

SVEU ILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATI KI FAKULTET  
BIOLOŠKI ODSJEK

PREDATORSKE BAKTERIJE – MOGU LI USPJETI  
GDJE ANTIBIOTICI NE DJELUJU?

PREDATORY BACTERIA – CAN THEY SUCCEED  
WHERE ANTIBIOTICS DO NOT WORK?

SEMINARSKI RAD

Anamarija Pfeiffer  
Preddiplomski studij molekularne biologije  
Mentor: doc. dr. sc. Martina Šeruga Musi

Zagreb, 2011.

## Sadržaj

1. Uvod .....	2	
2. Odnosi me u bakterijama – predatorstvo .....	<del>3</del>	Deleted: 3
3. <i>Bdellovibrionales</i> .....	<del>4</del>	Deleted: 4
3.1. <i>Bdellovibrio</i> .....	<del>4</del>	Deleted: 4
Životni ciklus bakterije roda <i>Bdellovibrio</i> .....	<del>4</del>	Deleted: 4
Staništa i ekologija roda <i>Bdellovibrio</i> .....	<del>6</del>	Deleted: 6
Mogu nosti upotrebe bakterija roda <i>Bdellovibrio</i> .....	<del>7</del>	Deleted: 7
3.2. <i>Micavibrio</i> .....	<del>10</del>	Deleted: 10
<i>Micavibrio</i> u istraživanjima .....	<del>10</del>	Deleted: 10
3.3. <i>Vampirovibrio</i> .....	<del>13</del>	Deleted: 13
4. Ostale predatorske bakterije .....	<del>14</del>	Deleted: 14
4.1. <i>Vampirococcus</i> .....	<del>14</del>	Deleted: 14
4.2. <i>Daptobacter</i> .....	<del>16</del>	Deleted: 16
5. Zaključci .....	<del>16</del>	Deleted: 16
6. Literatura .....	<del>17</del>	Deleted: 17
7. Sažetak .....	<del>18</del>	Deleted: 18
8. Summary .....	<del>18</del>	Deleted: 18

## 1. Uvod

U posljednjih nekoliko desetljeća iznimno je porasla upotreba antibiotika za liječenje raznih bolesti uzrokovanih mikroorganizmima, što je dovelo do pojave rezistencije na antibiotike. Takve bakterije, najčešće otporne na više vrsta lijekova, predstavljaju sve veći problem modernoj medicini jer ponestaje mogućnosti za njihovo liječenje, te je njihov broj svakim danom sve veći. Neke od najpoznatijih „*multi-drug resistance*“ bakterija su MRSA (meticilin-rezistentna bakterija *Staphylococcus aureus*), ESBL (enterobakterije producenti  $\beta$ -laktamaza proširenog spektra) i nefermentirajuće bakterije producenti karbapenemaza (najčešće bakterije *Pseudomonas aeruginosa* i *Acinetobacter baumannii* (Ferrara 2006)).

Neefikasnost antibiotika potaknula je liječnike i znanstvenike da potraže drugu vrstu rješenja. Prva takva istraživanja uključivala su bakteriofage, viruse koji napadaju bakterije, no kod njih je najveći problem bio njihov veliki raspon domaćina, zbog čega bi bili potencijalno opasni i za bakterije koje normalno žive u tijelu.

Razvojem tehnika molekularne biologije sredinom devedesetih godina prošlog stoljeća, došlo je do oživljenja istraživanja na pomalo zaboravljenoj grupi predatorskih bakterija – *Bdellovibrionaceae*. Te su bakterije prvi put otkrivene 1962. godine (Stolp i Petzold 1962) i na njima su se vršila intenzivna istraživanja tijekom šezdesetih i sedamdesetih godina 20.–tog stoljeća, ali većina takvih istraživanja je uključivala samo promatranje mikroskopom, i eventualno poneku biokemijsku analizu. Kako je bilo nemoguće klasičnom genetikom ispitivanje tih bakterija, došlo je do zastoja u istraživanju na skoro 20 godina.

