or suppression of *gft* genes' expression [14] and in consequence leading to inhibition of EPS formation.

For the reasons discussed above, plant-derived compounds are being sought; they may be applied as an alternative or supportive strategy to antibiotic therapy, as well as they may prevent biofilm formation or facilitate biofilm eradication. In recent years, there has been an increasing interest in pentacyclic triterpenes (TPs). They are polycyclic organic compounds of plant origin, used in traditional phytotherapy due to their wide spectrum of valuable medicinal properties. Plants rich in TPs, for example, *Centella asiatica* and *Arctostaphylos uva-ursi*, are frequently used prophylactically in the form of dietary supplements and nutraceuticals, as well as they are used as a support for the treatment of many diseases, especially those with inflammatory causes [15–17].

2. Asiatic Acid

Asiatic acid (AA; 2 α ,23-dihydroxyursolic acid) is a monocarboxylic acid derived from the hydride of ursane. In the structural formula, ursane is substituted with a carboxyl group at C-28 and hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-23 (stereoisomer 2 α , 3 β) (Figure 1A). The molecular formula can be presented as C₃₀H₄₈O₅, the molecular weight of AA is 488.70 g/mol [18,19]. AA, like other TPs, is a secondary metabolite protecting a plant against insect and microbial attack [20]. Particularly high concentrations of AA in its free form and as an aglycone with attached carbohydrate residues (asiaticoside) can be found in the leaves of *C. asiatica*, known as Gotu kola or kodavan. The total fraction of TPs of *C. asiatica* contains 30% AA, 40% asiaticoside and 30% madecassic acid [21]. This plant can be found in South Africa, Australia, Oceania, and Southeast Asian countries (mainly India and China, but also Japan, Malaysia, and Indonesia) [21]. For over 3000 years, *C. asiatica* has been one of the main medicinal ingredients used in traditional African, Ayurvedic and Chinese medicine as a panacea and it has been recommended primarily for neuropsychiatric disorders and for the treatment of wounds, leprosy, and syphilis [21,22]. Nowadays, in view of the fact that this plant shows an overall health-promoting effect, in its countries of origin it is consumed prophylactically both in the form of nutraceutical preparations and as an addition to salads and drinks. Moreover, *C. asiatica* is an ingredient in ointments, cosmetics, and toothpaste [21,22].

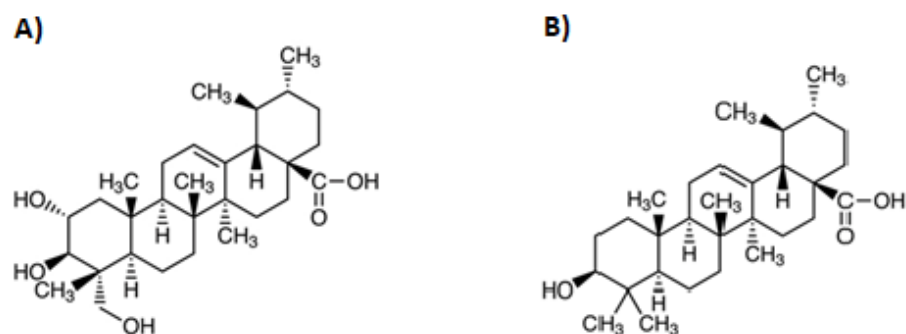


Figure 1. Chemical formulas of asiatic (A) and ursolic (B) acids.

3. Ursolic Acid

Ursolic acid (UA; 3 β -hydroxy-urs-12-en-28-oic acid) less commonly known as urson, is a hydroxy monocarboxylic acid derived from the hydride of ursane. In the structural formula, ursane is substituted with a carboxyl group at C-28 and a 3 β -hydroxyl group at C-3 (Figure 1B). The molecular formula can be presented as C₃₀H₄₈O₃, the molecular weight of UA is 456.70 g/mol [23–26].

UA is most found in the free form or as an aglycone in the case of triterpenoid saponins. UA is present in many plant species belonging to angiosperms, ferns, and bryophytes [27–30]. Its particularly high concentrations can be found in the leaves of *A. uva-ursi*, also known as bearberry. The leaf of *A. uva-ursi* is a pharmacopoeial raw material and it contains approx. 0.75% UA and several other pharmacologically active compounds: 6–12% arbutin and its metabolites (galoylarbutin, methylarbutin, free hydroquinone), approx. 20% tannins, 1.2–1.5% flavonoids (quercetin, isoquercetin, myricetin, kaempferol, hyperoside), uvaol, polyphenolic acids (6% gallic acid, syringic acid, p-coumaric acid, ellagic acid, and quinic acid) [31,32].

A. uva-ursi can be found in the arctic and temperate zones of the northern hemisphere—in Europe, Asia, and North America. In Poland, it can be found mainly in the northern part of the lowlands, in dry pine forests and heathlands, rarely in the mountains. In 2014, *A. uva-ursi* was included in the list of species under strict protection (Red List) [33]. Leaves of *A. uva-ursi* have been used for centuries in European traditional medicine as a diuretic, astringent, and antiseptic to treat urinary tract infections (UTIs) and relieve pain concerning nephrolithiasis. In contrast, Native Americans used leaves of *A. uva-ursi* to treat headaches, prevent and treat scurvy and prevent miscarriages. In modern phytotherapy, the leaf of *A. uva-ursi* is used alone in the form of decoctions and as an ingredient of urological herbal mixtures. Moreover, the *A. uva-ursi* leaf extract is an ingredient of pharmaceutical compounded preparations—liquids and pills with antibacterial, anti-inflammatory, and diuretic properties, which are recommended for the treatment of UTIs [34]. UA is also one of the biologically active triterpenoids found in several species of bryophytes: *Sphagnum magellanicum*, *Sphagnum tenellum*, *Sphagnum rubellum*, *Polytrichum juniperum*, *Sphagnum fallax*, and *Aulacomnium palustre*. However, only the extract from *S. magellanicum* showed antimicrobial activity [27].

4. Pharmacological Activities of AA and UA

Many studies have proved several molecular and pharmacological properties that are common to AA and UA: antioxidant, anti-inflammatory, anti-free radical, cytoprotective, apoptosis-regulating, and receptor- and enzyme-modulating activities. In various in vitro and in vivo studies, AA and UA have also been found to affect growth factors, transcription factors, and cell signalling. The above-mentioned properties result in the following therapeutic actions that are common to AA and UA: anticancer, hypotensive, cardioprotective, anti-infarction, anti-stroke, antihyperlipidemic, antidiabetic, hepatoprotective, gastroprotective, nephroprotective, diuretic, immunostimulatory, neuroprotective, nootropic, anti-Parkinson's, anti-Alzheimer's, anti-osteoporosis, antiprotozoal (especially

antimalarial), antifungal, antimycobacterial, antiviral (anti-HIV, anti-HCV) and radio-protective (anti-aging) actions. Furthermore, AA supports the treatment of burns and non-healing diabetic wounds, and it also exhibits spermicidal activity. UA, in turn, can accelerate wound healing, stimulate muscle growth and reduce fat gain, as well as it is an ingredient of dermatological preparations, cosmetics, and nutritional supplements for athletes [18,19,23,24,26,35–44].

5. The Mechanisms of Antibacterial Activity of AA and UA

Antibacterial activity is one of the many properties of pentacyclic triterpenes. Their activity is related to changes in the structure and functioning of the bacterial cell structures (cell membrane, adhesins), cell morphology, gene expression, and processes such as adhesion and biofilm formation (Figure 2) [10,13,14,45–47]. The available papers present the effects of AA and UA against both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Both acids showed better antibacterial activity against Gram-positive bacteria. This activity is related to differences in terms of the structure of cell envelopes of these two groups of bacteria. In the envelopes of Gram-negative bacteria, unlike Gram-positive bacteria, there is an outer membrane that can impede the penetration of acids into the bacterial cell [46,48]. Therefore, there are significant differences in terms of the values of AA and UA concentrations that inhibit the growth of bacteria from both groups. Higher MIC values are usually observed for Gram-negative bacteria.

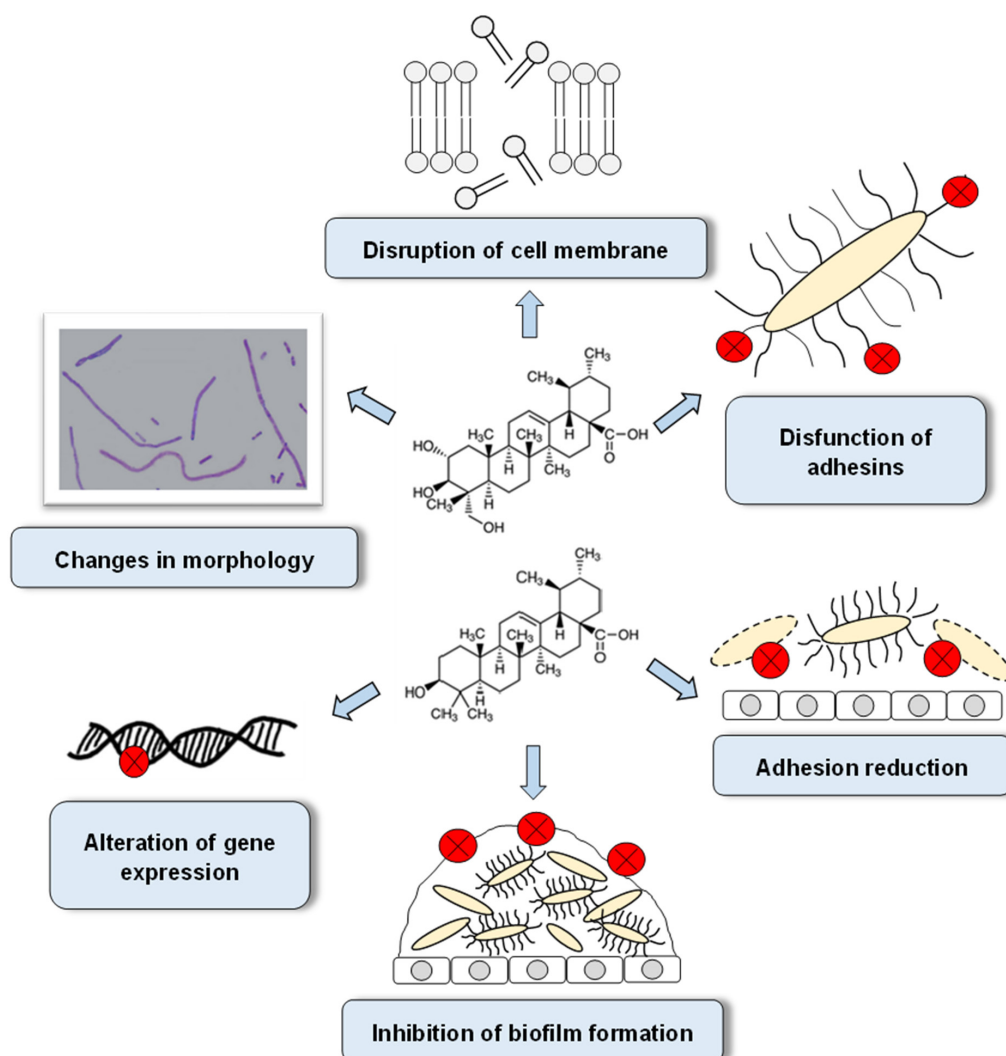


Figure 2. The various antibacterial targets of asiatic and ursolic acids.

In studies devoted to the antibiofilm effects of AA and UA, there was a more effective effect of AA, probably resulting from the slightly different molecular structure of this compound compared to UA. This is because AA has an additional hydroxyl group at C-23, which gives a more hydrophilic nature to the whole molecule, making it easier for this acid to penetrate inside the EPS of the biofilm and thus reach bacterial cells [19,49].

The anti-adhesion activity of AA and UA, contributing to the reduced ability of bacteria to adhere to epithelial cells (e.g., uroepithelium), is one of the mechanisms of their antimicrobial activity [10]. Impaired adhesion may be associated with morphological changes in bacterial cells and changed expression of genes encoding virulence factors such as P fimbriae, curli fimbriae, and hydrophobicity. AA- and UA-induced morphological changes and reduced bacterial motility impair the colonisation of tissues and abiotic surfaces and thus they impair biofilm formation.

Another known mechanism for the antibacterial activity of AA and UA is the impairment of the integrity and irreversible damage to the bacterial cell membrane. It has been determined that AA impairs potassium cation (K⁺) homeostasis, which is regulated by Kdp membrane transporters. K⁺ is involved in many aspects of bacterial physiology, for example, growth, survival, and virulence. AA increases the release of K⁺ from the cytoplasm and excessive loss of K⁺ leads to bacterial cell death. Moreover, the treatment of bacteria with AA causes an unfavourable release of DNA and RNA nucleotides, which may also cause cell death. Although AA can damage the lipid membrane, it may not be able to penetrate the EPS barrier that is a component of the biofilm [11,50].

The molecular mechanism of UA activity also involves the inclusion of its molecules into the inner membrane of the bacterial cell and interference with the formation of hydrogen bonds between phosphatidylethanolamine (PE) and phosphatidylglycerol (PG), which are major components of this membrane. UA molecules can also disorganise the packing of hydrophobic chains of phospholipid membranes. It is also possible that UA not only disrupts the PE-PG packing but also locally alters their mutual ratios, making bacteria more susceptible to antibiotics [51].

After a thorough understanding of the mechanism of action of AA and UA, the next issue to be addressed is to improve their low in vivo bioavailability that limits the clinical application of TPs in question. Therefore, structural modifications of UA have been conducted in recent years to improve its biological activity and bioavailability. The aim of one of the studies by Gu et al. [52] was to design and synthesise novel carbazole derivatives of UA and determine their antibacterial activity against Gram-positive (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) and Gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*) strains. Most of the synthesised UA derivatives showed inhibitory activities against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, adopting minimum inhibitory concentration (MIC) values of 3.9–15.6 mg/L, which were similar to the MIC values of amikacin—the positive control in that study. These results proved that the presence of the carbazole moiety alters the physicochemical properties of UA, including improvement of its water solubility, which leads to improved bioavailability and biological activity compared to the parent UA molecule.

Huang et al. [45] synthesised various UA derivatives containing two additional hydroxyl groups in the A-ring. Most of these derivatives showed a significantly enhanced activity against Gram-positive bacteria (*B. subtilis* ATCC 6051, *S. aureus* ATCC 25923, and *Streptomyces scabies*), with negligible or weak activity against Gram-negative bacteria (*E. coli* ATCC 25922 and *Ralstonia solanacearum* ATCC 11696) compared to UA. The weak activity of UA and its derivatives is due to the presence of an outer membrane in Gram-negative bacteria, which is a selective barrier against the penetration of these compounds into the cell. The structure-activity relationship analysis of UA derivatives showed that the introduction of two hydroxyl groups into UA at C-1 and C-2 along with a short alkyl ester group at C-17 strongly enhances the growth-inhibitory activity of Gram-positive bacteria. The authors showed that UA derivatives alter the expression levels (up- or down-regulation) of genes

related to peptidoglycan metabolism and cellular respiration metabolism, as well as genes involved in bacterial virulence.

Usmani et al. [53] investigated the antimicrobial potential of UA and its various amide derivatives against nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and its clinical colistin-resistant strains. It is interesting that despite the lack of antibacterial properties of pure UA, the authors showed very good antibiofilm properties of one of its derivatives (3- β -N-(2',4'-dinitrophenyl)-3-hydroxyurs-12-en-28-amide) against all tested *A. baumannii* strains. The authors also found that this amide derivative down-regulates the expression of biofilm development (*bap*) and quorum sensing (*abaR*) genes of *A. baumannii* suggesting this compound might hinder quorum sensing leading to stop biofilm formation.

Ghasemzadeh et al. [54] investigated the antibacterial properties of UA as well as UA-loaded chitosan nanoparticles (UA-Ch-NPs). The MIC values of UA and UA-Ch-NPs against *S. aureus* were 64 and 32 mg/L, respectively. The authors demonstrated that UA-Ch-NPs significantly decreased the expression of *icaA* and *icaD* genes, which are engaged in biofilm formation, indicating that UA-Ch-NPs could be a promising material for antibacterial and antibiofilm applications.

The weaker activity of UA compared to AA is due to its poor solubility in water. To improve the bioavailability of UA, Oprean et al. [55] encapsulated its molecules in polyurethane nanostructures, acting as carriers, and then they determined the antimicrobial activity of these complexes against *Bacillus cereus* and *B. subtilis* strains. Unfortunately, contrary to expectations, "encapsulation" reduced the antimicrobial activity of UA. Therefore, further studies are necessary to improve its antimicrobial activity.

However, there are relatively few literature reports that include studies describing the antimicrobial effects of AA and UA. Experiments conducted in recent years have proved that these acids, alone and combined with antibiotics, have significant antimicrobial activity. Existing studies focus primarily on bacteria living in the suspended matter, that is, planktonic forms. MIC and minimum bactericidal concentration (MBC) values of both acids were determined and their effects on bacterial survival, cell morphology, and bacterial membrane structure were described. The effects of AA and UA on the cell surface hydrophobicity, motility, and synthesis of fimbriae, which are virulence factors of significant importance for biofilm formation, were also shown in those studies

6. Antibacterial Properties of Pentacyclic Triterpenes

Planktonic forms of bacteria are free-living single cells that move freely in body fluids. They are more susceptible to used antibiotics compared to their biofilm forms, and they are more easily identified and eliminated by the host immune system [56]. In many cases, gene expression differs in terms of planktonic and biofilm forms, which contributes to their morphological and physiological diversity [57]. It should be noted that planktonic forms when released from the biofilm structure, become the source of subsequent outbreaks of infection. Although planktonic forms represent only 0.1% of the total microbial biomass, they also play a key role in bacterial infections [58]. Therefore, articles concerning the effects of AA and UA on bacteria living in planktonic forms were reviewed.

6.1. Anti-Planktonic Activity of Asiatic Acid

The studies presented below used AA isolated by researchers from various plants rich in pentacyclic triterpenes (Figure 3) or purchased in pure form. It should also be noted that these articles include a very diverse range of research.

Some articles are limited to identifying only MIC values (Table 1) or zones of growth inhibition (Table 2). Others are extended to studies concerning the effects of this acid on the morphology and virulence traits of analysed bacteria.

The MIC value is the lowest concentration of the antibacterial substance that inhibits bacterial growth. Determination of the MIC is the most basic laboratory measurement of the activity of an antimicrobial agent against microorganisms. A low MIC value indicates that less antibacterial agent concentration is needed to inhibit bacterial growth. Knowing

the MIC values of antibiotics is very important as it allows clinicians to select the appropriate antibiotic for a patient with a specific infection and determine the effective dose of the antibiotic.

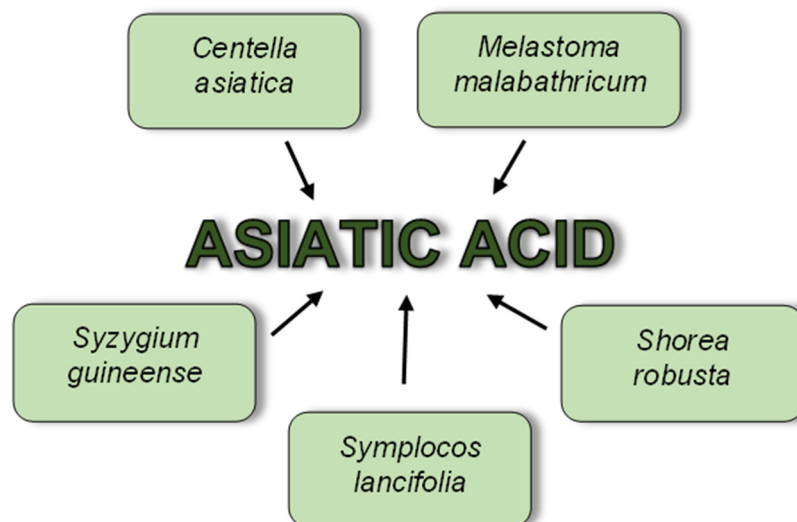


Figure 3. Plant sources of asiatic acid used in antibacterial experiments; green boxes—angiosperms.

Bacteria exposed to an insufficient concentration of a particular drug can evolve resistance to this drug. Therefore, the knowledge of MIC values is helpful in the treatment of patients and prevents the development of drug-resistant strains.

The antimicrobial activity of pure compound isolated from crude extract can be considered significant (very good) when its MIC is below 10 mg/L, moderate (good) when between 10 and 100 mg/L, and low (weak) when more than 100 mg/L [59].

The data in Table 1 indicate that AA exhibits a variety of antimicrobial activities. AA isolated from *S. guineense* leaves showed significant activity against Gram-positive *B. subtilis* (MIC = 0.75 mg/L) and Gram-negative *E. coli* (5 mg/L) [60]. AA showed moderate activity against most of the tested bacteria (10 < MIC < 100 mg/L) [11,46,50,60–62]. Weak AA activity has been described for Gram-positive strains of *E. faecalis* [46,63] and *S. aureus* [63]. Gram-negative strains of *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *E. cloacae* as well as Gram-positive *S. aureus* showed the lowest sensitivity to AA (MIC > 128 mg/L) [9,63,64]. Among these strains were uropathogenic *E. coli*, for which the AA MIC ranged from 512 mg/L to >1024 mg/L [9,10,47].

Djoukeng et al. [60] studied the effects of AA isolated from a methanol extract of *S. guineense* leaves. That acid revealed significant antibacterial activity against *B. subtilis*, *E. coli*, and *S. sonnei* strains and its MIC values were 0.75, 5.0, and 30.0 mg/L, respectively. Taemchuay et al. [61] found that both MIC and MBC values, determined against 30 clinical strains of *S. aureus* and the reference strain *S. aureus* ATCC 25923, were in the range of 20–160 mg/L for AA isolated from *C. asiatica* leaves. Acebey-Castellon et al. [63] determined that AA derived from methanolic extract of *S. lancifolia* leaves exhibited stronger antibacterial activity against *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC = 128 mg/L) and weaker activity against *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922, and *P. aeruginosa* ATCC 27853 (MICs > 128 mg/L).

The effect of AA on clinical *E. coli* strains isolated from the urine of patients with pyelonephritis was also analysed by Wojnicz et al. [10,47]. The articles identified the MIC values of AA against the analysed strains, which ranged from 512 mg/L to >1024 mg/L. Moreover, the effects of AA on virulence traits associated with biofilm formation and development by these bacilli were presented. AA at a concentration of 10 mg/L was sufficient enough to cause a loss of haemagglutinating capacity associated with the presence of P fimbriae. On the other hand, AA at a concentration of 40 mg/L inhibited the synthesis

of curli fimbriae and significantly reduced the motility of bacteria. AA at a concentration of 50 mg/L revealed anti-haemolytic activity [47] and reduced the hydrophobic nature of bacterial cell surfaces [10]. At a concentration of 40 mg/L, AA also affected the adhesion of *E. coli* to uroepithelial cells, significantly reducing the number of bacilli adhering to the epithelium. AA at a concentration of 50 mg/L also induced morphological changes in bacterial cells. An increased percentage of short filaments (5–15 μm) and the presence of long filaments (>15 μm) were observed in cultures treated with AA [10].

Table 1. MIC values of asiatic acid against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Bacterial Group	Species	Asiatic Acid			Ref.
		MIC [mg/L]	Source	Antibacterial Activity	
Gram-positive	<i>Bacillus cereus</i>	36–44	purchased ^{*B}	good	[50]
	<i>Bacillus subtilis</i>	0.75	<i>S. guineense</i>	very good	[60]
	<i>Clostridium difficile</i>	10–20	purchased ^{*A}	good	[11]
	<i>Enterococcus faecalis</i>	18–22	purchased ^{*B}	good	[50]
		64–128	purchased ^{*A}	good–weak	[46]
		128	<i>S. lancifolia</i>	weak	[63]
	<i>Listeria monocytogenes</i>	32–40	purchased ^{*B}	good	[50]
	<i>Staphylococcus aureus</i>	20–160	<i>C. asiatica</i>	good–weak	[61]
		26–30	purchased ^{*B}	good	[50]
>128		<i>S. lancifolia</i>	weak	[63]	
Gram-negative	<i>Enterobacter cloacae</i>	1024	purchased ^{*A}	weak	[9]
	<i>Escherichia coli</i>	5	<i>S. guineense</i>	very good	[60]
		20–28	purchased ^{*B}	good	[50]
		>128	<i>S. lancifolia</i>	weak	[63]
		512–>1024	purchased ^{*A}	weak	[10]
		512–>1024	purchased ^{*A}	weak	[47]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>1024	purchased ^{*A}	weak	[9]
		32–40	purchased ^{*B}	good	[50]
		64	<i>S. robusta</i>	good	[62]
		>128	purchased ^{**A}	weak	[64]
>128		<i>S. lancifolia</i>	weak	[63]	
<i>Salmonella typhimurium</i>	>1024	purchased ^{*A}	weak	[9]	
<i>Salmonella typhimurium</i>	30–34	purchased ^{*B}	good	[50]	
<i>Shigella sonnei</i>	30	<i>S. guineense</i>	good	[60]	

* purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Inc.; ** purchased from LKT Laboratories; ^A—synthetic; ^B—isolated from *C. asiatica*.

The study by Liu et al. [50] revealed the antimicrobial activity of AA against Gram-negative bacteria: *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium* DT104, *P. aeruginosa*, as well as Gram-positive bacteria: *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*. The MIC values of that acid against those bacterial strains were in the range of 20–40 mg/L, while the MBC values were in the range of 32–52 mg/L. AA reduced the survival of all bacterial strains as early as in 6-h cultures. AA at 1 \times MIC concentration impaired cell membrane integrity in 40–56% bacterial cells, while at 2 \times MIC concentration it caused loss of K⁺ ions and nucleotides in 71–89% of bacterial cells.

Wojnicz et al. [46] studied in detail the effect of AA on Gram-positive clinical strains of *E. faecalis*, the bacteria associated with serious nosocomial UTIs, particularly among catheterised patients. Those strains were resistant to, for example, gentamicin, nitrofurantoin, ampicillin, and trimethoprim/sulphamethoxazole. The MIC values of AA against the analysed strains were 64–128 mg/L. The anti-growth effect of sub-inhibitory concentrations (0.75 \times MIC) of AA was observed after 2-, 4-, 6- and 24-h incubation. AA showed the

highest activity after 24 h, where bacterial survival was reduced by 250-fold compared to the control sample. It was also observed that *E. faecalis* cells were larger and formed aggregates. These changes may be caused by AA impairing cell division, resulting in changes in cell morphology such as increased cell diameter or the occurrence of aggregates. Furthermore, the authors showed that AA significantly reduced or completely inhibited the ability of *E. faecalis* to synthesise enzymes and toxins that damage host tissues such as lipase, lecithinase, gelatinase, and haemolysins.

Harnvoravongchai et al. [11] found the potent antimicrobial activity of AA against clinical strains of *C. difficile*. The MIC values of AA were 10–20 mg/L. AA inhibited bacterial motility, induced membrane damage and morphological changes in cells, thus causing leakage of intracellular substances (proteins and nucleic acids) as early as 30 min of exposure. AA at concentrations of 10 and 100 mg/L damaged the spore surface, impairing the sporulation and germination of spores. According to the study by Han et al. [39], AA solution at a concentration of 5 µM (10%), being a part of a dressing for the treatment of diabetic non-healing wounds showed comparable antibacterial activity against *E. coli* ATCC 8739 and *S. aureus* ATCC 29213 as standard dressings soaked in penicillin at a concentration of 25 mg/L. In contrast, AA at a concentration of 15 µM (30%) showed a stronger inhibitory effect against both tested strains than penicillin.

In the study conducted by Bharitkar et al. [62], AA isolated from *S. robusta* resin exhibited good antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 25938 and *P. aeruginosa* with the MIC value of 64 mg/L.

Some researchers define the antimicrobial activity of AA by determining the zone of bacterial growth inhibition around a disc soaked with a specific concentration of it (Table 2). The size of the growth inhibition zone, given in millimetres, indicates the sensitivity of the bacteria to the test substance. The results are interpreted depending on the diameter of the inhibition zone as follows: the zone <7 mm is considered as inactive, 7–12 mm as active, >12 mm as very active [65].

Table 2. Growth inhibition zones and corresponding concentration values of asiatic acid against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Bacterial Group	Species	Inhibition Zone [mm]	Asiatic Acid			Ref.	
			Concentration [mg/L]	Source	Antibacterial Activity		
Gram-positive	<i>Bacillus cereus</i>	10.0	250	<i>M. malabathricum</i>	active	[66]	
		11.5	500		active		
		12.0	1000		active		
		13.5	2000		very active		
	<i>Bacillus subtilis</i>	7.0	25	<i>C. asiatica</i>	active	[67]	
		9.0	50		active		
		15.0	75		very active		
		17.0	100		very active		
			8.0	1000	purchased *C	active	[68]
		<i>Staphylococcus aureus</i>	9.0	250	<i>M. malabathricum</i>	active	[66]
	10.0		500	active			
	10.5		1000	active			
	11.0		2000	active			
			7.0	25	<i>C. asiatica</i>	active	[67]
			8.0	50		active	
			12.0	75		active	
		13.0	100	very active			
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	7.0	1000	purchased *C	active	[68]	

Table 2. Cont.

Bacterial Group	Species	Inhibition Zone [mm]	Asiatic Acid			Ref.
			Concentration [mg/L]	Source	Antibacterial Activity	
Gram-negative	<i>Escherichia coli</i>	7.0	1000	purchased * ^C	active	[68]
		7.0	64	<i>S. robusta</i>	active	[62]
	<i>Helicobacter pylori</i>	12.0	1000	purchased * ^C	active	[68]
		8.0	500		active	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8.0	1000	<i>M. malabathricum</i>	active	[66]
		9.0	2000		active	
		13.0	25	<i>C. asiatica</i>	very active	[67]
		23.0	50		very active	
		26.0	75		very active	
		28.0	100		very active	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8.0	64	<i>S. robusta</i>	active	[62]
		6.0	75	<i>C. asiatica</i>	inactive	[67]
		6.0	100			

* purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Inc.; ^C—origin is not given.

Table 2 presents the results of the research in which the authors marked the zones of inhibition of bacterial growth in the presence of selected AA concentrations. The largest zones of growth inhibition were recorded for *K. pneumoniae* (13–28 mm) using AA in concentrations of 25–100 mg/L [67]. The higher the concentration, the greater the zone of inhibition of bacterial growth. Very good AA activity was also demonstrated against *B. subtilis* using concentrations of 75 and 100 mg/L and *S. aureus* by treating it with AA at a concentration of 100 mg/L [67]. In the case of *B. cereus*, only a very high concentration of AA (2000 mg/L) isolated from *M. malabathricum* leaves showed antibacterial activity [66]. On the other hand, the smallest zone of growth inhibition was observed for the *P. aeruginosa* strain exposed to AA at the concentrations of 75 and 100 mg/L [67]. The diameter of this zone was only 6 mm, which proved the lack of antibacterial activity of the acid. In most of the described cases, AA showed zone inhibition was 7–12 mm against Gram-positive bacteria: *B. cereus* [66], *B. subtilis* [67], *S. aureus* [66–68], and *S. pneumoniae* [68] and Gram-negative: *E. coli* [62,68], *H. pylori* [68], *K. pneumoniae* [66], and *P. aeruginosa* [62].

Norzaharaini et al. [68] investigated the antibacterial activity of AA and asiaticoside present in the leaves of *C. asiatica*. At concentrations of 500–1000 mg/L, AA had antimicrobial activity against *H. pylori* ATCC 45903, *E. coli* ATCC 29952, *S. pneumoniae*, and *S. aureus*. The disk diffusion method was used for the assessment of antibacterial activity; the zones of inhibition were 12 mm (1000 mg/L) and 8 mm (500 mg/L) for *H. pylori*, 8 mm (1000 mg/L) for *S. aureus*, and 7 mm (1000 mg/L) for *E. coli* and *S. pneumoniae*. On the other hand, asiaticoside did not show antimicrobial activity against any of the above-mentioned strains.

Wong et al. [66], using the agar diffusion method, proved that AA derived from methanolic extract of *M. malabathricum* leaves exhibited antibacterial activity against *B. cereus* ATCC 10876, *S. aureus* ATCC 25923, and *K. pneumoniae*. For AA at a concentration of 2000 mg/L, the zones of inhibition of the analysed strains were 13.5, 11.0, and 9.0 mm, respectively, while for AA at a concentration of 1000 mg/L they were 12.0, 10.5, and 8.0 mm, respectively. AA at concentrations of 500 and 250 mg/L inhibited the growth of *B. cereus* (zone diameter was 11.5 and 10.0 mm, respectively) and *S. aureus* (10.0 and 9.0 mm), however, it was not active against *K. pneumoniae*. None of the used AA concentrations had antibacterial activity against *B. subtilis*, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 17853, and *S. typhi*.

Ashella and Fleming [67] conducted research concerning the antibacterial activity of AA using the agar diffusion-well method against *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, and *S. aureus* by identifying zones of bacterial growth inhibition at different acid concentrations (25, 50, 75, and 100 mg/L). *K. pneumoniae* proved to be the most susceptible to AA, as the zone of inhibition of growth of these bacteria appeared already at the lowest AA concentration (25 mg/L) and it was 13 mm. The *P. aeruginosa* strain was the most resistant to AA, as a zone of growth inhibition of 6 mm appeared only after using the concentration of 100 mg/L.

In the study by Bharitkar et al. [62], AA isolated from *S. robusta* resin showed antimicrobial activity against *E. coli* ATCC 25938 and *P. aeruginosa*. The zones of inhibition for AA at the same concentration of 64 mg/L were 7 and 8 mm, respectively.

6.2. Anti-Planktonic Activity of Ursolic Acid

Many articles describe the activity of UA against planktonic forms of bacteria. UA used in these experiments was plant-derived as shown in Figure 4 or was synthetic.

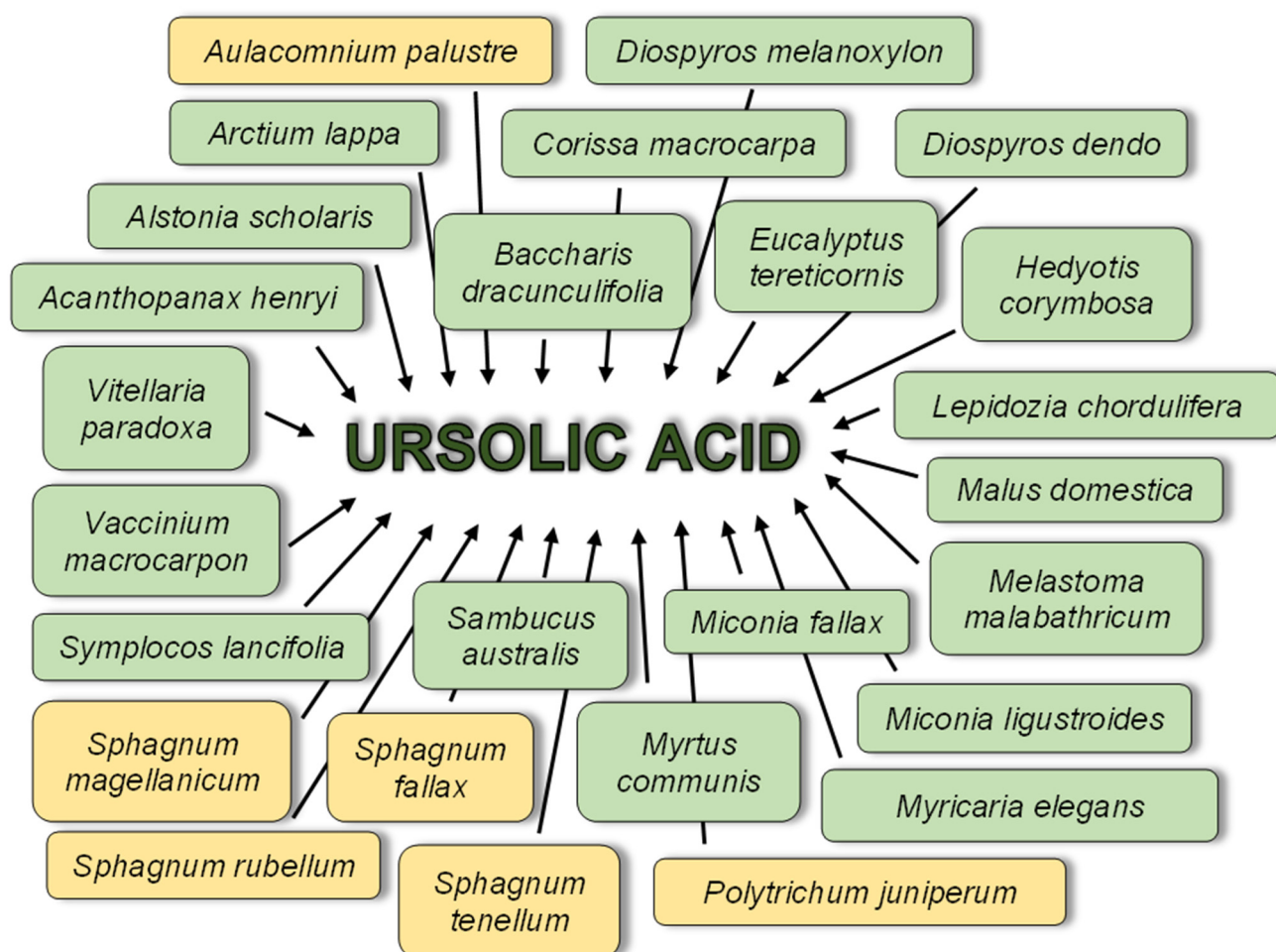


Figure 4. Plant sources of ursolic acid used in antibacterial experiments; green boxes—angiosperms; yellow boxes—bryophytes.

These articles include a very diverse range of research, for example, determination of MIC values (Table 3), the size of the growth inhibition zones (Table 4), effects of this acid on the cell morphology and virulence traits, the expression of genes associated with various metabolic pathways. There are also articles concerning the synergism of action with UA and antibiotics.

The data presented in Table 3 show that UA shows differentiated antibacterial activity. It is worth noting that this acid showed very good activity only against Gram-positive bacteria. UA isolated from *A. scholaris* showed significant activity against *E. faecalis* (MIC = 1 mg/L) and *L. monocytogenes* (MIC = 2 mg/L) [69]. UA isolated from *S. officinalis* also showed very good activity (MIC = 4 mg/L) against *E. faecalis* and *E. faecium* [70]. On the other hand, synthetic UA showed very good activity ($2 \leq \text{MIC} \leq 7.8$ mg/L) against cocci: *S. mutans*, *S. sobrinus* and *S. gordonii* [14,71], *E. faecalis* (MIC = 4 mg/L) [72], *S. aureus* ($4 \leq \text{MIC} \leq 8$ mg/L) [72–74] and *S. epidermidis* (MIC = 4 mg/L) [75], as well as against *L. monocytogenes* ($6.5 \leq \text{MIC} \leq 8$ mg/L) [75–77]. The MIC value of 8 mg/L for AU isolated from *A. scholaris* [69], *S. officinalis* [70] and *V. paradoxa* [78] was determined for *B. cereus* [69], *S. aureus* [70,78] and *S. pneumoniae* [70]. UA showed moderate activity ($10 < \text{MIC} < 100$ mg/L) against 13 species of Gram-positive bacteria [46,54,63,69,70,72,73,75,78–87] and 6 species of Gram-negative bacteria [75,79,82]. On the other hand, the low activity of UA (MIC > 100 mg/L) was described for 10 species of Gram-positive bacteria [13,46,63,72,80,88–91] and 8 species of Gram-negative bacteria [10,47,63,69,70,72,82,84,88,92,93]. The lowest sensitivity to UA (MIC ≥ 1000 mg/L) showed 5 species of Gram-positive bacteria: *B. cereus* [82], *L. monocytogenes* [82], *S. aureus* [82], *S. mutans* [94], *S. pneumoniae* [80], and 5 species of Gram-negative bacteria: *A. caveae* [82], *E. coli* [10,47,82,95], *K. pneumoniae* [80], *S. choleraesuis* [80], *V. cholerae* [80,82].

Table 3. MIC values of ursolic acid against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Bacterial Group	Species	Ursolic Acid			Ref.	
		MIC [mg/L]	Source	Antibacterial Activity		
Gram-positive	<i>Actinomyces naeslundii</i>	16	purchased ^{*A}	good	[89]	
	<i>Actinomyces viscosus</i>	32	purchased ^{*A}	good	[89]	
	<i>Bacillus cereus</i>	8	<i>A. scholaris</i>	very good	[69]	
		20	<i>M. ligustroides</i>	good	[80]	
		≥ 1024	<i>S. australis</i>	weak	[82]	
	<i>Bacillus sphaericus</i>	50	<i>D. melanoxylon</i>	good	[79]	
	<i>Bacillus subtilis</i>	25	<i>D. melanoxylon</i>	good	[79]	
	<i>Enterococcus faecalis</i>	1	<i>A. scholaris</i>	very good	[69]	
		4	<i>S. officinalis</i>	very good	[70]	
		4–256	purchased ^{*A}	very good–weak	[72]	
		16	<i>S. lancifolia</i>	good	[63]	
		32–512	purchased ^{*A}	good–weak	[46]	
		50	<i>M. fallax</i>	good	[87]	
		250	<i>M. ligustroides</i>	weak	[80]	
		<i>Enterococcus faecium</i>	4	<i>S. officinalis</i>	very good	[70]
			256	purchased ^{*A}	weak	[72]
			500	<i>C. macrocarpa</i>	weak	[88]
	<i>Listeria monocytogenes</i>	2	<i>A. scholaris</i>	very good	[69]	
		6.5	purchased ^{*A}	very good	[76]	
		8	purchased ^{*A}	very good	[75]	
8		purchased ^{*A}	very good	[77]		
≥ 1024		<i>S. australis</i>	weak	[82]		

Table 3. Cont.

Bacterial Group	Species	Ursolic Acid			Ref.
		MIC [mg/L]	Source	Antibacterial Activity	
<i>Staphylococcus aureus</i>		4–8	purchased ^{*A}	very good	[74]
		7.8 and 15.6	purchased ^{*A}	very good, good	[73]
		8	<i>S. officinalis</i>	very good	[70]
		8–16	<i>V. paradoxa</i>	very good–good	[78]
		8–>256	purchased ^{*A}	very good–weak	[72]
		10	<i>B. dracunculifolia</i>	good	[81]
		10	purchased ^{*A}	good	[75]
		16	<i>A. scholaris</i>	good	[69]
		32 and \geq 1024	<i>S. australis</i>	good, weak	[82]
		37	natural products	good	[85]
		50	<i>D. melanoxylon</i>	good	[79]
		60	natural products	good	[86]
		64	<i>A. scholaris</i>	good	[69]
		64	purchased ^{*A}	good	[83]
		64	purchased ^{**A}	good	[84]
		64	purchased ^{*A}	good	[54]
		128	<i>S. lancifolia</i>	weak	[63]
	250	<i>C. macrocarpa</i>	weak	[88]	
	250	purchased ^{*A}	weak	[90]	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		7.5	purchased ^{*A}	very good	[75]
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		250	<i>C. macrocarpa</i>	weak	[88]
<i>Streptococcus mitis</i>		50	<i>M. fallax</i>	good	[87]
<i>Streptococcus gordonii</i>		7.8	purchased ^{***A}	very good	[14]
		64	purchased ^{*A}	good	[89]
<i>Streptococcus mutans</i>		2–4	purchased ^{*A}	very good	[71]
		7.8	purchased ^{***A}	very good	[14]
		80	<i>M. fallax</i>	good	[87]
		128–256	purchased ^{*A}	weak	[91]
		250	purchased ^{****A}	weak	[13]
		256	purchased ^{*A}	weak	[89]
	1024	purchased ^{*A}	weak	[94]	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>		8	<i>S. officinalis</i>	very good	[70]
		1000	<i>M. ligustroides</i>	weak	[80]
<i>Streptococcus salivarius</i>		50	<i>M. fallax</i>	good	[87]
<i>Streptococcus sanguinis</i>		7.8	purchased ^{***A}	very good	[14]
		50	<i>M. fallax</i>	good	[87]
		128	purchased ^{*A}	weak	[89]
<i>Streptococcus sobrinus</i>		2–4	purchased ^{*A}	very good	[71]
		50	<i>M. fallax</i>	good	[87]
		64	purchased ^{*A}	good	[89]
		128	purchased ^{*A}	weak	[91]

Table 3. Cont.

Bacterial Group	Species	Ursolic Acid			Ref.
		MIC [mg/L]	Source	Antibacterial Activity	
Gram-negative	<i>Aeromonas caviae</i>	≥1024	<i>S. australis</i>	weak	[82]
		50	<i>D. melanoxydon</i>	good	[79]
		64 and 512	<i>S. australis</i>	good, weak	[82]
		>128	<i>S. officinalis</i>	weak	[70]
		>128	<i>S. lancifolia</i>	weak	[63]
		>128	<i>A. scholaris</i>	weak	[69]
		250	<i>C. macrocarpa</i>	weak	[88]
		256	purchased **A	weak	[84]
		256	purchased *A	weak	[93]
		>256	purchased *A	weak	[72]
		>256	<i>V. macrocarpon</i>	weak	[92]
		512->1024	purchased *A	weak	[10]
		512->1024	purchased *A	weak	[47]
	1000	<i>E. tereticornis</i>	weak	[95]	
	(1024	<i>S. australis</i>	weak	[82]	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	64	<i>S. australis</i>	good	[82]
		500	<i>C. macrocarpa</i>	weak	[88]
		512	purchased *A	weak	[93]
		1000	<i>M. ligustroides</i>	weak	[80]
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	22.5	purchased *A	good	[75]
		>128	<i>S. officinalis</i>	weak	[70]
		>128	<i>S. lancifolia</i>	weak	[63]
>128		<i>A. scholaris</i>	weak	[69]	
256		purchased **A	weak	[84]	
≥256		purchased *A	weak	[72]	
500		<i>C. macrocarpa</i>	weak	[88]	
512	<i>S. australis</i>	weak	[82]		
<i>Pseudomonas syringae</i>	25	<i>D. melanoxydon</i>	good	[79]	
<i>Salmonella choleraesuis</i>	1000	<i>M. ligustroides</i>	weak	[80]	
<i>Salmonella enterica</i>	>128	<i>A. scholaris</i>	weak	[69]	
<i>Salmonella typhi</i>	50	<i>D. melanoxydon</i>	good	[79]	
<i>Serratia marcescens</i>	>128	<i>S. officinalis</i>	weak	[70]	
<i>Shigella flexneri</i>	64	<i>S. australis</i>	good	[82]	
<i>Vibrio cholerae</i>	>1000	<i>M. ligustroides</i>	weak	[80]	
	≥1024	<i>S. australis</i>	weak	[82]	

* purchased from Sigma-Aldrich Chemicals Inc.; ** purchased from Santa Cruz Biotechnology; *** purchased from Macklin Inc.; **** purchased from National Institutes for Food and Drug Control; ^A—synthetic.

Table 4 presents the results of the research in which the authors marked the zones of bacterial growth inhibition in the presence of selected concentrations of UA. The largest zones of growth inhibition were recorded for Gram-positive *S. aureus* (21 mm) and Gram-negative *S. boydii* (19 mm) treated with UA (100 mg/L) isolated from *H. corymbosa*, which proves its high activity antibacterial action against these bacteria [96]. On the other hand, UA isolated from *M. malabathricum* [66] and used in concentrations of 250–2000 mg/L showed good activity against Gram-positive bacteria: *B. subtilis* (8.0–10.5 mm) and *S. aureus* (7.5–10.5 mm) and Gram-negative *S. typhi* (9.5–11.0 mm). The higher the acid concentration, the larger the zone of inhibition of growth. Interestingly, this relationship was not observed in the case of *B. cereus*, where the zone of growth inhibition was 7.0 mm regardless of the concentration of UA (250–2000 mg/L) [66].

Table 4. Growth inhibition zones and corresponding concentration values of ursolic acid against Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Bacterial Group	Species	Inhibition Zone [mm]	Ursolic acid			Ref	
			Concentration [mg/L]	Source	Antibacterial Activity		
Gram-positive	<i>Bacillus cereus</i>	7.0	250	<i>M. malabathricum</i>	active	[66]	
		7.0	500		active		
		7.0	1000		active		
		7.0	2000		active		
	<i>Bacillus subtilis</i>	8.0	250	<i>M. malabathricum</i>	active	[66]	
		9.0	500		active		
		9.5	1000		active		
		10.5	2000		active		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	21.0	100	<i>H. corymbosa</i>	very active	[96]	
		7.5	250	<i>M. malabathricum</i>	active	[66]	
		8.5	500		active		
		9.5	1000		active		
10.5		2000	active				
Gram-negative		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10.0	100	<i>H. corymbosa</i>	active	[96]
			9.5	250	<i>M. malabathricum</i>	active	[66]
		10.0	500	active			
	10.0	1000	active				
	11.0	2000	active				
	<i>Shigella boydii</i>	19.0	100	<i>H. corymbosa</i>	very active	[96]	

When analysing the data contained in Tables 1 and 3, one can observe that both AA and UA showed better antibacterial activity against Gram-positive strains. This is probably related to the differences in the structure of cellular envelopes. The structure present in Gram-negative bacteria is the outer membrane, with a specific chemical structure that makes it difficult for the penetration of antimicrobial compounds into the cell. The analysis of the data in Tables 1 and 3 also shows that the acid MIC values for the individual strains were generally higher in the case of UA than AA. The more efficient action of AA is probably due to the presence of an additional hydroxyl group at C-23, which makes the whole molecule more hydrophilic and makes it easier to reach the interior of the bacterial cells. It is also worth noting that bacteria belonging to the same group (Gram-positive/Gram-negative), and even to the same species, can significantly differ in their susceptibility to the same antibacterial compounds, resulting in different MIC values. The reasons for these differences may also be a different source/origin of microorganisms (clinical, environmental, or reference strains) and their individual characteristics. Moreover, the antibacterial activity of the acid may be related to the method of obtaining it (natural or synthetic). When analysing the data contained in Tables 2 and 4, it cannot be unequivocally shown that AA and UA exhibited better antibacterial activity against Gram-positive bacteria than against Gram-negative bacteria.

Mallavadhani et al. [79] investigated the effects of UA and its synthetic lipophilic derivatives containing ester chains of 3-O-fatty acids (C12–C18) against various bacterial species. UA was isolated from the leaves of *D. melanoxylon*. The MIC values of UA were 25 mg/L against *B. subtilis* ATCC 6051 and *P. syringae* ATCC 13457, while 50 mg/L against *B. sphaericus* ATCC 14577, *S. aureus* ATCC 9144, *E. coli* ATCC 25922, and *S. typhi* ATCC 23564. It should be noted that the antibacterial activity of UA derivatives against the analysed strains varied and it was dependent on the bacterial species, however, only in a few cases, it was better than that of pure UA.

Scalon Cunha et al. [87] evaluated the antibacterial activity of UA isolated from *M. fallax* and its semi-synthetic derivatives compared to the strains involved in plaque and

caries formation: *E. faecalis* ATCC 4082, *S. salivarius* ATCC 25975, *S. mitis* ATCC 49456, *S. mutans* ATCC 25275, *S. sobrinus* ATCC 33478 and *S. sanguinis* ATCC 10556. The MIC values of UA against all the aforementioned strains were in the range of 50–80 mg/L. In contrast, the MIC values of UA derivatives were generally higher. The stronger antibacterial activity of UA compared to its derivatives suggests that the free hydroxyl group at C-3 and the carboxyl group at C-17 are primarily responsible for this activity.

According to the study by Horiuchi et al. [70], UA exhibited antibacterial activity against Gram-positive cocci such as methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), penicillin-resistant *S. pneumoniae* (PRSP), and vancomycin-resistant enterococci (VRE): *E. faecalis* and *E. faecium*. The MIC values were 8, 8, and 4 mg/L, respectively. At a concentration of $2 \times$ MIC, UA showed the bactericidal activity against VRE for at least 48 h. UA showed a stronger bactericidal activity against *E. faecium* than ampicillin. UA showed only a bacteriostatic activity against *E. faecalis*. However, UA was not active against Gram-negative bacteria: *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. marcescens*, or against mutants of *E. coli* and *P. aeruginosa*, which are hypersensitive to drugs due to the absence of multidrug efflux pumps (MDR pumps). The MIC value against those strains was >128 mg/L.

The study by Ahmad et al. [97] determined the antimicrobial activity of UA isolated from the aerial parts of *M. elegans* against *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *E. coli*, and *S. flexneri*. UA revealed the antibacterial activity against *B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. typhi* for which growth inhibition zones were 12, 15, 16, and 18 mm, respectively. UA did not inhibit the growth of the other two strains.

Fontanay et al. [72] determined MIC for UA against five reference strains: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 and ATCC 29213, *E. faecalis* ATCC 29212 and *P. aeruginosa* ATCC 27853, as well as five antibiotic-resistant clinical isolates: *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, and *P. aeruginosa*. UA was found to be highly effective against Gram-positive bacteria: *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC = 4 mg/L) and *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 29213 (MIC = 8 mg/L). UA had no antibacterial activity against *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and all clinical strains (MIC > 256 mg/L).

Da Silva Filho et al. [81] showed that UA isolated from *B. dracunculifolia* leaves had antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA). The growth inhibitory concentration for 50% was $IC_{50} = 5$ mg/L and the MIC value was 10 mg/L.

Huang et al. [92] identified the presence of UA in one fraction of an extract prepared from *V. macrocarpon* cranberry fruit. The MIC value of the extract determined against strains of uropathogenic *E. coli* ATCC 700336 and ATCC 25922 was >256 mg/L. The extract fraction at 10 mg/L also inhibited COX-2 activity and the activity of nuclear transcription factor, NF- κ B.

Cunha et al. [80] evaluated the activity of UA isolated from *M. ligustroides* and its derivatives against *B. cereus* ATCC 14579, *V. cholerae* ATCC 9458, *S. choleraesuis* ATCC 10708, *K. pneumoniae* ATCC 10031, and *S. pneumoniae* ATCC 6305. UA was active only against *B. cereus*, showing the MIC value of 20 mg/L; the MIC values for other strains were 1000 mg/L or higher. UA derivatives were effective only against *S. pneumoniae*; their MIC values were 50 mg/L.

According to Kurek et al. [76], UA improved the lytic activity of Triton X-100 and lysozyme against the strain of *L. monocytogenes*. After 24-h incubation in the presence of UA at a concentration of $0.7 \times$ MIC (4.5 mg/L), bacterial cell length was reduced by 20% compared to the control and it did not exceed 2 μ m.

Sultana et al. [96] studied the antibacterial activity of UA isolated from *H. corymbosa* against 4 strains of Gram-positive bacteria: *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. lutea*, and *S. aureus*, as well as 10 Gram-negative strains: *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*, *S. paratyphi A*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhi*, *S. flexneri*, *V. cholerae*, and *K. pneumoniae*. UA at 100 mg/L showed significant activity against *S. aureus* (21 mm diameter zone of inhibition) and *S. boydii* (19 mm), whereas a moderate activity against *P. aeruginosa* (10 mm). Unfortunately, a weak activity of UA against other microorganisms (zones of inhibition of 6–10 mm) was reported.

Acebey-Castellon et al. [63] found that UA derived from *S. lancifolia* leaves showed a stronger antibacterial activity against Gram-positive *S. aureus* ATCC 25923 and *E. faecalis* ATCC 29212, and a weaker activity against Gram-negative *E. coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853. The MIC values ranged from 16 to >128 mg/L and they were lowest against *E. faecalis*.

Filocamo et al. [73] analysed the antibacterial activity of UA (also combined with norfloxacin) against *S. aureus* ATCC 29213, *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA), and 42 clinical isolates of *S. aureus*. The MIC and MBC values of UA against *S. aureus* ATCC 29213 were 7.81 mg/L and 124.96 mg/L, respectively. MRSA strain was more resistant to UA, the MIC and MBC values were 15.62 mg/L and 249.92 mg/L, respectively. The synergistic effect of UA and the antibiotic was proved by the combination of $0.25 \times$ MIC of norfloxacin with $1 \times$ MIC of UA, which inhibited the growth of 21 of 42 clinical strains, while the combination of $0.5 \times$ MIC of norfloxacin with $2 \times$ MIC of UA inhibited as many as 90% of the strains. Against *S. aureus* strain ATCC 29213, UA at a concentration of $1 \times$ MIC showed no postantibiotic effect (PAE), while at a concentration of $2 \times$ MIC it exerted a very short PAE (2 h). Administration of UA combined with norfloxacin resulted in the prolongation of PAE up to 14.5 h (at $1 \times$ MIC of UA) and 21 h (at $2 \times$ MIC of UA). There was a significant prolongation (25.3–29.1 h) of the postantibiotic sub-MIC effect (PASME) through preincubation of *S. aureus* ATCC 29213 cells in sub-inhibitory concentrations of norfloxacin. The synergistic effect of UA and norfloxacin may be due to initial damage to the bacterial membrane caused by lipophilic UA, which increases its permeability to norfloxacin. Enhanced intracellular accumulation of norfloxacin results in increased bacterial DNA damage and thus longer PAE and PASME.

Kim et al. [71] determined the antibacterial activity of UA against *S. mutans* ATCC 25175, *S. sobrinus* ATCC 33478, 40 clinical strains of *S. mutans*, and 15 clinical strains of *S. sobrinus*, which are involved in dental caries. The MIC value of UA against both reference strains was 2 mg/L while the MBC values were >4 mg/L for *S. mutans* ATCC 25175 and 8 mg/L for *S. sobrinus* ATCC 33478. The MIC value of UA was 2 mg/L for most clinical strains. The exceptions were 1 strain of *S. mutans* and three strains of *S. sobrinus* (MIC = 4 mg/L). Based on the obtained results, the authors suggested that UA at concentrations >8 mg/L could be used as an ingredient in oral hygiene products to prevent dental caries.

Moodley et al. [88] used UA isolated from the leaves of *Carissa macrocarpa* in their study. The acid revealed a moderate antibacterial activity against three Gram-negative bacterial strains: *K. pneumoniae* ATCC 700603, *P. aeruginosa* ATCC 35032, *E. coli* ATCC 25922, as well as four Gram-positive strains: *S. saprophyticus* ATCC 35552, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43300, and *E. faecium* ATCC 19434. The MIC values of that acid were 250–500 mg/L. Moodley et al., in their study, also identified the effect of UA at concentrations of $0.5 \times$ MIC, $1 \times$ MIC, and $2 \times$ MIC on the adhesion of all the above-listed strains to polystyrene surfaces. The adhesion of *E. coli* and *S. aureus* cells was reduced under the influence of all acid concentrations used. In the case of *P. aeruginosa*, there was reduced adhesion only with exposures to UA at $0.5 \times$ MIC and $1 \times$ MIC concentrations while there was enhanced adhesion during the exposure to $2 \times$ MIC. On the other hand, the adhesion of *S. saprophyticus* was enhanced during exposure to $0.5 \times$ MIC and it was reduced under the influence of $1 \times$ MIC and $2 \times$ MIC. It should be noted that the adhesion of *K. pneumoniae* to polystyrene surfaces enhanced after their exposure to all UA concentrations under analysis.

Kim et al. [74] identified the antibacterial activity of UA against 19 clinical strains of MRSA. The MIC value of UA for the analysed 15 strains was 4 mg/L while for the remaining strains—8 mg/L. Greater variation was observed for MBC values, which ranged between 4–32 mg/L.

According to the study by Kurek et al. [75], UA revealed significant antimicrobial activity against planktonic cells of strains such as *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ATCC 29213, and *S. epidermidis* ATCC 12228. MIC values ranged from 7.5 mg/L for

S. epidermidis to 22.5 mg/L for *P. aeruginosa*. Furthermore, the authors demonstrated the synergism of action of UA combined with β -lactam antibiotics (ampicillin and oxacillin). It should be noted that bacteria that were cultured in the presence of both components (UA + oxacillin or UA + ampicillin) became more susceptible to each of them. The most significant effect was observed for *S. aureus* and UA + ampicillin combination. The MIC value for ampicillin was reduced as much as 16-fold, that is, from 4 mg/L to 0.25 mg/L. These results indicate that UA when administered in combination with β -lactams, may be useful in the treatment of bacterial infections.

Wong et al. [66] proved using the agar diffusion method that UA derived from the methanolic extract of *M. malabathricum* leaves exhibited antimicrobial activity against *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis*, *B. cereus* ATCC 10876, and *S. typhi*. For UA at 2000 mg/L, the zones of inhibition of the tested strains were 10.5, 10.5, 7.0, and 11.0 mm; for UA at 1000 mg/L, they were 9.5, 9.5, 7.0, and 10.0 mm; for UA at 500 mg/L, they were 8.5, 9.0, 7.0, and 10.0 mm; and for UA at 250 mg/L, they were 7.5, 8.0, 7.0 and 9.5 mm, respectively. UA was not active against *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 17853, and *K. pneumoniae* at any of the analysed concentrations.

Wojnicz et al. [47], in addition to the previously described antimicrobial properties of UA, also investigated the effects of UA on the survival and virulence factors of 20 clinical UPEC strains isolated from the urine of patients with pyelonephritis. The MIC value of UA against 18 of 20 analysed bacilli was ≥ 1024 mg/L. The MIC of that acid was 512 mg/L for only two strains. It was also found that the reduction in the growth of planktonic forms was dependent on both incubation time and UA concentration. UA at a concentration of 40 mg/L significantly reduced the survival of planktonic forms only after 24 h, while at a concentration of 50 mg/L as early as in a 6-h culture. Moreover, UA revealed significant effects on virulence traits of bacilli such as P fimbriae, curli fimbriae, and the ability to synthesise α -hemolysin. The lowest used UA concentration (10 mg/L) resulted in a loss of haemagglutinating capacity associated with the presence of P fimbriae in 20% of the bacilli under analysis. The loss of curli fimbriae, the anti-hemolytic effect, and impaired bacterial motility were observed only after using UA at concentrations of 40 μ g/mL and 50 mg/L. The other study [10] reports the effect of UA on surface hydrophobicity and adhesion of clinical UPEC strains to uroepithelial cells. According to the authors, UA reduced the hydrophobic nature of the bacterial cell surface. At the highest concentration used (50 mg/L), UA significantly reduced the number of *E. coli* bacilli adhering to uroepithelial cells. That acid, at a concentration of 50 mg/L, also induced morphological changes in bacterial cells. In UA-treated cultures, there were increased numbers of short filaments (5–15 μ m). There were also long filaments (>15 μ m), thickened cells with swollen filaments, and cells partially devoid of a cell wall ("ghost cells").

Do Nascimento et al. [82] determined MIC values for UA and its derivatives isolated from *S. australis* against 12 bacterial strains. UA revealed the strongest activity against *S. aureus* ATCC 6538 (MIC = 32 mg/L). UA was also effective against *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 10031, and *S. flexneri* ATCC 12022 (MIC = 64 mg/L). In the case of *E. coli* ATCC 27 and *P. aeruginosa* ATCC 15442, the MIC value was identical (512 mg/L). The six other strains, that is, *S. aureus* ATCC 12692, *S. aureus* ATCC 12624, *B. cereus* ATCC 33018, *A. caveae* ATCC 15468, *V. cholera* ATCC 15748, and *L. monocytogenes* ATCC 19117 were insusceptible to UA (MIC ≥ 1024 mg/L). The researchers also found the synergism of action of UA combined with aminoglycosides (neomycin, amikacin, kanamycin, and gentamicin). MIC values of those antibiotics were reduced in the presence of UA against almost all microorganisms, excluding gentamicin and amikacin against *E. coli* ATCC 25922 and kanamycin against *P. aeruginosa* ATCC 15442 and *K. pneumoniae* ATCC 10031.

Dwivedi et al. [95] investigated the antibacterial properties of UA isolated from *E. tereticornis* leaves and its lipophilic derivatives. Three strains were used in a study by Dwivedi et al.: nalidixic acid-sensitive *E. coli* CA8000, nalidixic acid-resistant *E. coli* DH5 α , and the MDREC-KG4 clinical isolate of *E. coli* that is resistant to multiple antibiotics, including tetracycline. The MIC value of UA against all *E. coli* strains was 1000 mg/L. Similarly,

the MIC values of lipophilic derivatives against bacilli were very high (500–1000 mg/L), indicating their lack of antibacterial activity. However, it should be emphasised that the authors found the synergistic effect of both UA and its derivatives combined with nalidixic acid against *E. coli* CA8000 and *E. coli* DH5 α , as well as with tetracycline against *E. coli* MDREC-KG4. When applied at a concentration of 10 mg/L, UA and its derivatives combined with nalidixic acid reduced the MIC values of this antibiotic against *E. coli* CA8000 and *E. coli* DH5 α by 2-fold (UA) and 4–8-fold (UA derivatives). On the other hand, UA and its derivatives at a concentration of 50 mg/L and combined with tetracycline, reduced the MIC values of this antibiotic against *E. coli* MDREC-KG4 strain by 2-fold and 8-fold, respectively.

Park et al. [98] determined the effect of UA (64 mg/L) on the expression of 22 genes that are important in all three steps of peptidoglycan biosynthesis in *S. mutans* UA159. UA inhibited transcription of all genes involved in the first step (*glmU*, *murA*, *murB*, *murC*, *murC2*, *murD*, *murE*, *arl*, *ddl*, *murI*, *murF*) and second step of peptidoglycan biosynthesis (*bacA*, *mraY*, *murG*, *murM*, *murN*), and of most genes involved in the third step of murein synthesis (*pbp2a*, *pbp2b*, *pbp2x*, *dacA*). These studies clearly indicate that inhibition of gene expression is one of the mechanisms of the antimicrobial activity of UA.

A study by Wang et al. [69] revealed good antibacterial activity of UA, isolated from *A. scholaris* leaves, against Gram-positive strains of *E. faecalis* ATCC 29212 (MIC = 1 mg/L), *L. monocytogenes* ATCC 7644 (MIC = 2 mg/L), *B. cereus* ATCC 9139 (MIC = 8 mg/L), methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) ATCC 29213 (MIC = 16 mg/L) and *S. aureus* ATCC 43300 (MRSA) (MIC = 64 mg/L), while a weaker antibacterial activity (MIC >128 mg/L) was against Gram-negative *E. coli* ATCC 35150, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. enterica* ATCC 13311. Synergism was also found in the joint action of 0.5 \times MIC of UA and 0.5 \times MIC of ampicillin or tetracycline against *B. cereus* strains, MSSA and MRSA. The reduction in viable cell counts in 24-h cultures was >4 log₁₀.

Wang et al. [83] investigated the effect of supra-inhibitory UA concentration on cell membrane integrity and changes in the expression of 29 proteins involved in transcription, translation, and various metabolic pathways in MRSA strain cells. The MIC value of UA was 64 mg/L. After the cocci had been exposed to UA at a concentration of 4 \times MIC, the bacteria retained 49.5% of their cell membrane integrity. UA enhanced the synthesis of 18 proteins, of which the highest expression was observed for RplU (translation), AhpC (oxidative stress protein), ClpC (protein folding and RNA degradation processes), Mqo2 (tricarboxylic acid cycle), and Adh (alcohol dehydrogenase). The obtained results indicate that UA, due to its pleiotropic activity against MRSA, is a promising antimicrobial agent that should be given more attention in pharmaceutical research.

UA isolated from *V. paradoxa* leaves revealed good antimicrobial activity against reference *S. aureus* ATCC 33591 and clinical MRSA strains [78]. The MIC values of that acid were 8–16 mg/L and they were significantly lower than the MIC values of ampicillin and oxacillin (32–512 mg/L). The authors also found the presence of synergism between UA and β -lactam antibiotics (ampicillin and oxacillin), resulting in reduced MIC values for both drugs. The obtained results suggest a bidirectional mechanism of UA action. As it is known, a penicillin-binding protein (PBP2A) and β -lactamases are involved in the resistance of methicillin in staphylococci. Therefore, the authors suggested that UA might restore the affinity of PBP2A protein to β -lactam antibiotics and restore β -lactamase activity. Through observation by a fluorescence microscope, the authors proved that UA, like oxacillin, induces the delocalisation of PBP2 from the site of a dividing septum and its redistribution within the cell membrane, leading to disruption of cell division.

Oloyede et al. [84] found that the antimicrobial activity of UA is directly due to its oxidative properties. Preliminary studies identified the antimicrobial activity of UA against *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *S. aureus* ATCC 29213 strains. The MIC values against these bacteria ranged from 64–256 mg/L, while the MBC values ranged from 256–512 mg/L. According to further studies, UA can generate the production of reactive oxygen species (ROS), especially superoxide anion radical and hydroxyl radical, in

bacterial cells. They cause enhanced electron transport chain activity, resulting in oxidative stress, lipid peroxidation, and oxidation of 2-deoxyribose in DNA, leading to bacterial cell death. Increased amounts of ROS are associated with dysfunctions in the conversion reactions of glutathione, a natural free radical scavenger. The authors proved that UA decreased the level of reduced glutathione in bacterial cells while increasing the number of its oxidised molecules, which contributed to a significant decrease in bacterial survival due to an increase in oxidative stress indices.

Wojnicz et al. [46], in addition to their previously presented research concerning the effect of AA on clinical uropathogenic *E. faecalis* strains, also analysed the antibacterial effect of UA against cocci that are a common cause of UTIs, especially in catheterised patients. The bacteria were resistant to gentamicin, nitrofurantoin, ampicillin, and trimethoprim/sulphamethoxazole. The MIC values of UA against *E. faecalis* strains were 32–512 mg/L, which corresponds to other available literature data. It was noted that the growth of planktonic forms of *E. faecalis* was inhibited under the influence of $0.75 \times \text{MIC}$ of UA as early as in the 2-h culture, while in the 6-h culture, the greatest 780-fold reduction was observed in the number of CFU/mL of viable cells compared to the control sample. It was also found that in the presence of UA, *E. faecalis* cells were larger and they formed aggregates instead of characteristic chains. It is likely that UA impairs cell division processes, which may cause phenotypic changes in cell morphology, such as increased cell diameter and the presence of irregular aggregates. Moreover, it was found that UA significantly reduced, and in some cases completely inhibited, the ability of *E. faecalis* strains to synthesise DNase and extracellular enzymes (lipase, lecithinase, gelatinase) and haemolysin that damage host tissues.

Zhou et al. [99] investigated the antibacterial activity of ursolic acid 3-O- α -L-arabinopyranoside (URS), isolated from *A. henryi* leaves, against *S. aureus* strains. The MIC values were found to be 3.125 mg/L against MSSA strain and 6.25 mg/L against MRSA strains. The authors also found the existence of synergism between URS and oxacillin against MRSA strains. The addition of $0.5 \times \text{MIC}$ of URS reduced the MIC values of oxacillin by 2–32-fold according to strain. The study also determined the effect of URS on the morphology of MRSA strain cells. URS at a concentration of $0.5 \times \text{MIC}$ damaged the bacterial cell membrane and caused surface roughness. The authors also noted a slight decrease in membrane protein PBP2A levels under the influence of URS. A significant decrease in PBP2A levels, cell membrane disintegration, and bacterial cell lysis were only observed in the assay containing the combination of URS with oxacillin.

Jabeen et al. [100] investigated the activity of hydrazide of UA and its 11 derivatives with metals against Gram-negative *S. typhi* and *Shigella* spp., as well as Gram-positive *S. aureus* and *S. pneumoniae*. The MIC value of hydrazide of UA against the above-mentioned strains was >256 mg/L. Furthermore, it was found that the antibacterial activity of the hydrazide of UA might be enhanced by producing complexes with various metals (Zn, Cu, Fe, Sb), then the MIC values were 4–32 mg/L. The complex with triphenyltin proved to be the most potent antimicrobial agent, with the MIC values of 4 mg/L against *S. pneumoniae* and 8 mg/L against other strains.

Sundaramoorthy et al. [93] determined the MIC for UA against extremely drug-resistant (XDR) clinical strains of *E. coli* (MIC = 256 mg/L) and *K. pneumoniae* (MIC = 512 mg/L). The researchers found that UA exhibited the synergism of action with colistin, causing a significant 16-fold reduction in colistin MIC for *E. coli* and a 4-fold for *K. pneumoniae*. Moreover, UA enhanced the permeability of the bacterial outer membrane, and that facilitated the transport of colistin into the bacterial cell. Furthermore, UA inhibited the activity of efflux pumps, which in turn impeded the removal of the antibiotic from the bacterial cell.

When analysing the antibacterial activity of AA or UA, it can be noticed that their antimicrobial activity (MIC/inhibition zone) may be different for the same bacterial species. However, there are several different aspects to consider. First, there are many different bacterial strains within a species, all from different origins (biological material from which it was isolated, e.g., urine, faeces, blood, etc.). Secondly, the acids used in separate studies

often have different origins, that is, they are isolated from different plant species. Moreover, the methods of extracting these metabolites often vary.

7. Anti-Biofilm Properties of Pentacyclic Triterpenes

It is currently known that more than 99% of both commensal and pathogenic bacteria in the human body occur in a biofilm form. Biofilms are formed on the surface of dead cells (skin microflora), viable cells (mucous membrane microflora), and abiotic surfaces found in the human body (catheters, implants). Consortia formed from pathogenic bacteria are difficult to destroy with antibiotics, so it is useful to learn about the effects of AA and UA on biofilm structure and their interaction with drugs used in the treatment of bacterial infections.

7.1. Activity of Asiatic Acid against Bacterial Biofilms

A negligible number of articles have been devoted to the effect of AA on biofilm formation and eradication. Therefore, we decided to analyse available research in the current review in which the antibiofilm properties of AA combined with antibiotics were also highlighted.

Garo et al. [64] investigated the effect of AA and its combinations with ciprofloxacin or tobramycin on single-species *P. aeruginosa* biofilm. A rotating disk reactor (RDR) was used in that study as a model device to study the susceptibility of biofilms to antibiotics and other compounds. The MIC value of AA for *P. aeruginosa* was >128 mg/L. AA at concentrations of 10, 50, and 100 mg/L was used in that study. Only a small degree of biofilm reduction was observed under the influence of AA at concentrations of 50 and 100 mg/L. However, it should be noted that the lowest concentration of AA (10 mg/L) enhanced the susceptibility of biofilm-living *P. aeruginosa* to both tobramycin (100 mg/L) and ciprofloxacin (10 mg/L), which previously showed no antibiofilm effect.

Wojnicz et al. [49] conducted a study determining the effect of AA and its combinations with ciprofloxacin on biofilm formation and eradication. Uropathogenic *E. coli* strains (reference ATCC 700928 strains and clinical strains), with virulence traits relevant to biofilm formation, were used in that study. AA at a concentration of 50 mg/L weakly inhibited the biofilm formation by *E. coli* strains. A significantly better effect was obtained when AA was used in combination with ciprofloxacin. Similarly, during the eradication of biofilm from urological catheters, statistically significant results were obtained only when AA was used in combination with ciprofloxacin. The number of viable bacteria was reduced to 12%. In another study, Wojnicz et al. [46] investigated the effect of $0.75 \times \text{MIC}$ of AA on biofilm production by clinical *E. faecalis* strains. The MIC values of AA against the analysed strains were 64–128 mg/L. The complete inhibition of biofilm synthesis by tested cocci was demonstrated throughout the duration of the experiment (1–10 days). The survival rate of bacteria in the biofilm mass was significantly reduced under the influence of AA compared to control samples.

Surprising results were obtained by Harnvoravongchai et al. [11]. The research revealed that AA even at a concentration of 80 mg/L ($8 \times \text{MIC}$) had no inhibitory effect on biofilm formation by the highly virulent reference strain of *C. difficile* R20291.

The recent study of Sycz et al. [9] revealed that AA decreased the survival and the ability to create single- and multi-species biofilms by uropathogenic *E. coli* CFT073, *E. cloacae* ATCC-BAA 2468, *P. aeruginosa* ATCC 25000 strains. AA also changed the morphology of these bacteria.

7.2. Activity of Ursolic Acid against Bacterial Biofilms

Much more attention was paid to the antibiofilm properties of UA compared to AA. The following articles describe the effects of UA on biofilm mass formation and the expression of genes encoding virulence factors associated with biofilm synthesis. Few articles highlighted the synergistic effect of UA and antibiotics on biofilm formation.

Ren et al. [101] analysed the antimicrobial activity of UA isolated from *Diospyros dendo* leaves. UA at a concentration of 10 mg/L already showed significant antimicrobial activity against 24-h single-species biofilms formed by *E. coli* (including ATCC 25404), *P. aeruginosa*, and *V. harveyi* strains, reducing the amount of biofilm mass they produced by 72%, 87%, and 57%, respectively. Interestingly, UA at concentrations of 10 and 30 mg/L did not inhibit the growth of the aforementioned strains growing in planktonic forms. It was also found that UA did not affect quorum sensing. In contrast, UA at concentrations of 10 and 30 mg/L induced the expression of genes encoding proteins related to chemotaxis (*cheA*, *motAB*, *tap*, *tsr*), heat shock (*hslSTV*, *htpG*, *mopB*), and membrane transport (*dcuA*, *emrK*, *malE*). It should be noted that overexpression of the *motAB* gene makes cells too motile to remain stable within the biofilm environment, resulting in reduced biofilm formation. Conversely, low cell motility caused by loss of the *motAB* gene promotes bacterial conjugation, which promotes biofilm development. The authors found that UA (at concentrations of 10 and 30 mg/L) inhibited the operon *cysDJK* regulated by CysB. The CysB protein is a transcriptional regulator of LysR that controls the expression of genes involved in cysteine biosynthesis and sulphur metabolism. The CysB pathway is an interesting potential target pathway for UA and other TPs. According to that study, UA can modulate *cysB* gene expression in *E. coli*. The *cysB* mutant enhanced biofilm formation by 2–10-fold compared to the isogenic *cysB* strain.

According to Kurek et al. [75], single-species biofilms formed by *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ATCC 29213 and *S. epidermidis* ATCC 12228 strains had approx. 4-fold higher resistance to UA, compared to planktonic cells. Administration of UA along with β -lactam antibiotics (ampicillin and oxacillin) reduced MBIC (Minimum Biofilm Inhibitory Concentration) of both UA and antibiotics against the aforementioned bacterial strains.

Kim et al. [102] evaluated the effect of UA on biofilm formed by *S. mutans* UA159 cocci that play a key role in the pathogenesis of dental caries. UA in concentrations of 0.1, 0.2, and 0.5 % (*w/w*) was used for saturating the composite resin disks in that study. The disks were soaked in a culture of *S. mutans*, which was incubated for 24 h and then plated on nutrient agar to measure the number of CFU/mL. It was found that the number of bacteria reduced with an increasing concentration of UA. However, it should be noted that a better antibacterial effect of UA was obtained in cultures where glucose was the carbohydrate source than in those containing sucrose.

