

JULITTA GAJEWSKA*, KLAUDIA SZEWCZUK*,
WAWRZYNIEC PLADYS**, PAWEŁ SYSA***

**WRAŻLIWOŚĆ DRAPIEŻNYCH BAKTERII Z RODZAJU
BDELLOVIBRIO I ICH OFIAR Z RODZINY
ENTEROBACTERIACEAE NA WYBRANE ANTYBIOTYKI
I ŚRODEK DEZYNFEKCYJNY**

Streszczenie

Celem pracy była ocena możliwości wykorzystania bakterii drapieżnych z rodzaju *Bdellovibrio* do oczyszczania ścieków komunalnych z patogenych bakterii *Serratia liquefaciens* i *Citrobacter freundii*. Wykazano, że wyizolowane ze ścieków bakterie drapieżne oraz ich ofiary były wrażliwe na antybiotyki, m.in. chloramfenikol, streptomycynę i tetracyklinę oraz płyn dezynfekcyjny tzw. Wodę Ecofair. Stwierdzono, że bakterie *Bdellovibrio* sp. mogą pełnić funkcję regulatora liczebności bakterii G (-) z rodziny *Enterobacteriaceae*.

Słowa kluczowe: bakterie drapieżne, *Bdellovibrio* sp., *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacteriaceae*, patogeny, ścieki komunalne, Woda Ecofair

WPROWADZENIE

Ścieki to wody zużyte na potrzeby bytowo-gospodarcze, przemysłowe i inne. W zależności od pochodzenia, ich skład chemiczny może być różny, niemniej jednak zawsze obecne są mikroorganizmy. Ścieki powinny być oczyszczone tak, aby obecne w nich bakterie nie stanowiły zagrożenia dla jakości gleby i wody powierzchniowej [Błaszczuk 2007]. Naturalnymi antagonistami Gram-ujemnych bakterii są drapieżne bakterie z rodzaju *Bdellovibrio*, występujące w różnych środowiskach, w tym w ściekach komunalnych [Gajewska, Dąbrowski 2008, Jurkevitch 2006].

* Samodzielny Zakład Biologii Mikroorganizmów, SGGW Warszawa

** Ecofair, Warszawa

*** Zakład Histologii i Embriologii SGGW Warszawa

W artykule przedstawiono wyniki badań, których celem była ocena przydatności bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus* w ograniczeniu liczby wybranych patogennych bakterii G(-) z rodziny *Enterobacteriaceae*, występujących w ściekach komunalnych.

METODYKA BADAŃ

Bdellovibrio bacteriovorus jest Gram-ujemną bakterią drapieżną, żywiącą się protoplastem innych bakterii Gram (-). Ten niespecyficzny i nietypowy dla bakterii tryb życia przyczynił się do postrzegania *Bdellovibrio sp.* jako potencjalnego kandydata naturalnego reducenta liczby bakterii w ściekach. Do zwerifikowania tych poglądów użyto dwóch przedstawicieli z rodzaju *Enterobacteriaceae* zaklasyfikowanych jako *Serratia liquefaciens* i *Citrobacter freundii*. Wszystkie szczepy, zarówno ofiary jak i drapieżnik są zawsze obecne w ściekach.

W badaniach wykorzystano ścieki komunalne z Grodziska Mazowieckiego. Ścieki zostały rozcieńczone w zakresie 10^{-1} – 10^{-6} w roztworze fizjologicznym. Zawiesiny wysiewano po 100 μ l na podłoża Endo i agar odżywczy metodą posiewu powierzchniowego, a także po 1 ml na Petrifilmy 3M Poland (3MTM PetrifilmTM Enterobacteriaceae Count Plater; 3MTM PetrifilmTM E.coli/Coliform Count Plater; 3MTM PetrifilmTM Aerobic Count Plates). Z wyrosłych kolonii wykonywano preparaty barwione metodą Grama, w celu wytypowania potencjalnych ofiar dla *Bdellovibrio sp.*, preferujących bakterie Gram (-). Kolejnym etapem było oczyszczenie materiału poprzez wielokrotne pasáže na podłoża: agar odżywczy (AO) i Trypticase Soy Agar (TSA). Dalsza identyfikacja była przeprowadzana za pomocą tradycyjnych testów biochemicznych, przy użyciu podłoży, m.in.: Columbia Agar, Endo, Christensena z mocznikiem, Voges – Proscauer, wody peptonowej z tryptofanem, Simmonsa, podłoża Salmonella – Shigella (SS) oraz Enterosystemu 18 R firmy Liofilchem i potwierdzone testami Microgen GnA+B-ID firmy Microgen Bioproducts.

