

Received: 15.07.2016  
Accepted: 16.08.2017  
Published: 03.11.2017

## Drapieżnictwo wśród mikroorganizmów – ogromny potencjał międzygatunkowych zależności

### Predation among microorganisms: A huge potential of interspecies dependencies

Justyna Kowalska, Marcin Włodarczyk

Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

#### Streszczenie

W przyrodzie występuje wiele zależności międzygatunkowych, w tym również wśród bakterii. Jednym z nich jest drapieżnictwo prowadzące zawsze do śmierci ofiary. W artykule scharakteryzowano Deltaproteobakterie (*Bdellovibrio bacteriovorus*) oraz Alfaproteobakterii (*Micavibrio aeruginosavorus*) należące do grupy bakterii drapieżnych BALOs (*Bdellovibrio* and like organisms). Oba gatunki to monotrychalnie orzęsione Gram-ujemne bakterie o przecinkowatym kształcie, zdolne do żerowania na innych bakteriach Gram-ujemnych. Pierwszy z nich stosuje peryplazmatyczną strategię żerowania, wykazując nieswoisty wybór ofiary, natomiast drugi (*M. aeruginosavorus*) jest epibiotem atakującym określone gatunki bakterii. BALOs znalazły zastosowanie zarówno w medycynie do zwalczania drobnoustrojów odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe oraz poza medycyną (rolnictwo i przemysł spożywczy), jako środki ochrony roślin i środki zapobiegające psuciu się żywności. W wyniku poszukiwania skutecznej terapii przeciwko infekcji wywołanej lekoopornymi szczepami, wykazano, iż bakterie drapieżne żerujące na patogennych bakteriach, nie wykazują przy tym immunogenności wobec organizmu człowieka. Bakterie drapieżne są również zdolne do niszczenia wielo- i jednogatunkowych biofilmów. Najnowsze badania wskazały możliwość wykorzystania *B. bacteriovorus* do niszczenia biofilmu utworzonego przez *Staphylococcus aureus*. Proponuje się wykorzystanie podwójnej strategii żerowania *B. bacteriovorus* do zwalczania infekcji *in vivo*, szczególnie w tych przypadkach, kiedy zawodzą standardowe terapie.

#### Słowa kluczowe:

BALOs • drapieżnictwo • terapia

#### Summary

There are many interactions between species (including bacteria) in the environment. One of them is predation, which always leads to the death of a prey. Described in this review *Bdellovibrio bacteriovorus* (Deltaproteobacteria) and *Micavibrio aeruginosavorus* (Alfaproteobacteria) are uniflagellate, rod shaped and curved obligate predators of Gram-negative bacteria. Both species belong to the group of BALOs (*Bdellovibrio* and like organisms). *B. bacteriovorus* use periplasmic predatory strategy and *M. aeruginosavorus* are epibiotic hunters. BALOs have found application in both medicine in combating microorganisms responsible for food poisoning and outside of medicine (agriculture and food) as plant protection products and as measures used to prevent the spoiling of food. As a result of searching for effective therapies in the treatment of infections caused by drug-resistant strains of bacteria, it has been shown that predators feed on pathogenic bacteria without showing immunogenicity to humans. Predatory bacteria are able to destroy the multi- and single-species biofilms. Recent studies have indicated the possibility of *B. bacteriovorus* to destroy the biofilm formed by *Staphylococcus*

<b>Keywords:</b>	<b>BALOs • predation • therapy</b>
<b>GICID:</b>	01.3001.0010.5608
<b>DOI:</b>	10.5604/01.3001.0010.5608
<b>Word count:</b>	3877
<b>Tables:</b>	1
<b>Figures:</b>	4
<b>References:</b>	24

**Adres autora:** dr Marcin Włodarczyk, Katedra Immunologii i Biologii Infekcyjnej, Instytut Mikrobiologii, Biotechnologii i Immunologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź; e-mail: martini.w@wp.pl

**Wykaz skrótów:** **AP** – faza ataku (attack phase), **ATP** – adenozyntotrójfosforan (adenosine triphosphate), **BALOs** – organizmy należące do bakterii drapieżnych (*Bdellovibrio* and like organisms), **GP** – faza wzrostu (growth phase), **HD** – zależny od gospodarza-ofiary (host dependent), **HI** – niezależny od gospodarza-ofiary (host independent), **OmpA** – białko błony zewnętrznej (outer membrane protein A), **PCGs** – geny kodujące białka (protein-coding genes), **RTX** – rodzina cytolizyn i cytotoxyn (repeat in the toxin), **SEM** – elektronowy mikroskop skaningowy (scanning electron microscope).

## WSTĘP

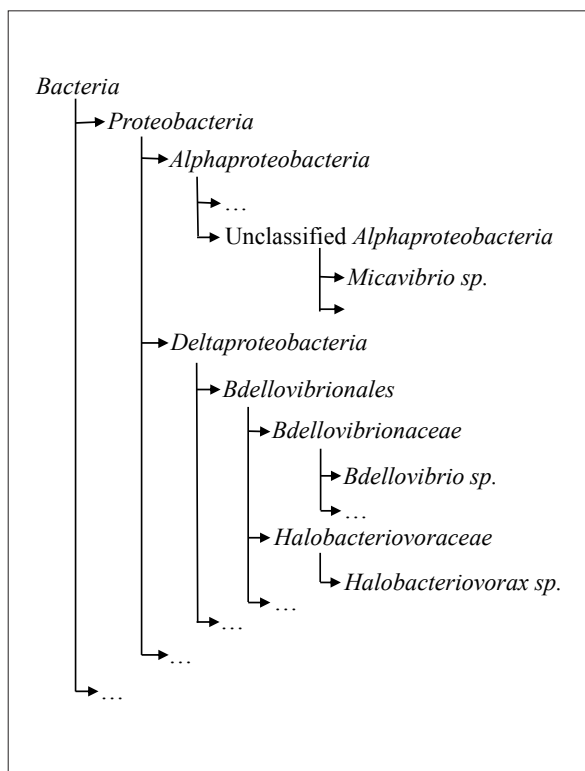
Naturalnym zjawiskiem występującym w przyrodzie jest eliminacja słabszych osobników w celu umocnienia całej populacji oraz zachowania bioróżnorodności [23]. Jednym z jej elementów jest drapieżnictwo – powszechnie występująca interakcja między drapieżnikiem a jego ofiarą, przy czym tylko drapieżnik odnosi korzyść. W odróżnieniu od pasożytnictwa proces ten prowadzi do śmierci ofiary. W świecie bakterii również dochodzi do drapieżnictwa. Od lat 60 XX w., kiedy odkryto BALOs (*Bdellovibrio* and like organisms), wśród bakteryjnych drapieżców poza bakteriofagami, protistami znalazły się także niektóre bakterie [20]. Bakterie z grupy BALOs wyizolowano m.in. ze środowiska wodnego (wody powierzchniowe, ścieki, osady denne), z gleby, a także z przewodów pokarmowych zwierząt i człowieka [24].