Zhou et al. [89] also investigated the effects of UA on caries-forming bacteria living both in planktonic form and in biofilm consortia. In addition to *S. mutans* UA159 strain, the researchers used three other strains from the genus *Streptococcus* (*S. sanguinis* ATCC 10556, *S. gordonii* ATCC 10558, and *S. sobrinus* ATCC 6715), as well as two strains from the genus *Actinomyces* (*A. viscosus* ATCC 15987, *A. naeslundii* ATCC 12104). The MIC values of UA were significantly lower against *Actinomyces* spp. (16 mg/L and 32 mg/L) than its MIC values against *Streptococcus* spp. (64–256 mg/L). The researchers found that UA at the sub-inhibitory concentration ($0.25 \times \text{MIC}$) inhibited biofilm formation by *S. mutans* and *S. gordonii* on titer plates as well as *S. mutans* and *A. viscosus* on the tooth surface. The study also attempted to eradicate mature biofilms formed by *S. mutans* and *A. viscosus* from the tooth surface using supra-inhibitory concentrations of UA. A much better effect was obtained against *A. viscosus*, which is largely related to the less compact structure of the biofilm formed by that strain compared to the biofilm formed by *S. mutans*. The exopolysaccharide of *S. mutans*, due to the presence of extracellular matrix glucans, is much denser and much more compact, which presumably made it much more difficult for UA to penetrate the inside of the biofilm formed by these cocci and for the bacteria to survive in central parts of the biofilm.

Kurek et al. [77] investigated the effects of UA on two major virulence factors of *L. monocytogenes*—haemolytic activity and biofilm synthesis. After the MIC (8 mg/L) and MBIC (24 mg/L) values of UA had been measured, the researchers determined the effect of sub-inhibitory concentrations of UA on the production of listeriolysin O by *L. monocytogenes*, biofilm formation ability, and survival of bacteria living in the biofilm mass. It was reported

that UA at a concentration of $0.75 \times \text{MIC}$ inhibited the activity of listeriolysin O almost by 3-fold. A concentration of $0.5 \times \text{MBIC}$ of UA attenuated biofilm formation by more than 60% and it reduced the survival of *L. monocytogenes* cells in biofilms by 56%.

The aim of a study by Micota et al. [90] was to determine the effect of UA on adhesion and biofilm formation by coagulase-positive *S. aureus* strains that are a common cause of infective endocarditis. Titre plates with wells coated with fibrinogen, fibronectin, and collagen were used in that study. UA at a concentration of $0.75 \times \text{MIC}$ (187.5 mg/L) significantly reduced the bacterial adhesion to surfaces coated with matrix proteins: collagen by 73.2%, fibronectin by 58.8%, and fibrinogen by 65.9%. The impairment of adhesion activities of staphylococci under the influence of UA contributed to significant inhibition of biofilm formation by these bacteria on analysed surfaces (70–86%).

Qin et al. [85] proved that UA at a concentration of 30 mg/L inhibited biofilm formation by a clinical MRSA strain by 66.3%. However, UA did not eradicate the mature biofilm formed by those bacteria. The researchers also attempted to determine the mechanism of the antibiofilm activity of UA at the molecular level. They investigated the expression levels of key genes encoding virulence factors such as surface proteins, capsule polysaccharides, and other compounds associated with biofilm formation by *S. aureus*. According to the researchers, the presence of UA resulted in reduced expression of genes encoding adhesins (*isdB*, *srtB*, *ebh*, *sdrC*) and some genes related to metabolism (*arcA*, *arcB2*, *arcD*, *aur*), which are considered important for biofilm survival.

Zou et al. [91] determined the synergistic effect of UA and xylitol on biofilm synthesis by *Streptococcus* bacteria that are the main aetiological agent of dental caries in humans. Reference strains of *S. sobrinus* ATCC 33478 and *S. mutans* UA159 as well as 2 clinical strains of *S. mutans* (KCOM 1207 and KCOM 1128) were used in that study. The MIC values of UA were 128–256 mg/L and the MBC values ranged from 256–512 mg/L, according to the analysed strain. Interestingly, both the MIC and MBC values of xylitol were identical regardless of the analysed strain. The most UA-susceptible strains were found to be *S. mutans* KCOM 1207 and *S. sobrinus* ATCC 33478. The synergism of action of UA and xylitol was investigated by using combinations of these two components at different concentrations. Combinations of 20% xylitol with sub-inhibitory concentrations of UA (16 or 32 mg/L) significantly reduced biofilm formation by analysed streptococci.

Gilabert et al. [103] investigated the antimicrobial activity of UA isolated from the liverwort *Lepidozia chordulifera* against reference strains of *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *S. aureus* ATCC 6538P. UA at a concentration of 50 mg/L did not decrease the amount of biofilm mass produced by *P. aeruginosa*, but it resulted in a 33% increase in biofilm production by *S. aureus* compared to the control. Moreover, UA had a stimulating effect on the growth of both *P. aeruginosa* and *S. aureus*, increasing the number of these bacteria by 41% and 12%, respectively. It should be noted that despite the lack of antibiofilm properties, UA reduced the activity of elastase (LasB), produced by *P. aeruginosa*, by 96%. It is believed that this enzyme affects biofilm architecture and functionality [104], while inhibition of LasB activity reduces bacterial adhesion, microcolony formation, and EPS binding in the biofilm [105].

Lou et al. [106] conducted a study concerning the effect of different components, isolated from *Arctium lappa* leaves, on the ability of biofilm synthesis by *P. aeruginosa* ATCC 9027. UA, along with rutin, caffeic acid, coumaric acid, and quercetin, was found to be one of the five best-performing antibiofilm substances present in *A. lappa* leaves. The lowest UA concentration that completely inhibited biofilm formation by *P. aeruginosa* was 500 mg/L.

Tan et al. [86] extended the research by Qin et al. [85] concerning the identification of the antibiofilm mechanism of UA activity at the molecular level. A reference strain of *S. aureus* ATCC 2592 (MSSA), which can form a vancomycin-resistant biofilm, was used in that study. The identified MIC and MBC values for UA were 60 mg/L and >200 mg/L, respectively. It was found that UA inhibited biofilm mass growth by 46.5%. The expression of six genes (*agrA*, *hld*, *icaR*, *spa*, *cna*, *bbp*) involved in biofilm formation in UA-treated bacteria was also investigated. Based on the analysis of obtained results, the mechanism of

biofilm formation of the MSSA strain was different from that of the MRSA strain analysed by Qin et al. [85]. The difference is due to the lack of the role of an accessory gene regulator (*agr*) in the MSSA strain. These findings also suggest that biofilms of the MSSA strain may be more resistant to antibiotics than biofilms of the MRSA strain that has a fully functional *agr*.

Studies determining the effect of UA and UA combined with ciprofloxacin on the process of biofilm formation and eradication were also conducted by Wojnicz et al. [49]. The researchers used polystyrene microtiter plates and silicone urological catheters as adhesive surfaces. The reference *E. coli* strain CFT073 (ATCC 700928) and 10 uropathogenic clinical *E. coli* strains with genes encoding proteins that are important in biofilm formation were used in those studies. On titre plates, both ursolic acid and its combination with ciprofloxacin showed anti-biofilm activity, especially in older biofilms. There was a decrease in both the amount of produced biofilm mass and the number of viable bacteria. Unfortunately, UA used alone had a weak effect on the eradication of biofilm from urological catheters. Statistically significant eradication of the biofilm mass was obtained only after treatment with a mixture of UA and ciprofloxacin.

The subject of a study by Feuillolay et al. [107] was *P. acnes*, an opportunistic strain of Gram-positive bacteria that is resistant to many tetracyclines and macrolide antibiotics. *P. acnes* grows as a biofilm on biomedical materials (implants) and in hair follicles of the skin, causing acne vulgaris. *Myrtus communis* leaf extract, in which UA content was quantified by HPLC and it was 20%, showed significant antibacterial activity against *P. acnes* strains that are insusceptible to erythromycin and clindamycin, growing both in suspended matter and forming a biofilm. The analysed extract, at concentrations of 10–1000 mg/L, inhibited biofilm formation and reduced the structured 48-h biofilm of *P. acnes*. The authors also determined the antibacterial properties of the extract (10 mg/L) combined with erythromycin (1000 mg/L) or clindamycin (500 mg/L). In those combinations, the analysed extract restored susceptibility of *P. acnes* strains to both erythromycin and clindamycin.

According to Chung et al. [94], when added to standard dental material (3 mg UA per 1 mL material), UA had the ability to inhibit biofilm formation by *S. mutans* UA159 on the tooth surface.

Ray et al. [108] analysed the effect of UA (30 mg/L) on biofilm mass synthesis by a clinical strain of *S. marcescens*. These bacilli may be the cause of catheter-related UTIs. UA was found to inhibit biofilm formation by the analysed bacterial strain.

Other Wojnicz et al. studies [46] investigated the effects of UA on biofilm production and survival of ten clinical *E. faecalis* strains. Although UA at a concentration of $0.75 \times \text{MIC}$ did not exhibit any significant inhibitory effect on biofilm mass synthesis, it significantly reduced the survival of cocci at all stages of 10-day biofilm development.

Jyothi et al. [109] investigated the antibiofilm activity of UA against 50 *S. aureus* strains with *icaD* adhesion gene involved in biofilm production. Inhibition of biofilm formation was observed in 40 isolates of the analysed strains, and it was 48.6% for UA applied at a concentration of 30 mg/L and 71.5% when the UA concentration was 60 mg/L, respectively.

Silva et al. [110] investigated the activity of UA (5, 25, and 100 μM) isolated from an apple peel (*Malus domestica*) against Gram-positive bacteria: *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 25904, and *S. epidermidis* ATCC 35984. Only UA at a concentration of 100 μM showed antimicrobial activity against planktonic cells and it inhibited biofilm synthesis by all bacterial strains under analysis.

As has been demonstrated by Liu et al. [13], UA decreased the viability of *S. mutans* and the structural integrity of its biofilms by interacting with the catalytic centre of glucosyltransferases, the key enzymes required in EPS synthesis. Lyu et al. [14] found that UA reduced the formation of multi-species biofilms (*S. mutans*, *S. sanguinis*, and *S. gordonii*) by inhibiting the expression of *gft* genes and in consequence leading to inhibition of EPS formation.

8. Conclusions

The studies published so far show that antibacterial activity of AA and UA is related to changes in the structure and functioning of the bacterial cell structures (cell membrane, adhesins), cell morphology, expression of genes encoding virulence factors such as P fimbriae, curli fimbriae, and hydrophobicity. Both pentacyclic triterpenes can affect the adhesion of bacteria to host cells and the process of biofilm formation, but the exact molecular mechanisms of this activity are still not fully explained. Therefore, our article also presents and summarises suggested by researchers' mechanisms of the biological action of these substances against microorganisms.

The article describes how to improve the poor availability of acids in vivo that limits their clinical application. Structural modifications of these substances have been conducted in recent years to improve their biological activity and bioavailability, such as designing and synthesising novel derivatives, improvement of its water solubility, encapsulation in carries (i.e., nanostructures).

In our article, we also intend to highlight that in the perspective of further research, the existence of synergistic effects of AA and UA with antibiotics (i.e., β -lactams, tetracyclines, fluoroquinolones, aminoglycosides) should be taken into account. It is even more necessary to define the rules for antimicrobial activity of both acids validation and its conversion of in vitro potency into in vivo therapeutic activity. Then, AA and UA could serve as supplements to standard pharmacotherapy.

Author Contributions: Conceptualisation, Z.S.; D.W. and D.T.-G.; drawing figures, D.W. and D.T.-G.; writing—original draft preparation, Z.S.; D.W. and D.T.-G.; writing—review and editing, D.W. and D.T.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The publication was prepared under the project financed from the funds granted by the Ministry of Education and Science in the “Regional Initiative of Excellence” programme for the years 2019–2022, project number 016/RID/2018/19, the amount of funding was 9 354 023,74 PLN.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Bjarnsholt, T. Introduction to biofilms. In *Biofilm Infections*; Bjarnsholt, T., Jensen, P., Moser, C., Høiby, N., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2011; pp. 1–9.
2. Elias, S.; Banin, E. Multi-species biofilms: Living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 990–1004. [[CrossRef](#)]
3. Rendueles, O.; Ghigo, J.M. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev.* **2012**, *36*, 972–989. [[CrossRef](#)]
4. Gebreyohannes, G.; Nyerere, A.; Bii, C.; Sbhatu, D.B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* **2019**, *5*, e02192. [[CrossRef](#)]
5. Olsen, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *34*, 877–886. [[CrossRef](#)]
6. Ramos-Vivas, J.; Chapartegui-González, I.; Fernández-Martínez, M.; González-Rico, C.; Fortún, J.; Escudero, R.; Marco, F.; Linares, L.; Montejo, M.; Aranzamendi, M.; et al. Biofilm formation by multidrug resistant Enterobacteriaceae strains isolated from solid organ transplant recipients. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8928. [[CrossRef](#)]
7. Gollan, B.; Grabe, G.; Michaux, C.; Helaine, S. Bacterial persisters and infection: Past, present, and progressing. *Annu. Rev. Microbiol.* **2019**, *73*, 359–385. [[CrossRef](#)]
8. Brady, A.J.; Laverty, G.; Gilpin, D.F.; Kearney, P.; Tunney, M. Antibiotic susceptibility of planktonic- and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: Should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 461–469. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Sycz, Z.; Tichaczek-Goska, D.; Jezierska-Domaradzka, A.; Wojnicz, D. Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient—Asiatic acid? *Biomolecules* **2021**, *11*, 1754. [[CrossRef](#)]
10. Wojnicz, D.; Kicia, M.; Tichaczek-Goska, D. Effect of asiatic and ursolic acids on morphology, hydrophobicity and adhesion of UPECs to uroepithelial cells. *Folia Microbiol.* **2013**, *58*, 245–252.

11. Harnvoravongchai, P.; Chankhamhaengdecha, S.; Ounjai, P.; Singhakaew, S.; Boonthaworn, K.; Janvilisri, T. Antimicrobial effect of asiatic acid against *Clostridium difficile* is associated with disruption of membrane permeability. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Chi, J.; Sun, L.; Cai, L.; Fan, L.; Shao, C.; Shang, L.; Zhao, Y. Chinese herb microneedle patch for wound healing. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 3507–3514. [[CrossRef](#)]
13. Liu, Y.; Huang, Y.; Fan, C.; Chi, Z.; Bai, M.; Sun, L.; Yang, L.; Yu, C.; Song, Z.; Yang, X.; et al. Ursolic acid targets glucosyltransferase and inhibits its activity to prevent *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 743305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Lyu, X.; Wang, L.; Shui, Y.; Jiang, Q.; Chen, L.; Yang, W.; He, X.; Zeng, J.; Li, Y. Ursolic acid inhibits multi-species biofilms developed by *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Streptococcus gordonii*. *Arch. Oral Biol.* **2021**, *125*, 105107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. James, J.T.; Dubery, I.A. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules* **2009**, *14*, 3922–3941. [[CrossRef](#)]
16. Jäger, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M.N.; Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants—Rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* **2009**, *14*, 2016–2031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sun, B.; Wu, L.; Wu, Y.; Zhang, C.; Qin, L.; Hayashi, M.; Kudo, M.; Gao, M.; Liu, T. Therapeutic potential of *Centella asiatica* and its triterpenes: A review. *Front. Pharm.* **2020**, *11*, 568032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lv, J.; Sharma, A.; Zhang, T.; Wu, Y.; Ding, X. Pharmacological review on asiatic acid and its derivatives: A potential compound. *SLAS Technol.* **2018**, *23*, 111–127. [[CrossRef](#)]
19. Nagoor Meeran, M.F.; Goyal, S.N.; Suchal, K.; Sharma, C.; Patil, C.R.; Ojha, S.K. Pharmacological properties, molecular mechanisms, and pharmaceutical development of asiatic acid: A pentacyclic triterpenoid of therapeutic promise. *Front. Pharm.* **2018**, *9*, 892. [[CrossRef](#)]
20. González-Coloma, A.; López-Balboa, C.; Santana, O.; Reina, M.; Fraga, B. Triterpene-based plant defenses. *Phytochem. Rev.* **2011**, *10*, 245–260. [[CrossRef](#)]
21. Bylka, W.; Znajdek-Awizeń, P.; Studzińska-Sroka, E.; Dańczak-Pazdrowska, A.; Brzezińska, M. *Centella asiatica* in dermatology: An overview. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 1117–1124. [[CrossRef](#)]
22. Chandrika, U.G.; Prasad Kumarab, P.A. Gotu Kola (*Centella asiatica*): Nutritional properties and plausible health benefits. *Adv. Food Nutr. Res.* **2015**, *76*, 125–157.
23. Kashyap, D.; Tuli, H.S.; Sharma, A.K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* **2016**, *146*, 201–213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. López-Hortas, L.; Pérez-Larrán, P.; González-Muñoz, M.J.; Falquén, E.; Domínguez, H. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. *Food Res. Int.* **2018**, *103*, 130–149. [[CrossRef](#)]
25. Pironi, A.M.; de Araújo, P.R.; Fernandes, M.A.; Regina, H.; Salgado, N.; Chorilli, M. Characteristics, biological properties and analytical methods of ursolic acid: A review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2018**, *48*, 86–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Mlala, S.; Oyedeji, A.O.; Gondwe, M.; Oyedeji, O.O. Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents. *Molecules* **2019**, *24*, 2751. [[CrossRef](#)]
27. Klavina, L.; Springe, G.; Nikolajeva, V.; Martsinkevich, I.; Nakurte, I.; Dzabijeva, D.; Steinberga, I. Chemical composition analysis, antimicrobial activity and cytotoxicity screening of moss extracts (moss phytochemistry). *Molecules* **2015**, *20*, 17221–17243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Wang, B.; Liu, P.; Shen, Y.M.; Dai, C. Studies on the chemical constituents from herb of *Rhodobryum roseum* [Chinese]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **2005**, *30*, 895–897.
29. Yang, S.; Liu, M.; Liang, N.; Zhao, Q.; Zhang, Y.; Xue, W.; Yang, S. Discovery and antitumor activities of constituents from *Cyrtomium fortunei* (J.) Smith rhizomes. *Chem. Cent. J.* **2013**, *7*, 24. [[CrossRef](#)]
30. Lee, J.S.; Miyashiro, H.; Nakamura, N.; Hattori, M. Two new triterpenes from the rhizome of *Dryopteris crassirhizoma*, and inhibitory activities of its constituents on human immunodeficiency virus-1 protease. *Chem. Pharm. Bull.* **2008**, *56*, 711–714. [[CrossRef](#)]
31. Jaroniewski, W. Medicinal plants of Polish forests. Bearberry *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengl. *Wszechświat* **1986**, *87*, 135–136. (In Polish)
32. Mohd Azman, N.A.; Gallego, M.G.; Segovia, F.; Abdullah, S.; Shaarani, S.M.; Almajano Pablos, M.P. Study of the properties of bearberry leaf extract as a natural antioxidant in model foods. *Antioxidants* **2016**, *5*, 11. [[CrossRef](#)]
33. Allen, D.; Bilz, M.; Leaman, D.J.; Miller, R.M.; Timoshyna, A.; Window, J. *European Red List of Medicinal Plants*; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2014.
34. Chaika, N.; Koshovyi, O.; Raal, A.; Kireyev, I.; Zupanets, A.; Odyntsova, V. Phytochemical profile and pharmacological activity of the dry extract from *Arctostaphylos uva-ursi* leaves modified with phenylalanine. *Sci. Pharm. Sci.* **2020**, *6*, 77–84. [[CrossRef](#)]
35. Wang, Y.; Lu, C.; Zhao, X.; Wang, D.; Liu, Y.; Sun, S. Antifungal activity and potential mechanism of asiatic acid alone and in combination with fluconazole against *Candida albicans*. *Biomed. Pharm.* **2021**, *139*, 111568. [[CrossRef](#)]
36. Zhu, Z.; Cui, L.; Yang, J.; Vong, C.T.; Hu, Y.; Xiao, J.; Chan, G.; He, Z.; Zhong, Z. Anticancer effects of asiatic acid against doxorubicin-resistant breast cancer cells via an AMPK-dependent pathway in vitro. *Phytomedicine* **2021**, *92*, 153737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Thanusha, A.V.; Dinda, A.K.; Koul, V. Evaluation of nano hydrogel composite based on gelatin/HA/CS suffused with asiatic acid/ZnO and CuO nanoparticles for second degree burns. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *89*, 378–386.
38. Yuyun, X.; Xi, C.; Qing, Y.; Lin, X.; Ke, R.; Bingwei, S. Asiatic acid attenuates lipopolysaccharide-induced injury by suppressing activation of the Notch signaling pathway. *Oncotarget* **2018**, *9*, 15036–15046. [[CrossRef](#)]
39. Han, Y.; Jiang, Y.; Li, Y.; Wang, M.; Fan, T.; Liu, M.; Ke, Q.; Xu, H.; Yi, Z. An aligned porous electrospun fibrous scaffold with embedded asiatic acid for accelerating diabetic wound healing. *J. Mater. Chem. B* **2019**, *7*, 6125–6138. [[CrossRef](#)]
40. Liew, K.Y.; Hafiz, M.F.; Chong, Y.J.; Harith, H.H.; Israf, D.A.; Tham, C.L. A review of malaysian herbal plants and their active constituents with potential therapeutic applications in sepsis. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2020**, *2020*, 8257817. [[CrossRef](#)]
41. Wolska, K.I.; Grudniak, A.M.; Fiecek, B.; Krackiewicz-Dowjat, A.; Kurek, A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Cent. Eur. J. Biol.* **2010**, *5*, 543–553. [[CrossRef](#)]
42. Jesus, J.A.; Lago, J.H.; Laurenti, M.D.; Yamamoto, E.S.; Passero, L.F.D. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2015**, *2015*, 620472. [[CrossRef](#)]
43. Woźniak, Ł.; Skapska, S.; Marszałek, K. Ursolic acid—A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecules* **2015**, *20*, 20614–20641. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Navina, R.; Lee, Y.G.; Kim, S.M. Molecular biological roles of ursolic acid in the treatment of human diseases. *Curr. Bioact. Compd.* **2017**, *13*, 177–185. [[CrossRef](#)]
45. Huang, L.; Luo, H.; Li, Q.; Wang, D.; Zhang, J.; Hao, X.; Yang, X. Pentacyclic triterpene derivatives possessing polyhydroxyl ring A inhibit Gram-positive bacteria growth by regulating metabolism and virulence genes expression. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *95*, 64–75. [[CrossRef](#)]
46. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Korzekwa, K.; Kicia, M.; Hendrich, A. Anti-enterococcal activities of pentacyclic triterpenes. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 483–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Kicia, M. Effect of asiatic and ursolic acids on growth and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Turk. J. Biol.* **2013**, *37*, 556–564. [[CrossRef](#)]
48. Ford, M. *Medical Microbiology*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2014.
49. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Kicia, M. Pentacyclic triterpenes combined with ciprofloxacin help to eradicate the biofilm formed in vitro by *Escherichia coli*. *Indian J. Med. Res.* **2015**, *141*, 343–353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Liu, W.H.; Liu, T.C.; Mong, M.C. Antibacterial effects and action modes of asiatic acid. *Biomedicine* **2015**, *5*, 22–29. [[CrossRef](#)]
51. Broniatowski, M.; Mastalerz, P.; Flasiński, M. Studies of the interactions of ursane-type bioactive terpenes with the model of *Escherichia coli* inner membrane-Langmuir monolayer approach. *Biochim. Biophys. Acta* **2015**, *1848*, 469–476. [[CrossRef](#)]
52. Gu, W.; Hao, Y.; Zhang, G.; Wang, S.F.; Miao, T.T.; Zhang, K.P. Synthesis, in vitro antimicrobial and cytotoxic activities of new carbazole derivatives of ursolic acid. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 554–557. [[CrossRef](#)]
53. Usmani, Y.; Ahmed, A.; Faizi, S.; Versiani, M.A.; Shamshad, S.; Khan, S.; Simjee, S.U. Antimicrobial and biofilm inhibiting potential of an amide derivative [N-(2', 4'-dinitrophenyl)-3β-hydroxyurs-12-en-28-carbonamide] of ursolic acid by modulating membrane potential and quorum sensing against colistin resistant *Acinetobacter Baumannii*. *Microb. Pathog.* **2021**, *157*, 104997. [[CrossRef](#)]
54. Ghasemzadeh, F.; Najafpour, G.D.; Mohammadi, M. Antiinfective properties of ursolic acid-loaded chitosan nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. *Turk. J. Chem.* **2021**, *45*, 1454–1462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Oprean, C.; Zambori, C.; Borcan, F.; Soica, C.; Zupko, I.; Minorics, R.; Bojin, F.; Ambrus, R.; Muntean, D.; Danciu, C.; et al. Anti-proliferative and antibacterial in vitro evaluation of the polyurethane nanostructures incorporating pentacyclic triterpenes. *Pharm. Biol.* **2016**, *54*, 2714–2722. [[CrossRef](#)]
56. Dincer, S.; Uslu, F.M.; Delik, A. Antibiotic resistance in biofilm. In *Bacterial Biofilms*; Dincer, S., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2020; pp. 1–8.
57. Sánchez, M.C.; Romero-Lastra, P.; Ribeiro-Vidal, H.; Llama-Palacios, A.; Figuero, E.; Herrera, D.; Sanz, M. Comparative gene expression analysis of planktonic *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in the presence of a growing biofilm versus planktonic cells. *BMC Microbiol.* **2019**, *19*, 58. [[CrossRef](#)]
58. Chen, H.; Wubbolts, R.W.; Haagsman, H.P.; Veldhuizen, E.J.A. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 10446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Bitchagno, G.T.M.; Nchiozem-Ngnitedem, V.A.; Wandji, N.T.; Noulala, G.C.T.; Fobofou, S.A.T.; Lenta, B.N. Plant-Derived Compounds Against Microbial Infections and Cancers. In *Bioactive Compounds in Nutraceutical and Functional Food for Good Human Health*; Sharma, K., Mishra, K., Senapati, K.K., Danciu, C., Eds.; IntechOpen Limited: London, UK, 2020; pp. 53–77.
60. Djoukeng, J.D.; Abou-Mansour, E.; Tabacchi, R.; Tapondjou, A.L.; Bouda, H.; Lontsi, D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *101*, 283–286. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Taemchuay, D.; Rukkwamsuk, T.; Sakpuaram, T.; Ruangwises, N. Antibacterial activity of crude extracts of *Centella asiatica* against *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Kasetsart Vet.* **2009**, *19*, 119–128.
62. Bharitkar, Y.P.; Banerjee, M.; Kumar, S.; Paira, R.; Meda, R.; Kuotsu, K.; Mondal, N.B. Search for a potent microbicidal spermicide from the isolates of *Shorea robusta* resin. *Contraception* **2013**, *88*, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Acebey-Castellon, I.L.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Doan Thi Mai, H.; Roseau, N.; Bouthagane, N.; Muhammad, D.; Le Magrex Debar, E.; Gangloff, S.C.; Litaudon, M.; Sevenet, T.; et al. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 163–168. [[CrossRef](#)]

64. Garo, E.; Eldridge, G.R.; Goering, M.G.; DeLancey Pulcini, E.; Hamilton, M.A.; Costerton, J.W.; James, G.A. Asiatic acid and corosolic acid enhance the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1813–1817. [[CrossRef](#)]
65. Mutai, C.; Bii, C.; Rukunga, G.; Ondicho, J.; Mwitari, P.; Abatis, D.; Vagias, C.; Roussis, V.; Kirui, J. Antimicrobial activity of pentacyclic triterpenes isolated from *Acacia mellifera*. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2009**, *6*, 42–48. [[CrossRef](#)]
66. Wong, K.C.; Hag Ali, D.M.; Boey, P.L. Chemical constituents and antibacterial activity of *Melastoma malabathricum* L. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 609–618. [[CrossRef](#)]
67. Ashella, S.; Fleming, A.T. Antimicrobial activity of asiatic acid against bacteria and fungi. *IJSR Online* **2016**, *5*, 920–921.
68. Norzaharaini, M.G.; Wan Norshazwani, W.S.; Hasmah, A.; Nor Izani, N.J.; Rapeah, S. Preliminary study on antimicrobial activities of asiaticoside and asiatic acid against selected gram-positive and gram-negative bacteria. *Health Environ. J.* **2011**, *2*, 23–26.
69. Wang, C.M.; Chen, H.T.; Wu, Z.Y.; Jhan, Y.L.; Shyu, C.L.; Chou, C.H. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. *Molecules* **2016**, *21*, 139. [[CrossRef](#)]
70. Horiuchi, K.; Shiota, S.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Kuroda, T.; Tsuchiya, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1147–1149. [[CrossRef](#)]
71. Kim, M.J.; Kim, C.S.; Park, J.Y.; Lim, Y.K.; Park, S.N.; Ahn, S.J.; Jin, D.C.; Kim, T.H.; Kook, J.K. Antimicrobial effects of ursolic acid against mutans Streptococci isolated from Koreans. *Int. J. Oral Biol.* **2011**, *36*, 7–11.
72. Fontanay, S.; Grare, M.; Mayer, J.; Finance, C.; Duval, R.E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 272–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Filocamo, A.; Bisignano, C.; D'Arrigo, M.; Ginestra, G.; Mandalari, G.; Galati, E.M. Norfloxacin and ursolic acid: In vitro association and postantibiotic effect against *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *53*, 193–197. [[CrossRef](#)]
74. Kim, S.G.; Kim, M.J.; Jin, D.; Park, S.N.; Cho, E.; Oliveira Freire, M.; Jang, S.J.; Park, Y.J.; Kook, J. K. Antimicrobial effect of ursolic acid and oleanolic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Microbiol.* **2012**, *48*, 212–215. [[CrossRef](#)]
75. Kurek, A.; Nadkowska, P.; Pliszka, S.; Wolska, K.I. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 515–519. [[CrossRef](#)]
76. Kurek, A.; Grudniak, A.M.; Szwed, M.; Klicka, A.; Samluk, Ł.; Wolska, K.I.; Janiszowska, W.; Popowska, M. Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2010**, *97*, 61–68. [[CrossRef](#)]
77. Kurek, A.; Markowska, K.; Grudniak, A.M.; Janiszowska, W.; Wolska, K.I. The effect of oleanolic and ursolic acids on the hemolytic properties and biofilm formation of *List Monocytogenes*. *Pol. J. Microbiol.* **2014**, *63*, 21–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Catteau, L.; Reichmann, N.T.; Olson, J.; Pinho, M.G.; Nizet, V.; Van Bambeke, F.; Quetin-Leclercq, J. Synergy between ursolic and oleanolic acids from *Vitellaria paradoxa* leaf extract and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: In vitro and in vivo activity and underlying mechanisms. *Molecules* **2017**, *22*, 2245. [[CrossRef](#)]
79. Mallavadhani, U.V.; Mahapatra, A.; Jamil, K.; Reddy, P.S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1576–1579. [[CrossRef](#)]
80. Cunha, W.R.; de Matos, G.X.; Souza, M.G.; Tozatti, M.G.; Andrade e Silva, M.L.; Martins, C.H.G.; da Silva, R.; da Silva Filho, A.A. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. *Pharm. Biol.* **2010**, *48*, 166–169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. da Silva Filho, A.A.; de Sousa, J.P.; Soares, S.; Furtado, N.A.; e Silva, M.L.; Cunha, W.R.; Gregório, L.E.; Nanayakkara, N.D.; Bastos, J.K. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Z. Nat. C. J. Bio. Sci.* **2008**, *63*, 40–46.
82. do Nascimento, P.G.G.; Lemos, T.L.G.; Bizerra, A.M.C.; Arriaga, A.M.C.; Ferreira, D.A.; Santiago, G.M.P.; Braz-Filho, R.; Costa, J.G.M. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives. *Molecules* **2014**, *19*, 1317–1327. [[CrossRef](#)]
83. Wang, C.M.; Jhan, Y.L.; Tsai, S.J.; Chou, C.H. The pleiotropic antibacterial mechanisms of ursolic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Molecules* **2016**, *21*, 884. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Oloyede, H.O.B.; Ajiboye, H.O.; Salawu, M.O.; Ajiboye, T.O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. *Microb. Pathog.* **2017**, *111*, 338–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Qin, N.; Tan, X.; Jiao, Y.; Liu, L.; Zhao, W.; Yang, S.; Jia, A. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5467. [[CrossRef](#)]
86. Tan, X.; Qin, N.; Wu, C.; Sheng, J.; Yang, R.; Zheng, B.; Ma, Z.; Liu, L.; Peng, X.; Jia, A. Transcriptome analysis of the biofilm formed by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11997. [[CrossRef](#)]
87. Scalon Cunha, L.C.; Andrade e Silva, M.L.; Cardoso Furtado, N.A.; Vinhólis, A.H.; Martins, C.H.; da Silva Filho, A.A.; Cunha, W.R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Z. Nat. C J. Biosci.* **2007**, *62*, 668–672.
88. Moodley, R.; Chenia, H.; Jonnalagadda, S.B.; Koorbanally, N. Antibacterial and anti-adhesion activity of the pentacyclic triterpenoids isolated from the leaves and edible fruits of *Carissa macrocarpa*. Antibacterial and anti-adhesion activity of the pentacyclic triterpenoids isolated from the leaves and edible fruits of *Carissa macrocarpa*. *J. Med. Plant. Res.* **2011**, *5*, 4851–4858.
89. Zhou, L.; Ding, Y.; Chen, W.; Zhang, P.; Chen, Y.; Lv, X. The in vitro study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. *Oral Dis.* **2013**, *19*, 494–500. [[CrossRef](#)]

90. Micota, B.; Sadowska, B.; Podsedek, A.; Redzyna, M.; Róźalska, B. *Leonurus cardiaca* L. herb—A derived extract and an ursolic acid as the factors affecting the adhesion capacity of *Staphylococcus aureus* in the context of infective endocarditis. *Acta Biochim. Pol.* **2014**, *61*, 385–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Zou, Y.; Lee, Y.; Huh, J.; Park, J.W. Synergistic effect of xylitol and ursolic acid combination on oral biofilms. *Restor. Dent. Endod.* **2014**, *39*, 288–295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Huang, Y.; Nikolic, D.; Pendland, S.; Doyle, B.J.; Locklear, T.D.; Mahady, G.B. Effects of cranberry extracts and ursolic acid derivatives on P-fimbriated *Escherichia coli*, COX-2 activity, pro-inflammatory cytokine release and the NF-kappa-beta transcriptional response in vitro. *Pharm. Biol.* **2009**, *47*, 18–25. [[CrossRef](#)]
93. Sundaramoorthy, N.S.; Mohan, H.M.; Subramaniam, S.; Raman, T.; Ganesan, S.S.; Sivasubramanian, A.; Nagarajan, S. Ursolic acid inhibits colistin efflux and curtails colistin resistant Enterobacteriaceae. *AMB Express* **2019**, *9*, 27. [[CrossRef](#)]
94. Chung, S.H.; Cho, S.; Kim, K.; Lim, B.S.; Ahn, S.J. Antimicrobial and physical characteristics of orthodontic primers containing antimicrobial agents. *Angle Orthod.* **2017**, *87*, 307–312. [[CrossRef](#)]
95. Dwivedi, G.R.; Maurya, A.; Yadav, D.K.; Khan, F.; Darokar, M.P.; Srivastava, S.K. Drug resistance reversal potential of ursolic acid derivatives against nalidixic acid- and multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Chem. Biol. Drug Des.* **2015**, *86*, 272–283. [[CrossRef](#)]
96. Sultana, T.; Rashid, M.A.; Ali, M.A.; Mahmood, S.F. Hepatoprotective and antibacterial activity of ursolic acid extracted from *Hedyotis corymbosa* L. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* **2010**, *45*, 27–34. [[CrossRef](#)]
97. Ahmad, M.; Ahmad, W.; Khan, S.; Zeeshan, M.; Obaidullah Nisar, M.; Shaheen, F.; Ahmad, M. New antibacterial pentacyclic triterpenes from *Myricaria elegans* Royle (tamariscineae). *J. Enzym. Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 1023–1027. [[CrossRef](#)]
98. Park, S.N.; Ahn, S.J.; Kook, J.K. Oleanolic acid and ursolic acid inhibit peptidoglycan biosynthesis in *Streptococcus mutans* UA159. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 613–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Zhou, T.; Li, Z.; Kang, O.H.; Mun, S.H.; Seo, Y.S.; Kong, R.; Shin, D.W.; Liu, X.Q.; Kwon, D.Y. Antimicrobial activity and synergism of ursolic acid 3-O- α -L-arabinopyranoside with oxacillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 1285–1293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Jabeen, M.; Ahmad, S.; Shahid, K.; Sadiq, A.; Rashid, U. Ursolic acid hydrazide based organometallic complexes: Synthesis, characterization, antibacterial, antioxidant, and docking studies. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Ren, D.; Zuo, R.; Gonzalez Barrios, A.F.; Bedzyk, L.A.; Eldridge, G.R.; Pasmore, M.E.; Wood, T.K. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4022–4034. [[CrossRef](#)]
102. Kim, S.; Song, M.; Roh, B.D.; Park, S.H.; Park, J.W. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on composite resins containing ursolic acid. *Restor. Endod.* **2013**, *38*, 65–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Gilibert, M.; Marcinkevicius, K.; Andujar, S.; Schiavone, M.; Arena, M.E.; Bardón, A. Sesqui- and triterpenoids from the liverwort *Lepidozia chordulifera* inhibitors of bacterial biofilm and elastase activity of human pathogenic bacteria. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 77–85. [[CrossRef](#)]
104. Tielen, P.; Rosenau, F.; Wilhelm, S.; Jaeger, K.E.; Flemming, H.C.; Wingender, J. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2010**, *156*, 2239–2252. [[CrossRef](#)]
105. Yu, H.; He, X.; Xie, W.; Xiong, J.; Sheng, H.; Guo, S.; Huang, C.; Zhang, D.; Zhang, K. Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid mediated regulation. *Can. J. Microbiol.* **2014**, *60*, 227–235. [[CrossRef](#)]
106. Lou, Z.; Tang, Y.; Song, X.; Wang, H. Metabolomics-based screening of biofilm-inhibitory compounds against *Pseudomonas aeruginosa* from burdock leaf. *Molecules* **2015**, *20*, 16266–16277. [[CrossRef](#)]
107. Feuillolay, C.; Pecastaings, S.; Le Gac, C.; Fiorini-Puybaret, C.; Luc, J.; Joulia, P.; Roques, C. A *Myrtus communis* extract enriched in myrtucummulones and ursolic acid reduces resistance of *Propionibacterium acnes* biofilms to antibiotics used in acne vulgaris. *Phytomedicine* **2016**, *23*, 307–315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Ray, C.; Shenoy, A.T.; Orihuela, C.J.; González-Juarbe, N. Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. *Ann. Microbiol. Antimicrob.* **2017**, *16*, 19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Jyothi, J.S.; Putty, K.; Reddy, Y.N.; Dhanalakshmi, K.; Umair, M.A.H. Antagonistic effect of ursolic acid on Staphylococcal biofilms. *Vet. World* **2018**, *11*, 1440–1444. [[CrossRef](#)]
110. Silva, G.N.S.; Primon-Barros, M.; Macedo, A.J.; Gnoatto, S.C.B. Triterpene derivatives as relevant scaffold for new antibiofilm drugs. *Biomolecules* **2019**, *9*, 58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

6.2. Artykuł nr 2

Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient – asiatic acid?

Zuzanna Sycz, Dorota Tichaczek-Goska, Anna Jeziarska-Domaradzka, Dorota Wojnicz

Biomolecules **2021** Vol.11 no.12, art.1754 [24 s.]

DOI: 10.3390/biom11121754

Impact Factor: **6,064**

Punkty KBN/MNiSW: **100,00**

Article

Are Uropathogenic Bacteria Living in Multispecies Biofilm Susceptible to Active Plant Ingredient—Asiatic Acid?

Zuzanna Sycz¹ , Dorota Tichaczek-Goska^{1,*} , Anna Jezierska-Domaradzka²  and Dorota Wojnicz¹

¹ Department of Biology and Medical Parasitology, Wrocław Medical University, 50-345 Wrocław, Poland; sycz.zuzanna@gmail.com (Z.S.); dorota.wojnicz@umw.edu.pl (D.W.)

² Department of Pharmaceutical Biology and Botany, Wrocław Medical University, 50-556 Wrocław, Poland; anna.jezierska-domaradzka@umw.edu.pl

* Correspondence: dorota.tichaczek-goska@umw.edu.pl; Tel.: +48-71-7841523

Abstract: Urinary tract infections (UTIs) are a serious health problem in the human population due to their chronic and recurrent nature. Bacteria causing UTIs form multispecies biofilms being resistant to the activity of the conventionally used antibiotics. Therefore, compounds of plant origin are currently being searched for, which could constitute an alternative strategy to antibiotic therapy. Our study aimed to determine the activity of asiatic acid (AA) against biofilms formed by uropathogenic *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Pseudomonas aeruginosa*. The influence of AA on the survival, biofilm mass formation by bacteria living in mono-, dual-, and triple-species consortia as well as the metabolic activity and bacterial cell morphology were determined. The spectrophotometric methods were used for biofilm mass synthesis and metabolic activity determination. The survival of bacteria was established using the serial dilution assay. The decrease in survival and a weakening of the ability to create biofilms, both single and multi-species, as well as changes in the morphology of bacterial cells were noticed. As AA works best against young biofilms, the use of AA-containing formulations, especially during the initial stages of infection, seems to be reasonable. However, there is a need for further research concerning AA especially regarding its antibacterial mechanisms of action.

Keywords: asiatic acid; plant compounds; uropathogenic bacteria; urinary tract infection (UTI); multispecies biofilm



Citation: Sycz, Z.; Tichaczek-Goska, D.; Jezierska-Domaradzka, A.; Wojnicz, D. Are Uropathogenic Bacteria Living in Multispecies Biofilm Susceptible to Active Plant Ingredient—Asiatic Acid? *Biomolecules* **2021**, *11*, 1754. <https://doi.org/10.3390/biom11121754>

Academic Editor: Vladimir N. Uversky

Received: 19 October 2021
Accepted: 22 November 2021
Published: 24 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

It is well known that biofilms formed by both commensal and pathogenic bacteria usually do not constitute a mono-species consortium but form multispecies communities of microorganisms. An example of such a multispecies biofilm is the biofilm formed in the urinary tract during its infections. The main cause of urinary tract infections (UTIs) is uropathogenic *Escherichia coli*, accompanied by other species, including *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Prevention of the formation of such a mixed-species biofilm or its eradication using standard pharmacotherapy is problematic and often associated with failure. Therefore, compounds of plant origin are currently being searched for, which could constitute an alternative strategy to antibiotic therapy or support it in preventing the formation of bacterial biofilm or facilitate its removal.

Asiatic acid (AA; 2 α ,23-dihydroxyursolic acid) belongs to the pentacyclic triterpenes group, polycyclic compounds classified as secondary plant metabolites. It is a monocarboxylic acid derived from the hydride of a ursane. In the structural formula, ursane is substituted with a carboxyl group at C-28 and hydroxyl groups at C-2, C-3, and C-23 (stereoisomer 2 α , 3 β) (Figure 1). The molecular formula can be presented as C₃₀H₄₈O₅, the molecular weight of AA is 488.70 g/mol [1,2]. AA can be found in the bark, cork cambium, resin, epidermis, waxy coating on leaves, and flowers of many plant species, where it protects against insect and microbial attack.

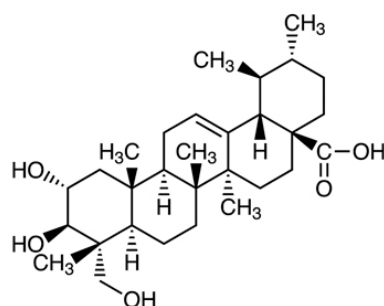


Figure 1. Chemical formula of asiatic acid.

In the form of asiaticoside and aglycone, large amounts of AA are found in the herb of *Centella asiatica* (L.) Urb. (Apiaceae), also known as “gotu kola” and “tiger herb”. The total fraction of TPs of *C. asiatica* contains 30% AA, 40% asiaticoside and 30% madecassic acid. *C. asiatica* can be found in South Africa, Australia, Oceania, and Southeast Asian countries (mainly India and China, but also Japan, Malaysia, and Indonesia). It is used both in the traditional far eastern and modern western phytotherapy due to the wide range of valuable pro-health properties and supporting the treatment of many diseases, especially those with inflammation [3–6]. The in vitro and in vivo studies so far have confirmed a number of pharmacological properties of AA, which include anti-cancer, hypotensive, cardioprotective, anti-infarction, anti-stroke, antihyperlipidemic, antidiabetic, hepatoprotective, gastroprotective, nephroprotective, diuretic, immunostimulatory, neuroprotective, nootropic, anti-Parkinson’s, anti-Alzheimer’s, anti-osteoporosis, antimalarial, antifungal, antiviral, anti-photoaging, supporting the treatment of burns and non-healing diabetic wounds, as well as a spermicidal effect [1,2,7–10]. Nowadays, in view of the fact that this plant shows an overall health-promoting effect, in its countries of origin it is consumed prophylactically both in the form of nutraceutical preparations and as an addition to salads and drinks. Moreover, *C. asiatica* is an ingredient in ointments, cosmetics, and toothpaste [11,12].

However, few literature reports describe the antimicrobial properties of AA. The experiments carried out in recent years have proved that this acid has a significant antibacterial effect when used alone as well as in combination with antibiotics. These studies focused primarily on bacteria living in suspension, i.e., planktonic forms. They included the determination of the MIC value (minimum inhibitory concentration) of the acid, its effect on bacterial survival, cell morphology and integrity of the bacterial membrane, and the impact on bacterial virulence factors such as hydrophobicity of the cell’s surface, ability to move, synthesis of curli fimbriae and P-type fimbriae [13–22]. Up to date, few studies have investigated the effect of AA on the ability of bacteria to form biofilms, and these studies have mainly concentrated on single-species consortia [21–24].

The impact of AA on multispecies biofilms has not been described so far. Therefore, our research aimed to determine the effect of AA on the growth dynamics and the number of uropathogenic bacteria living in biofilms. The amount of biofilm mass formed and its structure, cell morphology, and metabolic activity of bacilli living in mono- (*E. coli*; *E. cloacae*; *P. aeruginosa*), dual- (*E. coli* + *E. cloacae*; *E. coli* + *P. aeruginosa*), and triple-species biofilms (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) at various stages of their development (adhesion, maturation, dispersion, and migration) were also established.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains

Three uropathogenic reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) were used in the study: *Escherichia coli* CFT073, *Enterobacter cloacae* ATCC-BAA 2468, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25000.

2.2. Asiatic Acid

Asiatic acid (AA, purity 97%) was purchased from Sigma-Aldrich (Poland). Stock AA with a concentration of 4 mg/mL was prepared each time by dissolving the acid in an aqueous DMSO solution. For further experiments, stock AA was diluted with the appropriate culture medium.

2.3. MIC (Minimal Inhibitory Concentration) and MBC (Minimal Bactericidal Concentration) Determination

The MIC and MBC values of AA against examined bacterial strains were established using the 2-fold microdilution method according to CLSI [25]. The MIC was the lowest concentration of AA that prevented the visible growth of bacteria in the microtitre plate. The MBC was the lowest concentration of AA that killed bacteria. The MBC value was determined by subculturing bacterial samples to agar plates.

2.4. Preparation of the Bacterial Suspension

Strains cultures were grown overnight on TSB (Trypticasein Soy Broth, Biocorp, Poland) at 37 °C. Then, bacteria were transferred to fresh TSB and incubated at 37 °C for 2 h in the shaking water bath (Julabo SW-22, Poland). Following incubation, while bacterial cells were in the log phase of growth, the bacterial suspensions were centrifuged and suspended in PBS to reach the final density of 0.5 McFarland (10^8 CFU/mL). The suspensions prepared in this way were used in the experiments.

2.5. Biofilm Cultures

Cultures were carried out in 96-well polystyrene microtiter plates for 6, 24, 48, 72, and 96 h. Single species (*E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*), dual-species (*E. coli* + *E. cloacae*; *E. coli* + *P. aeruginosa*), and triple-species (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*). The control biofilm samples did not contain AA, while the test samples contained AA at a concentration of $0.5 \times \text{MIC}$.

2.6. The Bacterial Cell Count in Biofilm Cultures

Bacterial survival in biofilm was established after each time of incubation: 6, 24, 48, 72, and 96 h. Biofilm cultures were gently washed to remove cells unattached to the biofilm matrix. The biofilm deposited on the walls of the microtiter plate wells was scraped by hand with a sterile spatula, transferred to microtubes containing PBS, and vortexed for 3 min to disperse the biofilm uniformly [26]. The CFU/mL values were assessed by plating serial dilutions on chromogenic coliform agar (Graso Biotech, Poland).

2.7. Determination of the Biofilm Mass by Spectrophotometric Method

Unbound cells were removed from the 6, 24, 48, 72, and 96 h biofilm cultures by gentle washing three times with sterile PBS. Then, 1% crystal violet (CV) was added to each well and incubated at 37 °C for 15 min in order to penetrate the CV into the structure of the biofilm. The dye was then removed, and 95% ethanol was added to elute the CV from the biofilm matrix. After 15-min incubation at room temperature, the optical density (OD) was measured at a wavelength of 590 nm on a microplate reader (HiPo MPP-96[®] BIOSAN, Poland). On the basis of the OD value, the bacteria were classified into one of the following groups: $\text{OD} \leq \text{ODc}$ —non-biofilm producer; $\text{ODc} < \text{OD} \leq 2 \times \text{ODc}$ —weak-biofilm producer; $2 \times \text{ODc} < \text{OD} \leq 4 \times \text{ODc}$ —moderate-biofilm producer; $4 \times \text{ODc} < \text{OD}$ —strong-biofilm producer. The ODc value was calculated as the sum of the mean OD values for the blank (TSB) and 3 times the standard deviation of the mean OD value for the TSB [27–29]. The ODc value was 0.218.

2.8. Determination of the Metabolic Activity of Bacteria in a Biofilm Using the Spectrophotometric Method

2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) (10%) was added to 6, 24, 48, 72, and 96 h biofilm cultures. The metabolically active bacteria reduced TTC to red triphenyl formazan. After 24 h of incubation at 37 °C, plankton cells were removed by washing the biofilm cultures with sterile PBS. Then, 95% ethanol was added to each culture and after 15 min of incubation at room temperature, the amount of produced triphenyl formazan was measured spectrophotometrically at a wavelength of 490 nm (HiPo MPP-96[®] BIOSAN, Poland) [30,31].

2.9. Effect of AA on Bacterial Cell Morphology

Bacterial biofilms were incubated at 37 °C for 6, 24, 48, 72, and 96 h with AA at a concentration of 0.5 × MIC. Washed with PBS samples were then Gram-stained and observed under the microscope (Nikon Eclipse 400). The changes in bacterial cell morphology were recorded.

2.10. Statistical Analysis

Each experiment was repeated three times (so-called technical repeat); the grown bacterial colonies were counted from 6–8 plates, and the optical density was read from 6 wells of the microtiter plate, which gives a total of 18–24 so-called biological repeats. The final results are average values. The nonparametric Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s multiple comparison test were used to analysis of the obtained results. Statistical calculations were made using Statistica 13.3. (Stat Soft, Kraków, Poland). Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results and Discussion

3.1. MICs and MBCs Determination

The susceptibility of bacterial strains to analyzed plant compounds is specified by determining the MIC and MBC values. The MIC and MBC values of AA against the Gram-negative reference strains used in this study were 1536 and 2048 µg/mL for both *E. coli* CFT073 and *P. aeruginosa* ATCC25000, as well as 1024 and 1536 µg/mL for *E. cloacae* ATCC-BAA2468, respectively (Table 1).

Table 1. MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC (minimum bactericidal concentration) values of asiatic acid (AA) against bacterial strains.

		<i>E. coli</i> CFT073	<i>E. cloacae</i> BAA2468	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25000
AA concentration (µg/mL)	MIC	1536	1024	1536
	MBC	2048	1536	2048

In our previous study concerning the antimicrobial activity of AA against clinical *E. coli* strains, it was found that the MIC values of AA were also high, ranging from 512 to >1024 µg/mL [17,18]. The MIC values of AA against *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* ATCC 27853, and *E. coli* ATCC2 5922 obtained by Garo et al. [23] and Acebey-Castellon et al. [14] were >128 µg/mL. There were significantly lower MIC and MBC values of AA against *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* DT104, and *P. aeruginosa* and they were 20–40 µg/mL and 32–46 µg/mL, respectively [19]. The differences of MICs of AA for bacteria belonging to the same species may be due to the different origins (sources). Strains used in the current study are classified as uropathogenic. According to the American Type Culture Collection (ATCC), *E. coli* CFT073 has been isolated from blood and urine from a woman with acute pyelonephritis and *P. aeruginosa* ATCC 2500—from the urine of a catheterized patient. Garo et al. [23] used *P. aeruginosa* PAO1 from an infected wound; Acebey-Castellon et al. [14] used *E. coli* ATCC 25922 clinical isolate of unknown origin and *P. aeruginosa*

ATCC 27853 isolated from blood culture. Liu et al. [19] tested enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 being a major foodborne pathogen and *P. aeruginosa* isolated from products of animal origin. Moreover, the differences in MICs of AA obtained by us and those of other researchers may be caused by different methods used to determine them. In our study the microdilution method was used, other researchers used the disc diffusion method.

Several studies have also determined the effect of AA on Gram-positive strains. As a rule, MIC and MBC values of AA against strains that belong to this group are lower compared to Gram-negative strains. Liu et al. [19] determined the susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus* to AA. The MIC and MBC values ranged between 18–44 µg/mL and 28–56 µg/mL, respectively. Even lower MIC values of AA, 10–20 µg/mL, were obtained by Harnvoravongchai et al. [22] against *Clostridium difficile* strains. However, it should be noted that the MIC values of AA against Gram-positive strains are not always as low as in above-mentioned studies. According to our other previous studies [21], those values against clinical *E. faecalis* strains were 64–128 µg/mL. Comparable results were obtained by Acebey-Castellon et al. [14] against *S. aureus* ATCC25923 (MIC > 128 µg/mL) and *E. faecalis* ATCC29212 (MIC = 128 µg/mL). According to studies conducted on *S. aureus* strains, the MIC and MBC values of AA ranged between 20–160 µg/mL [32].

When comparing the antibacterial activity of different compounds against Gram-negative and Gram-positive strains, it can be observed that the MIC values are generally higher against the former. This is related to differences in terms of the structure of cell envelopes of these two groups of bacteria. The outer membrane is a significant structure found in Gram-negative bacteria, which has a specific chemical structure that impedes the penetration of antibacterial compounds into the cell. It should be noted that bacteria that belong to the same group (Gram-positive/Gram-negative), or even to the same species, may differ significantly in their susceptibility to the same antibacterial compounds, resulting in different MIC values. The reason for these differences should also be found in various sources of microbes (clinical, environmental, or reference strains) and their individual characteristics.

3.2. The *E. coli* Cell Count in Mono-, Dual-, and Triple-Species Biofilms Untreated with AA

Comparing the number of live *E. coli* cells in mono-species biofilm and dual-species consortia (*E. coli* + *E. cloacae* and *E. coli* + *P. aeruginosa*), it was found that the presence of either *E. cloacae* or *P. aeruginosa* in the bacterial cultures limited the growth of *E. coli* rods (Figure 2).

This may indicate antagonistic interactions between bacteria. However, statistically significant inhibition of *E. coli* growth ($p \leq 0.05$) was noted in the *E. coli* + *E. cloacae* biofilm only in 6 and 24 h cultures. When comparing the viable *E. coli* cells count in the mono-species biofilm and in the dual-species consortium co-created with *P. aeruginosa*, it was found that the presence of *P. aeruginosa* significantly limited the growth of *E. coli* rods at all stages of biofilm formation ($p \leq 0.05$) except for the young 6 h culture. The data contained in Figure 2 also show that the simultaneous presence of *E. cloacae* and *P. aeruginosa* in the triple-species biofilm (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) significantly limited the *E. coli* growth at all stages of its formation compared to the number of *E. coli* cells growing in mono-species biofilm as well as dual-species biofilm co-created with *E. cloacae* ($p \leq 0.05$). The reduction in *E. coli* growth in the triple-species consortium compared to the number of these rods in the dual-species biofilm co-created with *P. aeruginosa* was noticed only in 24 and 48 h samples ($p \leq 0.05$).

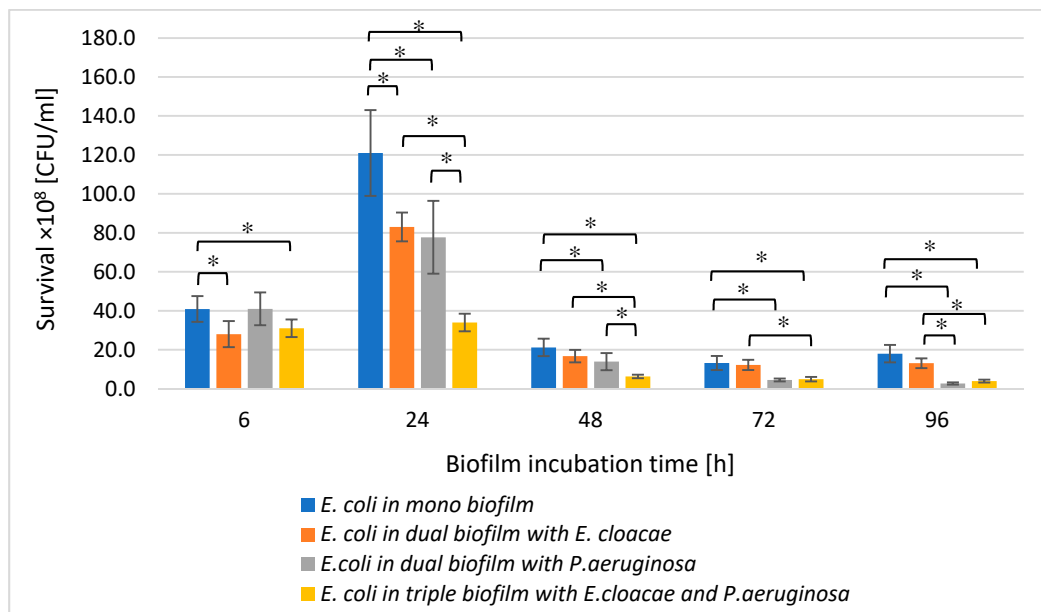


Figure 2. The survival of *E. coli* rods in mono-, dual-, and triple-species biofilms. Statistically significant differences were noted with an asterisk ($* p \leq 0.05$).

3.3. The *E. cloacae* Cell Count in Mono-, Dual- and Triple-Species Biofilms Untreated with AA

Comparing the number of living *E. cloacae* cells in a single-species biofilm with their number in dual-species (*E. coli* + *E. cloacae*) and triple-species (*E. cloacae* + *E. coli* + *P. aeruginosa*) biofilms, a statistically significant reduction in *E. cloacae* cells count was found in both multispecies biofilms at all stages of their development ($p \leq 0.05$). Such a result may be due to the antagonistic interactions between bacteria (Figure 3). Statistically significant differences in the number of *E. cloacae* cells were noted in 24 and 48 h dual-species biofilms compared to triple-species biofilms ($p \leq 0.05$).

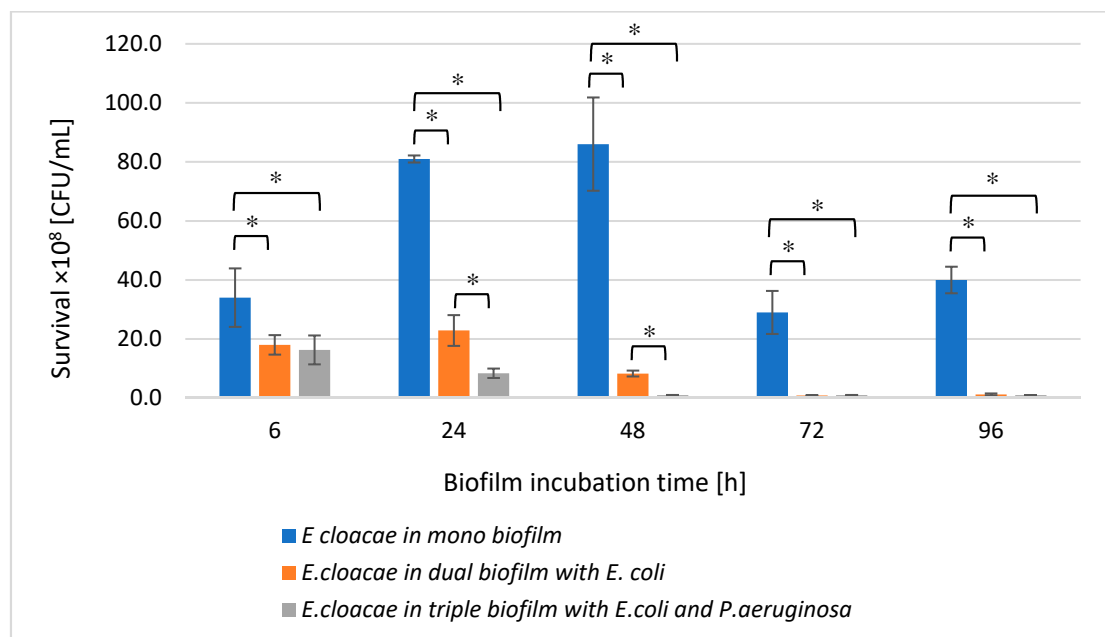


Figure 3. The survival of *E. cloacae* rods in mono-, dual-, and triple-species biofilms. Statistically significant differences were noted with an asterisk ($* p \leq 0.05$).

3.4. The *P. aeruginosa* Cell Count in Mono-, Dual- and Triple-Species Biofilms Untreated with AA

As shown in Figure 4, the number of live *P. aeruginosa* cells in the dual-species biofilm (*P. aeruginosa* + *E. coli*) compared to the monoculture was significantly lower in the young 6 and 24 h biofilms and the oldest 96 h culture ($p \leq 0.05$). In contrast, the *P. aeruginosa* cells count in the 48 and 72 h dual-species biofilms significantly increased in comparison with the number of these cells noticed in the monoculture ($p \leq 0.05$).

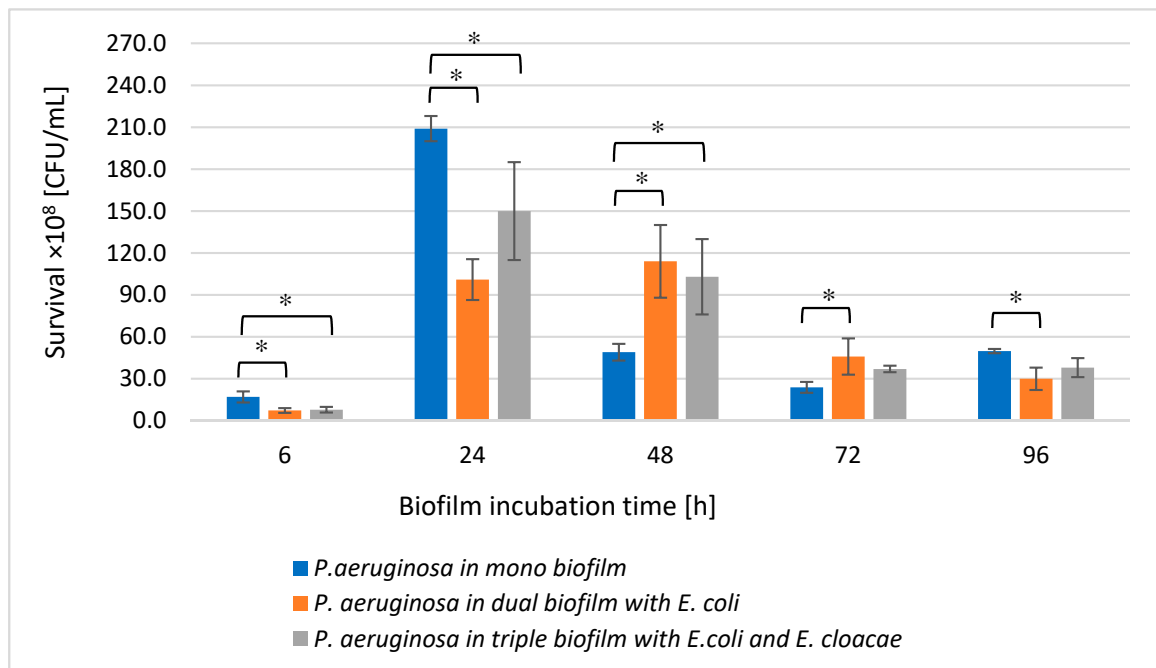


Figure 4. The survival of *P. aeruginosa* rods in mono-, dual-, and triple-species biofilms. Statistically significant differences were noted with an asterisk ($* p \leq 0.05$).

A very similar relationship was observed between single- and triple-species biofilms. Interestingly, the presence of the other bacterial species did not disturb the growth of *P. aeruginosa*, on the contrary, the *P. aeruginosa* rods grew better in mixed consortia than in the monoculture (Figure 4).

The results obtained concerning bacterial survival indicate that single-species biofilms have higher cell counts for individual bacterial species than dual- and triple-species biofilms. This indicates the presence of mutually antagonistic interactions between microbial strains living in mixed biofilms. The growth of *E. coli* in dual-species consortia was limited by the presence of *E. cloacae* and *P. aeruginosa*; *P. aeruginosa* showed stronger antagonism to *E. coli*. It should be noted that *E. coli* cell counts were lowest when the bacilli grew in a triple-species biofilm. Similarly, the presence of *E. coli* significantly reduced the growth of *E. cloacae*. In contrast, *P. aeruginosa* growth was limited by the presence of *E. coli* only in young biofilms. The antagonism noted between *P. aeruginosa* and *E. coli* is reflected in observations made by other researchers. Machado et al. [33] analyzed 6-day single- and dual-species biofilms composed of *P. aeruginosa* ATCC10145 and *E. coli* K12MG1655. In single-species biofilms, the number of cells for each strain was higher compared to the dual-species consortium. According to Vanysacker et al. [34], biofilms formed on microfiltration membrane surfaces by *E. coli* LMG 2092T and *P. aeruginosa* PA14, the number of cells for each strain was higher in single-species consortia compared to the dual-species biofilm. Based on the above-mentioned results, it can be concluded that *E. coli* and *P. aeruginosa* interact antagonistically. Cerqueira et al. [35] obtained slightly different results. They observed that *E. coli* cell counts in single-species biofilms were higher and *P. aeruginosa* cell counts were lower than when these strains formed a common dual-species consortium. *P. aeruginosa*, however, outnumbered *E. coli* only after 48 h of collective growth. Kuznetsova

et al. [36] evaluated the survival of the *E. coli* strain and different strains of *P. aeruginosa* in monocultures and in mixed dual-species cultures. Three strains of *P. aeruginosa* were used in that study: reference strain ATCC 27853, clinical strain BALG (strong-biofilm producer), and clinical strain 9–3 (weak-biofilm producer). *E. coli* cell counts decreased only in 6 h mixed biofilms formed with both clinical strains of *P. aeruginosa*. However, *E. coli* cell counts were the same in the presence of the *P. aeruginosa* reference strain. The survival rate of the ATCC 27853 strain also remained unchanged in the presence of *E. coli*. In contrast, there was also a decrease in the number of the other two clinical strains of *P. aeruginosa* in dual-species consortia; as early as 6 h of incubation for the strain that was a weak-biofilm producer and as late as 12 h for the strain that was a strong biofilm producer. Two other research teams observed a lack of antagonistic relationships in dual-species biofilms formed by *E. coli* and *P. aeruginosa*. Oliveira et al. [37] noted that in single-species biofilms formed on polystyrene surfaces by *E. coli* CECT434 and *P. aeruginosa* PAO1, the number of cells for each strain was lower compared to dual-species biofilms. Solis-Velasquez et al. [38] also showed that *E. coli* ATCC 11229 and *P. aeruginosa* ATCC 15442 cell counts in the dual-species biofilm were higher than cell counts for individual strains growing in monocultures.

As is well known, the phenomenon of “quorum sensing” (QS) is one of the main factors that are significant during biofilm formation. QS helps bacteria not only regulate the number of cells within their own species, but also influence the number of bacteria of another species living in the same consortium. Mirani et al. [39] observed that in a common mixed culture of *P. aeruginosa* and *E. coli*, the number of cells for each species varied according to the stage of biofilm formation. In a young, 24 h consortium, *E. coli* was numerically superior to *P. aeruginosa*. However, the situation was reversed in the case of an older, 48 h biofilm. Only *P. aeruginosa* strains producing cis-2-decenoic acid (CDA) had antagonistic effects on *E. coli*. CDA belongs to a group of diffusible molecules that are involved in interspecies signaling and they modulate the behavior of other microbes. Interestingly, CDA molecules also had the ability to disperse the formed *E. coli* biofilm. Additionally, it was found that *P. aeruginosa* produced more CDA when cultured in a biofilm mixed with *E. coli* [40]. Rahmani-Badi et al. [41] observed that pure CDA was also capable of inhibiting the production of single- and dual-species biofilms formed by *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603. The pure CDA also caused the dispersion of biofilms already formed by these bacterial species. In addition to CDA production, *P. aeruginosa* secretes significant amounts of extracellular rhamnolipids (RHL) and signaling molecules, including N-acyl-L-homoserine lactone (AHL) involved in QS. *P. aeruginosa* bacilli living in mixed biofilms use RHL to disperse the biofilm matrix, facilitating their access to iron and oxygen, for which they compete with other microbes. With AHL molecules activating *P. aeruginosa* bacilli to intense divisions, this species numerically dominates in mixed biofilms [40,42]. Cao et al. [43] found that *P. aeruginosa* PAO1C growing as colonies secreted signalling molecules of alkyl quinolones (AQ) in response to the presence of *E. coli* DH5 α colonies. Interestingly, the appearance of AQ at the periphery of *E. coli* colonies occurred well before the physical fusion of colonies of these two bacterial species. It is clear that varied species of bacteria living together interact with each other. As indicated by Bhattacharjee et al. [44], more intense growth of *P. aeruginosa* in mixed biofilms formed together with *E. coli* is associated not only with QS but also with the topography of a surface on which the biofilm grows. The prevalence of *P. aeruginosa* occurs only when the culture is cultivated on a flat surface. During biofilm growth on undulating surfaces, *E. coli* bacilli are less likely to disperse. This phenomenon is related to the production of indole by *E. coli* cells, which reduces the dispersive response of these bacilli to signalling compounds secreted by *P. aeruginosa*. Moreover, indole was found to play a significant role in the survival of *E. coli* in a mixed biofilm by inhibiting the production of pyocyanin and other AHL-regulated virulence factors of *P. aeruginosa* [45].

The importance of extracellular metabolites in the interactions between *P. aeruginosa* and *E. coli* is supported by Lopes et al.'s study [46]. The authors determined the effect of supernatants containing metabolites of planktonic forms and biofilm forms of *P. aeruginosa* ATCC 10145 on the growth of both planktonic forms and biofilm forms of *E. coli* K12MG1655 and vice versa. It was found that the supernatant extracted from planktonic forms of *E. coli* stimulated biofilm formation by *P. aeruginosa* bacilli, however, it did not affect their survival. In contrast, the supernatant obtained from the planktonic culture of *P. aeruginosa* did not affect either biofilm production by *E. coli* or the survival of these bacilli. Lopes et al. [46] also showed that metabolites found in the *aeruginosa* bacilli to intense divisions, this species numerically dominates in mixed biofilms [40,42]. Cao et al. [43] found that *P. aeruginosa* PAO1C growing as colonies secreted signaling molecules of alkyl quinolones (AQ) in response to the presence of *E. coli* DH5 α colonies. Interestingly, the appearance of AQ at the periphery of *E. coli* colonies occurred well before the physical fusion of colonies of these two bacterial species. It is clear that varied species of bacteria living together interact with each other. As indicated by Bhattacharjee et al. [44], more intense growth of *P. aeruginosa* in mixed biofilms formed together with *E. coli* is associated not only with QS but also with the topography of a surface on which the biofilm grows. The prevalence of *P. aeruginosa* occurs only when the culture is cultivated on a flat surface. During biofilm growth on undulating surfaces, *E. coli* bacilli are less likely to disperse. This phenomenon is related to the production of indole by *E. coli* cells, which reduces the dispersive response of these bacilli to signaling compounds secreted by *P. aeruginosa*. Moreover, indole was found to play a significant role in the survival of *E. coli* in a mixed biofilm by inhibiting supernatant obtained from *P. aeruginosa* biofilm culture strongly stimulated the growth of planktonic forms, however, they inhibited the formation of biofilm formed by *E. coli*. They also significantly reduced the survival rate of *E. coli*. Metabolites found in the supernatant obtained from *E. coli* biofilm culture did not affect either the growth of planktonic forms or biofilm mass formation by *P. aeruginosa*. However, they decreased the survival rate of *P. aeruginosa* in the biofilm. Castonguay et al. [47] conducted a study focusing on mixed biofilm formation by *E. coli* PHL565 and *Pseudomonas putida* MT2. It should be noted that these strains differed in terms of their adhesive capabilities. The former strain was non-adherent and thus incapable of forming a biofilm, while the latter one showed extraordinarily strong adhesive properties and formed a thin biofilm even on glass surfaces. Interestingly, in a mixed culture, *E. coli* PHL565 bacilli were able to adhere to surfaces and they formed a biofilm together with *P. putida*.

3.5. Formation of Biofilm Mass by Uropathogenic Rods in Mono-, Dual- and Triple-Species Biofilms Untreated with AA

The amount of biofilm mass created by individual species of bacteria allowed to differentiate them into weak, moderate, or strong biofilm producers. Depending on the optical density (OD) value, the strains were classified into one of 4 groups: $OD_{590} \leq 0.218$ —no biofilm, $0.218 < OD_{590} \leq 0.436$ —weak biofilm, $0.436 < OD_{590} \leq 0.872$ —moderate biofilm, and $OD_{590} > 0.872$ —strong biofilm.

The *E. coli* strain formed a weak biofilm at all stages of development (Figure 5). The highest amount of biofilm was recorded in the 6 h culture ($OD_{590} = 0.406$), and the lowest in the 48 h one ($OD_{590} = 0.261$). The *E. cloacae* strain produced a weak biofilm ($0.281 < OD_{590} \leq 0.329$) at all stages of its formation except for the 24 h culture in which the mean OD_{590} value was 0.574, indicating the average biofilm mass production. The *P. aeruginosa* strain was the best biofilm producer. It produced a moderate biofilm ($0.802 < OD_{590} \leq 0.836$) at all stages of biofilm maturation, except for the 6 h culture ($OD_{590} = 0.370$).

As shown in Figure 5, *E. coli* and *E. cloacae* grown together in the 24, 48, and 72 h dual-species consortia produced less biofilm mass than when they were grown separately. However, statistical significance was only demonstrated in the 24 h culture ($p \leq 0.05$).

An interesting result was obtained for the dual-species biofilm of *E. coli* + *P. aeruginosa* in comparison to the mono-species biofilm formed by *P. aeruginosa*. It is clear that the *E. coli* rods act antagonistically inhibiting EPS production by *P. aeruginosa*. The strongest

inhibitory effect was observed especially in 24, 48, and 72 h cultures where the reduction in biofilm mass was 34%, 51%, and 30%, respectively ($p \leq 0.05$) (Figure 5). Similar results were obtained for the triple-species biofilm of *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*. The greatest reduction in biofilm mass synthesis (52%) was recorded in the 48 h culture in comparison to *P. aeruginosa* monoculture ($p \leq 0.05$) (Figure 5).

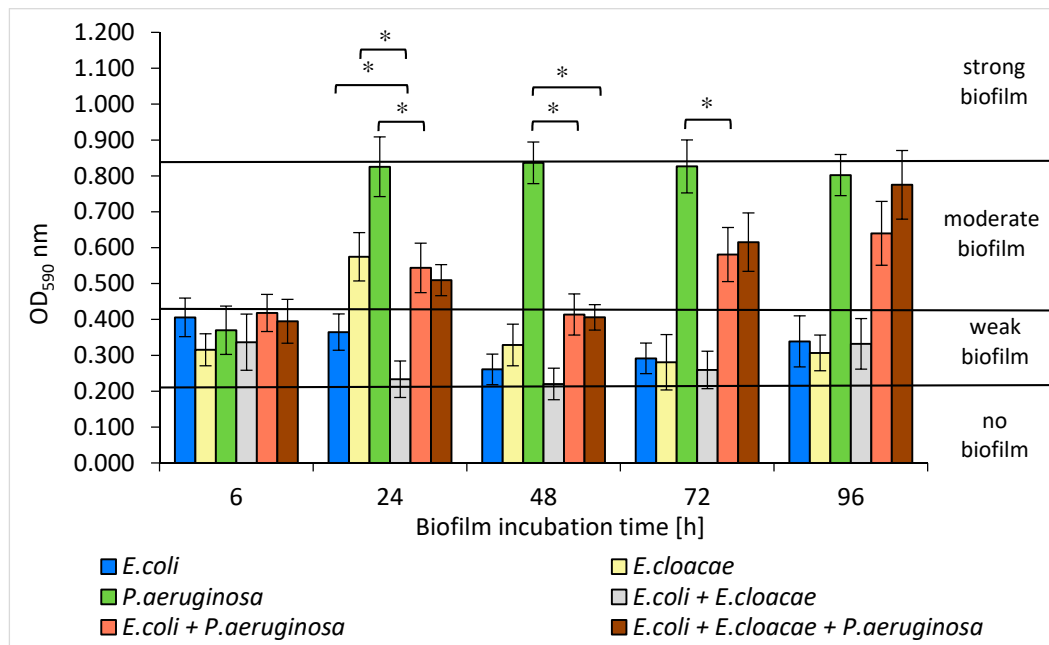


Figure 5. The biofilm mass production by bacteria living in mono-, dual-, and triple-species biofilm consortia. Statistically significant differences were noted with an asterisk ($* p \leq 0.05$).