Materiał z kolonii *Bdellovibrio sp.* namnażano w 5 ml podłoża YP w próbkach, następnie inkubowano przy użyciu łaźni z wytrząsaniem (150 rpm/30° C) przez 3h. Po odwirowaniu (~ 3000g/15 min) osad zawieszano w świeżej pożywce i w dalszej kolejności używano go do namnażania drapieżnika.

W dalszym etapie próbowano doprowadzić do izolacji i namnażania *Bdellovibrio bacteriovorus*. Materiałem bazowym były również ścieki komunalne, które poddano dwóm typom wirowania – jednocyklowemu wg zmodyfikowanej metody Varon i Shilo (~10000g/10 min) [Varon, Stilo 1969] oraz trójcyklowemu (trzy cykle każdy ~2000g/30 min) [Dias, Bhat 1965].

Do izolacji *Bdellovibrio sp.* ze środowiska zastosowano technikę dwuwarstwową [Stolp i Starr 1963]. Do próbki zawierającej po 0,1 ml wodnego

roztworu jonów Mg^{2+} i Ca^{2+} (o końcowym stężeniu odpowiednio 0,003M i 0,002M), dodano 1 ml próbki zawierającej drapieżnika i 0,1 ml próbki ofiary. Następnie tak złożoną mieszaninę inkubowano (20 min/25° C), w celu umożliwienia adhezji drapieżnika do ofiary. Po tym czasie całość zalano 2,9 ml płynnej pożywki YP (temp ok. 47-50° C), o końcowym stężeniu ok. 0,65% i wylano ją na wcześniej przygotowane na płytkach zestalone podłoże YP o stężeniu ok. 1,5%. Po zestaleniu się wierzchniej warstwy, płytki inkubowano przez 7 dni w temperaturze 30°C.

Pojawienie się pierwszych, pojedynczych łąsinek wymusiło konieczność dodatkowego namnażania *B. bacteriovorus*, celem zwiększenia ich ilości, niezbędnej do dalszych badań. W tym celu wykorzystano zmodyfikowaną metodę hodowli płynnej wg Jurkevitcha [Jurkevitch 2006]: materiał z łąsinki był wycinany z otaczającym go agarem i umieszczany w kolbkach o pojemności 100 ml, zawierających 50 ml pożywki YP zaszczerpionej wcześniej preferowaną ofiarą, by w dalszej kolejności inkubować ją w łąźni z wytrząsaniem (150 rpm/30° C).

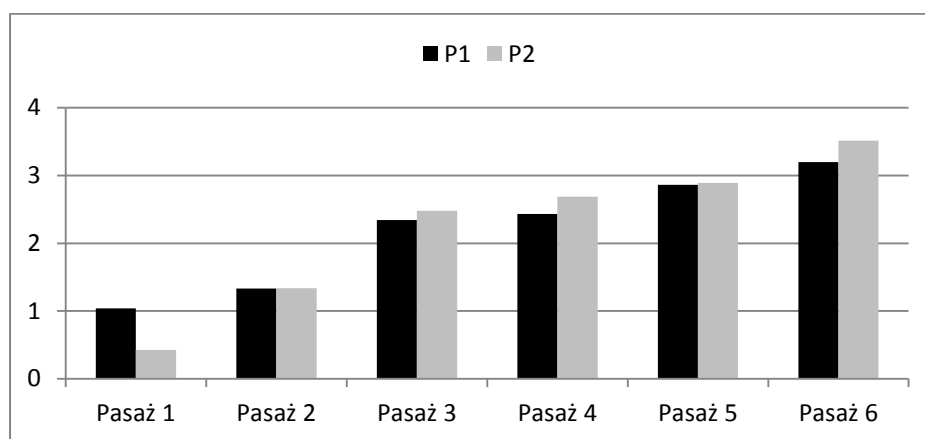
W celu określenia wrażliwości *Bdellovibrio sp.* i jego ofiar, użyto płyn o działaniu biobójczym, tzw. Wodę Ecofair, będącą elektrochemicznie przetworzoną wodą wodociągową (firmy Ecofair Sp. z o.o.) o pH 6,2 i 8,2. Zastosowano metodę krążkowo-dyfuzyjną, przy użyciu techniki dwuwarstwowej.

