

**JULITTA GAJEWSKA<sup>\*</sup>, KLAUDIA SZEWCZUK<sup>\*</sup>,  
WAWRZYNIEC PLADYS<sup>\*\*</sup>, PAWEŁ SYSA<sup>\*\*\*</sup>**

**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 patogennych 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 zweryfikowania 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  $\mu$ l na podłoża Endo i agar odżywczy metodą posiewu powierzchniowego, a także po 1 ml na Petrifilmy 3M Poland (3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> Enterobacteriaceae Count Plater; 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> E.coli/Coliform Count Plater; 3M<sup>TM</sup> Petrifilm<sup>TM</sup> 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 pasażę 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 moczniakiem, Voges – Proscauera, wody peptonowej z tryptofanem, Simmons, 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 łysinek 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 łysinki 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 łaźni z wytrząsaniem (150 rpm/30° C).

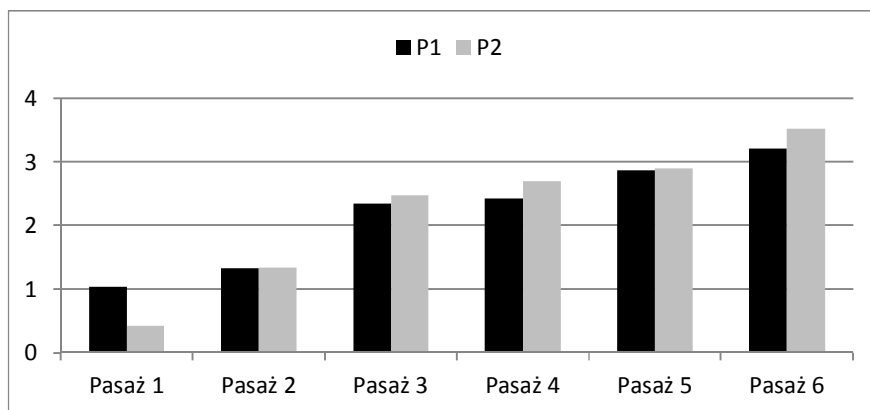
W celu określenia wrażliwości *Bdellovibrio sp.* i jego ofiar, użyto płynu o działaniu biobójczym, tzw. Wodę Ecofair, będącą elektrochemicznie przetworzoną wodą wodociągową (firmy Ecofair Sp. z o.o.) o pH 6,2 i 8,2. Zastosowano metodę krążkowo-dyfuzyjną, przy użyciu techniki dwuwarstwowej.

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:  $Cl_2O$ ,  $HClO$ ,  $HClO_2$ ,  $HClO_3$ ,  $Cl^-$ ,  $O^*$  (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 (amoksycylina – 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 łysinek 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.

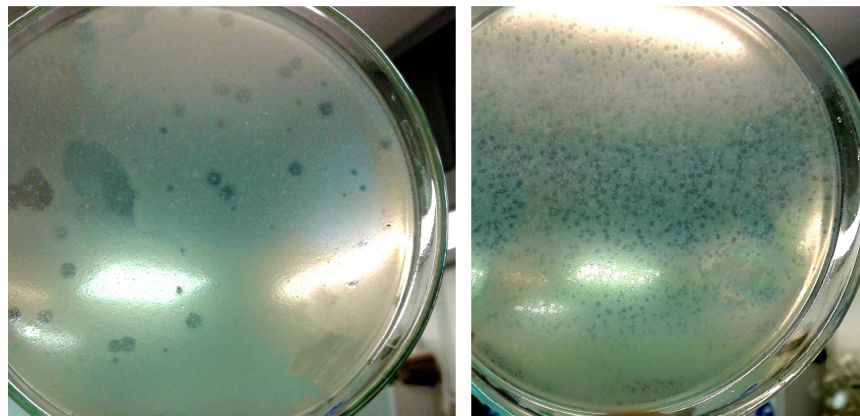


Rys. 1 Zmiana liczby łysinek w kolejnych pasażach poprzedzonych preinkubacją; P 1 i P 2- ofiary preferowane przez *Bdellovibrio bacteriovorus*

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  $\text{cm}^{-3}$ , a ofiar do ok.  $10^8$  jtk  $\text{cm}^{-3}$ , 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
$x_{\text{śr}}$ 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
$x_{\text{śr}}$ dla P 2	9,75	10	0	0
$x_{\text{śr}}$ 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 amoksycylina, 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
$\bar{x}_{\text{sr}}$ 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
$\bar{x}_{\text{sr}}$ dla P 2	13,00	9,88	0	0
$\bar{x}_{\text{sr}}$ 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 pożądaną 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 predadatory 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