Bakterie drapieżne o zdolnościach do swoistego ukierunkowania względem swojej ofiary należą głównie do rodzaju *Bdellovibrio* spp. i *Micavibrio* spp. [3]. Jak dotąd są to najlepiej poznane bakterie żerujące na Gram-ujemnych bakteriach [19]. W przypadku rodzaju *Bdellovibrio* zarówno cykl życiowy, jak i biologia komórki zostały stosunkowo dobrze zbadane. Atak na komórkę-ofiarę następuje przez przyłączenie się do powierzchni, penetrację do peryplazmy, namnażanie, a następnie rozerwanie ściany komórkowej ofiary i przedostanie się na zewnątrz w celu rozpoczęcia swojego cyklu od nowa [4,18,20]. Drapieżcy BALOs mogą również żerować na powierzchni ofiary, bez konieczności wnikania do peryplazmy, czego

przykładem jest *Bdellovibrio exovorus* [16]. Do grupy drapieżnych „epibiotów” (epibiotic – żyjący na powierzchni innych żywych organizmów) należą również *Micavibrio* spp. jednak jest to jedyna możliwość oddziaływania z ofiarą [2,3]. *Micavibrio* spp. przyczepiają się do komórki, w celu pożywienia i namnożenia, co często jest nazywane stylem „vampire-like” [3]. Ponadto *Micavibrio* spp. w odróżnieniu od *Bdellovibrio* spp. wykazują dużą swoistość względem gospodarza, żerując przede wszystkim na *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* oraz *Klebsiella pneumoniae* [3].

## *Bdellovibrio*

Rodzaj *Bdellovibrio*, jako pierwsze drapieżne bakterie, zostały odkryte i opisane przez niemieckich mikrobiologów Stolpa i Petzolda w 1962 r., podczas próby izolacji bakteriofagów z zawiesiny gleby [5,8,20,21,23]. Zainteresowanie niecodzienną biologią BALOs doprowadziło do przeprowadzenia wielu testów i badań, w celu wykorzystania ich jako „żywych antybiotyków”. W 1973 r. zostały użyte jako czynniki biokontroli zapobiegania zarazie spowodowanej przez *Pseudomonas syringae* w uprawie soi [23]. Istotnym krokiem w poznaniu grupy BALOs było opisanie całego genomu, co znacznie ułatwiło dalsze odkrycia, jak np. poznanie cyklu życiowego *Bdellovibrio* spp., czy zastąpienie antybiotyków w terapii zakażeń mikroorganizmami lekoopornymi [4,5,23]. W następnych latach analizowano genomikę, cykl życiowy, fizjologię oraz właściwości biochemiczne BALOs [23].



**Ryc. 1.** Drzewo filogenetyczne opisywanych bakterii. Dane oparte na podstawie wyszukiwarki taksonomicznej NCIB [15]

Początkowo wszystkie izolowane drapieżne bakterie były klasyfikowane jako rodzaj *Bdellovibrio*, jednak dokładniejsza analiza genomu ujawniła rozbieżności taksonomiczne, wymuszając podział BALOs do dwóch rodzin: *Bdellovibrionaceae* oraz *Bacteriovoraceae* należących do rzędu *Bdellovibrionales* [21]. Obecna systematyka klasyfikuje bakterie z grupy BALOs do wielu grup taksonomicznych (ryc. 1), np. *Bdellovibrio bacteriovorus* należy do rodziny *Bdellovibrionaceae* (Deltaproteobakteria), a drapieżca *Micavibrio aeruginosavorus* należy do niesklasyfikowanych Alphaproteobakterii [15].

### **Bdellovibrio bacteriovorus**

*Bdellovibrio bacteriovorus* jest najlepiej poznany i scharakteryzowany bakteryjnym, bezwzględnie drapieżcą żyjącym na Gram-ujemnych bakteriach [3,4,18,19,20,21]. Ta Gram-ujemna proteobakteria o wielkości  $0,25 \times 1,0 \mu\text{m}$  i przecinkowatym kształcie na jednym z biegunów komórki ma rzęskę, dzięki której może się poruszać wykorzystując zjawisko chemotaksji [5,8,20].