Woda Ecofair (w wyniku procesu elektrochemicznego przetwarzania wody wodociągowej z dodatkiem nieznacznej ilości chlorku sodu w postaci dopuszczonej do spożycia soli spożywczej) zawiera: 80% - ClO_2 , który w zależności od poziomu pH uwalnia się do Cl_2 ; ponadto w wodzie Ecofair występują w śladowych ilościach: Cl_2O , $HClO$, $HClO_2$, $HClO_3$, $Cl-1$, O^* (rodnik, uwodniony), OH (rodnik wodorotlenowy). Woda Ecofair charakteryzuje się silnym potencjałem redox (informacja producenta).

W celu określenia wrażliwości *Bdellovibrio sp.* i jego ofiar, na płytkę Petriego o średnicy 9 cm z podłożem agarowym wysiewano po 0,1 ml hodowli bakterii (OD 1,0), a następnie umieszczano 6 krążków bibułowych o średnicy 6 mm, z antybiotykami (amoksylicyna – Amc 30, ampicylina – Amc 30, ceftazydym – Caz 30), chloramfenikol – C 30, streptomycyna – S 10, tetracyklina – Te 30), o średnicy 6 mm (firmy Biomed) lub zawierających 0,01 ml Wody Ecofair (pH 6,2 i 8,2). W przypadku oznaczania wrażliwości bakterii na Wodę Ecofair, kontrolę stanowiły krążki bibułowe o średnicy 6 mm, nasączone po 0,01 ml jałowego roztworu soli fizjologicznej (0,85% NaCl) o pH 6,2 i 8,2. Po 2 godz. preinkubacji w temp. +4° C, płytki hodowano w temp. 30° C przez okres do 12 dni i odczytywano wrażliwość szczepów na podstawie strefy zahamowania wzrostu, pojawienia się lub braku łąsinek oraz kontroli mikroskopowej w preparatach w kropli płaskiej, przy użyciu mikroskopu Nikon E600 z kamerą. Badania wykonywano w 2 powtórzeniach.

WYNIKI BADAŃ

Po izolacji bakterii *Bdellovibrio sp.* na podłożach Endo i AO a także na Petrifilmach firmy 3M Poland, przystąpiono do ich identyfikacji. W celu zweryfikowania i potwierdzenia wyników, przeprowadzono dwa typy systemów biochemicznych: tradycyjny oraz Enterosystem 18 R firmy Liofilchem, potwierdzone testami Microgen GnA+B-ID firmy Microgen Bioproducts. Na podstawie przeprowadzonych badań wyizolowano i zidentyfikowano dwa szczepy ofiar, należących do rodziny *Enterobacteriaceae*: *Serratia liquefaciens* (P 1) i *Citrobacter freundii* (P 2). Na rys. 1 przedstawiono wyniki oznaczenia liczebności bakterii *Bdellovibrio bacteriovorus*, w hodowlach pałeczek ofiar P 1 i P 2. Najwyższą liczebność bakterii drapieżnych z rodzaju *Bdellovibrio* uzyskano w wyniku 6 pasaży w hodowli z bakteriami ofiar.

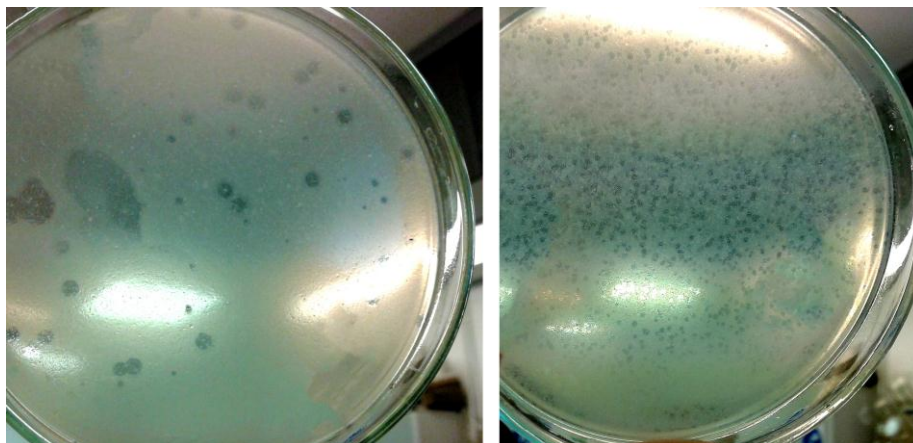


Rys. 1 Zmiana liczby łysinek w kolejnych pasażach poprzedzonych preinkubacją; P 1 i P 2- ofiary preferowane przez *Bdellovibrio bacteriovorus*

Fig. 1 Change of the plaques number in subsequent passages preceded by preincubation; P 1 and P 2 - preys preferred by *Bdellovibrio bacteriovorus*

Fot. 1 ilustruje morfologię łysinek i wzrost liczby bakterii *Bdellovibrio sp.* wyhodowanych na szczepie *Serratia liquefaciens* po piątym pasażu, w porównaniu z drugim pasażem.

