

„Charakterystyka wybranych bakteriofagów wyizolowanych ze ścieków komunalnych – badania na poziomie molekularnym i potencjalne znaczenie biotechnologiczne”
mgr Gracja Topka-Bielecka

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania procesem tworzenia i zwalczania biofilmu bakteryjnego. Dotyczy to zarówno biofilmów wytwarzanych przez chorobotwórcze (patogenne) jak i niechorobotwórcze (niepatogenne) szczepy bakteryjne. Biofilm to skupisko mikroorganizmów związanych z podłożem lub przylegających do siebie nawzajem, zanurzonych w macierzy złożonej z zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych zwanych w skrócie EPSs (ang. *Extracellular Polymeric Substances*) [praca nr 1]. Do komponentów macierzy należą białka, lipidy, zewnątrzkomórkowe DNA (e-DNA), RNA i polisacharydy [1,2]. Tworzenie biofilmu bakteryjnego jest procesem złożonym, podzielonym na pięć etapów: (1) przyleganie, (2) formowanie monowarstwy komórek i wydzielanie EPS (3) tworzenie mikrokolonii, (4) dojrzewanie biofilmu oraz (5) odrywanie i migracja komórek z biofilmu [praca nr 1]. Co ważne, można zidentyfikować zarówno pozytywne, jak i negatywne aspekty powstawania biofilmu z punktu widzenia człowieka. Z jednej strony, biofilmy mają kluczowe znaczenie dla procesów fermentacyjnych, wykorzystywane są m.in. w oczyszczalniach ścieków i procesach uzdatniania wody, czy też w rozwoju technologii mikrobiologicznych ogniw paliwowych. Z drugiej strony, formowanie biofilmów jest poważnym problemem w sektorze medycznym. Dzieje się tak, ponieważ bakterie chorobotwórcze i wielolekooporne występujące w formie biofilmu mogą pokrywać powierzchnie różnych wyrobów stosowanych w medycynie, a także kolonizować tkanki pacjentów. Ponadto biofilmy stanowią duże wyzwanie w przemyśle spożywczym i innych przemysłowych instalacjach wodnych [3–7].

Szacuje się, że 99% wszystkich bakterii w środowisku naturalnym występuje w postaci biofilmu [8]. Zdolność tworzenia struktur biofilmowych na różnego rodzaju powierzchniach posiadają również bakterie patogenne. Biofilmy rzadko występują w postaci jednogatunkowej, przeważnie są to struktury składające się z wielu gatunków mikroorganizmów. Co ważne, bakterie w biofilmach wykazują 10–1000 razy większą oporność na antybiotyki w porównaniu z komórkami występującymi w formie planktonowej [9,10]. Komórki bakteryjne stanowiące część biofilmu wykazują oporność na antybiotyki ze względu na szereg współdziałających czynników: (i) interakcje środków przeciwdrobnoustrojowych ze składnikami macierzy biofilmu, które opóźniają i osłabiają ich działanie, (ii) wolniejsze tempo wzrostu bakterii w biofilmie (iii), ukrywanie miejsc wiązania dla antybiotyku w wyniku zmian genetycznych zachodzących w

docelowych komórkach, (iv) działanie enzymów modyfikujących, (v) występowanie komórek przetrwałych (ang. *persisters*) niewrażliwych na antybiotyki, (vi) zmiany mikrośrodowiska chemicznego, (vii) wiek biofilmu oraz (viii) powstawanie biofilmów wielogatunkowych [**praca nr 1**]. Co ciekawe, obecność więcej niż jednego gatunku bakterii w biofilmie jest korzystna dla utrzymania tej struktury, ponieważ może ułatwiać przytwierdzenie komórek do powierzchni oraz nabywanie przez nie genów oporności na związki przeciwbakteryjne [5]. Trudności w skutecznym zwalczaniu biofilmów wielogatunkowych wynikają głównie z różnorodnych mechanizmów oporności występujących u tworzących tę strukturę bakterii, a także z ograniczenia migracji środków przeciwdrobnoustrojowych. Ograniczenie to spowodowane jest dużą różnorodnością EPS wydzielanych przez zróżnicowane gatunkowo i niejednorodnie rozmieszczone w biofilmie mikroorganizmy. Niewątpliwie występowanie oporności na antybiotyki w przypadku biofilmów wielogatunkowych stanowi bardzo poważny problem, niemniej jednak podejmowane są różne próby zwalczania tego typu biofilmów. Zostały one dokładnie omówione w **pracy nr 1** rozprawy doktorskiej, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania bakteriofagów i kodowanych przez nie enzymów (np. depolimeraz) zarówno w terapiach indywidualnych, jak i skojarzonych (z innymi środkami przeciwbakteryjnymi).