Cotter i Thomashow su 1992. godine objavili radove s novim otkrićima na mutantima bakterije *Bdellovibrio*, a sekvenciranje genoma soja *Bdellovibrio* HD100 omogućilo je lakše manipuliranje eksperimentima i daljnja istraživanja.

Predatorske bakterije nisu uniformna skupina bakterija, već nose taj zajednički naziv zbog načina razmnožavanja i hranjenja. Svaka od tih bakterija, osim povremenih spontanih mutanata, zahtijeva domaćina kako bi se umnožila, što je osobina tipična za viruse. Ipak, predatorske bakterije imaju jednu ključnu razliku u odnosu na viruse – ne ovise direktno o metabolizmu plijena.

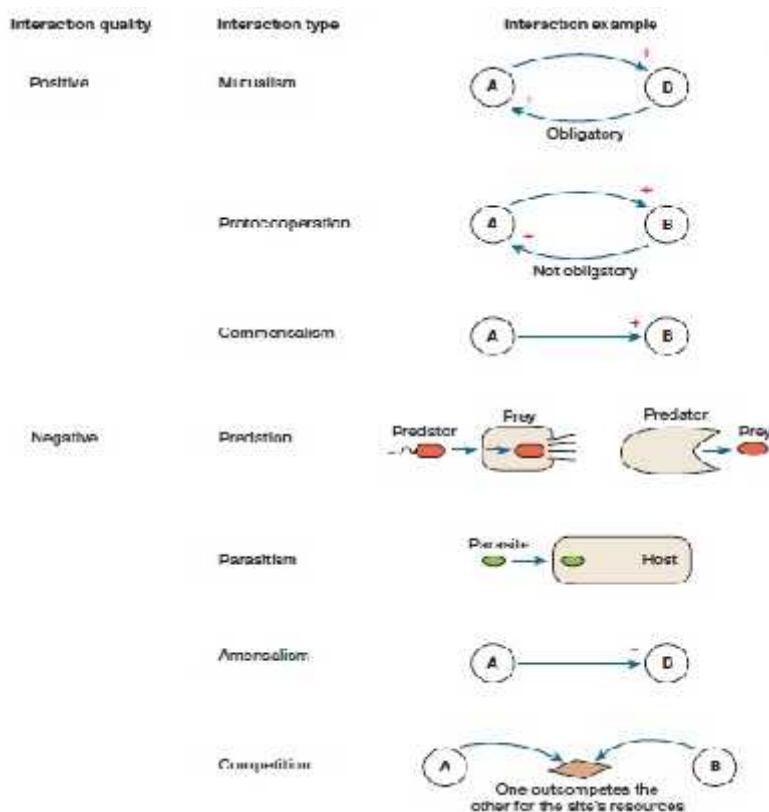
U početku se te bakterije smatralo, i nazivalo, parazitskim bakterijama, jer napadaju druge bakterije i hrane se njihovim sadržajem. S obzirom na to da većina takvih bakterija ubije svog domaćina u manje od petnaest minuta, znanstvenici su zaključili da takav naziv nije prikladan jer pravi parazitski odnos zahtijeva duže vremena da se uspostavi, te su im dali njihovo sadašnje ime – predatorske bakterije.

## 2. Odnosi među bakterijama – predatorstvo

Kao i svi drugi organizmi, i bakterije sudjeluju u interakcijama s drugim organizmima. Te interakcije mogu biti pozitivne, poput mutualizma, komenzalizma i protokooperacije, ili negativne, primjerice amenzalizam, predatorstvo, parazitizam i kompeticija (slika 1). Danas prihvaćena teorija endosimbiotskog nastanka eukariota tvrdi da su upravo interakcije između bakterija i drugih stanica dovele do pojave prvih eukariotskih stanica.