Po namnożeniu szczepu drapieżcy do liczebności ok. 10^3 jtk cm^{-3} , a ofiar do ok. 10^8 jtk cm^{-3} , użyto je do oznaczenia wrażliwości na Wodę Ecofair (pH 6,2 i 8,2). Kontrolę stanowiły dwie próbki soli fizjologicznej (0,85% roztwór NaCl) o identycznych odczynach, oznaczone jako K 1 (pH 6,2) oraz K 2 (pH 8,2). Wyniki badań przedstawiono w tabelach 1 i 2.



Fot. 1 Zmiana liczby łysinek w pasażu 2 (po lewej) i pasażu 5 (po prawej) zawierających bakterie *Bdellovibrio* sp. hodowane na bakteriach *Serratia liquefaciens*
 Fot. 1 Change of plaques number in second passage (on left) and fifth passage (on right) contained *Bdellovibrio* sp. bacteria cultivated on *Serratia liquefaciens* bacteria

Tab. 1. Oznaczenie wrażliwości bakterii ofiar: P 1 – *Serratia liquefaciens* i P 2 – *Citrobacter freundii*, na działanie Wody Ecofair (pH 6,2 i 8,2), w porównaniu z kontrolą (K 1 i K 2)

Tab.1. Determination of the sensitivity of victims bacteria: P 1 – *Serratia liquefaciens* i P 2 – *Citrobacter freundii* on Ecofair Water (6,8 and 8,2 pH), in comparison with controls (K 1 and K 2)

Szczep	Strefa zahamowania wzrostu [mm] po działaniu Wody Ecofair na płytkach Petriego o średnicy 9 cm			
	pH 6,2	pH 8,2	K1	K2
P 1	10	10	0	0
	9	10	0	0
	10	9	0	0
	10	11	0	0
\bar{x}_{sr} dla P 1	9,75	10	0	0
P 2	10	10	0	0
	9	9	0	0
	10	10	0	0
	10	11	0	0
\bar{x}_{sr} dla P 2	9,75	10	0	0
\bar{x}_{sr} dla antybiotyków (chloramfenikol, tetracyklina i streptomycyna)	9,75	10	0	0

Następnie, po oznaczeniu wrażliwości ofiar na Wodę Ecofair, wykonano podobne oznaczenia, z użyciem techniki dwuwarstwowej, w celu określenia wrażliwości *Bdellovibrio bacteriovorus* (tab. 2).

W obu przypadkach strefy zahamowania wzrostu bez widocznych bakterii powstałe wskutek biobójczego działania Wody Ecofair, były kontrolowane mikroskopowo, z wykorzystaniem mikroskopu kontrastowo-fazowego Nikon Eclipse E600 z kamerą. Badania potwierdziły brak obecności zarówno drapieżnika, jak i ofiar w strefach zahamowania wzrostu. Wykazano, że zarówno bakterie drapieżne, jak i ich ofiary były wrażliwe na działanie chloramfenikolu, streptomycyny, tetracykliny oraz płynu dezynfekcyjnego tzw. Wody Ecofair (pH 6,2 i 8,2) oraz odporne na działanie takich antybiotyków, jak amoksylicyna, ampicylina i ceftazydym.

Tab. 2. Określenie strefy wrażliwości *B. bacteriovorus* po działaniu Wody Ecofair. P 1 i P 2 - szczepy ofiar, K 1 i K 2 - próby kontrolne

Tab. 2. Determination of the sensitivity zones for *B. bacteriovorus* after Ecofair Water action; P 1 and P 2 - prey strains; K 1 and K 2 - the controls