According to our study, *E. coli* and *E. cloacae* formed weak single-species biofilms, while the *P. aeruginosa* strain had much stronger biofilm production. Moreover, Wang et al. [48] observed that the clinical strains of *P. aeruginosa* produced significantly greater biofilm mass than *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, and *Klebsiella oxytoca*. The present study also found that the amount of produced biofilm mass was usually greater in single-species consortia compared to dual- and triple-species biofilms. The fact that the amount of biomass produced in mature mixed biofilms was smaller than the amount of biomass produced at the same stage of biofilm formation by each individual species provides evidence of antagonistic interactions between the analyzed bacteria. This was particularly evident in the dual-species biofilm, in which the amount of extracellular polymeric substance (EPS) produced by *P. aeruginosa* was decreased by the presence of *E. coli*. These findings contradict studies of other research groups [36,49–51]. Qian et al. [49] found that the amount of biofilm mass produced by single-species consortia of *E. coli* ATCC 25922 and *E. cloacae* ATCC 13047 was smaller than that in mixed biofilm. Kuznetsova et al. [36] also observed that the amount of biomass in dual-species biofilms composed of *E. coli* and *P. aeruginosa* was significantly greater compared to single-species biofilms. Similarly, Liu et al. [50] observed synergism during the formation of dual-species biofilms containing *Burkholderia caryophylli* and *E. coli* O157:H7, as well as *Ralstonia insidiosa* and *E. coli* O157:H7. Moreover, Culotti et al. [51] observed that the growth and synthesis of biofilm mass produced by *E. coli* DH5 α were more intense when these bacteria grew together with *P. aeruginosa* PAO1. Interestingly, *P. aeruginosa* grew only in clusters, whereas *E. coli* occupied a much larger area, growing as a lawn. On the other hand, Machado et al. [33] found that the amount of biofilm mass formed by *P. aeruginosa* ATCC 10145 and *E. coli* K12MG1655 after the 6-day incubation was similar whether the bacteria grew in monocultures or formed a common consortium.

3.6. Metabolic Activity of Uropathogenic Rods in Mono-, Dual- and Triple-Species Biofilms Untreated with AA

The results presented in Figure 6 show that the highest metabolic activity was noticed in the 6, 24, and 48 h *E. cloacae* monocultures as well as in the 96 h monoculture of *E. coli*. The weaker metabolic activity was exhibited in the single-species *P. aeruginosa* cultures regardless of the stage of biofilm development. It was also observed that the simultaneous presence of *E. coli* + *E. cloacae* and *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* resulted in a reduction in metabolic activity in 24 h cultures compared to the activity of *E. cloacae* rods growing in a mono-species consortium ($p \leq 0.05$). Therefore, it can be concluded that strains are mutually antagonistic. The metabolic activity of bacteria living in the dual-biofilm of *E. coli* + *P. aeruginosa* seems to be lower than the activity of *E. coli* growing in monoculture. In addition, the metabolic activity of bacteria growing in triple-species biofilms in 24, 48, and 96 h cultures was weaker than when these species lived in mono-species consortia, but the results have no statistical significance ($p > 0.05$).

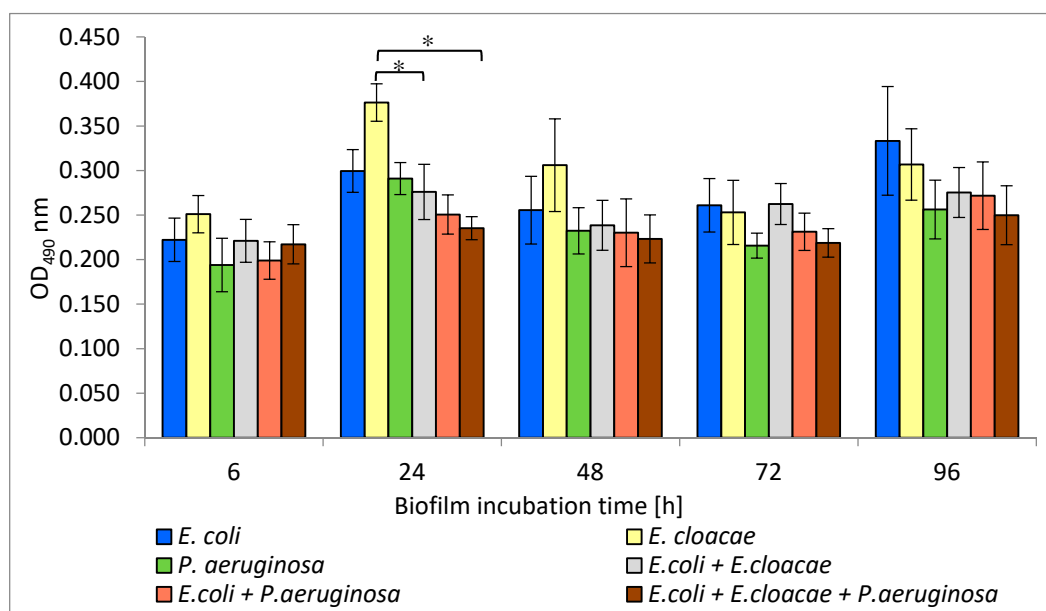


Figure 6. The metabolic activity of bacteria living in mono-, dual-, and triple-species biofilm consortia. Statistically significant differences were noted with an asterisk (* $p \leq 0.05$).

Machado et al. [33] determined the metabolic activity of *P. aeruginosa* ATCC 10145 and *E. coli* K12MG1655 strains in 6-day mono-cultured biofilms. In a monoculture, *P. aeruginosa* had higher metabolic activity than *E. coli*. This result is contrary to the one obtained in our current study. According to our study, *P. aeruginosa* had weaker metabolic activity compared to *E. coli* and *E. cloacae*. However, this study and Machado et al.'s study [33] found that bacteria growing in mixed consortia had lower metabolic activity than single-species consortia.

Interestingly, the present study showed that the amount of formed biofilm mass does not correlate with the metabolic activity of the bacteria. *E. cloacae* and *E. coli* strains producing only a weak biofilm had higher metabolic activity than better biofilm-producing *P. aeruginosa*.

The present study also attempted to determine the effect of AA on survival, biofilm mass production, and metabolic activity of *E. coli*, *E. cloacae*, and *P. aeruginosa* growing in monocultures and in mixed biofilms. The obtained results indicate that AA has an antibacterial effect on bacteria growing in all tested biofilms.

3.7. The *E. coli* Cell Count in Mono-, Dual-, and Triple-Species Biofilms Treated with AA

In mono-species biofilm formed by *E. coli* (Figure 7A), regardless of its maturity stage, a statistically significant decrease in the number of viable bacteria under the influence of AA was noted in comparison with the control sample ($p \leq 0.05$). The greatest reduction in the number of viable cells (4 log₁₀) occurred after 24 h of incubation. The weakest effect of AA was recorded in the older 72 and 96 h biofilms (Figure 7A).

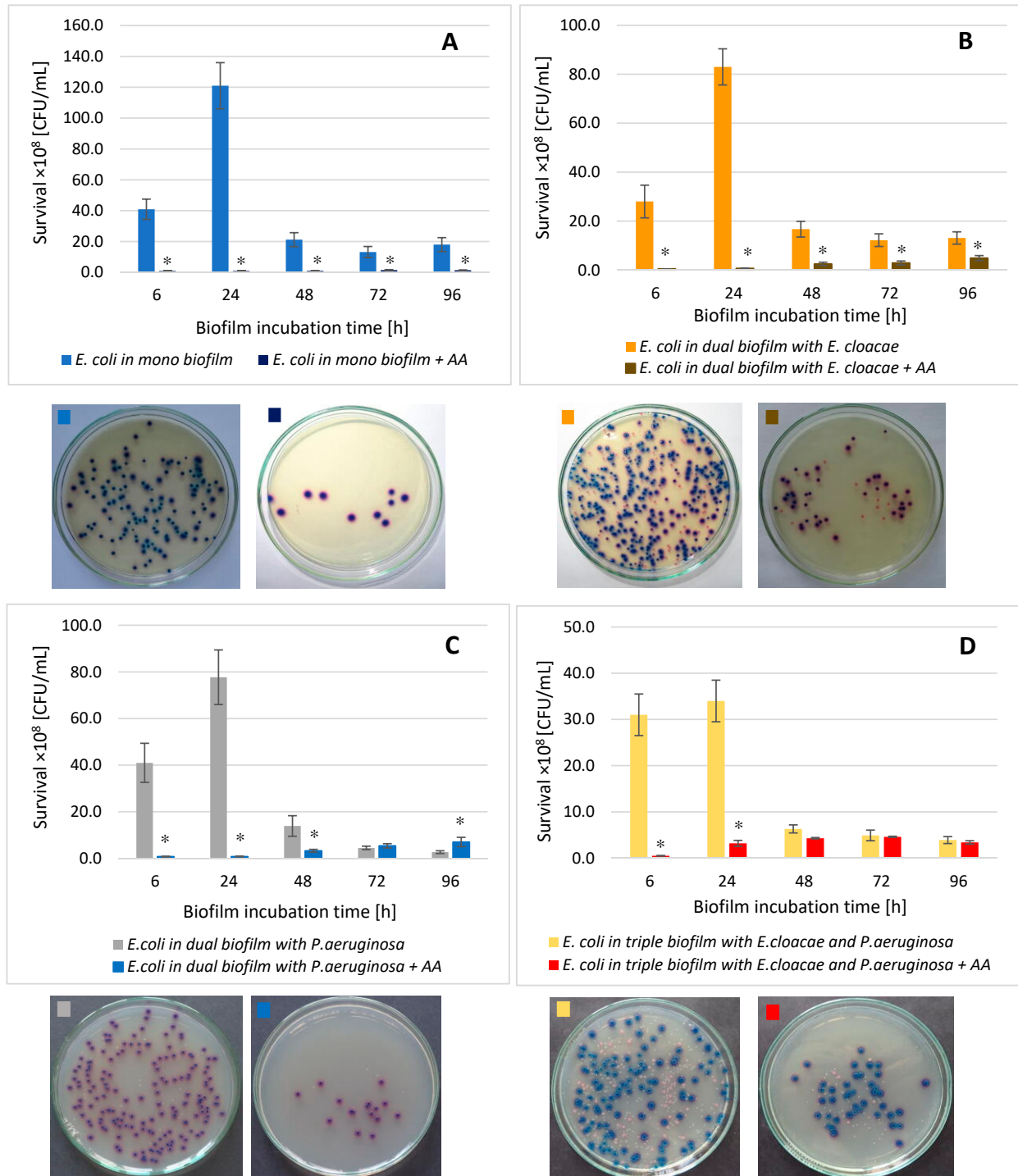


Figure 7. The survival of *E. coli* rods in mono- (A), dual- (B,C), and triple-species (D) biofilms treated with asiatic acid (AA) in comparison to untreated biofilms. Statistically significant differences were noted with an asterisk ($* p \leq 0.05$). The photos show bacterial colonies grown on chromogenic coliform agar inoculated from 24-hour biofilm cultures.

The data contained in Figure 7B,C show that this acid reduced the number of *E. coli* also in dual-species biofilms (*E. coli* + *E. cloacae* + AA and *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA) as well as triple-species biofilm (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA; Figure 7D) compared to the number of *E. coli* cells grown in the consortia untreated with AA.

Analyzing the effect of AA on the survival of bacteria in a dual-species biofilm (*E. coli* + *P. aeruginosa*; Figure 7C), it was noticed that the acid inhibited the growth of *E. coli* in the 6, 24, and 48 h biofilms and the reduction was 2.6 log₁₀, 2.5 log₁₀, and 0.6 log₁₀, respectively ($p \leq 0.05$). No inhibitory effect of AA on the survival of *E. coli* bacilli was observed only in the mature 72 and 96 h dual-species culture of *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA.

Comparative analysis of *E. coli* survival in mono-species biofilm treated with AA with survival of these bacteria in dual-species (*E. coli* + *E. cloacae* + AA and *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA) and triple-species (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA) biofilms, also in the presence of the AA (Figure 8), showed that the acid was most effective against *E. coli* living in mono-species biofilm regardless of its stage of development ($p \leq 0.05$). On the other hand, *E. coli* bacilli showed the lowest sensitivity to the action of AA, living in a triple-species consortium (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA) in 6, 24, and 48 h cultures.

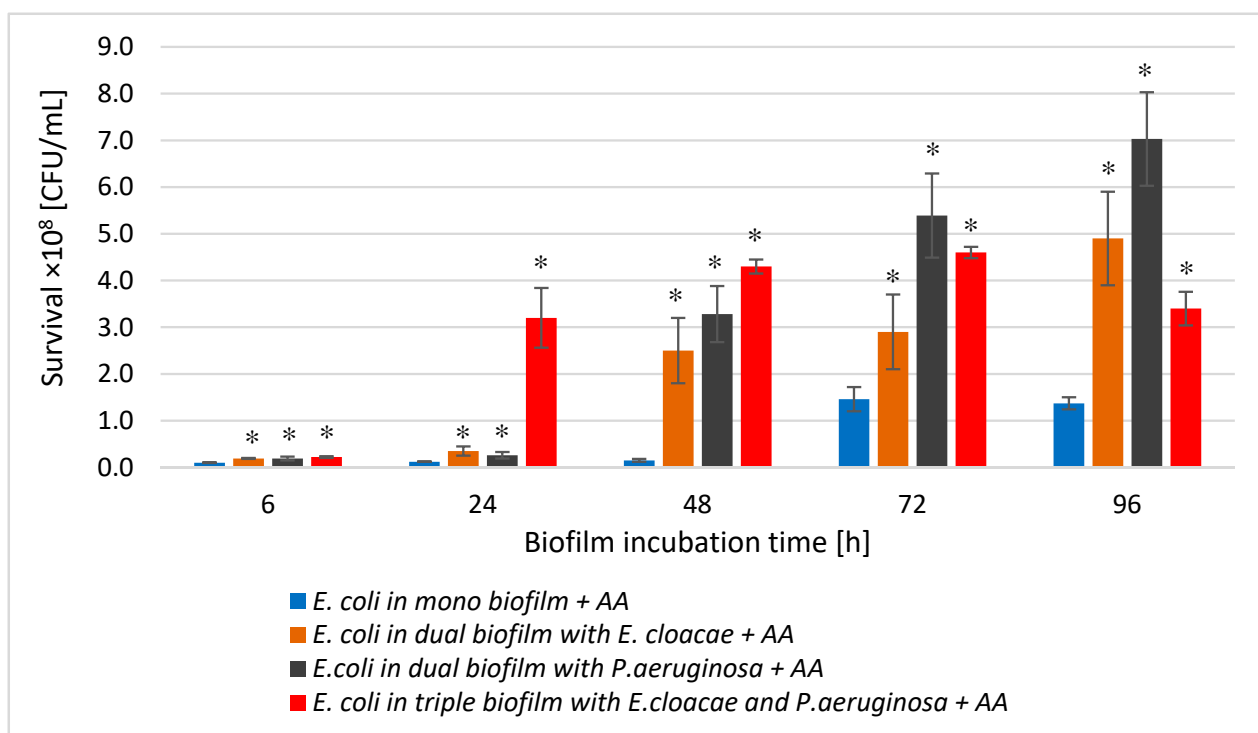


Figure 8. Comparison of the *E. coli* rods survival in mono-species biofilm with the survival of *E. coli* rods growing in dual- and triple-species consortia treated with asiatic acid (AA). Statistically significant differences were noted with an asterisk ($* p \leq 0.05$).

3.8. The *E. cloacae* Cell Count in Mono-, Dual-, and Triple-Species Biofilms Treated with AA

As shown in Figure 9A, AA significantly reduced the *E. cloacae* cells count in mono-species biofilm at all stages of its development ($p \leq 0.05$). The most effective antibacterial activity of the acid was recorded in the oldest 96 h biofilm (8.6 log₁₀ reduction). The data in Figure 9 show that AA also significantly reduced the number of *E. cloacae* cells in both dual- (Figure 9B) and triple-species biofilm (Figure 9C) ($p \leq 0.05$) at all stages of their development.

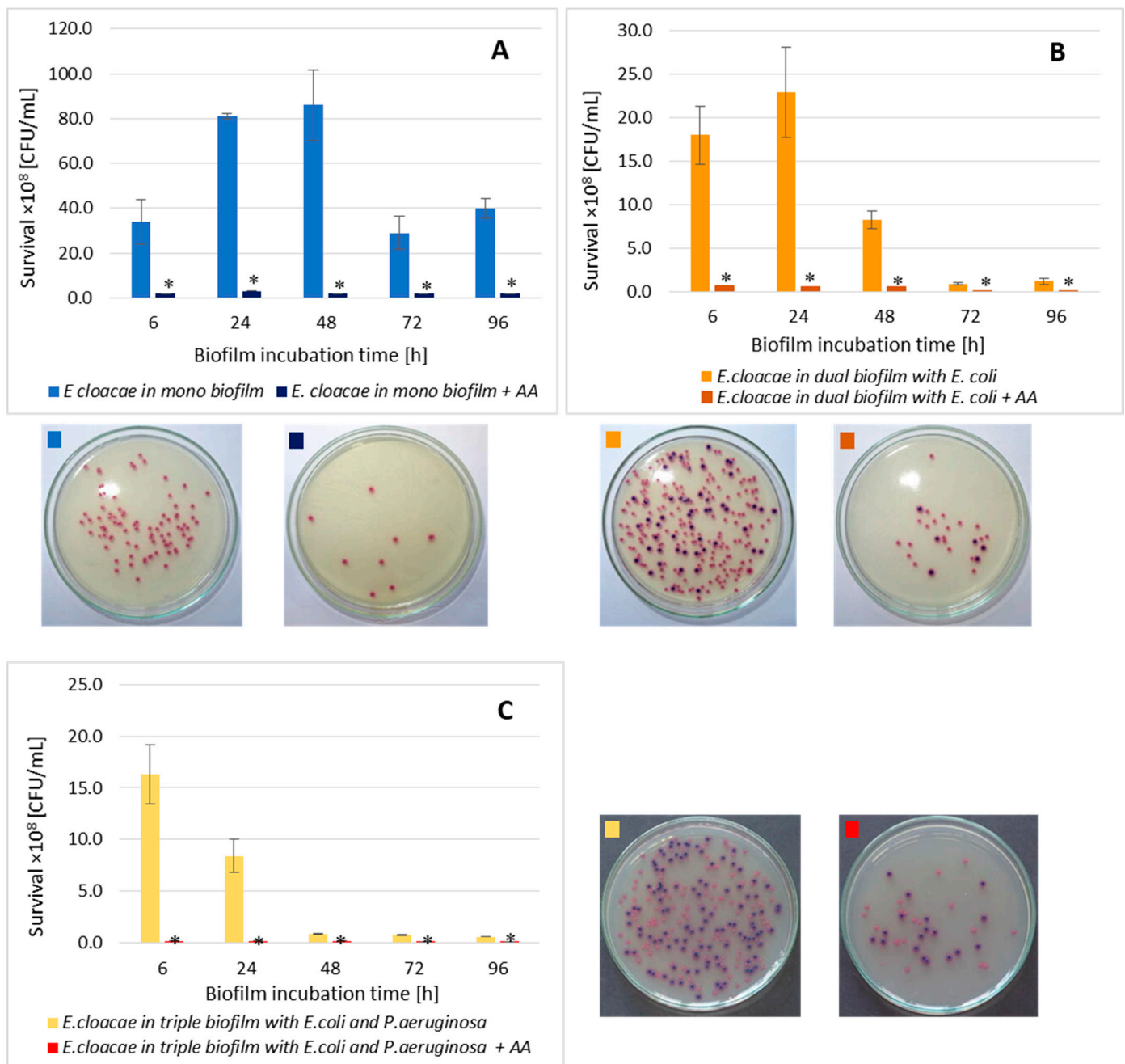


Figure 9. The survival of *E. cloacae* rods in mono- (A), dual- (B), and triple-species (C) biofilms treated with asiatic acid (AA) in comparison to untreated biofilms. Statistically significant differences were noted with an asterisk (* $p \leq 0.05$). The photos show bacterial colonies grown on chromogenic coliform agar inoculated from 24-hour biofilm cultures.

Comparative analysis of the effect of AA on *E. cloacae* survival in mono-, dual-, and triple-species biofilms (Figure 10) showed that the acid had the weakest antibacterial effect on the *E. cloacae* grown a triple-species biofilm. The acid was most effective against *E. cloacae* living in mono-species biofilm regardless of its stage of development ($p \leq 0.05$) with the exception of the young 6 h culture where *E. cloacae* rods grew much better than in dual- as well as triple-species consortia ($p \leq 0.05$).

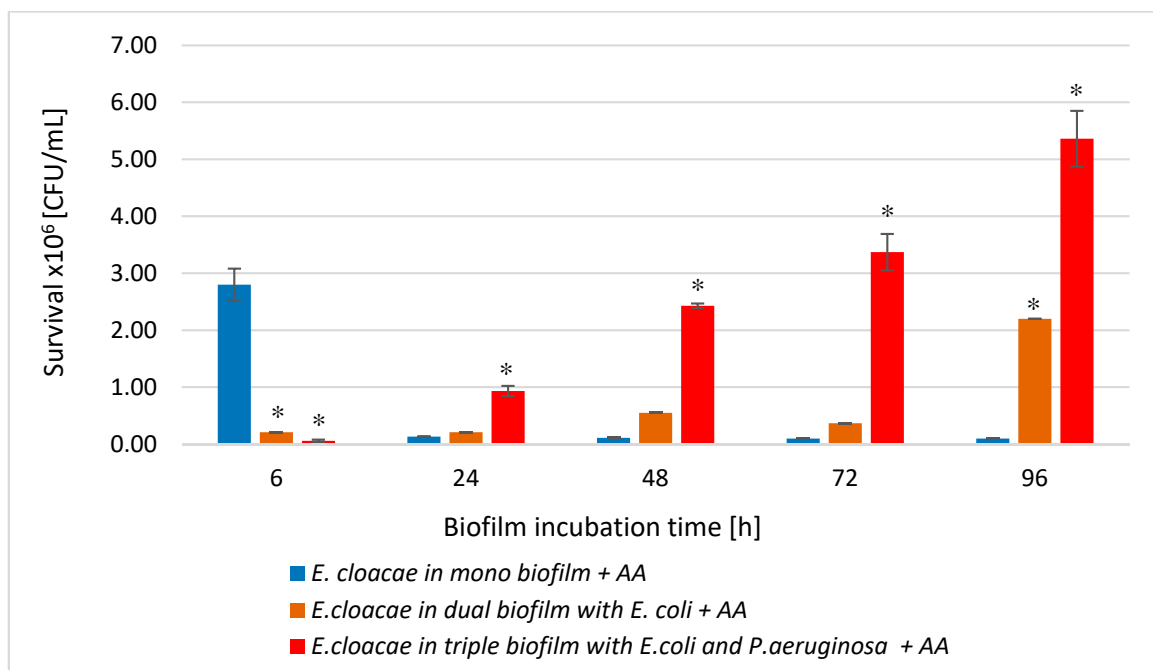


Figure 10. Comparison of the *E. cloacae* rods survival in mono-species biofilm with the survival of *E. cloacae* rods growing in dual- and triple-species consortia treated with asiatic acid (AA). Statistically significant differences were noted with an asterisk (* $p \leq 0.05$).

3.9. The *P. aeruginosa* Cell Count in Mono-, Dual-, and Triple-Species Biofilms Treated with AA

The data presented in Figure 11 show that AA significantly reduced the number of viable *P. aeruginosa* cells in mono-, dual-, and triple-species biofilms compared to the untreated samples at all stages of their development ($p \leq 0.05$). The greatest decrease in the *P. aeruginosa* cells count was recorded in 72 h mono- and triple-species biofilms (Figure 11C); reduction values were 3.2 log₁₀ and 3.5 log₁₀, respectively. In the dual-species biofilm (Figure 11B), the AA showed the best bactericidal activity on the *P. aeruginosa* rods grown in 48 and 72 h cultures with a growth reduction of 3.2 log₁₀.

Comparing the *P. aeruginosa* cells count in all AA-treated biofilms (Figure 12), it can be concluded that the acid exhibited the most effective antibacterial activity against *P. aeruginosa* rods growing in the 6, 24, and 96 h triple-biofilm cultures comparing them to mono-species consortia. This situation undoubtedly proves that the presence of additional species in the culture (*E. coli* and *E. cloacae*) strongly antagonizes the *P. aeruginosa* strain. As a result of these interactions, the *P. aeruginosa* strain becomes more susceptible to AA.

The reduction in the number of viable cells depended on the duration of AA and whether a bacterial strain grew in a single- or multi-species consortium. AA the most reduced bacterial counts in single-species biofilms while slightly less in dual- and triple-species biofilms (Figures 8 and 10). AA also inhibited EPS synthesis in all tested biofilms. Under the influence of AA, there was also a decrease in the metabolic activity of bacilli living in single-species biofilms at all stages of their formation. Our previous studies determining the effect of AA on both Gram-negative [24], and Gram-positive [21], bacteria, as well as on the formation and eradication of single-species biofilms, showed its antibacterial activity. AA also supported the pharmacological effects of ciprofloxacin when removing mature *E. coli* biofilm from urinary catheters [24]. Garo et al. [23] investigated the influence of AA on single-species *P. aeruginosa* biofilm. AA showed antibiofilm activity. Furthermore, it acted synergistically with ciprofloxacin and tobramycin. Bacterial susceptibility to AA may be associated with membrane disintegration. This is confirmed by the results obtained by Liu et al. [19], in which they proved that AA caused membrane damage in both Gram-negative bacteria (*E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*) and Gram-positive ones (*L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*). Meanwhile, the results of two

other research teams did not prove the antibiofilm effect of AA against Gram-positive bacteria [22,52]. Harnvoravongchai et al. [22] found that AA, even at concentrations several times greater than the MIC value, had no inhibitory effect on biofilm formation by clinical strains of *Clostridium difficile*. Moreover, Bharitkar et al. [52] observed that AA even at a high concentration of 1250 µg/mL did not inhibit the growth of *Lactobacillus acidophilus*.

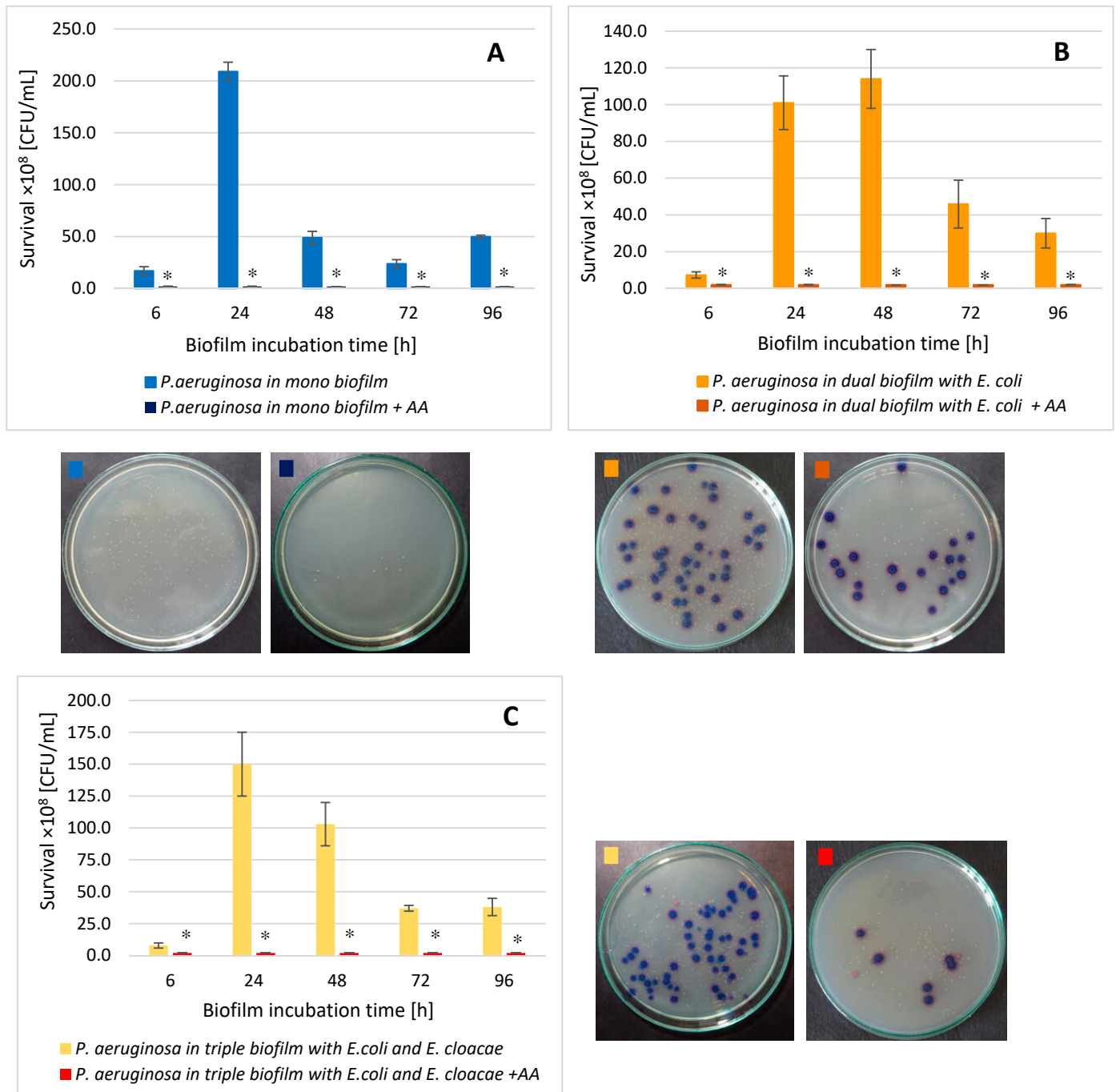


Figure 11. The survival of *P. aeruginosa* rods in mono- (A), dual- (B), and triple-species (C) biofilms treated with asiatic acid (AA) in comparison to untreated biofilms. Statistically significant differences were noted with an asterisk (* $p \leq 0.05$). The photos show bacterial colonies grown on chromogenic coliform agar inoculated from 24-hour biofilm cultures.

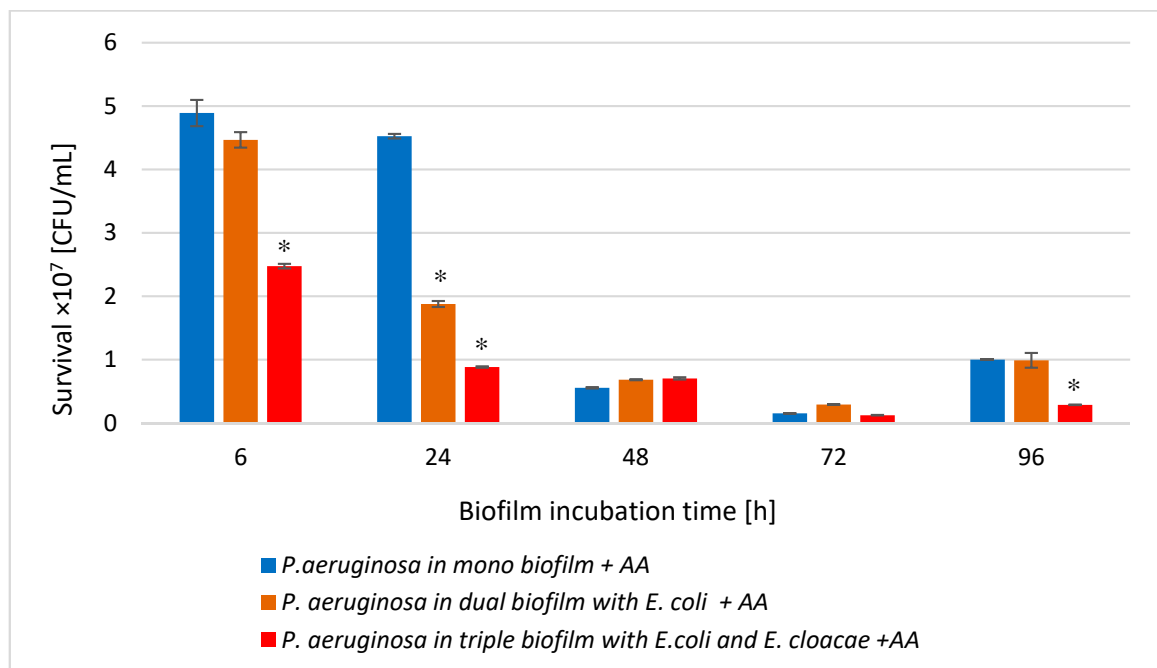


Figure 12. Comparison of the *P. aeruginosa* rods survival in mono-species biofilm with the survival of *E. cloacae* rods growing in dual- and triple-species consortia treated with asiatic acid (AA). Statistically significant differences were noted with an asterisk (* $p \leq 0.05$).

The results obtained by other authors indicate that different antibacterial agents show better activity against single-species biofilms than multi-species biofilms. The results of this study, however, are difficult to discuss because they are novel. No research group has investigated the effects of AA on bacteria living in multispecies consortia so far. According to Schwering et al. [53], dual-species biofilms of *E. coli* and *E. cloacae* are up to 300 times more resistant to chlorine than single-species biofilms. Furthermore, Qian et al. [49] investigated the effect of luteolin on mixed biofilm formed by *E. coli* ATCC 25922 and *E. cloacae* ATCC 13047. Qian et al. [49] found that luteolin had a much weaker effect than when the bacteria were grown in monocultures.

3.10. Formation of Biofilm Mass by Uropathogenic Rods in Mono-, Dual-, and Triple-Species Biofilms Treated with AA

The data presented in Figure 13 shows that AA significantly inhibited the synthesis of biofilm formed by the rods growing in mono-species consortia ($p \leq 0.05$). The exceptions were the 48 and 72 h *E. coli* cultures and a 72 h *E. cloacae* culture ($p > 0.05$). The most effective anti-biofilm activity of AA was observed in *P. aeruginosa* cultures. *P. aeruginosa* strain originally producing moderate biofilm ($0.802 < OD_{590} \leq 0.836$) became a non-biofilm producer ($OD_{590} \leq 0.218$).

The results presented in Figure 14 show that AA reduced the amount of biofilm produced by bacteria growing in dual-species *E. coli* + *P. aeruginosa* and triple-species *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* biofilms at all stages of their formation ($p \leq 0.05$). However, in the dual-species *E. coli* + *E. cloacae* consortium, a significant reduction in biofilm mass under the influence of AA was recorded only in 6 and 24 h cultures ($p \leq 0.05$). It is worth noting that complete inhibition of biofilm synthesis ($OD_{590} \leq 0.218$) was noted in all 6 and 24 h dual- and triple-species consortia (Figure 14).

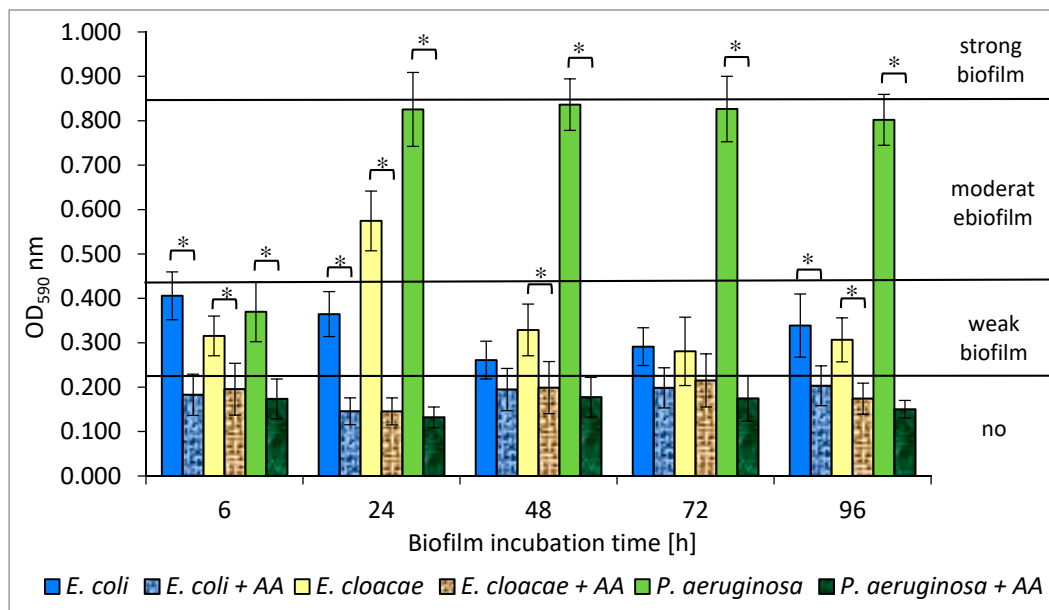


Figure 13. The influence of the asiatic acid (AA) on the biofilm-mass production by bacteria living in mono-species consortia. Statistically significant differences were noted with an asterisk (* $p \leq 0.05$).

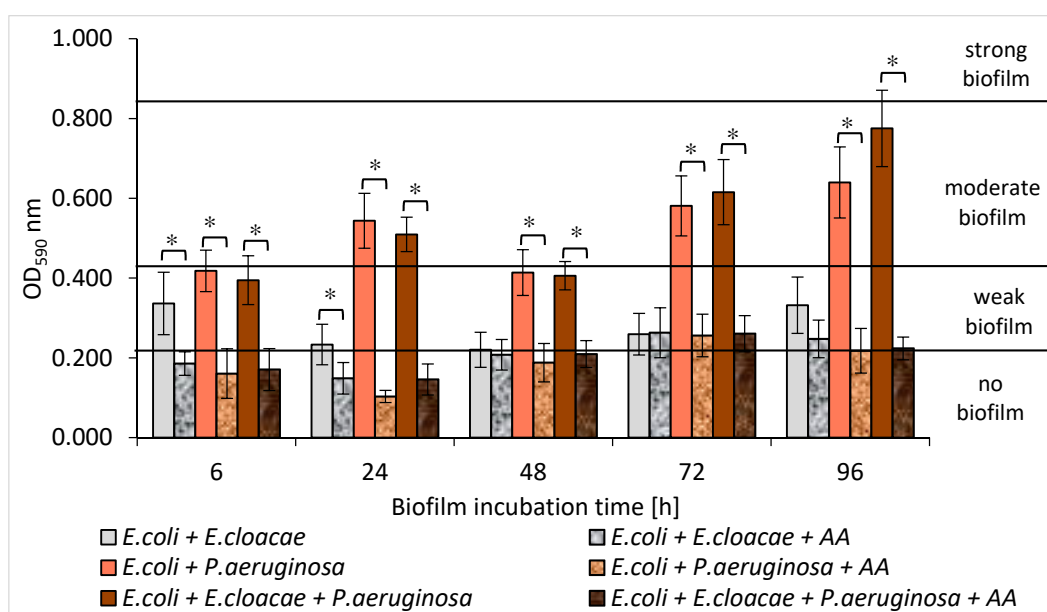


Figure 14. The influence of the asiatic acid (AA) on the biofilm-mass production by bacteria living in dual- and triple-species consortia. Statistically significant differences were noted with an asterisk (* $p \leq 0.05$).

3.11. Metabolic Activity of Uropathogenic Rods in Mono-, Dual-, and Triple-Species Biofilms Treated with AA

The results in Figure 15 show that AA reduced the metabolic activity of rods growing in mono-species biofilms. However, statistically significant results were only reported for the 24 and 48 h *E. cloacae* cultures ($p \leq 0.05$). It is worth emphasizing that AA did not reduce the metabolic activity of bacteria living in dual-species or triple-species biofilms ($p > 0.05$) (Figure 16). In contrast, the metabolic activity of bacteria growing in the triple-species consortia (24 and 96 h) significantly increased in the presence of AA ($p \leq 0.05$).

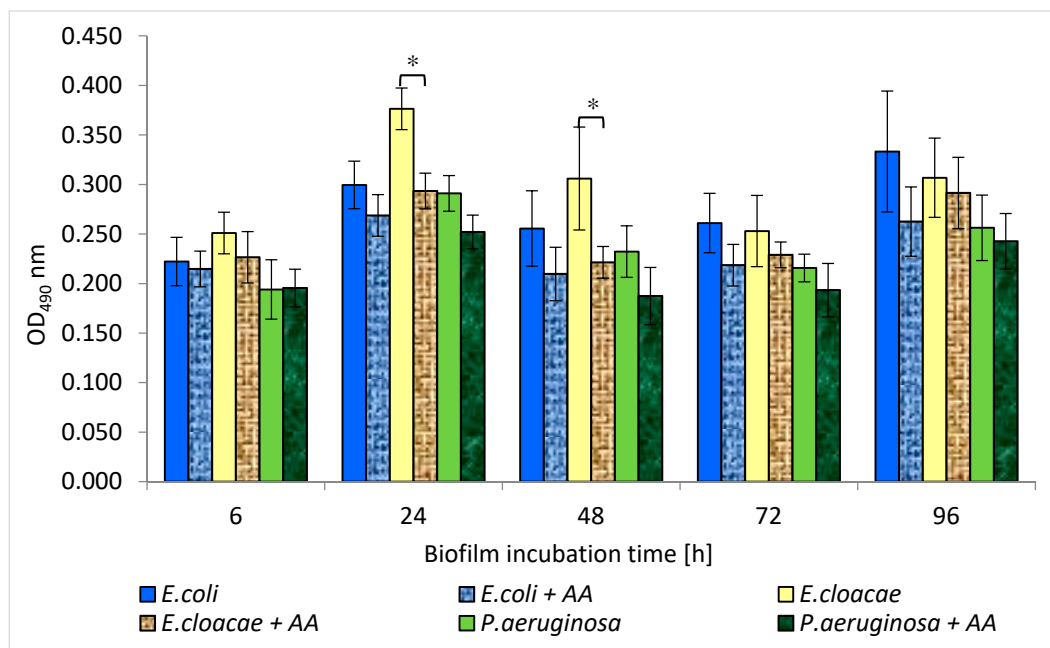


Figure 15. The influence of the asiatic acid (AA) on the metabolic activity of bacteria living in mono-species biofilms (* $p \leq 0.05$).

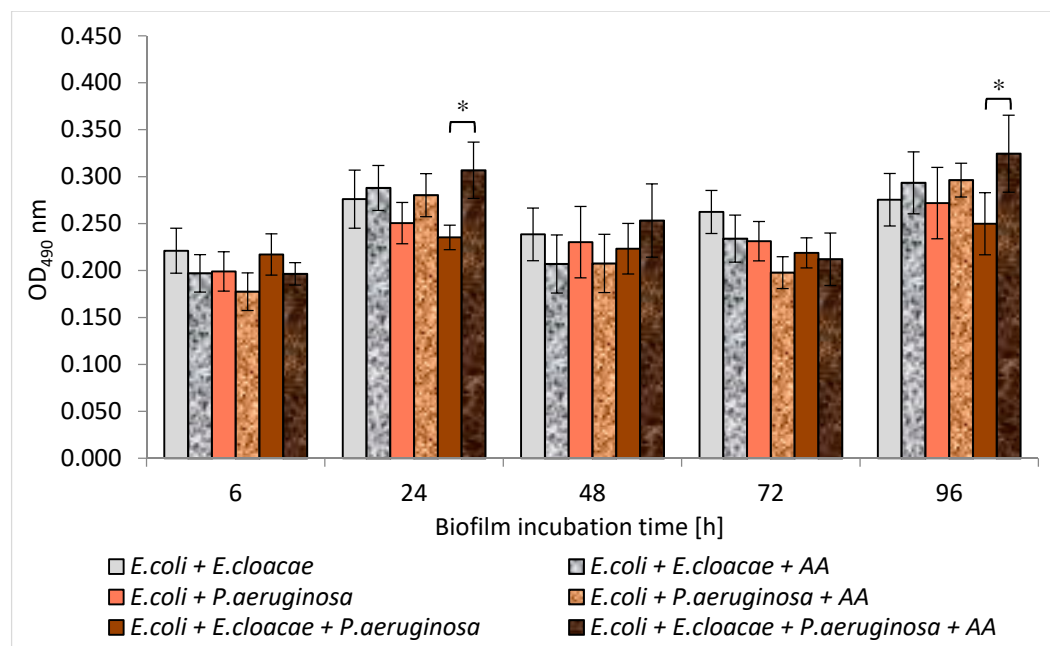


Figure 16. The influence of the asiatic acid (AA) on the metabolic activity of bacteria living in dual- and triple-species biofilms (* $p \leq 0.05$).

It is also difficult to discuss the results of our study regarding the effect of AA on the amount of formed biomass and the metabolic activity of bacteria living in biofilm consortia, due to the lack of literature data in this regard. Nostro et al. [54] described changes in the amount of biofilm and metabolic activity of *E. coli* and *S. aureus* that form a dual-species consortium under the influence of two plant-derived organic compounds—citronellol and eugenol. Citronellol had a better effect on single-species biofilms. The amount of biofilm mass was smaller and the bacterial metabolic activity was weaker compared to the dual-species consortium. In contrast, eugenol showed better antibiofilm activity on the dual-species consortium.

3.12. Effect of AA on Bacterial Morphology

The normal cell length of the investigated strains ranges from 0.8 to 3.0 μm (Figure 17A). Various morphological changes were noted in AA-treated bacterial cells. In young 6 h monocultures of *E. coli* and *E. cloacae* short filaments (5–15 μm) were observed. In older biofilms (24–96 h) additionally, long filaments (>15 μm) have been found (Figure 17B). The so-called “ghost” cells (partially lacking cell wall) were present in single-species mature biofilms of *E. coli* (48–96 h) and *E. cloacae* (96 h) (Figure 17C). No morphological changes were observed in the biofilms formed by *P. aeruginosa*. Short and long filaments, as well as “ghost” cells, were observed in AA-treated dual-biofilm of *E. coli* + *P. aeruginosa*, regardless of its maturation stage (Figure 17D). In young 6 h dual-biofilms formed by *E. coli* + *E. cloacae* and triple-species biofilms (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*), only short filaments were found, while in older biofilms (24–96 h), additionally long filaments and “ghost” cells were observed (Figure 17E).

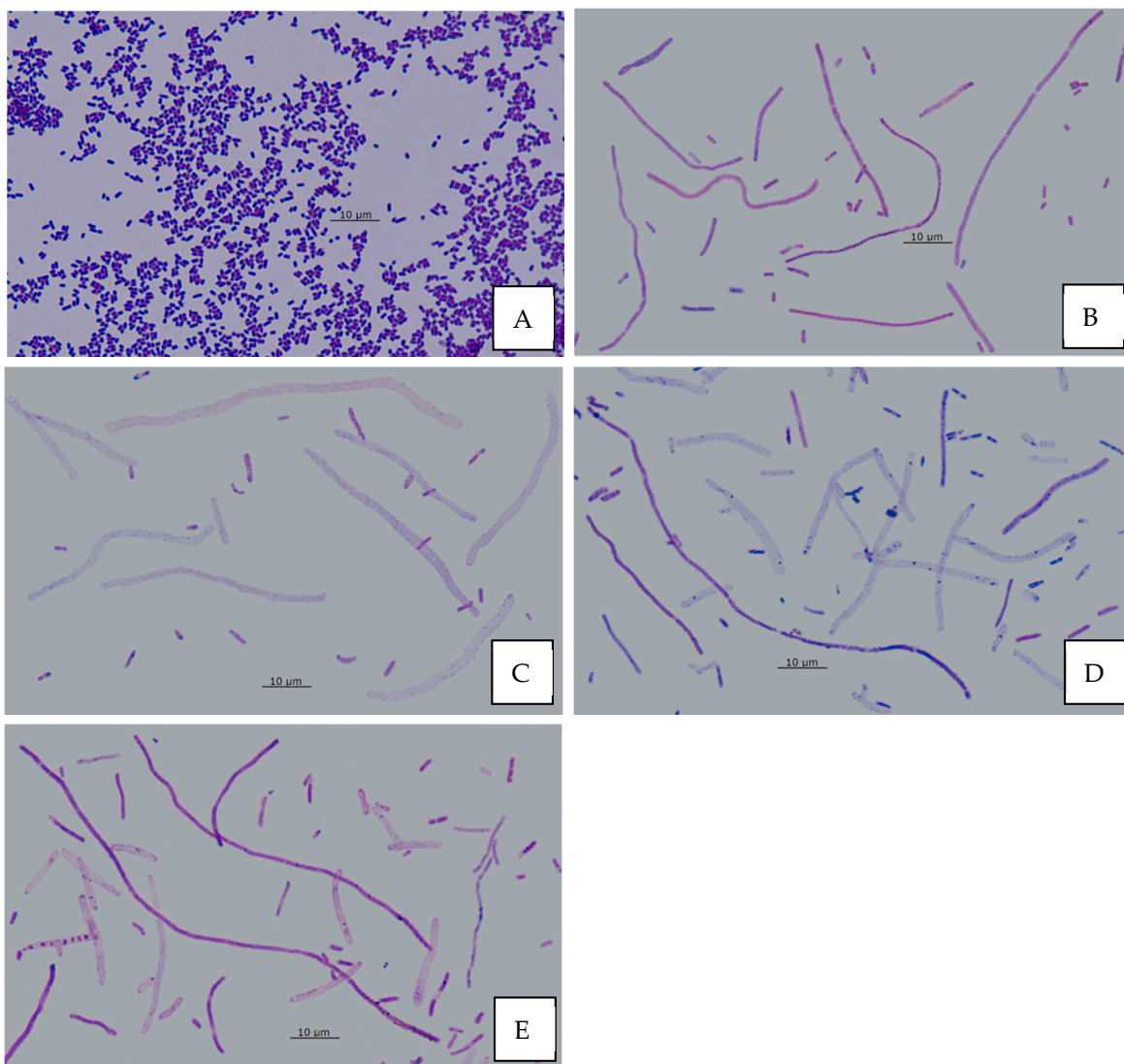


Figure 17. Morphological changes of bacterial cells under the treatment with asiatic acid (AA); (A)—untreated bacteria; (B–E)—samples treated with AA: (B)—long filaments in *E. coli* + *E. cloacae* biofilms (24–96 h); (C)—“ghost” cells in *E. coli* and *E. cloacae* biofilms (48–96 h); (D)—short filaments, long filaments and “ghost” cells in *E. coli* + *P. aeruginosa* biofilms (6–96 h); (E)—short filaments, long filaments and “ghost” cells in *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* biofilms (24–96 h) (Nikon Eclipse 400; magnification, $\times 1000$).

Our study showed that in the presence of AA, there were short filaments (5–15 μm) in young 6 h monoculture biofilms formed by *E. coli* and *E. cloacae*, and additionally long filaments (>15 μm) in older biofilms (24–96 h). “Ghost” cells were found in single-species mature biofilms of *E. coli* (48–96 h) and *E. cloacae* (96 h). On the other hand, no morphological changes were observed in mono-species biofilms formed by *P. aeruginosa*. In dual-species biofilms formed by AA-treated *E. coli* + *P. aeruginosa*, there were short and long filaments and “ghost” cells, regardless of the developmental stage of these biofilms (Figure 17D). On the other hand, in young 6 h biofilms formed by *E. coli* + *E. cloacae* there were only short filaments, while older biofilms (24–96 h) additionally contained long filaments and “ghost” cells. In a triple-species biofilm (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) the same changes as in the dual-species biofilm formed by *E. coli* + *E. cloacae* were observed. In AA-treated biofilm cultures, there were changes in bacterial cellular morphology: short and long filaments and “ghost” cells. Similar changes were observed in microscopic images of *E. coli* cultures by Wojnicz et al. [17], who additionally found cells that were thickened, and they had intracellular edema. Wojnicz et al. [21] also conducted research concerning the effects of AA on biofilms formed by clinical *E. faecalis* strains. The cells of these cocci were larger in terms of diameter, and they formed irregular aggregates instead of chains.

It is known that morphological changes of bacterial cells are determined by different mechanisms. Cell filamentation may be caused by impaired synthesis of peptidoglycan that builds the cell wall or impaired formation of division septa. PBP3 (penicillin-binding protein 3) plays an important role in the formation of septa during bacterial cell division. Inhibition of this enzyme’s activity causes cell elongation without cell division. Beta-lactam antibiotics, which have an affinity for PBP3, exhibit such division inhibitory activity. They cause filaments formation by *E. coli* and *P. aeruginosa* already at low antibiotic concentrations [55,56]. However, this is not the only mechanism that leads to the filamentation of bacterial cells. The filamentation of bacterial cells is also observed due to the inhibition of replication caused by DNA damage or dysfunction of the FtsZ protein, which is a key molecule for bacterial divisions. Delayed septum formation occurs due to inhibition of the FtsZ by the SulA protein. This inhibits the formation of the division ring and causes PBP3 inactivation. Cell filamentation is also observed under the influence of fluoroquinolones (e.g., ciprofloxacin) that contribute to blocking DNA replication by inhibiting gyrase activity [57,58]. It should be noted that both inhibitors of peptidoglycan synthesis and DNA synthesis may result in the creation of “ghost” cells in which partial lysis of the cell wall has occurred [59]. The mechanism of action of AA has yet to be thoroughly understood and described. In our current study, the observed morphological changes in *E. coli* and *E. cloacae* cells after exposure to AA confers the assumption that not only does it destroy the cell membrane integrity and cause its dysfunction, but it can also penetrate the bacterial cell and interact with DNA and/or proteins involved in the formation of the division septum. In this way, AA could affect the replication process and interfere with the cell division of the bacterial cell. Therefore, phenotypically altered bacteria may have a loss of ability to adhere to host cells, which consequently reduces their virulence.

4. Conclusions

The results of this study show significant effects of AA on the survival of bacterial cells, their morphology, ability to form single-, dual-, and triple-species biofilms, and metabolic activity of the cells living in them. However, there is a need for further research concerning AA as a documented bioactive substance, especially regarding its mechanism of action on bacterial cells. It is even more necessary to define principles of validating the antimicrobial activity of AA and principles of relating/converting the potency of its in vitro effect to its in vivo therapeutic effect. AA could then be used as both a complementary agent and adjunctive one for conventional antibiotic therapy applied for chronic UTIs. It could also be a preventive measure for people who are prone to recurrent UTIs. As AA worked best on young biofilms, the use of AA-containing formulations would be reasonable especially during the initial stages of infection.

Author Contributions: Conceptualization, Z.S., D.T.-G. and D.W.; methodology, Z.S., D.T.-G. and D.W.; investigation, Z.S., D.T.-G. and D.W.; data curation, Z.S., D.T.-G. and D.W.; writing—original draft preparation, Z.S., D.T.-G. and D.W.; writing—review and editing, D.T.-G., A.J.-D. and D.W.; visualization, Z.S. and D.T.-G.; supervision, D.T.-G. and D.W.; project administration, D.T.-G. and D.W.; funding acquisition, D.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by The Ministry of Health subvention according to number of STM.A060.20.060 from the IT Simple system of Wroclaw Medical University.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Lv, J.; Sharma, A.; Zhang, T.; Wu, Y.; Ding, X. Pharmacological review on asiatic acid and its derivatives: A potential compound. *SLAS Technol.* **2018**, *23*, 111–127. [[CrossRef](#)]
2. Nagoor Meeran, M.F.; Goyal, S.N.; Suchal, K.; Sharma, C.; Patil, C.R.; Ojha, S.K. Pharmacological properties, molecular mechanisms, and pharmaceutical development of asiatic acid: A pentacyclic triterpenoid of therapeutic promise. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. James, J.T.; Dubery, I.A. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules* **2009**, *14*, 3922–3941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Jäger, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M.N.; Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants—Rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* **2009**, *14*, 2016–2031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Karłowicz-Bodalska, K.; Han, S.; Han, T.; Miranowicz, M.; Bodalska, A. *Centella asiatica* (L.) Urban, syn. *Hydrocotyle asiatica* L.—Asian pennywort—A famous medicinal plant of the Far East. *Post. Fitoter.* **2013**, *4*, 225–235. (In Polish)
6. Sun, B.; Wu, L.; Wu, Y.; Zhang, C.; Qin, L.; Hayashi, M.; Kudo, M.; Gao, M.; Liu, T. Therapeutic potential of *Centella asiatica* and its triterpenes: A review. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 568032. [[CrossRef](#)]
7. Thanusha, A.V.; Dinda, A.K.; Koul, V. Evaluation of nano hydrogel composite based on gelatin/HA/CS suffused with asiatic acid/ZnO and CuO nanoparticles for second degree burns. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *89*, 378–386.
8. Yuyun, X.; Xi, C.; Qing, Y.; Lin, X.; Ke, R.; Bingwei, S. Asiatic acid attenuates lipopolysaccharide-induced injury by suppressing activation of the Notch signaling pathway. *Oncotarget* **2018**, *9*, 15036–15046. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Han, Y.; Jiang, Y.; Li, Y.; Wang, M.; Fan, T.; Liu, M.; Ke, Q.; Xu, H.; Yi, Z. An aligned porous electrospun fibrous scaffold with embedded asiatic acid for accelerating diabetic wound healing. *J. Mater. Chem. B.* **2019**, *7*, 6125–6138. [[CrossRef](#)]
10. Liew, K.Y.; Hafiz, M.F.; Chong, Y.J.; Harith, H.H.; Israf, D.A.; Tham, C.L. A review of malaysian herbal plants and their active constituents with potential therapeutic applications in sepsis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2020**, *2020*, 8257817.
11. Bylka, W.; Znajdek-Awizeń, P.; Studzińska-Sroka, E.; Dańczak-Pazdrowska, A.; Brzezińska, M. *Centella asiatica* in dermatology: An overview. *Phytother Res.* **2014**, *28*, 1117–1124. [[CrossRef](#)]
12. Chandrika, U.G.; Prasad Kumarab, P.A. Gotu Kola (*Centella asiatica*): Nutritional properties and plausible health benefits. *Adv. Food Nutr. Res.* **2015**, *76*, 125–157.
13. Djoukeng, J.D.; Abou-Mansour, E.; Tabacchi, R.; Tapondjou, A.L.; Bouda, H.; Lontsi, D. Antibacterial triterpenes from *Syzygium guineense* (Myrtaceae). *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *101*, 283–286. [[CrossRef](#)]
14. Acebey-Castellon, I.L.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Doan Thi Mai, H.; Roseau, N.; Bouthagane, N.; Muhammad, D.; Le Magrex Debar, E.; Gangloff, S.C.; Litaudon, M.; Sevenet, T.; et al. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 163–168. [[CrossRef](#)]
15. Norzaharaini, M.G.; Wan Norshazwani, W.S.; Hasmah, A.; Nor Izani, N.J.; Rapeah, S. Preliminary study on antimicrobial activities of asiaticoside and asiatic acid against selected gram positive and gram-negative bacteria. *Health Environ. J.* **2011**, *2*, 23–26.
16. Wong, K.C.; Hag Ali, D.M.; Boey, P.L. Chemical constituents and antibacterial activity of *Melastoma malabathricum* L. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 609–618. [[CrossRef](#)]
17. Wojnicz, D.; Kicia, M.; Tichaczek-Goska, D. Effect of asiatic and ursolic acids on morphology, hydrophobicity and adhesion of UPECs to uroepithelial cells. *Folia Microbiol.* **2013**, *58*, 245–252.
18. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Kicia, M. Effect of asiatic and ursolic acids on growth and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Turk. J. Biol.* **2013**, *37*, 556–564. [[CrossRef](#)]
19. Liu, W.H.; Liu, T.C.; Mong, M.C. Antibacterial effects and action modes of asiatic acid. *Biomedicine* **2015**, *5*, 22–29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Ashella, S.; Fleming, A.T. Antimicrobial activity of asiatic acid against bacteria and fungi. *IJSR Online* **2016**, *5*, 920–921.

21. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Korzekwa, K.; Kicia, M.; Hendrich, A. Anti-enterococcal activities of pentacyclic triterpenes. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 483–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Harnvoravongchai, P.; Chankhamhaengdecha, S.; Ounjai, P.; Singhakaew, S.; Boonthaworn, K.; Janvilisri, T. Antimicrobial effect of asiatic acid against *Clostridium difficile* is associated with disruption of membrane permeability. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Garo, E.; Eldridge, G.R.; Goering, M.G.; DeLancey Pulcini, E.; Hamilton, M.A.; Costerton, J.W.; James, G.A. Asiatic acid and corosolic acid enhance the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to tobramycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1813–1817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Kicia, M. Pentacyclic triterpenes combined with ciprofloxacin help to eradicate the biofilm formed in vitro by *Escherichia coli*. *Indian J. Med. Res.* **2015**, *141*, 343–353. [[CrossRef](#)]
25. CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th ed.; CLSI standard M07; Clinical and Laboratory Standards Institut: Wayne, PA, USA, 2018.
26. Di Bonaventura, G.; Spedicato, I.; D'Antonio, D.; Robuffo, I.; Piccolomini, R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* modulation by quinolones, trimethoprim, sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 151–160. [[CrossRef](#)]
27. O'Toole, G.A.; Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 295–304. [[CrossRef](#)]
28. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899. [[CrossRef](#)]
29. Singh, A.K.; Prakash, P.; Achra, A.; Singh, G.P.; Das, A.; Singh, R.K. Standardization and classification of in vitro biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Global. Infect. Dis.* **2017**, *9*, 93–101.
30. Kim, S.; Kim, M.J.; Kang, H.Y.; Seol, S.Y.; Cho, D.T.; Kim, J. A simple colorimetric method for testing antimicrobial susceptibility of biofilmed bacteria. *J. Microbiol.* **2010**, *48*, 709–711. [[CrossRef](#)]
31. Haney, E.F.; Trimble, M.J.; Cheng, J.T.; Vallé, Q.; Hancock, R.E.W. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules* **2018**, *8*, 29. [[CrossRef](#)]
32. Taemchuay, D.; Rukkamsuk, T.; Sakpuaram, T.; Ruangwises, N. Antibacterial activity of crude extracts of *Centella asiatica* against *Staphylococcus aureus* in bovine mastitis. *Kasetsart Vet.* **2009**, *19*, 119–128.
33. Machado, I.; Lopes, S.P.; Sousa, A.M.; Pereira, M.O. Adaptive response of single and binary *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms to benzalkonium chloride. *J. Basic Microbiol.* **2012**, *52*, 43–52. [[CrossRef](#)]
34. Vanysacker, L.; Denis, C.; Declerck, P.; Piasecka, A.; Vankelecom, I.F. Microbial adhesion and biofilm formation on microfiltration membranes: A detailed characterization using model organisms with increasing complexity. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 470867. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Cerqueira, L.; Oliveira, J.A.; Nicolau, A.; Azevedo, N.F.; Vieira, M.J. Biofilm formation with mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa/Escherichia coli* on silicone using artificial urine to mimic urinary catheters. *Biofouling* **2013**, *29*, 829–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kuznetsova, M.V.; Maslennikova, I.L.; Karpunina, T.I.; Nesterova, L.Y.; Demakov, V.A. Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* in predominant biofilm or planktonic forms of existence in mixed culture with *Escherichia coli* in vitro. *Can. J. Microbiol.* **2013**, *59*, 604–610. [[CrossRef](#)]
37. Oliveira, A.; Sousa, J.C.; Silva, A.C.; Melo, L.D.R.; Sillankorva, S. Chestnut honey and bacteriophage application to control *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms: Evaluation in an ex vivo wound model. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Solis-Velazquez, O.A.; Gutiérrez-Lomelí, M.; Guerreo-Medina, P.J.; Rosas-García, M.L.; Iñiguez-Moreno, M.; Avila-Novoa, M.G. Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2020**. [[CrossRef](#)]
39. Mirani, Z.A.; Fatima, A.; Urooj, S.; Aziz, M.; Khan, M.N.; Abbas, T. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Escherichia coli*. *Iran J. Basic Med. Sci.* **2018**, *21*, 760–769.
40. Davies, D.G.; Marques, C.N.H. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 1393–1403. [[CrossRef](#)]
41. Rahmani-Badi, A.; Sepehr, S.; Mohammadi, P.; Soudi, M.R.; Babaie-Naiej, H.; Fallahi, H. A combination of cis-2-decenoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 1509–1516. [[CrossRef](#)]
42. Tiwari, R.; Karthik, K.; Rana, R.; Malik, Y.S.; Dhama, K.; Joshi, S.K. Quorum sensing inhibitors/antagonists countering food spoilage bacteria—need molecular and pharmaceutical intervention for protecting current issues of food safety. *Int. J. Pharmacol.* **2016**, *12*, 262–271. [[CrossRef](#)]
43. Cao, T.; Morales-Soto, N.; Jia, J.; Baig, N.F.; Dunham, S.J.B.; Ellis, J.; Sweedler, J.V.; Shrout, J.D.; Bohn, P.W. Spatiotemporal dynamics of molecular messaging in bacterial co-cultures studied by multimodal chemical imaging. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **2019**, *10863*, 108630A. [[PubMed](#)]

44. Bhattacharjee, A.; Khan, M.; Kleiman, M.; Hochbaum, A.I. Effects of growth surface topography on bacterial signaling in coculture biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 18531–18539. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Chu, W.; Zere, T.R.; Weber, M.M.; Wood, T.K.; Whiteley, M.; Hidalgo-Romano, B.; Valenzuela, E., Jr.; McLean, R.J. Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 411–419. [[CrossRef](#)]
46. Lopes, S.P.; Machado, I.; Pereira, M.O. Role of planktonic and sessile extracellular metabolic byproducts on *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* intra and interspecies relationships. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 133–140. [[CrossRef](#)]
47. Castonguay, M.H.; van der Schaaf, S.; Koester, W.; Krooneman, J.; van der Meer, W.; Harmsen, H.; Landini, P. Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Res. Microbiol.* **2006**, *157*, 471–478. [[CrossRef](#)]
48. Wang, X.; Lünsdorf, H.; Ehrén, I.; Brauner, A.; Römling, U. Characteristics of biofilms from urinary tract catheters and presence of biofilm-related components in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **2010**, *60*, 446–453. [[CrossRef](#)]
49. Qian, W.; Fu, Y.; Liu, M.; Zhang, J.; Wang, W.; Li, J.; Zeng, Q.; Wang, T.; Li, Y. Mechanisms of action of luteolin against single- and dual-species of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and its antibiofilm activities. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *193*, 1397–1414. [[CrossRef](#)]
50. Liu, N.T.; Nou, X.; Lefcourt, A.M.; Shelton, D.R.; Lo, Y.M. Dual-species biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 and environmental bacteria isolated from fresh-cut processing facilities. *Int. J. Food Microbiol.* **2014**, *171*, 15–20. [[CrossRef](#)]
51. Culotti, A.; Packman, A.I. *Pseudomonas aeruginosa* promotes *Escherichia coli* biofilm formation in nutrient-limited medium. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107186. [[CrossRef](#)]
52. Bharitkar, Y.P.; Banerjee, M.; Kumar, S.; Paira, R.; Meda, R.; Kuotsu, K.; Mondal, N.B. Search for a potent microbicidal spermicide from the isolates of *Shorea robusta* resin. *Contraception* **2013**, *88*, 133–140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Schwering, M.; Song, J.; Louie, M.; Turner, R.J.; Ceri, H. Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling* **2013**, *29*, 917–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Nostro, A.; Scaffaro, R.; D'Arrigo, M.; Botta, L.; Filocamo, A.; Marino, A.; Bisignano, G. Development and characterization of essential oil component-based polymer films: A potential approach to reduce bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9515–9523. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Kong, K.F.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* **2010**, *118*, 1–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. El-Hajj, Z.W.; Newman, E.B. How much territory can a single *E. coli* cell control? *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 309. [[CrossRef](#)]
57. Justice, S.S.; Hunstad, D.A.; Seed, P.C.; Hultgren, S.J. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19884–19889. [[CrossRef](#)]
58. Cheng, G.; Hao, H.; Dai, M.; Liu, Z.; Yuan, Z. Antibacterial action of quinolones: From target to network. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 555–562. [[CrossRef](#)]
59. Cushnie, T.P.; O'Driscoll, N.H.; Lamb, A.J. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 4471–4492. [[CrossRef](#)]

6.3. Artykuł nr 3

Does secondary plant metabolite – ursolic acid exhibit antibacterial activity against uropathogenic Escherichia coli living in single- and multispecies biofilms?

Zuzanna Sycz, Dorota Wojnicz, Dorota Tichaczek-Goska

Pharmaceutics **2022**, Vol.14 no. 8, art. 1691 [20 s.]

DOI: 10.3390/pharmaceutics14081691

Impact Factor: **6,525**

Punkty KBN/MNiSW: **100,00**

Article

Does Secondary Plant Metabolite Ursolic Acid Exhibit Antibacterial Activity against Uropathogenic *Escherichia coli* Living in Single- and Multispecies Biofilms?

Zuzanna Sycz, Dorota Wojnicz * and Dorota Tichaczek-Goska

Department of Biology and Medical Parasitology, Wrocław Medical University, 50-345 Wrocław, Poland

* Correspondence: dorota.wojnicz@umw.edu.pl; Tel.: +48-71-784-15-18

Abstract: Multispecies bacterial biofilms are the often cause of chronic recurrent urinary tract infections within the human population. Eradicating such a complex bacterial consortium with standard pharmacotherapy is often unsuccessful. Therefore, plant-derived compounds are currently being researched as an alternative strategy to antibiotic therapy for preventing bacterial biofilm formation and facilitating its eradication. Therefore, our research aimed to determine the effect of secondary plant metabolite ursolic acid (UA) on the growth and survival, the quantity of exopolysaccharides formed, metabolic activity, and morphology of uropathogenic Gram-negative rods living in single- and mixed-species biofilms at various stages of their development. Spectrophotometric methods were used for biofilm mass formation and metabolic activity determination. The survival of bacteria was established using the serial dilution assay. The decrease in survival and inhibition of biofilm creation, both single- and multispecies, as well as changes in the morphology of bacterial cells were noticed. As UA exhibited better activity against young biofilms, the use of UA-containing formulations, especially during the initial steps of urinary tract infection, seems to be reasonable. However, the future direction should be a thorough understanding of the mechanisms of UA activity as a bioactive substance.

Keywords: ursolic acid; plant metabolites; multispecies biofilm; urinary tract infections; uropathogenic bacteria

Citation: Sycz, Z.; Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D. Does Secondary Plant Metabolite Ursolic Acid Exhibit Antibacterial Activity against Uropathogenic *Escherichia coli* Living in Single- and Multispecies Biofilms? *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1691. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081691>

Academic Editors: Maria Nowakowska and Clive Prestidge

Received: 17 May 2022

Accepted: 12 August 2022

Published: 14 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ursolic acid (UA; 3 β -hydroxy-12-ursen-28-ic acid) belongs to the group of pentacyclic triterpenes (TPs), polycyclic compounds classified as secondary plant metabolites. Large amounts of UA are found in the leaves of *Arctostaphylos uva-ursi*, known as bearberry. This plant is a pharmacopeial material with antibacterial, anti-inflammatory, and diuretic properties, used in modern phytotherapy as an adjuvant in the treatment of urinary tract infections (UTIs) [1–4].

The in vitro and in vivo studies to date have confirmed the numerous pharmacological properties of UA, including antineoplastic, hypotensive, cardioprotective, antidiabetic, nephroprotective, diuretic, immunostimulating, antimalarial, anticryptococcal, antituberculous, and antiviral [5–12]. In addition, UA may accelerate the healing process of wounds, stimulate muscle growth, and reduce the growth of adipose tissue, and it is also a component of dermatological preparations, cosmetics, and dietary supplements for athletes [13–15].

The experiments carried out in recent years have also shown that UA alone and in combination with antibiotics (including β -lactams, tetracyclines, fluoroquinolones, and aminoglycosides) shows significant antibacterial activity, but these studies mainly concerned bacteria living in suspension—the so-called planktonic forms [16–42].

The above studies included the determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) value of UA and its influence on the survival of bacteria, on the morphology of cells and bacterial membranes as well as on the impact on bacterial virulence factors such as hydrophobicity of the surface of bacterial cells, ability to move, and synthesis of the curli fimbria and P-type fimbria. Few research centers have investigated the effect of UA on the ability of bacteria to form biofilms, and these studies have focused on single-species consortia [30,41,43–57].

It is known that both the biofilms formed by commensal and pathogenic bacteria can constitute single-species consortia but also can consist of many species of microorganisms. Examples of both single- and multispecies structures are formed in the course of a urinary tract infection (UTI). The main etiological factor of UTI is uropathogenic *Escherichia coli*, accompanied by other species, including *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* [58]. The eradication of such a multispecies biofilm with standard pharmacotherapy is often unsuccessful. Therefore, plant-derived compounds are currently being researched as an alternative strategy to antibiotic therapy for preventing the formation of bacterial biofilm and facilitating its removal. The effect of UA on multispecies biofilms is limited to the influence of this acid on Gram-positive bacteria from the genus *Streptococcus* [59].

Therefore, our research aimed to determine the effect of UA on the growth and survival of *E. coli* rods living in single-, dual- (*E. coli* + *E. cloacae*; *E. coli* + *P. aeruginosa*), and triple-species (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) biofilms at various stages of their development. We also attempted to assess the differences in the amount of biofilm mass formed, metabolic activity, and the morphology of bacteria with the treatment of UA in the various biofilm consortia depending on their species content.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strains

Three uropathogenic reference strains from the American Type Culture Collection (ATCC) were used in the study: *Escherichia coli* CFT073 (ATCC 700928), *Enterobacter cloacae* ATCC-BAA 2468, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25000. The strains were maintained at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in nutrient broth containing 40% glycerol.

2.2. Cultural Media and Chemicals

The following culture media and chemicals were used: chromogenic coliform agar CFS 1424 (Graso Biotech, Starogard Gdański, Poland), trypticasein soy broth (TSB; Biocorp, Warsaw, Poland), trypticasein soy agar (TSA; Biocorp, Warsaw, Poland), nutrient broth (SIS-Biomed, Warsaw, Poland), lab agar (Biocorp, Warsaw, Poland), Mueller–Hinton broth II (MHB; International Diagnostic Group plc, Cardiff, UK), dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, Poznań, Poland), phosphate-buffered saline (PBS; Polgen, Warsaw, Poland), crystal violet (CV; Sigma-Aldrich, Poznań, Poland), 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC; Sigma-Aldrich, Poznań, Poland).

2.3. Antimicrobial Agent

Ursolic acid (UA, purity $\geq 90\%$) was purchased from Sigma-Aldrich (Poznań, Poland). Stock solution at a concentration of 4 mg/mL was prepared each time by dissolving UA in DMSO. For further experiments, the final concentration of UA was prepared by diluting the stock with an appropriate culture medium.

2.4. Preparation of Bacterial Suspension

The bacteria were suspended in 1 mL of TSB and incubated in a shaking water bath ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 h). After centrifugation (4500 rpm/5 min), a sufficient volume of PBS was added to the pellet to obtain a bacterial suspension with an optical density of 0.5 McFarland ($1\text{--}2 \times 10^8$ CFU/mL).

2.5. Preparation of Biofilm Cultures

Bacterial cultures were carried out in 96-well polystyrene microtiter plates for 6, 24, 48, 72, and 96 h. Single-species (*E. coli*; *E. cloacae*; *P. aeruginosa*), dual-species (*E. coli* + *E. cloacae*; *E. coli* + *P. aeruginosa*) and triple-species (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) biofilms were prepared. The control biofilms did not contain UA, while the test samples contained UA at a concentration of $0.5 \times \text{MIC}$ (768 $\mu\text{g/mL}$). Twenty microliters of each bacterial suspension with a density of $1\text{--}2 \times 10^8$ CFU/mL was added to each UA-treated and untreated (control) sample.

2.6. Biofilm Formation on Microtiter Plates and Count of Live Bacteria in Biofilm

Bacterial survival in biofilm was established after each time of incubation (6, 24, 48, 72, and 96 h). Biofilm cultures were gently washed away to remove cells not bound to the matrix. The biofilm deposited on the wall of the microplate well was scraped with a sterile spatula [60] and resuspended in PBS. Then, the number of live bacteria in the biofilm (CFU/mL) was determined by serial dilution and plating on agar plates. Three biological replicates were performed, and each had 6 technical replicates. The final results are average values.

2.7. Biofilm Formation Assay and Quantification

From 6, 24, 48, 72, and 96 h biofilm cultures, cells unbound with matrix were removed by gentle rinsing three times with sterile distilled water. Then, 1% CV was added to each well and incubated at 37 °C for 15 min to cause the CV to penetrate the biofilm structure. The dye was then removed, and 95% ethanol was added to wash the CV off the biofilm matrix. After 15 min of incubation at room temperature, the optical density (OD) was measured at a wavelength of 590 nm on a microplate reader (HiPo MPP-96® BIOSAN, Riga, Latvia). Based on the OD value, bacterial strains were classified into one of the following groups: $\text{OD} \leq \text{ODc}$ —not producing biofilm; $\text{ODc} < \text{OD} \leq 2 \times \text{ODc}$ —weak biofilm-producing; $2 \times \text{ODc} < \text{OD} \leq 4 \times \text{ODc}$ —producing moderate biofilm; $4 \times \text{ODc} < \text{OD}$ —producing strong biofilm. The ODc cut-off value was calculated as the sum of the mean OD value for the blank (TSB) and 3 times the standard deviation of the mean OD for TSB [61–63]. The experiment was repeated three times. The optical density was read from 6 wells of the microtiter plate, giving a total of 18 repeats. The final results are average values.

2.8. Determination of the Metabolic Activity of Bacteria in a Biofilm by Spectrophotometry

The 10% TTC was added to 6, 24, 48, 72, and 96 h biofilm cultures. The metabolically active bacteria reduced TTC to red triphenyl formazan. After 24 h of incubation at 37 °C, planktonic cells were removed by rinsing the biofilm cultures three times with sterile distilled water. Then, 95% ethanol was added to each culture, and after 15 min of incubation at room temperature, the amount of produced triphenyl formazan was measured spectrophotometrically (HiPo MPP-96® BIOSAN, Riga, Latvia) at a wavelength of 490 nm [64,65]. The experiment was repeated three times. The optical density was read from 6 wells of the microtiter plate, giving a total of 18 repeats. The final results are average values.

2.9. Effect of UA on Bacterial Morphology

Bacterial biofilms were incubated at 37 °C for 6, 24, 48, 72, and 96 h without UA and with UA at a concentration of $0.5 \times \text{MIC}$ in 96-well microtiter plates. The samples were then washed three times in PBS. Then, to visualize bacterial cells, 20 μL of each culture was transferred onto a glass slide, air-dried, Gram-stained, and observed in a microscope (Nikon Eclipse 400, Tokyo, Japan) with 1000-fold magnification. The changes in bacterial cell morphology were recorded with the use of PROGRES GRYPHAX® Version 2.2.0.1234, Jenoptik, Jena, Germany.