Predatorstvo je široko-rasprostranjena pojava kod koje predator proždire ili napada plijen, što najčešće završava smrću plijena. Od tog odnosa plijen nema koristi, a predatoru je nužan za daljnju reprodukciju. Predator ne mora nužno biti veći od plijena, dapače, može biti i manji od plijena, pogotovo kod predatorskih bakterija.

Predatorstvo općenito može biti ekstracelularno i intracelularno, pa se tako dijele i predatorske bakterije. Ekstracelularni predatori nikad ne ulaze u stanicu, već su vezani samo na površinu bakterije plijena, isisavaju i njen sadržaj. Najpoznatiji primjeri takvih predatora među bakterijama su rodovi *Vampirovibrio*, *Micavibrio* i *Vampirococcus*. Intracelularni predatori moraju probiti stanični zid i naseliti se u unutrašnjost plijena kako bi se mogli podijeliti. Neki probijaju samo stanični stijenku i zadržavaju se u periplazmatskom prostoru, a drugi probijaju i citoplazmatsku membranu i naseljavaju se u citoplazmu. Najpoznatiji periplazmatski predator je rod *Bdellovibrio*, a citoplazmatski *Daptobacter* (Guerrero i sur. 1986).



Slika 1: Prikaz odnosa među bakterijama. Preuzeto iz Prescott i sur. 2002

### 3. *Bdellovibrionales*

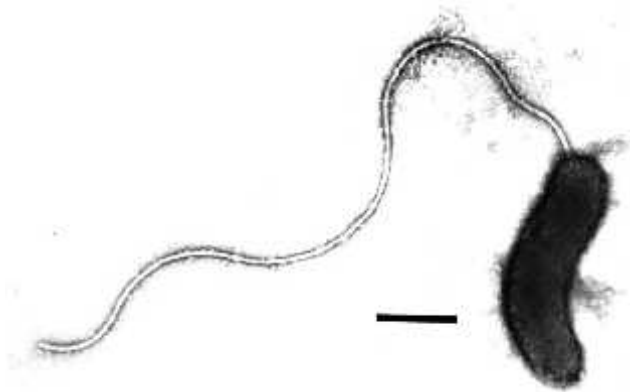
Red *Bdellovibrionales* pripada u razred  $\alpha$ -proteobakterija zajedno s redovima *Desulfovibrionales*, *Desulfobacterales*, *Desulfuromonadales* i *Myxococcales*. Iako taj razred ne obuhvaća veliki broj redova, oni se međusobno poprilično razlikuju, fiziološki i morfološki. Osim *Bdellovibrionales*, i *Myxococcales* imaju predatorske sposobnosti.

Red *Bdellovibrionales* sadrži samo jednu porodicu, *Bdellovibrionaceae* i tri roda: *Bdellovibrio*, *Micavibrio* i *Vampirovibrio*.

#### 3.1. *Bdellovibrio*

Bakterije iz roda *Bdellovibrio* su Gram-negativni, monoflagelatni zarezci (slika 2) čije ime dolazi od grčke riječi *bdella*, što znači pijavica. Posebnost njihove građe je u njihovom biću, koji je neobično debeo zbog prisustva vanjskog omotača, koji obavija biće poput korica, a nastavlja se na stanišnu stijenku.

*Bdellovibrio* ima karakterističan životni stil: napada druge Gram-negativne bakterije i dijeli se u njihovoj unutrašnjosti, te ih po završetku svog životnog ciklusa lizira i potomstvo napušta bakteriju „duha“. Takve bakterije su u biti samo ostaci stanišne stijenke i organela koje *Bdellovibrio* nije iskoristio (Lambert i sur. 2006).



Slika 2: Morfologija bakterije roda *Bdellovibrio*. Crtica predstavlja dužinu od 0.2  $\mu\text{m}$ . Preuzeto iz Prescott i sur. 2002.