Szczepy	Strefy zahamowania wzrostu bakterii [mm] po działaniu Wody Ecofair nma płytkach Petriego o średnicy 9 cm			
	pH 6,2	pH 8,2	K1	K2
P 1	13	15	0	0
	14	14	0	0
	12	15	0	0
	13	13	0	0
	15	12	0	0
	6	12	0	0
	12	12	0	0
	7	10	0	0
\bar{x}_{sr} dla P 1	11,50	12,88	0	0
P 2	15	12	0	0
	15	11	0	0
	12	12	0	0
	13	12	0	0
	13	0	0	0
	12	0	0	0
	13	12	0	0
	11	12	0	0
\bar{x}_{sr} dla P 2	13,00	9,88	0	0
\bar{x}_{sr} dla P 1 i P 2	12,25	11,38	0	0

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

Badane ścieki komunalne okazały się dobrym materiałem umożliwiającym izolację *Bdellovibrio bacteriovorus*, podobnie jak we wcześniejszej pracy Gajewskiej i Dąbrowskiego [2008]. Autorzy izolowali ze ścieków bakterie *Bdellovibrio sp.* przy użyciu izolatów bakterii chorobotwórczych *Aeromonas hydrophila*, podobnie stosując technikę płytek dwuwarstwowych. W badaniach wykazanie powinowactwa bakterii *Bdellovibrio sp.* do dwóch kolejnych gatunków patogennych dla ludzi i zwierząt, oznaczonych jako *Serratia liquefaciens* i *Citrobacter freundii*, wskazało na pozyteczny i pożądany wpływ *Bdellovibrio bacteriovorus* na redukcję liczebności wyizolowanych patogennych bakterii jelitowych, występujących w ściekach komunalnych.

Na podstawie badań ustalono, że:

1. *Bdellovibrio bacteriovorus* jako bakteria drapieżna, może być skutecznie wykorzystana do redukcji liczby patogenów z rodziny *Enterobacteriaceae*, występujących w ściekach komunalnych.
2. Woda Ecofair może być stosowana do redukcji liczebności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, obecnych w ściekach komunalnych (*Serratia liquefaciens* i *Citrobacter freundii*).
3. Łączne zastosowanie szczepu drapieżcy *Bdellovibrio bdellovorus* i Wody Ecofar do eliminacji chorobotwórczych pałeczek jelitowych nie jest wskazane, ze względu na wrażliwość drapieżcy na ten środek dezynfekcyjny.

LITERATURA

1. BERGEY D.H., GARRITY G.M., BRENNER D. J., KRIEG, N. R., STALEY J. R. (ed.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Ed. Springer, 2005
2. BŁASZCZYK M.: *Mikroorganizmy w ochronie środowiska*, Wyd. PWN 2007
3. DIAS F.F., BHAT J. V.: *Microbial Ecology of Activated Sludge II. Bacteriophages, Bdellovibrio, Coliforms, and Other Organisms*, Applied Microbiology, Nr 2, 257-261, 1965
4. GAJEWSKA J., DĄBROWSKI K.: *Izolacja i identyfikacja drapieżnych bakterii z rodzaju Bdellovibrio w ściekach komunalnych*. Ekologia i Technika, Nr 16 (96 A), 215-218, 2008
5. JURKEVITCH E.: *The Genus Bdellovibrio*, w: DWORKIN M., FALKOW S., ROSENBERG E., SCHLEIFER K-H., STACKEBRANDT E., *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Third Edition*, Springer, 2006

6. STOLP H., STARR M. P.: *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism, *Antonie van Leeuwenhoek*, 29, 217-248, 1963
7. VARON M., SHILO M.: *Interaction of Bdellovibrio bacteriovorus and Host Bacteria II. Intracellular Growth and Development of Bdellovibrio bacteriovorus in Liquid Cultures*, *Journal of Bacteriology*, Nr 1, 136-141, 1969

SENSITIVITY OF PREDATORY BACTERIA OF THE GENUS *BDELLOVIBRIO* SP. AND THEIR PREYS FROM *ENTEROBACTERIACEAE* FAMILY ON ANTIBIOTICS AND DISINFECTANT

S u m m a r y

*The aim of this study was to evaluate the use of predatory bacteria of the genus *Bdellovibrio* to treatment municipal wastewater with *Serratia liquefaciens* and *Citrobacter freundii* bacteria. It was observed, that isolated predatory bacteria and their preys were sensitive on antibiotics: chloramphenicol, streptomycine and tetracycline and Ecofair Water disinfectant. It was showed that the bacteria of *Bdellovibrio* genus can reduce the total number of G (-) pathogenic bacteria from *Enterobacteriaceae* family.*

Key words: predatory bacteria, *Bdellovibrio* sp., *Serratia liquefaciens*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacteriaceae*, pathogens, sewage, Ecofair Water