Bakteriofagi (fagi) to wirusy, które infekują i replikują się tylko w komórkach bakteryjnych. Mogą być zjadliwe (wirulentne) albo łagodne (umiarkowane). Fagi zjadliwe rozwijają się w bakteriach tylko na drodze litycznej. Podczas takiej infekcji dochodzi do replikacji materiału genetycznego wirusa, a następnie do uformowania i uwolnienia wirusowych cząstek potomnych w wyniku lizy komórki bakteryjnej prowadzącej do jej śmierci. Fagi łagodne natomiast, przechodzą zarówno cykl lityczny, jak i lizogeniczny, w którym to wirusowy materiał genetyczny pozostaje zintegrowany z genomem gospodarza i utrzymywany jest w formie profaga. Co istotne, terapie i metody walki z biofilmami wykorzystujące bakteriofagi koncentrują się głównie na fagach litycznych. Strategie te opierają się przede wszystkim na zastosowaniu pojedynczych fagów lub koktajli fagowych, enzymów fagowego pochodzenia, fagów zmodyfikowanych genetycznie lub na wdrażaniu terapii skojarzonych (bakteriofagi w połączeniu z np. antybiotykami) [**praca nr 1**]. Zalety stosowania wirusów bakteryjnych przeciwko biofilmom wynikają z ich następujących właściwości: (i) fagi wykazują aktywność lityczną przeciwko bakteriom o obniżonym (choć nie całkowicie zahamowanym) metabolizmie, (ii) charakteryzują się specyficznym działaniem (zazwyczaj są w stanie infekować komórki bakteryjne w obrębie danego gatunku, a nawet

określonego szczepu), (iii) wykazują zdolność samokontroli (rozmnażają się tylko wtedy, gdy dostępne są wrażliwe na nie bakterie), (iv) są bezpieczne (czyli nieaktywne wobec komórek eukariotycznych), (v) są powszechnie dostępne oraz łatwe w pozyskiwaniu, a także (vi) przejawiają zdolność do rozprzestrzeniania się i rozwoju w bakteriach obecnych w biofilmie (przynajmniej do pewnego stopnia) [11].

W ostatnich latach znacznie wzrosła liczba artykułów dotyczących zastosowania bakteriofagów, jako narzędzia do kontroli procesu tworzenia się biofilmu. W świetle powyższych faktów, **celem moich badań w ramach pracy doktorskiej było wyizolowanie i scharakteryzowanie nieznanych wcześniej fagów litycznych, wykazujących potencjalne zastosowanie w walce z biofilmem bakteryjnym.**

Powszechnie wiadomo, że ścieki komunalne obfitują w bakteriofagi i są bogatym źródłem tych wirusów. Ponadto składniki ścieków są pożywką dla wielu gatunków bakterii, co z kolei wpływa na różnorodność infekujących je wirusów występujących w tym środowisku. Mając to na uwadze, zdecydowałam się na poszukiwania fagów w próbkach ścieków komunalnych, pochodzących z Gdańskiej Oczyszczalni Ścieków. Izolacja fagów została przeprowadzona zgodnie z wcześniej opisaną procedurą [12]. W kluczowym etapie tego podejścia, surową próbkę ścieków miejskich miesza się z hodowlą wybranego gatunku/szczepu bakteryjnego, w celu pozyskania cząstek fagowych zdolnych do rozwoju w komórkach gospodarza. W swoich badaniach skupiałam się na dwóch gatunkach bakterii, *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis* – mikroorganizmów powszechnie występujących w biofilmach wielogatunkowych.