2.10. Statistical Analysis

The nonparametric Kruskal–Wallis test followed by a Dunn’s multiple comparison test was used in analysis of the obtained results. Statistical calculations were performed using Statistica 13.3. (Stat Soft, Kraków, Poland). All values are expressed as mean \pm SD. Values of $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Survival of *E. coli* in Single-, Dual-, and Triple-Species Biofilms

The aim of the current study was bidirectional. First, we decided to evaluate how the presence of the other bacterial species influences the survival, biofilm mass formation, and metabolic activity of the *E. coli* rods—the most prevalent cause of UTIs. The second very important and completely innovative goal of our research was to assess how the bacteria living in single- and multispecies biofilms are affected by the secondary plant metabolite ursolic acid (UA).

Comparing the number of live *E. coli* cells in single- and dual-species biofilms (*E. coli* + *E. cloacae*; *E. coli* + *P. aeruginosa*) untreated with UA, it was found that the presence of both *E. cloacae* and *P. aeruginosa* rods limited the abundance of the *E. coli* strain (Figure 1). A statistically significant reduction in the number of *E. coli* cells ($p \leq 0.05$) was noted in the *E. coli* + *E. cloacae* biofilm after 6 and 24 h and in the *E. coli* + *P. aeruginosa* biofilm at all stages of its formation, except for the young 6 h culture. The data present in Figure 1 also show that the simultaneous presence of *E. cloacae* and *P. aeruginosa* in the triple-species consortium (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) significantly limited the growth of *E. coli* at all stages of its formation compared to the growth of *E. coli* in monoculture ($p \leq 0.05$).

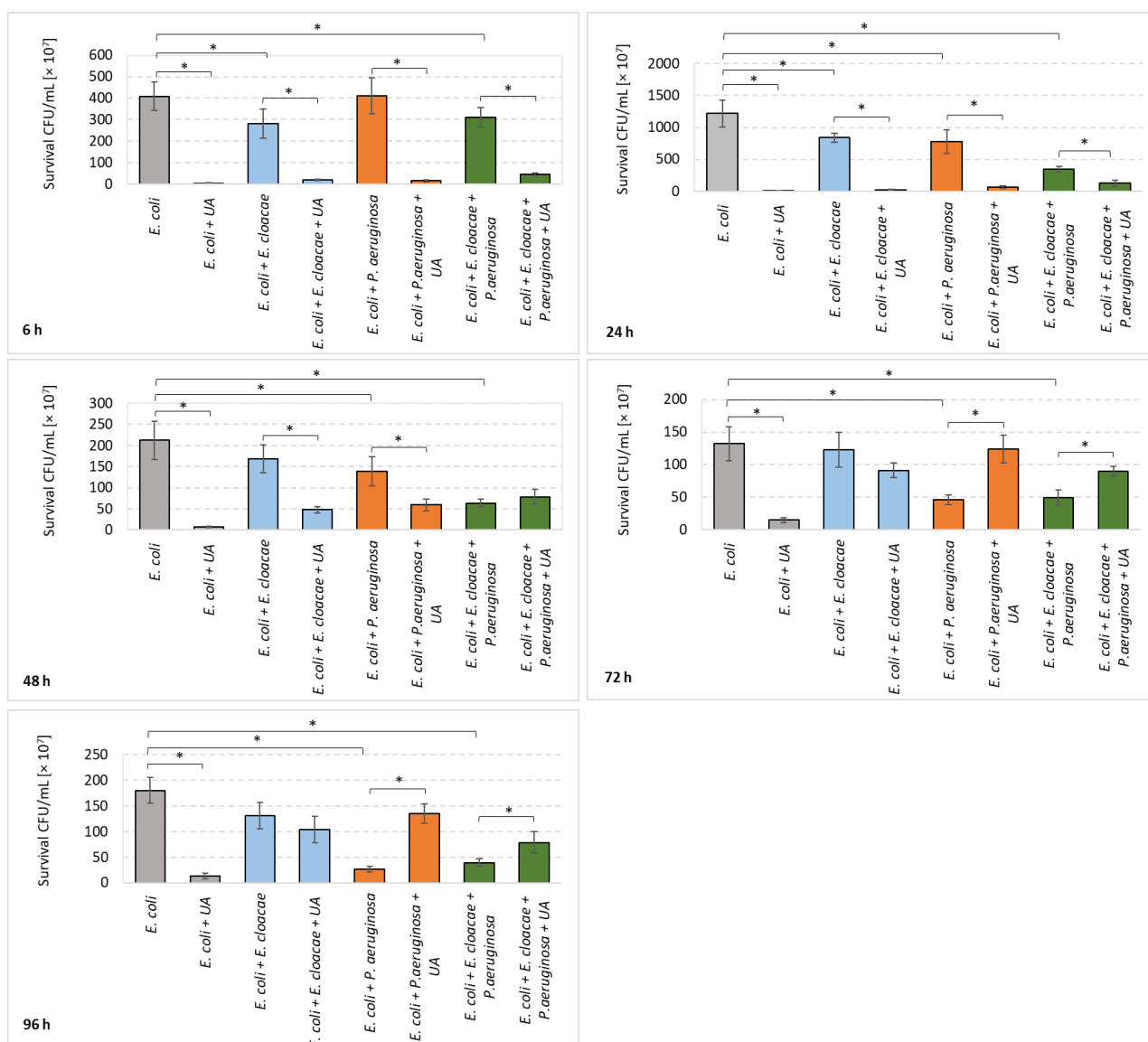


Figure 1. Count of *Escherichia coli* cells living in single-, dual-, and triple-species biofilms untreated (control samples) and treated with ursolic acid (UA). Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were noted with an asterisk (*). The experiment was repeated three times. The grown bacterial colonies were counted from six plates which gives a total of 18 repeats. The final results are average values.

Data present in Figure 1 show that UA significantly decreased the number of *E. coli* in single-species biofilm regardless of its maturity stage ($p \leq 0.05$). The greatest reduction in the number of viable cells ($2 \log_{10}$) occurred after 6 and 24 h of incubation. In the dual-species consortia (*E. coli* + *E. cloacae*; *E. coli* + *P. aeruginosa*), UA significantly reduced the number of *E. coli* rods after 6, 24, and 48 h of incubation. A significant reduction in *E. coli* survival under the influence of UA was also observed in young 6 and 24 h triple-species biofilms (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) ($p \leq 0.05$). Unfortunately, in mature 72 and 96 h cultures exposed to UA, of both dual-species (*E. coli* + *P. aeruginosa*) and triple-species (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*), the number of *E. coli* significantly increased in comparison to the samples untreated with UA.

Comparative analysis of the survival of *E. coli* in the tested biofilms exposed to UA (Figure 1) showed that this acid most significantly affected *E. coli* bacteria living in mono-cultures regardless of the incubation time.

3.2. Formation of Biofilm Mass by Uropathogenic Rods in Nontreated (Control) and UA-Treated Samples

Based on the amount of biofilm formed, read as the optical density (OD) value, the tested bacterial strains were classified into one of three groups: non-biofilm-forming $OD_{590} \leq 0.218$, weak biofilm-producing $0.218 < OD_{590} \leq 0.436$, and moderate biofilm-forming $0.436 < OD_{590} \leq 0.872$. None of the strains was a strong biofilm producer ($OD_{590} > 0.872$).

The data in Figure 2 show that the *E. coli* strain formed a weak biofilm at all stages of its development. The largest amount of biofilm was synthesized in a 6 h culture ($OD_{590} = 0.406$) and the lowest in a 48 h culture ($OD_{590} = 0.261$).

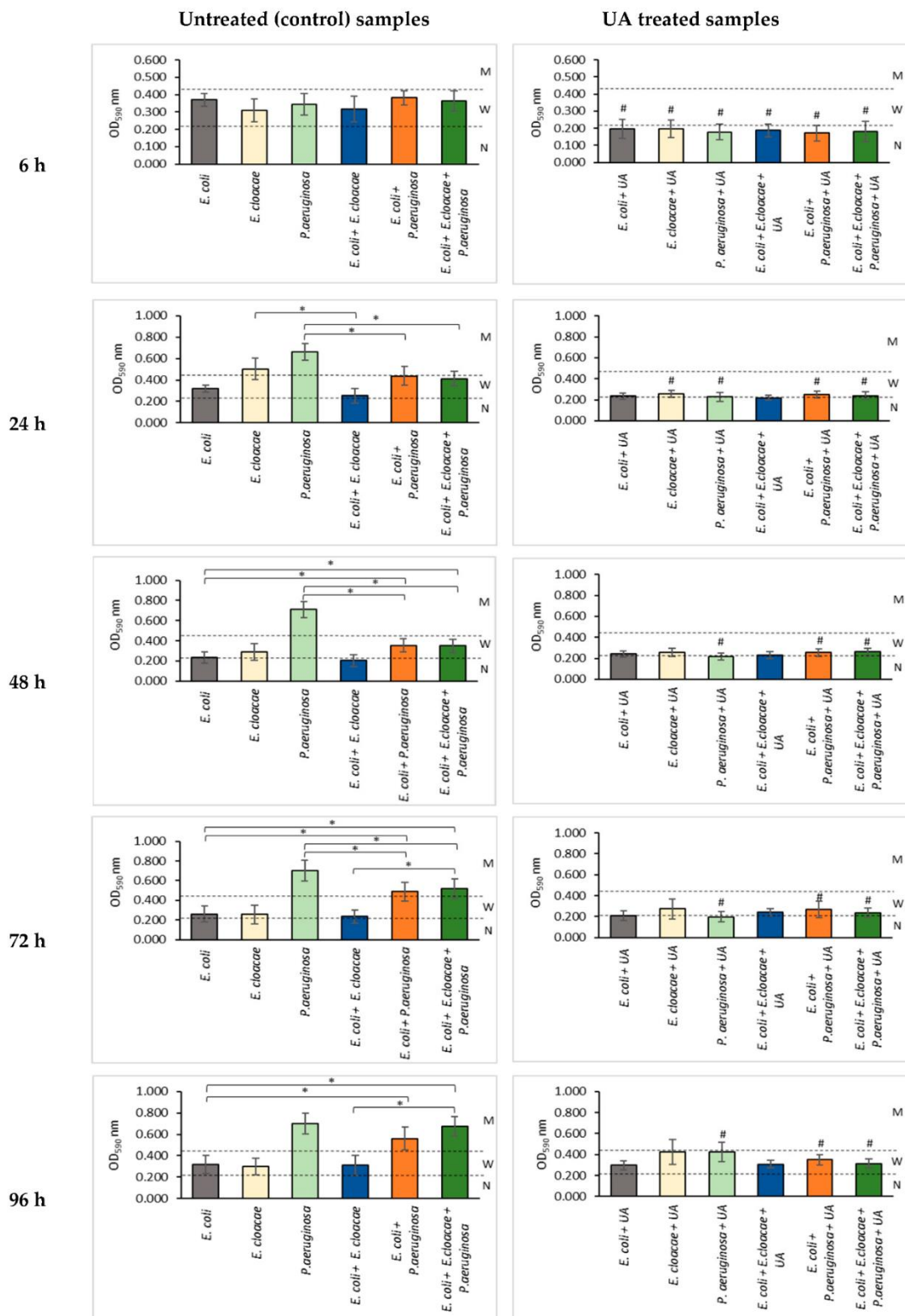


Figure 2. The impact of ursolic acid (UA) on biofilm mass production by bacteria living in single-, dual-, and triple-species biofilms. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were noted with an asterisk (*) when untreated samples were compared with each other or with a hash (#) when UA-treated samples were compared to their untreated controls. N—no biofilm; W—weak biofilm; M—moderate biofilm. The experiment was repeated three times. The optical density was read from six wells of the microtiter plate, giving a total of 18 repeats. The final results are average values.

The *E. cloacae* strain produced a similar amount of the biofilm mass as *E. coli* ($0.281 < OD_{590} \leq 0.329$), except for the 24 h culture where it was a better biofilm producer than the *E. coli* strain ($OD_{590} = 0.574$). The *P. aeruginosa* strain showed the best biofilm production among the three bacterial strains tested. It produced a higher biofilm amount ($0.802 < OD_{590} \leq 0.836$) than the two other tested strains at all stages of biofilm formation except for the young 6 h culture ($OD_{590} = 0.370$).

The analysis of the results presented in Figure 2 shows that the amounts of biofilm mass being produced by the bacteria growing in 24, 48, and 72 h dual-species consortia (*E. coli* + *E. cloacae*) were smaller than the amounts of the biofilm produced by each of these species when growing separately. However, statistical significance was only demonstrated in the 24 h culture ($p \leq 0.05$).

A similar result was noted for the *E. coli* + *P. aeruginosa* dual-species biofilm where it is seen that the presence of *E. coli* antagonistically influences the biofilm mass production by *P. aeruginosa* in the 24, 48, and 72 h cultures ($p \leq 0.05$). The reductions in biofilm mass in these cultures compared to *P. aeruginosa* monoculture were 34%, 51%, and 30%, respectively. The data contained in Figure 2 show that in 24, 48, and 72 h triple-species biofilms (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*), the presence of *E. coli* and *E. cloacae* also significantly reduced the biofilm mass formation by *P. aeruginosa* rods ($p \leq 0.05$). The reductions in biofilm mass in these cultures were 38%, 52%, and 26%, respectively.

The data presented in Figure 2 show that UA significantly inhibited biofilm production in all mono- and multispecies 6 h cultures ($OD_{590} \leq 0.218$) compared to the UA-untreated controls ($p \leq 0.05$). It was also found that UA had an antibiotic effect on the older 24, 48, 72, and 96 h consortia in which *P. aeruginosa* rods were present ($p \leq 0.05$). Additionally, in the 24 h *E. cloacae* culture, UA also significantly reduced the amount of the biofilm synthesized by this strain ($p \leq 0.05$).

3.3. Determination of the Metabolic Activity of Bacteria Living in Mono-, Dual- and Triple-Species Biofilms

The results presented in Figure 3 indicate that *E. cloacae* in the 24 h culture and *E. coli* in the 96 h consortium showed the highest metabolic activity. Analyzing the metabolic activity of bacteria growing in the dual-species *E. coli* + *E. cloacae* biofilm, it was found that their metabolic activity was significantly lower than that of *E. cloacae* growing in monoculture ($p \leq 0.05$).

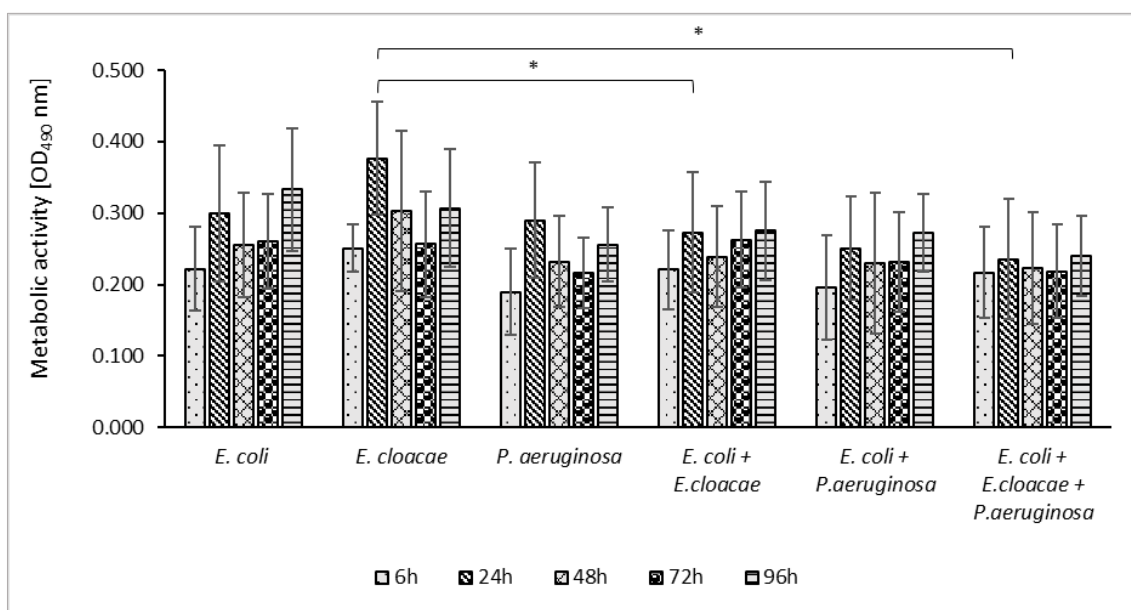


Figure 3. Metabolic activity of bacteria living in mono-, dual- and triple-species biofilms at different stages of biofilm development. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) were noted with an

asterisk (*). The experiment was repeated three times. The optical density was read from six wells of the microtiter plate, giving a total of 18 repeats. The final results are average values.

The metabolic activity of bacteria growing in 24, 48, and 96 h triple-species biofilms was weaker than the metabolic activity of each of these species of rods growing separately. However, a statistically significant result was only observed for the 24 h *E. cloacae* mono-culture ($p \leq 0.05$).

The data in Figure 4 indicate that UA reduced the metabolic activity of the rods growing in all biofilms tested at all stages of their development except for the young 6-hour-old cultures. The UA was the most effective against 24 h consortia. The metabolic activity of rods treated with UA was significantly reduced in both single- and dual-species consortia with a reduction ratio of 28.3–40.5% and 21.1–22.9%, respectively ($p \leq 0.05$).

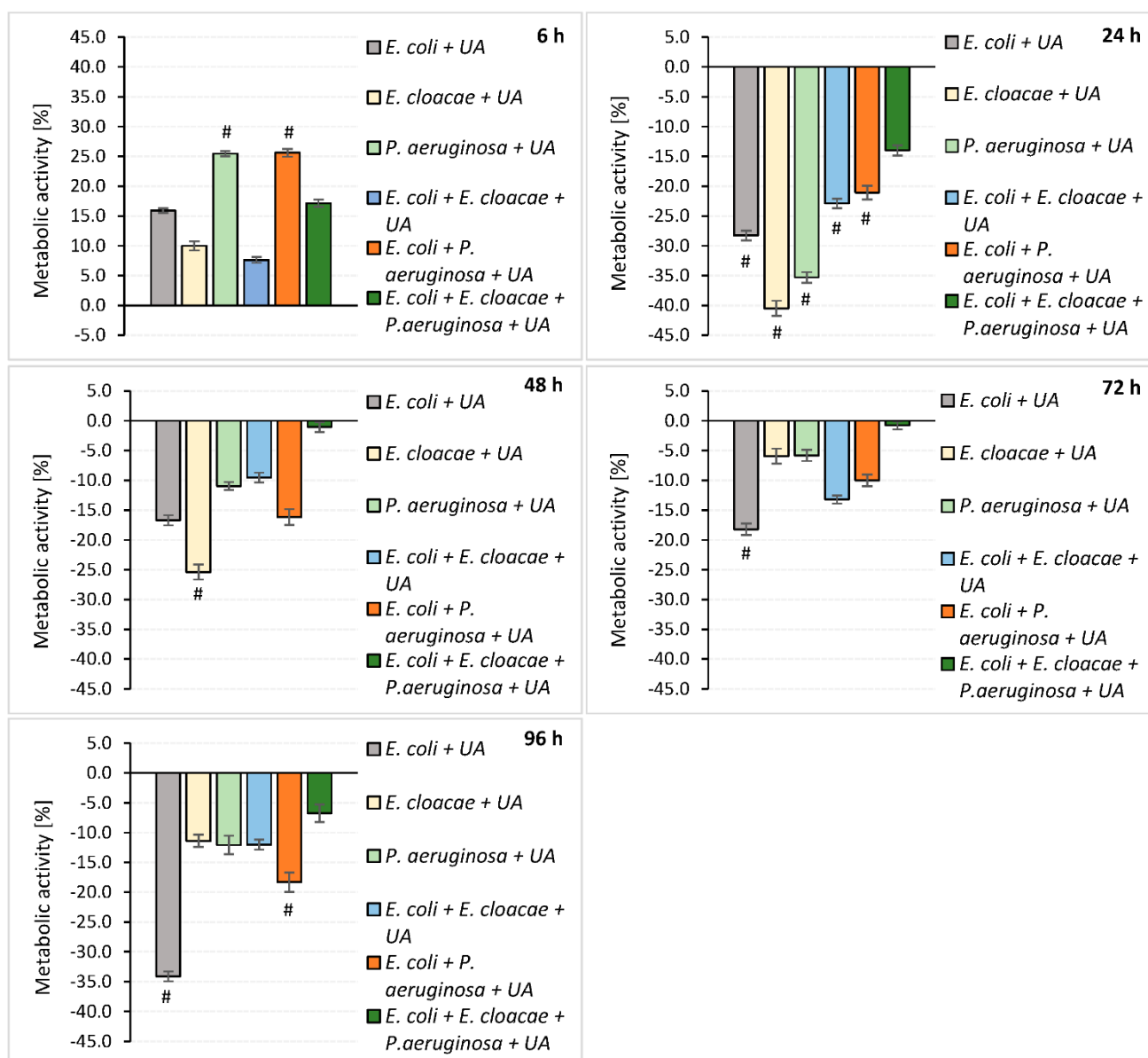


Figure 4. The impact of ursolic acid (UA) on the metabolic activity of bacteria living in mono-, dual- and triple-species biofilms. Statistically significant differences ($p \leq 0.05$) between UA-treated and untreated samples were noted with a hash (#). The experiment was repeated three times. The optical density was read from six wells of the microtiter plate, giving a total of 18 repeats. The final results are average values.

In older biofilms, UA was less effective, significantly reducing only the metabolic activity of *E. cloacae* rods after 48 h (25.4% reduction), *E. coli* rods after 72 (18.2%) and 96 h (34.1%), and *E. coli* + *P. aeruginosa* after 96 h (18.3%) of incubation ($p \leq 0.05$).

3.4. Effect of UA on Bacterial Morphology

Various morphological changes in bacterial cells were observed in the biofilms treated with UA (Figure 5).

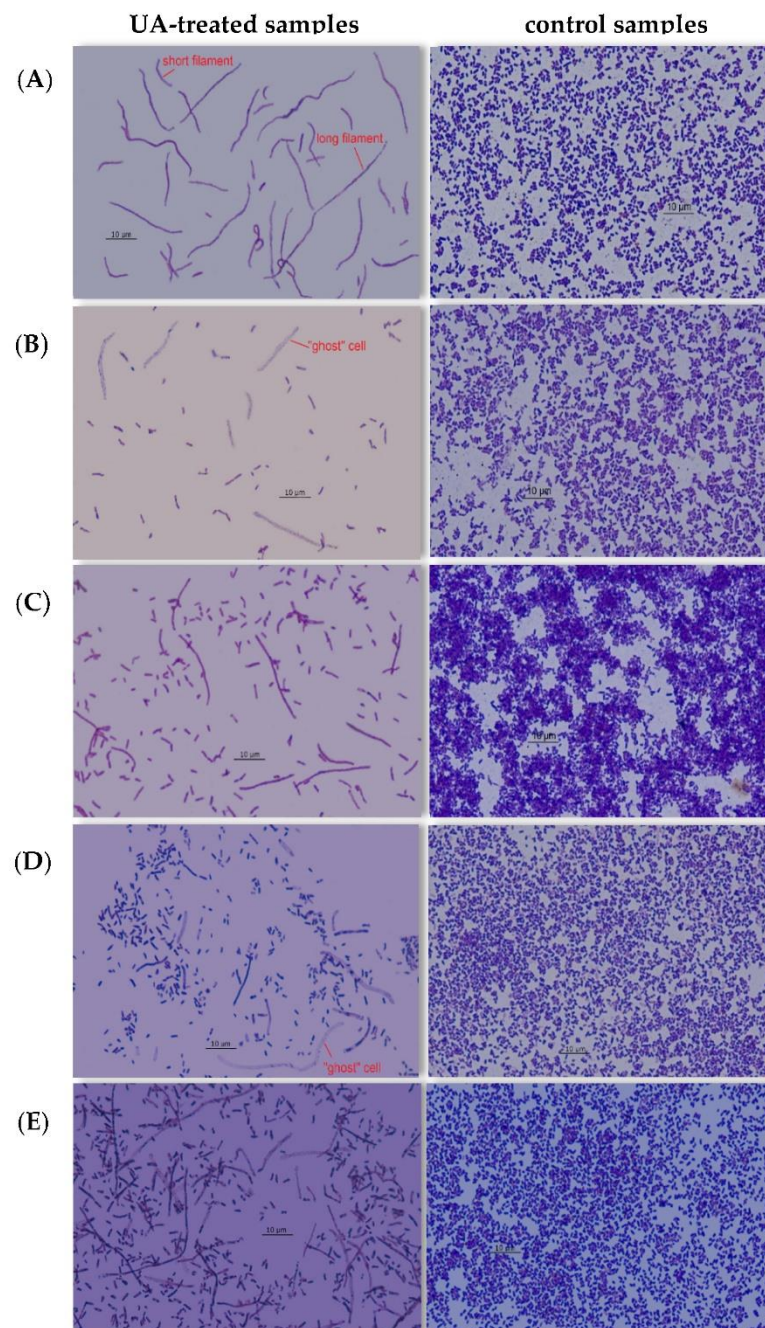


Figure 5. Sample photos showing the morphological changes of bacterial cells exposed to ursolic acid (UA) in different biofilm cultures at different stages of their development; (A) 96 h *E. coli* cultures; (B) 72 h *E. cloacae* cultures; (C) 96 h *P. aeruginosa* cultures; (D) 72 h *E. coli* + *P. aeruginosa* cultures; (E) 96 h *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* cultures; (Nikon Eclipse 400; magnification, $\times 1000$).

In young 6 h single-species cultures formed by *E. coli* and *E. cloacae*, short filaments (5–15 µm) were found. In older biofilms (24–96 h) created by these two species, additionally, long filaments (>15 µm) were noticed (Figure 5A). “Ghost” cells were present in 24, 48, 72, and 96 h *E. coli* monocultures and 48, 72, and 96 h *E. cloacae* single-species biofilms (Figure 5B). In *P. aeruginosa* single-biofilms, short and long filaments were present only in the old 72 and 96 h cultures (Figure 5C). *P. aeruginosa* rods did not form “ghost” cells at any stage of biofilm formation. In young 6 h dual-biofilms formed by *E. coli* + *E. cloacae* and *E. coli* + *P. aeruginosa* in the presence of UA, only short filaments were found, and in all older biofilms (24–96 h), long filaments and cells of the “ghost” type (Figure 5D) were additionally observed. In triple-species biofilms (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*), short and long filaments were observed regardless of the stage of their development, along with “ghost” cells in 24–96 h consortia (Figure 5E).

4. Discussion

4.1. Survival of the *Escherichia coli* Rods in Biofilms Cultured in the Absence of UA

The available literature contains only a few results of studies on multispecies biofilms and the interactions of the bacteria living in them [59,66–70]. The current state of knowledge on the survival of bacteria in biofilms is extended by the current work. It showed that in single-species biofilms, the number of *E. coli* cells is usually greater than in biofilms formed together with other species of bacteria. This indicates the existence of mutually antagonistic interactions between microorganisms. It was noted that the growth of *E. coli* in dual-species consortia was limited by the presence of both *E. cloacae* and *P. aeruginosa*, with *P. aeruginosa* showing a stronger antagonism to *E. coli* than *E. cloacae*. It is worth noting that the number of *E. coli* cells was the lowest when the rods were grown in a triple-species biofilm.

The antagonism between *E. coli* and *P. aeruginosa* noted by us is also observed by other researchers. Machado et al. [66] investigated 6-day single- and dual-species biofilms composed of *E. coli* K12 MG1655 and *P. aeruginosa* ATCC 10145. In single-species biofilms, the number of *E. coli* cells was greater than in the dual-species consortium. Vanyacker et al. [67] also noticed that in single-species cultures created by *E. coli* LMG 2092T, the number of cells of this strain was greater than in the dual-species consortium created together with *P. aeruginosa* PA14. Similar results were obtained by Cerqueira et al. [68] who observed that the presence of the *P. aeruginosa* in biofilms formed together with *E. coli* rods always adversely affected the count of *E. coli*. Kuznetsova et al. [69] assessed the survival of the *E. coli* strain in monoculture and in a mixed consortium, formed together with one of the three strains of *P. aeruginosa* (the reference ATCC 27853, a clinical strain with high biofilm production and a clinical strain with low biofilm production). The number of *E. coli* cells in the biofilm formed together with *P. aeruginosa* ATCC 27853 did not change from the number of *E. coli* in the monoculture. In contrast, the number of *E. coli* rods decreased when they grew together with the clinical strain of *P. aeruginosa*, regardless of whether it was a weak or a strong biofilm producer.

In contrast to the results obtained by our research team, Oliveira et al. [70] and Solis-Velasquez et al. [71] observed synergism between *E. coli* and *P. aeruginosa*. The number of *E. coli* cells was lower when the strain grew in single-species biofilms than in double-species consortia.

The reasons for the existence of antagonism between *E. coli* and *P. aeruginosa* in dual-species biofilms have not been fully elucidated so far. One of the sources of this phenomenon is quorum sensing (QS), which is one of the main mechanisms involved in biofilm formation. Quorum sensing (QS) is a communication mechanism between bacteria that allows specific processes to be controlled, such as virulence factor expression, biofilm formation, production of secondary metabolites, and stress adaptation mechanisms such as bacterial competition systems, including secretion systems. *P. aeruginosa* has at least three types of QS systems: Las, Rhl, and *Pseudomonas* quinolone signal (PQS). N-(3-oxo-

dodecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL), N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL), and 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) are used as autoinducers (AIs) in these systems, respectively. Two N-acylhomoserine lactones (AHLs), 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL, bind LuxR-type intracellular receptor proteins LasR and RhlR, respectively. In the Las system, a receptor LasR is activated by its cognate 3-oxo-C12-HSL, synthesized by LasI, and this complex activates Las, Rhl, and PQS systems. The Rhl system consists of RhlR and its cognate signal, C4-HSL, synthesized by RhlI, and this complex autoregulates the Rhl system. The PQS system binds its receptor, PqsR, and the complex regulates PQS and Rhl systems. These three QS systems control the production of virulence factors: exoenzymes, exotoxin A, phenazine, lectin, pyocyanin, rhamnolipids (RHLs), fatty acids (cis-2-decenoic acid and cis-11-methyl-2-dodecenoic acid), iron chelating activity, antibiotic resistance, and extracellular polysaccharides (alginate, Psl, and Pel) involved in biofilm formation [72,73]. Due to QS, bacteria not only regulate the number of cells within their own species but also influence the number of other species cells living in a common consortium. Mirani et al. [74] observed that in a young 24 h dual-species consortium, *E. coli* outnumbered *P. aeruginosa*. However, the situation was reversed in the older 48 h biofilm. Only cis-2-decenoic acid (CDA) producing strains of *P. aeruginosa* have been shown to have an antagonistic effect on *E. coli*. CDA belongs to the group of diffusive molecules involved in interspecies signaling and modulating the behavior of other microorganisms. Interestingly, CDA molecules also had the ability to scatter biofilm formed by *E. coli*. Additionally, it was noted that *P. aeruginosa* produced more CDA when grown in with *E. coli* in a mixed biofilm. Rahmani-Badi et al. [75] reported that pure CDA has also been able to inhibit the production of mono- and dual-species biofilms formed by *E. coli* ATCC 25922 and *K. pneumoniae* ATCC 700603 and, moreover, caused the dispersion of biofilms already formed by these bacteria.

In addition to CDA production, *P. aeruginosa* secretes significant amounts of extracellular rhamnolipids (RHLs) and signaling molecules involved in QS, e.g., N-acyl-L-homoserine lactone (AHL) and 2-alkyl-4-quinolones (AQs). *P. aeruginosa* rods, which live in mixed biofilms, use RHL to disperse the biofilm matrix, making it easier for cells to access iron and oxygen for which they compete with other microorganisms. Additionally, AHL molecules activate *P. aeruginosa* to intense divisions, which makes this species dominant in mixed biofilms [76,77]. Cao et al. [78], examining 8–96 h biofilms of *E. coli* DH5 α and *P. aeruginosa* PAO1C, observed that *P. aeruginosa* PAO1C strongly secreted AQ molecules in response to the presence of *E. coli* DH5 α cells. Interestingly, the appearance of AQ on the periphery of an *E. coli* colonies occurred much earlier than the physical fusion of the colonies of these two species of bacteria.

The importance of extracellular metabolites in the interaction of *E. coli* and *P. aeruginosa* has been confirmed by the studies of Lopes et al. [79]. The authors determined the effect of supernatants containing metabolites of the planktonic and biofilm forms of *P. aeruginosa* ATCC 10145 on the growth of both planktonic and biofilm forms of *E. coli* K12 MG1655. It was shown that the supernatant obtained from the planktonic culture of *P. aeruginosa* did not affect either the biofilm production by *E. coli* or the survival of these rods. On the other hand, metabolites present in the supernatant obtained from *P. aeruginosa* biofilm culture strongly inhibited the development of biofilm formed by *E. coli*. They also significantly reduced the survival of *E. coli* rods.

As demonstrated by Bhattacharjee et al. [80], the more intense growth of *P. aeruginosa* in mixed biofilms, formed together with *E. coli*, is related not only to QS but also to the topography of the surface on which the biofilm grows. The predominance of *P. aeruginosa* only took place when this dual-species cultivation was carried out on a flat surface. During the growth of biofilm on folded surfaces, *E. coli* bacilli were less dispersed. This phenomenon is related to the production of indole by *E. coli* cells, which as a consequence suppresses the dispersion response of these rods to signaling compounds secreted by *P. aeruginosa*. Moreover, Chu et al. [81] found that indole plays a significant role in *E. coli*

survival in mixed biofilm by inhibiting the production of pyocyanin (PCN) and other AHL-regulated *P. aeruginosa* virulence factors.

As explained through QS, *P. aeruginosa* secretes antimicrobial chemicals and signal molecules to compete and/or cooperate with other microbes. It is known that the type VI secretion system (T6SS), present in about 25% of Gram-negative bacteria, is often crucial for their virulence and is involved in bacterial interaction and competition, biofilm formation, and transport of ions [72,82,83]. Basler et al. [84] discovered, that the T6SS antibacterial activity of *P. aeruginosa* is triggered by the activity of T6SS displayed by other bacteria (*Vibrio cholerae* and *Acinetobacter baylyi*). *E. coli* and *E. cloacae* also have the T6SS system, but so far it has not been as thoroughly understood as in *P. aeruginosa* [85–87]. Soria-Bustos et al. [85] reported that opportunistic strain *E. cloacae* ATCC 13047 codes two functional T6SS systems which are involved in the pathogenesis of *E. cloacae* with specialized functions in the interaction with other bacteria and with host cells.

It can be presumed with high probability that above-described T6SS plays an important role in the antagonism between bacteria in the dual- and especially triple-species consortia we have investigated in this study.

4.2. Biofilm Formation and Metabolic Activity of Bacteria Growing in the Absence of UA

The current research showed that both the *E. coli* strain and *E. cloacae* strain formed weak single-species biofilms, while the *P. aeruginosa* strain was distinguished by moderate biofilm production. Wang et al. [88] also noticed that the clinical strains of *P. aeruginosa* they studied produced a much greater amount of biofilm mass than *E. coli* or *E. cloacae*. We also showed that in single-species consortia, the amount of the biofilm mass was usually greater than in dual- and triple-species consortia. The fact that the amount of biomass produced in mature mixed biofilms was lower than the amount of biomass produced at the same stage of biofilm development by each species separately proves the existence of antagonistic interactions between the studied strains of *E. coli*, *E. cloacae*, and *P. aeruginosa*. This phenomenon was particularly evident in dual- and triple-species biofilms, where the amount of the biofilm produced by *P. aeruginosa* was significantly reduced in the presence of *E. coli*.

These results, however, contradict the observations of other authors [69,89,90]. Qian et al. [89] observed that the amount of biofilm produced in single-species consortia of *E. coli* ATCC 25922 and *E. cloacae* ATCC 13047 was lower than in the mixed biofilm formed by both of these species. In the studies by Kuznetsova et al. [69], it was also noticed that the amounts of biomass of the dual-species biofilm composed of *E. coli* and *P. aeruginosa* after 6, 12, and 24 h of incubation were significantly higher in comparison to single-species biofilms. Likewise, Culotti et al. [90] noted that the growth and synthesis of biofilm mass by the *E. coli* DH5 α strain was more intense when these bacteria were grown together with *P. aeruginosa* PAO1. In turn, Machado et al. [66] found that the amount of biofilm formed by *E. coli* K12 MG1655 and *P. aeruginosa* ATCC 10145 was similar, regardless of whether the bacteria grew in monocultures or formed a common consortium.

Machado et al. [66] also determined the metabolic activity of *E. coli* and *P. aeruginosa* strains in single- and dual-species biofilms. *P. aeruginosa* in monoculture was characterized by a higher metabolic activity than *E. coli* rods. This result is inconsistent with the results of our current research. *P. aeruginosa* tested by us showed weaker metabolic activity compared to *E. coli* as well as *E. cloacae*. However, both our research and that conducted by Machado et al. [66] showed that bacteria growing in monocultures have a higher metabolic activity than those growing in mixed consortia. Interestingly, our own research showed that the amount of the created biofilm mass did not correlate with the metabolic activity of bacteria. *E. cloacae* and *E. coli* strains producing only weak biofilm were characterized by higher metabolic activity than *P. aeruginosa*, which was a better biofilm producer. The metabolic activity of the bacteria living in biofilm consortia is difficult to interpret, and this is a limitation of the current study. It is known that not all the cells in a

biofilm have the same metabolism. The cells living closer to the surface have different metabolism, nutrient, and oxygen availability than the cells inside the biofilm [91].

4.3. Survival, Biomass Formation, and Metabolic Activity of Bacteria in Biofilms Treated with UA

The results obtained in our own research showed the antibacterial effect of UA on the rods growing both in monocultures and in mixed biofilms. However, the reduction in the number of viable cells depended on the duration of action of UA and whether the acid was acting on a single- or multispecies consortium. UA reduced the number of *E. coli* rods the most in young 6 and 24 h biofilms, regardless of whether the rods were grown alone or in mixed biofilms.

It is worth noting that UA was most effective in reducing the formation of biofilm mass by *P. aeruginosa* growing in single-species biofilms, as well as by bacteria growing in mixed dual- and triple-species cultures in which *P. aeruginosa* was present. UA also reduced the metabolic activity of bacteria living in single-species biofilms at all stages of their growth, except for the 6 h cultures, in which an increase in bacterial activity was noticed.

Our own previous research also demonstrated the antibacterial activity of UA in the formation and eradication of single-species biofilms formed by the uropathogenic reference *E. coli* CFT073 and clinical *E. coli* strains. UA has also been shown to support the pharmacological effect of ciprofloxacin in removing mature *E. coli* biofilm from urological catheters [53].

The antibacterial activity of UA limited to single-species biofilms of *E. coli* and *P. aeruginosa* was also investigated by others [30,43,50,51]. Ren et al. [43] reported that UA showed significant antibacterial activity against 24 h single-species consortia formed by *E. coli* and *P. aeruginosa* strains, reducing the amount of biofilm mass by 72% and 87%, respectively. Interestingly, UA did not inhibit the growth of these strains growing in planktonic forms but induced the expression of genes encoding proteins related to chemotaxis, e.g., motAB. It is worth noting that overexpression of the motAB gene makes cells too mobile to remain stable in the biofilm environment, which disrupts its formation. Research by Lou et al. [51] also confirmed the antibiotic activity of UA against the strain *P. aeruginosa* ATCC 9027. In turn, Kurek et al. [30] showed that UA had a weak effect on single-species biofilms formed by *P. aeruginosa* strains. However, when combined with β -lactam antibiotics, its antibiotic effect was improved.

Meanwhile, the results obtained by Gilabert et al. [50] did not confirm the antibiotic activity of UA against the strain *P. aeruginosa* ATCC 27853. UA did not inhibit the production of biofilm mass and also stimulated *P. aeruginosa* cells to divide, increasing the survival of these bacilli. It is worth noting, however, that despite the lack of anti-biofilm properties, UA reduced the activity of LasB elastase produced by *P. aeruginosa*. LasB affects the architecture and functionality of the biofilm [92], and inhibition of the activity of this enzyme weakens bacterial adhesion, microcolony formation, and extracellular matrix binding in the biofilm [93].

In the available literature, the influence of UA on multispecies biofilms is limited only to Gram-positive streptococci; therefore, the results of our current research are quite difficult to discuss. However, there are studies in which it has been shown that non-UA antibacterial agents exhibit better activity against single- than multispecies biofilms. Schwering et al. [94] found that *E. coli* and *E. cloacae* biofilms are up to 300 times more resistant to chlorine than single-species consortia. Qian et al. [89] studied the effect of luteolin on the mixed biofilm formed by *E. coli* ATCC 25922 and *E. cloacae* ATCC 13047. They showed that the compound was much less active than when the bacteria grew in monocultures. Interestingly, in our study, UA did not inhibit the survival of *E. coli* in the old 72 and 96 h consortia in which *P. aeruginosa* strain was present. The reason for this could be the presence of *P. aeruginosa* in the biofilm, which over time produces more and more extracellular substances as part of the biofilm matrix. This would make it difficult for UA to access *E. coli* cells grown in such a consortium. The sensitivity of these rods to UA

decreases, which in turn causes an increase in the number of *E. coli* cells in the population. However, in a dual- and triple-species consortium untreated with UA, a decrease in the number of *E. coli* cells has been noticed. Thus, perhaps the presence of UA in the biofilm consortium interferes with the signaling molecules involved in QS and the T6SS system described above, and this weakens antagonistic interactions between strains, allowing the divisions of *E. coli* cells.

It is also difficult to discuss the results obtained by us describing the effect of UA on the amount of biomass formed and the metabolic activity of bacteria living in biofilm consortia due to the lack of literature data. Nostro et al. [95] noted changes in the amount of biofilm formed and the metabolic activity of *E. coli* and *Staphylococcus aureus* forming a dual-species consortium in the presence of plant-derived compounds—citronellol and eugenol. Citronellol showed a better effect on single-species biofilms by reducing the amount of biofilm mass and weakening the metabolic activity of bacteria. In contrast, eugenol performed better on the bispecific consortium. A significant decrease in the number of viable cells and their metabolic activity was noticed only in 96 h biofilms. In the present study, UA was shown to be more effective on young 6 and 24 h biofilms.

4.4. Changes in Cell Morphology of Bacteria Treated with UA

In biofilm cultures of reference *E. coli* CFT073 (ATCC 700928), *E. cloacae* ATCC-BAA 2468, *P. aeruginosa* ATCC 25000 strains treated with UA, short and long filaments and “ghost” cells partially devoid of the cell wall were observed. Similar morphological cell changes in clinical *E. coli* strains were observed [32]. The authors also found the presence of thickened cells with intracellular distension of the “swollen” type [32]. Wojnicz et al. [41] examined the effect of UA on biofilms formed by clinical strains of *Enterococcus faecalis*. The cells of these cocci had a larger diameter and formed irregular aggregates instead of the characteristic chains visible in UA-untreated cultures. The morphological changes in bacterial cells under the influence of UA were also observed by others. Kurek et al. [23] found that after 24 h of incubation in the presence of UA, the length of *Listeria monocytogenes* bacterial cells was reduced by 20% compared to control. Catteau et al. [39] showed that UA, like the β -lactam antibiotic oxacillin, caused the delocalization of the penicillin-binding protein (PBP2) from the site of the division septum and its redistribution throughout the cell membrane, which disrupted *S. aureus* cell division.

It is known that morphological changes in bacterial cells are conditioned by various mechanisms. The causes of cell filamentation can be both disturbances in peptidoglycan synthesis and disturbances in the formation of division septa. The enzyme PBP3 plays an important role in the formation of septa. Inhibition of its activity causes the cell to lengthen without dividing it. Such cell division inhibiting activity is shown by β -lactam antibiotics having an affinity for PBP3 [96,97]. Filamentation is also observed due to inhibition of replication caused by DNA damage or dysfunction of FtsZ, a key protein in the bacterial division. Septa formation is delayed due to the dysfunction of the FtsZ protein by the Sula protein. This stops the division ring formation and inactivates PBP3. Mizushima et al. [98], however, found that UA does not bind directly to DNA and does not affect the activity of *E. coli* DNA polymerase I. Cell filamentation has also been observed under the influence of ciprofloxacin, which by inhibiting the activity of gyrase contributes to blocking DNA replication [99,100]. The formation of “ghost” cells in which partial lysis of the cell wall has taken place is caused both by inhibitors of peptidoglycan synthesis and DNA synthesis [101]. Perhaps UA’s mechanism of action is similar. However, it has not been fully understood and described so far. The morphological changes we observe in the cells of the examined rods after exposure to this acid allow us to assume that it not only destroys the integrity of the cell membrane and causes its dysfunction but can also penetrate into the bacterial cell and interact with DNA or proteins involved in the formation of a division septum. In this way, UA could interfere with the replication process and bacterial cell divisions. Phenotypically altered bacteria may therefore lose their ability to adhere to the host cells, which in turn reduces their virulence.

5. Conclusions

Our research has shown a significant effect of UA on the survival of bacterial cells, their morphology, the ability to form single- and mixed-species biofilms, and the metabolic activity of cells living in them. The future direction should be a thorough understanding of the antibacterial mechanism of the activity of UA as a documented bioactive substance. From the perspective of further research, the synergistic effect of UA with antibiotics should also be taken into account. Therefore, it is necessary to define the rules for the validation of the antibacterial activity of UA and the conversion of its in vitro potency into its in vivo therapeutic effect.

Due to the fact that UA exhibited the best antibacterial activity in the early stages of biofilm formation, the use of preparations containing UA would be appropriate, especially at the beginning of UTIs.

Author Contributions: Conceptualization, Z.S., D.W. and D.T.-G.; methodology, Z.S., D.W. and D.T.-G.; investigation, Z.S., D.W. and D.T.-G.; data curation, Z.S., D.W. and D.T.-G.; writing—original draft preparation, Z.S., D.W. and D.T.-G.; writing—review and editing, D.W. and D.T.-G.; visualization, Z.S., D.W. and D.T.-G.; funding acquisition, D.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by The Ministry of Health subvention, no. STM.A060.20.060, from the IT Simple System of Wrocław Medical University.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Jaroniewski, W. Medicinal plants of Polish forests. Bearberry *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengl. *Wszechświat* **1986**, *87*, 135–136. (In Polish)
2. Jäger, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M.N.; Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants—Rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* **2009**, *14*, 2016–2031.
3. Mohd Azman, N.A.; Gallego, M.G.; Segovia, F.; Abdullah, S.; Shaarani, S.M.; Almajano Pablos, M.P. Study of the properties of bearberry leaf extract as a natural antioxidant in model foods. *Antioxidants* **2016**, *5*, 11.
4. Chaika, N.; Koshovyi, O.; Ain, R.; Kireyev, I.; Zupanets, A.; Odyntsova, V. Phytochemical profile and pharmacological activity of the dry extract from *Arctostaphylos uva-ursi* leaves modified with phenylalanine. *ScienceRise Pharm. Sci.* **2020**, *6*, 74–84.
5. Wolska, K.I.; Grudniak, A.M.; Fiecek, B.; Kraczkiewicz-Dowjat, A.; Kurek, A. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. *Cent. Eur. J. Biol.* **2010**, *5*, 543–553.
6. Jesus, J.A.; Lago, J.H.; Laurenti, M.D.; Yamamoto, E.S.; Passero, L.F. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: An update. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 620472.
7. Woźniak, Ł.; Skąpska, S.; Marszałek, K. Ursolic acid—A pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecules* **2015**, *20*, 20614.
8. Kashyap, D.; Tuli, H.S.; Sharma, A.K. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* **2016**, *146*, 201–213.
9. Navina, R.; Lee, Y.G.; Kim, S.M. Molecular biological roles of ursolic acid in the treatment of human diseases. *Curr. Bioact. Compd.* **2017**, *13*, 177–185.
10. López-Hortas, L.; Pérez-Larrán, P.; González-Muñoz, M.J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. *Food Res. Int.* **2018**, *103*, 130–149.
11. Pironi, A.M.; de Araújo, P.R.; Fernandes, M.A.; Salgado, H.R.N.; Chorilli, M. Characteristics, biological properties and analytical methods of ursolic acid: A review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2018**, *48*, 86–93.
12. Mlala, S.; Oyediji, A.O.; Gondwe, M.; Oyediji, O.O. Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents. *Molecules* **2019**, *24*, 2751.
13. Aazam, E.S.; Zaheer, Z. Growth of Ag-nanoparticles in an aqueous solution and their antimicrobial activities against Gram positive, Gram negative bacterial strains and Candida fungus. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **2016**, *39*, 575–584.
14. Alvarado, H.; Abrego, G.; Souto, E.B.; Garduño-Ramirez, M.; Clares, B.; García, M.; Calpena, A.C. Nanoemulsions for dermal controlled release of oleanolic and ursolic acids: In vitro, ex vivo and in vivo characterization. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2015**, *130*, 40–47.

15. Ghiulai, R.; Roşca, O.J.; Antal, D.S.; Mioc, M.; Mioc, A.; Racoviceanu, R.; Macaşoi, I.; Olariu, T.; Dehelean, C.; Creţu, O.M.; et al. Tetracyclic and pentacyclic triterpenes with high therapeutic efficiency in wound healing approaches. *Molecules* **2020**, *25*, 5557.
16. Mallavadhani, U.V.; Mahapatra, A.; Jamil, K.; Reddy, P.S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-O-lipophilic chains. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 1576–1579.
17. Cunha, L.C.S.; Andrade e Silva, M.L.; Cardoso Furtado, N.A.; Vinhólis, A.H.; Martins, C.H.; da Silva Filho, A.A.; Cunha, W.R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* **2007**, *62*, 668–672.
18. Horiuchi, K.; Shiota, S.; Hatano, T.; Yoshida, T.; Kuroda, T.; Tsuchiya, T. Antimicrobial activity of oleanolic acid from *Salvia officinalis* and related compounds on vancomycin-resistant enterococci (VRE). *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 1147–1149.
19. Ahmad, M.; Ahmad, W.; Khan, S.; Zeeshan, M.; Obaidullah, A.J.; Nisar, M.; Shaheen, F.; Ahmad, M. New antibacterial pentacyclic triterpenes from *Myricaria elegans* Royle (tamariscineae). *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2008**, *23*, 1023–1027.
20. Fontanay, S.; Grare, M.; Mayer, J.; Finance, C.; Duval, R.E. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *120*, 272–276.
21. da Silva Filho, A.A.; de Sousa, J.P.; Soares, S.; Furtado, N.A.; Andrade e Silva, M.L.; Cunha, W.R.; Gregório, L.E.; Nanayakkara, N.P.; Bastos, J.K. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.* **2008**, *63*, 40–46.
22. Cunha, W.R.; de Matos, G.X.; Souza, M.G.; Tozatti, M.G.; Andrade e Silva, M.L.; Martins, C.H.; da Silva, R.; Da Silva Filho, A.A. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. *Pharm. Biol.* **2010**, *48*, 166–169.
23. Kurek, A.; Grudniak, A.M.; Szwed, M.; Klicka, A.; Samluk, L.; Wolska, K.I.; Janiszowska, W.; Popowska, M. Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **2010**, *97*, 61–68.
24. Sultana, T.; Rashid, M.A.; Ali, M.A.; Mahmood, S.F. Hepatoprotective and antibacterial activity of ursolic acid extracted from *Hedyotis corymbosa* L. *Bangladesh J. Sci. Ind. Res.* **2010**, *45*, 27–34.
25. Acebey-Castellon, I.L.; Voutquenne-Nazabadioko, L.; Doan Thi Mai, H.; Roseau, N.; Bouthagane, N.; Muhammad, D.; Le Margre Debar, E.; Gangloff, S.C.; Litaudon, M.; Sevenet, T.; et al. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 163–168.
26. Filocamo, A.; Bisignano, C.; D'Arrigo, M.; Ginestra, G.; Mandalari, G.; Galati, E.M. Norfloxacin and ursolic acid: In vitro association and postantibiotic effect against *Staphylococcus aureus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2011**, *53*, 193–197.
27. Kim, M.J.; Kim, C.S.; Park, J.Y.; Lim, Y.K.; Park, S.N.; Ahn, S.J.; Jin, D.C.; Kim, T.H.; Kook, J.K. Antimicrobial effects of ursolic acid against mutans Streptococci isolated from Koreans. *Int. J. Oral Biol.* **2011**, *36*, 7–11.
28. Moodley, R.; Chenia, H.; Jonnalagadda, S.B.; Koorbanally, N. Antibacterial and anti-adhesion activity of the pentacyclic triterpenoids isolated from the leaves and edible fruits of *Carissa macrocarpa*. *J. Med. Plant. Res.* **2011**, *5*, 4851–4858.
29. Kim, S.G.; Kim, M.J.; Jin, D.; Park, S.N.; Cho, E.; Freire, M.O.; Jang, S.J.; Park, Y.J.; Kook, J.K. Antimicrobial effect of ursolic acid and oleanolic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Korean J. Microbiol.* **2012**, *48*, 212–215.
30. Kurek, A.; Nadkowska, P.; Pliszka, S.; Wolska, K.I. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 515–519.
31. Wong, K.C.; Hag Ali, D.M.; Boey, P.L. Chemical constituents and antibacterial activity of *Melastoma malabathricum* L. *Nat. Prod. Res.* **2012**, *26*, 609–618.
32. Wojnicz, D.; Kicia, M.; Tichaczek-Goska, D. Effect of asiatic and ursolic acids on morphology, hydrophobicity and adhesion of UPECs to uroepithelial cells. *Folia Microbiol.* **2013**, *58*, 245–252.
33. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Kicia, M. Effect of asiatic and ursolic acids on growth and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Turk. J. Biol.* **2013**, *37*, 556–564.
34. Do Nascimento, P.G.G.; Lemos, T.L.G.; Bizerra, A.M.C.; Arriaga, Â.M.; Ferreira, D.A.; Santiago, G.M.; Braz-Filho, R.; Costa, J.G. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives. *Molecules* **2014**, *19*, 1317–1327.
35. Dwivedi, G.R.; Maurya, A.; Yadav, D.K.; Khan, F.; Darokar, M.P.; Srivastava, S.K. Drug resistance reversal potential of ursolic acid derivatives against nalidixic acid- and multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Chem. Biol. Drug. Des.* **2015**, *86*, 272–283.
36. Park, S.N.; Ahn, S.J.; Kook, J.K. Oleanolic acid and ursolic acid inhibit peptidoglycan biosynthesis in *Streptococcus mutans* UA159. *Braz. J. Microbiol.* **2015**, *46*, 613–617.
37. Wang, C.M.; Chen, H.T.; Wu, Z.Y.; Jhan, Y.L.; Shyu, C.L.; Chou, C.H. Antibacterial and synergistic activity of pentacyclic triterpenoids isolated from *Alstonia scholaris*. *Molecules* **2016**, *21*, 139.
38. Wang, C.M.; Jhan, Y.L.; Tsai, S.J.; Chou, C.H. The pleiotropic antibacterial mechanisms of ursolic acid against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Molecules* **2016**, *21*, 884.
39. Catteau, L.; Reichmann, N.T.; Olson, J.; Pinho, M.G.; Nizet, V.; Van Bambeke, F.; Quetin-Leclercq, J. Synergy between ursolic and oleanolic acids from *Vitellaria paradoxa* leaf extract and β -lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: In vitro and in vivo activity and underlying mechanisms. *Molecules* **2017**, *22*, 2245.
40. Oloyede, H.O.B.; Ajiboye, H.O.; Salawu, M.O.; Ajiboye, T.O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. *Microb. Pathog.* **2017**, *111*, 338–344.
41. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Korzekwa, K.; Kicia, M.; Hendrich, A. Anti-enterococcal activities of pentacyclic triterpenes. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 483–490.

42. Sundaramoorthy, N.S.; Mohan, H.M.; Subramaniam, S.; Raman, T.; Selva Ganesan, S.; Sivasubamian, A.; Nagarajan, S. Ursolic acid inhibits colistin efflux and curtails colistin resistant Enterobacteriaceae. *AMB Express* **2019**, *9*, 27.
43. Ren, D.; Zuo, R.; Gonzalez Barrios, A.F.; Bedzyk, L.A.; Eldridge, G.R.; Pasmore, M.E.; Wood, T.K. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 4022–4034.
44. Kim, S.; Song, M.; Roh, B.D.; Park, S.H.; Park, J.W. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation on composite resins containing ursolic acid. *Restor. Dent. Endod.* **2013**, *38*, 65–72.
45. Zhou, L.; Ding, Y.; Chen, W.; Zhang, P.; Chen, Y.; Lv, X. The in vitro study of ursolic acid and oleanolic acid inhibiting cariogenic microorganisms as well as biofilm. *Oral. Dis.* **2013**, *19*, 494–500.
46. Kurek, A.; Markowska, K.; Grudniak, A.M.; Janiszowska, W.; Wolska, K.I. The effect of oleanolic and ursolic acids on the hemolytic properties and biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. *Pol. J. Microbiol.* **2014**, *63*, 21–25.
47. Micota, B.; Sadowska, B.; Podsedek, A.; Redzynia, M.; Różalska, B. *Leonurus cardiaca* L. herb—A derived extract and an ursolic acid as the factors affecting the adhesion capacity of *Staphylococcus aureus* in the context of infective endocarditis. *Acta Biochim. Pol.* **2014**, *61*, 385–388.
48. Qin, N.; Tan, X.; Jiao, Y.; Liu, L.; Zhao, W.; Yang, S.; Jia, A. RNA-Seq-based transcriptome analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm inhibition by ursolic acid and resveratrol. *Sci. Rep.* **2014**, *4*, 5467.
49. Zou, Y.; Lee, Y.; Huh, J.; Park, J.W. Synergistic effect of xylitol and ursolic acid combination on oral biofilms. *Restor. Dent. Endod.* **2014**, *39*, 288–295.
50. Gilabert, M.; Marcinkevicius, K.; Andujar, S.; Schiavone, M.; Arena, M.E.; Bardón, A. Sesqui- and triterpenoids from the liverwort *Lepidozia chordulifera* inhibitors of bacterial biofilm and elastase activity of human pathogenic bacteria. *Phytomedicine* **2015**, *22*, 77–85.
51. Lou, Z.; Tang, Y.; Song, X.; Wang, H. Metabolomics-based screening of biofilm-inhibitory compounds against *Pseudomonas aeruginosa* from burdock leaf. *Molecules* **2015**, *20*, 16266–16277.
52. Tan, X.; Qin, N.; Wu, C.; Sheng, J.; Yang, R.; Zheng, B.; Ma, Z.; Liu, L.; Peng, X.; Jia, A. Transcriptome analysis of the biofilm formed by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11997.
53. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Kicia, M. Pentacyclic triterpenes combined with ciprofloxacin help to eradicate the biofilm formed in vitro by *Escherichia coli*. *Indian J. Med. Res.* **2015**, *141*, 343–353.
54. Chung, S.H.; Cho, S.; Kim, K.; Lim, B.S.; Ahn, S.J. Antimicrobial and physical characteristics of orthodontic primers containing antimicrobial agents. *Angle Orthod.* **2017**, *87*, 307–312.
55. Ray, C.; Shenoy, A.T.; Orihuela, C.J.; González-Juarbe, N. Killing of *Serratia marcescens* biofilms with chloramphenicol. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2017**, *16*, 19.
56. Jyothi, J.S.; Putty, K.; Reddy, Y.N.; Dhanalakshmi, K.; Umair, M.A.H. Antagonistic effect of ursolic acid on Staphylococcal biofilms. *Vet. World* **2018**, *11*, 1440–1444.
57. Silva, G.N.S.D.; Primon-Barros, M.; Macedo, A.J.; Gnoatto, S.C.B. Triterpene derivatives as relevant scaffold for new antibiofilm drugs. *Biomolecules* **2019**, *9*, 58.
58. Ahmed, N.; Khalid, H.; Mushtaq, M.; Basha, S.; Rabaan, A.A.; Garout, M.; Halwani, M.A.; Al Mutair, A.; Alhumaid, S.; Al Alawi, Z.; et al. The molecular characterization of virulence determinants and antibiotic resistance patterns in human bacterial uropathogens. *Antibiotics* **2022**, *11*, 516.
59. Lyu, X.; Wang, L.; Shui, Y.; Jiang, Q.; Chen, L.; Yang, W.; He, X.; Zeng, J.; Li, Y. Ursolic acid inhibits multi-species biofilms developed by *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Streptococcus gordonii*. *Arch. Oral Biol.* **2021**, *125*, 105107.
60. Di Bonaventura, G.; Spedicato, I.; D'Antonio, D.; Robuffo, I.; Piccolomini, R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia* modulation by quinolones, trimethoprim, sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2004**, *48*, 151–160.
61. O'Toole, G.A.; Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 295–304.
62. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899.
63. Singh, A.K.; Prakash, P.; Achra, A.; Singh, G.P.; Das, A.; Singh, R.K. Standardization and classification of in vitro biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Global. Infect. Dis.* **2017**, *9*, 93–101.
64. Kim, S.; Kim, M.J.; Kang, H.Y.; Seol, S.Y.; Cho, D.T.; Kim, J. A simple colorimetric method for testing antimicrobial susceptibility of biofilmed bacteria. *J. Microbiol.* **2010**, *48*, 709–711.
65. Haney, E.F.; Trimble, M.J.; Cheng, J.T.; Vallé, Q.; Hancock, R.E.W. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules* **2018**, *8*, 29.
66. Machado, I.; Lopes, S.P.; Sousa, A.M.; Pereira, M.O. Adaptive response of single and binary *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms to benzalkonium chloride. *J. Basic Microbiol.* **2012**, *52*, 43–52.
67. Vanyacker, L.; Denis, C.; Declerck, P.; Piasecka, A.; Vankelecom, I.F. Microbial adhesion and biofilm formation on microfiltration membranes: A detailed characterization using model organisms with increasing complexity. *Biomed. Res. Int.* **2013**, *2013*, 470867.
68. Cerqueira, L.; Oliveira, J.A.; Nicolau, A.; Azevedo, N.F.; Vieira, M.J. Biofilm formation with mixed cultures of *Pseudomonas aeruginosa/Escherichia coli* on silicone using artificial urine to mimic urinary catheters. *Biofouling* **2013**, *29*, 829–840.

69. Kuznetsova, M.V.; Maslennikova, I.L.; Karpunina, T.I.; Nesterova, L.Y.; Demakov, V.A. Interactions of *Pseudomonas aeruginosa* in predominant biofilm or planktonic forms of existence in mixed culture with *Escherichia coli* in vitro. *Can. J. Microbiol.* **2013**, *59*, 604–610.
70. Oliveira, A.; Sousa, J.C.; Silva, A.C.; Melo, L.D.R.; Sillankorva, S. Chestnut honey and bacteriophage application to control *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilms: Evaluation in an ex vivo wound model. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1725.
71. Solis-Velazquez, O.A.; Gutiérrez-Lomelí, M.; Guerreiro-Medina, P.J.; Rosas-García, M.L.; Iñiguez-Moreno, M.; Avila-Novoa, M.G. Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2020**, *54*, 1038–1047, <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.07.002>.
72. Tashiro, Y.; Yawata, Y.; Toyofuku, M.; Uchiyama, H.; Nomura, N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes Environ.* **2013**, *1*, 13–24.
73. Pena, R.T.; Blasco, L.; Ambroa, A.; González-Pedrajo, B.; Fernández-García, L.; López, M.; Bleriot, I.; Bou, G.; García-Contreras, R.; Wood, T.K.; et al. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1100.
74. Mirani, Z.A.; Fatima, A.; Urooj, S.; Aziz, M.; Khan, M.N.; Abbas, T. Relationship of cell surface hydrophobicity with biofilm formation and growth rate: A study on *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Iran J. Basic Med. Sci.* **2018**, *21*, 760–769.
75. Rahmani-Badi, A.; Sepehr, S.; Mohammadi, P.; Soudi, M.R.; Babaie-Naiej, H.; Fallahi, H. A combination of cis-2-decanoic acid and antibiotics eradicates pre-established catheter-associated biofilms. *J. Med. Microbiol.* **2014**, *63*, 1509–1516.
76. Davies, D.G.; Marques, C.N.H. A fatty acid messenger is responsible for inducing dispersion in microbial biofilms. *J. Bacteriol.* **2009**, *191*, 1393–1403.
77. Tiwari, R.; Karthik, K.; Rana, R.; Malik, Y.S.; Dhama, K.; Joshi, S.K. Quorum sensing inhibitors/antagonists countering food spoilage bacteria—need molecular and pharmaceutical intervention for protecting current issues of food safety. *Int. J. Pharmacol.* **2016**, *12*, 262–271.
78. Cao, T.; Morales-Soto, N.; Jia, J.; Baig, N.F.; Dunham, S.J.B.; Ellis, J.; Sweedler, J.V.; ShROUT, J.D.; Bohn, P.W. Spatiotemporal dynamics of molecular messaging in bacterial co-cultures studied by multimodal chemical imaging. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.* **2019**, *10863*, 108630A.
79. Lopes, S.P.; Machado, I.; Pereira, M.O. Role of planktonic and sessile extracellular metabolic by-products on *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* intra and interspecies relationships. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 133–140.
80. Bhattacharjee, A.; Khan, M.; Kleiman, M.; Hochbaum, A.I. Effects of growth surface topography on bacterial signaling in coculture biofilms. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* **2017**, *9*, 18531–18539.
81. Chu, W.; Zere, T.R.; Weber, M.M.; Wood, T.K.; Whiteley, M.; Hidalgo-Romano, B.; Valenzuela, E., Jr.; McLean, R.J. Indole production promotes *Escherichia coli* mixed-culture growth with *Pseudomonas aeruginosa* by inhibiting quorum signaling. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 411–419.
82. Chen, L.; Zou, Y.; She, P.; Wu, Y. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Res.* **2015**, *172*, 19–25.
83. Navarro-Garcia, F.; Ruiz-Perez, F.; Cataldi, Á.; Larzábal, M. Type VI secretion system in pathogenic *Escherichia coli*: Structure, role in virulence, and acquisition. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1965.
84. Basler, M.; Ho, B.T.; Mekalanos, J.J. Tit-for-tat. Type VI secretion system counter attack during bacterial cell–cell interactions. *Cell* **2013**, *4*, 884–894.
85. Soria-Bustos, J.; Ares, M.A.; Gómez-Aldapa, C.A.; González-y-Merchand, J.A.; Girón, J.A.; De la Cruz, M.A. Two Type VI secretion systems of *Enterobacter cloacae* are required for bacterial competition, cell adherence, and intestinal colonization. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 560488.
86. Ma, J.; Pan, Z.; Huang, J.; Sun, M.; Lu, C.; Yao, H. The Hcp proteins fused with diverse extended-toxin domains represent a novel pattern of antibacterial effectors in type VI secretion systems. *Virulence* **2017**, *8*, 1189–1202.
87. Zong, B.; Zhang, Y.; Wang, X.; Liu, M.; Zhang, T.; Zhu, Y.; Zheng, Y.; Hu, L.; Li, P.; Chen, H.; et al. Characterization of multiple type-VI secretion system (T6SS) VgrG proteins in the pathogenicity and antibacterial activity of porcine extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Virulence* **2019**, *10*, 118–132.
88. Wang, X.; Lünsdorf, H.; Ehrén, I.; Brauner, A.; Römling, U. Characteristics of biofilms from urinary tract catheters and presence of biofilm-related components in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* **2010**, *60*, 446–453.
89. Qian, W.; Fu, Y.; Liu, M.; Zhang, J.; Wang, W.; Li, J.; Zeng, Q.; Wang, T.; Li, Y. Mechanisms of action of luteolin against single- and dual-species of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and its antibiofilm activities. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2021**, *193*, 1397–1414.
90. Culotti, A.; Packman, A.I. *Pseudomonas aeruginosa* promotes *Escherichia coli* biofilm formation in nutrient-limited medium. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e107186.
91. Sheraton, M.V.; Yam, J.K.H.; Tan, C.H.; Oh, H.S.; Mancini, E.; Yang, L.; Rice, S.A.; Sloat, P.M.A. Mesoscopic energy minimization drives *Pseudomonas aeruginosa* biofilm morphologies and consequent stratification of antibiotic activity based on cell metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e02544-17.
92. Tielen, P.; Rosenau, F.; Wilhelm, S.; Jaeger, K.E.; Flemming, H.C.; Wingender, J. Extracellular enzymes affect biofilm formation of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* **2010**, *156*, 2239–2252.
93. Yu, H.; He, X.; Xie, W.; Xiong, J.; Sheng, H.; Guo, S.; Huang, C.; Zhang, D.; Zhang, K. Elastase LasB of *Pseudomonas aeruginosa* promotes biofilm formation partly through rhamnolipid mediated regulation. *Can. J. Microbiol.* **2014**, *60*, 227–235.

94. Schwering, M.; Song, J.; Louie, M.; Turner, R.J.; Ceri, H. Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling* **2013**, *29*, 917–928.
95. Nostro, A.; Scaffaro, R.; D'Arrigo, M.; Botta, L.; Filocamo, A.; Marino, A.; Bisignano, G. Development and characterization of essential oil component-based polymer films: A potential approach to reduce bacterial biofilm. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 9515–9523.
96. Kong, K.F.; Schneper, L.; Mathee, K. Beta-lactam antibiotics: From antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* **2010**, *118*, 1–36.
97. El-Hajj, Z.W.; Newman, E.B. How much territory can a single *E. coli* cell control? *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 309.
98. Mizushima, Y.; Iida, A.; Ohta, K.; Sugawara, F.; Sakaguchi, K. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochem. J.* **2000**, *350*, 757–763.
99. Justice, S.S.; Hunstad, D.A.; Seed, P.C.; Hultgren, S.J. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19884–19889.
100. Cheng, G.; Hao, H.; Dai, M.; Liu, Z.; Yuan, Z. Antibacterial action of quinolones: From target to network. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 555–562.
101. Cushnie, T.P.; O'Driscoll, N.H.; Lamb, A.J. Morphological and ultrastructural changes in bacterial cells as an indicator of antibacterial mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 4471–4492.

7. OCENA EFEKTYWNOŚCI DZIAŁANIA KWASU AZJATYKOWEGO (AA) i URSOLOWEGO (UA) w HODOWLACH BIOFILMOWYCH

7.1. Jednogatunkowych *E. coli* CFT073 (ATCC 700928), *E. cloacae* ATCC-BAA 2468 i *P. aeruginosa* ATCC 25000

Porównując efektywność działania AA i UA na **przeżywalność** bakterii żyjących w monokulturach biofilmowych (Tabele nr 1-3, Wykres nr 1) można stwierdzić, że pod wpływem AA największą redukcję liczby żywych komórek ($p \leq 0,05$) odnotowano w najstarszym (96 h) biofilmie *E. cloacae* (8,6 log₁₀) i była ona ponad 2-krotnie większa niż w młodszym (24 h) biofilmie *E. coli* (4 log₁₀) oraz starszym (72 h) biofilmie *P. aeruginosa* (3,2 log₁₀). Natomiast pod wpływem UA, największą redukcję liczby żywych komórek ($p \leq 0,05$) odnotowano w dojrzałym (48 h) biofilmie *E. cloacae* (5 log₁₀) i była ona większa niż w młodszych (24 h) biofilmach *E. coli* (2,1 log₁₀) oraz *P. aeruginosa* (2,9 log₁₀).

Reasumując:

- Najbardziej wrażliwym na AA i UA spośród badanych patogenów był szczep *E. cloacae* rosnący w dojrzałych 48- i 96-godzinnych monokulturach.
- AA wykazał silniejsze działanie bakteriobójcze w porównaniu z UA niezależnie od szczepu bakteryjnego.

Tabela nr 1. Przeżywalność szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	5,19E+07	6,36E+06
6	4,09E+09	6,68E+08	3,43E+09	9,90E+08	1,69E+09	4,01E+08
24	1,22E+10	3,08E+09	8,11E+09	1,27E+09	2,10E+10	2,00E+09
48	2,12E+09	4,55E+08	8,65E+09	1,78E+09	4,90E+09	6,13E+08
72	1,32E+09	3,63E+08	2,91E+09	7,37E+08	2,38E+09	3,96E+08
96	1,80E+09	4,53E+08	4,06E+09	4,53E+08	4,98E+09	1,52E+09

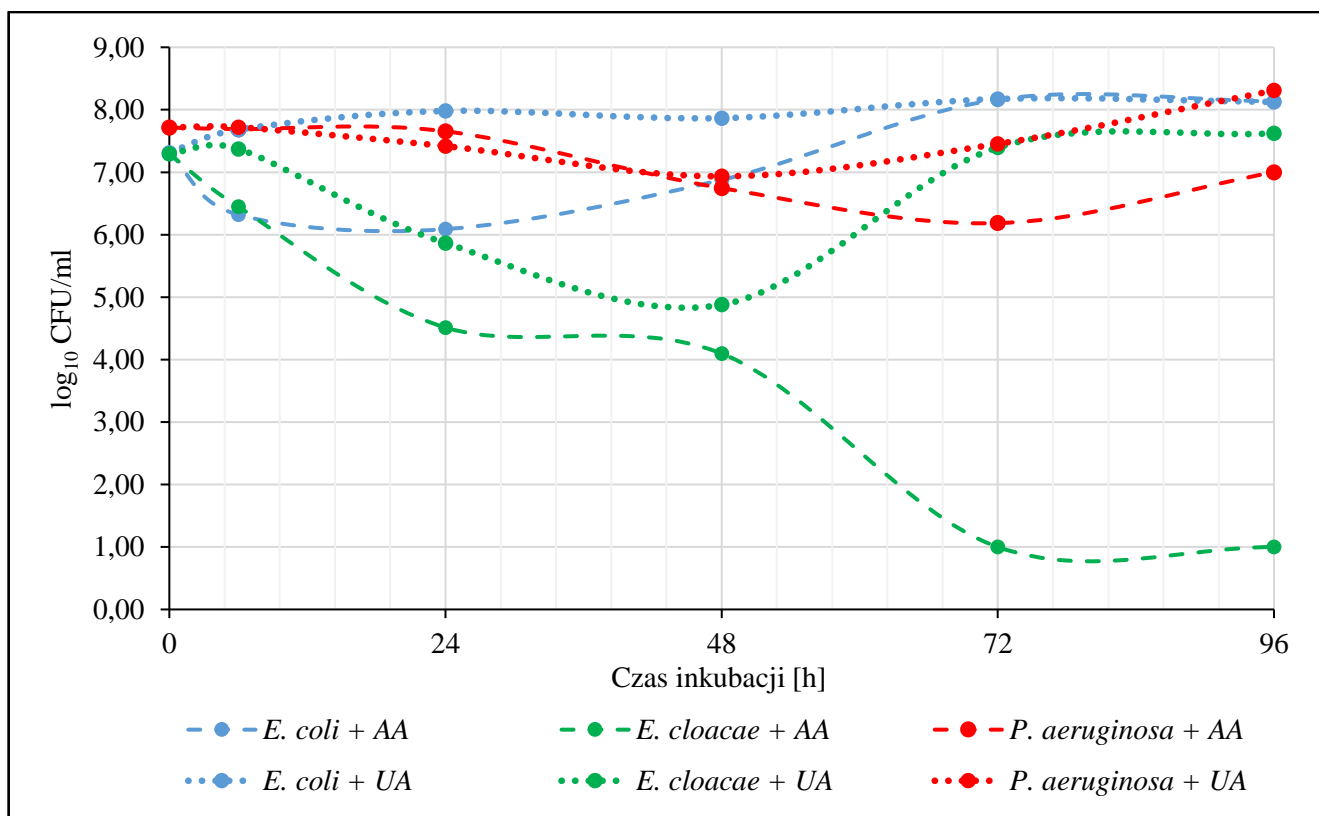
Tabela nr 2. Przeżywalność szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych biofilmach w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 1) zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	5,19E+07	6,36E+06
6	2,08E+06	6,39E+05	2,80E+06	2,83E+05	4,90E+07	2,09E+07
24	1,23E+06	2,65E+05	3,26E+04	6,59E+03	4,53E+07	3,67E+06

48	7,54E+06	2,91E+06	1,25E+04	2,69E+03	5,58E+06	1,13E+06
72	1,46E+08	2,63E+07	1,00E+01	0,00E+00	1,53E+06	4,11E+05
96	1,37E+08	1,35E+07	1,00E+01	0,00E+00	1,00E+07	0,00E+00

Tabela nr 3. Przeżywalność szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych biofilmach w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 1) zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	5,19E+07	6,36E+06
6	4,81E+07	5,58E+06	2,37E+07	6,57E+06	5,26E+07	1,19E+07
24	9,58E+07	6,09E+06	7,33E+05	2,61E+05	2,62E+07	8,48E+06
48	7,35E+07	2,36E+07	7,56E+04	2,29E+04	8,60E+06	9,93E+05
72	1,49E+08	4,64E+07	2,49E+07	1,21E+07	2,85E+07	1,07E+07
96	1,33E+08	5,09E+07	4,20E+07	6,87E+06	2,03E+08	1,25E+07



Wykres nr 1. Przeżywalność szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jednogatunkowych w obecności AA (linie przerywane) i UA (linie kropkowane).

Porównując efektywność działania AA i UA na **ilość tworzonego biofilmu** w monokulturach (Tabele nr 4-6, Wykres nr 2) można stwierdzić, że pod wpływem AA największe spadki ilości wytworzonej masy biofilmowej miały miejsce po 24 h inkubacji ($p \leq 0,05$), a najslabsze działanie AA obserwowano w hodowlach 48- i 72-godzinnych. Wszystkie badane szczepy pod wpływem AA utraciły zdolność do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$), jednakże największą redukcję ilości biomasy

(o 84%) odnotowano w 24-godzinny biofilmie *P. aeruginosa* ($p \leq 0,05$) i była ona ponad 3-krotnie większa niż w 48- i 72-godzinnych hodowlach *E. coli* i *E. cloacae*. Natomiast pod wpływem UA, największe spadki ilości wytworzonej masy biofilmowej miały miejsce na różnych etapach rozwoju biofilmów, w zależności od szczepu, jednak największą redukcję ilości biomasy (o 76%) odnotowano w 72-godzinny biofilmie *P. aeruginosa* ($p \leq 0,05$), z kolei najmniejszą ($p \leq 0,05$) w 6-godzinnej hodowli *E. coli* (o 51%).

Reasumując:

- AA i UA wykazały najefektywniejsze działanie antybiofilmowe wobec szczepu *P. aeruginosa* rosnącego w monokulturze.
- AA i UA wykazały najsłabsze działanie antybiofilmowe wobec szczepu *E. coli* rosnącego w monokulturze.
- AA powodował większą redukcję ilości wytworzonej biomasy niż UA niezależnie od szczepu bakteryjnego.

Tabela nr 4. Ilość tworzonego biofilmu w jednogatunkowych hodowlach szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*.