#### Životni ciklus bakterije roda *Bdellovibrio*

Iako je životni ciklus bakterije roda *Bdellovibrio* izrazito kompleksan, on je zapravo jako kratak i traje maksimalno 4 sata (slika 3). Znanstvenici dijele životni ciklus bakterije roda *Bdellovibrio* na dvije faze: napadačku fazu i fazu rasta. *Bdellovibrio* započinje svoj životni ciklus fazom napadanja, kao slobodno plivajuća, brzo pokretljiva bakterija, čija brzina dostiže i do 160  $\mu\text{m}$  u sekundi, odnosno 100 dužina tijela u sekundi (slika 4.1). Brzo pronalaženje, prepoznavanje i prihvaćanje za plijen je ključno za replikaciju, s obzirom da

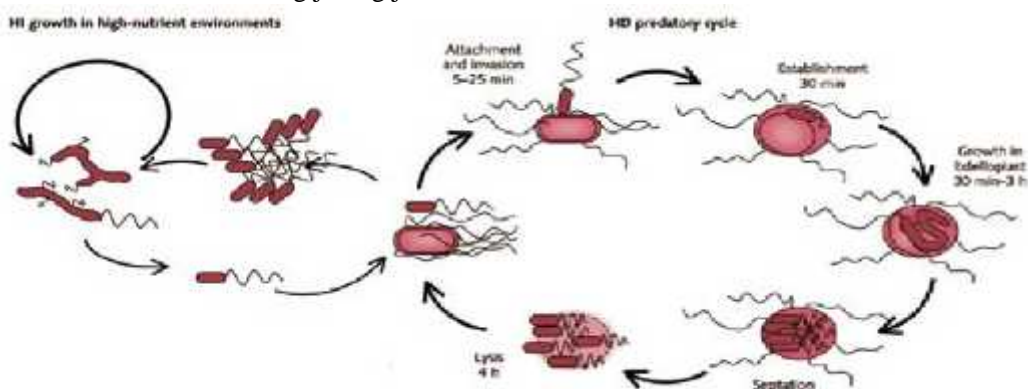
*Bdellovibrio* ima vrijeme poluživota oko deset sati u uvjetima gladovanja (Sockett i sur. 2008).

Za pokretljivost je zaslužan isključivo bič, koji je sastavljen od šest različitih tipova flagelina u dva najpoznatija soja bakterije *Bdellovibrio*: *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 i *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J (Lambert i sur. 2006). Samo jedan tip flagelina je nužan za sastavljanje i pokretljivost biča, te za efikasnu predaciju u tekućim bakterijskim kulturama, dok ostali daju samo manji doprinos strukturi biča. U toj je fazi *Bdellovibrio* dug izmeću 0.5 i 1.5  $\mu\text{m}$ , a širok oko 0.5  $\mu\text{m}$ .

Način na koji predatorska bakterija pronalazi mjesta bogata plijenom još je nepoznat. U ranim istraživanjima su smatrali da se radi o nasumičnim sudarima (Jurkevitch 2006), ali novija istraživanja (Lambert i sur. 2003) su predložila kemotaksično kretanje u smjeru kisika i aminokiselina, te pokazala da mutacijom gena za metil-akceptirajućeg i kemotaksijskog proteina dolazi do smanjenja predatorske sposobnosti bakterije *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100.

Otpribliže dvadeset minuta nakon susreta sa stanicom-plijenom, i vezanja na nju, predatorska bakterija prodire u periplazmatski prostor bušenjem stanične stijenke (slika 4.2), te u tom procesu razgrađuje svoj bič. Istovremeno s prodiranjem bakterije *Bdellovibrio* u žrtvu, dolazi do razgradnje stanične stijenke, vjerojatno zbog aktivnosti hidrolitičkih enzima koji cijepaju unakrsne veze peptidoglikana. Time se povećava periplazmatski prostor i stvara dovoljno mjesta za predatorsku bakteriju.