E. coli i *E. faecalis* należą do grupy drobnoustrojów biofilmujących, które wykazują ogromny wpływ na światową gospodarkę i medycynę. Bakterie z gatunku *E. coli* wymieniane są jako jedne z najpowszechniejszych mikroorganizmów zdolnych do tworzenia biofilmów. Co istotne, strukturę biofilmu mogą tworzyć zarówno niepatogenne, jak i patogenne bakterie *E. coli*. Wśród patogenów wymienia się m.in enterokrwotoczne szczepy *E. coli* (ang. *enterohemorrhagic E. coli* – EHEC), enteropatogenne *E. coli* (ang. *enteropathogenic E. coli* - EPEC) oraz enteroagregacyjne *E. coli* (ang. *enteroaggregative E. coli* - EAaggEC). Biofilmy zawierające bakterie *E. coli* są głównymi czynnikami przyczyniającymi się do występowania zakażeń związanych z kontaminacją sprzętu oraz materiałów biomedycznych [13]. Ponadto, są one odpowiedzialne za zanieczyszczenia w przemyśle spożywczym oraz psucie się żywności [14]. Bakterie *E. coli* wykazują również zdolność do kolonizacji różnych powierzchni, takich jak stal nierdzewna,

materiały polimerowe, szkło, polistyren, PCV czy teflon, powodując ich uszkodzenia oraz korozję [5]. *E. faecalis* to z kolei najczęściej izolowany gatunek bakterii spośród enterokoków, stanowiący 80–90% wszystkich izolatów klinicznych [15]. Mikroorganizmy te są często odpowiedzialne za poważne infekcje m.in. zakażenia dróg moczowych, w tym zakażenia odcewnikowe, zapalenie wsierdza, bakteriemię, czy powikłania po leczeniu endodontycznym [16,17]. W większości przypadków są to infekcje występujące w środowisku szpitalnym, związane z formowaniem biofilmu, a co za tym idzie z problemami wynikającymi z silnej oporności bakterii na środki przeciwbakteryjne. Co istotne, aż 75% wszystkich przypadków infekcji dróg moczowych związanych jest z cewnikowaniem [18]. Ostatnie doniesienia wskazują, że szczepy *E. faecalis* są odpowiedzialne za 20% wszystkich przypadków zakażeń dróg moczowych, w tym zakażeń odcewnikowych, ze względu na zdolność do kolonizacji i tworzenia biofilmu na powierzchni cewników [19]. Dużą rolę odgrywa w tym przypadku rodzaj biomateriału, z jakiego wyprodukowany jest cewnik. Bakterie te skutecznie przylegają do polimerów, takich jak propylen, polistyren, silikon, polichlorek winylu czy lateks, które są powszechnie wykorzystywane do produkcji cewników urologicznych [20]. Ponadto, biofilmy *E. faecalis* stanowią poważne źródło zanieczyszczeń w przemyśle spożywczym, głównie podczas produkcji żywności.