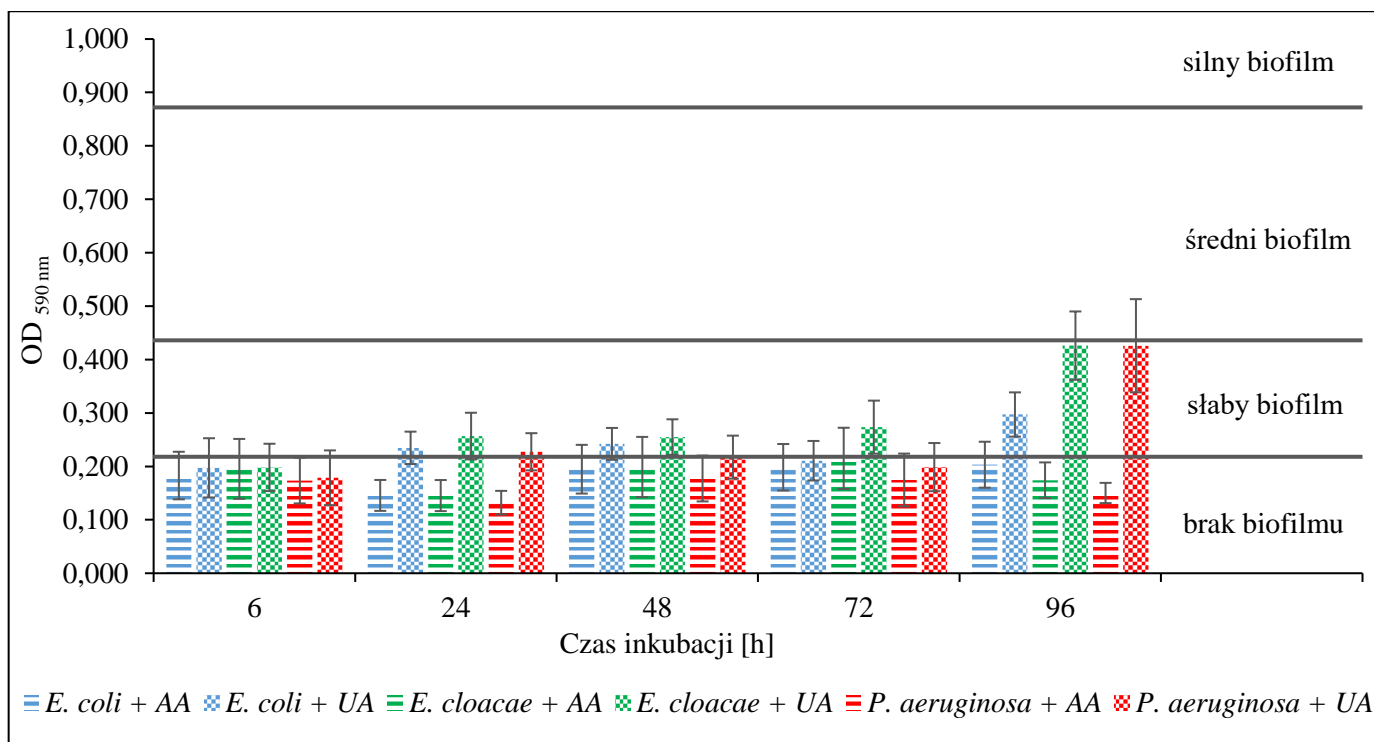
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,406	0,053	0,316	0,044	0,370	0,066
24	0,365	0,049	0,574	0,065	0,825	0,081
48	0,261	0,042	0,329	0,057	0,836	0,057
72	0,291	0,042	0,281	0,075	0,826	0,072
96	0,339	0,070	0,307	0,049	0,802	0,056

Tabela nr 5. Ilość tworzonego biofilmu w jednogatunkowych hodowlach szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 4) zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,183	0,045	0,195	0,056	0,174	0,043
24	0,146	0,029	0,145	0,029	0,132	0,022
48	0,195	0,046	0,199	0,056	0,177	0,043
72	0,198	0,043	0,215	0,057	0,175	0,049
96	0,203	0,043	0,174	0,033	0,150	0,019

Tabela nr 6. Ilość tworzonych biofilmów w jednogatunkowych hodowlach szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 4) zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,197	0,055	0,198	0,051	0,179	0,044
24	0,235	0,030	0,257	0,035	0,227	0,044
48	0,242	0,030	0,255	0,040	0,217	0,033
72	0,211	0,037	0,273	0,045	0,199	0,050
96	0,297	0,041	0,426	0,087	0,426	0,064



Wykres nr 2. Ilość tworzonych biofilmów przez szczepy *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* w hodowlach jednogatunkowych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).

Porównując efektywność działania AA i UA na **aktywność metaboliczną** bakterii żyjących w monokulturach (Tabele nr 7-9, Wykres nr 3) można stwierdzić, że największa redukcja aktywności metabolicznej pod wpływem AA ($p \leq 0,05$) miała miejsce po 48 h u *E. cloacae* (o 28%) oraz po 96 h u *E. coli* (o 21%), natomiast w przypadku *P. aeruginosa* wszystkie spadki aktywności metabolicznej były nieistotne statystycznie ($p > 0,05$). Z kolei pod wpływem UA, największą redukcję aktywności metabolicznej ($p \leq 0,05$) zaobserwowano po 24 h u *E. cloacae* (o 41%) i *P. aeruginosa* (o 32%) oraz po 96 h u *E. coli* (o 34%).

Reasumując:

- *E. cloacae* rosnący w monokulturze był najbardziej wrażliwy na AA i UA spośród badanych szczepów, natomiast szczepem najbardziej opornym na te kwasy był *P. aeruginosa*.

- UA powodował większą redukcję aktywności metabolicznej niż AA niezależnie od szczepu bakteryjnego.

Tabela nr 7. Aktywność metaboliczna szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych.

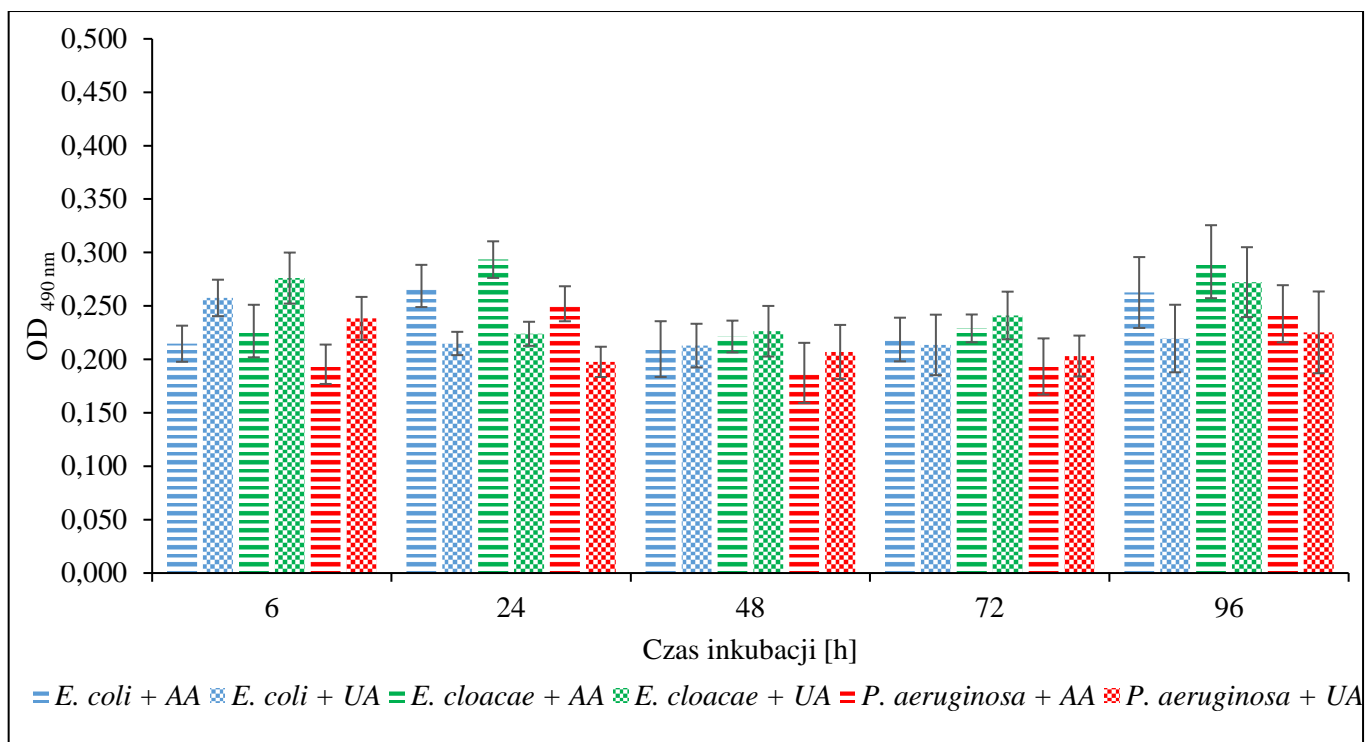
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,222	0,024	0,251	0,021	0,194	0,029
24	0,300	0,024	0,376	0,021	0,291	0,017
48	0,256	0,038	0,306	0,051	0,232	0,026
72	0,261	0,030	0,263	0,035	0,216	0,014
96	0,333	0,060	0,307	0,039	0,256	0,033

Tabela nr 8. Aktywność metaboliczna szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 7) zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,215	0,017	0,227	0,025	0,195	0,018
24	0,269	0,020	0,293	0,017	0,252	0,016
48	0,210	0,026	0,221	0,015	0,187	0,028
72	0,219	0,020	0,229	0,013	0,193	0,026
96	0,263	0,033	0,291	0,034	0,243	0,027

Tabela nr 9. Aktywność metaboliczna szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 7) zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,258	0,017	0,276	0,020	0,238	0,024
24	0,215	0,011	0,224	0,014	0,198	0,011
48	0,213	0,020	0,226	0,025	0,207	0,024
72	0,214	0,028	0,241	0,019	0,203	0,022
96	0,220	0,032	0,272	0,038	0,225	0,033



Wykres nr 3. Aktywność metaboliczna szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).

Podsumowanie:

- a) Biofilmy jednogatunkowe *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* charakteryzowały się podobną dynamiką wzrostu na poszczególnych etapach hodowli.
- b) Szczepy *E. coli* oraz *E. cloacae* tworzyły słabe biofilmy jednogatunkowe, a szczep *P. aeruginosa* – średni.
- c) Największą aktywnością metaboliczną wyróżniał się *E. cloacae*, a najmniejszą – *P. aeruginosa*.
- d) We wszystkich biofilmach jednogatunkowych liczba komórek bakterii, ilość wytworzonej masy biofilmowej i aktywność metaboliczna, były zwykle większe niż w biofilmach dwu- i trzygatunkowych, co stanowi dowód na istnienie oddziaływań antagonistycznych między badanymi szczepami bakterii.

Zmiany w biofilmach jednogatunkowych pod wpływem AA:

- a) zmniejszenie liczby komórek bakterii, największą redukcję odnotowano w monokulturze *E. cloacae*, najmniejszą – *P. aeruginosa*;
- b) zmniejszenie ilości wytworzonej masy biofilmowej, największą redukcję odnotowano w monokulturze *P. aeruginosa*, najmniejszą – *E. coli*, jednak wszystkie badane szczepy pod wpływem AA utraciły zdolność do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$);
- c) zmniejszenie aktywności metabolicznej na większości etapów tworzenia biofilmów, największą redukcję odnotowano w monokulturze *E. cloacae*, najmniejszą – *P. aeruginosa*.

Zmiany w biofilmach jednogatunkowych pod wpływem UA:

- a) zmniejszenie liczby komórek bakterii, największą redukcję odnotowano w monokulturze *E. cloacae*, najmniejszą – *E. coli*;

b) zmniejszenie ilości wytworzonej masy biofilmowej na większości etapów tworzenia biofilmów, największą redukcję odnotowano w monokulturze *P. aeruginosa*, najmniejszą – *E. coli*, utrata zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) tylko w niektórych biofilmach;

c) zmniejszenie aktywności metabolicznej na większości etapów tworzenia biofilmów, największą redukcję odnotowano w monokulturze *E. cloacae*, najmniejszą – *P. aeruginosa*.

7.2. Dwugatunkowych *E. coli* CFT073 + *E. cloacae* ATCC-BAA 2468

Porównując efektywność działania AA i UA na **przeżywalność** bakterii żyjących w biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* (Tabele nr 10-14, Wykres nr 4) można stwierdzić, że największa redukcja liczby żywych komórek pod wpływem AA ($p \leq 0,05$) dotyczyła *E. cloacae* i nastąpiła po 24 h inkubacji (o 5,4 \log_{10}), natomiast spadek przeżywalności *E. coli* był ponad 2-krotnie mniejszy (o 2,4 \log_{10}). AA działał 3-4 krotnie słabiej na biofilmy 72- i 96-godzinne. Natomiast pod wpływem UA, największa redukcja liczby żywych komórek ($p \leq 0,05$) nastąpiła po 24 h inkubacji i dotyczyła *E. cloacae* (o 2,5 \log_{10}), natomiast spadek przeżywalności *E. coli* był mniejszy (1,55 \log_{10}). UA działał nawet 10-krotnie słabiej na biofilmy 72- i 96-godzinne.

Reasumując:

- W biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + AA oraz *E. coli* + *E. cloacae* + UA, obydwa kwasy działały najsilniej po 24 h inkubacji, przy czym AA powodował większą redukcję przeżywalności niż UA.
- Szczep *E. cloacae* był 2-krotnie bardziej wrażliwy na AA niż na UA oraz bardziej wrażliwy na oba kwasy niż *E. coli*.

Tabela nr 10. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *E. cloacae* [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	2,15E+07	5,18E+06	3,10E+07	1,02E+07
6	4,09E+09	6,68E+08	3,43E+09	9,90E+08	2,82E+09	6,76E+08	1,80E+09	3,30E+08
24	1,22E+10	3,08E+09	8,11E+09	1,27E+09	8,39E+09	7,42E+08	2,29E+09	5,20E+08
48	2,12E+09	4,55E+08	8,65E+09	1,78E+09	1,68E+09	3,26E+08	8,30E+08	1,06E+08
72	1,32E+09	3,63E+08	2,91E+09	7,37E+08	1,23E+09	2,69E+08	9,00E+07	1,24E+07
96	1,80E+09	4,53E+08	4,06E+09	4,53E+08	1,31E+09	2,56E+08	1,20E+08	3,71E+07

Tabela nr 11. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *E. cloacae* [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych biofilmach w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	2,15E+07	5,18E+06	3,10E+07	1,02E+07
6	2,08E+06	6,39E+05	2,80E+06	2,83E+05	1,03E+07	1,09E+06	3,10E+05	2,16E+04
24	1,23E+06	2,65E+05	3,26E+04	6,59E+03	3,51E+07	1,11E+07	9,33E+03	9,43E+02
48	7,54E+06	2,91E+06	1,25E+04	2,69E+03	2,50E+08	7,73E+07	5,50E+05	7,64E+04
72	1,46E+08	2,63E+07	1,00E+01	0,00E+00	2,97E+08	8,74E+07	3,67E+05	4,71E+04
96	1,37E+08	1,35E+07	1,00E+01	0,00E+00	4,98E+08	1,08E+08	2,20E+06	3,65E+05

Tabela nr 12. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *E. cloacae* [CFU/ml] w dwugatunkowych biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,15E+07	5,18E+06	3,10E+07	1,02E+07	2,15E+07	5,18E+06	3,10E+07	1,02E+07
6	2,82E+09	6,76E+08	1,80E+09	3,30E+08	1,03E+07	1,09E+06	3,10E+05	2,16E+04
24	8,39E+09	7,42E+08	2,29E+09	5,20E+08	3,51E+07	1,11E+07	9,33E+03	9,43E+02
48	1,68E+09	3,26E+08	8,30E+08	1,06E+08	2,50E+08	7,73E+07	5,50E+05	7,64E+04
72	1,23E+09	2,69E+08	9,00E+07	1,24E+07	2,97E+08	8,74E+07	3,67E+05	4,71E+04
96	1,31E+09	2,56E+08	1,20E+08	3,71E+07	4,98E+08	1,08E+08	2,20E+06	3,65E+05

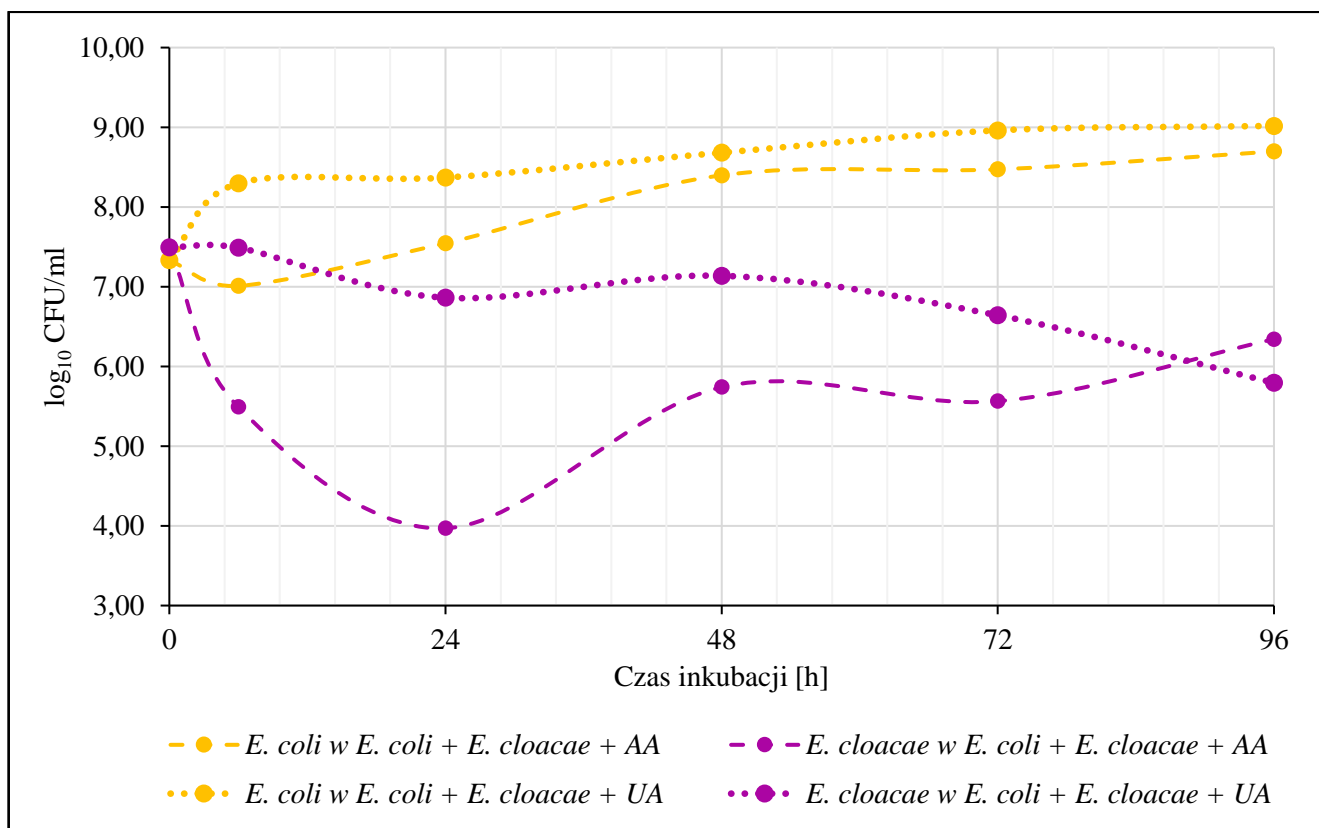
Tabela nr 13. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *E. cloacae* [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych biofilmach w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	2,15E+07	5,18E+06	3,10E+07	1,02E+07
6	4,81E+07	5,58E+06	2,37E+07	6,57E+06	1,98E+08	2,24E+07	3,08E+07	3,32E+06

24	9,58E+07	6,09E+06	7,33E+05	2,61E+05	2,34E+08	3,82E+07	7,27E+06	1,32E+06
48	7,35E+07	2,36E+07	7,56E+04	2,29E+04	4,80E+08	7,30E+07	1,37E+07	4,10E+06
72	1,49E+08	4,64E+07	2,49E+07	1,21E+07	9,14E+08	1,14E+08	4,38E+06	4,66E+05
96	1,33E+08	5,09E+07	4,20E+07	6,87E+06	1,04E+09	2,60E+08	6,22E+05	9,91E+04

Tabela nr 14. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *E. cloacae* [CFU/ml] w dwugatunkowych biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,15E+07	5,18E+06	3,10E+07	1,02E+07	2,15E+07	5,18E+06	3,10E+07	1,02E+07
6	2,82E+09	6,76E+08	1,80E+09	3,30E+08	1,98E+08	1,09E+06	3,08E+07	2,16E+04
24	8,39E+09	7,42E+08	2,29E+09	5,20E+08	2,34E+08	1,11E+07	7,27E+06	9,43E+02
48	1,68E+09	3,26E+08	8,30E+08	1,06E+08	4,80E+08	7,73E+07	1,37E+07	7,64E+04
72	1,23E+09	2,69E+08	9,00E+07	1,24E+07	9,14E+08	8,74E+07	4,38E+06	4,71E+04
96	1,31E+09	2,56E+08	1,20E+08	3,71E+07	1,04E+09	1,08E+08	6,22E+05	3,65E+05



Wykres nr 4. Przeżywalność szczepów *E. coli* i *E. cloacae* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae*) w obecności AA (linie przerywane) i UA (linie kropkowane).

Porównując efektywność działania AA i UA na **ilość tworzonego biofilmu** w konsorcjach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* (Tabele nr 15-19, Wykres nr 5) można stwierdzić, że największe spadki ilości wytworzonej masy biofilmowej pod wpływem AA ($p \leq 0,05$), skutkujące utratą zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) miały miejsce po 6, 24 i 96 h inkubacji, a brak działania AA obserwowano w hodowlach 72-godzinnych. Największą redukcję ilości biomasy (o 45%) odnotowano w 6-godzinnej hodowli *E. coli* + *E. cloacae* + AA ($p \leq 0,05$). Natomiast pod wpływem UA, największą redukcję ilości biomasy (o 44%) połączoną z utratą zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) w konsorcjach *E. coli* + *E. cloacae* + UA odnotowano jedynie po 6 h inkubacji ($p \leq 0,05$), z kolei brak działania UA obserwowano w hodowlach 48-godzinnych.

Reasumując:

- W konsorcjach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + AA oraz *E. coli* + *E. cloacae* + UA, obydwa kwasy wykazywały najsilniejsze działanie antybiofilmowe w biofilmach 6-godzinnych.
- AA powodował większą redukcję ilości wytworzonej masy biofilmowej niż UA, zatem wykazał silniejsze działanie antybiofilmowe w porównaniu z UA.

Tabela nr 15. Porównanie ilości tworzonego biofilmu w hodowlach jednogatunkowych (*E. coli* i *E. cloacae*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae*). Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,406	0,053	0,336	0,077	0,316	0,044	0,336	0,077
24	0,365	0,049	0,233	0,050	0,574	0,065	0,233	0,050
48	0,261	0,042	0,220	0,043	0,329	0,057	0,220	0,043
72	0,291	0,042	0,259	0,051	0,281	0,075	0,259	0,051
96	0,339	0,070	0,332	0,069	0,307	0,049	0,332	0,069

Tabela nr 16. Porównanie ilości tworzonego biofilmu w hodowlach jednogatunkowych (*E. coli* i *E. cloacae*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae*) w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,183	0,045	0,186	0,028	0,195	0,056	0,186	0,028
24	0,146	0,029	0,149	0,038	0,145	0,029	0,149	0,038
48	0,195	0,046	0,208	0,037	0,199	0,056	0,208	0,037
72	0,198	0,043	0,263	0,060	0,215	0,057	0,263	0,060
96	0,203	0,043	0,247	0,045	0,174	0,033	0,247	0,045

Tabela nr 17. Porównanie ilości tworzego biofilmu w hodowlach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* kontrolnych i w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

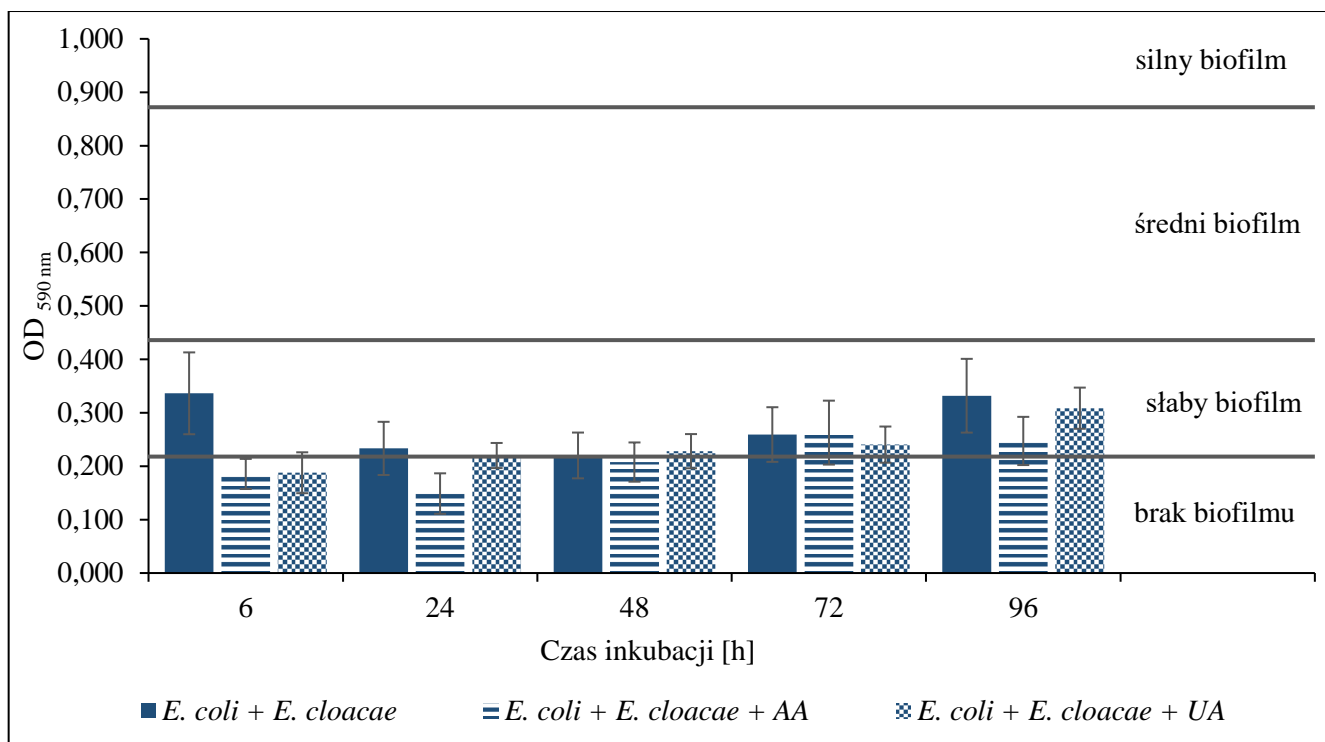
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,336	0,077	0,186	0,028
24	0,233	0,050	0,149	0,038
48	0,220	0,043	0,208	0,037
72	0,259	0,051	0,263	0,060
96	0,332	0,069	0,247	0,045

Tabela nr 18. Porównanie ilości tworzego biofilmu w hodowlach jednogatunkowych (*E. coli* i *E. cloacae*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae*) w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,197	0,055	0,188	0,038	0,198	0,051	0,188	0,038
24	0,235	0,030	0,220	0,024	0,257	0,035	0,220	0,024
48	0,242	0,030	0,228	0,032	0,255	0,040	0,228	0,032
72	0,211	0,037	0,240	0,034	0,273	0,045	0,240	0,034
96	0,297	0,041	0,309	0,039	0,426	0,087	0,309	0,039

Tabela nr 19. Porównanie ilości tworzego biofilmu w hodowlach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* kontrolnych i w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,336	0,077	0,188	0,038
24	0,233	0,050	0,220	0,024
48	0,220	0,043	0,228	0,032
72	0,259	0,051	0,240	0,034
96	0,332	0,069	0,309	0,039



Wykres nr 5. Ilość tworzono biofilmu w dwugatunkowych biofilmach *E. coli* + *E. cloacae* kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).

Porównując efektywność działania AA i UA na **aktywność metaboliczną** bakterii żyjących w biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* (Tabele nr 20-24, Wykres nr 6) można stwierdzić, że spadki aktywności metabolicznej pod wpływem AA miały miejsce po 6, 48 i 72 h inkubacji, a brak działania AA obserwowano w hodowlach 24 i 96-godzinnych. Największą redukcję aktywności metabolicznej (o 13%) odnotowano w 48-godzinnej hodowli *E. coli* + *E. cloacae* + AA. Natomiast pod wpływem UA, największą i istotną statystycznie ($p \leq 0,05$) redukcję aktywności metabolicznej (o 23%) w konsorcjach *E. coli* + *E. cloacae* + UA odnotowano po 24 h inkubacji, z kolei brak działania UA obserwowano w hodowlach 6-godzinnych.

Reasumując:

- W biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + AA oraz *E. coli* + *E. cloacae* + UA, UA powodował większą redukcję aktywności metabolicznej niż AA.

Tabela nr 20. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli* i *E. cloacae*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae*) hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,222	0,024	0,221	0,024	0,251	0,021	0,221	0,024
24	0,300	0,024	0,276	0,030	0,376	0,021	0,276	0,030
48	0,256	0,038	0,239	0,028	0,306	0,051	0,239	0,028

72	0,261	0,030	0,262	0,023	0,263	0,035	0,262	0,023
96	0,333	0,060	0,275	0,028	0,307	0,039	0,275	0,028

Tabela nr 21. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli* i *E. cloacae*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae*) hodowlach biofilmowych w obecności AA.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,215	0,017	0,197	0,019	0,227	0,025	0,197	0,019
24	0,269	0,020	0,288	0,023	0,293	0,017	0,288	0,023
48	0,210	0,026	0,207	0,030	0,221	0,015	0,207	0,030
72	0,219	0,020	0,234	0,024	0,229	0,013	0,234	0,024
96	0,263	0,033	0,293	0,032	0,291	0,034	0,293	0,032

Tabela nr 22. Porównanie aktywności metabolicznej dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* biofilmów kontrolnych i hodowanych w obecności AA.

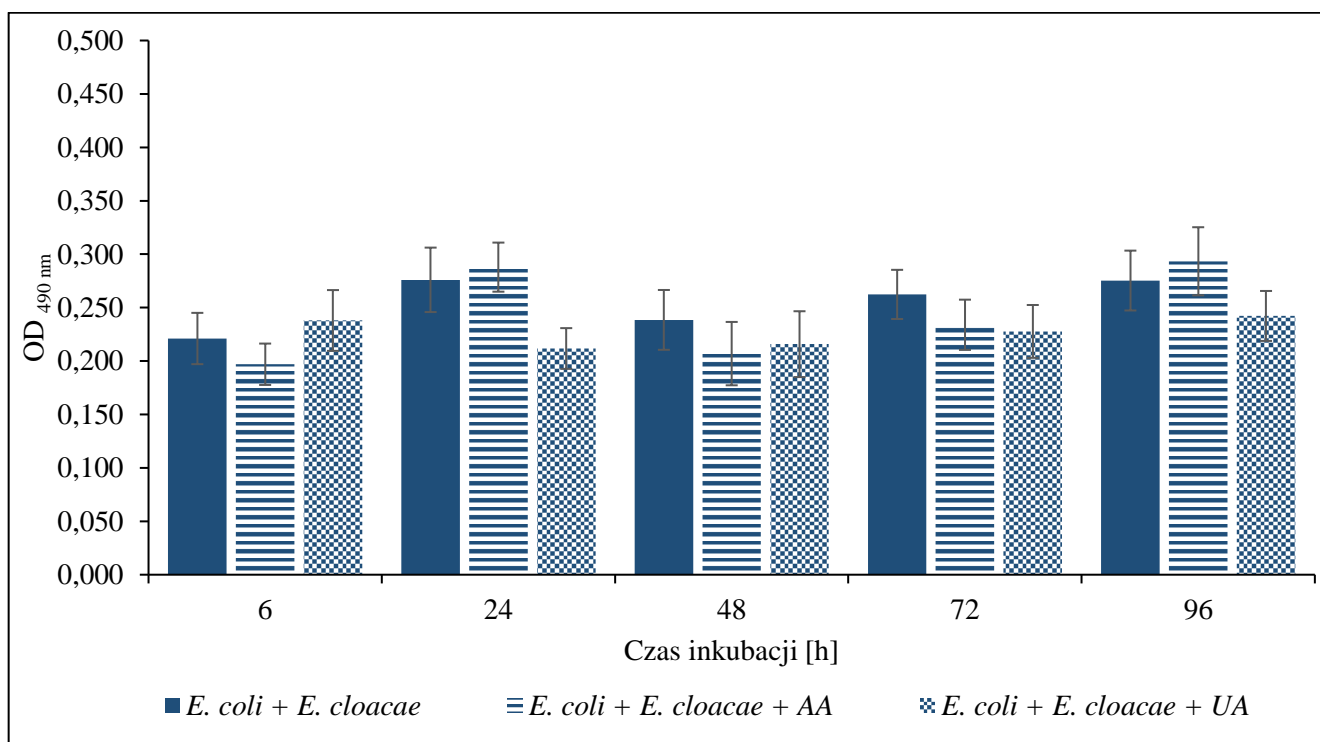
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,221	0,024	0,197	0,019
24	0,276	0,030	0,288	0,023
48	0,239	0,028	0,207	0,030
72	0,262	0,023	0,234	0,024
96	0,275	0,028	0,293	0,032

Tabela nr 23. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli* i *E. cloacae*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae*) hodowlach biofilmowych w obecności UA.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,258	0,017	0,238	0,028	0,276	0,020	0,238	0,028
24	0,215	0,011	0,212	0,019	0,224	0,014	0,212	0,019
48	0,213	0,020	0,216	0,031	0,226	0,025	0,216	0,031
72	0,214	0,028	0,228	0,025	0,241	0,019	0,228	0,025
96	0,220	0,032	0,242	0,023	0,272	0,038	0,242	0,023

Tabela nr 24. Porównanie aktywności metabolicznej dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* biofilmów kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,221	0,024	0,238	0,028
24	0,276	0,030	0,212	0,019
48	0,239	0,028	0,216	0,031
72	0,262	0,023	0,228	0,025
96	0,275	0,028	0,242	0,023



Wykres nr 6. Aktywność metaboliczna w dwugatunkowych biofilmach *E. coli* + *E. cloacae* kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).

Podsumowanie:

- W biofilmie dwugatunkowym *E. coli* i *E. cloacae*, obecność szczepu *E. cloacae* zmniejszyła liczbę komórek *E. coli* na pierwszych dwóch etapach, a obecność szczepu *E. coli* ograniczała przeżywalność *E. cloacae* na wszystkich etapach tworzenia biofilmu.
- Jednoczesna obecność tych dwóch gatunków bakterii skutkowałą zmniejszeniem ilości wytworzonej masy biofilmowej i zmniejszeniem aktywności metabolicznej, zwłaszcza w odniesieniu do monokultury *E. cloacae*.
- Obserwacje te mogą wskazywać na antagonistyczne oddziaływania pomiędzy badanymi szczepami, z których silniejsze są oddziaływania *E. coli* wobec *E. cloacae*.

Zmiany w biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* pod wpływem AA:

- a) zanik lub osłabienie antagonistycznego oddziaływania pomiędzy bakteriami;
- b) zmniejszenie liczby komórek bakterii, większa redukcja liczebności dotyczyła *E. cloacae*, spadki przeżywalności obu szczepów były niższe niż w obu monokulturach;
- c) zmniejszenie ilości wytworzonej masy biofilmowej i utrata zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) na pierwszych dwóch etapach jego tworzenia, redukcja biomasy była niższa niż w obu monokulturach;
- d) zmniejszenie aktywności metabolicznej na większości etapów tworzenia biofilmów, spadki aktywności były niższe niż w obu monokulturach.

Zmiany w biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* pod wpływem UA:

- a) zanik lub osłabienie antagonistycznego oddziaływania pomiędzy bakteriami, przy braku wpływu UA na antagonistyczne oddziaływania *E. coli* wobec liczebności *E. cloacae* w końcowych etapach wzrostu biofilmu;
- b) zmniejszenie liczby komórek bakterii na większości etapów tworzenia biofilmów, większa redukcja liczebności dotyczyła *E. cloacae*, spadki przeżywalności obu szczepów były niższe niż w obu monokulturach;
- c) zmniejszenie ilości wytworzonej masy biofilmowej na większości etapów tworzenia biofilmów, utrata zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) tylko na pierwszym etapie jego tworzenia, redukcja biomasy była niższa niż w obu monokulturach;
- d) zmniejszenie aktywności metabolicznej na większości etapów tworzenia biofilmów, spadki aktywności były niższe niż w obu monokulturach.

7.3. Dwugatunkowych *E. coli* CFT073 + *P. aeruginosa* ATCC 25000

Porównując efektywność działania AA i UA na **przeżywalność** bakterii w biofilmie dwugatunkowym *E. coli* + *P. aeruginosa* (Tabele nr 25-29, Wykres nr 7) można stwierdzić, że największa redukcja liczby żywych komórek pod wpływem AA ($p \leq 0,05$) dotyczyła *P. aeruginosa* i nastąpiła po 48 i 72 h inkubacji (o 3,2 \log_{10}), natomiast spadek przeżywalności *E. coli* był mniejszy (2,5 \log_{10}) i nastąpił po 6 i 24 h inkubacji ($p \leq 0,05$). Co ciekawe, AA nie działał bójczo jedynie na komórki *E. coli* rosnące w dwugatunkowych biofilmach 72- i 96-godzinnych. Natomiast pod wpływem UA, największa redukcja liczby żywych komórek ($p \leq 0,05$) dotyczyła *P. aeruginosa* i nastąpiła po 48 h inkubacji (o 3 \log_{10}), natomiast spadek przeżywalności *E. coli* był mniejszy (1,4 \log_{10}) i nastąpił po 6 h inkubacji ($p \leq 0,05$). Co ciekawe, UA podobnie jak AA, nie działał bójczo na komórki *E. coli* rosnące w dwugatunkowych biofilmach 72- i 96-godzinnych.

Reasumując:

- W biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA oraz *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA, obydwa kwasy działały najsilniej po 6 h inkubacji wobec *E. coli*, a po 48 h – wobec *P. aeruginosa*.
- AA powodował większy spadek przeżywalności niż UA, zatem wykazał silniejsze działanie bójcze w porównaniu z UA.
- Szczep *P. aeruginosa* był bardziej wrażliwy na AA niż na UA oraz bardziej wrażliwy na oba kwasy niż *E. coli*.
- Żaden z kwasów nie działał bójczo na komórki *E. coli* w 72- i 96-godzinnych biofilmach *E. coli* + *P. aeruginosa*.

Tabela nr 25. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	5,19E+07	6,36E+06	1,76E+07	2,07E+06	5,67E+07	1,35E+07
6	4,09E+09	6,68E+08	1,69E+09	4,01E+08	4,10E+09	8,41E+08	7,34E+08	1,78E+08
24	1,22E+10	3,08E+09	2,10E+10	2,00E+09	7,77E+09	1,87E+09	1,01E+10	1,46E+09
48	2,12E+09	4,55E+08	4,90E+09	6,13E+08	1,39E+09	4,44E+08	1,15E+10	2,64E+09
72	1,32E+09	3,63E+08	2,38E+09	3,96E+08	4,58E+08	7,38E+07	4,59E+09	1,32E+09
96	1,80E+09	4,53E+08	4,98E+09	1,52E+09	2,67E+08	5,73E+07	3,01E+09	8,22E+08

Tabela nr 26. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych biofilmach w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	5,19E+07	6,36E+06	1,76E+07	2,07E+06	5,67E+07	1,35E+07
6	2,08E+06	6,39E+05	4,90E+07	2,09E+07	1,12E+07	4,01E+06	4,47E+07	1,23E+07
24	1,23E+06	2,65E+05	4,53E+07	3,67E+06	2,67E+07	7,69E+06	1,88E+07	4,72E+06
48	7,54E+06	2,91E+06	5,58E+06	1,13E+06	3,28E+08	6,38E+07	6,85E+06	7,77E+05
72	1,46E+08	2,63E+07	1,53E+06	4,11E+05	5,39E+08	9,79E+07	2,93E+06	5,99E+05
96	1,37E+08	1,35E+07	1,00E+07	0,00E+00	7,03E+08	2,09E+08	9,90E+06	1,16E+07

Tabela nr 27. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w dwugatunkowych biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

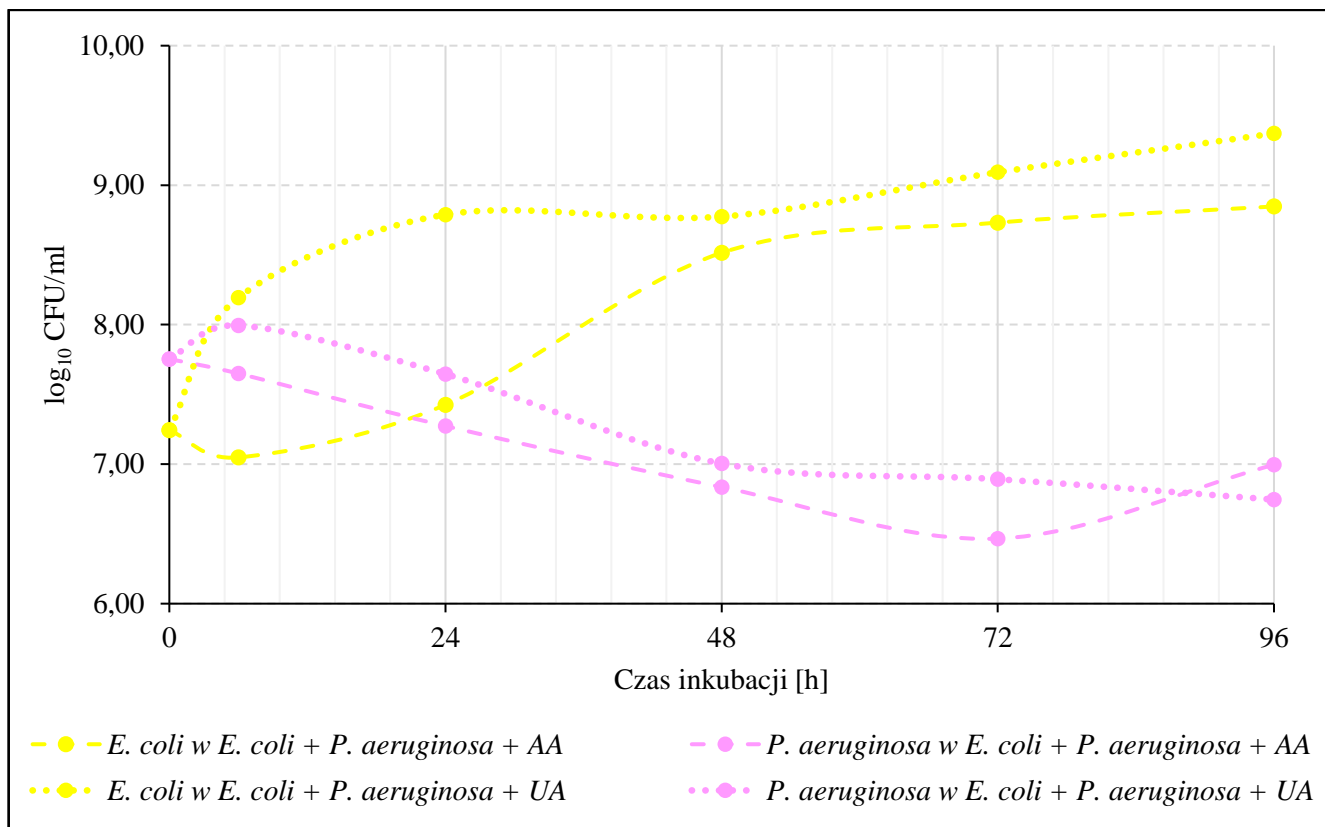
Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	1,76E+07	2,07E+06	5,67E+07	1,35E+07	1,76E+07	2,07E+06	5,67E+07	1,35E+07
6	4,10E+09	8,41E+08	7,34E+08	1,78E+08	1,12E+07	4,01E+06	4,47E+07	1,23E+07
24	7,77E+09	1,87E+09	1,01E+10	1,46E+09	2,67E+07	7,69E+06	1,88E+07	4,72E+06
48	1,39E+09	4,44E+08	1,15E+10	2,64E+09	3,28E+08	6,38E+07	6,85E+06	7,77E+05
72	4,58E+08	7,38E+07	4,59E+09	1,32E+09	5,39E+08	9,79E+07	2,93E+06	5,99E+05
96	2,67E+08	5,73E+07	3,01E+09	8,22E+08	7,03E+08	2,09E+08	9,90E+06	1,16E+07

Tabela nr 28. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych biofilmach w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	5,19E+07	6,36E+06	1,76E+07	2,07E+06	5,67E+07	1,35E+07
6	4,81E+07	5,58E+06	5,26E+07	1,19E+07	1,56E+08	5,65E+07	9,87E+07	1,78E+07
24	9,58E+07	6,09E+06	2,62E+07	8,48E+06	6,15E+08	2,02E+08	4,43E+07	9,96E+06
48	7,35E+07	2,36E+07	8,60E+06	9,93E+05	5,95E+08	1,39E+08	1,01E+07	1,76E+06
72	1,49E+08	4,64E+07	2,85E+07	1,07E+07	1,24E+09	4,68E+08	7,80E+06	1,83E+06
96	1,33E+08	5,09E+07	2,03E+08	1,25E+07	2,35E+09	5,90E+08	5,57E+06	1,90E+06

Tabela nr 29. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w dwugatunkowych biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	1,76E+07	2,07E+06	5,67E+07	1,35E+07	1,76E+07	2,07E+06	5,67E+07	1,35E+07
6	4,10E+09	8,41E+08	7,34E+08	1,78E+08	1,56E+08	5,65E+07	9,87E+07	1,78E+07
24	7,77E+09	1,87E+09	1,01E+10	1,46E+09	6,15E+08	2,02E+08	4,43E+07	9,96E+06
48	1,39E+09	4,44E+08	1,15E+10	2,64E+09	5,95E+08	1,39E+08	1,01E+07	1,76E+06
72	4,58E+08	7,38E+07	4,59E+09	1,32E+09	1,24E+09	4,68E+08	7,80E+06	1,83E+06
96	2,67E+08	5,73E+07	3,01E+09	8,22E+08	2,35E+09	5,90E+08	5,57E+06	1,90E+06



Wykres nr 7. Przeżywalność szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach dwugatunkowych (*E. coli* + *P. aeruginosa*) w obecności AA (linie przerywane) i UA (linie kropkowane).

Porównując efektywność działania AA i UA na **ilość tworzonych biofilmu** w konsorcjach dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* (Tabele nr 30-34, Wykres nr 8) można stwierdzić, że spadki ilości wytworzonej masy biofilmowej pod wpływem AA ($p \leq 0,05$), skutkujące utratą zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) miały miejsce po 6, 24, 48 i 96 h inkubacji, a największą redukcję ilości biomasy (o 81%) odnotowano w 24-godzinnej hodowli *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA. Natomiast pod wpływem UA ($p \leq 0,05$), największą redukcję ilości biomasy (o 59%) połączoną z utratą zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) w konsorcjach *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA odnotowano jedynie po 6 h inkubacji. Najsłabsze działanie obydwu kwasów obserwowano w hodowlach 48-godzinnych.

Reasumując:

- W biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA oraz *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA, AA powodował większą redukcję ilości wytworzonej masy biofilmowej niż UA, zatem wykazał silniejsze działanie antybiofilmowe w porównaniu z UA.

Tabela nr 30. Porównanie ilości tworzego biofilmu w jednogatunkowych (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,406	0,053	0,418	0,051	0,370	0,066	0,418	0,051
24	0,365	0,049	0,544	0,067	0,825	0,081	0,544	0,067
48	0,261	0,042	0,414	0,056	0,836	0,057	0,414	0,056
72	0,291	0,042	0,581	0,074	0,826	0,072	0,581	0,074
96	0,339	0,070	0,640	0,087	0,802	0,056	0,640	0,087

Tabela nr 31. Porównanie ilości tworzego biofilmu w jednogatunkowych (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,183	0,045	0,161	0,060	0,174	0,043	0,161	0,060
24	0,146	0,029	0,103	0,014	0,132	0,022	0,103	0,014
48	0,195	0,046	0,188	0,046	0,177	0,043	0,188	0,046
72	0,198	0,043	0,256	0,051	0,175	0,049	0,256	0,051
96	0,203	0,043	0,218	0,054	0,150	0,019	0,218	0,054

Tabela nr 32. Porównanie ilości tworzego biofilmu w dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,418	0,051	0,161	0,060
24	0,544	0,067	0,103	0,014
48	0,414	0,056	0,188	0,046
72	0,581	0,074	0,256	0,051
96	0,640	0,087	0,218	0,054

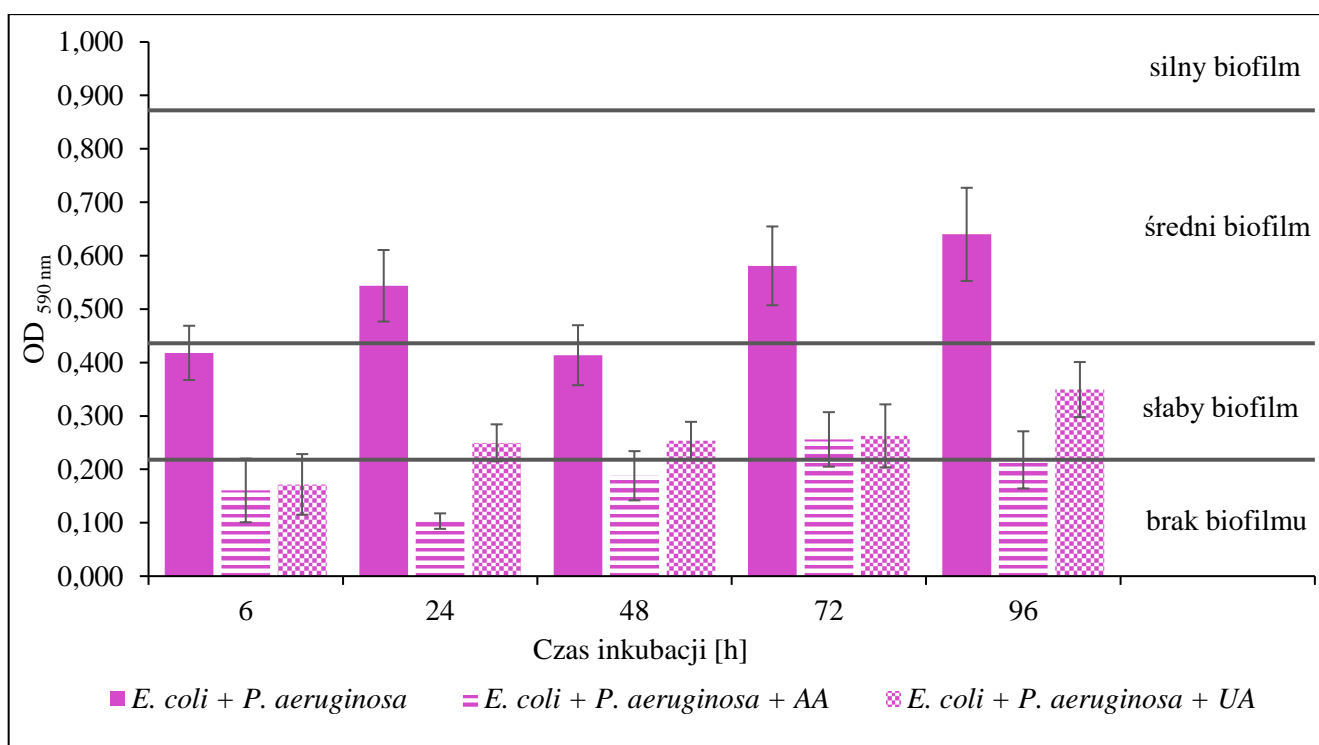
Tabela nr 33. Porównanie ilości tworzego biofilmu w jednogatunkowych (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,197	0,055	0,172	0,057	0,179	0,044	0,172	0,057
24	0,235	0,030	0,250	0,035	0,227	0,044	0,250	0,035

48	0,242	0,030	0,254	0,035	0,217	0,033	0,254	0,035
72	0,211	0,037	0,263	0,059	0,199	0,050	0,263	0,059
96	0,297	0,041	0,349	0,052	0,426	0,064	0,349	0,052

Tabela nr 34. Porównanie ilości tworzonych biofilmów w dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do próbek kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,418	0,051	0,172	0,057
24	0,544	0,067	0,250	0,035
48	0,414	0,056	0,254	0,035
72	0,581	0,074	0,263	0,059
96	0,640	0,087	0,349	0,052



Wykres nr 8. Ilość tworzonych biofilmów w dwugatunkowych biofilmach *E. coli* + *P. aeruginosa* kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).

Porównując efektywność działania AA i UA na **aktywność metaboliczną** bakterii żyjących w biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* (Tabele nr 35-39, Wykres nr 9) można stwierdzić, że nieistotny statystycznie ($p > 0,05$) spadek aktywności metabolicznej pod wpływem AA miał miejsce po 6, 48 i 72 h inkubacji, a brak działania AA obserwowano w hodowlach 24 i 96-godzinnych. Największą redukcję aktywności metabolicznej (o 15%) odnotowano w 72-godzinnej hodowli *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA. Natomiast pod wpływem UA, największą i istotną statystycznie ($p \leq 0,05$) redukcję aktywności metabolicznej (o 21%) w konsorcjach *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA odnotowano po 24 h inkubacji.

Reasumując:

- W biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA oraz *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA, UA powodował większą redukcję aktywności metabolicznej niż AA.

Tabela nr 35. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,222	0,024	0,199	0,020	0,194	0,029	0,199	0,020
24	0,300	0,024	0,251	0,021	0,291	0,017	0,251	0,021
48	0,256	0,038	0,230	0,037	0,232	0,026	0,230	0,037
72	0,261	0,030	0,231	0,021	0,216	0,014	0,231	0,021
96	0,333	0,060	0,272	0,038	0,256	0,033	0,272	0,038

Tabela nr 36. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych w obecności AA.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,215	0,017	0,177	0,019	0,195	0,018	0,177	0,019
24	0,269	0,020	0,280	0,022	0,252	0,016	0,280	0,022
48	0,210	0,026	0,207	0,030	0,187	0,028	0,207	0,030
72	0,219	0,020	0,198	0,016	0,193	0,026	0,198	0,016
96	0,263	0,033	0,296	0,017	0,243	0,027	0,296	0,017

Tabela nr 37. Porównanie aktywności metabolicznej w dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA.

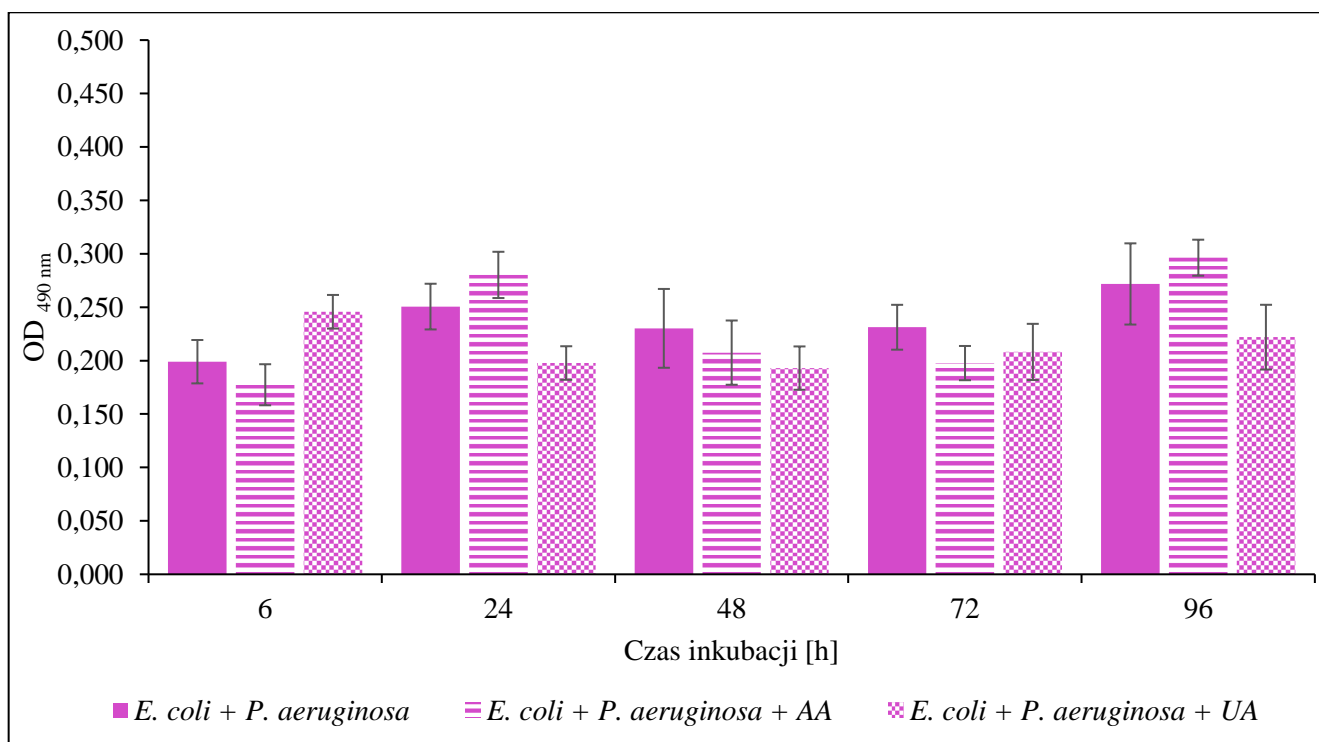
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,199	0,020	0,177	0,019
24	0,251	0,021	0,280	0,022
48	0,230	0,037	0,207	0,030
72	0,231	0,021	0,198	0,016
96	0,272	0,038	0,296	0,017

Tabela nr 38. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli* i *P. aeruginosa*) i dwugatunkowych (*E. coli* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych w obecności UA.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,258	0,017	0,246	0,016	0,238	0,024	0,246	0,016
24	0,215	0,011	0,198	0,016	0,198	0,011	0,198	0,016
48	0,213	0,020	0,193	0,020	0,207	0,024	0,193	0,020
72	0,214	0,028	0,208	0,026	0,203	0,022	0,208	0,026
96	0,220	0,032	0,222	0,030	0,225	0,033	0,222	0,030

Tabela nr 39. Porównanie aktywności metabolicznej w dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,199	0,020	0,246	0,016
24	0,251	0,021	0,198	0,016
48	0,230	0,037	0,193	0,020
72	0,231	0,021	0,208	0,026
96	0,272	0,038	0,222	0,030



Wykres nr 9. Aktywność metaboliczna w dwugatunkowych biofilmach *E. coli* + *P. aeruginosa* kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).

Podsumowanie:

a) W biofilmie dwugatunkowym *E. coli* i *P. aeruginosa*, obecność szczepu *P. aeruginosa* zmniejszała liczbę komórek *E. coli* na większości etapów tworzenia biofilmu, a obecność szczepu *E. coli* zmniejszała liczbę komórek *P. aeruginosa* tylko na pierwszym i ostatnim etapie. Obserwacja ta może wskazywać na antagonistyczne oddziaływania pomiędzy w/w bakteriami, z których silniejsze są oddziaływania *P. aeruginosa* wobec *E. coli*. Antagonistyczne działanie *E. coli* wobec *P. aeruginosa* było słabsze niż wykazane wyżej wobec *E. cloacae*.

b) Jednoczesna obecność *E. coli* i *P. aeruginosa*, na większości etapów tworzenia biofilmu skutkowałą zwiększeniem ilości wytworzonej masy biofilmowej (a zmniejszeniem aktywności metabolicznej) w odniesieniu do jednogatunkowego biofilmu *E. coli*, natomiast zmniejszeniem ilości wytworzonej masy biofilmowej (a zwiększeniem aktywności metabolicznej) w odniesieniu do monokultury *P. aeruginosa*. Zatem odwrotnie niż w przypadku przeżywalności, tylko obecność *E. coli* działała antagonistycznie, ponieważ zahamowała ilość tworzonego biofilmu przez *P. aeruginosa*. Tymczasem *P. aeruginosa* nie wykazał analogicznego wpływu na ilość biomasy *E. coli*, jednak podobnie jak w przypadku przeżywalności działał antagonistycznie na aktywność metaboliczną *E. coli*.

Zmiany w biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* pod wpływem AA:

a) zanik antagonistycznego oddziaływania *P. aeruginosa* wobec liczebności *E. coli*, przy braku wpływu AA na antagonistyczne oddziaływania *E. coli* wobec liczebności *P. aeruginosa* w końcowych etapach wzrostu biofilmu;

b) zmniejszenie liczby komórek bakterii, większa redukcja liczebności dotyczyła *P. aeruginosa*, spadki przeżywalności *E. coli* były niższe, a *P. aeruginosa* wyższe niż w monokulturach;

c) zmniejszenie ilości wytworzonej masy biofilmowej i utrata zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) na większości etapów jego tworzenia, redukcja biomasy była niższa niż w monokulturze *P. aeruginosa*, a wyższa niż w *E. coli*;

d) zmniejszenie aktywności metabolicznej na większości etapów tworzenia biofilmów, spadki aktywności były niższe niż w obu monokulturach.

Zmiany w biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *P. aeruginosa* pod wpływem UA:

a) zanik antagonistycznego oddziaływania *P. aeruginosa* wobec liczebności *E. coli*, przy braku wpływu AA na antagonistyczne oddziaływania *E. coli* wobec liczebności *P. aeruginosa* w końcowych etapach wzrostu biofilmu;

b) zmniejszenie liczby komórek bakterii, większa redukcja liczebności dotyczyła *P. aeruginosa*, spadki przeżywalności *E. coli* były niższe, a *P. aeruginosa* wyższe niż w monokulturach;

c) zmniejszenie ilości wytworzonej masy biofilmowej, utrata zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) tylko na pierwszym etapie jego tworzenia, redukcja biomasy była niższa niż w monokulturze *P. aeruginosa*, a wyższa niż w *E. coli*;

d) zmniejszenie aktywności metabolicznej na większości etapów tworzenia biofilmów, spadki aktywności były niższe niż w obu monokulturach.

7.4. Trzygatunkowych *E. coli* CFT073 + *E. cloacae* ATCC-BAA 2468 + *P. aeruginosa* ATCC 25000

Porównując efektywność działania AA i UA na **przeżywalność** bakterii w biofilmie trzygatunkowym *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* (Tabele nr 40-44, Wykres nr 10) można stwierdzić, że największa redukcja liczby żywych komórek pod wpływem AA (o 3,5 log₁₀) dotyczyła *P. aeruginosa* i nastąpiła po 72 h inkubacji ($p \leq 0,05$), z kolei spadek przeżywalności *E. cloacae* był mniejszy (3,3 log₁₀) i wystąpił po 6 h hodowli ($p \leq 0,05$), a najmniejszy spadek liczebności dotyczył *E. coli* (2,15 log₁₀) i miał miejsce po 6 h inkubacji ($p \leq 0,05$). Co ciekawe, AA wykazał znikome działanie bójcze na komórki *E. coli* rosnące w trzygatunkowych biofilmach 72- i 96-godzinnych, a wynik ten jest zbieżny z obserwacjami uzyskanym dla *E. coli* żyjących w biofilmach dwugatunkowych. Natomiast pod wpływem UA, największa redukcja liczby żywych komórek (o 3,6 log₁₀) dotyczyła *P. aeruginosa* i nastąpiła po 96 h inkubacji ($p \leq 0,05$), z kolei spadek przeżywalności *E. cloacae* był mniejszy (1,4 log₁₀) i wystąpił po 6 i 24 h hodowli ($p \leq 0,05$), a najmniejszy spadek liczebności dotyczył *E. coli* (0,8 log₁₀) i miał miejsce po 6 h inkubacji ($p \leq 0,05$). Co ciekawe, UA nie wykazał działania bójczego na komórki *E. coli* rosnące w trzygatunkowych biofilmach 48-, 72- i 96-godzinnych, a wynik ten jest zbieżny z obserwacjami uzyskanym dla *E. coli* żyjących w 72- i 96- godzinnych biofilmach dwugatunkowych.

Reasumując:

- W biofilmach trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA oraz *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA, obydwa kwasy działały najsilniej po 6 h inkubacji wobec *E. coli* i *E. cloacae*, a po 72 i 96 h – wobec *P. aeruginosa*.
- AA powodował większy spadek przeżywalności *E. coli* i *E. cloacae* niż UA, zatem wykazał silniejsze działanie bójcze w porównaniu z UA.
- Szczip *P. aeruginosa* był minimalnie bardziej wrażliwy na UA niż na AA oraz bardziej wrażliwy na oba kwasy niż *E. cloacae* i *E. coli*.
- Najmniej wrażliwym szczepem okazał się być *E. coli*, wobec którego w 48, 72- i 96-godzinnych biofilmach trzygatunkowych, AA wykazał słabe działanie, a UA nie działał bójczo.

Tabela nr 40. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych i trzygatunkowych hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	5,19E+07	6,36E+06	2,27E+07	8,35E+06	2,69E+07	7,21E+06	5,77E+07	1,83E+07
6	4,09E+09	6,68E+08	3,43E+09	9,90E+08	1,69E+09	4,01E+08	3,10E+09	4,55E+08	1,63E+09	4,91E+08	7,82E+08	2,29E+08
24	1,22E+10	3,08E+09	8,11E+09	1,27E+09	2,10E+10	2,00E+09	3,45E+09	4,52E+08	8,40E+08	1,62E+08	1,51E+10	3,50E+09
48	2,12E+09	4,55E+08	8,65E+09	1,78E+09	4,90E+09	6,13E+08	6,36E+08	8,79E+07	2,51E+07	7,92E+06	1,04E+10	2,76E+09
72	1,32E+09	3,63E+08	2,91E+09	7,37E+08	2,38E+09	3,96E+08	4,92E+08	1,17E+08	4,54E+07	7,12E+06	3,76E+09	2,34E+08
96	1,80E+09	4,53E+08	4,06E+09	4,53E+08	4,98E+09	1,52E+09	3,93E+08	7,50E+07	9,60E+06	8,00E+05	3,85E+09	6,80E+08

Tabela nr 41. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych i trzygatunkowych biofilmach w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	5,19E+07	6,36E+06	2,27E+07	8,35E+06	2,69E+07	7,21E+06	5,77E+07	1,83E+07
6	2,08E+06	6,39E+05	2,80E+06	2,83E+05	4,90E+07	2,09E+07	2,21E+07	2,20E+06	8,83E+05	2,03E+05	2,48E+07	3,56E+06
24	1,23E+06	2,65E+05	3,26E+04	6,59E+03	4,53E+07	3,67E+06	3,28E+08	6,38E+07	9,33E+05	9,43E+04	8,84E+06	9,91E+05
48	7,54E+06	2,91E+06	1,25E+04	2,69E+03	5,58E+06	1,13E+06	4,31E+08	2,65E+08	2,43E+06	4,19E+05	7,04E+06	1,79E+06
72	1,46E+08	2,63E+07	1,00E+01	0,00E+00	1,53E+06	4,11E+05	4,62E+08	1,24E+08	3,37E+06	3,30E+05	1,24E+06	4,32E+05
96	1,37E+08	1,35E+07	1,00E+01	0,00E+00	1,00E+07	0,00E+00	3,40E+08	3,69E+07	5,37E+06	4,92E+05	2,88E+06	4,88E+05

Tabela nr 42. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w trzygatunkowych biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

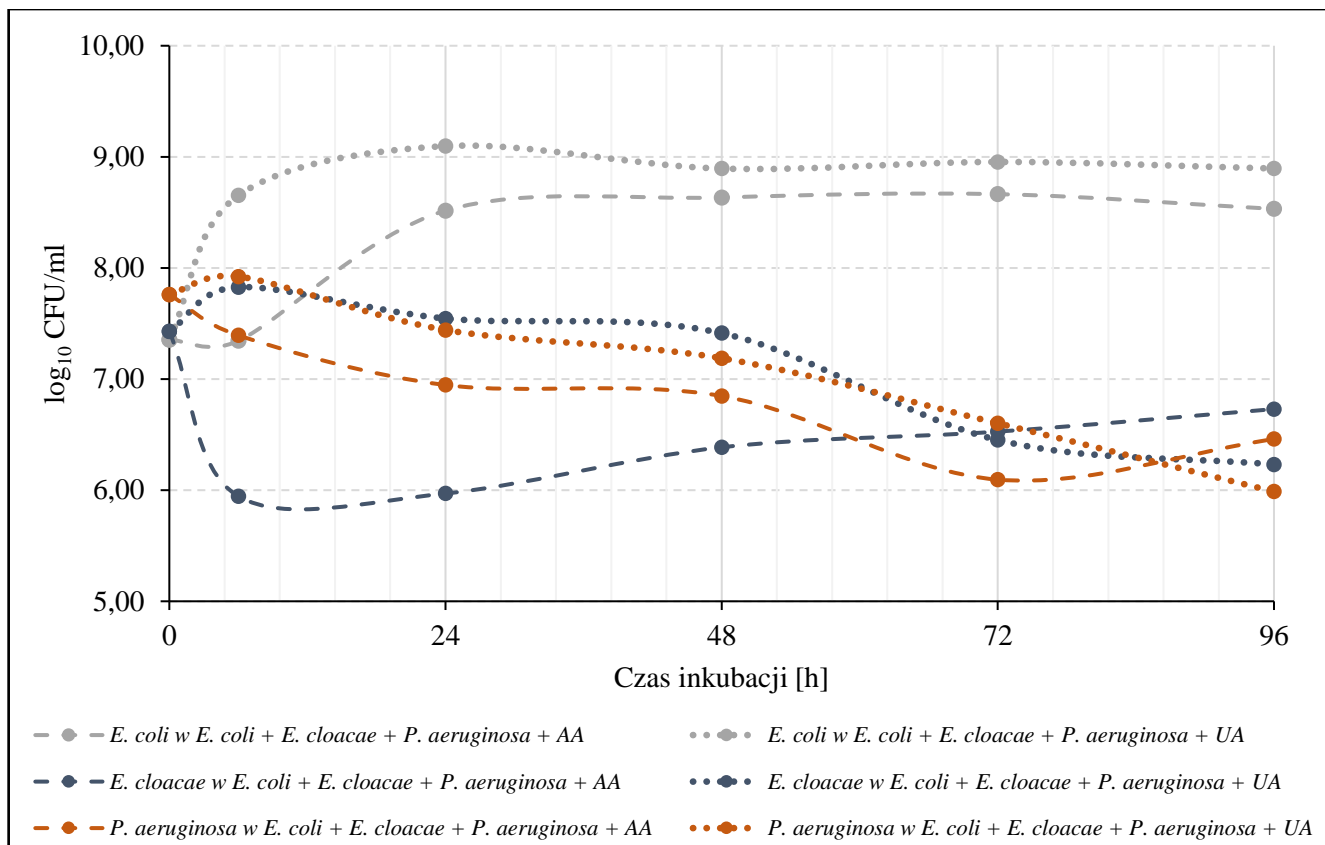
Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,27E+07	8,35E+06	2,69E+07	7,21E+06	5,77E+07	1,83E+07	2,27E+07	8,35E+06	2,69E+07	7,21E+06	5,77E+07	1,83E+07
6	3,10E+09	4,55E+08	1,63E+09	4,91E+08	7,82E+08	2,29E+08	2,21E+07	2,20E+06	8,83E+05	2,03E+05	2,48E+07	3,56E+06
24	3,45E+09	4,52E+08	8,40E+08	1,62E+08	1,51E+10	3,50E+09	3,28E+08	6,38E+07	9,33E+05	9,43E+04	8,84E+06	9,91E+05
48	6,36E+08	8,79E+07	2,51E+07	7,92E+06	1,04E+10	2,76E+09	4,31E+08	2,65E+08	2,43E+06	4,19E+05	7,04E+06	1,79E+06
72	4,92E+08	1,17E+08	4,54E+07	7,12E+06	3,76E+09	2,34E+08	4,62E+08	1,24E+08	3,37E+06	3,30E+05	1,24E+06	4,32E+05
96	3,93E+08	7,50E+07	9,60E+06	8,00E+05	3,85E+09	6,80E+08	3,40E+08	3,69E+07	5,37E+06	4,92E+05	2,88E+06	4,88E+05

Tabela nr 43. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych i trzygatunkowych biofilmach w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	1,97E+07	2,70E+06	5,19E+07	6,36E+06	2,27E+07	8,35E+06	2,69E+07	7,21E+06	5,77E+07	1,83E+07
6	4,81E+07	5,58E+06	2,37E+07	6,57E+06	5,26E+07	1,19E+07	4,49E+08	5,73E+07	6,72E+07	2,54E+07	8,38E+07	2,60E+07
24	9,58E+07	6,09E+06	7,33E+05	2,61E+05	2,62E+07	8,48E+06	1,25E+09	4,56E+08	3,51E+07	5,23E+06	2,77E+07	3,30E+06
48	7,35E+07	2,36E+07	7,56E+04	2,29E+04	8,60E+06	9,93E+05	7,84E+08	1,69E+08	2,59E+07	4,48E+06	1,54E+07	3,47E+06
72	1,49E+08	4,64E+07	2,49E+07	1,21E+07	2,85E+07	1,07E+07	9,00E+08	7,72E+07	2,83E+06	3,03E+05	4,00E+06	7,07E+05
96	1,33E+08	5,09E+07	4,20E+07	6,87E+06	2,03E+08	1,25E+07	7,86E+08	2,11E+08	1,70E+06	4,10E+05	9,71E+05	8,81E+04

Tabela nr 44. Porównanie przeżywalności szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w trzygatunkowych biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,27E+07	8,35E+06	2,69E+07	7,21E+06	5,77E+07	1,83E+07	2,27E+07	8,35E+06	2,69E+07	7,21E+06	5,77E+07	1,83E+07
6	3,10E+09	4,55E+08	1,63E+09	4,91E+08	7,82E+08	2,29E+08	4,49E+08	5,73E+07	6,72E+07	2,54E+07	8,38E+07	2,60E+07
24	3,45E+09	4,52E+08	8,40E+08	1,62E+08	1,51E+10	3,50E+09	1,25E+09	4,56E+08	3,51E+07	5,23E+06	2,77E+07	3,30E+06
48	6,36E+08	8,79E+07	2,51E+07	7,92E+06	1,04E+10	2,76E+09	7,84E+08	1,69E+08	2,59E+07	4,48E+06	1,54E+07	3,47E+06
72	4,92E+08	1,17E+08	4,54E+07	7,12E+06	3,76E+09	2,34E+08	9,00E+08	7,72E+07	2,83E+06	3,03E+05	4,00E+06	7,07E+05
96	3,93E+08	7,50E+07	9,60E+06	8,00E+05	3,85E+09	6,80E+08	7,86E+08	2,11E+08	1,70E+06	4,10E+05	9,71E+05	8,81E+04



Wykres nr 10. Przeżywalność szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) w obecności AA (linie przerywane) i UA (linie kropkowane).

Porównując efektywność działania AA i UA na **ilość tworzonego biofilmu** w konsorcjach trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* (Tabele nr 45-49, Wykres nr 11) można stwierdzić, że największe spadki ilości wytworzonej masy biofilmowej pod wpływem AA ($p \leq 0,05$), skutkujące utratą zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) miały miejsce po 24 i 96 h inkubacji i wynosiły 71%. Natomiast pod wpływem UA, największa redukcja ilości biomasy (o 61%) miała miejsce po 72 h inkubacji, ale połączoną z utratą zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) odnotowano jedynie po 6 h inkubacji ($p \leq 0,05$). Najsłabsze działanie obydwu kwasów obserwowano w hodowlach 48-godzinnych.

Reasumując:

- W biofilmach trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA oraz *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA, AA powodował większą redukcję ilości wytworzonej masy biofilmowej niż UA, zatem wykazał silniejsze działanie antybiofilmowe w porównaniu z UA.