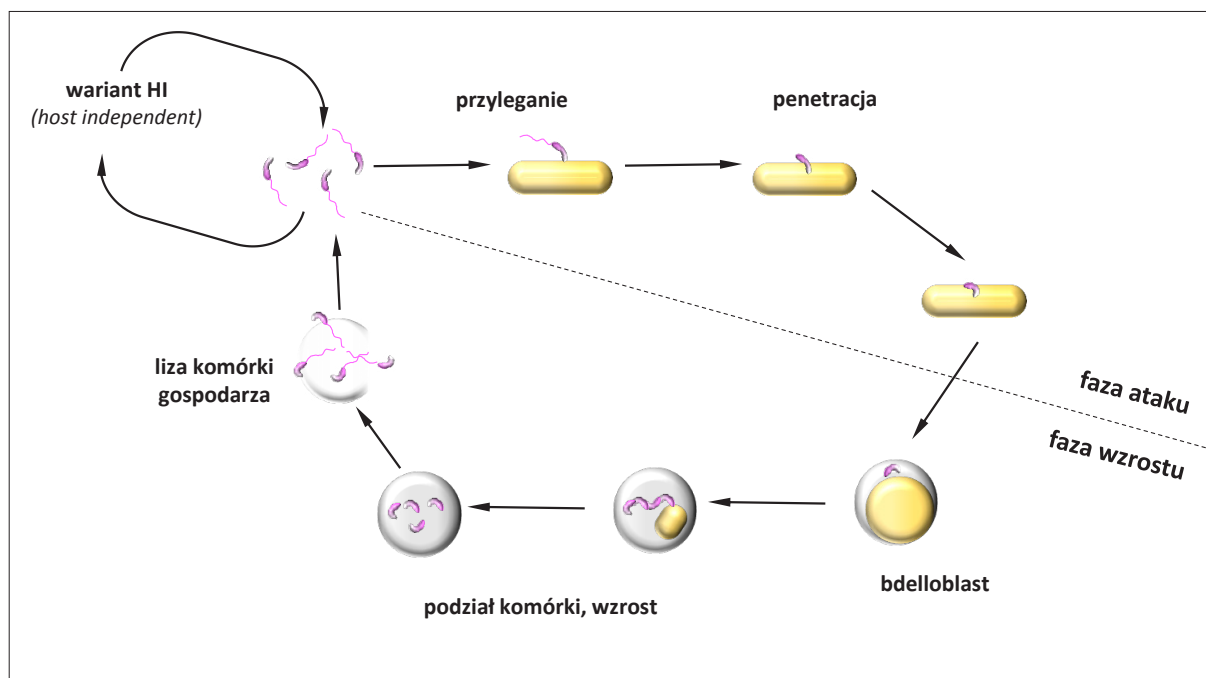
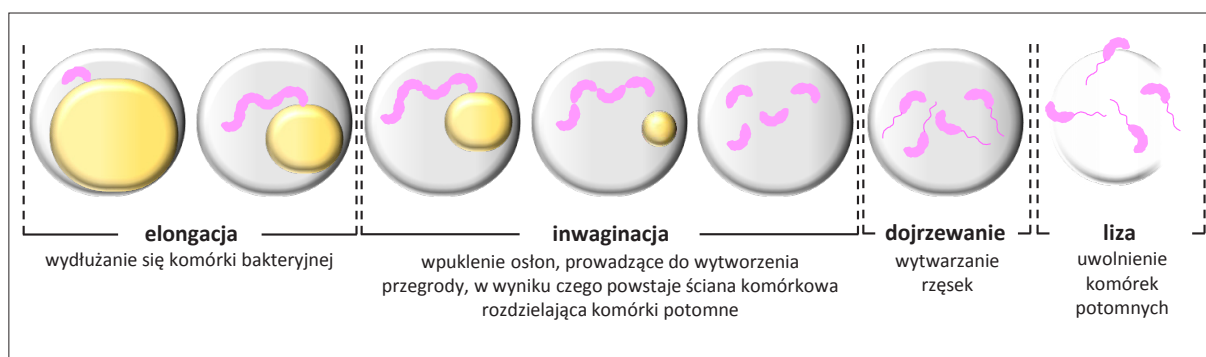
### **Cykl życiowy *Bdellovibrio bacteriovorus***

Wyróżnia się dwa warianty *Bdellovibrio bacteriovorus*. Pierwszy – dziko żyjące formy, które można hodować na wzbogaconym podłożu, bez obecności w nim ofiary, przez co wariant ten został określony jako „HI” (host independent). Bakterie te są zdolne wówczas do wzrostu, jednak nie mogą się dzielić. Zdolność *B. bacte-*

*riovorus* do żerowania jest odwrotnie proporcjonalna do stężenia składników odżywczych w środowisku. Drugi wariant, HD (host-depended), czyli zależny od komórki ofiary, dotyczy bakterii wolno pływających, które przechodzą cykl życiowy. Niektórzy badacze zauważyli, iż warunki środowiska, takie jak dostępność składników pokarmowych czy obecność innych bakterii oraz wciąż słabo poznane cząsteczki sygnałowe, mogą wywoływać przejście z jednego wariantu w drugi, co istotnie wpływa na bilans między postaciami HI i HD [20].

Cykl życia *Bdellovibrio* (ryc. 2) składa się z dwóch faz: ataku (AP, attack phase) oraz wzrostu (GP, growth phase) [16,20,21]. Faza ataku u wszystkich gatunków BALOs przebiega w podobny sposób [5,16]. Komórki w tej fazie cechują się zahamowaną replikacją i brakiem podziałów do czasu gdy znajdą swoją ofiarę [16,20,21]. Poruszają się z prędkością około dziesięciu długości komórki na sekundę, co sprawia, że są aż 10 razy szybsze niż *E. coli* [20]. Napotkanie ofiary przez drapieżcę jest wynikiem przypadkowych kolizji, dlatego bardzo ważna jest duża ruchliwość drapieżcy [21]. Napędzany przez pojedynczą rzęskę łowca szuka ofiary, a następnie przyłącza się do niej [16,23]. Początkowy etap przylegania jest odwracalny i nie angażuje żadnych specjalnych struktur, ani nie wymaga obecności receptorów, przez co drapieżcy BALOs często przylegają też do bakterii Gram-dodatnich lub powierzchni abiotycznych [21]. Penetracja kończy fazę ataku, po której rozpoczyna się faza wzrostu, która przebiega w różny sposób u drapieżców „peryplazmatycznych” oraz „epibiotycznych” [16,20,21]. *B. bacteriovorus* po nieodwracalnym przytwierdzeniu się do ofiary, przenika do peryplazmy ofiary używając fimbrii typu IV [6]. Komórki drapieżcy znajdujące się w tej fazie charakteryzują się dużo mniejszą ruchliwością. W niszczeniu ściany komórkowej ofiary główną rolę odgrywają wytwarzane przez *B. bacteriovorus* liczne enzymy, w tym glikanaza, deacetylaza oraz peptydaza. Ich aktywność polega na niszczeniu szczelnej struktury peptydoglikanu, umożliwiając drapieżcy przedostanie się do peryplazmy. Rozpoczynający się w ten sposób kolejny etap rozwoju zwanym bdelloblastem, charakteryzuje się przebudowywaniem przez BALOs struktury komórki ofiary przez deacylację peptydoglikanu, usuwanie kwasu diaminopimelinowego, czy dołączanie kwasów tłuszczowych o długich łańcuchach. Degradacji ulegają również białka OmpA (outer membrane protein A) i lipoproteiny mureiny. Dzięki temu *Bdellovibrio* zapewnia sobie bezpieczną niszę do wzrostu i namnażania. Wszystkie te reakcje prowadzą do transformacji morfologicznej drapieżcy, procesy oddychania ofiary zostają zatrzymane, a komórka drapieżcy o kształcie przecinkowatym z rzęską przybiera postać kulistą, zwaną bdelloplastem (ryc. 3).