Badania w ramach pracy doktorskiej rozpoczęłam od ogólnej charakterystyki nowo wyizolowanego bakteriofaga vB_EcoS-95 [praca nr 2]. W pierwszej kolejności dokonałam analizy cech morfologicznych i ustaliłam zakres gospodarza dla pozyskanego faga. Aktywność lityczną faga względem różnych szczepów bakteryjnych określiłam za pomocą testu kropelkowego, obserwując tworzenie się stref zahamowania wzrostu bakterii. Uzyskane wyniki ujawniły aktywność bakteriolityczną faga vB_EcoS-95 wobec niektórych szczepów *E. coli*, w tym kilku izolatów klinicznych. Na podstawie zdjęć z transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM) dokonałam analizy wirionów i zakwalifikowałam faga vB_EcoS-95 do rodziny *Siphoviridae*. Co ciekawe, badając kinetykę rozwoju litycznego (w doświadczeniu typu „one step growth”) zaobserwowałam, że okres latencji w optymalnych warunkach wzrostu bakterii wynosił zaledwie 4 minuty, natomiast plon fagowy w przeliczeniu na komórkę wynosił 115 jednostek tworzących łysinki (ang. PFU – *Plaque Forming Unit*). Uzyskane wyniki wskazują, że vB_EcoS-95 wytwarza wystarczającą liczbę wirionów potomnych w krótkim czasie, aby skutecznie przeprowadzić lizę komórki gospodarza, co czyni go potencjalnie atrakcyjnym w zwalczaniu infekcji lub ochronie różnych materiałów przed kolonizacją bakteryjną. W kolejnym etapie prac,

poznana i opisana została pełna sekwencja nukleotydowa genomu faga. Co istotne, analiza sekwencji nie wykazała obecności w genomie faga genu polimerazy DNA, ale pozwoliła zidentyfikować gen kodujący nietypowe białko lityczne, które może potencjalnie przyczyniać się do szybkiej lizy komórki gospodarza. Mając na uwadze potrzebę przeprowadzenia badań w kierunku opracowania nowych narzędzi do zwalczania biofilmów, postanowiłam sprawdzić aktywność pozyskanego faga wobec biofilmującego szczepu *E. coli*. Skuteczność degradacji biofilmu przez faga vB_EcoS-95 oceniłam różnymi metodami, w tym testami z użyciem fioleto krystalicznego oraz resazury, a także z zastosowaniem holograficznej mikroskopii 3D. Uzyskane wyniki wskazują, że bakteriofag vB_EcoS-95 jest zdolny do niszczenia biofilmu bakteryjnego. Ponadto porównując otrzymane wyniki zaobserwowałam, że najefektywniejszy spadek liczby komórek bakteryjnych w biofilmie nastąpił w przypadku zastosowania preparatu fagowego o wysokim mianie, przy m.o.i. o wartości 10 (ang. m.o.i - *multiplicity of infection*), podczas gdy niższe wartości m.o.i. (7, 5, 4 i 2) skutkowały stopniową redukcją biofilmu. Na podstawie tych badań wysunęłam wniosek, że vB_EcoS-95 jest nowo odkrytym fagiem, zdolnym do infekcji szczepów *E. coli*, który może znaleźć potencjalne zastosowanie w walce z biofilmami stanowiącymi problem w przemyśle spożywczym lub medycynie. Co więcej, niezwykle krótki okres latencji tego faga pozwala na przypuszczenia o jego potencjalnym wykorzystaniu w dalszych badaniach nad rozwojem nowatorskich narzędzi biotechnologicznych, mających zastosowanie m.in. w inżynierii genetycznej [**praca nr 2**].

E. faecalis jest częstym czynnikiem etiologicznym zakażeń szpitalnych. Duży problem w zwalczaniu tych bakterii stanowi coraz to większy odsetek szczepów wykazujących oporność na szereg poznanych dotąd antybiotyków. Co istotne, patogen ten wykazuje zdolność do tworzenia biofilmu na różnego rodzaju powierzchniach. W **pracy nr 3** scharakteryzowałam kolejnego nowo odkrytego wirulentnego faga, którego nazwałam vB_EfaS-271. Fag ten infekuje kliniczny szczep *E. faecalis* 271. Prace badawcze rozpoczęłam od określenia zakresu gospodarza dla faga oraz analizy jego cech morfologicznych. Zaobserwowałam, że nowo wyizolowany fag wykazał aktywność lityczną wobec kilku klinicznych szczepów *E. faecalis*, natomiast nie był zdolny do infekcji szczepów innych gatunków bakterii. Z kolei, wyniki analizy filogenetycznej i morfologicznej (z wykorzystaniem TME), pozwoliły przypisać bakteriofaga vB_EfaS-271 do rodziny *Siphoviridae*. Następnie zbadałam kinetykę rozwoju litycznego prezentowanego faga. Zaobserwowałam, iż bakteriofag ten charakteryzuje się stosunkowo krótkim cyklem