Tabela nr 45. Porównanie ilości tworzego biofilmu w jednogatunkowych (*E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,406	0,053	0,395	0,060	0,316	0,044	0,395	0,060	0,370	0,066	0,395	0,060
24	0,365	0,049	0,509	0,042	0,574	0,065	0,509	0,042	0,825	0,081	0,509	0,042
48	0,261	0,042	0,406	0,035	0,329	0,057	0,406	0,035	0,836	0,057	0,406	0,035
72	0,291	0,042	0,615	0,080	0,281	0,075	0,615	0,080	0,826	0,072	0,615	0,080
96	0,339	0,070	0,775	0,094	0,307	0,049	0,775	0,094	0,802	0,056	0,775	0,094

Tabela nr 46. Porównanie ilości tworzego biofilmu w jednogatunkowych (*E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,183	0,045	0,171	0,050	0,195	0,056	0,171	0,050	0,174	0,043	0,171	0,050
24	0,146	0,029	0,146	0,037	0,145	0,029	0,146	0,037	0,132	0,022	0,146	0,037
48	0,195	0,046	0,209	0,032	0,199	0,056	0,209	0,032	0,177	0,043	0,209	0,032
72	0,198	0,043	0,260	0,043	0,215	0,057	0,260	0,043	0,175	0,049	0,260	0,043
96	0,203	0,043	0,224	0,027	0,174	0,033	0,224	0,027	0,150	0,019	0,224	0,027

Tabela nr 47. Porównanie ilości tworzego biofilmu w trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

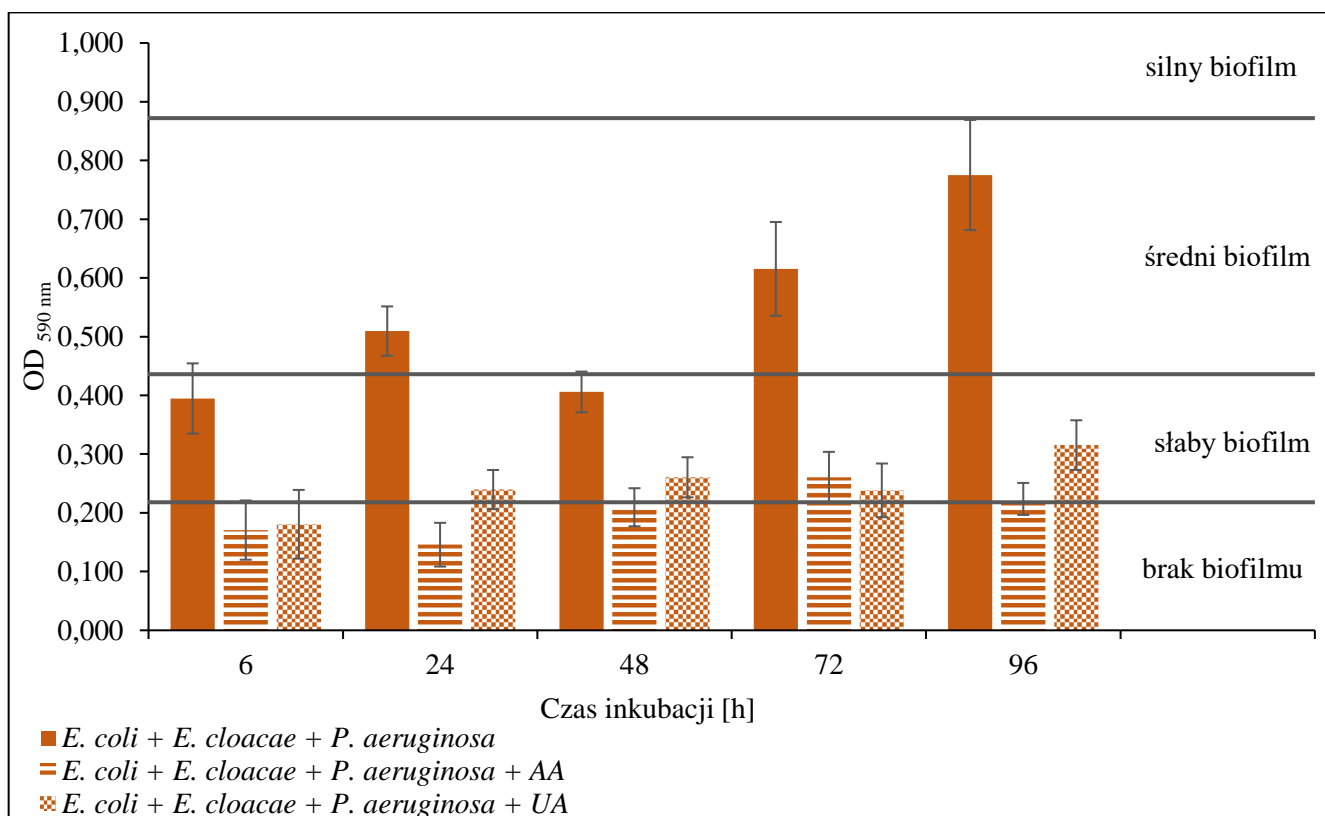
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,395	0,060	0,171	0,050
24	0,509	0,042	0,146	0,037
48	0,406	0,035	0,209	0,032
72	0,615	0,080	0,260	0,043
96	0,775	0,094	0,224	0,027

Tabela nr 48. Porównanie ilości tworzego biofilmu w jednogatunkowych (*E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,197	0,055	0,181	0,059	0,198	0,051	0,181	0,059	0,179	0,044	0,181	0,059
24	0,235	0,030	0,240	0,033	0,257	0,035	0,240	0,033	0,227	0,044	0,240	0,033
48	0,242	0,030	0,260	0,034	0,255	0,040	0,260	0,034	0,217	0,033	0,260	0,034
72	0,211	0,037	0,238	0,046	0,273	0,045	0,238	0,046	0,199	0,050	0,238	0,046
96	0,297	0,041	0,315	0,042	0,426	0,087	0,315	0,042	0,426	0,064	0,315	0,042

Tabela nr 49. Porównanie ilości tworzonych biofilmów w trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,395	0,060	0,181	0,059
24	0,509	0,042	0,240	0,033
48	0,406	0,035	0,260	0,034
72	0,615	0,080	0,238	0,046
96	0,775	0,094	0,315	0,042



Wykres nr 11. Ilości tworzonych biofilmów w trzygatunkowych biofilmach *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami przerywanymi) i UA (słupki kropkowane).

Porównując efektywność działania AA i UA na **aktywność metaboliczną** bakterii żyjących w biofilmach trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* (Tabele nr 50-54, Wykres nr 12) można stwierdzić, że pod wpływem AA największą redukcję aktywności metabolicznej (o 10%) odnotowano w 6-godzinnej hodowli *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA. Natomiast pod wpływem UA, największą redukcję aktywności metabolicznej (o 18%) w konsorcjach *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA odnotowano po 24 h inkubacji.

Reasumując:

- W biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA oraz *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA, UA powodował większą redukcję aktywności metabolicznej niż AA.

Tabela nr 50. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,222	0,024	0,217	0,022	0,251	0,021	0,217	0,022	0,194	0,029	0,217	0,022
24	0,300	0,024	0,235	0,013	0,376	0,021	0,235	0,013	0,291	0,017	0,235	0,013
48	0,256	0,038	0,223	0,026	0,306	0,051	0,223	0,026	0,232	0,026	0,223	0,026
72	0,261	0,030	0,219	0,016	0,263	0,035	0,219	0,016	0,216	0,014	0,219	0,016
96	0,333	0,060	0,250	0,032	0,307	0,039	0,250	0,032	0,256	0,033	0,250	0,032

Tabela nr 51. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,215	0,017	0,196	0,012	0,227	0,025	0,196	0,012	0,195	0,018	0,196	0,012
24	0,269	0,020	0,307	0,029	0,293	0,017	0,307	0,029	0,252	0,016	0,307	0,029
48	0,210	0,026	0,253	0,038	0,221	0,015	0,253	0,038	0,187	0,028	0,253	0,038
72	0,219	0,020	0,212	0,027	0,229	0,013	0,212	0,027	0,193	0,026	0,212	0,027
96	0,263	0,033	0,324	0,039	0,291	0,034	0,324	0,039	0,243	0,027	0,324	0,039

Tabela nr 52. Porównanie aktywności metabolicznej w trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

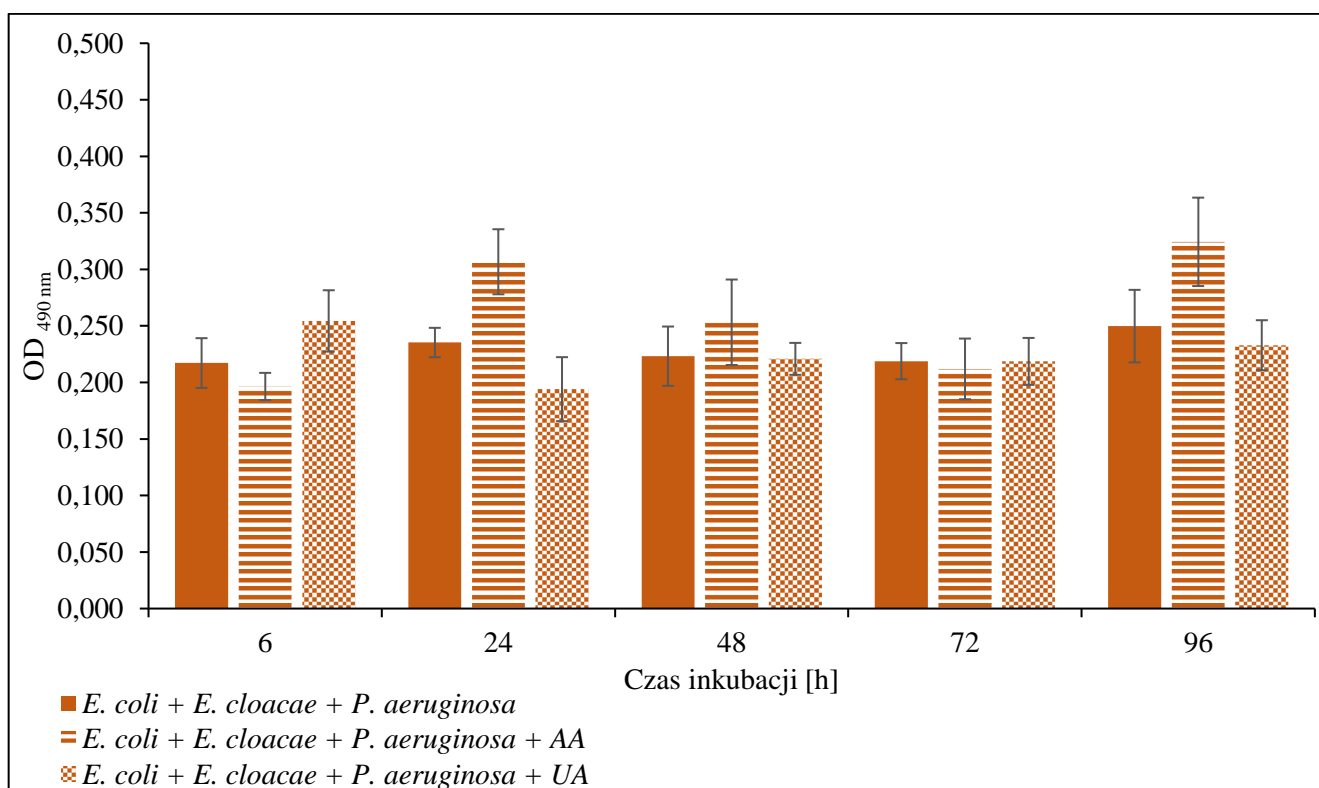
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,217	0,022	0,196	0,012
24	0,235	0,013	0,307	0,029
48	0,223	0,026	0,253	0,038
72	0,219	0,016	0,212	0,027
96	0,250	0,032	0,324	0,039

Tabela nr 53. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (*E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) hodowlach biofilmowych w obecności UA.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,258	0,017	0,254	0,027	0,276	0,020	0,254	0,027	0,238	0,024	0,254	0,027
24	0,215	0,011	0,194	0,028	0,224	0,014	0,194	0,028	0,198	0,011	0,194	0,028
48	0,213	0,020	0,221	0,014	0,226	0,025	0,221	0,014	0,207	0,024	0,221	0,014
72	0,214	0,028	0,219	0,021	0,241	0,019	0,219	0,021	0,203	0,022	0,219	0,021
96	0,220	0,032	0,233	0,022	0,272	0,038	0,233	0,022	0,225	0,033	0,233	0,022

Tabela nr 54. Porównanie aktywności metabolicznej w trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,217	0,022	0,254	0,027
24	0,235	0,013	0,194	0,028
48	0,223	0,026	0,221	0,014
72	0,219	0,016	0,219	0,021
96	0,250	0,032	0,233	0,022



Wykres nr 12. Aktywność metaboliczna w trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* biofilmach kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).

Podsumowanie:

a) W biofilmie trzygatunkowym *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*, na wszystkich etapach tworzenia biofilmu, obecność szczepów *E. cloacae* i *P. aeruginosa* zmniejszała liczbę komórek *E. coli*, a obecność szczepów *E. coli* i *P. aeruginosa* zmniejszała liczbę komórek *E. cloacae*. Natomiast obecność szczepów *E. coli* i *E. cloacae* zmniejszała liczbę komórek *P. aeruginosa* tylko na trzech etapach tworzenia biofilmu. Z powyższego wynika, że w biofilmie trzygatunkowym wystąpiło największe zahamowanie wzrostu *E. coli* i *E. cloacae*, natomiast szczep *P. aeruginosa* wydaje się być bardziej odporny na oddziaływania antagonistyczne. Obserwacje te w połączeniu z wcześniejszymi dotyczącymi biofilmów dwugatunkowych mogą wskazywać, że najsilniejsze oddziaływania antagonistyczne wobec przeżywalności konkurencyjnych szczepów wywiera *P. aeruginosa*, a najsłabsze – *E. cloacae*.

b) Jednoczesna obecność *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* skutkowałą zwiększeniem ilości wytworzonej masy biofilmowej w odniesieniu do jednogatunkowych biofilmów *E. coli* i *E. cloacae*, a zmniejszeniem w odniesieniu do monokultury *P. aeruginosa*. Z kolei aktywność metaboliczna uległa zmniejszeniu w porównaniu ze wszystkimi biofilmami jednogatunkowymi. Wyniki te dowodzą przede wszystkim antagonistycznego działania *E. coli* i *E. cloacae*, ponieważ obecność tych szczepów zahamowała tworzenie biomasy przez *P. aeruginosa*.

Zmiany w biofilmach trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* pod wpływem AA:

a) zanik antagonistycznego oddziaływania *E. cloacae* i /lub *P. aeruginosa* wobec liczebności *E. coli* oraz *E. coli* i/lub *P. aeruginosa* wobec liczebności *E. cloacae*, przy braku wpływu AA na antagonistyczne oddziaływania *E. coli* i/lub *E. cloacae* wobec liczebności *P. aeruginosa*;

b) zmniejszenie liczby komórek bakterii, największa redukcja liczebności dotyczyła *P. aeruginosa*, najmniejsza – *E. coli*, spadki przeżywalności *E. coli* i *E. cloacae* były niższe, a *P. aeruginosa* wyższe niż w monokulturach;

c) zmniejszenie ilości wytworzonej masy biofilmowej i utrata zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) na większości etapów jego tworzenia, redukcja biomasy była niższa niż w monokulturach *E. cloacae* i *P. aeruginosa*, a wyższa niż w *E. coli*;

d) zwiększenie aktywności metabolicznej na większości etapów tworzenia biofilmów, spadki aktywności były nieistotne statystycznie i niższe niż we wszystkich monokulturach.

Zmiany w biofilmach trzygatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* pod wpływem UA:

a) zanik lub osłabienie antagonistycznego oddziaływania *E. cloacae* i /lub *P. aeruginosa* wobec liczebności *E. coli*, przy braku wpływu UA na antagonistyczne oddziaływania *E. coli* i/lub *P. aeruginosa* wobec liczebności *E. cloacae* oraz *E. coli* i/lub *E. cloacae* wobec liczebności *P. aeruginosa* w końcowych etapach wzrostu biofilmu;

b) zmniejszenie liczby komórek bakterii na większości etapów tworzenia biofilmów, największa redukcja liczebności dotyczyła *P. aeruginosa*, najmniejsza – *E. coli*, spadki przeżywalności *E. coli* i *E. cloacae* były niższe, a *P. aeruginosa* wyższe niż w monokulturach;

- c) zmniejszenie ilości wytworzonej masy biofilmowej, utrata zdolności do produkcji biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) tylko na pierwszym etapie jego tworzenia, redukcja biomasy była niższa niż w monokulturze *P. aeruginosa*, a wyższa niż w *E. cloacae* i *E. coli*;
- d) zmniejszenie aktywności metabolicznej na większości etapów tworzenia biofilmów, spadki aktywności były nieistotne statystycznie i niższe niż we wszystkich monokulturach.

8. ANALIZA PORÓWNAWCZA i PODSUMOWANIE WYNIKÓW

8.1. Porównanie wartości MIC oraz MBC wyznaczonych dla AA i UA

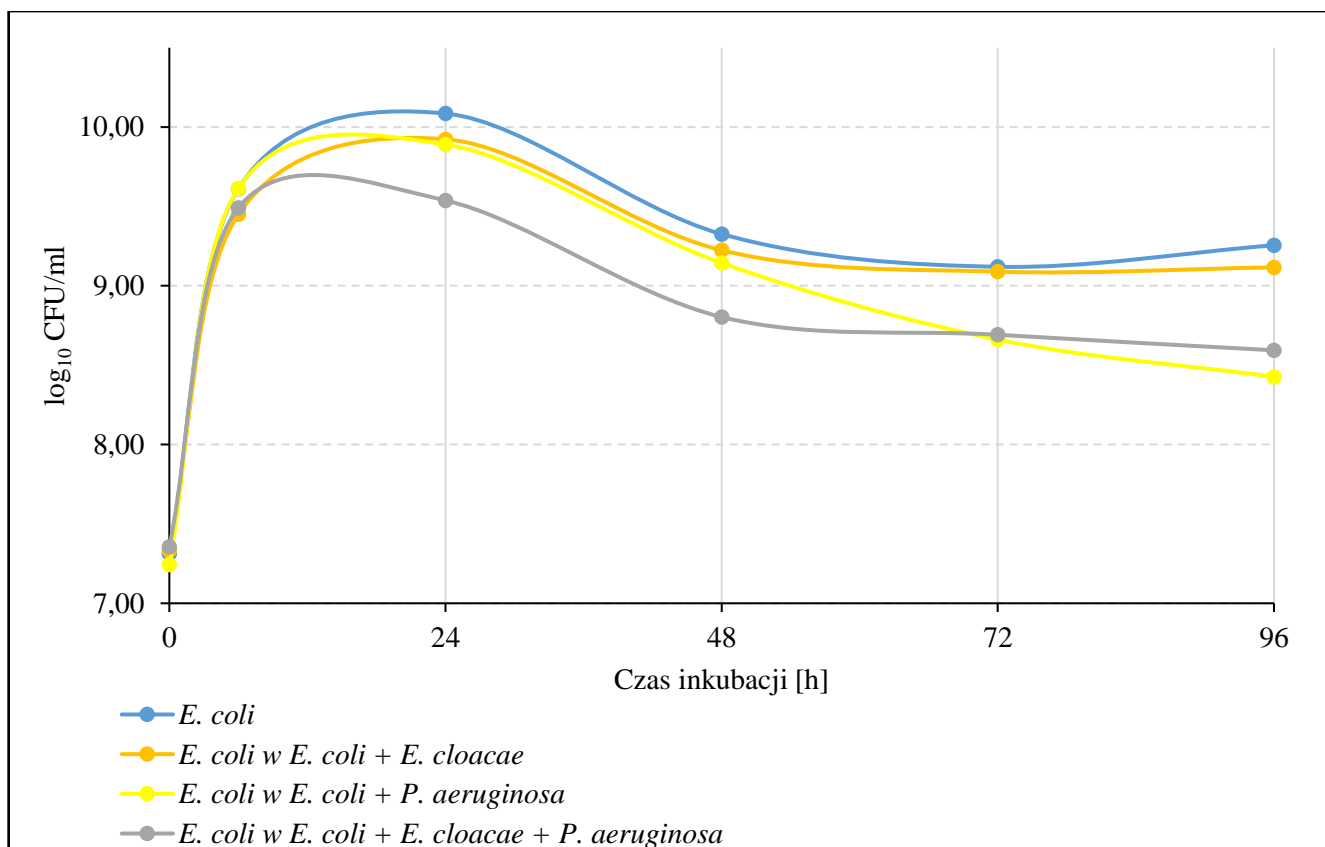
Wartości MIC oraz MBC dla AA i UA wobec badanych szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* oznaczono wg metody mikrorozcieńczeń przedstawionej w podrozdziale 5.2.1. Wartości MIC i MBC AA w stosunku do Gram-ujemnych szczepów referencyjnych wynosiły odpowiednio: 1536 i 2048 µg/ml dla *E. coli* CFT073 i *P. aeruginosa* ATCC25000 oraz 1024 i 1536 µg/ml dla *E. cloacae* ATCC-BAA2468. Natomiast wartości MIC i MBC UA były dla wszystkich badanych szczepów jednakowe i wynosiły odpowiednio 1536 i 2048 µg/ml.

8.2. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalność *E. coli* w biofilmach

Z danych zawartych w Tabeli nr 55 i na Wykresie nr 13 wynika, że w porównaniu do wzrostu *E. coli* zarówno w biofilmie jednogatunkowym, jak i dwugatunkowym tworzonym wspólnie z *E. cloacae* ($p \leq 0,05$), jednoczesna obecność *E. cloacae* i *P. aeruginosa* w biofilmie trzygatunkowym istotnie ograniczała liczebność *E. coli* na wszystkich etapach jego tworzenia. Natomiast ograniczoną przeżywalność *E. coli* w biofilmie trzygatunkowym w porównaniu do jej wzrostu w biofilmie dwugatunkowym tworzonym wspólnie z *P. aeruginosa* odnotowano jedynie po 24 i 48 h ($p \leq 0,05$).

Tabela nr 55. Porównanie przeżywalności *E. coli* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	2,15E+07	5,18E+06	1,76E+07	2,07E+06	2,27E+07	8,35E+06
6	4,09E+09	6,68E+08	2,82E+09	6,76E+08	4,10E+09	8,41E+08	3,10E+09	4,55E+08
24	1,22E+10	3,08E+09	8,39E+09	7,42E+08	7,77E+09	1,87E+09	3,45E+09	4,52E+08
48	2,12E+09	4,55E+08	1,68E+09	3,26E+08	1,39E+09	4,44E+08	6,36E+08	8,79E+07
72	1,32E+09	3,63E+08	1,23E+09	2,69E+08	4,58E+08	7,38E+07	4,92E+08	1,17E+08
96	1,80E+09	4,53E+08	1,31E+09	2,56E+08	2,67E+08	5,73E+07	3,93E+08	7,50E+07

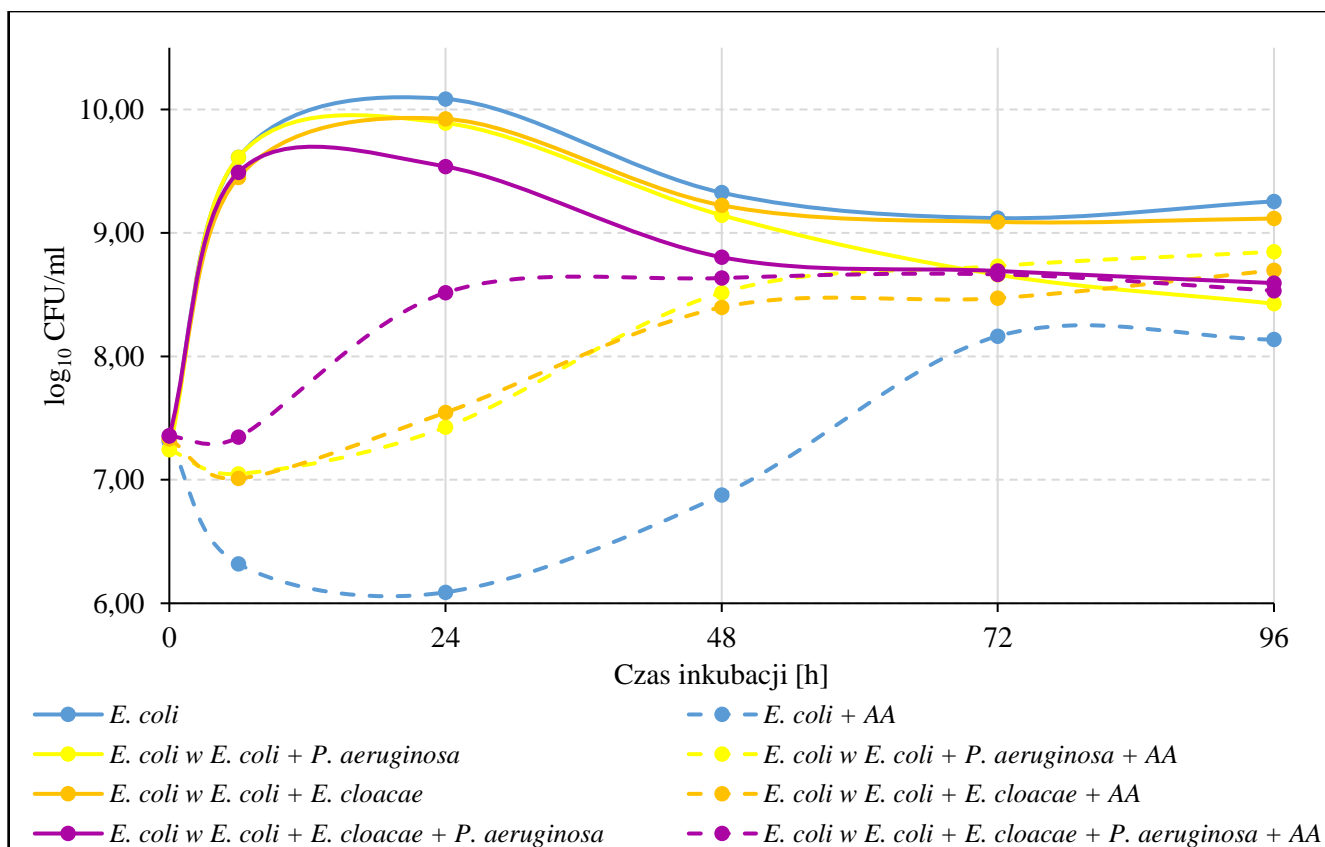


Wykres nr 13. Porównanie przeżywalności *E. coli* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Analiza porównawcza liczby żywych komórek *E. coli* (Tabela nr 56 i Wykres nr 14) w biofilmie jednogatunkowym tworzonym w obecności AA z przeżywalnością tych bakterii w biofilmach dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + AA i *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA) i trzygatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA) wykazała, że AA działa najefektywniej na *E. coli* żyjące w biofilmie jednogatunkowym niezależnie od etapu jego rozwoju ($p \leq 0,05$). Natomiast pałeczki *E. coli* wykazały najmniejszą wrażliwość na działanie AA żyjąc w konsorcjum trzygatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA) w hodowlach 6-, 24-, i 48-godzinnych.

Tabela nr 56. Porównanie wpływu AA na przeżywalność *E. coli* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	2,15E+07	5,18E+06	1,76E+07	2,07E+06	2,27E+07	8,35E+06
6	2,08E+06	6,39E+05	1,03E+07	1,09E+06	1,12E+07	4,01E+06	2,21E+07	2,20E+06
24	1,23E+06	2,65E+05	3,51E+07	1,11E+07	2,67E+07	7,69E+06	3,28E+08	6,38E+07
48	7,54E+06	2,91E+06	2,50E+08	7,73E+07	3,28E+08	6,38E+07	4,31E+08	2,65E+08
72	1,46E+08	2,63E+07	2,97E+08	8,74E+07	5,39E+08	9,79E+07	4,62E+08	1,24E+08
96	1,37E+08	1,35E+07	4,98E+08	1,08E+08	7,03E+08	2,09E+08	3,40E+08	3,69E+07

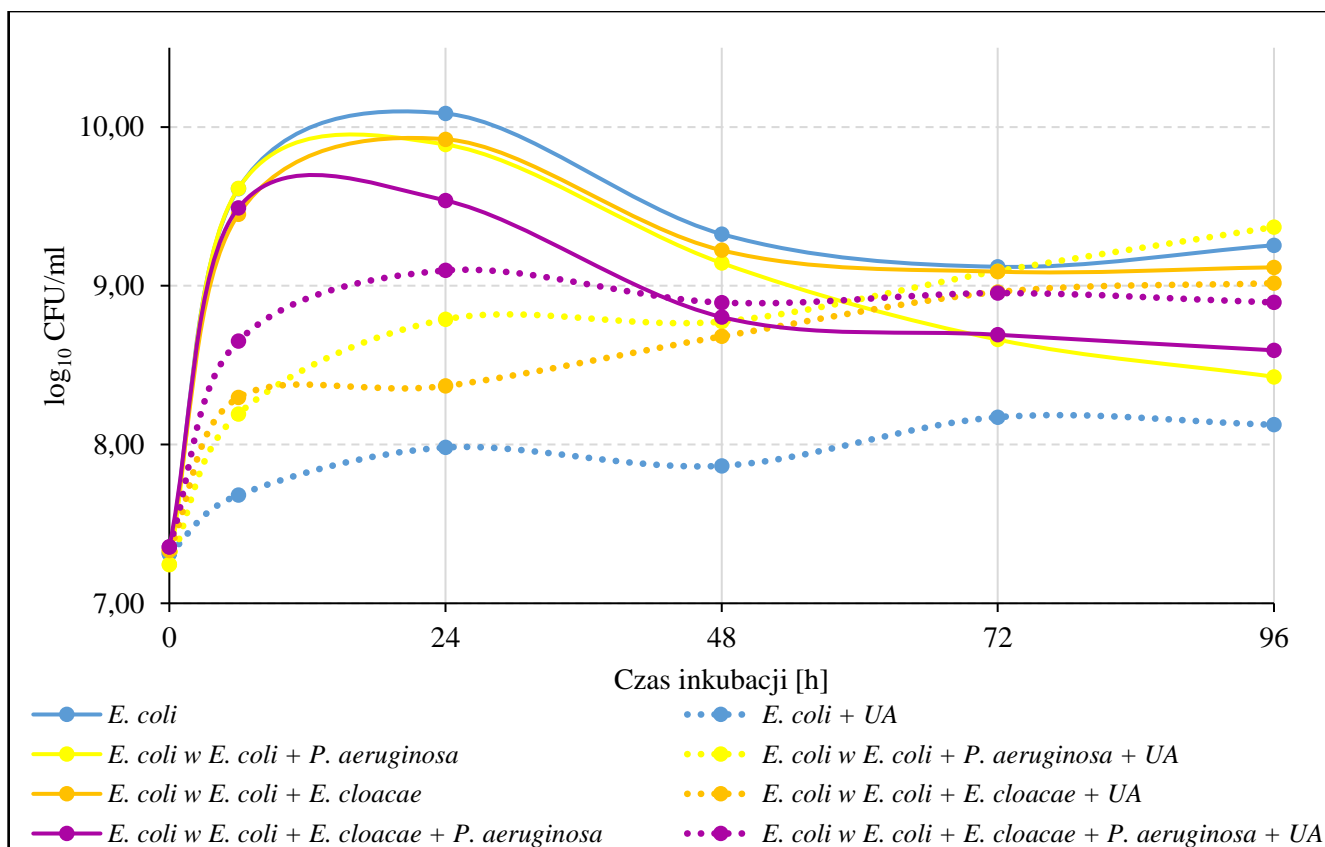


Wykres nr 14. Porównanie wpływu AA na przeżywalność bakterii *E. coli* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Analiza porównawcza liczby żywych komórek *E. coli* (Tabela nr 57 i Wykres nr 15) w biofilmie jednogatunkowym tworzonym w obecności UA z przeżywalnością tych bakterii w biofilmach dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + UA i *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA) i trzygatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA) wykazała, że UA działa najefektywniej na *E. coli* żyjące w biofilmie jednogatunkowym niezależnie od etapu jego rozwoju ($p \leq 0,05$). Natomiast pałeczki *E. coli* wykazały najmniejszą wrażliwość na działanie UA żyjąc w konsorcjum trzygatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA) w hodowlach 6- i 24- godzinnych.

Tabela nr 57. Porównanie wpływu UA na przeżywalność *E. coli* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. coli</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. coli</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	2,05E+07	4,00E+06	2,15E+07	5,18E+06	1,76E+07	2,07E+06	2,27E+07	8,35E+06
6	4,81E+07	5,58E+06	1,98E+08	2,24E+07	1,56E+08	5,65E+07	4,49E+08	5,73E+07
24	9,58E+07	6,09E+06	2,34E+08	3,82E+07	6,15E+08	2,02E+08	1,25E+09	4,56E+08
48	7,35E+07	2,36E+07	4,80E+08	7,30E+07	5,95E+08	1,39E+08	7,84E+08	1,69E+08
72	1,49E+08	4,64E+07	9,14E+08	1,14E+08	1,24E+09	4,68E+08	9,00E+08	7,72E+07
96	1,33E+08	5,09E+07	1,04E+09	2,60E+08	2,35E+09	5,90E+08	7,86E+08	2,11E+08



Wykres nr 15. Porównanie wpływu UA na przeżywalność *E. coli* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Wyniki powyższych analiz porównawczych jednoznacznie wskazują na silniejsze działanie bójcze AA. Również porównując najwyższą zauważoną efektywność antybakteryjnego działania AA i UA ($p \leq 0,05$), wyrażoną największą redukcją liczby żywych komórek *E. coli* rosnącej w jedno-, dwu- i trzygatunkowych biofilmach (Tabela nr 58 a, b oraz Wykres nr 16) odnotowano, że silniejsze działanie bójcze wykazał AA, który w każdym z badanych biofilmów powodował ok. 2-krotnie większą redukcję liczby żywych komórek w porównaniu z UA. Obydwa kwasy najbardziej zmniejszyły liczebność *E. coli* w monokulturach, następnie w biofilmach dwugatunkowych, a najslabiej w trzygatunkowym. Spośród szczepów rosnących w biofilmie jednogatunkowym, *E. coli* była mniej wrażliwa na AA niż *E. cloacae*, ale bardziej niż *P. aeruginosa*, a także była najmniej wrażliwa na UA. W biofilmach dwugatunkowych była mniej wrażliwa na obydwa kwasy niż rosnące z nią szczepy *E. cloacae* oraz *P. aeruginosa*. W biofilmie dwugatunkowym tworzonym wspólnie z *E. cloacae* była mniej wrażliwa na AA (oraz bardziej wrażliwa na UA) niż rosnąc w konsorcjum z *P. aeruginosa*. Natomiast w biofilmie trzygatunkowym była najmniej spośród badanych szczepów wrażliwa na obydwa kwasy.

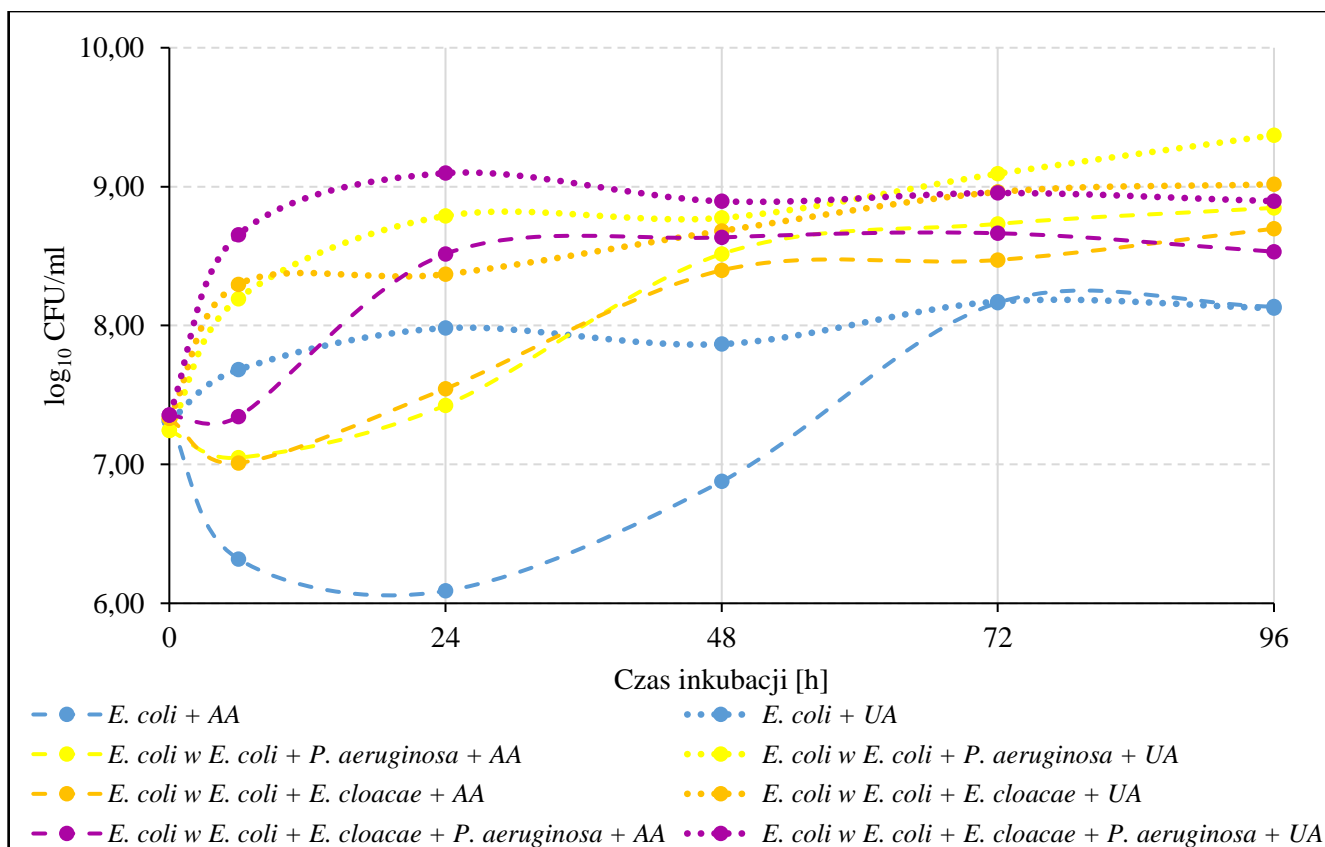
Tabela nr 58. Największa redukcja liczby żywych komórek *E. coli* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych (a) w obecności AA, (b) w obecności UA.

a)

Największa redukcja liczby żywych komórek	AA
<i>E. cloacae</i>	8,6 \log_{10} po 96 h
<i>E. cloacae</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	5,4 \log_{10} po 24 h
<i>E. coli</i>	4 \log_{10} po 24 h
<i>P. aeruginosa</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3,5 \log_{10} po 72 h
<i>E. cloacae</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3,3 \log_{10} po 6 h
<i>P. aeruginosa</i> w <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3,2 \log_{10} po 48 i 72 h
<i>P. aeruginosa</i>	3,2 \log_{10} po 72 h
<i>E. coli</i> w <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	2,6 \log_{10} po 6 h
<i>E. coli</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	2,4 \log_{10} po 6 i 24 h
<i>E. coli</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	2,15 \log_{10} po 6 h

b)

Największa redukcja liczby żywych komórek	UA
<i>E. cloacae</i>	5 \log_{10} po 48 h
<i>P. aeruginosa</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3,6 \log_{10} po 96 h
<i>P. aeruginosa</i> w <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	3 \log_{10} po 48 h
<i>P. aeruginosa</i>	2,9 \log_{10} po 24 h
<i>E. cloacae</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	2,5 \log_{10} po 24 h
<i>E. coli</i>	2,1 \log_{10} po 24 h
<i>E. coli</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	1,55 \log_{10} po 24 h
<i>E. coli</i> w <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	1,4 \log_{10} po 6 h
<i>E. cloacae</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	1,4 \log_{10} po 6 i 24 h
<i>E. coli</i> w <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	0,8 \log_{10} po 6 h



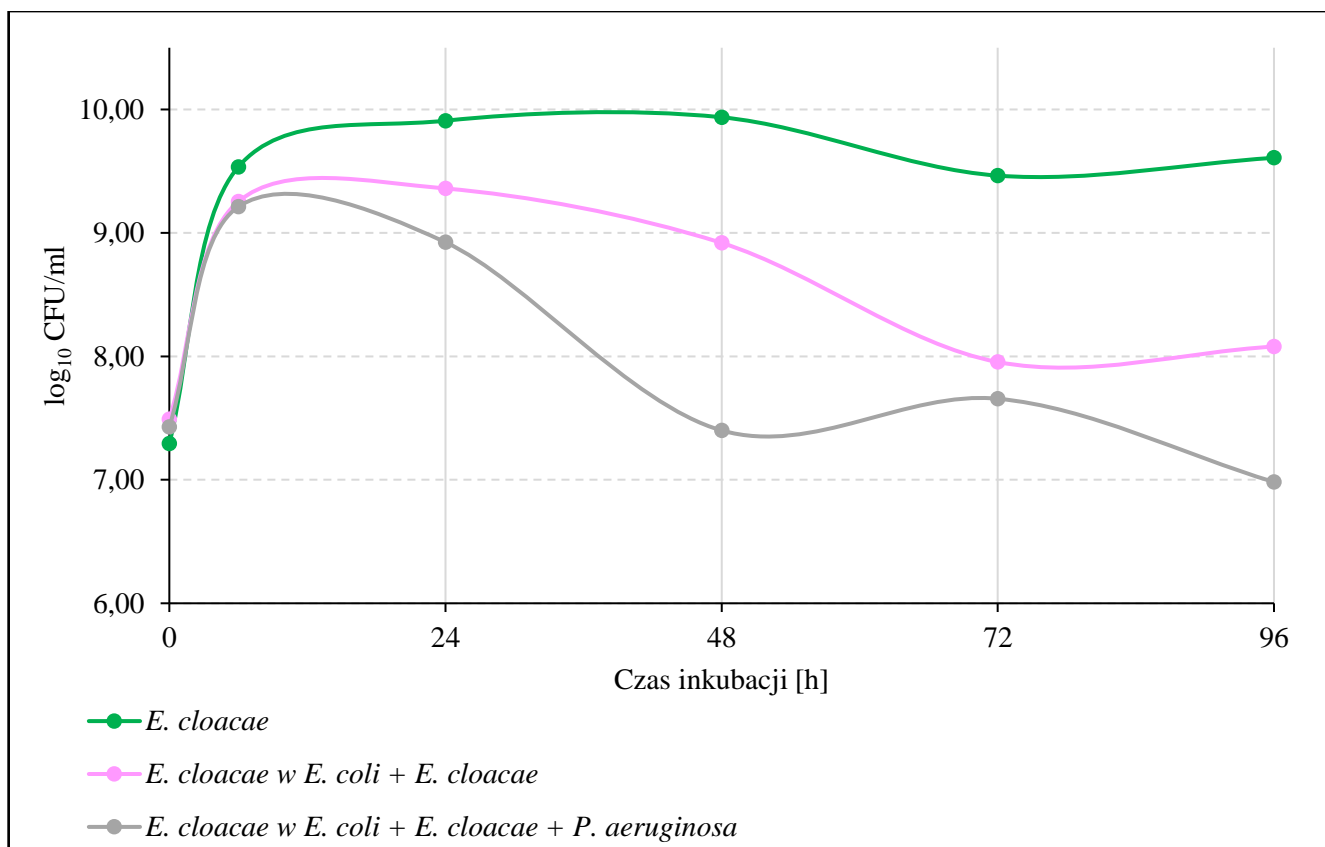
Wykres nr 16. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalność *E. coli* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

8.3. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalność *E. cloacae* w biofilmach

Z danych zawartych w Tabeli nr 59 i na Wykresie nr 17 wynika, że wzrost pałeczek *E. cloacae* w biofilmie trzygatunkowym (*E. cloacae* + *E. coli* + *P. aeruginosa*) na wszystkich etapach jego rozwoju był słabszy w porównaniu do wzrostu tych pałeczek zarówno w biofilmie jednogatunkowym ($p \leq 0,05$) jak i dwugatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae*).

Tabela nr 59. Porównanie przeżywalności *E. cloacae* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	1,97E+07	2,70E+06	3,10E+07	1,02E+07	2,69E+07	7,21E+06
6	3,43E+09	9,90E+08	1,80E+09	3,30E+08	1,63E+09	4,91E+08
24	8,11E+09	1,27E+09	2,29E+09	5,20E+08	8,40E+08	1,62E+08
48	8,65E+09	1,78E+09	8,30E+08	1,06E+08	2,51E+07	7,92E+06
72	2,91E+09	7,37E+08	9,00E+07	1,24E+07	4,54E+07	7,12E+06
96	4,06E+09	4,53E+08	1,20E+08	3,71E+07	9,60E+06	8,00E+05

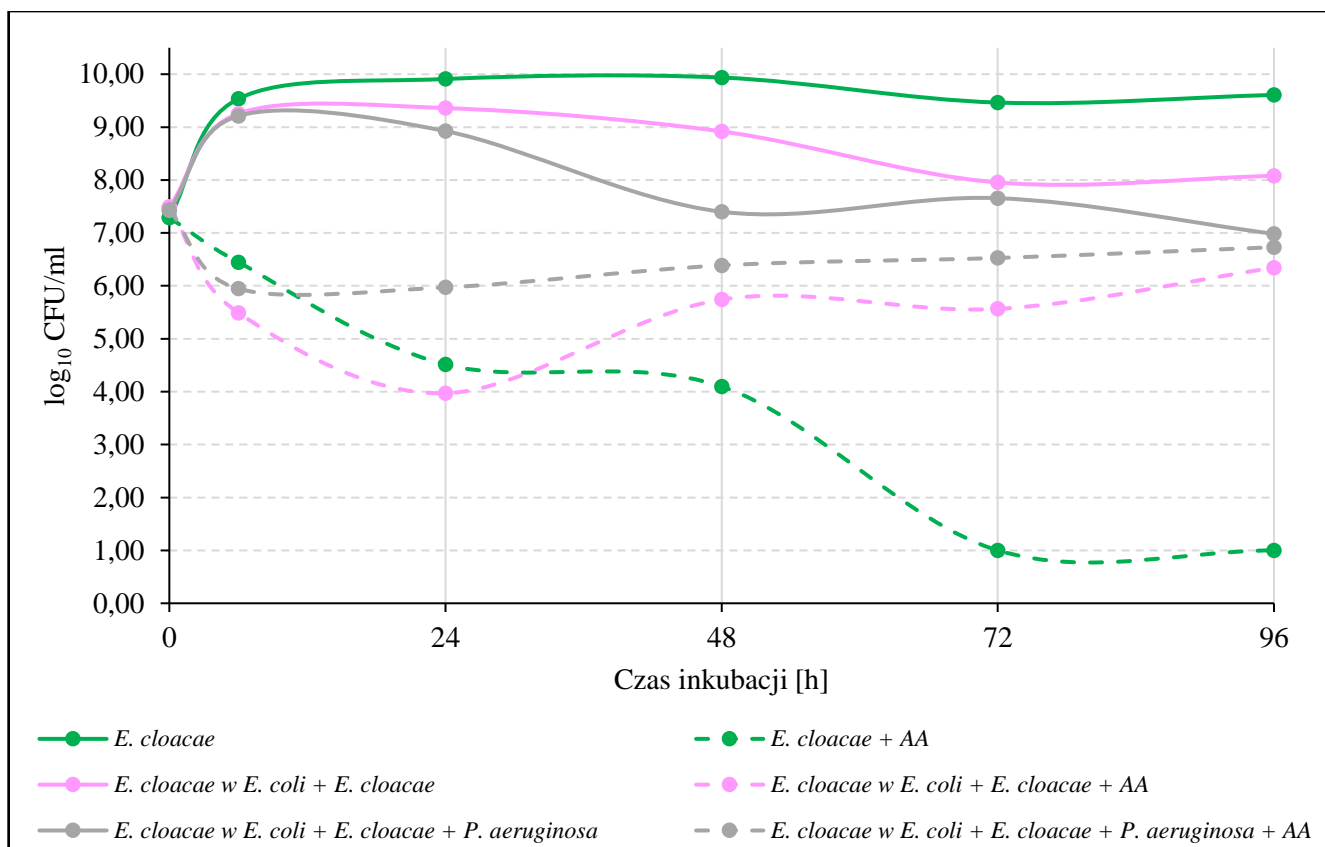


Wykres nr 17. Porównanie przeżywalności *E. cloacae* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Analiza porównawcza działania AA na przeżywalność pałeczek *E. cloacae* (Tabela nr 60 i Wykres nr 18) w biofilmach dwu- (*E. cloacae* + *E. coli* + AA) i trzygatunkowych (*E. cloacae* + *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA) w porównaniu z jego działaniem na te pałeczki rosnące w monokulturze pozwala stwierdzić, że AA działa najefektywniej na *E. cloacae* żyjące w 72- i 96-godzinnym biofilmie jednogatunkowym ($p \leq 0,05$), a najslabiej na *E. cloacae* żyjące w biofilmie trzygatunkowym.

Tabela nr 60. Porównanie wpływu AA na przeżywalności *E. cloacae* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	1,97E+07	2,70E+06	3,10E+07	1,02E+07	2,69E+07	7,21E+06
6	2,80E+06	2,83E+05	3,10E+05	2,16E+04	8,83E+05	2,03E+05
24	3,26E+04	6,59E+03	9,33E+03	9,43E+02	9,33E+05	9,43E+04
48	1,25E+04	2,69E+03	5,50E+05	7,64E+04	2,43E+06	4,19E+05
72	1,00E+01	0,00E+00	3,67E+05	4,71E+04	3,37E+06	3,30E+05
96	1,00E+01	0,00E+00	2,20E+06	3,65E+05	5,37E+06	4,92E+05

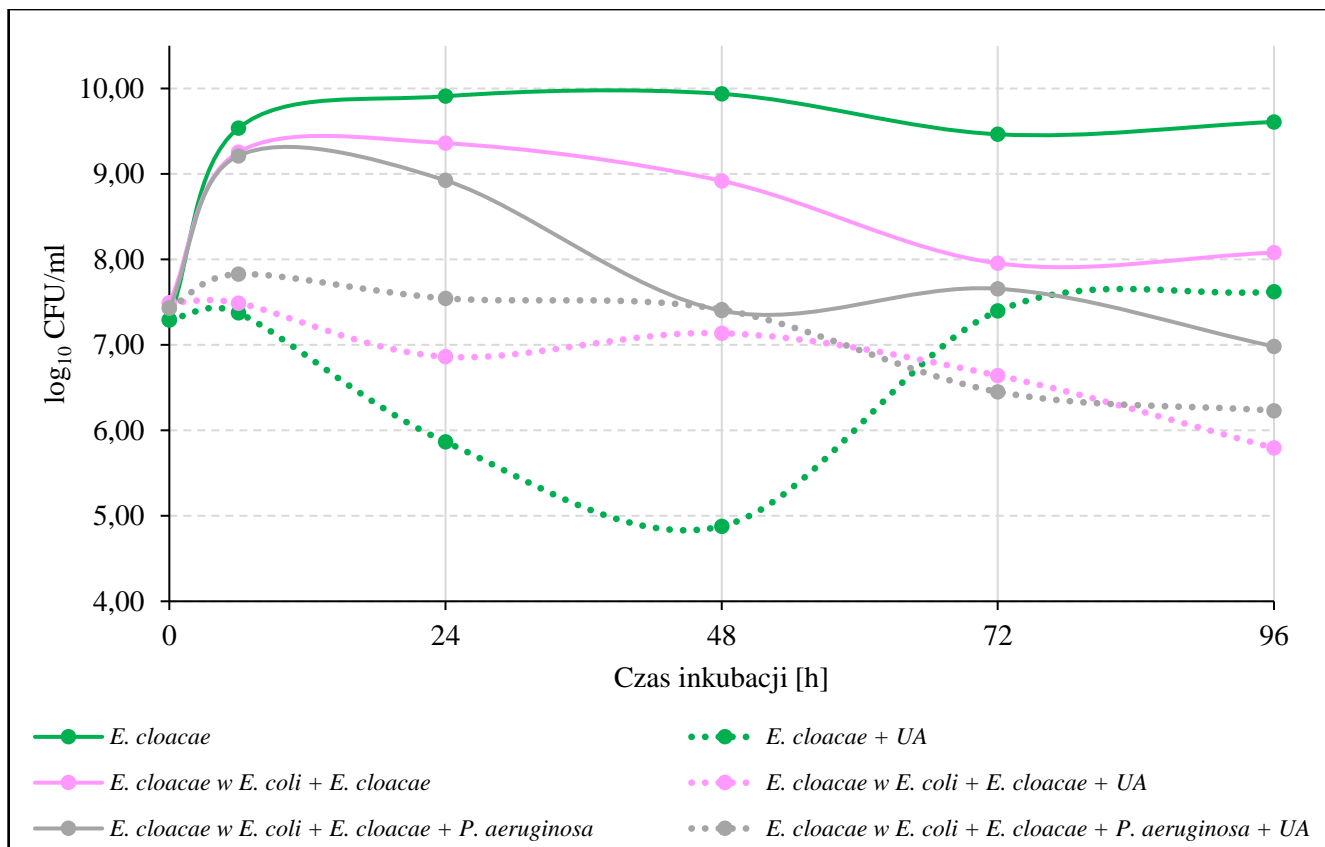


Wykres nr 18. Porównanie wpływu AA na przeżywalności *E. cloacae* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Analiza porównawcza działania UA na przeżywalność pałeczek *E. cloacae* (Tabela nr 61 i Wykres nr 19) w biofilmach dwu- (*E. cloacae* + *E. coli* + UA) i trzygatunkowych (*E. cloacae* + *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA) w porównaniu z jego działaniem na te pałeczki rosnące w monokulturze pozwala stwierdzić, że UA działa najefektywniej na *E. cloacae* żyjące w 6-, 24- i 48-godzinny biofilmie jednogatunkowym ($p \leq 0,05$), a najslabiej na *E. cloacae* żyjące w 72- i 96-godzinnej monokulturze, jak i w 6-, 24- i 48- godzinny biofilmie trzygatunkowym.

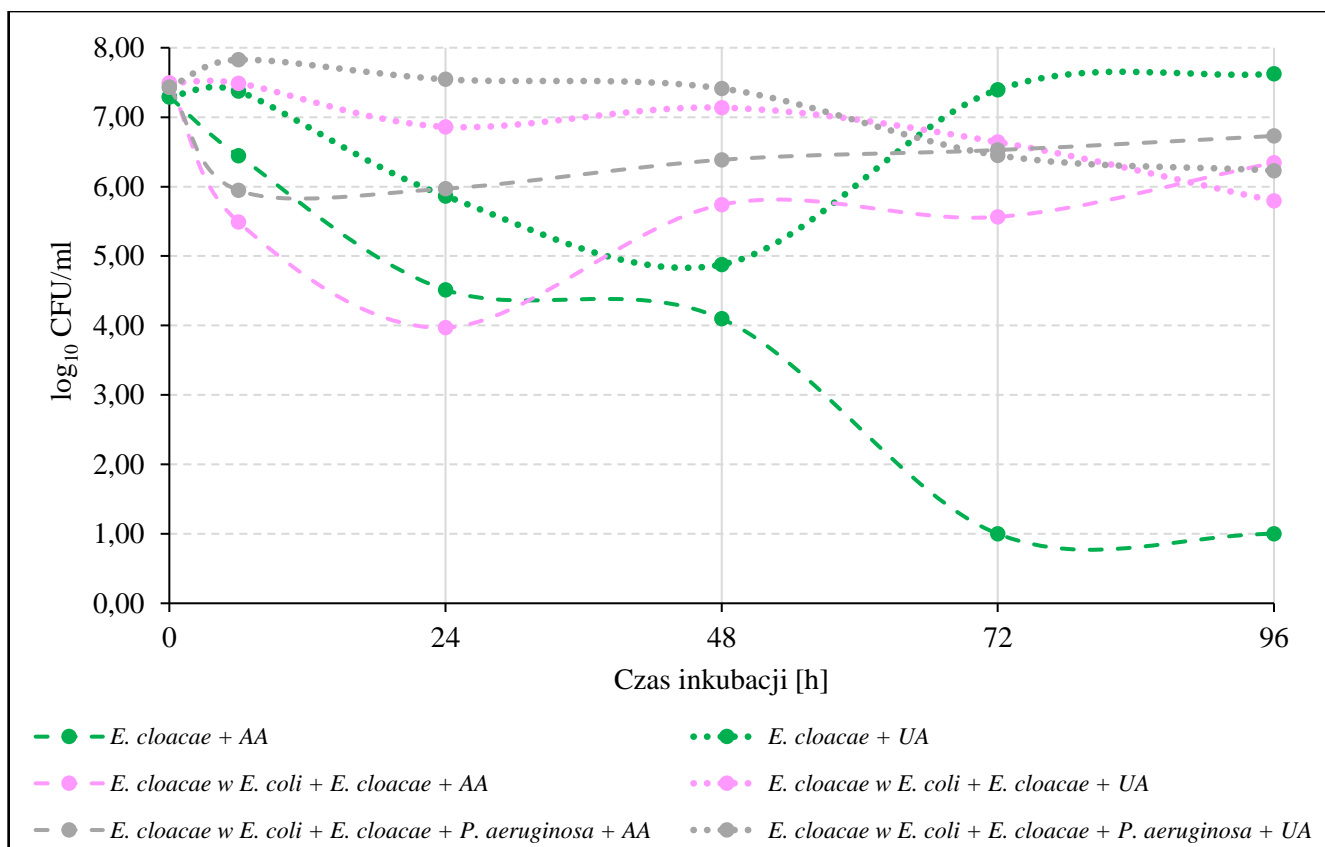
Tabela nr 61. Porównanie wpływu UA na przeżywalności *E. cloacae* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>E. cloacae</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	1,97E+07	2,70E+06	3,10E+07	1,02E+07	2,69E+07	7,21E+06
6	2,37E+07	6,57E+06	3,08E+07	3,32E+06	6,72E+07	2,54E+07
24	7,33E+05	2,61E+05	7,27E+06	1,32E+06	3,51E+07	5,23E+06
48	7,56E+04	2,29E+04	1,37E+07	4,10E+06	2,59E+07	4,48E+06
72	2,49E+07	1,21E+07	4,38E+06	4,66E+05	2,83E+06	3,03E+05
96	4,20E+07	6,87E+06	6,22E+05	9,91E+04	1,70E+06	4,10E+05



Wykres nr 19. Porównanie wpływu UA na przeżywalności *E. cloacae* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Porównując najwyższą zauważoną efektywność antybakteryjnego działania AA i UA wobec *E. cloacae* rosnącego w jedno-, dwu- i trzygatunkowych biofilmach (Tabela nr 58 a i b oraz Wykres nr 20), silniejsze działanie bójcze wykazał AA, który w każdym z badanych biofilmów powodował ok. 2-krotnie większą redukcję liczby żywych komórek w porównaniu z UA. Obydwa kwasy najbardziej zmniejszyły liczebność *E. cloacae* w monokulturach, następnie w biofilmie dwugatunkowym, a najslabiej w trzygatunkowym. Spośród szczepów rosnących w biofilmach jednogatunkowych, *E. cloacae* był najbardziej wrażliwy na obydwa kwasy. W biofilmie dwugatunkowym okazał się bardziej wrażliwy niż *E. coli*, również na obydwa kwasy. Natomiast w biofilmie trzygatunkowym był bardziej wrażliwy na obydwa kwasy niż *E. coli*, ale mniej niż *P. aeruginosa*.



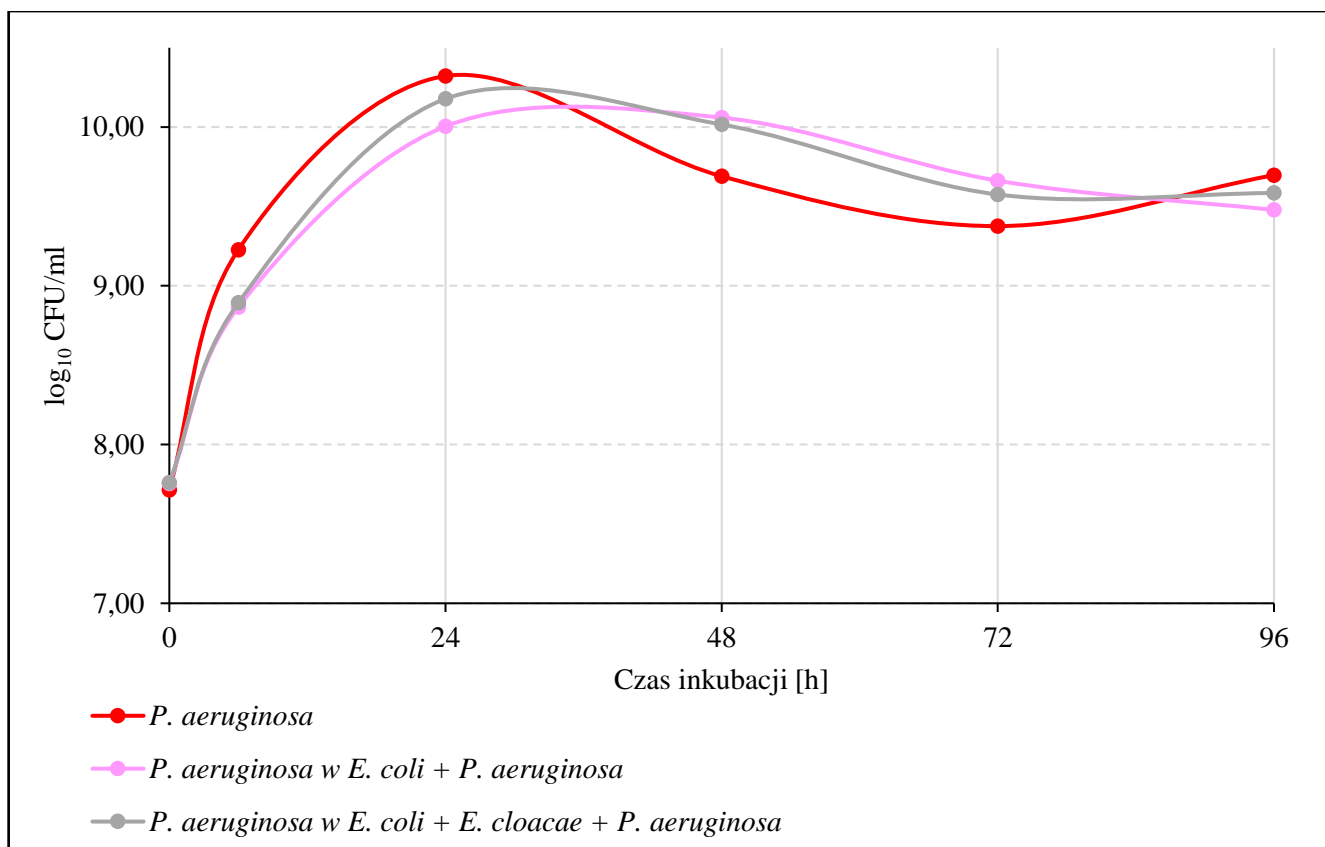
Wykres nr 20. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalności *E. cloacae* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

8.4. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalność *P. aeruginosa* w biofilmach

Z danych zawartych w Tabeli nr 62 i na Wykresie nr 21 wynika, że w biofilmach 48- i 72-godzinnych dwu- (*E. coli* + *P. aeruginosa*) jak i trzygatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) odnotowano istotny statystycznie wzrost liczby komórek *P. aeruginosa* w porównaniu z liczbą tych komórek w monokulturze ($p \leq 0,05$).

Tabela nr 62. Porównanie przeżywalności *P. aeruginosa* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	5,19E+07	6,36E+06	5,67E+07	1,35E+07	5,77E+07	1,83E+07
6	1,69E+09	4,01E+08	7,34E+08	1,78E+08	7,82E+08	2,29E+08
24	2,10E+10	2,00E+09	1,01E+10	1,46E+09	1,51E+10	3,50E+09
48	4,90E+09	6,13E+08	1,15E+10	2,64E+09	1,04E+10	2,76E+09
72	2,38E+09	3,96E+08	4,59E+09	1,32E+09	3,76E+09	2,34E+08
96	4,98E+09	1,52E+09	3,01E+09	8,22E+08	3,85E+09	6,80E+08

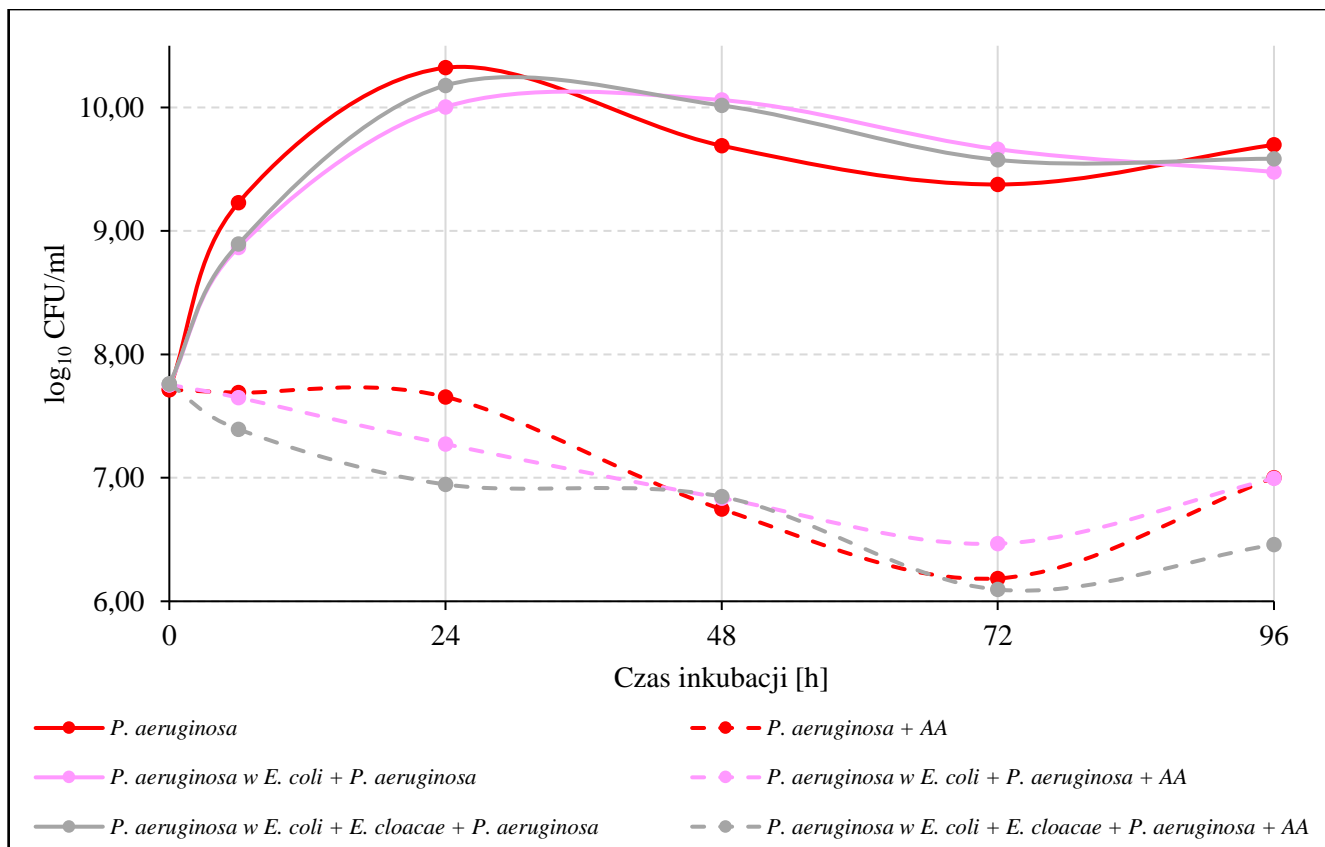


Wykres nr 21. Porównanie przeżywalności *P. aeruginosa* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Analiza porównawcza liczby żywych komórek *P. aeruginosa* (Tabela nr 63 i Wykres nr 22) rosnących w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych w obecności AA wykazała, że w hodowlach 6-, 24- i 96-godzinnych kwas ten działał najefektywniej na pałeczki *P. aeruginosa* żyjące w biofilmie trzygatunkowym ($p \leq 0,05$).

Tabela nr 63. Porównanie wpływu AA na przeżywalności *P. aeruginosa* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	5,19E+07	6,36E+06	5,67E+07	1,35E+07	5,77E+07	1,83E+07
6	4,90E+07	2,09E+07	4,47E+07	1,23E+07	2,48E+07	3,56E+06
24	4,53E+07	3,67E+06	1,88E+07	4,72E+06	8,84E+06	9,91E+05
48	5,58E+06	1,13E+06	6,85E+06	7,77E+05	7,04E+06	1,79E+06
72	1,53E+06	4,11E+05	2,93E+06	5,99E+05	1,24E+06	4,32E+05
96	1,00E+07	0,00E+00	9,90E+06	1,16E+07	2,88E+06	4,88E+05

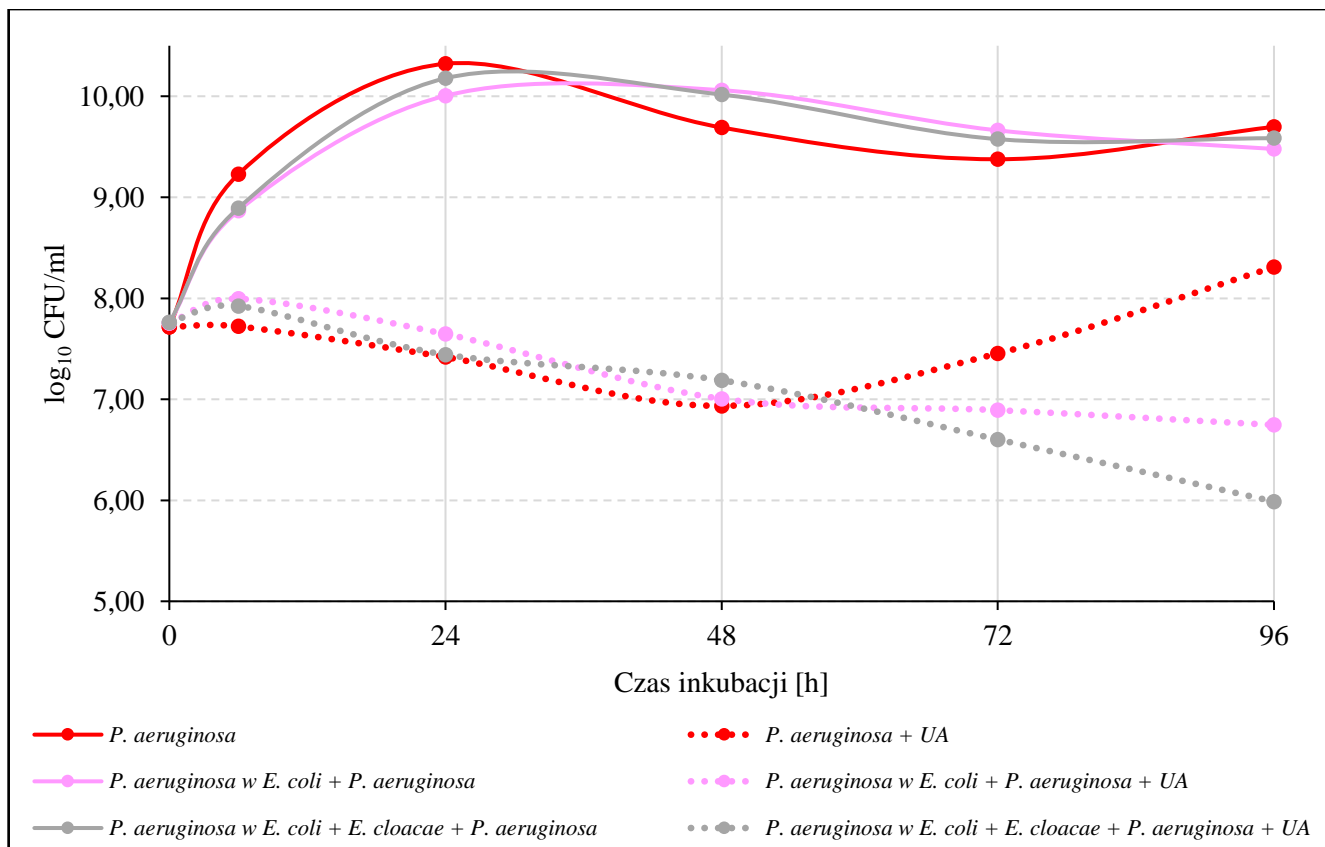


Wykres nr 22. Porównanie wpływu AA na przeżywalności *P. aeruginosa* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Analiza porównawcza liczby żywych komórek *P. aeruginosa* (Tabela nr 64 i Wykres nr 23) rosnących w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych w obecności UA wykazała, że w hodowlach 6-, 24- i 48-godzinnych kwas ten działał najefektywniej na pałeczki *P. aeruginosa* żyjące w monokulturze, natomiast w hodowlach 72- i 96-godzinnych na komórki *P. aeruginosa* rosnące w biofilmie trzygatunkowym.

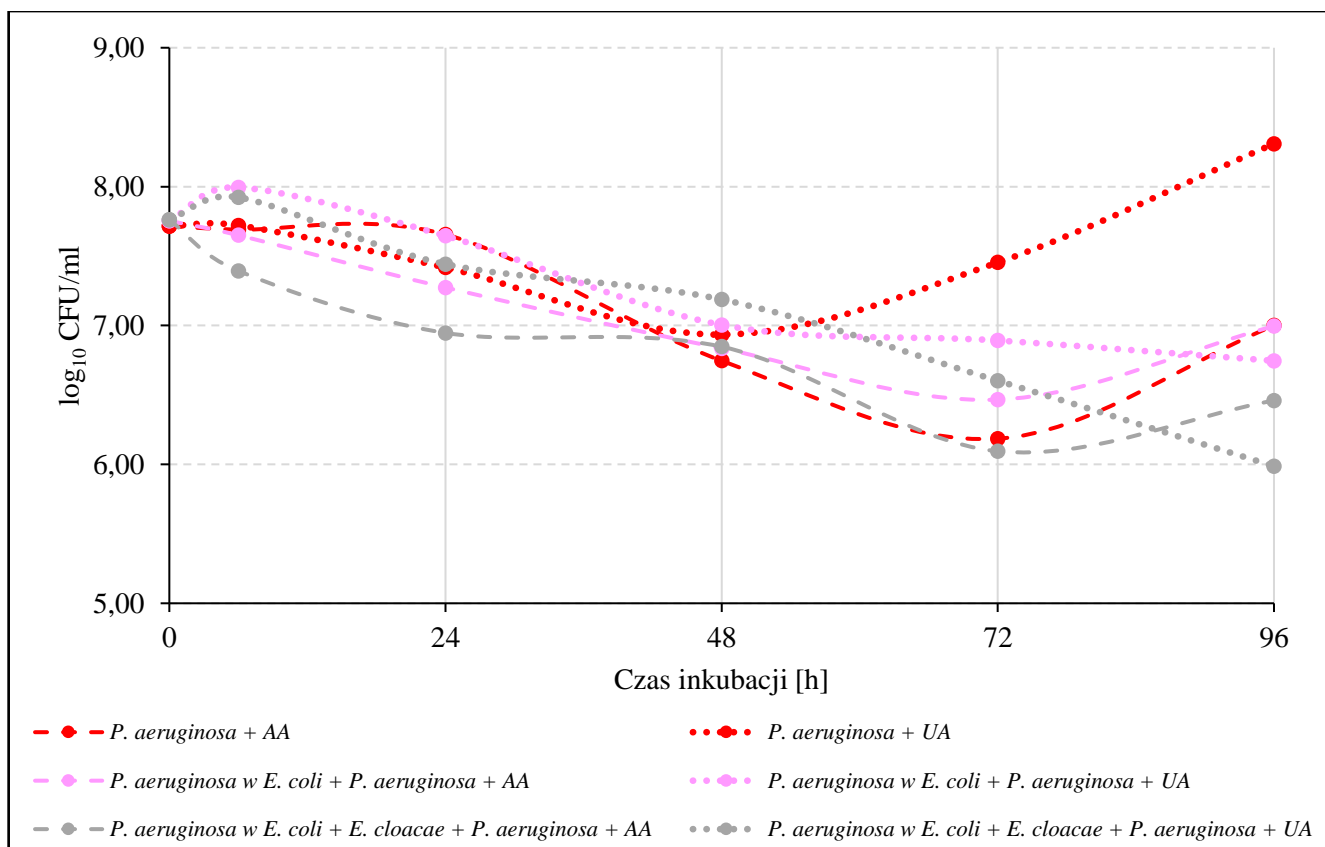
Tabela nr 64. Porównanie wpływu UA na przeżywalności *P. aeruginosa* [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia liczba <i>P. aeruginosa</i> w biofilmie <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA [CFU/ml]	Odchylenie standardowe (SD)
0	5,19E+07	6,36E+06	5,67E+07	1,35E+07	5,77E+07	1,83E+07
6	5,26E+07	1,19E+07	9,87E+07	1,78E+07	8,38E+07	2,60E+07
24	2,62E+07	8,48E+06	4,43E+07	9,96E+06	2,77E+07	3,30E+06
48	8,60E+06	9,93E+05	1,01E+07	1,76E+06	1,54E+07	3,47E+06
72	2,85E+07	1,07E+07	7,80E+06	1,83E+06	4,00E+06	7,07E+05
96	2,03E+08	1,25E+07	5,57E+06	1,90E+06	9,71E+05	8,81E+04



Wykres nr 23. Porównanie wpływu UA na przeżywalności *P. aeruginosa* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

Porównując najwyższą zauważoną efektywność antybakteryjnego działania AA i UA wobec *P. aeruginosa* rosnącego w jedno-, dwu- i trzygatunkowych biofilmach (Tabela nr 58 a i b oraz Wykres nr 24), silniejsze działanie bójcze w konsorcjach jedno- i dwugatunkowych wykazał AA, natomiast w trzygatunkowych – UA. Redukcja liczby żywych komórek *P. aeruginosa* przez AA w porównaniu z UA nie różniła się 2-krotnie jak miało to miejsce w przypadku *E. coli* i *E. cloacae*, lecz przyjmowała podobne wartości liczbowe. Co bardzo ciekawe, w przeciwieństwie do *E. coli* i *E. cloacae*, obydwa kwasy najbardziej zmniejszyły liczebność *P. aeruginosa* w biofilmach trzygatunkowych, następnie w biofilmach dwugatunkowych, a najslabiej w monokulturze. Spośród szczepów rosnących w biofilmach jednogatunkowych, *P. aeruginosa* był mniej wrażliwy na UA niż *E. cloacae*, ale bardziej niż *E. coli*, a także był najmniej wrażliwy na AA. W biofilmie dwugatunkowym okazał się bardziej wrażliwy niż *E. coli*, również na obydwa kwasy. Natomiast w biofilmie trzygatunkowym był bardziej wrażliwy na obydwa kwasy niż *E. coli* i *E. cloacae*.