U tom trenutku počinje sesilna faza: faza rasta, tijekom koje *Bdellovibrio* tvori bdeloplast, okruglu strukturu unutar bakterije plijena (slika 4.3), koju bezoblični plijen okružuje poput lisica (Lambert i sur. 2006). Formiranje bdeloplasta događa se otprilike pola sata nakon interakcije plijena i predatora. U bdeloplastu je *Bdellovibrio* zaštićen od fotooksidacije i napada bakteriofagima. Tijekom faze raste predatorska bakterija preuzima kontrolu nad stanicom plijenom i inhibira sintezu DNA, RNA i proteina plijena, te hidrolizira citoplazmu plijena, pri čemu koristi membranu žrtve kao zaštitu od gubitka sadržaja citoplazme. Rastom predatorska bakterija koristi aminokiseline žrtve kao izvor ugljika, dušika i energije. Nukleotide i masne kiseline plijena ne razgrađuje, već ih direktno uključuje u biosintezu, čime štedi energiju i ugljik.



Slika 3: Shematski prikaz životnog ciklusa bakterije roda *Bdellovibrio*, preuzeto iz Sockett i sur. 2008.

U bdeloplastu *Bdellovibrio* raste u dugu filamentoznu stanicu, i nakon log-faze od 45 minuta dolazi do replikacije DNA, koja se događa istovremeno s daljnjim rastom filameta. Kad postigne konačnu veličinu, otprilike tri sata nakon infekcije, *Bdellovibrio* se dijeli višestrukom fizijom, a broj potomaka koji će dati ovisi isključivo o veličini bakterija domaćina. Za *E.coli* taj broj iznosi 5.7 potomaka (Seidler i Starr 1969), dok za *Aquaspirillum serpens* može iznositi i do 30 (Stolp 1967). Liza plijena i izlazak potomaka traje između 20 minuta i sat vremena, a svaki potomak je spreman na novi napad.



Slika 4: Fotografije bakterije roda *Bdellovibrio* u raznim fazama životnog ciklusa: 1. slobodnoplivajuća bakterija, 2. probijanje stanične stijenke, 3. bdeloplast. Preuzeto iz Sockett i sur. 2008.

### *Bdelociste*

Neki sojevi bakterija roda *Bdellovibrio*, pod posebnim uvjetima rasta mogu tvoriti strukturu nalik na cistu – bdelocistu. Zasad je stvaranje takvih cisti uočeno samo u dva soja, od kojih su na jednom, soju W, vršeni mnogi eksperimenti. *Bdellovibrio* soj W tvori bdelociste u bakteriji *Rhodospirillum rubrum*, purpurnoj ne-sumpornoj bakteriji iz razreda  $\beta$ -proteobakterija. Takve bdelociste sazrijevaju u roku od četiri sata, a predatorska bakterija raste u bubrežastu strukturu ograničenu vanjskim, amorfnim slojem. Unutarnji sloj, građeni od sitnijih čestica, okružuje plazma membrana plijena, građena od krupnijih čestica. Unutar bdelociste nalaze se strukture nalik na skladišne granule. Bdelociste su otpornije od vegetativnih stanica na isušivanje, visoke temperature i sonikaciju, a njihova germinacija se može izazvati monovalentnim kationima poput  $\text{NH}_4^+$  ili  $\text{K}^+$ , te s osam različitih L-aminokiselina, od kojih je najvažniji L-glutamin (Tudor i Conti 1978).

### Staništa i ekologija roda *Bdellovibrio*

Bakterije iz roda *Bdellovibrio* izolirane su iz velikog broja različitih vodenih ekosustava, poput estuarija, oceanskih i morskih obala, rijeka, kanalizacije, ribnjaka i umjetno izgrađenih zaliha vode. Također su izolirane iz škrga raka, sedimenata, tla, s potopljenih

površina i iz rizosfere biljaka. Zanimljivo je da je koncentracija bakterija roda *Bdellovibrio* pronađenih u rijekama ovisila o zagađenosti vode i niti jedan rod *Bdellovibrio* nije pronađen u istoj izvornoj vodi. Ipak, *Bdellovibrio* pokazuje osjetljivost na zagađenja teškim metalima, deterdžentima i pesticidima (Varon i Shilo 1978.).