Drapieżca czerpie substancje odżywcze oraz energię niezbędną do wzrostu z cytoplazmy zdobyczy, za pomocą swoistych pomp [5,16,20,21]. Następuje podział komórki w procesie wpuklenia osłon, powodujący wytworzenie przegrody, powstaje ściana komórkowa rozdzielająca

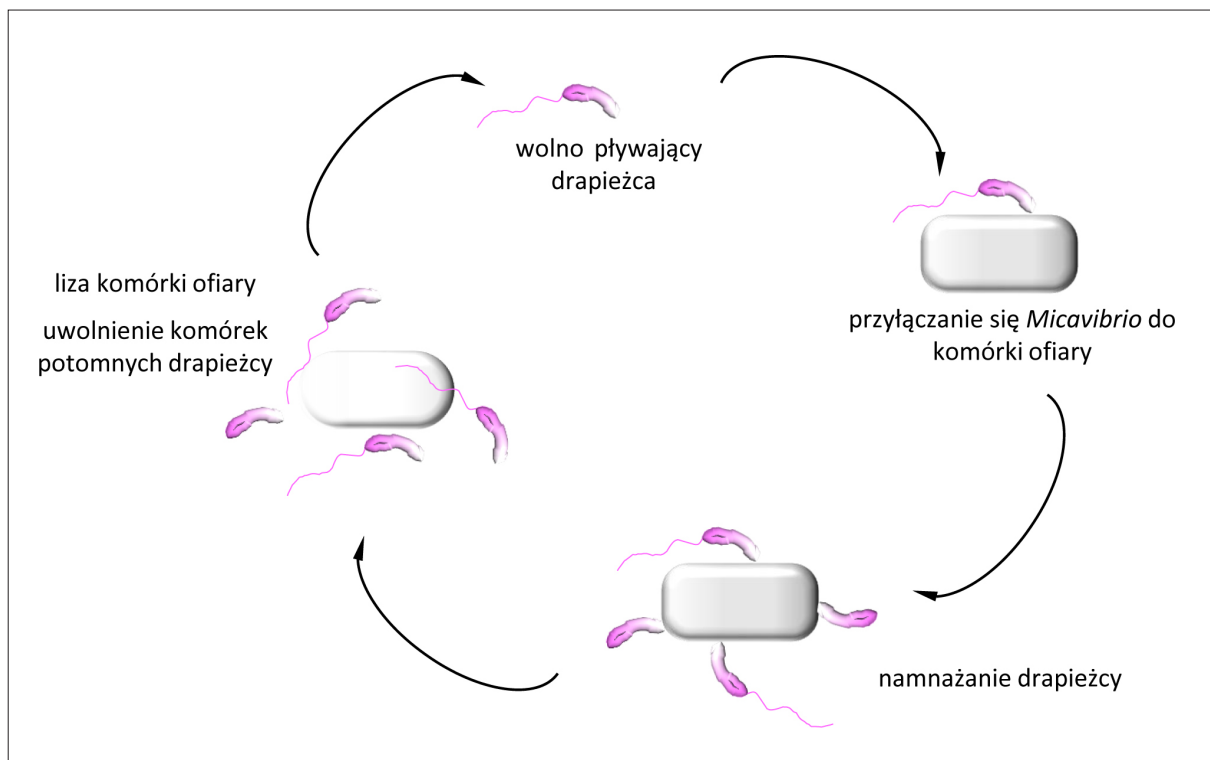
Ryc. 2. Cykl życiowy *Bdellovibrio bacteriovorus*Ryc. 3. Etapy wzrostu *B. bacteriovorus* w bdelloplasmie

komórki potomne. Następnie są wytwarzane rzęski, a komórka potomna indukuje powstanie porów w ścianie komórkowej gospodarza i wydostaje się na zewnątrz, by rozpocząć cykl od nowa (ryc. 3).

Fenton i wsp. [6] badając wzrost i podział *Bdellovibrio* w bdelloplasmie odkryli ważną zależność. Wiele drapieżców po wnikięciu do ofiary i uformowaniu bdelloplasmu nie rozpoczynało elongacji ani podziałów. Dokładna analiza tego zjawiska w mikroskopie elektronowym wskazała, że komórki rozpoczynają trawienie ofiary, jednak nie otrzymują z tego procesu wystarczającej ilości substancji odżywczych, by rozpocząć replikację całego genomu. Ponadto, dalsze analizy wykazały, że inwaginacja osłon komórkowych pojawia się tylko wtedy, gdy komórka *B. bacteriovorus* osiągnie maksymalny rozmiar.

### ANALIZA GENOMU *B. BACTERIOVORUS*

Genom *B. bacteriovorus* w pełni zsekwencjonowano w 2004 r. [21,23]. Badania wykazały obecność pojedynczego, kolistego chromosomu, o wielkości średnio 3,8 miliona nukleotydów [21]. Zsekwencjonowanie genomu *B. bacteriovorus* i innych drapieżców peryplazmatycznych i epibiotycznych ujawniło, że te pierwsze mają ponad 888 więcej genów kodujących białka (PCGs, protein-coding genes) i około 2/3 więcej genów kodujących enzymy o aktywności proteolitycznej. Niemniej jednak wciąż jeszcze nie poznano funkcji około 24% genów *Bdellovibrio* [16]. Wśród najlepiej poznanych produktów PCG wyróżnia się białka odpowiedzialne m.in. za metabolizm puryn, wewnątrzkomórkowy transport substancji odżywczych, biosyntezę rzęski oraz chemotaksję, syntezę peptydów sygnałowych, białko szoku cieplnego, hemolizyny i inne. Fazy wzrostu (GP) towarzyszy trans-



Ryc. 4. Cykl życiowy *Micavibrio* sp.

krypcja prawie 95,4% genów, których ekspresja nie była widoczna podczas fazy wolno pływającej bakterii [16].

Na podkreślenie uwagi zasługuje również to, iż genom *B. bacteriovorus* koduje nawet do 80% więcej genów antybiotykoooporności niż pozostałe bakterie drapieżne. Główną rolę odgrywają systemy pomp, które skutecznie usuwają lek z wnętrza komórki bakteryjnej [16].

U wszystkich bakteryjnych drapieżców odkryto również zestaw genów kodujących proteazy, charakterystyczny dla poszczególnych gatunków. U *B. bacteriovorus* składa się z 16 genów kodujących enzymy modyfikujące peptydoglikan, m.in. transglikozylazy, aminidazy, DD-endo-peptydazy i DD-karboksypeptydazy. Ponadto, odkryto swoiste dla *B. bacteriovorus* endopeptydazy, które „rzeźbią” struktury peptydoglikanu gospodarza w celu utworzenia stabilnej i bezpiecznej niszy do wzrostu. Genów tych nie znaleziono wśród innych epibiotycznych gatunków BALOs [16,21,23].