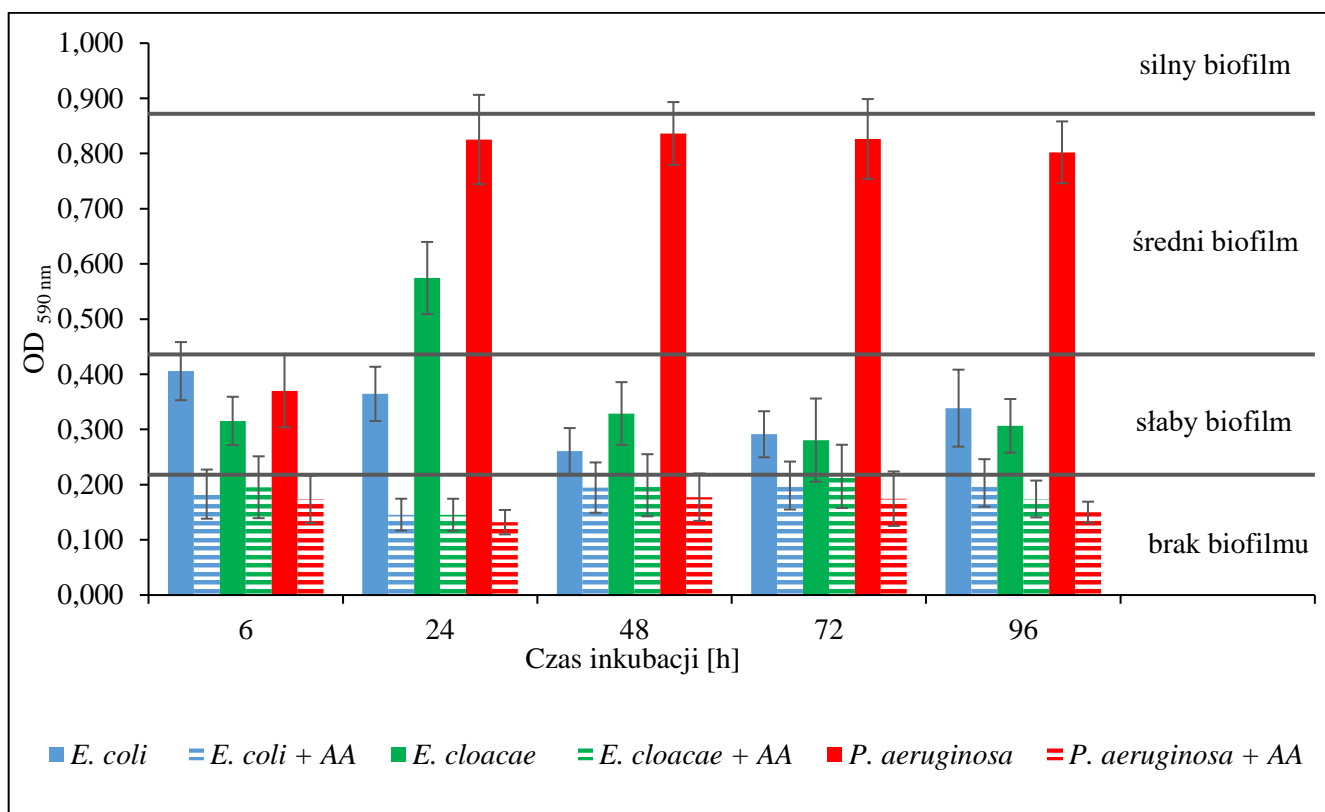
Wykres nr 24. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalności *P. aeruginosa* [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

8.5. Porównanie wpływu AA i UA na ilość wytworzonej masy biofilmowej

Analiza porównawcza ilości masy biofilmowej wytworzonej przy braku i w obecności AA w poszczególnych rodzajach biofilmów (Tabele nr 65 i 66 oraz Wykresy nr 25 i 26) wykazała, że w biofilmach jednogatunkowych (*E. coli* + AA, *E. cloacae* + AA, *P. aeruginosa* + AA), dwugatunkowym *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA oraz trzygatunkowym *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA, redukcja ilości biomasy była istotna statystycznie na wszystkich etapach ich formowania ($p \leq 0,05$), natomiast w konsorcjum *E. coli* + *E. cloacae* + AA tylko po 6 i 24 h inkubacji. Zupełne zahamowanie syntezy biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) pod wpływem AA odnotowano w monokulturach we wszystkich stadiach ich rozwoju, a także we wszystkich konsorcjach dwu- i trzygatunkowych, ale tylko na wczesnych etapach (6, 24 i 48 h).

Tabela nr 65. Porównanie wpływu AA na ilość wytworzonego biofilmu w monokulturach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

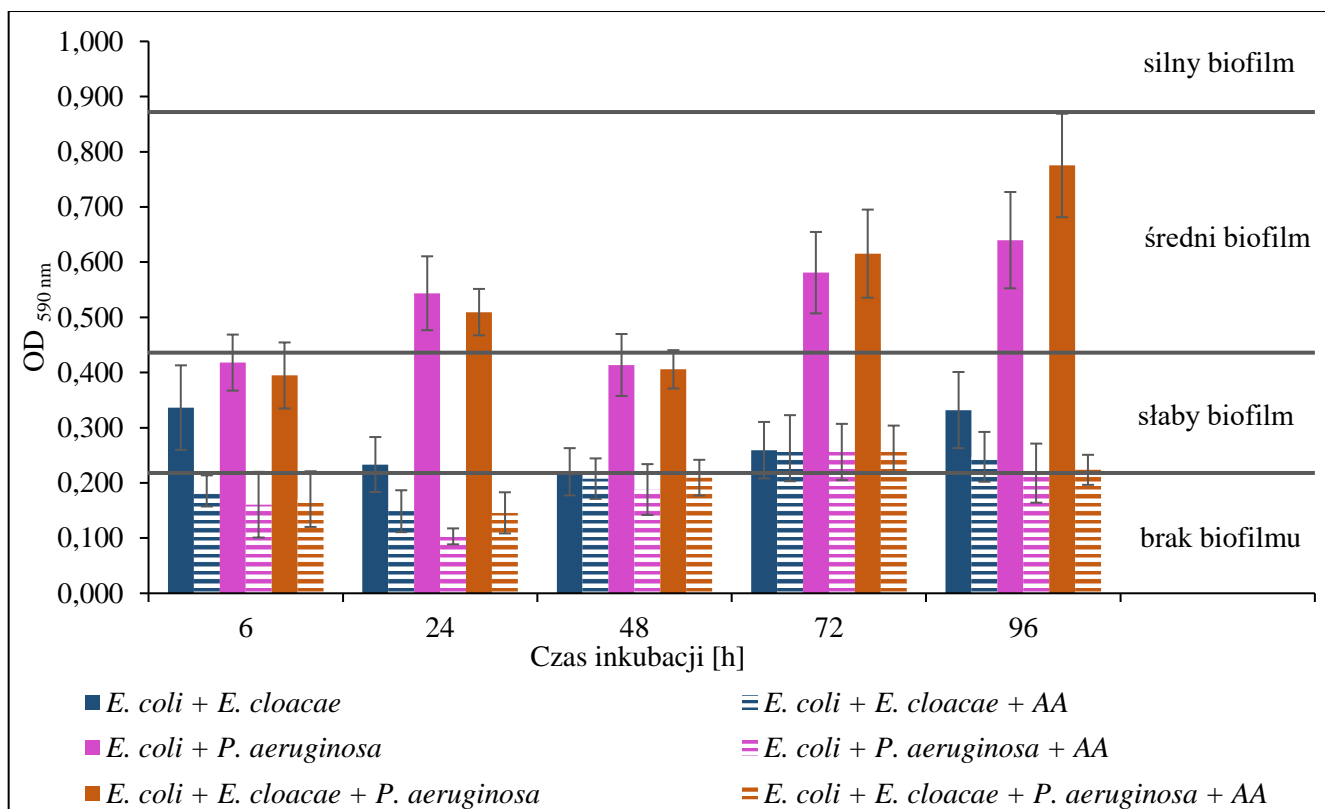
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,406	0,053	0,183	0,045	0,316	0,044	0,195	0,056	0,370	0,066	0,174	0,043
24	0,365	0,049	0,146	0,029	0,574	0,065	0,145	0,029	0,825	0,081	0,132	0,022
48	0,261	0,042	0,195	0,046	0,329	0,057	0,199	0,056	0,836	0,057	0,177	0,043
72	0,291	0,042	0,198	0,043	0,281	0,075	0,215	0,057	0,826	0,072	0,175	0,049
96	0,339	0,070	0,203	0,043	0,307	0,049	0,174	0,033	0,802	0,056	0,150	0,019



Wykres nr 25. Porównanie wpływu AA na ilość wytworzonego biofilmu w monokulturach.

Tabela nr 66. Porównanie wpływu AA na ilość wytworzonego biofilmu w dwu- i trzygatunkowych konsorcjach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,336	0,077	0,186	0,028	0,418	0,051	0,161	0,060	0,395	0,060	0,171	0,050
24	0,233	0,050	0,149	0,038	0,544	0,067	0,103	0,014	0,509	0,042	0,146	0,037
48	0,220	0,043	0,208	0,037	0,414	0,056	0,188	0,046	0,406	0,035	0,209	0,032
72	0,259	0,051	0,263	0,060	0,581	0,074	0,256	0,051	0,615	0,080	0,260	0,043
96	0,332	0,069	0,247	0,045	0,640	0,087	0,218	0,054	0,775	0,094	0,224	0,027

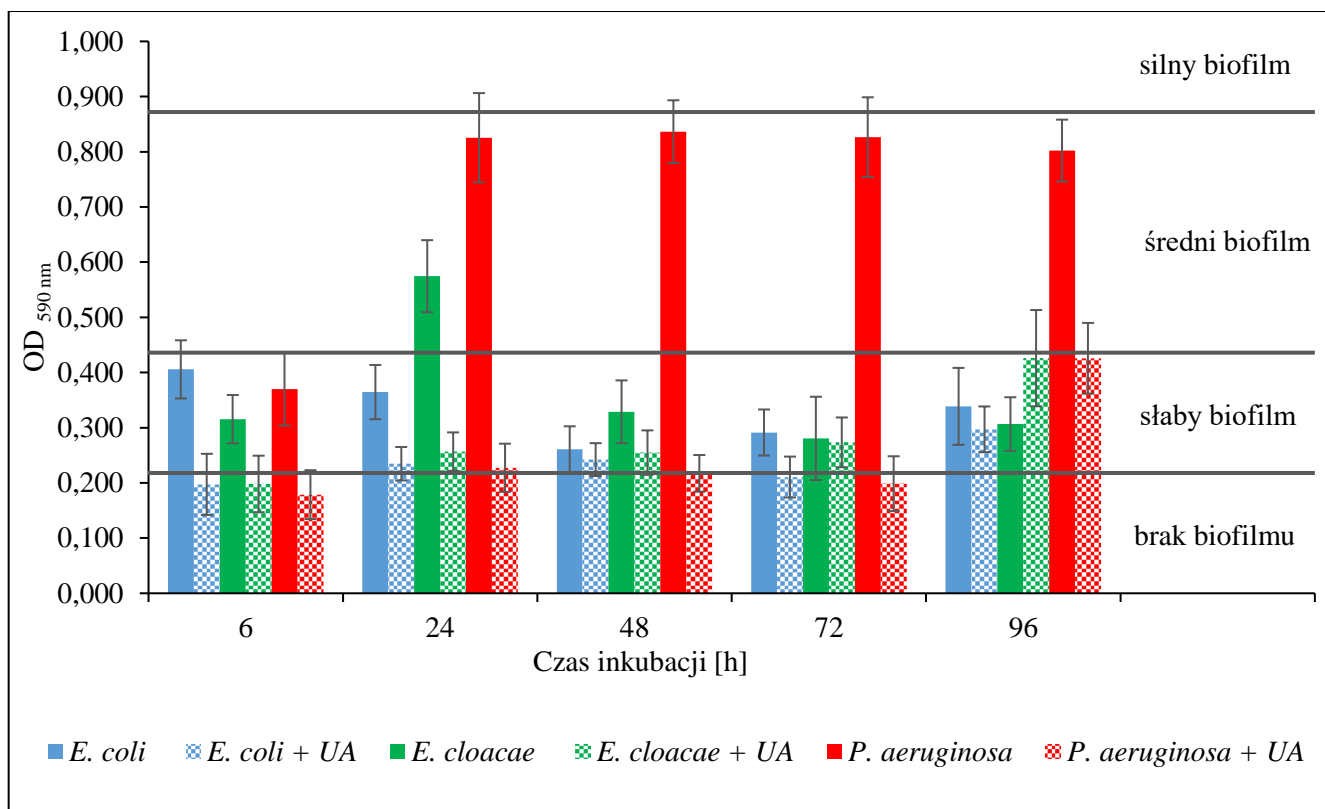


Wykres nr 26. Porównanie wpływu AA na ilość wytworzonego biofilmu w konsorcjach dwu- i trzygatunkowych.

Analiza porównawcza ilości masy biofilmowej wytworzonej przy braku i w obecności UA w poszczególnych rodzajach biofilmów (Tabele nr 67 i 68 oraz Wykresy nr 27 i 28) wykazała, że w monokulturze *P. aeruginosa* + UA, biofilmie dwugatunkowym *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA oraz trzygatunkowym *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA, redukcja ilości biomasy była istotna statystycznie na wszystkich etapach ich formowania ($p \leq 0,05$), w monokulturach *E. coli* + UA oraz *E. cloacae* + UA tylko po 6 i 24 h, natomiast w konsorcjum *E. coli* + *E. cloacae* + UA jedynie po 6 h inkubacji. Zupelne zahamowanie syntezy biofilmu ($OD_{590\text{ nm}} \leq 0,218$) pod wpływem UA odnotowano w monokulturach *E. coli* + UA oraz *P. aeruginosa* + UA po tylko 6 i 72 h, natomiast w biofilmie *E. cloacae* + UA oraz we wszystkich konsorcjach dwu- i trzygatunkowych jedynie po 6 h hodowli.

Tabela nr 67. Porównanie wpływu UA na ilość wytworzonego biofilmu w monokulturach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

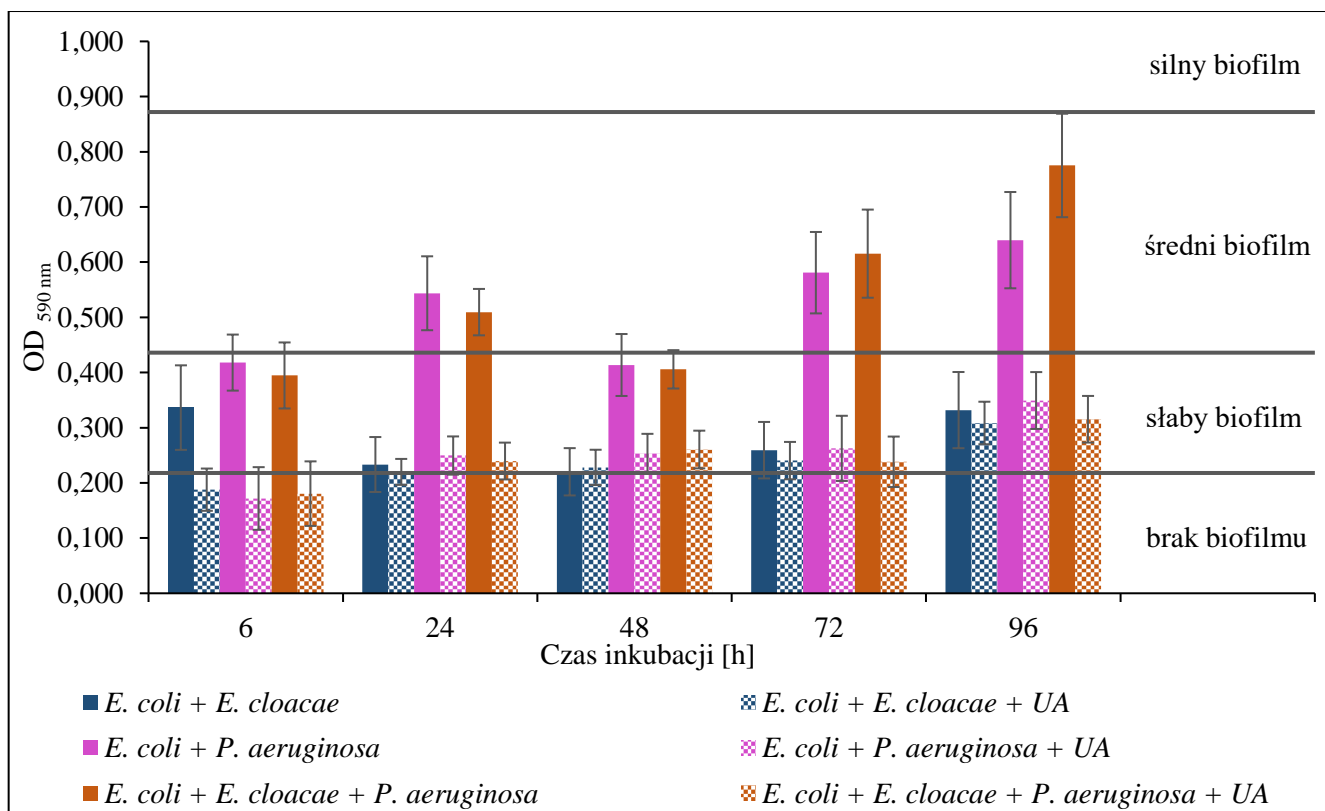
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość $OD_{590\text{ nm}}$ <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,406	0,053	0,197	0,055	0,316	0,044	0,198	0,051	0,370	0,066	0,179	0,044
24	0,365	0,049	0,235	0,030	0,574	0,065	0,257	0,035	0,825	0,081	0,227	0,044
48	0,261	0,042	0,242	0,030	0,329	0,057	0,255	0,040	0,836	0,057	0,217	0,033
72	0,291	0,042	0,211	0,037	0,281	0,075	0,273	0,045	0,826	0,072	0,199	0,050
96	0,339	0,070	0,297	0,041	0,307	0,049	0,426	0,087	0,802	0,056	0,426	0,064



Wykres nr 27. Porównanie wpływu UA na ilość wytworzonego biofilmu w monokulturach.

Tabela nr 68. Porównanie wpływu UA na ilość wytworzonego biofilmu w konsorcjach dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{590 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,336	0,077	0,188	0,038	0,418	0,051	0,172	0,057	0,395	0,060	0,181	0,059
24	0,233	0,050	0,220	0,024	0,544	0,067	0,250	0,035	0,509	0,042	0,240	0,033
48	0,220	0,043	0,228	0,032	0,414	0,056	0,254	0,035	0,406	0,035	0,260	0,034
72	0,259	0,051	0,240	0,034	0,581	0,074	0,263	0,059	0,615	0,080	0,238	0,046
96	0,332	0,069	0,309	0,039	0,640	0,087	0,349	0,052	0,775	0,094	0,315	0,042



Wykres nr 28. Porównanie wpływu UA na ilość wytworzonego biofilmu w konsorcjach dwu- i trzygatunkowych.

Wyniki powyższych analiz porównawczych jednoznacznie wskazują na silniejsze działanie antybiofilmowe AA. Również porównując najwyższą zauważoną efektywność antybiofilmowego działania AA i UA ($p \leq 0,05$), wyrażoną w największym % redukcji ilości masy biofilmowej (Tabela nr 69 a i b oraz Wykres nr 29) odnotowano, że silniejsze działanie wykazał AA, ponieważ w każdym z badanych biofilmów powodował większą redukcję ilości biomasy w porównaniu z UA. Spośród szczepów rosnących w biofilmie jednogatunkowym, najbardziej wrażliwy na obydwa kwasy był *P. aeruginosa*, a najmniej *E. coli*. Spośród biofilmów dwugatunkowych, konsorcjum *E. coli* + *P. aeruginosa* było bardziej wrażliwe na obydwa kwasy niż *E. coli* + *E. cloacae*. Natomiast biofilm trzygatunkowy *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* był bardziej wrażliwy na UA niż obydwa biofilmy dwugatunkowe, natomiast na AA był wrażliwy bardziej niż *E. coli* + *E. cloacae* i mniej niż *E. coli* + *P. aeruginosa*. W ujęciu całościowym, najbardziej wrażliwa na obydwa kwasy była monokultura *P. aeruginosa*, a najbardziej odporny był biofilm jednogatunkowy *E. coli* i dwugatunkowy *E. coli* + *E. cloacae*.

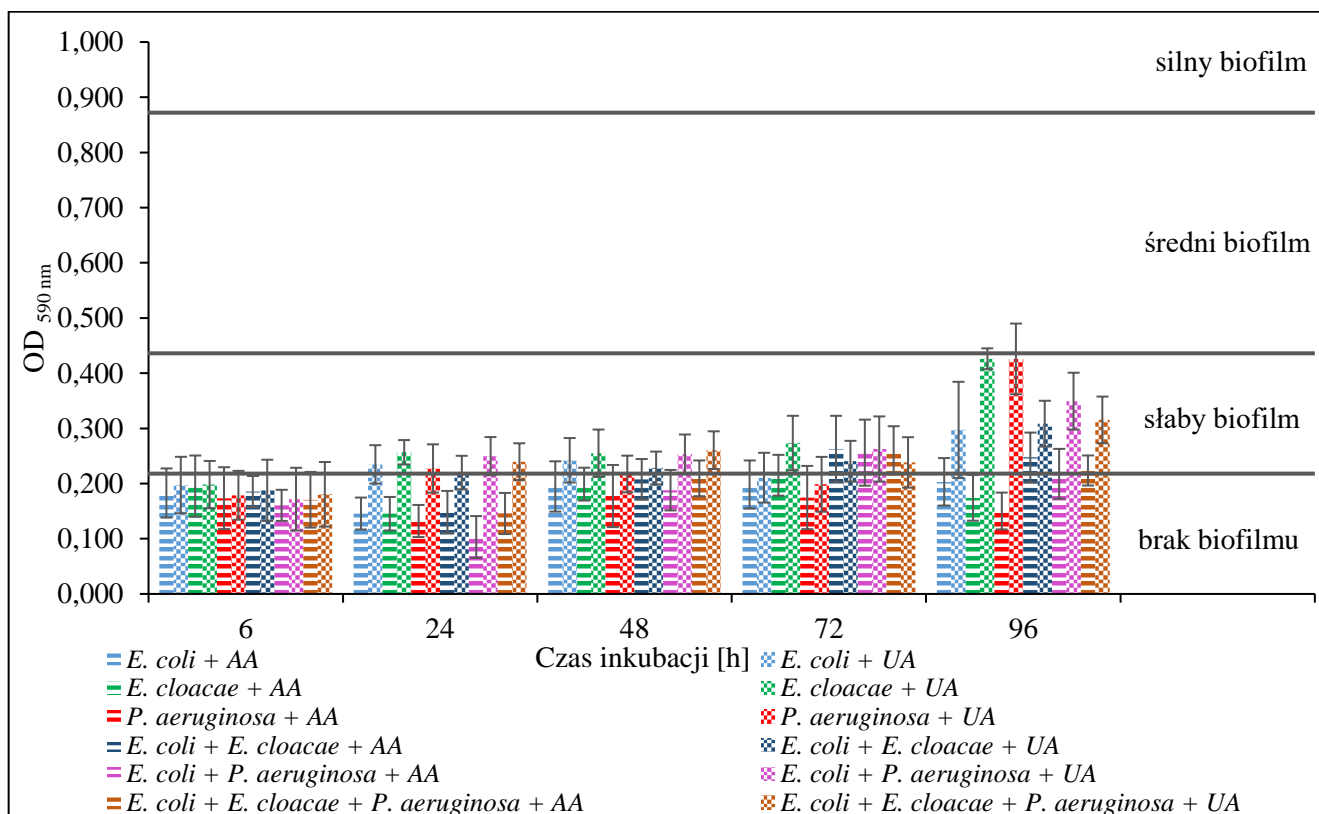
Tabela nr 69. Największy % redukcji ilości masy biofilmowej w konsorcjach jedno-, dwu- i trzygatunkowych (a) w obecności AA, (b) w obecności UA.

a)

Największy % redukcji ilości masy biofilmowej	AA
<i>P. aeruginosa</i>	84% po 24 h
<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	81% po 24 h
<i>E. cloacae</i>	75% po 24 h
<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	71% po 24 i 96 h
<i>E. coli</i>	60% po 24 h
<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	45% po 6 h

b)

Największy % redukcji ilości masy biofilmowej	UA
<i>P. aeruginosa</i>	76% po 72 h
<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	61% po 72 h
<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	59% po 6 h
<i>E. cloacae</i>	55% po 24 h
<i>E. coli</i>	51% po 6 h
<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	44% po 6 h



Wykres nr 29. Porównanie wpływu AA i UA na ilość wytworzonego biofilmu w konsorcjach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

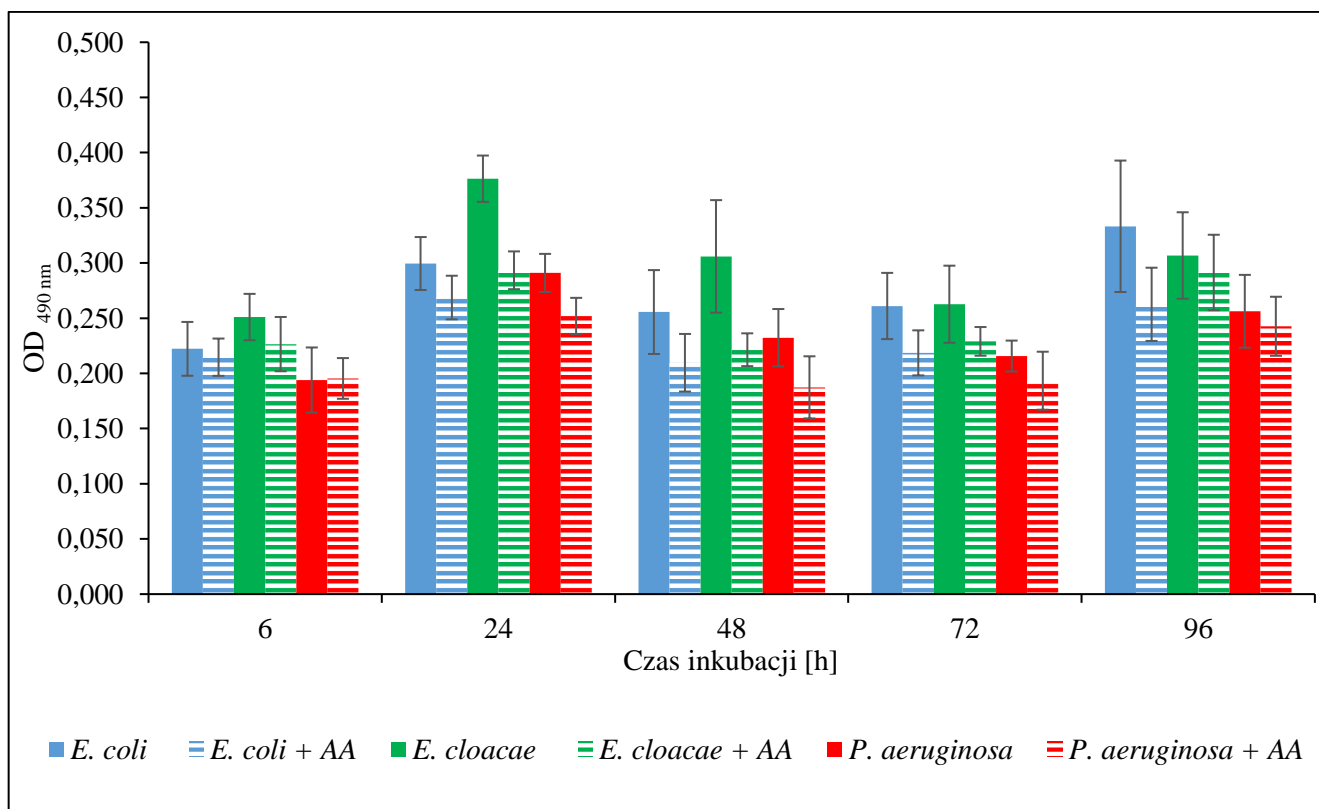
8.6. Porównanie wpływu AA i UA na aktywność metaboliczną bakterii w biofilmach

Analiza porównawcza aktywności metabolicznej przy braku i w obecności AA w poszczególnych rodzajach biofilmów (Tabele nr 70 i 71 oraz Wykresy nr 30 i 31) wykazała, że w biofilmach jednogatunkowych (*E. coli* + AA, *E. cloacae* + AA, *P. aeruginosa* + AA) miało miejsce zmniejszenie aktywności metabolicznej na wszystkich etapach ich formowania, jednak wyniki istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) odnotowano jedynie po 24 i 48 h (*E. cloacae* + AA) oraz po 96 h (*E. coli* + AA).

W konsorcjum trzygatunkowym *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + AA wynikiem istotnym statystycznie ($p \leq 0,05$) było zwiększenie aktywności metabolicznej po 24 i 96 h inkubacji. Natomiast zmiany zaobserwowane w biofilmach dwugatunkowych *E. coli* + *E. cloacae* + AA i *E. coli* + *P. aeruginosa* + AA nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$).

Tabela nr 70. Porównanie wpływu AA na aktywność metaboliczną w monokulturach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

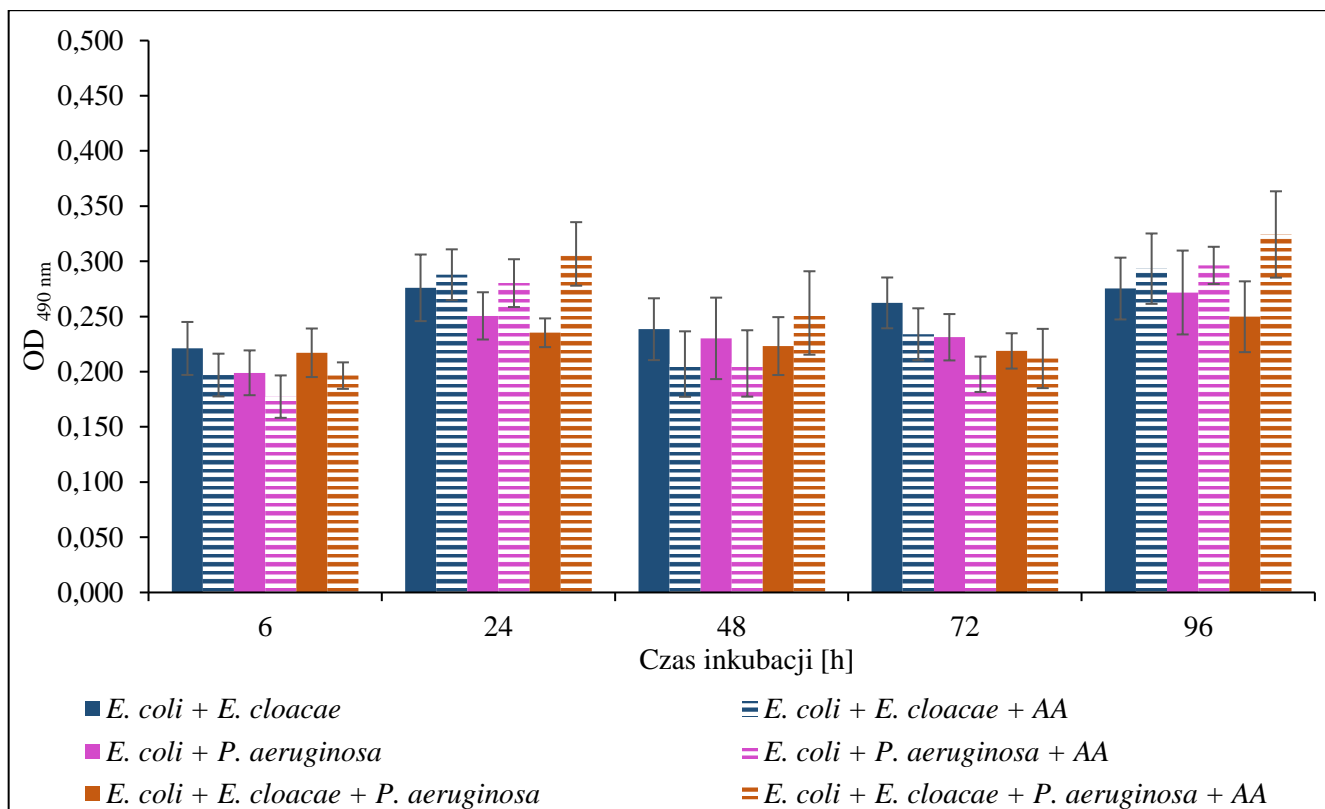
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,222	0,024	0,215	0,017	0,251	0,021	0,227	0,025	0,194	0,029	0,195	0,018
24	0,300	0,024	0,269	0,020	0,376	0,021	0,293	0,017	0,291	0,017	0,252	0,016
48	0,256	0,038	0,210	0,026	0,306	0,051	0,221	0,015	0,232	0,026	0,187	0,028
72	0,261	0,030	0,219	0,020	0,263	0,035	0,229	0,013	0,216	0,014	0,193	0,026
96	0,333	0,060	0,263	0,033	0,307	0,039	0,291	0,034	0,256	0,033	0,243	0,027



Wykres nr 30. Porównanie wpływu AA na aktywność metaboliczną w monokulturach.

Tabela nr 71. Porównanie wpływu AA na aktywność metaboliczną w biofilmach dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + AA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,221	0,024	0,197	0,019	0,199	0,020	0,177	0,019	0,217	0,022	0,196	0,012
24	0,276	0,030	0,288	0,023	0,251	0,021	0,280	0,022	0,235	0,013	0,307	0,029
48	0,239	0,028	0,207	0,030	0,230	0,037	0,207	0,030	0,223	0,026	0,253	0,038
72	0,262	0,023	0,234	0,024	0,231	0,021	0,198	0,016	0,219	0,016	0,212	0,027
96	0,275	0,028	0,293	0,032	0,272	0,038	0,296	0,017	0,250	0,032	0,324	0,039

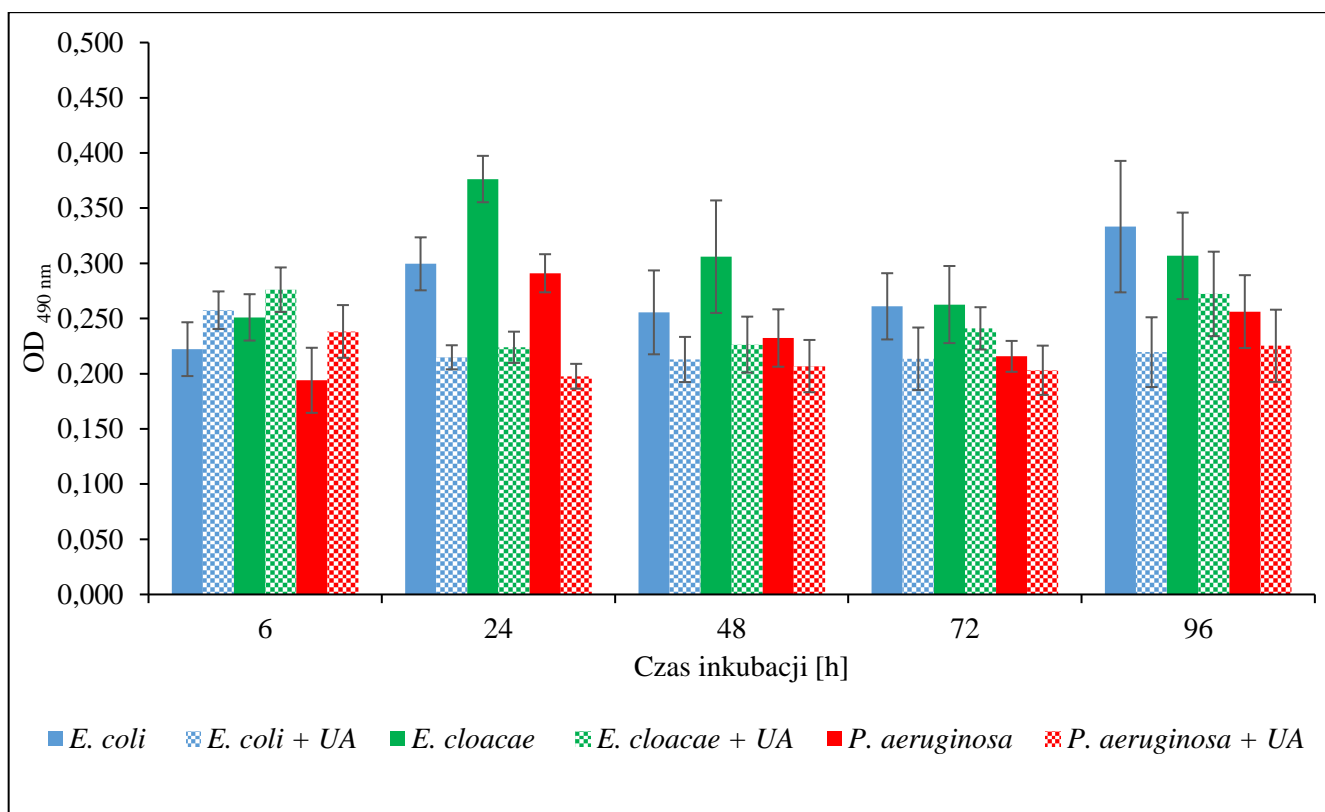


Wykres nr 31. Porównanie wpływu AA na aktywność metaboliczną w biofilmach dwu- i trzygatunkowych.

Analiza porównawcza aktywności metabolicznej przy braku i w obecności UA w poszczególnych rodzajach biofilmów (Tabele nr 72 i 73 oraz Wykresy nr 32 i 33) wykazała, że zarówno w biofilmach jednogatunkowych (*E. coli* + UA, *E. cloacae* + UA, *P. aeruginosa* + UA) jak i dwugatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + UA i *E. coli* + *P. aeruginosa* + UA) i trzygatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA), miało miejsce zwiększenie aktywności metabolicznej po 6 h hodowli, a następnie jej zmniejszenie na kolejnych etapach dojrzewania (24-96 h). Wyniki istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) odnotowano dla każdego z w/w biofilmów po 24 h, a oprócz tego dodatkowo po 48 h (*E. cloacae* + UA), po 96 h (*E. coli* + UA), po 6 h (*P. aeruginosa* + UA) oraz po 6 i 96 h (*E. coli* + *P. aeruginosa* + UA). Natomiast zmiany zaobserwowane w konsorcjum trzygatunkowym *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* + UA nie były istotne statystycznie ($p > 0,05$).

Tabela nr 72. Porównanie wpływu UA na aktywność metaboliczną w monokulturach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

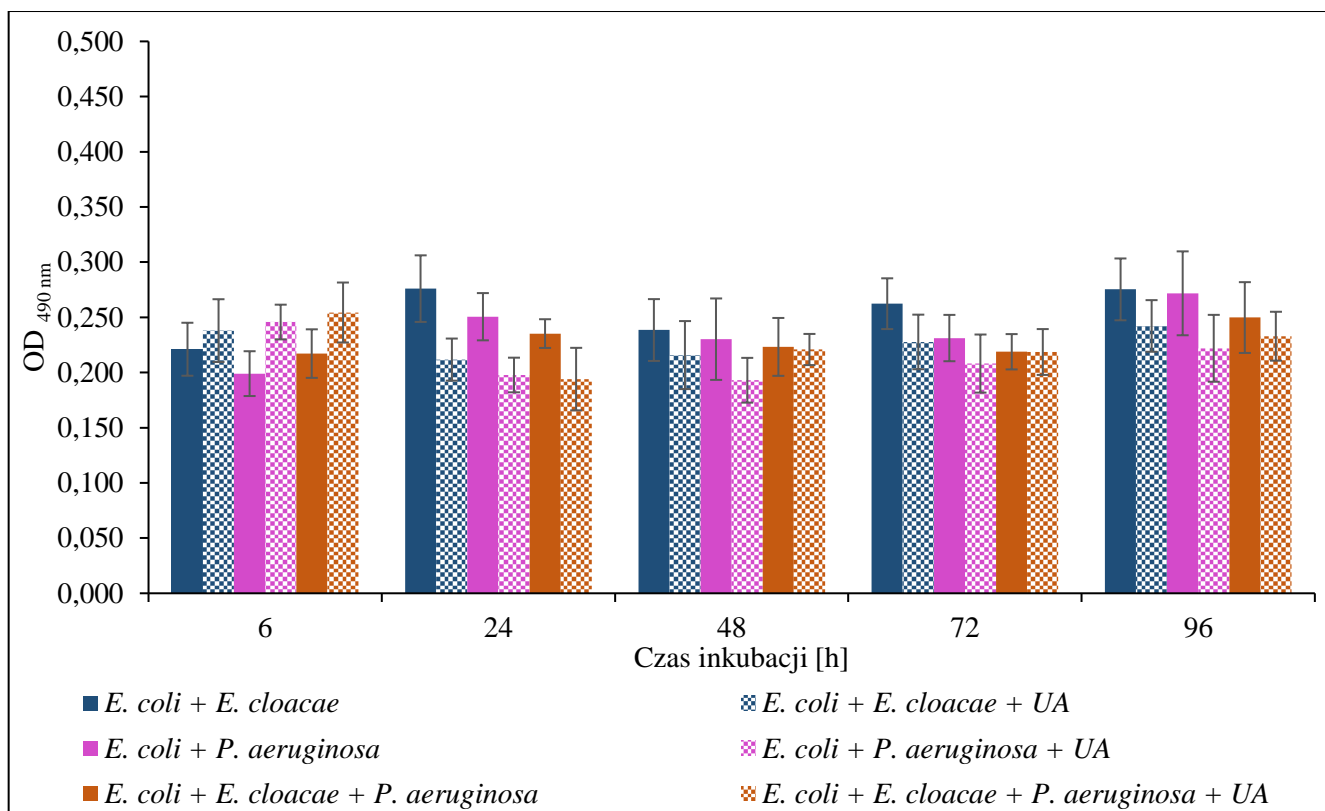
Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,222	0,024	0,258	0,017	0,251	0,021	0,276	0,020	0,194	0,029	0,238	0,024
24	0,300	0,024	0,215	0,011	0,376	0,021	0,224	0,014	0,291	0,017	0,198	0,011
48	0,256	0,038	0,213	0,020	0,306	0,051	0,226	0,025	0,232	0,026	0,207	0,024
72	0,261	0,030	0,214	0,028	0,263	0,035	0,241	0,019	0,216	0,014	0,203	0,022
96	0,333	0,060	0,220	0,032	0,307	0,039	0,272	0,038	0,256	0,033	0,225	0,033



Wykres nr 32. Porównanie wpływu UA na aktywność metaboliczną w monokulturach.

Tabela nr 73. Porównanie wpływu UA na aktywność metaboliczną w biofilmach dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.

Czas inkubacji [h]	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	Odchylenie standardowe (SD)	Średnia wartość OD _{490 nm} <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> + UA	Odchylenie standardowe (SD)
6	0,221	0,024	0,238	0,028	0,199	0,020	0,246	0,016	0,217	0,022	0,254	0,027
24	0,276	0,030	0,212	0,019	0,251	0,021	0,198	0,016	0,235	0,013	0,194	0,028
48	0,239	0,028	0,216	0,031	0,230	0,037	0,193	0,020	0,223	0,026	0,221	0,014
72	0,262	0,023	0,228	0,025	0,231	0,021	0,208	0,026	0,219	0,016	0,219	0,021
96	0,275	0,028	0,242	0,023	0,272	0,038	0,222	0,030	0,250	0,032	0,233	0,022



Wykres nr 33. Porównanie wpływu UA na aktywność metaboliczną w biofilmach dwu- i trzygatunkowych.

Wyniki powyższych analiz porównawczych jednoznacznie wskazują, że silniejsze działanie zmniejszające aktywność metaboliczną posiada UA. Również porównując najwyższą zauważoną efektywność działania AA i UA ($p \leq 0,05$), wyrażoną w największym % redukcji aktywności metabolicznej (Tabela nr 74 a i b oraz Wykres nr 34) odnotowano, że silniejsze działanie wykazał UA, ponieważ w każdym z badanych biofilmów powodował większą redukcję aktywności metabolicznej w porównaniu z AA. Spośród szczepów rosnących w biofilmie jednogatunkowym, najbardziej wrażliwy na obydwa kwasy był *E. cloacae*, a najmniej *P. aeruginosa*. Spośród biofilmów dwugatunkowych, konsorcjum *E. coli* + *P. aeruginosa* było bardziej wrażliwe na AA, a *E. coli* + *E. cloacae* na UA. Natomiast biofilm trzygatunkowy *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa* był najmniej wrażliwy na obydwa kwasy, ale co ciekawe, jego wrażliwość na UA była większa niż konsorcjów dwugatunkowych na AA. W ujęciu całościowym, najbardziej wrażliwa na obydwa kwasy była monokultura *E. cloacae*, a najbardziej odporny był biofilm trzygatunkowy *E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*.

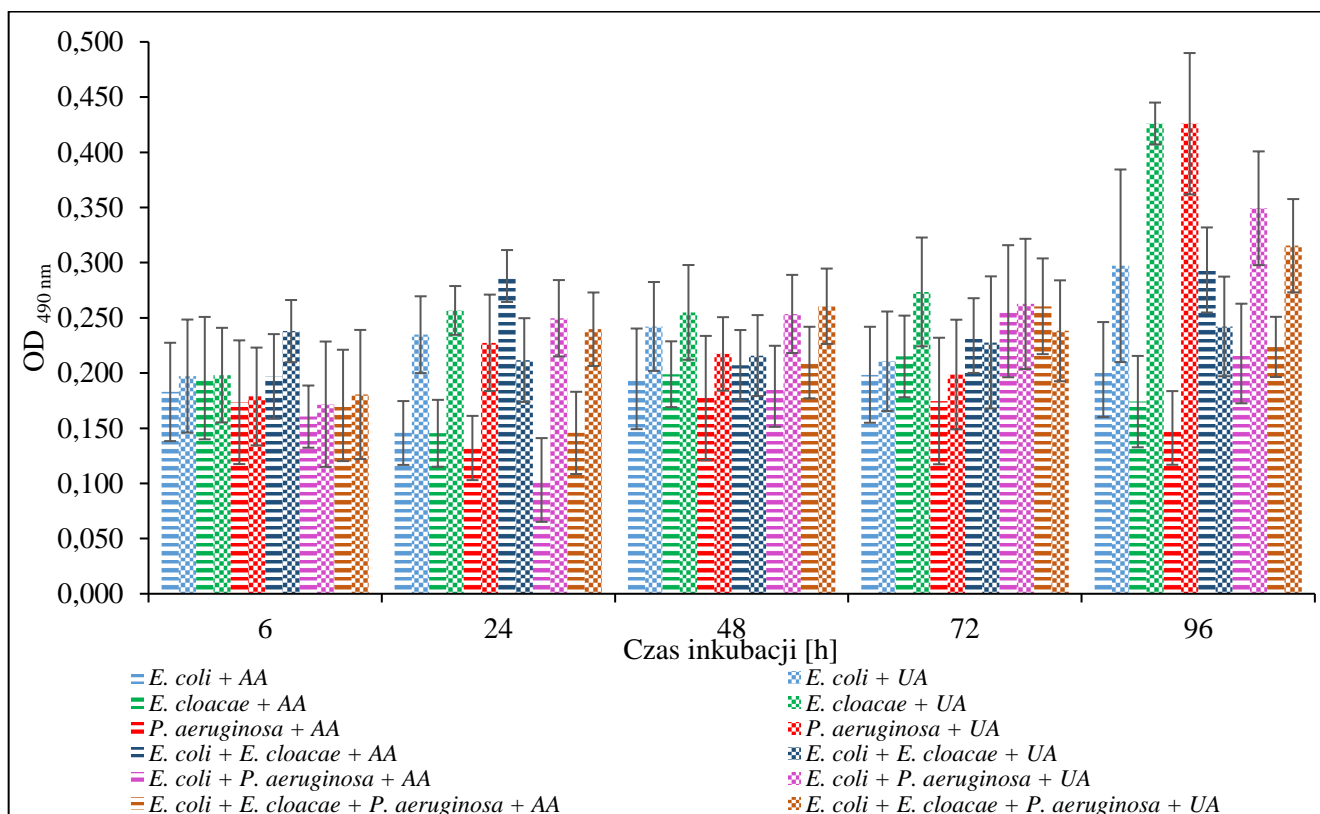
Tabela nr 74. Największy % redukcji aktywności metabolicznej w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych (a) w obecności AA, (b) w obecności UA.

a)

Największy % redukcji aktywności metabolicznej	AA
<i>E. cloacae</i>	28% po 48 h
<i>E. coli</i>	21% po 96 h
<i>P. aeruginosa</i>	19% po 48 h
<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	15% po 72 h
<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	13% po 48 h
<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	10% po 6 h

b)

Największy % redukcji aktywności metabolicznej	UA
<i>E. cloacae</i>	41% po 24 h
<i>E. coli</i>	34% po 96 h
<i>P. aeruginosa</i>	32% po 24 h
<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>	23% po 24 h
<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>	21% po 24 h
<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	18% po 24 h



Wykres nr 34. Porównanie wpływu AA i UA na aktywność metaboliczną w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.

9. WNIOSKI

1. Charakterystyka biofilmów jedno- (*E. coli*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*), dwu- (*E. coli* + *E. cloacae*, *E. coli* + *P. aeruginosa*) i trzygatunkowych (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*) polegająca na określeniu przeżywalności poszczególnych szczepów, ilości wytworzonej przez nie biomasy oraz ich aktywności metabolicznej, pozwala stwierdzić występowanie antagonistycznych oddziaływań pomiędzy badanymi szczepami, rosnącymi w biofilmach wielogatunkowych.

Jednoczesna obecność dwóch lub trzech gatunków bakterii z reguły skutkowałą ograniczeniem przeżywalności, zmniejszeniem ilości wytworzonej masy biofilmowej oraz obniżeniem aktywności metabolicznej poszczególnych szczepów, w porównaniu do ich monokultur. Biorąc pod uwagę przeżywalność i aktywność metaboliczną można stwierdzić, że najsilniejsze oddziaływania antagonistyczne wobec pozostałych szczepów wywierał *P. aeruginosa*, a najsłabsze – *E. cloacae*. Natomiast uwzględniając zahamowanie wytwarzania masy biofilmowej, działanie antagonistycznie wykazały jedynie *E. coli* i *E. cloacae* wobec siebie nawzajem i wobec *P. aeruginosa*.

Oddziaływania antagonistyczne między testowanymi szczepami bakterii zostały odnotowane w:

a) biofilmie dwugatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae*), w którym *E. coli* zmniejszała liczbę żywych komórek *E. cloacae* i ograniczała ich aktywność metaboliczną co skutkowało także zmniejszeniem ilości wytwarzanej masy biofilmowej;

b) biofilmie dwugatunkowym (*E. coli* + *P. aeruginosa*), w którym *P. aeruginosa* ograniczała przeżywalność i aktywność metaboliczną *E. coli*. Natomiast obecność *E. coli* spowodowała, że ilość tworzonej masy biofilmowej przez *P. aeruginosa* zmniejszyła się w porównaniu do jego monokultury;

c) biofilmie trzygatunkowym (*E. coli* + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*), w którym *P. aeruginosa* redukowałą liczbę żywych komórek pozostałych dwóch szczepów. Z kolei obecność *E. coli* i *E. cloacae* przyczyniła się do zmniejszenia ilości masy biofilmowej produkowanej przez *P. aeruginosa*.

2. Na podstawie wartości MIC i MBC uzyskanych dla AA i UA można stwierdzić, że wszystkie testowane szczepy bakteryjne były tak samo wrażliwe na UA, natomiast szczep *E. cloacae* wykazywał większą wrażliwość na AA niż szczepy *E. coli* i *P. aeruginosa*.

3. Obecność AA i UA w sposób istotny statystycznie wpływała na przeżywalność, ilość masy biofilmowej, aktywność metaboliczną oraz morfologię pałeczek żyjących w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych, a także na stosunki antagonistyczne zaobserwowane między badanymi szczepami.

a) wpływ kwasów na przeżywalność bakterii

W większości biofilmów AA efektywniej niż UA zmniejszała liczbę żywych komórek bakterii. Najbardziej wrażliwy na działanie AA był szczep *E. cloacae* żyjący w monokulturze i biofilmie dwugatunkowym. Natomiast największą redukcję liczby żywych komórek bakteryjnych w obecności

UA odnotowano wobec szczepu *E. cloacae* żyjącego w monokulturze, a także szczepu *P. aeruginosa* współtworzącego biofilmy trzy- i dwugatunkowe. Najbardziej odporny na działanie obydwu kwasów był szczep *E. coli* rosnący w biofilmie trzygatunkowym.

b) wpływ kwasów na ilość wytworzonej masy biofilmowej

We wszystkich biofilmach AA powodował większą redukcję ilości wytworzonej masy biofilmowej niż UA. Najbardziej wrażliwa na działanie obydwu kwasów była monokultura *P. aeruginosa*. Następnie na działanie AA największą wrażliwość wykazał biofilm *E. coli* + *P. aeruginosa*, a na działanie UA biofilm trzygatunkowy. Najbardziej odporne na działanie obydwu kwasów były: biofilm *E. coli* + *E. cloacae* oraz monokultura *E. coli*.

c) wpływ kwasów na aktywność metaboliczną bakterii w biofilmach

We wszystkich biofilmach UA powodował większą redukcję aktywności metabolicznej niż AA. Najbardziej wrażliwe na działanie obydwu kwasów były monokultury: *E. cloacae*, następnie *E. coli* i *P. aeruginosa*. Natomiast najslabszy wpływ AA i UA na spadek aktywności metabolicznej odnotowano w biofilmie trzygatunkowym.

d) wpływ kwasów na morfologię pałeczek

W hodowlach biofilmowych prowadzonych w obecności AA lub UA stwierdzono obecność krótkich filamentów (5-15 μm), długich filamentów (>15 μm) oraz komórek częściowo pozbawionych ściany komórkowej tzw. „ghost”. UA wykazał silniejszy niż AA wpływ na zmianę morfologii pałeczek tworzących monokultury i konsorcja trzygatunkowe. Natomiast AA, pomimo braku wpływu na morfologię pałeczek *P. aeruginosa* rosnących w monokulturze, wykazał silniejszy niż UA wpływ na biofilm dwugatunkowy *E. coli* + *P. aeruginosa*.

e) wpływ kwasów na stosunki antagonistyczne między bakteriami

Jednoczesna hodowla dwóch lub trzech gatunków bakterii, która w biofilmach kontrolnych skutkowałą spadkiem przeżywalności, ilości wytworzonej biomasy oraz obniżeniem aktywności metabolicznej komórek, w obecności AA lub UA najczęściej skutkowałą zanikiem, osłabieniem lub ograniczeniem (tylko do niektórych etapów) antagonistycznego oddziaływania pomiędzy bakteriami. W przypadkach, gdy antagonistyczne oddziaływanie było słabe lub występowało na końcowych etapach wzrostu danego biofilmu, obecność kwasu z reguły nie wywierała na niego wpływu. Odnotowano istnienie antagonistycznego oddziaływania na ilość biomasy (rzadziej na aktywność metaboliczną), pomimo prowadzenia hodowli w obecności UA, co może przemawiać za słabszym działaniem antybakteryjnym UA w porównaniu z AA.

4. Analiza porównawcza wszystkich uzyskanych wyników pozwala stwierdzić, że silniejsze działanie bakteriobójcze i antybiofilmowe wykazał AA, natomiast większą redukcję aktywności metabolicznej powodował UA. Obydwa kwasy działały najlepiej we wczesnych fazach tworzenia biofilmów (tj. 6-48 h). Odkrycia te mogą być w przyszłości pomocne do opracowania skutecznego

postępowania leczniczego z zastosowaniem AA i UA jako alternatywy dla antybiotyków w grupie pacjentów podatnych na występowanie nawracających i/lub przewlekłych ZUM, a stosowanie preparatów zawierających AA i UA byłoby zasadne zwłaszcza w początkowej fazie infekcji.

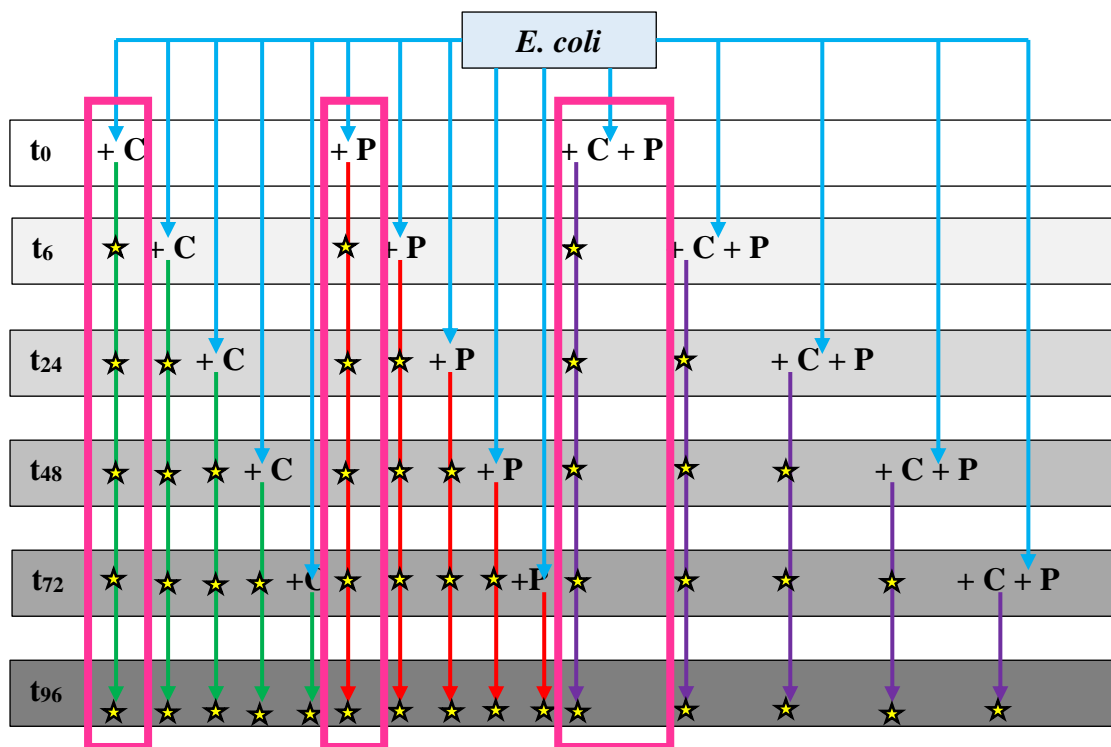
10. WYNIKI DODATKOWYCH EKSPERYMENTÓW i PROPONOWANE KIERUNKI DALSZYCH BADAŃ

W ramach dokładniejszej charakterystyki szczepów referencyjnych, zbadano liczebność ich komórek w jednogatunkowych hodowlach planktonowych po 1–8 h inkubacji. Wszystkie badane szczepy bakterii wykazały przewidywalny, intensywny wzrost aż do 5 h inkubacji, po czym pojawiły się różnice w tempie podziału komórek, w zależności od gatunku. Zbadano także jednogatunkowe biofilmy 24-240 – godzinne (tzw. biofilm 10-dniowy), określając przeżywalność, ilość wytworzonej biomasy i aktywność metaboliczną bakterii w nich żyjących. Krzywe wzrostu form biofilmowych różniły się między sobą, w zależności od gatunku, jednak wszystkie badane szczepy bakterii po 96 h hodowli wykazały tendencję do zmniejszenia liczebności, osiągając najmniejszą liczbę komórek w 168 h inkubacji. Ilość wytworzonego biofilmu była największa w przypadku *P. aeruginosa*, podlegała czasowym wahaniom w zależności od szczepu bakterii, jednak żaden z nich nie produkował biofilmu w 216-godzinnej hodowli. Szczep *E. cloacae* charakteryzował się największą, a *P. aeruginosa* najmniejszą aktywnością metaboliczną, jednak wszystkie badane szczepy bakterii wykazały największą aktywność metaboliczną po 144 h, a najmniejszą po 120 h inkubacji.

Zrealizowane w niniejszej pracy doktorskiej badania biofilmów jedno-, dwu- i trzygatunkowych, w których wszystkie szczepy rosły razem od czasu t_0 , wykazały występowanie wzajemnych stosunków antagonistycznych oraz istotny wpływ AA i UA na przeżywalność komórek bakteryjnych, ich morfologię, zdolność do tworzenia biomasy oraz aktywność metaboliczną. W ramach dodatkowych badań sprawdzono, czy wzrost szczepu *E. coli* w biofilmach wielogatunkowych jest zależny od czasu dołączania następnych gatunków (*E. cloacae* i/lub *P. aeruginosa*). W tym celu zbadano biofilmy dwu- i trzygatunkowe, w których *E. cloacae* i/lub *P. aeruginosa* dodawane były po 6, 24, 48 lub 72 h do już istniejącej (założonej w czasie t_0) hodowli *E. coli*, a odczytów i pomiarów dokonywano po 24, 48, 72 i 96 h inkubacji. Innymi słowy, biofilm *E. coli* był nadkażany szczepami *E. cloacae* i/lub *P. aeruginosa* (Rysunek nr 4).

Analogicznie jak w przypadku biofilmów, w których wszystkie szczepy rosły razem od czasu t_0 , przeanalizowano występowanie wzajemnych stosunków (antagonistycznych lub synergistycznych) między badanymi szczepami w zależności od czasu pojawienia się ich w biomasie, poprzez określenie: liczebności komórek badanych gatunków, tj. przeżywalności poszczególnych szczepów w biofilmach, ilości wytworzonej masy biofilmowej oraz aktywności metabolicznej komórek w biofilmach. Następnie zbadano zmiany zachodzące w wymienionych parametrach pod wpływem AA lub UA.

W ramach dodatkowych eksperymentów stwierdzono, że występowanie stosunków antagonistycznych między badanymi szczepami było zależne od czasu pojawienia się ich w biomasie. Były one bardziej widoczne w biofilmach, w których wszystkie szczepy rosły razem od t_0 , niż w biofilmach założonych w czasie t_0 jako jednogatunkowe *E. coli*, do których po upływie poszczególnych



Rysunek nr 4. Schemat przedstawiający dwa badane modele biofilmów dwu- i trzygatunkowych. Różowe ramki obejmują badania wchodzące w zakres artykułów nr 2 i 3 (dotyczą biofilmów, w których wszystkie szczepy rosły razem od czasu t_0). Badania dodatkowe omawiane w niniejszym podrozdziale znajdują się poza zakresem różowych ramek i dotyczą biofilmów, w których *E. cloacae* i/lub *P. aeruginosa* dodawane były po 6, 24, 48 lub 72 h do już istniejącej (założonej w czasie t_0) hodowli *E. coli*. Odczytów i pomiarów dokonywano w punktach oznaczonych ★. Objasnienia symboli: C – *E. cloacae*, P – *P. aeruginosa*.

czasów inkubacji dodawano hodowle planktonowe *E. cloacae* lub/i *P. aeruginosa*. Dodanie hodowli planktonowych *E. cloacae* i/lub *P. aeruginosa* do istniejącego biofilmu jednogatunkowego *E. coli*, ograniczało liczebność komórek *E. coli* i zmniejszało ich aktywność metaboliczną na większości dalszych etapów tworzenia biofilmu. Najczęściej działania antagonistyczne odnotowywano już przy pierwszym pomiarze od momentu dołączenia konkurencyjnych szczepu (-ów). Antagonizm był tym silniejszy, im szybciej doszło do nadkażenia, jednak wygasał wraz z kolejnymi etapami wzrostu biofilmu. W kwestii ilości wytworzonej biomasy, nadkażenie biofilmu jednogatunkowego *E. coli* hodowlą planktonową *E. cloacae*, zmniejszało ilość produkowanego egzopolisacharydu na kolejnych etapach tworzenia biofilmu. Takiego działania antagonistycznego nie odnotowano w przypadku nadkażenia za pomocą szczepu *P. aeruginosa*. Jednoczesne dołączenie *E. cloacae* i *P. aeruginosa* do istniejącego biofilmu *E. coli*, skutkowało krótkotrwałym antagonizmem i zmniejszeniem ilości biomasy tylko na pierwszych etapach wspólnego wzrostu.

W biofilmach założonych w czasie t_0 jako jednogatunkowe *E. coli*, do których po upływie poszczególnych czasów inkubacji dodawano hodowle planktonowe szczepów *E. cloacae* lub/i *P. aeruginosa*, AA i UA w stężeniu podprogowym $0,5 \times \text{MIC}$ wykazały:

a) słabsze działanie bójcze niż w biofilmach, w których wszystkie szczepy rosły razem od t_0 . Obydwa kwasy najbardziej zmniejszyły liczebność *E. coli* w hodowlach dwugatunkowych *E. coli* + AA (lub UA)

+ *E. cloacae*, następnie *E. coli* + AA (lub UA) + *P. aeruginosa*, a najmniej w trzygatunkowych *E. coli* + AA (lub UA) + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*;

b) słabsze działanie antybiofilmowe niż w biofilmach, w których wszystkie szczepy rosły razem od t_0 . Najsilniej działały w hodowlach dwugatunkowych *E. coli* + AA (lub UA) + *P. aeruginosa*, następnie w trzygatunkowych *E. coli* + AA (lub UA) + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*, a najslabiej w *E. coli* + AA (lub UA) + *E. cloacae*;

c) silniejsze działanie obniżające aktywność metaboliczną komórek niż w wielogatunkowych biofilmach hodowanych razem od t_0 . Najsilniej działały w hodowlach dwugatunkowych *E. coli* + AA (lub UA) + *E. cloacae* (lub *P. aeruginosa*), a słabiej w trzygatunkowych *E. coli* + AA (lub UA) + *E. cloacae* + *P. aeruginosa*.

Reasumując, w biofilmach, w których wszystkie szczepy rosły razem od t_0 , działanie bójcze i antybiofilmowe obydwu badanych kwasów było silniejsze, a działanie obniżające aktywność metaboliczną słabsze niż w biofilmach nadkażanych. Zatem nadkażenie istniejącej hodowli *E. coli*, w odniesieniu do działania bakteriobójczego i antybiofilmowego, zaowocowało wzrostem jej oporności na AA i UA; natomiast w odniesieniu do aktywności metabolicznej – wzrostem wrażliwości na AA i UA, w porównaniu z biofilmami o analogicznym składzie, w których wszystkie gatunki rosły razem od t_0 .

W biofilmach założonych w czasie t_0 jako jednogatunkowe *E. coli* + AA (UA), do których dodawano hodowle planktonowe szczepów *E. cloacae* i *P. aeruginosa*, zanik oddziaływań antagonistycznych nie skutkował zmianami istotnymi statystycznie zwłaszcza w biofilmach, w których do nadkażenia dochodziło na późniejszych etapach wzrostu. Podobnie jak w przypadku biofilmów, w których wszystkie szczepy rosły razem od t_0 , w biofilmach nadkażanych również odnotowano istnienie antagonistycznego oddziaływania na ilość biomasy (rzadziej na aktywność metaboliczną), pomimo prowadzenia hodowli w obecności UA, co może przemawiać za słabszym działaniem antybakteryjnym UA w porównaniu z AA.

Przyszłym kierunkiem badań nad AA i UA jako udokumentowanymi substancjami bioaktywnymi powinno być dokładne zrozumienie mechanizmu działania tych kwasów na komórki bakteryjne. Z dotychczas opublikowanych (i cytowanych w niniejszej pracy) badań wynika, że działanie przeciwbakteryjne AA i UA jest związane ze zmianami w budowie i funkcjonowaniu struktur komórek bakteryjnych (błona komórkowa, adhezyny), morfologią komórek, ekspresją genów (kodujących czynniki wirulencji takie jak fimbrie typu P, fimbrie curli i hydrofobowość) oraz procesami takimi jak adhezja do komórki gospodarza i tworzenie biofilmu. Jednak dokładne mechanizmy molekularne tej aktywności wciąż nie zostały w pełni wyjaśnione.

Warto podkreślić, że dotychczas nie zbadano także wpływu AA i UA na ekspresję ważnych genów, do których należą: geny kodujące cechy warunkujące adhezję bakterii do komórek uroepitelialnych, geny mające istotne znaczenie w procesie tworzenia i rozwoju struktury biofilmu oraz geny kodujące

czynniki wirulencji (m.in. te, które odpowiedzialne są za *quorum sensing*) u bakterii żyjących w biofilmach wielogatunkowych. Ponadto, ok. 25% bakterii Gram-ujemnych (w tym *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*), posiada geny kodujące system sekrecyjny typu VI (T6SS), który bierze udział w interakcji i współzawodnictwie bakteryjnym, tworzeniu biofilmu i transporcie jonów. Układ T6SS to mechanizm molekularny, wykorzystywany do transportu białek efektorowych (np. egzotoksyn) z wnętrza komórki bakteryjnej przez otoczkę komórkową do sąsiedniej komórki docelowej, którą może być komórka prokariotyczna innego drobnoustroju, z którym dana bakteria konkuruje lub (rzadziej) komórka eukariotyczna organizmu gospodarza [57, 117-120]. W tym celu należałoby przeprowadzić ilościową charakterystykę składu gatunkowego biofilmu w zależności od warunków jego hodowli (kwantyfikacja bezwzględna) oraz analizę poziomu transkryptów wybranych genów na poszczególnych etapach wzrostu biofilmów (kwantyfikacja względna). Zorganizowana regulacja ekspresji genów związanych z wirulencją i biofilmem jest ważnym czynnikiem inwazji bakterii, kolonizacji, wzrostu i/lub wytwarzania toksyn. Dlatego charakterystyka tych genów może być przydatna do lepszego zrozumienia patogenezy ZUM, opracowania skutecznych strategii leczenia i zminimalizowania powikłań.

Znając wpływ AA i UA na proces tworzenia biofilmów, w dalszej perspektywie należy zbadać działanie AA i UA na eradykację już istniejących biofilmów, tj. wyznaczyć wartości minimalnego stężenia hamującego rozwój biofilmu (*ang. Minimum Biofilm Inhibitory Concentration, MBIC*) oraz minimalnego stężenia eliminującego/eradykującego biofilm (*ang. Minimum Biofilm Eradication Concentration, MBEC*) wobec biofilmów utworzonych przez różne szczepy uropatogenne. Ponadto, należy brać pod uwagę udowodnione występowanie synergistycznego działania AA i UA z antybiotykami (tj. β -laktamami, tetracyklinami, fluorochinolonami, aminoglikozydami). Tym bardziej konieczne jest zdefiniowanie zasad walidacji działania przeciwbakteryjnego AA i UA oraz przeliczenia siły jego działania *in vitro* na działanie terapeutyczne *in vivo*.

Kolejną kwestią do rozwiązania jest poprawa zauważonej niskiej biodostępności i aktywności biologicznej AA i UA *in vivo*, która ogranicza ich zastosowanie kliniczne. W tym celu należy przeprowadzić modyfikacje strukturalne tych substancji, takie jak projektowanie i synteza nowych pochodnych, zwiększenie rozpuszczalności w wodzie, enkapsulacja w nośnikach (tj. nanostrukturach) etc. Wówczas AA i UA mogłyby służyć jako środki uzupełniające i wspomagające konwencjonalną antybiotykoterapię stosowaną w leczeniu przewlekłych ZUM. Mogłyby również stanowić środek profilaktyczny dla pacjentów mających skłonności do nawracających ZUM. Z uwagi na fakt, że AA i UA działały najlepiej we wczesnych fazach tworzenia biofilmów (tj. 6-48 h), stosowanie preparatów zawierających AA i UA byłoby zasadne w szczególności na początku infekcji.

11. STRESZCZENIA

11.1. Streszczenie w języku polskim

Wstęp: Zakażenia dróg moczowych (ZUM) są w populacji ludzkiej poważnym problemem zdrowotnym ze względu na ich przewlekły i nawracający charakter. Bakterie wywołujące ZUM tworzą wielogatunkowe biofilmy, które są odporne na działanie konwencjonalnie stosowanych antybiotyków. Z uwagi na stale rosnącą liczbę bakterii wielolekoopornych, prowadzone są poszukiwania związków pochodzenia roślinnego o przeciwbakteryjnym mechanizmie działania. Jedną z takich grup stanowią triterpeny pentacykliczne (TP) charakteryzujące się szerokim spektrum właściwości leczniczych. Należące do tej grupy kwas azjatykowy (AA) i kwas ursolowy (UA), wykazują różnorodne aktywności biologiczne, w tym działanie przeciwdrobnoustrojowe. W dostępnej literaturze z ostatnich kilkunastu lat, stosunkowo niewiele wyników badań dotyczy wpływu AA i UA na formy planktonowe i biofilmowe bakterii chorobotwórczych dla człowieka.

Cel pracy: Niniejsza praca doktorska miała na celu szersze zrozumienie działania AA i UA na uropatogenne pałeczki Gram-ujemne (*Escherichia coli* CFT073, *Enterobacter cloacae* ATCC-BAA 2468 i *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25000), zarówno na ich formy planktonowe, jak i na tworzone przez nie biofilmy, również wielogatunkowe. Cel zrealizowano, określając wpływ AA i UA na przeżywalność, zdolność do tworzenia masy biofilmowej oraz aktywność metaboliczną bakterii żyjących w konsorcjach jedno-, dwu- i trzygatunkowych, a także ich wpływ na morfologię komórek bakteryjnych.

Materiały: Szczepy referencyjne wyizolowane z moczu, pochodzące z kolekcji ATCC: *E. coli* CFT 073, *E. cloacae* ATCC-BAA 2468, *P. aeruginosa* ATCC 25000. AA i UA zakupione w firmie Sigma-Aldrich.

Metody: Przeżywalność bakterii ustalono stosując test seryjnych rozcieńczeń. Do oznaczenia ilości wytworzonej biomasy oraz aktywności metabolicznej wykorzystano metody spektrofotometryczne (z użyciem CV i TTC). Obserwację zmian w morfologii komórek bakteryjnych przeprowadzono techniką mikroskopową.

Wyniki: Stwierdzono występowanie antagonistycznych oddziaływań pomiędzy badanymi bakteriami, rosnącymi w biofilmach wielogatunkowych. Następnie wyznaczono wartości MIC oraz MBC dla AA i UA wobec poszczególnych szczepów. Wykazano, że obecność AA i UA w sposób istotny statystycznie wpływa na przeżywalność, ilość masy biofilmowej, aktywność metaboliczną oraz morfologię pałeczek w biofilmach jedno- jak i wielogatunkowych oraz na występowanie stosunków antagonistycznych między badanymi szczepami. Pod wpływem działania AA i UA zaobserwowano zmniejszenie liczebności komórek bakteryjnych, osłabienie zdolności do tworzenia biomasy i zmniejszenie aktywności metabolicznej w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych, a także zmiany

w morfologii komórek bakteryjnych. Analiza porównawcza wszystkich uzyskanych wyników pozwala stwierdzić, że silniejsze działanie bakteriobójcze i antybiofilmowe wykazał AA, natomiast większą redukcję aktywności metabolicznej powodował UA.

Wnioski: W związku z tym, że AA i UA najlepiej działały przeciwko młodym biofilmom, stosowanie preparatów zawierających TP, zwłaszcza w początkowych stadiach infekcji, wydaje się uzasadnione i prawdopodobnie mogłoby stanowić alternatywną strategię dla antybiotykoterapii na tym etapie. Potrzebne są jednak dalsze badania dotyczące AA i UA, zwłaszcza w odniesieniu do mechanizmu ich antibakteryjnego działania. Wyniki badań przeprowadzonych w niniejszej pracy doktorskiej wskazują, że w dłuższej perspektywie AA i UA mogłyby być stosowane w profilaktyce i leczeniu zakażeń bakteryjnych.

11.2. Streszczenie w języku angielskim (*Summary*)

Introduction: Urinary tract infections (UTIs) are a severe health problem in the human population due to their chronic and recurrent nature. Bacteria causing UTIs form multispecies biofilms being resistant to the activity of the conventionally used antibiotics. Due to the ever-increasing number of multidrug-resistant bacteria, research concerning plant-derived compounds with antimicrobial mechanisms of action is being conducted. Pentacyclic triterpenes (TPs), which have a broad spectrum of medicinal properties, are one of such groups. Asiatic acid (AA) and ursolic acid (UA) belong to this group, and exhibit diverse biological action, including antimicrobial activity. In available literature over the past several years, relatively few results of the research concern the influence of AA and UA on planktonic and biofilm forms of pathogenic bacteria.

Aims: Therefore, this doctoral thesis aimed at a broader understanding of the activity of AA and UA against uropathogenic gram-negative rods: *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa* living both form planktonic as well as a biofilm (also multispecies biofilms). The influence of AA and UA on the survival, biofilm mass formation by bacteria living in mono-, dual-, and triple-species consortia as well as the metabolic activity and bacterial cell morphology were determined.

Materials: Reference strains isolated from urine were purchased from ATCC: *E. coli* CFT 073, *E. cloacae* ATCC-BAA 2468, and *P. aeruginosa* ATCC 25000. AA and UA were purchased from Sigma-Aldrich.

Methods: The survival of bacteria was established using the serial dilution assay. The spectrophotometric methods (with CV and TTC) were applied for biofilm mass synthesis and metabolic activity determination. The changes in bacterial cell morphology were observed using the microscopic technique.

Results: The occurrence of antagonistic interactions between studied bacteria growing in multispecies biofilms was found. Then, the MIC and MBC values of AA and UA for tested strains were

determined. It has been shown that AA and UA statistically significant influences survivance, biofilm mass formation, metabolic activity and cell morphology in single- and multispecies biofilms, and the presence of antagonistic relations between tested strains. After incubation of bacteria in the presence of AA and UA, the reduction of bacterial cell number, weakening of the ability to form biofilms and reduction of metabolic activity in single-, dual-, and triple-species consortia, as well as changes in the morphology of bacterial cells were noticed. A comparative analysis of all obtained results demonstrates that AA showed a stronger bactericidal and antibiofilm activities, while UA caused a significant reduction of metabolic activity.

Conclusions: The activity of AA and UA is the best against young biofilms, therefore the use of TP-containing formulations, especially during the initial stages of infection, seems to be reasonable and probably could constitute an alternative strategy to antibiotic therapy at this stage. However, there is a need for further research concerning AA and UA, especially regarding their antibacterial mechanisms of action. The results of the research carried out by this doctoral dissertation indicate that, in the long run, AA and UA can be used in the prevention and treatment of bacterial infectious diseases.