rozwojowym (okres latencji wynosi zaledwie 8 minut) oraz plonem fagowym wynoszącym 70 PFU na komórkę. Analiza sekwencji nukleotydowej genomu faga wykazała podobieństwo do kilku innych fagów infekujących enterokoki. Ponadto poznanie tej sekwencji pozwoliło zidentyfikować w genomie vB_EfaS-271 geny kodujące białko podobne do polimerazy DNA typu B, dwufunkcyjne białko pełniące potencjalną rolę prymazy i polimerazy DNA, dwie endonukleazy, helikazę oraz prymazę. Co istotne, wszystkie te białka mogą pełnić ważne funkcje w skutecznej replikacji genomu faga. W kolejnym etapie prac, dokonałam analizy działania cząstek fagowych vB_EfaS-271 na biofilm bakteryjny. Otrzymane wyniki pozwoliły stwierdzić, że wykazują one zdolność degradacji biofilmu utworzonego przez szczep *E. faecalis* 271 [**praca nr 3**]. Chcąc określić skuteczność działania preparatu fagowego potraktowałam biofilm odpowiednimi jego rozcieńczeniami. Co ciekawe, spowodował on znaczny spadek wartości gęstości optycznej biofilmu, nawet przy najmniejszej badanej liczbie cząstek fagowych, czyli 10^2 PFU/ml. Podobny efekt redukcji biomasy biofilmu zaobserwowałam w doświadczeniu z barwieniem fioletem krystalicznym i badaniu aktywności metabolicznej, oszacowanej w teście konwersji resazuryny. Przedstawione wyniki wskazują na wysoką skuteczność faga vB_EfaS-271 w zwalczaniu niektórych szczepów *E. faecalis* oraz jego potencjalną przydatność jako środka przeciwbakteryjnego. Chociaż fag ten jest zdolny do infekcji tylko niewielkiej liczby szczepów *E. faecalis*, uzyskane wyniki sugerują, że może on mieć potencjalne znaczenie w opracowywaniu terapii fagowej lub zostać wykorzystany w inżynierii genetycznej. Poza tym, należy podkreślić jego wysoką efektywność w niszczeniu biofilmu utworzonego przez szczep *E. faecalis* 271 [**praca nr 3**].

Mając powyższe na uwadze, postanowiłam przeprowadzić eksperymenty mające na celu zbadanie interakcji bakteriofag-gospodarz, w świetle potencjalnych zastosowań vB_EfaS-271 w terapii fagowej [**praca nr 4**]. W pierwszej kolejności dokonałam analizy skuteczności faga vB_EfaS-271 w zapobieganiu tworzenia biofilmu przez *E. faecalis* na powierzchni cewnika. W tym celu wykorzystałam klasyczne silikonowe cewniki Foley'a. Zaobserwowałam, że vB_EfaS-271 efektywnie obniża przeżywalność i liczbę komórek bakteryjnych na powierzchni cewnika. Co ciekawe, infekcja dużą liczbą cząstek fagowych vB_EfaS-271 (m.o.i. = 10) spowodowała szybki (w ciągu 3 h) i znaczący spadek liczby żywych komórek *E. faecalis*, natomiast użycie niższych wartości m.o.i. (0,0001 lub 0,01) wywołało podobne efekty, ale w dłuższym okresie czasu (6 h). Warte uwagi są również wyniki otrzymane podczas analizy wpływu stosowanego preparatu