#### *Micavibrio aeruginosavorus*

Innym przykładem bakterii drapieżnej jest *Micavibrio aeruginosavorus*, należący do typu *Proteobacteria* (ryc. 1). Bakterię odkryto na początku lat osiemdziesiątych XX w., kiedy to podczas analizy próbek ścieków, wyizolowano nowy gatunek należący do BALOs, nadając mu nazwę rodzajową *Micavibrio* [12,22]. Mimo iż początkowo wszystkie bakterie drapieżne klasyfikowano jako jeden, unikalny rodzaj *Bdellovibrio*, dalsze badania oparte na

sekwencji 16S rRNA ujawniły zróżnicowany zbiór drapieżnych mikroorganizmów, w tym należący do klasy  $\alpha$ -*Proteobacteria* rodzaj *Micavibrio* (ryc. 1) [10,12,22]. *Micavibrio* spp. podobnie jak *Bdellovibrio bacteriovorus* jest Gram-ujemnym, bezwzględny drapieżcą, ale różni się od *B. bacteriovorus* przede wszystkim sposobem żerowania – jest epibiontem, czyli nie wnika do wnętrza komórki, ale przymocowuje się do ściany komórkowej ofiary i przez cały cykl pozostaje na zewnątrz [4,10,16]. Drapieżca ten cechuje się również dużą swoistością do ofiary. Atakuje głównie *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *K. pneumoniae*, jednak badania prowadzone przez Dashiffa i wsp. wykazały, że *M. aeruginosavorus* może niszczyć również komórki *Escherichia*, *Shigella* oraz w mniejszym stopniu może niszczyć także mieszane kultury bakterii, w skład których wchodziły bakterie z rodzaju *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* oraz *Yersinia* [4,12]. *Micavibrio* to niewielkie rozmiarem komórki o przecinkowym kształcie, długości do 1,5  $\mu\text{m}$ , co sprawia, że jest prawie dwukrotnie większa od *B. bacteriovorus* [3,4,12]. Drapieżca ma monotrychalne urzęsienie, umożliwiające aktywne poszukiwanie zdobyczy oraz atak i penetrację nawet biofilmu bakteryjnego [3,10,23].

#### Cykl życiowy *M. aeruginosavorus*

Na cykl życiowy *Micavibrio* składają się dwie główne fazy: ataku oraz wzrostu (ryc. 4). W fazie ataku, drapieżca dzięki aktywnemu ruchowi za pomocą rzęski poszukuje „ofiary”. Po znalezieniu zdobyczy *Micavibrio* przyłącza się do komórki zazwyczaj nieorzęsonym biegunem lub



podłużnym bokiem. Możliwe jest przyłączenie się do jednej ofiary wielu drapieżców.

W następnej fazie *Micavibrio* „wysysa” z komórki ofiary składniki odżywcze, potem zaczyna się wzrost i podział przez rozszczepienie binarne [3,22]. Faza ta kończy się lizą komórki ofiary i uwolnieniem jednej komórki potomnej *Micavibrio* ssp. [3,12,22]. *M. aeruginosavorus* jest zdolny do żerowania w temperaturze 25-37°C, ale traci tę zdolność w środowisku anaerobowym i mikroaerofilnym [10].

### ANALIZA GENOMU I TRANSKRYPTOMU

Analiza genomu *Micavibrio* spp. umożliwiła nie tylko przyporządkowanie tego rodzaju BALOs do  $\alpha$ -Proteobakterii, ale również ujawniła wiele unikatowych cech tego rodzaju [22]. Cały genom *Micavibrio aeruginosavorus* zawiera prawie 2,5 miliona par zasad, a zawartość par GC (guanina-cytozyna) wynosi 54,7%. Analiza wykazała, że drapieżca ma złożony zestaw genów odpowiedzialnych za cechy komórek wolno pływających (niezbędnych w fazie ataku), np. wiele genów odpowiedzialnych za szlaki metaboliczne (w tym glikolizę i szlak kwasu trikarboksylowego), transport elektronów i system oddychania, wytwarzanie syntetazy adenozyntrofosforanu (ATP, adenosine triphosphate), co wiąże się ze zdolnością do wytwarzania ATP. Zawiera również komplet genów umożliwiający syntezę nukleotydów *de novo*. *M. aeruginosavorus* nie ma natomiast genów odpowiedzialnych za biosyntezę aminokwasów oraz za pobieranie ich ze środowiska, dlatego brak wariantu HI w cyklu rozwojowym tego drobnoustroju [22].

Ważnym odkryciem okazała się obecność genów kodujących białka będące pochodnymi hemolizyny. Wiadomo, że drapieżca prowadzi do śmierci swojej zdobyczy, dlatego *M. aeruginosavorus* koduje aż 6 takich białek, należących do rodziny toksyn RTX (repeat in toxin). Białka wbudowują się w błonę komórkową gospodarza, tworząc w niej pory, a następnie z powodu wypływu substancji komórkowej dochodzi do lizy komórki. Sugeruje się, że białka te mogą również odgrywać ważną rolę w rozpoznawaniu ofiary, jak i w procesie adhezji [22].

W genomie *M. aeruginosavorus* znalazły się również geny kodujące fimbrie typu IV, które często biorą udział w adhezji, a następnie inwazji do komórek ofiary (jak w przypadku *B. bacteriovorus*). Wprawdzie *Micavibrio* spp. są epibiontami to fimbrie prawdopodobnie odgrywają ważną rolę w procesie adhezji. Na podstawie analizy transkryptomu wykazano, które geny odgrywają istotną rolę w poszczególnych fazach cyklu rozwojowego. W fazie ataku nasileniu ekspresji ulegają geny zaangażowane w biosyntezę rzęski czy proces chemotaksji. Natomiast w fazie przyłączania dominują produkty genów odpowiedzialne za replikację DNA, transkrypcję, translację, wytwarzanie energii, a także podział komórki. Dokładna analiza genomu *M. aeruginosavorus* wykazała obecność genów odpowiedzialnych za biosyntezę 13-ami-

nokwasów niezbędnych do biosyntezy białka. Jednak brak ścieżek metabolicznych do syntezy *de novo* pozostałych 7-aminokwasów (w tym alaniny, argininy, histydyny, izoleucyny, metioniny, tryptofanu i waliny) oraz braku systemów transportujących aminokwasy ze środowiska zewnętrznego uzasadnia tezę, iż *M. aeruginosavorus* jest bezwzględnie drapieżcą, zależnym od swej ofiary [22].