12. WYKAZ SKRÓTÓW; SPIS TABEL, WYKRESÓW, RYSUNKÓW i FOTOGRAFII

- AA** (ang. *asiatic acid*) – kwas azjatykowy
- ABUTI** (ang. *asymptomatic bacteremic UTI*) – bakteriomocz bezobjawowy
- ATCC** (ang. *American Type Culture Collection*) – Amerykańska Kolekcja Kultur Typowych
- BRI** (ang. *biofilm related infections*) – zakażenia związane z powstawaniem biofilmów
- CAUTI** (ang. *catheter-associated urinary tract infections*) – zakażenia układu moczowego u pacjentów zacewnikowanych, odcewnikowe ZUM
- CLSI** (ang. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) – Instytut Norm Klinicznych i Laboratoryjnych
- CFU** (ang. *Colony Forming Units*) – jednostki tworzące kolonię
- CV** (ang. *crystal violet*) – fiolet krystaliczny
- DMSO** (ang. *dimethyl sulfoxide*) – dimetylosulfotlenek, (CH₃)₂SO
- EAU** (ang. *European Association of Urology*) – Europejskie Towarzystwo Urologiczne
- ECM** (ang. *extracellular matrix*) – macierz zewnątrzkomórkowa
- EPS** (ang. *extracellular polymeric substance*) – polisacharydowe substancje zewnątrzkomórkowe, macierz pozakomórkowa
- ESβL** (ang. *extended spectrum β-lactamase*) – β-laktamazy o rozszerzonym spektrum substratowym
- HAUTI** (ang. *hospital-acquired urinary tract infections*) – szpitalne zakażenia układu moczowego
- IDSA** (ang. *Infectious Diseases Society of America*) – Amerykańskie Towarzystwo Chorób Zakaźnych
- MBC** (ang. *Minimal Bactericidal Concentration*) – minimalne stężenie bakteriobójcze; stężenie leku niezbędne do całkowitego zahamowania wzrostu czyli zabicia bakterii
- MBEC** (ang. *Minimum Biofilm Eradication Concentration*) – minimalne stężenie eliminujące/eradykujące biofilm
- MBIC** (ang. *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*) – minimalne stężenie hamujące rozwój biofilmu
- MHB** (ang. *Mueller-Hinton Broth II*) – bulion Mueller-Hintona
- MIC** (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*) – minimalne stężenie hamujące; stężenie leku niezbędne do zahamowania wzrostu bakterii
- OD** (ang. *optical density*) – gęstość optyczna
- ODc** – suma średniej OD dla próby ślepej (podłoża TSB) i 3-krotnego iloczynu odchylenia standardowego średniej OD dla TSB
- OOZN** – niepowikłane ostre odmiedniczkowe zapalenie nerek, *pyelonephritis*
- PAI** (ang. *pathogenicity island*) – chromosomalne wyspy patogenności
- PBS** (ang. *phosphate buffered saline*) – buforowany roztwór soli fizjologicznej
- sub-MIC** (ang. *sub-minimal inhibitory concentration*) – stężenie leku niższe od MIC
- QS** (ang. *quorum sensing*) – mechanizm umożliwiający komunikację między komórkami bakterii
- rpm** (ang. *revolutions per minute*) – liczba obrotów na minutę
- SD** – odchylenie standardowe populacyjne
- TP** – triterpeny pentacykliczne
- TSA** (ang. *Trypticasein Soy Agar*) – agar tryptozowo-sojowy
- TSB** (ang. *Trypticasein Soy Broth*) – bulion tryptozowo-sojowy
- TTC** (ang. *2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride*) – chlorek 2,3,5-trifenylotetrazoliowy
- UA** (ang. *ursolic acid*) – kwas ursolowy
- UPEC** (ang. *Uropathogenic strains of Escherichia coli*) – uropatogenne szczepy *E. coli*
- UTI** (ang. *Urinary Tract Infection*) – zakażenia układu moczowego
- WHO** (ang. *World Health Organization*) – Światowa Organizacja Zdrowia
- ZUM** – Zakażenia Układu Moczowego

- Tabela nr 1.** Przeżywalność szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych.105
- Tabela nr 2.** Przeżywalność szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych biofilmach w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 1) zaznaczono kolorem czerwonym.105
- Tabela nr 3.** Przeżywalność szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa* [CFU/ml] w jednogatunkowych biofilmach w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 1) zaznaczono kolorem czerwonym.106
- Tabela nr 4.** Ilość tworzonego biofilmu w jednogatunkowych hodowlach szczepów *E. coli*, *E. cloacae* i *P. aeruginosa*. ..107

Tabela nr 5. Ilość tworzego biofilmu w jednogatunkowych hodowlach szczepów <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 4) zaznaczono kolorem czerwonym.	107
Tabela nr 6. Ilość tworzego biofilmu w jednogatunkowych hodowlach szczepów <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 4) zaznaczono kolorem czerwonym.	108
Tabela nr 7. Aktywność metaboliczna szczepów <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych.	109
Tabela nr 8. Aktywność metaboliczna szczepów <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 7) zaznaczono kolorem czerwonym.	109
Tabela nr 9. Aktywność metaboliczna szczepów <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych (Tabela nr 7) zaznaczono kolorem czerwonym.	109
Tabela nr 10. Porównanie przeżywalności szczepów <i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i> [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	111
Tabela nr 11. Porównanie przeżywalności szczepów <i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i> [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych biofilmach w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	112
Tabela nr 12. Porównanie przeżywalności szczepów <i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i> [CFU/ml] w dwugatunkowych biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	112
Tabela nr 13. Porównanie przeżywalności szczepów <i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i> [CFU/ml] w jednogatunkowych i dwugatunkowych biofilmach w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	112
Tabela nr 14. Porównanie przeżywalności szczepów <i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i> [CFU/ml] w dwugatunkowych biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	113
Tabela nr 15. Porównanie ilości tworzego biofilmu w hodowlach jednogatunkowych (<i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i>) i dwugatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>). Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	114
Tabela nr 16. Porównanie ilości tworzego biofilmu w hodowlach jednogatunkowych (<i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i>) i dwugatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>) w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	114
Tabela nr 17. Porównanie ilości tworzego biofilmu w hodowlach dwugatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> kontrolnych i w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	115
Tabela nr 18. Porównanie ilości tworzego biofilmu w hodowlach jednogatunkowych (<i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i>) i dwugatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>) w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	115
Tabela nr 19. Porównanie ilości tworzego biofilmu w hodowlach dwugatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> kontrolnych i w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	115
Tabela nr 20. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i>) i dwugatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>) hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	116
Tabela nr 21. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i>) i dwugatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>) hodowlach biofilmowych w obecności AA.	117
Tabela nr 22. Porównanie aktywności metabolicznej dwugatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> biofilmów kontrolnych i hodowanych w obecności AA.	117
Tabela nr 23. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i>) i dwugatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>) hodowlach biofilmowych w obecności UA.	117
Tabela nr 24. Porównanie aktywności metabolicznej dwugatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> biofilmów kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	118

Tabela nr 45. Porównanie ilości tworzonoego biofilmu w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i>) i trzygatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>) hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	132
Tabela nr 46. Porównanie ilości tworzonoego biofilmu w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i>) i trzygatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>) hodowlach biofilmowych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	132
Tabela nr 47. Porównanie ilości tworzonoego biofilmu w trzygatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	132
Tabela nr 48. Porównanie ilości tworzonoego biofilmu w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i>) i trzygatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>) hodowlach biofilmowych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	132
Tabela nr 49. Porównanie ilości tworzonoego biofilmu w trzygatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	133
Tabela nr 50. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i>) i trzygatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>) hodowlach biofilmowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	134
Tabela nr 51. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i>) i trzygatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>) hodowlach biofilmowych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	134
Tabela nr 52. Porównanie aktywności metabolicznej w trzygatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności AA. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	134
Tabela nr 53. Porównanie aktywności metabolicznej w jednogatunkowych (<i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i>) i trzygatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>) hodowlach biofilmowych w obecności UA.	135
Tabela nr 54. Porównanie aktywności metabolicznej w trzygatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> biofilmach kontrolnych i hodowanych w obecności UA.	135
Tabela nr 55. Porównanie przeżywalności <i>E. coli</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	138
Tabela nr 56. Porównanie wpływu AA na przeżywalność <i>E. coli</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	139
Tabela nr 57. Porównanie wpływu UA na przeżywalność <i>E. coli</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	140
Tabela nr 58. Największa redukcja liczby żywych komórek <i>E. coli</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych (a) w obecności AA, (b) w obecności UA.	142
Tabela nr 59. Porównanie przeżywalności <i>E. cloacae</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	143
Tabela nr 60. Porównanie wpływu AA na przeżywalności <i>E. cloacae</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	144
Tabela nr 61. Porównanie wpływu UA na przeżywalności <i>E. cloacae</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	145
Tabela nr 62. Porównanie przeżywalności <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	147
Tabela nr 63. Porównanie wpływu AA na przeżywalności <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	148
Tabela nr 64. Porównanie wpływu UA na przeżywalności <i>P. aeruginosa</i> [CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	149
Tabela nr 65. Porównanie wpływu AA na ilość wytworzonoego biofilmu w monokulturach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	152
Tabela nr 66. Porównanie wpływu AA na ilość wytworzonoego biofilmu w dwu- i trzygatunkowych konsorcjach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	152

Tabela nr 67. Porównanie wpływu UA na ilość wytworzonego biofilmu w monokulturach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	153
Tabela nr 68. Porównanie wpływu UA na ilość wytworzonego biofilmu w konsorcjach dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	154
Tabela nr 69. Największy % redukcji ilości masy biofilmowej w konsorcjach jedno-, dwu- i trzygatunkowych (a) w obecności AA, (b) w obecności UA.	156
Tabela nr 70. Porównanie wpływu AA na aktywność metaboliczną w monokulturach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	157
Tabela nr 71. Porównanie wpływu AA na aktywność metaboliczną w biofilmach dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	158
Tabela nr 72. Porównanie wpływu UA na aktywność metaboliczną w monokulturach. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	159
Tabela nr 73. Porównanie wpływu UA na aktywność metaboliczną w biofilmach dwu- i trzygatunkowych. Różnice istotne statystycznie ($p \leq 0,05$) w odniesieniu do prób kontrolnych zaznaczono kolorem czerwonym.	159
Tabela nr 74. Największy % redukcji aktywności metabolicznej w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych (a) w obecności AA, (b) w obecności UA.	161
Wykres nr 1. Przeżywalność szczepów <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jednogatunkowych w obecności AA (linie przerywane) i UA (linie kropkowane).	106
Wykres nr 2. Ilość tworzonego biofilmu przez szczepy <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> w hodowlach jednogatunkowych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).	108
Wykres nr 3. Aktywność metaboliczna szczepów <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> w jednogatunkowych hodowlach biofilmowych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).	110
Wykres nr 4. Przeżywalność szczepów <i>E. coli</i> i <i>E. cloacae</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach dwugatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i>) w obecności AA (linie przerywane) i UA (linie kropkowane).	113
Wykres nr 5. Ilość tworzonego biofilmu w dwugatunkowych biofilmach <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).	116
Wykres nr 6. Aktywność metaboliczna w dwugatunkowych biofilmach <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).	118
Wykres nr 7. Przeżywalność szczepów <i>E. coli</i> i <i>P. aeruginosa</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach dwugatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i>) w obecności AA (linie przerywane) i UA (linie kropkowane).	122
Wykres nr 8. Ilość tworzonego biofilmu w dwugatunkowych biofilmach <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).	124
Wykres nr 9. Aktywność metaboliczna w dwugatunkowych biofilmach <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).	126
Wykres nr 10. Przeżywalność szczepów <i>E. coli</i> , <i>E. cloacae</i> i <i>P. aeruginosa</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach trzygatunkowych (<i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>) w obecności AA (linie przerywane) i UA (linie kropkowane).	131
Wykres nr 11. Ilości tworzonego biofilmu w trzygatunkowych biofilmach <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami przerywanymi) i UA (słupki kropkowane).	133
Wykres nr 12. Aktywność metaboliczna w trzygatunkowych <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i> biofilmach kontrolnych (słupki jednolite) oraz hodowanych w obecności AA (słupki z liniami poziomymi) i UA (słupki kropkowane).	135
Wykres nr 13. Porównanie przeżywalności <i>E. coli</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	139
Wykres nr 14. Porównanie wpływu AA na przeżywalność bakterii <i>E. coli</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	140
Wykres nr 15. Porównanie wpływu UA na przeżywalność <i>E. coli</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	141
Wykres nr 16. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalność <i>E. coli</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	143
Wykres nr 17. Porównanie przeżywalności <i>E. cloacae</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	144
Wykres nr 18. Porównanie wpływu AA na przeżywalności <i>E. cloacae</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	145
Wykres nr 19. Porównanie wpływu UA na przeżywalności <i>E. cloacae</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	146
Wykres nr 20. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalności <i>E. cloacae</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	147

Wykres nr 21. Porównanie przeżywalności <i>P. aeruginosa</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	148
Wykres nr 22. Porównanie wpływu AA na przeżywalności <i>P. aeruginosa</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	149
Wykres nr 23. Porównanie wpływu UA na przeżywalności <i>P. aeruginosa</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	150
Wykres nr 24. Porównanie wpływu AA i UA na przeżywalności <i>P. aeruginosa</i> [\log_{10} CFU/ml] w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	151
Wykres nr 25. Porównanie wpływu AA na ilość wytworzonego biofilmu w monokulturach.	152
Wykres nr 26. Porównanie wpływu AA na ilość wytworzonego biofilmu w konsorcjach dwu- i trzygatunkowych.	153
Wykres nr 27. Porównanie wpływu UA na ilość wytworzonego biofilmu w monokulturach.	154
Wykres nr 28. Porównanie wpływu UA na ilość wytworzonego biofilmu w konsorcjach dwu- i trzygatunkowych.	155
Wykres nr 29. Porównanie wpływu AA i UA na ilość wytworzonego biofilmu w konsorcjach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	156
Wykres nr 30. Porównanie wpływu AA na aktywność metaboliczną w monokulturach.	157
Wykres nr 31. Porównanie wpływu AA na aktywność metaboliczną w biofilmach dwu- i trzygatunkowych.	158
Wykres nr 32. Porównanie wpływu UA na aktywność metaboliczną w monokulturach.	159
Wykres nr 33. Porównanie wpływu UA na aktywność metaboliczną w biofilmach dwu- i trzygatunkowych.	160
Wykres nr 34. Porównanie wpływu AA i UA na aktywność metaboliczną w biofilmach jedno-, dwu- i trzygatunkowych.	161
Rysunek nr 1. Etapy tworzenia biofilmu (opis w tekście).	13
Rysunek nr 2. Schematy mikropłytek 96-dółkowych dla hodowli biofilmowych. (A) – próby kontrolne; (B) – próby badane w obecności AA; (C) – próby badane w obecności UA. Objasnienia symboli: E – <i>E. coli</i> , C – <i>E. cloacae</i> , P – <i>P. aeruginosa</i> , EC – <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> , EP – <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> , ECP – <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	23
Rysunek nr 3. Schemat doświadczenia dla hodowli biofilmowych jedno-, dwu- i trzygatunkowych. Objasnienia symboli jak pod Rysunkiem nr 2.	24
Rysunek nr 4. Schemat przedstawiający dwa badane modele biofilmów dwu- i trzygatunkowych. Różowe ramki obejmują badania wchodzące w zakres artykułów nr 2 i 3 (dotyczą biofilmów, w których wszystkie szczepy rosły razem od czasu t_0). Badania dodatkowe omawiane w niniejszym podrozdziale znajdują się poza zakresem różowych ramek i dotyczą biofilmów, w których <i>E. cloacae</i> i/lub <i>P. aeruginosa</i> dodawane były po 6, 24, 48 lub 72 h do już istniejącej (założonej w czasie t_0) hodowli <i>E. coli</i> . Odczytów i pomiarów dokonywano w punktach oznaczonych ★. Objasnienia symboli: C – <i>E. cloacae</i> , P – <i>P. aeruginosa</i>	166
Zdjęcie nr 1. Kolory kolonii badanych szczepów na podłożu różnicującym.	25
Zdjęcie nr 2. Ilość wytworzonej biomasy w biofilmach 72-godzinnych, kontrolnych (A, B) i hodowanych w obecności AA (C, D). Objasnienia symboli: E – <i>E. coli</i> , C – <i>E. cloacae</i> , P – <i>P. aeruginosa</i> , EC – <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> , EP – <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> , ECP – <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	26
Zdjęcie nr 3. Ilość wytworzonego trifenyloformazanu w biofilmach 72-godzinnych, kontrolnych (A, B) i hodowanych w obecności AA (C, D). Objasnienia symboli: E – <i>E. coli</i> , C – <i>E. cloacae</i> , P – <i>P. aeruginosa</i> , EC – <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> , EP – <i>E. coli</i> + <i>P. aeruginosa</i> , ECP – <i>E. coli</i> + <i>E. cloacae</i> + <i>P. aeruginosa</i>	27

13. BIBLIOGRAFIA

- [1]. Loubet, P.; Ranfaing, J.; Dinh, A.; Dunyach-Remy, C.; Bernard, L.; Bruyère, F.; Lavigne, J.P.; Sotto, A. Alternative therapeutic options to antibiotics for the treatment of urinary tract infections. *Front Microbiol.* **2020**, *11*, 1509.
- [2]. James, J.T.; Dubery, I.A. Pentacyclic triterpenoids from the medicinal herb, *Centella asiatica* (L.) Urban. *Molecules* **2009**, *14*, 3922–3941.
- [3]. Jäger, S.; Trojan, H.; Kopp, T.; Laszczyk, M.N.; Scheffler, A. Pentacyclic triterpene distribution in various plants – rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. *Molecules* **2009**, *14*, 2016–2031.
- [4]. Sun, B.; Wu, L.; Wu, Y.; Zhang, C.; Qin, L.; Hayashi, M.; Kudo, M.; Gao, M.; Liu, T. Therapeutic potential of *Centella asiatica* and its triterpenes: a review. *Front. Pharmacol.* **2020**, *11*, 568032.
- [5]. Lv, J.; Sharma, A.; Zhang, T.; Wu, Y.; Ding, X. Pharmacological review on asiatic acid and its derivatives: a potential compound. *SLAS Technol.* **2018**, *23*, 111–127.
- [6]. Nagoor Meeran, M.F.; Goyal, S.N.; Suchal, K.; Sharma, C.; Patil, C.R.; Ojha, S.K. Pharmacological properties, molecular mechanisms, and pharmaceutical development of asiatic acid: a pentacyclic triterpenoid of therapeutic promise. *Front. Pharmacol.* **2018**, *9*, 892.
- [7]. Liew, K.Y.; Hafiz, M.F.; Chong, Y.J.; Harith, H.H.; Israf, D.A.; Tham, C.L. A review of malaysian herbal plants and their active constituents with potential therapeutic applications in sepsis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2020**, *2020*, 8257817.
- [8]. Jesus, J.A.; Lago, J.H.; Laurenti, M.D.; Yamamoto, E.S.; Passero, L.F. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2015**, *2015*, 620472.
- [9]. Woźniak, Ł.; Skąpska, S.; Marszałek, K. Ursolic acid—a pentacyclic triterpenoid with a wide spectrum of pharmacological activities. *Molecules* **2015**, *20*, 20614.
- [10]. Kashyap, D.; Tuli, H.S.; Sharma, A.K. Ursolic acid (UA): a metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci.* **2016**, *146*, 201–213.
- [11]. Navina, R.; Lee, Y.G.; Kim, S.M. Molecular biological roles of ursolic acid in the treatment of human diseases. *Curr. Bioact. Compd.* **2017**, *13*, 177–185.
- [12]. López-Hortas, L.; Pérez-Larrán, P.; González-Muñoz, M.J.; Falqué, E.; Domínguez, H. Recent developments on the extraction and application of ursolic acid. A review. *Food Res. Int.* **2018**, *103*, 130–149.
- [13]. Pironi, A.M.; de Araújo, P.R.; Fernandes, M.A.; Salgado, H.R.N.; Chorilli, M. Characteristics, biological properties and analytical methods of ursolic acid: A review. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2018**, *48*, 86–93.
- [14]. Mlala, S.; Oyedeji, A.O.; Gondwe, M.; Oyedeji, O.O. Ursolic acid and its derivatives as bioactive agents. *Molecules* **2019**, *24*, 2751.
- [15]. Sycz, Z.; Tichaczek-Goska, D.; Wojnicz, D. Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes – asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals. *Biomolecules* **2022**, *12*, 98.
- [16]. Lyu, X.; Wang, L.; Shui, Y.; Jiang, Q.; Chen, L.; Yang, W.; He, X.; Zeng, J.; Li, Y. Ursolic acid inhibits multi-species biofilms developed by *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, and *Streptococcus gordonii*. *Arch. Oral Biol.* **2021**, *125*, 105107.
- [17]. Sycz, Z.; Tichaczek-Goska, D.; Jezierska-Domaradzka, A.; Wojnicz, D. Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient – asiatic acid? *Biomolecules* **2021**, *11*, 1754.

- [18]. Sycz, Z.; Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D. Does secondary plant metabolite ursolic acid exhibit antibacterial activity against uropathogenic *Escherichia coli* living in single- and multispecies biofilms? *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1691.
- [19]. Chi, J.; Sun, L.; Cai, L.; Fan, L.; Shao, C.; Shang, L.; Zhao, Y. Chinese herb microneedle patch for wound healing. *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 3507–3514.
- [20]. Liu, Y.; Huang, Y.; Fan, C.; Chi, Z.; Bai, M.; Sun, L.; Yang, L.; Yu, C.; Song, Z.; Yang, X.; et al. Ursolic acid targets glucosyltransferase and inhibits its activity to prevent *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 743305.
- [21]. McLellan, L.K.; Hunstad, D.A. Urinary tract infection: pathogenesis and outlook. *Trends. Mol. Med.* **2016**, *22*, 946–957.
- [22]. Tandogdu, Z.; Wagenlehner, F.M. Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2016**, *29*, 73–79.
- [23]. Subashchandrabose, S.; Mobley, H.L.T. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **2015**, *3*, 10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.
- [24]. Schlegel, H.G. Mikrobiologia ogólna. PWN, Warszawa, **2003**.
- [25]. Murray, P.R.; Rosenthal, K.S.; Pfaller, M.A. Mikrobiologia. Elsevier Urban & Partner, Wrocław, **2005**.
- [26]. Różalska, M. Tlenowe pałeczki Gram-ujemne. Pałeczki jelitowe - *Enterobacteriaceae*. W: Szewczyk, E.M. *Diagnostyka bakteriologiczna*. PWN, Warszawa, **2005**.
- [27]. Johnson, D.I. Bacterial pathogens and their virulence factors. Springer International Publishing AG, **2018**.
- [28]. Lüthje, P.; Brauner, A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv Microb Physiol.* **2014**, *65*, 337–372.
- [29]. Burrows, L.L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. *Annu Rev Microbiol.* **2012**, *66*, 493–520.
- [30]. Berne, C.; Ducret, A.; Hardy, G.G.; Brun, Y.V. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol Spectr.* **2015**, *3*, 4, 10.1128/microbiolspec.MB-0018-2015.
- [31]. Madsen, J.S.; Burmølle, M.; Hansen, L.H.; Sørensen, S.J. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. *FEMS. Immunol. Med. Microbiol.* **2012**, *65*, 183–195.
- [32]. Behzadi, P. Uropathogenic *Escherichia coli* and fimbrial adhesins virulome. In: Jarzembowski, T.; Dąca A.; Dębska-Ślizień, M.A. (eds.) Urinary tract infection - the result of the strength of the pathogen, or the weakness of the host. *IntechOpen*, London, **2018**.
- [33]. Spurbeck, R.R.; Mobley, H.L.T. Uropathogenic *Escherichia coli*. In: Donnenberg, M.S. (eds.) *Escherichia coli*. Pathotypes and principles of pathogenesis. *Academic Press*, **2013**.
- [34]. Ribić, R.; Meštrović, T.; Neuberg, M.; Kozina, G. Effective anti-adhesives of uropathogenic *Escherichia coli*. *Acta Pharm.* **2018**, *68*, 1–18.
- [35]. Baldy-Chudzik, K.; Bok, E.; Mazurek, J. Znane i nowe warianty patogennych *Escherichia coli* jako konsekwencja plastycznego genomu. *Postepy Hig Med Dosw.* **2015**, *69*, 345–361.
- [36]. Li, X.; Zhou, K.; Wang, J.; Guo, J.; Cao, Y.; Ren, J.; Guan, T.; Sheng, W.; Zhang, M.; Yao, Z.; Wang, Q. Diagnostic value of the fimbriae distribution pattern in localization of urinary tract infection. *Front Med (Lausanne)*. **2021**, *8*, 602691.

- [37]. Bien, J.; Sokolova, O.; Bozko, P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol.* **2012**, *2012*, 681473.
- [38]. Davin-Regli, A., Lavigne, J.P.; Pagès, J.M. *Enterobacter* spp.: Update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev.* **2019**, *32*, e00002-19.
- [39]. Davin-Regli, A.; Pagès, J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*, 392.
- [40]. Nikonorow, E.; Baraniak, A.; Gniadkowski M. Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki beta-laktamowe wynikająca z wytwarzania beta-laktamaz. *Post. Mikrobiol.* **2013**, *52*, 261–271.
- [41]. Azevedo, P.A.A.; Furlan, J.P.R.; Oliveira-Silva, M.; Nakamura-Silva, R.; Gomes, C.N.; Costa, K.R.C.; Stehling, E.G.; Pitondo-Silva, A. Detection of virulence and β -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. *Braz J Microbiol.* **2018**, *49*, Suppl 1, 224–228.
- [42]. Alhede, M.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Alhede, M. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: mechanisms of immune evasion. *Adv Appl Microbiol.* **2014**, *86*, 1–40.
- [43]. Franklin, M.J.; Nivens, D.E.; Weadge, J.T.; Howell, P.L. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol.* **2011**, *2*, 167.
- [44]. Qin, S.; Xiao, W.; Zhou, C.; Pu, Q.; Deng, X.; Lan, L.; Liang, H.; Song, X.; Wu, M. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* **2022**, *7*, 199.
- [45]. Moradali, M.F.; Ghods, S.; Rehm, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. *Front Cell Infect Microbiol.* **2017**, *7*, 39.
- [46]. Thi, M.T.T.; Wibowo, D.; Rehm, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Mol Sci.* **2020**, *21*, 8671.
- [47]. Bitsori, M.; Maraki, S.; Koukouraki, S.; Galanakis, E. *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infection in children: risk factors and outcomes. *J Urol.* **2012**, *187*, 260–264.
- [48]. Mittal, R.; Aggarwal, S.; Sharma, S.; Chhibber, S.; Harjai, K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview. *J Infect Public Health.* **2009**, *2*, 101–111.
- [49]. Gellatly, S.L.; Hancock, R.E. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis.* **2013**, *67*, 159–173.
- [50]. Newman, J.W.; Floyd, R.V.; Fothergill, J.L. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. *FEMS Microbiol Lett.* **2017**, *364*, 15.
- [51]. Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S, Kumargowda ST, Challapilli SB. Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol (Praha).* **2018**, *63*, 413–432.
- [52]. Krause, K.; Milewska, K.; Szalewska-Pałasz A. Rola komponentów odpowiedzi ścisłej w regulacji wirulencji. *Post Mikrobiol.* **2019**, *58*, 247–258.
- [53]. Wolska, K.; Kot, B.; Piechota, M.; Frankowska, A. Oporność *Pseudomonas aeruginosa* na antybiotyki. *Postepy Hig Med Dosw.* **2013**, *67*, 1300–1311.
- [54]. Santajit, S.; Indrawattana, N. Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens. *Biomed Res Int.* **2016**, *2016*, 2475067.

- [55]. Totsika, M.; Moriel, D.G.; Idris, A.; Rogers, B.A.; Wurpel, D.J.; Phan, M.D.; Paterson, D.L.; Schembri, M.A. Uropathogenic *Escherichia coli* mediated urinary tract infection. *Curr Drug Targets*. **2012**, *11*, 1386–1399.
- [56]. Solano, C.; Echeverz, M.; Lasa, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Curr Opin Microbiol*. **2014**, *18*, 96–104.
- [57]. Tashiro, Y.; Yawata, Y.; Toyofuku, M.; Uchiyama, H.; Nomura, N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes Environ*. **2013**, *1*, 13–24.
- [58]. Pena, R.T.; Blasco, L.; Ambroa, A.; González-Pedrajo, B.; Fernández-García, L.; López, M.; Bleriot, I.; Bou, G.; García-Contreras, R.; Wood, T.K.; Tomás, M. Relationship between quorum sensing and secretion systems. *Front. Microbiol*. **2019**, *10*, 1100.
- [59]. Hall, C.W.; Mah, T.F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. **2017**, *41*, 276–301.
- [60]. Moryl, M. Egzopolimery macierzy biofilmu jako czynniki wirulencji mikroorganizmów w rozwoju chorób człowieka. *Postepy Hig Med Dosw*. **2015**, *69*, 1485–1498.
- [61]. Limoli, D.H.; Jones, C.J.; Wozniak, D.J. Bacterial extracellular polysaccharides in biofilm formation and function. *Microbiol Spectr*. **2015**, *3*, 10.1128/microbiolspec.MB-0011-2014.
- [62]. Laverty, G.; Gorman, S.P.; Gilmore, B.F. Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens* **2014**, *3*, 596–632.
- [63]. Geesey, G.G.; Richardson, W.T.; Yeomans, H.G.; Irvin, R.T.; Costerton, J.W. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Can J Microbiol*. **1977**, *23*, 1733–1736.
- [64]. McCoy, W.F.; Bryers, J.D.; Robbins, J.; Costerton, J.W. Observations of fouling biofilm formation. *Can J Microbiol* **1981**, *27*, 910–917.
- [65]. Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. **1999**, *284*, 1318–1322.
- [66]. Stoodley, P.; Sauer, K.; Davies, D.G.; Costerton, J.W. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol*. **2002**, *56*, 187–209.
- [67]. Bjarnsholt, T. Introduction to biofilms. In: Bjarnsholt, T.; Jensen, P.; Moser, C.; Høiby, N. (eds.) *Biofilm infections*. New York: Springer, **2011**, 1–9.
- [68]. Elias, S.; Banin, E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol. Rev*. **2012**, *36*, 990–1004.
- [69]. Okshevsky, M.; Meyer, R.L. The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Crit Rev Microbiol*. **2015**, *41*, 341–352.
- [70]. Rendueles, O.; Ghigo, J.M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS. Microbiol. Rev*. **2012**, *36*, 972–989.
- [71]. Musk, D.J.; Hergenrother, P.J. Chemical counter measures for the control of bacterial biofilms: Effective compounds and promising targets. *Curr. Med. Chem*. **2006**, *13*, 2163.
- [72]. Neethirajan, S.; Clond, M.A.; Vogt, A. Medical biofilms – nanotechnology approaches. *J Biomed Nanotechnol*. **2014**, *10*, 2806–2827.
- [73]. Soto, S.M. Importance of biofilms in urinary tract infections: new therapeutic approaches. *Adv. Biol*. **2014**, Article ID 543974.

- [74]. Luo, A.; Wang, F.; Sun, D.; Liu, X.; Xin, B. Formation, development, and cross-species interactions in biofilms. *Front Microbiol.* **2022**, *12*, 757327.
- [75]. Ballén V, Cepas V, Ratia C, Gabasa Y, Soto SM. Clinical *Escherichia coli*: from biofilm formation to new antibiofilm strategies. *microorganisms.* **2022**, *10*, 1103.
- [76]. Serra, D.O.; Richter, A.M.; Klauck, G.; Mika, F.; Hengge, R. Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *mBio* **2013**, *4*, e00103–13.
- [77]. Singh, S.; Singh, S.K.; Chowdhury, I.; Singh, R. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *Open Microbiol J.* **2017**, *11*, 53–62.
- [78]. Chmielewska, S.J.; Leszczyńska K. Rola i znaczenie wybranych czynników wirulencji determinujących chorobotwórczość uropatogennych szczepów *Escherichia coli*. *Post Mikrobiol.* **2020**, *59*, 25–37.
- [79]. Azevedo, A.S.; Almeida, C.; Melo, L.F.; Azevedo, N.F. Impact of polymicrobial biofilms in catheter-associated urinary tract infections. *Crit Rev Microbiol.* **2017**, *43*, 423–439.
- [80]. Olsen I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *34*, 877–886.
- [81]. Gollan, B.; Grabe, G.; Michaux, C.; Helaine, S. Bacterial persisters and infection: past, present, and progressing. *Annu. Rev. Microbiol.* **2019**, *73*, 359–385.
- [82]. Sharma, D.; Misba, L.; Khan, A.U. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. *Antimicrob Resist Infect Control.* **2019**, *8*, 76.
- [83]. Aka, S.T.; Haji, S.H. Sub-MIC of antibiotics induced biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* in the presence of chlorhexidine. *Braz J Microbiol.* **2015**, *46*, 149–154.
- [84]. di Martino P: Extracellular polymeric substances, a key element in understanding biofilm phenotype. *AIMS Microbiol* **2018**, *4*, 274–288.
- [85]. Hamadi, F.; Latrache, H.; Zahir, H.; Elghmari, A.; Timinouni, M.; Ellouali, M. The relation between *Escherichia coli* surface functional groups' composition and their physicochemical properties. *Braz. J. Microbiol.* **2008**, *39*, 10–15.
- [86]. Gebreyohannes, G.; Nyerere, A.; Bii, C.; Sbhata, D.B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* **2019**, *5*, e02192.
- [87]. Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 322–332.
- [88]. Brady, A.J.; Laverty, G.; Gilpin, D.F.; Kearney, P.; Tunney, M. Antibiotic susceptibility of planktonic- and biofilm-grown staphylococci isolated from implant-associated infections: should MBEC and nature of biofilm formation replace MIC? *J. Med. Microbiol.* **2017**, *66*, 461–469.
- [89]. Ramos-Vivas, J.; Chapartegui-González, I.; Fernández-Martínez, M.; González-Rico, C.; Fortún, J.; Escudero, R.; Marco, F.; Linares, L.; Montejo, M.; Aranzamendi, M.; Muñoz, P.; Valerio, M.; Aguado, J.M.; Resino, E.; Ahufinger, I.G.; Vega, A.P.; Martínez-Martínez, L.; Fariñas, M.C.; ENTHERE Study Group; the Group for Study of Infection in Transplantation of the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (GESITRA-SEIMC); the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Biofilm formation by multidrug resistant *Enterobacteriaceae* strains isolated from solid organ transplant recipients. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 8928.
- [90]. Bermingham, S.; Ashe, J. Systematic review of the impact of urinary tract infections on health-related quality of life. *BJU Int.* **2012**, *110*, 830–836.
- [91]. Bonkat, G.; Bartoletti, R.; Bruyère, F.; Cai, T.; Geerlings, S.E.; Köves, B.; Schubert, S.; Pilatz, A.; Veeratterapillay, R.; Wagenlehner, F. EAU Guidelines on Urological Infections. *European Association of Urology* **2022**.

- [92]. Chmielewska, S.J.; Fiedoruk, K.; Daniluk, T.; Ściepuk, M.; Kaczmarzyk, D.; Leszczyńska K. Znaczenie uropatogennych szczepów *Escherichia coli* (UPEC) w etiopatogenezie zakażeń układu moczowego. *Post Mikrobiol.* **2016**, *55*, 45–56.
- [93]. Hryniewicz, W.; Holeccki, M. Rekomendacje diagnostyki, terapii i profilaktyki zakażeń układu moczowego u dorosłych. *Narodowy Instytut Leków, Warszawa* **2015**.
- [94]. Urinary Tract Infection (Catheter-Associated Urinary Tract Infection [CAUTI] and Non-Catheter-Associated Urinary Tract Infection [UTI]) Events. *Centers for Diseases Control and Prevention. National Healthcare Safety Network*. January **2022**.
- [95]. Goulart, D.B. Urinary tract infection caused by antibiotic-resistant uropathogenic *Escherichia coli*: a major public health concern. *Res., Soc. Dev.* **2021**, *10*, e34101623190.
- [96]. Zalewska-Piątek, B.; Piątek, R.; Krawczyk, B.; Olszewski, M. Patomechanizm zakażeń dróg moczowych wywoływanych przez uropatogenne szczepy *E. coli*. *Postepy Hig Med Dosw.* **2019**, *73*, 269–281.
- [97]. Hooton T.M. Urinary tract infection in adults. In: Feehally, J.; Floege, J.; Tonelli, M.; Johnson, R. *Comprehensive Clinical Nephrology* (6th edition), Elsevier, **2019**.
- [98]. Ostrowska, K.; Strzelczyk, A.; Różalski, A.; Stączek, P. Biofilm bakteryjny jako przyczyna zakażeń układu moczowego – mikroorganizmy patogenne, metody prewencji i eradykacji. *Postepy Hig Med Dosw* **2013**, *67*, 1027–1033.
- [99]. Dzierżanowska, D.: Zakażenia szpitalne. *Alfa-Medica Press, Bielsko-Biała* **2008**.
- [100]. Flores-Mireles, A.; Hreha, T.N.; Hunstad, D.A. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Top Spinal Cord Inj Rehabil.* **2019**, *25*, 228–240.
- [101]. Flores-Mireles, A.L.; Walker, J.N.; Caparon, M.; Hultgren, S.J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* **2015**, *13*, 269–284.
- [102]. Gould, C.V.; Umscheid, C.A.; Agarwal, R.K.; Kuntz, G.; Pegues, D.A. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for Prevention of Catheter-associated Urinary Tract Infection. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/cauti/> [Last update: June 6, **2019**].
- [103]. Hooton, T. M.; Bradley S. F.; Cardenas, D. D.; Colgan, R.; Geerlings, S.E.; Rice, J.C.; Saint, S.; Schaeffer, A.J.; Tambayh, P.A.; Tenke, P.; Nicolle, L.E.; Infectious Diseases Society of America. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **2010**, *50*, 625–663.
- [104]. Lee, H.S.; Le, J. Infectious Diseases. Urinary Tract Infections. *American College of Clinical Pharmacy. Pharmacotherapy Self-Assessment Program (PSAP)* **2018**
- [105]. Wojnicz, D.; Kicia, M.; Tichaczek-Goska, D. Effect of asiatic and ursolic acids on morphology, hydrophobicity and adhesion of UPECs to uroepithelial cells. *Folia Microbiol.* **2013**, *58*, 245–252.
- [106]. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Kicia, M. Effect of asiatic and ursolic acids on growth and virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Turk. J. Biol.* **2013**, *37*, 556–564.
- [107]. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Kicia, M. Pentacyclic triterpenes combined with ciprofloxacin help to eradicate the biofilm formed in vitro by *Escherichia coli*. *Indian J. Med. Res.* **2015**, *141*, 343–353.
- [108]. Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D.; Korzekwa, K.; Kicia, M.; Hendrich, A. Anti-enterococcal activities of pentacyclic triterpenes. *Adv. Clin. Exp. Med.* **2017**, *26*, 483–490.

- [109]. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically*. 11th ed. CLSI standard M07. Wayne, PA, USA, **2018**.
- [110]. di Bonaventura, G.; Spedicato, I.; D'Antonio, D.; Robuffo, I.; Piccolomini, R. Biofilm formation by *Stenotrophomonas maltophilia*: modulation by quinolones, trimethoprim, sulfamethoxazole, and ceftazidime. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2004**, *48*, 151–160.
- [111]. O'Toole, G.A.; Kolter, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30*, 295–304.
- [112]. Stepanović, S.; Vuković, D.; Hola, V.; Di Bonaventura, G.; Djukić, S.; Cirković, I.; Ruzicka, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *APMIS* **2007**, *115*, 891–899.
- [113]. Singh, A.K.; Prakash, P.; Achra, A.; Singh, G.P.; Das, A.; Singh, R.K. Standardization and classification of *in vitro* biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *J. Global. Infect. Dis.* **2017**, *9*, 93–101.
- [114]. Kim, S.; Kim, M.J.; Kang, H.Y.; Seol, S.Y.; Cho, D.T.; Kim, J. A simple colorimetric method for testing antimicrobial susceptibility of biofilmed bacteria. *J. Microbiol.* **2010**, *48*, 709–711.
- [115]. Sabaeifard, P.; Abdi-Ali, A.; Soudi, M.R.; Dinarvand, R. Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. *J. Microbiol. Methods.* **2014**, *105*, 134–140.
- [116]. Haney, E.F.; Trimble, M.J.; Cheng, J.T.; Vallé, Q.; Hancock, R.E.W. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules* **2018**, *8*, 29.
- [117]. Chen, L.; Zou, Y.; She, P.; Wu, Y. Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Res.* **2015**, *172*, 19–25.
- [118]. Ho, B.T.; Dong, T.G.; Mekalanos, J.J. A view to a kill: the bacterial Type VI Secretion System. *Cell Host Microbe.* **2014**, *15*, 9–21.
- [119]. Navarro-Garcia, F.; Ruiz-Perez, F.; Cataldi, Á.; Larzábal, M. Type VI secretion system in pathogenic *Escherichia coli*: structure, role in virulence, and acquisition. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1965.
- [120]. Ruiz-Perez, F.; Nataro, J.P. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cell Mol Life Sci.* **2014**, *71*, 745–770.

14. NOTA BIOGRAFICZNA i DOROBK NAUKOWY DOKTORANTKI

Zuzanna Ewa Sycz

Doktorantka w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu (dziedzina: nauki medyczne; dyscyplina: biologia medyczna; specjalność: mikrobiologia).

Absolwentka dwóch kierunków studiów stacjonarnych: **mgr biotechnologii** (Uniwersytet Wrocławski, Wydział Biotechnologii, kierunek: biotechnologia, specjalność: biotechnologia medyczna, 2011 r.) oraz **mgr farmacji** (Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej, kierunek: farmacja, 2010 r.).

Autorka: 4 artykułów w czasopismach naukowych posiadających Impact Factor (w tym 3 jako pierwszy autor), 4 autorskich artykułów w czasopismach naukowych nieposiadających Impact Factor, 1 autorskiej monografii naukowej i 13 rozdziałów w monografiach (w tym 3 autorskich i 6 jako pierwszy autor) oraz 53 streszczeń zjazdowych (23 z konferencji w jęz. angielskim i 30 z konferencji krajowych). Sumaryczny IF: **21,625**, pkt. MNiSW: **515,00**.

Podczas studiów doktoranckich uzyskała i zrealizowała Grant dla Młodych Naukowców (nr Simple: STM.A060.20.060); otrzymywała stypendium JM Rektora dla najlepszych doktorantów; była członkiem Koła Naukowego Doktorantów, Samorządu Doktorantów (m.in. jako przewodnicząca Komisji Wyborczej), Komitetów Organizacyjnych III i IV edycji Wrocławskich Dni Doktoranta oraz I Ogólnopolskiej Doktoranckiej Konferencji Interdyscyplinarnej oraz działała na rzecz popularyzacji nauki, aktywnie uczestnicząc w organizacji XXII i XXIII edycji Dolnośląskiego Festiwalu Nauki.

Publikacje w czasopismach naukowych posiadających Impact Factor

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty MNiSW	Typ KBN
1.	Study on the influence of cranberry extract Żuravit S·O·S® on the properties of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. [AUT.] DOROTA WOJNICZ, ZUZANNA SYCZ, STEFAN WALKOWSKI, JANINA GABRIELSKA, ALEKSANDRA WŁOCH, ALICJA KUCHARSKA, ANNA SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, ANDRZEJ B. HENDRICH. <i>Phytomedicine</i> 2012 Vol.19 no.6 s.506-514, ryc., tab., bibliogr. 57 poz., summ. DOI: 10.1016/j.phymed.2011.12.013	2,972	35	praca oryginalna
2.	Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient - asiatic acid?. [AUT.] ZUZANNA SYCZ, [AUT. KORESP.] DOROTA TICHACZEK-GOSKA, [AUT.] ANNA JEZIERSKA-DOMARADZKA, DOROTA WOJNICZ. <i>Biomolecules</i> 2021 Vol.11 no.12 art.1754 [24 s.], ryc., tab., bibliogr. 59 poz., summ. DOI: 10.3390/biom11121754	6,064	100	praca oryginalna
3.	Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes - asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals. [AUT.] ZUZANNA SYCZ, [AUT. KORESP.] DOROTA TICHACZEK-GOSKA, [AUT.] DOROTA WOJNICZ. <i>Biomolecules</i> 2022 Vol.12 no.1 art.98 [29 s.], ryc., tab., bibliogr. 110 poz., summ. DOI: 10.3390/biom12010098	6,064	100	praca przeglądowa
4.	Does secondary plant metabolite ursolic acid exhibit antibacterial activity against uropathogenic <i>Escherichia coli</i> living in single- and multispecies biofilms? [AUT.] ZUZANNA SYCZ, [AUT. KORESP.] DOROTA WOJNICZ, [AUT.] DOROTA TICHACZEK-GOSKA. <i>Pharmaceutics</i> 2022 Vol.14 no.8 art.1691 [20 s.], ryc., bibliogr. 101 poz., summ. DOI: 10.3390/pharmaceutics14081691	6,525	100	praca oryginalna

Publikacje w czasopismach naukowych nieposiadających Impact Factor

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty MNiSW	Typ KBN
1.	Charakterystyka antocyjanin z owoców żurawiny. Właściwości chemiczne, farmakokinetyczne i farmakologiczne (Characteristics of anthocyanins from cranberry fruits. Chemical, pharmacokinetic and pharmacological properties). [AUT.] ZUZANNA SYCZ. Probl.Nauk Med.Nauk Zdr.Teoria Prakt. 2019 nr 1 s.19-27, ryc., tab., bibliogr. 37 poz., streszcz., summ.	0	5	praca przeglądowa
2.	Przeciwbakteryjne działanie antocyjanin z owoców żurawiny (Antimicrobial action of anthocyanins from cranberry fruits). [AUT.] ZUZANNA SYCZ. Probl.Nauk Med.Nauk Zdr.Teoria Prakt. 2019 nr 1 s.12-18, bibliogr. 57 poz., streszcz., summ.	0	5	praca przeglądowa
3.	Przeciwutleniające działanie antocyjanin z owoców żurawiny (Antioxidant action anthocyanins from cranberry fruits). [AUT.] ZUZANNA SYCZ. Probl.Nauk Med.Nauk Zdr.Teoria Prakt. 2019 nr 2 s.3-8, bibliogr. 28 poz., streszcz., summ.	0	5	praca przeglądowa
4.	Hipolipemiczne i antyadipogenne działanie antocyjanin z owoców żurawiny (Hypolipidemic and antiadipogenic activity of anthocyanins from cranberry fruits). [AUT.] ZUZANNA SYCZ. Probl.Nauk Med.Nauk Zdr.Teoria Prakt. 2019 nr 2 s.9-15, bibliogr. 27 poz., streszcz., summ.	0	5	praca przeglądowa

Autorstwo monografii naukowej

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty MNiSW	Typ KBN
1.	Optimalizacja terapii takrolimusem u chorych po przeszczepie nerki. [AUT.] ZUZANNA SYCZ. Wrocław 2018 , Exante, 133 s., ryc., tab., bibliogr. 126 poz., 978-83-65374-89-9.	0	80	inne

Autorstwo rozdziałów w monografiach naukowych

Lp.	Opis bibliograficzny	IF	Punkty MNiSW	Typ KBN
1.	Produkcja przeciwciał i szczepionek w roślinach (Production of antibodies and vaccines in plants). [AUT.] ZUZANNA SYCZ. W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Część VI Poznań 2018 , Młodzi Naukowcy, s.104-110, bibliogr., streszcz, 978-83-66139-26-8.	0	5	inne
2.	Chemoprewencja nowotworów (Chemoprevention of tumors). [AUT.] ZUZANNA SYCZ, MATYLDA CZOSNYKOWSKA-ŁUKACKA. W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Część VI Poznań 2018 , Młodzi Naukowcy, s.111-117, bibliogr., streszcz, 978-83-66139-26-8.	0	5	inne

3.	Biofilm bakteryjny wielogatunkowy - metody badania i wizualizacji na powierzchniach abiotycznych. Część I - przegląd metod barwiących i metabolicznych (Multispecies bacterial biofilm - research and visualization methods on abiotic surfaces. Part I - staining and metabolic assays). [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: ochrona środowiska. Część I Poznań 2019 , Młodzi Naukowcy, s.47-54, bibliogr., streszcz, 978-83-66139-98-5.	0	5	inne
4.	Biofilm bakteryjny wielogatunkowy - metody badania i wizualizacji na powierzchniach abiotycznych. Część II - przegląd metod genetycznych i fizycznych (Multispecies bacterial biofilm - research and visualization methods on abiotic surfaces. Part I - genetic and physical assays). [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: ochrona środowiska. Część I Poznań 2019 , Młodzi Naukowcy, s.55-61, bibliogr., streszcz, 978-83-66139-97-8.	0	5	inne
5.	Biofilm bakteryjny wielogatunkowy - metody badania i wizualizacji na powierzchniach abiotycznych. Część III - przegląd metod mikroskopowych (Multispecies bacterial biofilm - research and visualization methods on abiotic surfaces. Part III - microscopy assays). [AUT.] ZUZANNA SYCZ , MONIKA SĘPEK . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki przyrodnicze. Część IV Poznań 2019 , Młodzi Naukowcy, s.178-184, bibliogr., streszcz, 978-83-66392-37-3.	0	5	inne
6.	Bakteryjne modułowe syntazy poliketydowe (Bacterial modular polyketide synthases). [AUT.] ZUZANNA SYCZ , MONIKA SĘPEK . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki przyrodnicze. Część IV Poznań 2019 , Młodzi Naukowcy, s.185-191, bibliogr., streszcz, 978-83-66392-37-3.	0	5	inne
7.	Wole wieloguzkowe tarczycy. Część I - analiza czynników wpływających na nawrót wola wieloguzkowego tarczycy po zabiegach resekcyjnych gruczołu tarczycowego (Multinodular goiter. Part I - analysis of the factors affecting the recurrence of the multinodular goiter after resection procedure of the thyroid gland). [AUT.] MONIKA SĘPEK , ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Część VII - choroby Poznań 2019 , Młodzi Naukowcy, s.118-123, 978-83-66392-25-0.	0	5	inne
8.	Wole wieloguzkowe tarczycy. Część II - analiza czynników ryzyka warunkujących związek między wolem wieloguzkowym a rakiem tarczycy (Multinodular goiter. Part II - analysis of risk factors determining the relationship between multinodular goiter and thyroid cancer). [AUT.] MONIKA SĘPEK , ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Część VII - choroby Poznań 2019 , Młodzi Naukowcy, s.124-129, bibliogr., summ, 978-83-66392-25-0.	0	5	inne
9.	Triterpeny pentacykliczne o działaniu przeciwbakteryjnym. Część I - kwas azjatykowy (Antibacterial effect of pentacyclic triterpenes. Part I - asiatic acid). [AUT.] ZUZANNA SYCZ , MONIKA SĘPEK . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki przyrodnicze. Część I Poznań 2020 , Młodzi Naukowcy, s.98-104, ryc., bibliogr., streszcz, 978-83-66392-86-1.	0	5	inne
10.	Triterpeny pentacykliczne o działaniu przeciwbakteryjnym. Część II - kwas ursolowy (Antibacterial effect of pentacyclic triterpenes. Part II - ursolic acid). [AUT.] ZUZANNA SYCZ , MONIKA SĘPEK . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki przyrodnicze. Część I Poznań 2020 , Młodzi Naukowcy, s.105-112, ryc., bibliogr., streszcz, 978-83-66392-86-1.	0	5	inne
11.	Nadczynność tarczycy. Część I - Analiza czynników warunkujących związek między nadczynnością tarczycy a nowotworem tarczycy (Hyperthyroidism. Part I - Analysis of risk factors determining the relationship between hyperthyroidism and thyroid cancer). [AUT.] MONIKA SĘPEK , ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Część I - choroby Poznań 2020 , Młodzi Naukowcy, s.78-83, bibliogr., streszcz, 978-83-66392-78-6.	0	5	inne

12.	Zależność między nadczynnością tarczycy a ciążą (Association of hyperthyroidism and pregnancy). [AUT.] MONIKA SĘPEK, ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój młodych naukowców w Polsce: nauki medyczne i nauki o zdrowiu. Część I - choroby Poznań 2020 , Młodzi Naukowcy, s.84-90, bibliogr., streszcz., 978-83-66392-78-6.	0	5	inne
13.	Wpływ ekstraktu z owoców żurawiny wielkoowocowej (<i>Vaccinium macrocarpon</i>) na lokalizację kardiolipiny w błonach komórkowych uropatogennych szczepów <i>Escherichia coli</i> (The effect of large cranberry (<i>Vaccinium macrocarpon</i>) extract on cardiolipin location in cell membranes of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains). [AUT.] ZUZANNA SYCZ , DOROTA WOJNICZ. W: Zastosowanie roślin w naukach medycznych i przyrodniczych Lublin 2020 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s.24-40, ryc., bibliogr. 35 poz., streszcz., summ, 978-83-66489-35-6.	0	20	inne

Streszczenia zjazdowe w jęz. angielskim

Lp.	Opis bibliograficzny
1.	Immunosuppressive therapy and risk of adverse effects in renal transplant recipients, children after bone marrow transplantation and children with primary glomerulonephritis. [AUT.] MAGDALENA HURKACZ, ZUZANNA KOBIAŁKA , MAGDALENA KURIATA-KORDEK, IRENA WIKIERA-MAGOTT, KRZYSZTOF KAŁWAK, ANNA WIELA-HOJEŃSKA, MARIAN KLINGER, ALICJA CHYBICKA, DANUTA ZWOLIŃSKA. Ther.Drug Monit. 2009 Vol.31 no.5 s.667 poz.223, 11th International Congress of Therapeutic Drug Monitoring & Clinical Toxicology. Montreal, Quebec, Canada, October 3-8, 2009 .
2.	The effect of Żuravit S·O·S® on virulence factors and cardiolipin domains morphology of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains. [AUT.] M[ARTA] KICIA, D[OROTA] WOJNICZ, Z[UZANNA] SYCZ , A[NDRZEJ] B. HENDRICH. Sepsis 2011 T.4 nr 1 s.112-113, Polish-Ukrainian Weigl Conference "From microbiology to synthetic biology". Wrocław, May 18-20, 2011 .
3.	The impact of plant origin substances on the course of lactation. [AUT.] Z[UZANNA] SYCZ , J[OLANTA] LIS-KUBERKA, M[AGDALENA] ORCZYK-PAWIŁOWICZ. W: 2nd Wrocław Scientific Meetings [Wrocław, 2nd March 2018] Wrocław 2018 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s.107 poz.P48, 978-83-65932-02-0.
4.	Fucosylation and sialylation pattern of human milk immune glycoproteins over milk maturation stages. [AUT.] J[OLANTA] LIS-KUBERKA, Z[UZANNA] SYCZ , M[ARTA] BERGHAUSEN-MAZUR, M[AGDALENA] ORCZYK-PAWIŁOWICZ. W: 2nd Wrocław Scientific Meetings [Wrocław, 2nd March 2018] Wrocław 2018 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s.83 poz.P27, 978-83-65932-02-0.
5.	Controversy in nutrition: human milk components dependent on maternal diet. [AUT.] Z[UZANNA] SYCZ , M[ATYLDĄ] CZOSNYKOWSKA-ŁUKACKA. W: III Konferencja Naukowa "Człowiek - żywność - zdrowie". Wrocław, 16-17.03. 2018 . Streszczenia, s.57-59.
6.	Novel eradication methods of bacterial biofilms in chronic diabetic foot infection. [AUT.] Z[UZANNA] SYCZ , M[ONIKA] SĘPEK, J[USTYNA] JEŻEWSKA, D[OROTA] WOJNICZ. W: 3rd Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 1st-2nd March 2019 Wrocław 2019 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., s.167 poz.P113, 978-83-65932-64-8.

7.	Bacterial microflora isolated from wounds of patients with diabetic foot infection hospitalized in the general surgery ward. [AUT.] M[ONIKA] SĘPEK, Z[UZANNA] SYCZ, J[USTYNA] JEŻEWSKA, J[ERZY] RUDNICKI. W: 3rd Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 1st-2nd March 2019 Wrocław 2019 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o, s.153 poz.P99, 978-83-65932-64-8.
8.	Pole on the appointment with the Dr Google - analysis of the phenomenon of online searching information about health. [AUT.] J[USTYNA] JEŻEWSKA, Z[UZANNA] SYCZ, M[ONIKA] SĘPEK, J[AROSŁAW] BARAŃSKI. W: 3rd Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 1st-2nd March 2019 Wrocław 2019 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o, s.80 poz.P26, tab., bibliogr. 9 poz, 978-83-65932-64-8.
9.	The effect of anthocyanins on virulence factors of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains. [AUT.] ZUZANNA SYCZ, MONIKA SĘPEK, DOROTA WOJNICZ. W: Sympozjum Naukowe "Zielone Forum". Wrocław, 29-30.03.2019. Streszczenia, s.30, 4th International Conference "Man-food-health". Wrocław, Poland, 29.03.2019. Abstracts.
10.	The effects of amiodarone on thyroid dysfunction. [AUT.] MONIKA SĘPEK, ZUZANNA SYCZ, JERZY RUDNICKI. W: Sympozjum Naukowe "Zielone Forum". Wrocław, 29-30.03.2019. Streszczenia, s.29, 4th International Conference "Man-food-health". Wrocław, Poland, 29.03.2019. Abstracts.
11.	Remdesivir - the most promising anti - SARS-CoV-2 agent. [AUT.] ZUZANNA SYCZ, KAMIL KLIMAS, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA. W: 3rd edition National Scientific e-Conference "e-Factory of Science". May 09, 2020. The book of abstracts Łódź 2020 , Promovendi Foundation Publishing, s.44, 978-83-955366-8-7.
12.	Diabetic neuropathy - the most common chronic complication of diabetes mellitus. Symptoms, diagnostics and treatment. [AUT.] KAMIL KLIMAS, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA. W: 3rd edition National Scientific e-Conference "e-Factory of Science". May 09, 2020. The book of abstracts Łódź 2020 , Promovendi Foundation Publishing, s.21, 978-83-955366-8-7.
13.	SARS-COV-2 infection in children. [AUT.] MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ, KAMIL KLIMAS. W: 3rd edition National Scientific e-Conference "e-Factory of Science". May 09, 2020. The book of abstracts Łódź 2020 , Promovendi Foundation Publishing, s.24, 978-83-955366-8-7.
14.	Diabetes and COVID-19: the clash of two global epidemics. [AUT.] AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, KAMIL KLIMAS, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, ZUZANNA SYCZ. W: 3rd edition National Scientific e-Conference "e-Factory of Science". May 09, 2020. The book of abstracts Łódź 2020 , Promovendi Foundation Publishing, s.46, 978-83-955366-8-7.
15.	Prospects for anti- SARS-CoV-2 vaccines development. [AUT.] ZUZANNA SYCZ, KAMIL KLIMAS, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA. W: 1st Summer Scientific On-line School. August 08, 2020. The book of abstracts Łódź 2020 , Promovendi Foundation Publishing, s.109, 978-83-957816-2-9.
16.	How to recognize and treat obstructive sleep apnea?. [AUT.] KAMIL KLIMAS, ZUZANNA SYCZ, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA. W: 1st Summer Scientific On-line School. August 08, 2020. The book of abstracts Łódź 2020 , Promovendi Foundation Publishing, s.85, 978-83-957816-2-9.

17.	Alcohol and its effects on the human body. [AUT.] MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, KAMIL KLIMAS, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ . W: 1st Summer Scientific On-line School. August 08, 2020. The book of abstracts Łódź 2020 , Promovendi Foundation Publishing, s.87, 978-83-957816-2-9.
18.	Metabolic syndrome in medical practice. [AUT.] AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, KAMIL KLIMAS, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, ZUZANNA SYCZ . W: 1st Summer Scientific On-line School. August 08, 2020. The book of abstracts Łódź 2020 , Promovendi Foundation Publishing, s.111, 978-83-957816-2-9.
19.	The expression of virulence- and biofilm-related genes in selected species of uropathogenic Gram-negative rods. [AUT.] Z[UZANNA] SYCZ , M[AGDALENA] SZYDŁOWICZ, M[AGDA] KABAJ, K[AMIL] KLIMAS, A[GNIESZKA] ŚWIĘCICKA-KLAMA, D[OROTA] WOJNICZ. W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020 Wrocław 2020 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o, s.229-230, bibliogr. 6 poz, 978-83-66489-37-0.
20.	Do-it-yourself artificial pancreas systems (DIY APS): non-commercial software for diabetes control improvement. [AUT.] MAGDA KABAJ, KAMIL KLIMAS, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ . W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020 Wrocław 2020 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o, s.125-126, bibliogr. 5 poz, 978-83-66489-37-0.
21.	Cryoglobulins and their damaging effect on organs. Etiopathogenesis, symptoms and diagnosis of cryoglobulinemia. [AUT.] K[AMIL] KLIMAS, M[AGDA] KABAJ, A[GNIESZKA] ŚWIĘCICKA-KLAMA, Z[UZANNA] SYCZ . W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020 Wrocław 2020 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o, s.136-137, bibliogr. 5 poz, 978-83-66489-37-0.
22.	Persistent organic pollutants: impact on the incidence of type 2 diabetes. [AUT.] AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, MAGDA KABAJ, KAMIL KLIMAS, ZUZANNA SYCZ . W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020 Wrocław 2020 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o, s.241-242, bibliogr. 6 poz, 978-83-66489-37-0.
23.	Pneumocystis pneumonia - who should be vigilant?. [AUT.] M[AGDALENA] SZYDŁOWICZ, M[ARTA] KICIA, Ż. ZAJĄCZKOWSKA, Z[UZANNA] SYCZ . W: 4th International Wrocław Scientific Meetings. Wrocław, 09-10 October 2020 Wrocław 2020 , Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o, s.235-236, bibliogr. 5 poz, 978-83-66489-37-0.

Streszczenia zjazdowe w jęz. polskim

Lp.	Opis bibliograficzny
1.	Antyoksydacyjne właściwości ekstraktu z owoców żurawiny wielkoowocowej i jego wpływ na czynniki wirulencji uropatogennych szczepów <i>Escherichia coli</i> (Antioxidant properties of cranberry fruits extract and its effect on virulence factors of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains). [AUT.] D[OROTA] WOJNICZ, Z[UZANNA] SYCZ , S[TEFAN] WALKOWSKI, J. GABRIELSKA, A. WŁOCH, A. KUCHARSKA, A. SOKÓŁ-ŁĘTOWSKA, A[NDRZEJ] B. HENDRICH. W: XXVII Zjazd Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów "Drobnoustroje bez granic". Lublin, 5-8 września 2012. Streszczenia - sesja plakatowa, doniesienia ustne [CD-ROM] Warszawa 2012 , Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, poz.P-VI-217 [sesja plakatowa 07.09/sesja VI].
2.	Wpływ regionu geograficznego i statusu socjoekonomicznego na profil bioaktywnych składników mleka kobiecego. [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Konferencja "Interdyscyplinarność przyszłością nauki". Zieloniec, 10-12 listopada 2017 . Księga abstraktów, s.42.

3.	Karmienie piersią w ujęciu historycznym i kulturowym. [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Konferencja "Interdyscyplinarność przyszłości nauki". Zieloniec, 13-15 kwietnia 2018. Księga abstraktów, s.37.
4.	Aktualny stan wiedzy dotyczący suplementacji diety matek w okresie laktacji. [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2018. Materiały konferencyjne - wiosna : część trzecia - Wrocław [9.05.2018] Poznań 2018, Młodzi Naukowcy, s.112 poz.105, 978-83-65917-76-8.
5.	Antybakteryjne działanie skoncentrowanego ekstraktu z owoców żurawiny wielkoowocowej. [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Interdyscyplinarność przyszłości nauki. Zieloniec, 10-12 listopada 2018. Księga abstraktów, s.66.
6.	Metody badania biofilmów bakteryjnych. [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2018. Materiały konferencyjne - jesień : część druga - Wrocław [21.11.2018] Poznań 2018, Młodzi Naukowcy, s.55 poz.50, 978-83-66139-75-6.
7.	Antybakteryjne właściwości wyciągu z owoców żurawiny wielkoowocowej (<i>Vaccinium macrocarpon</i>). [AUT.] ZUZANNA SYCZ , DOROTA WOJNICZ . W: Sympozjum Naukowe "Zielone Forum". Wrocław, 29-30.03.2019. Streszczenia, s.45, 1. Konferencja Naukowa "Probiotyki-ziola-nutraceutyki". Wrocław, 30.03.2019. Streszczenia.
8.	Metody eradykacji biofilmów bakteryjnych. [AUT.] ZUZANNA SYCZ , MONIKA SĘPEK . W: Badania i rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2019. Materiały konferencyjne - wiosna : część trzecia - Wrocław [10.04.2019] Poznań 2019, Młodzi Naukowcy, s.90 poz.83, 978-83-66139-82-4.
9.	Przyczyny nawrotu wola wieloguzkowego tarczycy po zabiegach resekcyjnych gruczołu tarczycowego. [AUT.] M[ONIKA] SĘPEK , Z[UZANNA] SYCZ . W: Badania i rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2019. Materiały konferencyjne - wiosna : część trzecia - Wrocław [10.04.2019] Poznań 2019, Młodzi Naukowcy, s.81 poz.73, 978-83-66139-82-4.
10.	Wpływ skoncentrowanego ekstraktu z owoców żurawiny wielkoowocowej na błony komórek bakteryjnych. [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Interdyscyplinarność przyszłości nauki. Zieloniec, 12-14 kwietnia 2019. Księga abstraktów, s.9.
11.	Biofilm bakteryjny jako powikłanie mezoterapii kwasem hialuronowym. [AUT.] ZUZANNA SYCZ , JUSTYNA JEŻEWSKA . W: III Ogólnopolska Konferencja dla Młodych Naukowców "Wieczór Naukowca 2019 - Wokół człowieka". Wrocław, 23-24 maja 2019 r. Program i streszczenia, s.52-53 poz.6.
12.	Motywacja Polaków do podjęcia aktywności fizycznej według badań społecznych. [AUT.] JUSTYNA JEŻEWSKA , ZUZANNA SYCZ . W: III Ogólnopolska Konferencja dla Młodych Naukowców "Wieczór Naukowca 2019 - Wokół człowieka". Wrocław, 23-24 maja 2019 r. Program i streszczenia, s.27-28 poz.7.
13.	Medycyna folkloru źródłem racjonalnej fitoterapii zakażeń układu moczowego. [AUT.] ZUZANNA SYCZ . W: Konferencja "Interdyscyplinarność przyszłości nauki". Zieloniec, 15-17.11.2019. Księga abstraktów Wrocław 2019, s.10.
14.	Triterpeny pentacykliczne - działanie przeciwbakteryjne. [AUT.] ZUZANNA SYCZ , MONIKA SĘPEK . W: Badania i rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2019. Materiały konferencyjne - jesień : część druga - Wrocław [20.11.2019] Poznań 2019, Młodzi Naukowcy, s.60 poz.56, 978-83-66392-56-4.
15.	Związek między nadczynnością tarczycy a nowotworem tarczycy. [AUT.] MONIKA SĘPEK , ZUZANNA SYCZ . W: Badania i rozwój Młodych Naukowców w Polsce 2019. Materiały konferencyjne - jesień : część druga - Wrocław [20.11.2019] Poznań 2019, Młodzi Naukowcy, s.51 poz.47, 978-83-66392-56-4.
16.	Ziołolecznictwo zakażeń układu moczowego - wczoraj i dziś. [AUT.] ZUZANNA SYCZ , MAGDA KABAJ , KAMIL KLIMAS , AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA . W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 06-07 lutego 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.55, 978-83-63216-24-5.

17.	Nowoczesne wskaźniki wyrównania glikemii. [AUT.] MAGDA KABAJ, KAMIL KLIMAS, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 06-07 lutego 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.40, 978-83-63216-24-5.
18.	Neuropatia jako przewlekłe powikłanie cukrzycy. [AUT.] KAMIL KLIMAS, MAGDA KABAJ, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 06-07 lutego 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.41, 978-83-63216-24-5.
19.	Systemy ciągłego monitorowania glikemii (CGM) w kontroli cukrzycy. [AUT.] AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, MAGDA KABAJ, KAMIL KLIMAS, ZUZANNA SYCZ. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 06-07 lutego 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.58-59, 978-83-63216-24-5.
20.	Remdesivir - czy będziemy nim leczyć COVID-19?. [AUT.] ZUZANNA SYCZ, KAMIL KLIMAS, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS cz. II". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 03-04 kwietnia 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.92-93, 978-83-63216-26-9.
21.	CELIAKIA - diagnostyka, powikłania i leczenie. [AUT.] KAMIL KLIMAS, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS cz. II". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 03-04 kwietnia 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.70-71, 978-83-63216-26-9.
22.	COVID-19 u dzieci. [AUT.] MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ, KAMIL KLIMAS. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS cz. II". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 03-04 kwietnia 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.72-73, 978-83-63216-26-9.
23.	Cukrzyca w obliczu pandemii koronawirusa. [AUT.] AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, KAMIL KLIMAS, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, ZUZANNA SYCZ. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS cz. II". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 03-04 kwietnia 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.96-97, 978-83-63216-26-9.
24.	Perspektywy opracowania szczepionki przeciwko COVID-19. [AUT.] ZUZANNA SYCZ, KAMIL KLIMAS, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS cz. III". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 11-12 czerwca 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.128-129, 978-83-63216-30-6.
25.	Jak rozpoznać i leczyć obturacyjny bezdech senny?. [AUT.] KAMIL KLIMAS, ZUZANNA SYCZ, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS cz. III". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 11-12 czerwca 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.100-101, 978-83-63216-30-6.
26.	Alkohol i jego wpływ na organizm człowieka. [AUT.] MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, KAMIL KLIMAS, AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, ZUZANNA SYCZ. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS cz. III". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 11-12 czerwca 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.102-103, 978-83-63216-30-6.
27.	Zespół metaboliczny w praktyce klinicznej. [AUT.] AGNIESZKA ŚWIĘCICKA-KLAMA, KAMIL KLIMAS, MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, ZUZANNA SYCZ. W: Ogólnopolska Konferencja Interdyscyplinarna pn: "OMNIBUS cz. III". Nauki interdyscyplinarne. Kraków 11-12 czerwca 2020 r. Książka abstraktów Kraków 2020, s.130-131, 978-83-63216-30-6.
28.	Wyścig o szczepionkę: mRNA-1273 czy BNT162? (Race for vaccine: mRNA-1273 or BNT162?). [AUT.] ZUZANNA SYCZ. W: I Ogólnopolska Doktorancka Konferencja Interdyscyplinarna. Wrocław, 19.09.2020 r. Księga abstraktów Wrocław 2020, s.9 poz.4.

29.	Przełom w walce z koronawirusem - nowa metoda leczenia hospitalizowanych pacjentów z COVID-19 (A breakthrough in the fight against coronavirus - new treatment method for hospitalized COVID-19 patients). [AUT.] Z[UZANNA] SYCZ, A[GNIESZKA] ŚWIĘCICKA-KLAMA. W: I Ogólnopolska Doktorancka Konferencja Interdyscyplinarna. Wrocław, 19.09.2020 r. Księga abstraktów Wrocław 2020, s.16 poz.11.
30.	COVID-19 u pacjentów z cukrzycą typu 2 (COVID-19 in patients with type 2 diabetes). [AUT.] A[GNIESZKA] ŚWIĘCICKA-KLAMA, Z[UZANNA] SYCZ. W: I Ogólnopolska Doktorancka Konferencja Interdyscyplinarna. Wrocław, 19.09.2020 r. Księga abstraktów Wrocław 2020, s.19 poz.14.

Sumaryczny Impact Factor: **21,625**

Punktacja MNiSW: **515,00**

15. ZAŁĄCZNIKI

15.1. Opinia Komisji Bioetycznej

KOMISJA BIOETYCZNA
przy
Uniwersytecie Medycznym
we Wrocławiu
ul. Pasteura 1; 50-367 WROCLAW

OPINIA KOMISJI BIOETYCZNEJ Nr KB – 182/2019

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, powołana zarządzeniem Rektora Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu nr 133/XV R/2017 z dnia 21 grudnia 2017 r. oraz działająca w trybie przewidzianym rozporządzeniem Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. (Dz.U. nr 47, poz. 480) na podstawie ustawy o zawodzie lekarza z dnia 5 grudnia 1996 r. (Dz.U. nr 28 z 1997 r. poz. 152 z późniejszymi zmianami) w składzie:

dr hab. Jacek Daroszewski, prof. nadzw. (endokrynologia, diabetologia)
prof. dr hab. Krzysztof Grabowski (chirurgia)
dr Henryk Kaczkowski (chirurgia szczękowa, chirurgia stomatologiczna)
mgr Irena Knabel-Krzyszowska (farmacja)
prof. dr hab. Jerzy Liebhart (choroby wewnętrzne, alergologia)
ks. dr hab. Piotr Mrzygłód, prof. nadzw. (duchowny)
mgr Luiza Müller (prawo)
dr hab. Sławomir Sidorowicz (psychiatria)
dr hab. Leszek Szenborn, prof. nadzw (pediatria, choroby zakaźne)
Danuta Tarkowska (pielęgniarstwo)
prof. dr hab. Anna Wiela-Hojeńska (farmakologia kliniczna)
dr hab. Andrzej Wojnar, prof. nadzw. (histopatologia, dermatologia) przedstawiciel
Dolnośląskiej Izby Lekarskiej)
dr hab. Jacek Zieliński (filozofia)

pod przewodnictwem
prof. dr hab. Jana Kornafela (ginekologia i położnictwo, onkologia)

Przestrzegając w działalności zasad Good Clinical Practice oraz zasad Deklaracji Helsińskiej,
po zapoznaniu się z projektem badawczym pt.

„Wpływ triterpenów pentacyklicznych na uropatogenne pałeczki Gram-ujemne”

zgłoszonym przez **mgr Zuzannę Ewę Sycz** uczestniczkę studiów doktoranckich w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu oraz złożonymi wraz z wnioskiem dokumentami, w tajnym głosowaniu postanowiła wyrazić zgodę na przeprowadzenie badania w Katedrze i Zakładzie Biologii i Parazytologii Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu pod nadzorem dr hab. Doroty Wojnicz **pod warunkiem zachowania anonimowości uzyskanych danych.**

Uwaga: Badanie to zostało objęte ubezpieczeniem odpowiedzialności cywilnej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu z tytułu prowadzonej działalności:

Pouczenie: W ciągu 14 dni od otrzymania decyzji wnioskodawcy przysługuje prawo odwołania do Komisji Odwoławczej za pośrednictwem Komisji Bioetycznej UM we Wrocławiu

Opinia powyższa dotyczy: projektu badawczego będącego podstawą rozprawy doktorskiej

Wrocław, dnia **12** marca 2019 r.

BW

Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
KOMISJA BIOETYCZNA
przewodniczący
prof. dr hab. Jan Komarfel

15.2. Oświadczenia współautorów

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. J. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-345 Wrocław

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- **Sycz, Z.;** Tichaczek-Goska, D.; Wojnicz, D. Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes – asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals. *Biomolecules* **2022**, *12*, 98. <https://doi.org/10.3390/biom12010098>

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji artykułu, przeglądzie piśmiennictwa, zebraniu i opracowaniu danych literaturowych w formie tabel, przygotowaniu treści manuskryptu.

Oświadczam, że w pracach:

- **Sycz, Z.;** Tichaczek-Goska, D.; Jezierska-Domaradzka, A.; Wojnicz, D. Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient – asiatic acid? *Biomolecules* **2021**, *11*, 1754. <https://doi.org/10.3390/biom11121754>
- **Sycz, Z.;** Wojnicz, D.; Tichaczek-Goska, D. Does secondary plant metabolite – ursolic acid exhibit antibacterial activity against uropathogenic *Escherichia coli* living in single- and multispecies biofilms? *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1691. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081691>

mój udział polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji i metodologii badań, wykonaniu doświadczeń, wykonaniu dokumentacji fotograficznej, analizie statystycznej wyników, przygotowaniu treści manuskryptów, opracowaniu i wizualizacji wyników, zebraniu piśmiennictwa.

Podpis

Zuzanna Sycz

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. J. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-345 Wrocław

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Sycz, Z.; **Tichaczek-Goska, D.**; Wojnicz, D. Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes – asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals. *Biomolecules* **2022**, *12*, 98. <https://doi.org/10.3390/biom12010098>

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji artykułu, edycji tabel i przygotowaniu rysunków, edycji treści i ostatecznej akceptacji manuskryptu, opiece promotorskiej i nadzorze merytorycznym nad realizacją projektu badawczego.

Oświadczam, że w pracach:

- Sycz, Z.; **Tichaczek-Goska, D.**; Jezierska-Domaradzka, A.; Wojnicz, D. Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient – asiatic acid? *Biomolecules* **2021**, *11*, 1754. <https://doi.org/10.3390/biom11121754>
- Sycz, Z.; Wojnicz, D.; **Tichaczek-Goska, D.** Does secondary plant metabolite – ursolic acid exhibit antibacterial activity against uropathogenic *Escherichia coli* living in single- and multispecies biofilms? *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1691. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081691>

mój udział polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji i metodologii badań, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i wizualizacji wyników, edycji i ostatecznej akceptacji manuskryptów, opiece promotorskiej i nadzorze merytorycznym nad realizacją projektu badawczego.

Podpis



dr hab. Dorota Wojnicz

Wrocław, 16.08.2022 r.

Katedra i Zakład Biologii i Parazytologii Lekarskiej
Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu
ul. J. Mikulicza-Radeckiego 9, 50-345 Wrocław

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Sycz, Z.; Tichaczek-Goska, D.; **Wojnicz, D.** Anti-planktonic and anti-biofilm properties of pentacyclic triterpenes – asiatic acid and ursolic acid as promising antibacterial future pharmaceuticals. *Biomolecules* **2022**, *12*, 98. <https://doi.org/10.3390/biom12010098>

mój udział polegał na: opracowaniu koncepcji artykułu, edycji tabel i przygotowaniu rysunków, edycji treści i ostatecznej akceptacji manuskryptu, opiece promotorskiej i kierowaniu projektem naukowym oraz pozyskaniu finansowania publikacji artykułu.

Oświadczam, że w pracach:

- Sycz, Z.; Tichaczek-Goska, D.; Jezierska-Domaradzka, A.; **Wojnicz, D.** Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient – asiatic acid? *Biomolecules* **2021**, *11*, 1754. <https://doi.org/10.3390/biom11121754>
- Sycz, Z.; **Wojnicz, D.**; Tichaczek-Goska, D. Does secondary plant metabolite – ursolic acid exhibit antibacterial activity against uropathogenic *Escherichia coli* living in single- and multispecies biofilms? *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1691. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14081691>

mój udział polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji i metodologii badań, wykonaniu doświadczeń, opracowaniu i wizualizacji wyników, edycji i ostatecznej akceptacji manuskryptów, opiece promotorskiej i kierowaniu projektem naukowym oraz pozyskaniu środków finansowych na realizację badań i publikację artykułów.

Podpis
Dorota Wojnicz

dr Anna Jezierska-Domaradzka

Wrocław, 16.08.2022 r.

Katedra Biologii i Biotechnologii Farmaceutycznej

Zakład Biotechnologii Farmaceutycznej

Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu

ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że w pracy:

- Sycz, Z.; Tichaczek-Goska, D.; Jezierska-Domaradzka, A.; Wojnicz, D. Are uropathogenic bacteria living in multispecies biofilm susceptible to active plant ingredient – asiatic acid? *Biomolecules* **2021**, *11*, 1754. <https://doi.org/10.3390/biom11121754>

mój udział polegał na recenzji i redakcji manuskryptu.

Podpis