fagowego vB_EfaS-271 na efektywność powstawania mutantów fagopornych. Zaobserwowałam, że po 24-godzinnej inkubacji hodowli bakteryjnej z fagami, liczba komórek fagoopornych była zależna od zastosowanej wartości m.o.i i wykazywała najwyższy poziom gdy stosunek fag-komórka wynosił 10 (m.o.i. = 10). Ze względu na fakt, iż uzyskane wyniki wskazały, że bakteriofaga vB_EfaS-271 można uznać za potencjalnego kandydata do dalszych analiz w celu wykorzystania go w terapii fagowej, postanowiłam zbadać toksyczność preparatu fagowego wobec wybranej linii komórek ssaczych oraz jego wpływ na bakterie *E. faecalis* podczas wspólnej hodowli. W tym celu, jako model badawczy użyto linii komórkowej fibroblastów mysich - BALB/c 3T3, klon 31. Analizując wpływ preparatu fagowego na komórki eukariotyczne, nie zaobserwowałam efektu cytotoksycznego. Liczba żywych komórek, ich kształt i wielkość były podobne przed i po 24-godzinnej inkubacji z fagami. Na tej podstawie wysunęłam wniosek, że bakteriofag vB_EfaS-271 nie jest toksyczny dla komórek ssaczych. Dopiero dodanie bakterii *E. faecalis* do hodowli fibroblastów BALB/c 3T3 spowodowało znaczący spadek żywotności tych komórek. Co ciekawe, jednoczesne zastosowanie cząstek fagowych vB_EfaS-271 i bakterii doprowadziło do częściowego przywrócenia żywotności fibroblastów. Taki efekt widoczny był wyłącznie w przypadku zastosowania niskiej wartości m.o.i. (0,0001), przy wartości 10 podobnego efektu nie zaobserwowałam. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że skuteczność ochrony mysich fibroblastów przed bakteriami *E. faecalis* była wyższa przy zastosowaniu niższych wartości m.o.i. Z kolei pojawienie się bakterii opornych na fagi następowało szybciej przy użyciu większej liczby cząstek fagowych, co potwierdza uzyskane wcześniej wyniki. Na tej podstawie wysunięty został wniosek, że selekcja bakterii niewrażliwych na fagi jest bardziej skuteczna gdy komórka bakteryjna gospodarza zostaje zakażona kilkoma fagami. Co istotne, mutant oporny na faga, chociaż zdolny do życia, zwykle nie jest w stanie przeprowadzić jednego z procesów fizjologicznych (przynajmniej do pewnego stopnia), w odróżnieniu od komórki typu dzikiego. W efekcie, chociaż pojawianie się niewrażliwych na faga vB_EfaS-271 mutantów może sugerować ograniczenie stosowania tego wirusa w terapii fagowej, to jednak upośledzony wzrost i niższa konkurencyjność takich mutantów sugeruje, że połączenie terapii fagowej z innym leczeniem przeciwbakteryjnym może nadal przynosić skuteczne efekty [praca nr 4].

Wyniki uzyskane w ramach niniejszej pracy wskazują na duży potencjał nowo odkrytych fagów w niszczeniu i zapobieganiu tworzenia się biofilmów przez bakterie *E. coli* i *E. faecalis*. Co istotne, w obu przypadkach obserwuje się znaczne zmniejszenie liczby komórek bakteryjnych w

strukturze biofilmu. Biorąc pod uwagę dostępne dane literaturowe oraz uzyskane wyniki sugeruję, że bakteriofagi vB_EcoS-95 i vB_EfaS-271 mogą być potencjalnie wykorzystywane do opracowania metod zwalczania biofilmów wielogatunkowych, stanowiących duże wyzwanie w sektorach medycznym i przemysłowym. Obecnie duże nadzieje na opracowanie skutecznych strategii antybiofilmowych wiąże się z terapią skojarzoną (fagi lub ich pochodne wraz z antybiotykami). Pomimo iż w swojej rozprawie doktorskiej nie analizowałam skuteczności tego podejścia, to niewątpliwie warto zbadać je w przyszłości.