### WYKORZYSTANIE BALOs

#### Pozamedyczne

BALOs znalazło potencjalne zastosowanie w wielu dziedzinach życia. *B. bacteriovorus* przeżywa wiele lat w przesuszanej glebie, a w razie pojawienia się potencjalnej ofiary szybko przystosowuje się do „ponownego” drapieżnictwa. W dużej liczbie występuje w strefie korzeniowej, wśród bakterii ryzosfery. Po raz pierwszy z sukcesem wykorzystano *B. bacteriovorus* w rolnictwie w 1973 r., do zwalczaniu zarazy wywołanej przez *Pseudomonas glycinea*. W innych badaniach wykluczono szkodliwe działanie *Bdellovibrio* na symbionty roślinne [5].

Po ograniczeniu stosowania antybiotyków w hodowlach zwierząt, naukowcy zaczęli badać możliwość wykorzystania bakterii drapieżnych jako potencjalne substytuty dostępnych środków farmaceutycznych. Atterbury i wsp. [1] przeprowadzili badanie na kurczętach, które zainfekowano bakteriami *Salmonella enterica*, a następnie doustnie podawano *B. bacteriovorus*. Okazało się, że BALOs skutecznie eliminowało *S. enterica*, znacznie łagodząc stany zapalne spowodowane zakażeniem [1]. Inni badacze zastosowali *Bdellovibrio* w zmniejszaniu objawów zapalenia rogówki wywołanej przez *Shigella flexneri* u królików [5]. Zastosowano również *Bdellovibrio* w zwalczaniu infekcji oka u krów o etiologii *Moraxella bovis* [2]. Wykorzystano również BALOs do zwalczania zakażeń bakteryjnych u ryb w stawach hodowlanych [5]. Autorzy powyższych badań wskazują na potencjał BALOs, przez stosowanie ich w eliminowaniu wielu infekcji.

*Bdellovibrio bacteriovorus* znalazło zastosowanie również w przemyśle spożywczym. Przeprowadzono testy badające zdolność BALOs do lizy 32 szczepów bakteryjnych w obrębie 6 rodzajów patogenów powodujących zatrucia pokarmowe. Badania wykazały skuteczność *Bdellovibrio* w zwalczaniu drobnoustrojów patogennych i biorących udział w psuciu się żywności, nawet w niskich temperaturach. Inne badania tej samej grupy skupiły się na zdolności *B. bacteriovorus* do niszczenia mikroorganizmów z powierzchni urządzeń używanych do przetwarzania żywności, w tym eliminacji bakterii *E. coli* szczep O157:H7 oraz *Salmonella* sp. obecnych na powierzchni ze stali nierdzewnej [5].

### MEDYCZNE ZASTOSOWANIA

Mimo wielu doniesień, najczęściej badań skupia się jednak nad możliwym wykorzystaniem BALOs w walce

z bakteriami antybiotykoopornymi. Jest to spowodowane poszukiwaniami skutecznego zwalczania infekcji spowodowanych lekoopornymi szczepami bakterii [11,17,20]. Istotne jest to, iż bakterie drapieżne wprowadzane do organizmu człowieka w profilaktyce zakażeń wywołanych szczepami lekoopornymi, nie powinny być szkodliwe dla organizmu. W tym kierunku wykonano wiele badań, np. w 1973 r. wykazano brak patogenności *Bdellovibrio* u myszy, królików i świnek morskich. Wykazano również brak możliwości namnażania się szczepu *Bdellovibrio* w przewodzie pokarmowym ryb, żab i myszy. W badaniach obserwowano stopniowe zmniejszanie się liczby drapieżców. Dwidar i wsp. [5] wykazali, iż podanie doustne preparatu zawierającego bakterie drapieżne zmieniło naturalną mikrobiotę jelit, jednak zmiana ta nie wpłynęła negatywnie na wzrost i dobre samopoczucie organizmu [kurcząt]. W innych testach odrzucono możliwość wzrostu BALOs na komórkach zwierzęcych. Następnie pojawiły się wyniki badań dotyczących immunogenności bakterii drapieżnych u człowieka. Przede wszystkim ich LPS zamiast grup fosforanowych zawiera reszty  $\alpha$ -D-mannozy, co ma mniejsze powinowactwo do receptorów dla lipopolisacharydu oraz mniejszą toksyczność wobec komórek ludzkich [15].

Większość BALOs wykazuje nieswoisty wybór ofiary *B. bacteriovorus* może atakować Gram-ujemne bakterie ze ściśle spokrewnionych gatunków, jak również oddalonych od siebie filogenetycznie. Mogą atakować bakterie z rodzaju *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Listonella*, *Morganella*, *Proteus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* i *Yersinia*, a także mogą również żerować na *Campylobacter jejuni*, czy *Helicobacter pylori* (tabela 1) [3,5]. Ważne okazały się wyniki badań Monnappa i wsp. [13] i Iebba i wsp. [9], którzy użyli *B. bacteriovorus* do zwalczania biofilmu utworzonego przez Gram-dodatnie ziarniaki *S. aureus*, w obu przypadkach zakończone

sukcesem. W badaniach prowadzonych pod nadzorem Kadouriego i wsp. [12] ekspozycja na *B. bacteriovorus* wielolekoopornych bakterii wyizolowanych z krwi, moczu, płwociny, oskrzeli i ran (m.in. *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas* spp., opornych na ceftazydym, cefotaksym, tetracyklinę, gentamycynę, imipenem, meropenem, cefepim, amikacynę, trimetoprim, sulfametoksazol) powodowała liżę 93% komórek ofiary.

Jak wynika z danych literaturowych, *M. aeruginosavorus* atakuje bardzo nieliczne bakterie Gram-ujemne. Wielu badaczy opisało, że może żerować głównie na trzech gatunkach: *Pseudomonas aeruginosa* (mimo iż jest bakterią oportunistyczną, to jest również jednym z najważniejszych i najgroźniejszych lekoopornych drobnoustrojów powodujących zakażenia szpitalne), *Burkholderia cepacia* (oporna na wiele antybiotyków bakteria występująca w zakażeniach wewnątrzszpitalnych) oraz *Klebsiella pneumoniae* (pałeczka o dużej zjadliwości z wrodzoną opornością na antybiotyki) [3,12,16]. Ponadto, o zdolności do żerowania danego gatunku może zadecydować również szczep drapieżcy, np. do badań nad użyciem BALOs w infekcjach oczu Shanks i wsp. [17] użyli dwa szczepy *M. aeruginosavorus* HD100 oraz 109J, pierwszy (HD100) powodował śmierć 100% komórek klinicznego szczepu *P. aeruginosa*, a drugi (109J) tylko 70%.

BALOs mogą również degradować biofilm, którego wytwarzanie jest przejawem zjadliwości wielu gatunków bakterii odpowiedzialnych za zakażenia. Biofilm to zwarte skupisko mikroorganizmów przyklejone do powierzchni, wytwarzające zewnątrzkomórkową macierz, która je chroni i zakotwicza w tkance, a także na implantach medycznych oraz sprzęcie medycznym [3,12]. Biofilm bakteryjny wytwarzany jest m.in. przez uropatogenne szczepy *E. coli* izolowane z zakażeń układu moczowego, *P. aeruginosa* wywołującego zakażenia ran, obrażeń pooparzeniowych i dróg oddechowych, czy

**Tabela 1.** Porównanie zakresu gospodarzy (ofiary) *B. bacteriovorus* oraz *M. aeruginosavorus*

	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	<i>Micavibrio aeruginosavorus</i>		<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	<i>Micavibrio aeruginosavorus</i>
<i>Acinetobacter</i> spp.	+	-	<i>P. vulgaris</i>	+	+/-
<i>Aeromonas</i> spp.	+	n.a.	<i>Ps. aeruginosa</i>	+/-	+
<i>B. bronchiseptica</i>	+	-	<i>Ps. fluorescens</i>	+	-
<i>B. cepacia</i>	+	+	<i>Ps. syringae</i>	+	-
<i>C. freundii</i>	+	-	<i>S. enterica</i>	+	n.a
<i>Enterobacter</i> spp.	+	+/-	<i>S. marcescens</i>	+	-
<i>E. coli</i>	+	+	<i>Shigella</i> spp.	+	+
<i>K. pneumoniae</i>	+	+	<i>S. aureus</i>	-	n.a
<i>M. morgani</i>	+	-	<i>Vibrio</i> spp.	+	-
<i>P. mirabilis</i>	+	+	<i>Yersinia</i> spp.	+	-

+ - zdolność do żerowania na ofierze, -- brak zdolności do żerowania, n.a - brak badań.

bytujące w płytce nazębnej liczne bakterie Gram-ujemne mogące się przyczyniać do powstawania próchnicy [20].

Kadouri i wsp. [12] oraz Dashiff i wsp. [3] przeprowadzili badania nad zdolnością bakterii drapieżnych (*M. aeruginosavorus* oraz *B. bacteriovorus*) do atakowania i niszczenia biofilmu bakteryjnego. W celu zobrazowania tego zjawiska naukowcy przeprowadzili analizę z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM, scanning electron microscope). Uzyskany na szkiełku podstawowym biofilm poddano ekspozycji bakteriami drapieżnymi. Po inkubacji, szkiełka przepłukano w celu usunięcia uwolnionych z biofilmu komórek. Badania wskazują jednoznacznie na zdolność *M. aeruginosavorus* do niszczenia biofilmu. Naukowcy odnotowali redukcję biofilmu w 69% po 12 godzinach oraz w 87% po 24 godzinach ekspozycji na drapieżcę w porównaniu z próbą kontrolną. Ponadto, *Micavibrio* redukuje biofilm utworzony ze szczepów klinicznych *P. aeruginosa* prawie w 82% [12]. Jak wykazali Dashiff i wsp. [3], poza atakowaniem bakterii z rodzaju *Burkholderia*, *Pseudomonas* i *Klebsiella*, *M. aeruginosavorus* jest zdolny do żerowania na bakteriach z rodzaju *Escherichia* czy *Shigella*. Odnotowano również zdolność *Micavibrio* do niszczenia wielogatunkowych biofilmów wytworzonych przez bakterie z rodzaju *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* oraz *Yersinia* [3].

Podobne badania wykonano z *B. bacteriovorus*, który atakuje zarówno komórki wolno pływające (planktoniczne), jak również biofilmy jedno- lub wielogatunkowe. W przypadku tego drapieżcy występowała większa redukcja komórek w biofilmie, co mogło być związane z dużą gęstością komórek ofiary i łatwiejszym napotkaniem swojej zdobyczy. Widoczna była znaczna redukcja biofilmu w każdej próbie użycia *B. bacteriovorus* w porównaniu do próby kontrolnej. W odróżnieniu od bezkręgowców, pierwotniaków i bakteriofagów, również używanych do redukcji biofilmu, żerowanie BALOs nie ogranicza się tylko do warstwy zewnętrznej biofilmu [3,13]. Monappa i wsp. [13] pierwsi wykazali zdolność *B. bacteriovorus* do inwazji biofilmu utworzonego przez *S. aureus*. Zauważyli, że wariant HI *B. bacteriovorus* wydziela

do środowiska wzrostu liczne proteazy. Dalsze badania ujawniły, iż supernatant z *B. bacteriovorus* ma wystarczającą aktywność lityczną, by uniemożliwić tworzenie się biofilmu *S. aureus*, jak również powoduje rozluźnienie struktury istniejącego już biofilmu [13].

Ważnymi obserwacjami zakończyły się również badania Iebby i wsp. [9] nad żerowaniem *B. bacteriovorus* na szczepach klinicznych *P. aeruginosa* i *S. aureus* wyizolowanych od chorych na mukowiscydozę. Wśród cierpiących na tę śmiertelną, uwarunkowaną genetycznie chorobę stwierdza się uporczywe przewlekłe i nawracające infekcje dróg oddechowych, często prowadzące do niewydolności oddechowej. W mukowiscydozie za rozwój infekcji są odpowiedzialne zazwyczaj antybiooporne bakterie *P. aeruginosa* i *S. aureus* zdolne do tworzenia biofilmu. Zauważono, że po 24-godzinnej ekspozycji biofilmu *S. aureus* na *B. bacteriovorus* nastąpiła znaczna redukcja biofilmu. Obserwacja pod mikroskopem wskazała nowe zjawisko: komórki drapieżcy żerują na swojej ofierze *S. aureus* w sposób epibiotyczny. W przypadku *P. aeruginosa* drapieżca zachował peryplazmatyczną strategię żerowania. Warto zauważyć, że ta podwójna strategia żerowania *B. bacteriovorus* oraz jego nieszkodliwość wobec komórek ssaków, mogłaby zostać wykorzystana w celu zwalczania infekcji *in vivo* nie tylko wśród chorych na mukowiscydozę [9].