Cytowana literatura:

1. Flemming, H.-C.; Neu, T.R.; Wozniak, D.J. The EPS Matrix: The “House of Biofilm Cells.” *J Bacteriol* **2007**, *189*, 7945–7947, doi:10.1128/JB.00858-07.
2. Jachlewski, S.; Jachlewski, W.D.; Linne, U.; Bräsen, C.; Wingender, J.; Siebers, B. Isolation of Extracellular Polymeric Substances from Biofilms of the Thermoacidophilic Archaeon *Sulfolobus Acidocaldarius*. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2015**, *3*, doi:10.3389/fbioe.2015.00123.
3. Stoica, P.; Chifiriuc, M.C.; Rapa, M.; Lazăr, V. 1 - Overview of biofilm-related problems in medical devices. In *Biofilms and Implantable Medical Devices*; Deng, Y., Lv, W., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp. 3–23 ISBN 978-0-08-100382-4.
4. Di Pippo, F.; Di Gregorio, L.; Congestri, R.; Tandoi, V.; Rossetti, S. Biofilm Growth and Control in Cooling Water Industrial Systems. *FEMS Microbiology Ecology* **2018**, *94*, doi:10.1093/femsec/fiy044.
5. Galié, S.; García-Gutiérrez, C.; Miguélez, E.M.; Villar, C.J.; Lombó, F. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol* **2018**, *9*, doi:10.3389/fmicb.2018.00898.
6. Mina, I.R.; Jara, N.P.; Criollo, J.E.; Castillo, J.A. The Critical Role of Biofilms in Bacterial Vascular Plant Pathogenesis. *Plant Pathology* **2019**, *68*, 1439–1447, doi:https://doi.org/10.1111/ppa.13073.
7. Habib, S.; Zavahir, S.; Abusafa, A.E.; Abdulkareem, A.; Sobolčiak, P.; Lehocky, M.; Vesela, D.; Humpolíček, P.; Popelka, A. Slippery Liquid-Infused Porous Polymeric Surfaces Based on Natural Oil with Antimicrobial Effect. *Polymers (Basel)* **2021**, *13*, doi:10.3390/polym13020206.
8. Dalton, H.M.; March, P.E. Molecular Genetics of Bacterial Attachment and Biofouling. *Current Opinion in Biotechnology* **1998**, *9*, 252–255, doi:10.1016/S0958-1669(98)80055-4.
9. Potera, C. ANTIBIOTIC RESISTANCE: Biofilm Dispersing Agent Rejuvenates Older Antibiotics. *Environ Health Perspect* **2010**, *118*, A288.
10. Mah, T.-F. Biofilm-Specific Antibiotic Resistance. *Future Microbiol* **2012**, *7*, 1061–1072, doi:10.2217/fmb.12.76.
11. Loc-Carrillo, C.; Abedon, S.T. Pros and Cons of Phage Therapy. *Bacteriophage* **2011**, *1*, 111–114, doi:10.4161/bact.1.2.14590.
12. Jurczak-Kurek, A.; Gašior, T.; Nejman-Falańczyk, B.; Bloch, S.; Dydecka, A.; Topka, G.; Necel, A.; Jakubowska-Deredas, M.; Narajczyk, M.; Richert, M.; et al. Biodiversity of Bacteriophages: Morphological and Biological Properties of a Large Group of Phages Isolated from Urban Sewage. *Scientific Reports* **2016**, *6*, 34338, doi:10.1038/srep34338.

13. Sharma, G.; Sharma, S.; Sharma, P.; Chandola, D.; Dang, S.; Gupta, S.; Gabrani, R. Escherichia Coli Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *J Appl Microbiol* **2016**, *121*, 309–319, doi:10.1111/jam.13078.
14. Milho, C.; Silva, M.D.; Alves, D.; Oliveira, H.; Sousa, C.; Pastrana, L.M.; Azeredo, J.; Sillankorva, S. Escherichia Coli and Salmonella Enteritidis Dual-Species Biofilms: Interspecies Interactions and Antibiofilm Efficacy of Phages. *Scientific Reports* **2019**, *9*, 18183, doi:10.1038/s41598-019-54847-y.
15. Shridhar, S.; Dhanashree, B. Antibiotic Susceptibility Pattern and Biofilm Formation in Clinical Isolates of Enterococcus Spp. Available online: <https://www.hindawi.com/journals/ipid/2019/7854968/> (accessed on 23 February 2021).
16. Khalifa, L.; Brosh, Y.; Gelman, D.; Copenhagen-Glazer, S.; Beyth, S.; Poradosu-Cohen, R.; Que, Y.-A.; Beyth, N.; Hazan, R. Targeting Enterococcus Faecalis Biofilms with Phage Therapy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 2696–2705, doi:10.1128/AEM.00096-15.
17. Tan, F.; She, P.; Zhou, L.; Liu, Y.; Chen, L.; Luo, Z.; Wu, Y. Bactericidal and Anti-Biofilm Activity of the Retinoid Compound CD437 Against Enterococcus Faecalis. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, doi:10.3389/fmicb.2019.02301.
18. Rousseau, M.; Goh, H.M.S.; Holec, S.; Albert, M.L.; Williams, R.B.H.; Ingersoll, M.A.; Kline, K.A. Bladder Catheterization Increases Susceptibility to Infection That Can Be Prevented by Prophylactic Antibiotic Treatment. *JCI Insight* **1**, doi:10.1172/jci.insight.88178.
19. Zheng, J.-X.; Bai, B.; Lin, Z.-W.; Pu, Z.-Y.; Yao, W.-M.; Chen, Z.; Li, D.-Y.; Deng, X.-B.; Deng, Q.-W.; Yu, Z.-J. Characterization of Biofilm Formation by Enterococcus Faecalis Isolates Derived from Urinary Tract Infections in China. *J Med Microbiol* **2018**, *67*, 60–67, doi:10.1099/jmm.0.000647.
20. Ostrowska, K.; Strzelczyk, A.; Różalski, A.; Stączek, P. Bacterial Biofilm as a Cause of Urinary Tract Infection – Pathogens, Methods of Prevention and Eradication. *Postepy Hig Med Dosw* **2013**, *67*, 1027–1033, doi:10.5604/17322693.1073567.
21. Ch'ng, J.-H.; Chong, K.K.L.; Lam, L.N.; Wong, J.J.; Kline, K.A. Biofilm-Associated Infection by Enterococci. *Nature Reviews Microbiology* **2019**, *17*, 82–94, doi:10.1038/s41579-018-0107-z.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej:

Praca nr 1: Topka-Bielecka, G.; Dydecka, A.; Necel, A.; Bloch, S.; Nejman-Faleńczyk, B.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, A. Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm. *Antibiotics* **2021**, *10*, 175.

Praca nr 2: Topka, G.; Bloch, S.; Nejman-Faleńczyk, B.; Gąsior, T.; Jurczak-Kurek, A.; Necel, A.; Dydecka, A.; Richert, M.; Węgrzyn, G.; and Węgrzyn, A. Characterization of Bacteriophage vB-EcoS-95, Isolated From Urban Sewage and Revealing Extremely Rapid Lytic Development. *Front. Microbiol.* **2019**, *9*:3326

Praca nr 3: Topka-Bielecka, G.; Bloch, S.; Nejman-Faleńczyk, B.; Grabski, M.; Jurczak-Kurek, A.; Górniak, M.; Dydecka, A.; Necel, A.; Węgrzyn, G.; Węgrzyn, A. Characterization of the Bacteriophage vB_EfaS-271 Infecting *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 6345.

Praca nr 4: Topka-Bielecka, G.; Nejman-Faleńczyk, B.; Bloch, S.; Dydecka, A.; Necel, A.; Węgrzyn, A.; Węgrzyn, G. Phage–Bacteria Interactions in Potential Applications of Bacteriophage vB_EfaS-271 against *Enterococcus faecalis*. *Viruses* **2021**, *13*, 318.