## PODSUMOWANIE

Występujące w środowisku naturalnym zjawisko drapieżnictwa między bakteriami jest niezbędnym procesem warunkującym zachowanie bioróżnorodności. Wykazany w badaniach wysoki potencjał BALOs w walce z patogenami u zwierząt, stwarza ogromne nadzieje na wykorzystanie bakterii drapieżnych, które mogą atakować inne bakterie patogenne dla człowieka, ze szczególnym uwzględnieniem bakterii wielolekoopornych. Nie można zatem wykluczyć, iż w przyszłości bakterie drapieżne będą wykorzystywane w przypadkach klinicznych, gdy zawodzą standardowe schematy leczenia.

## PIŚMIENICTWO

- [1] Atterbury R.J., Hogley L., Till R., Lambert C., Capeness M.J., Lerner T.R., Fenton A.K., Barrow P., Sockett R.E.: Effects of orally administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the well-being and *Salmonella* colonization of young chicks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 77: 5794-57803
- [2] Boileau M.J., Clinkenbeard K.D., Iandolo J.J.: Assessment of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J killing of *Moraxella bovis* in an *in vitro* model of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Can. J. Vet. Res.*, 2011; 75: 285-291
- [3] Dashiff A., Junka R.A., Libera M., Kadouri D.E.: Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Appl. Microbiol.*, 2011; 110: 431-444
- [4] Dashiff A., Keeling T.G., Kadouri D.E.: Inhibition of predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* via host cell metabolic activity in the presence of carbohydrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011; 77: 2224-2231
- [5] Dwidar M., Monappa A.K., Mitchell R.J.: The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Rep.*, 2012; 45: 71-78
- [6] Fenton A.K., Kanna M., Woods R.D., Aizawa S.I., Sockett R.E.: Shadowing the actions of a predator: backlit fluorescent microscopy reveals synchronous nonbinary septation of predatory *Bdellovibrio* inside prey and exit through discrete bdelloplast pores. *J. Bacteriol.*, 2010; 192: 6329-6335
- [7] Ferguson M.A., Núñez M.E., Kim H.J., Goffredi S., Shamskhou E., Faudree L., Chang E., Landry R.M., Ma A., Choi D.E., Thomas N., Schmitt J., Spain E.M.: Spatially organized films from *Bdellovibrio bacteriovorus* prey lysates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014; 80: 7405-7414
- [8] Harini K., Ajila V., Hegde S.: *Bdellovibrio bacteriovorus*: A future antimicrobial agent? *J. Indian. Soc. Periodontol.*, 2013; 17: 823-825
- [9] Iebba V., Totino V., Santangelo F., Gagliardi A., Ciotoli L., Virga A.,



Ambrosi C., Pompili M., De Biase R.V., Selan L., Artini M., Pantanella F., Mura F., Passariello C., Nicoletti M., i wsp.: *Bdellovibrio bacteriovorus* directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cystic fibrosis isolates. *Front. Microbiol.*, 2014; 5: 280

[10] Jurkevitch E.: Predatory behaviours in bacteria – diversity and transitions. *Microbe*, 2007; 2: 67-73

[11] Kadouri D.E., To K., Shanks R.M., Doi Y.: Predatory bacteria: A potential ally against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *PLoS One*, 2013; 8: e63397

[12] Kadouri D., Venzon N.C., O'Toole G.A.: Vulnerability of pathogenic biofilms to *Micavibrio aeruginosavorus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 605-614

[13] Loozen G., Boon N., Pauwels M., Slomka V., Rodrigues Herro E., Quirynen M., Teughels W.: Effect of *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 on multispecies oral communities. *Anaerobe*, 2015; 35: 45-53

[14] Monnappa A.K., Dwidar M., Seo J.K., Hur J.H., Mitchell R.J.: *Bdellovibrio bacteriovorus* inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and invasion into human epithelial cells. *Sci. Rep.*, 2014; 4: 3811

[15] NCBI. Taxonomy Browser. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi> (27.06.2016)

[16] Pasternak Z., Njagi M., Shani Y., Chanyi R., Rotem O., Lurie-Weinberger M.N., Koval S., Pietrovski S., Gophna U., Jurkevitch E.: In and out: an analysis of epibiotic vs periplasmic bacterial predators. *ISME J.*, 2014; 8: 625-635

[17] Shanks R.M., Davra V.R., Romanowski E.G., Brothers K.M., Stella N.A., Godbole D., Kadouri D.E.: An eye to a kill: using predatory bacteria to control Gram-negative pathogens associated with ocular infections. *PLoS One*, 2013; 8: e66723

[18] Shanks R.M., Kadouri D.E.: Predatory prokaryotes wage war against eye infections. *Future Microbiol.*, 2014; 9: 429-432

[19] Shatzkes K., Chae R., Tang C., Ramirez G.C., Mukherjee S., Tsenova L., Connell N.D., Kadouri D.E.: Examining the safety of respiratory and intravenous inoculation of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* in a mouse model. *Sci. Rep.*, 2015; 5: 12899

[20] Sinha A., Hurakadli M., Ravindra S., Agarwal A.: *Bdellovibrio* like organisms: the predatory assassin. *IOSR J. Dent. Med. Sci.*, 2014; 13: 32-36

[21] Strauch E., Schwudke D., Linscheid M.: Predatory mechanisms of *Bdellovibrio* and like organisms. *Future Microbiol.*, 2007; 2: 63-73

[22] Wang Z., Kadouri D.E., Wu M.: Genomic insights into an obligate epibiotic bacterial predator: *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13. *BMC Genomics*, 2011; 12: 453

[23] Welsh R.M., Thurber R.V.: Bacterial predators in host microbiomes. *Microbe*, 2016; 11: 61-67

[24] Williams H.N., Pineiro S.: Ecology of the predatory *Bdellovibrio* and like organisms. W: *Predatory prokaryotes. Biology, Ecology and Evolution. Microbiology Monographs*, red.: Jurkevitch E. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007; 4: 213-248

---

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.