Bdelovibriji su aerobi, i mogu se dijeliti isključivo u prisustvu kisika, ali mogu preživjeti anaerobne uvjete ako su u fazi napada, ili u obliku bdelociste. Postoje i halotolerantni sojevi koji mogu živjeti u mikroaerobnim uvjetima.

Predatorska bakterija bez problema napada i enkapsulirane bakterije i bakterije unutar biofilмова. Čini se da u nekim slučajevima biofilm predstavlja pogodnije stanište za *Bdellovibrio* nego okolica, jer su predatori izolirani iz prirodnih morskih biofilмова, a nisu iz okolne vode. Ipak, u većini slučajeva *Bdellovibrio* brzo reducira masu biofilma u kojem se nalazi. Upravo to njegovo svojstvo se intenzivno istražuje u posljednjih nekoliko godina, u nadi da će pomoći u suzbijanju infekcija „multi-drug resistance“ bakterija.

Istraživanja su pokazala da je za preživljenje bakterija roda *Bdellovibrio* nužna velika koncentracija plijena: minimalno  $10^5$  CFU  $g^{-1}$  (CFU – *colony forming units*; jedinice formiranja kolonija).

### **Mogućnosti upotrebe bakterija roda *Bdellovibrio***

Bakterije iz roda *Bdellovibrio* u posljednje se vrijeme sve više istražuju kao potencijalno rješenje za mnoge opasne bolesti koje uzrokuju Gram-negativne bakterije, prirodni plijen bakterija roda *Bdellovibrio*. Osim što napadaju neke od najopasnijih bakterija na svijetu, otpornih na antibiotike, poput vrsta *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Klebsiella pneumoniae*, *Bdellovibrio* posjeduje još neke sposobnosti bitne za uspješnost napada na druge bakterije: može prodrijeti kroz bakterijsku kapsulu i napadati i bakterije unutar biofilma. Ovo posljednje svojstvo je njegova najveća prednost, s obzirom da bakterije unutar biofilma mogu biti i do tisućputa otpornije na antimikrobne agente nego slobodne bakterije.

U radu iz 2010. godine Dashiff i sur. objavili su svoje istraživanje o humanim patogenim bakterijama koje mogu biti plijen za soj *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. Ispitali su može li, i u kojoj mjeri ta predatorska bakterija smanjiti broj bakterija plijena predstavnika 83 različitih sojeva. Za mjerenje predacije koristili su brojanje CFU. Rezultati su pokazali da vrsta *Bdellovibrio bacteriovorus* napada i reducira populaciju 68 od 83 ispitanih sojeva.

Bakterije podložne napadu pripadale su rodovima *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Listonella*, *Morganella*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Vibrio* i *Yersinia*. Najveće smanjenje u broju stanica zabilježeno je kod soja bakterije *Proteus vulgaris* PIC



365<sup>1</sup>, a značajno smanjenje zabilježeno je i kod ostalih ispitanih sojeva te vrste, te kod svih ispitanih sojeva *Escherichia coli*, kliničkih izolata *Klebsiella pneumoniae* i jednog soja *Aeromonas salmonicida*<sup>2</sup>. *Bdellovibrio* nije napadao bakterije iz rodova *Campylobacter* i *Stenotrophomonas*, od Gram-negativnih, te *Mycobacterium*, *Enterococcus* i *Staphylococcus* od Gram-pozitivnih.

Nakon određivanja potencijalnih domaćina vrste *Bdellovibrio bacteriovorus*, znanstvenici su odlučili testirati s kojom je efikasnost u on reducirati potencijalni plijen u viševrsnim mikrobijskim kulturama. Napravili su tri viševrsne kulture sa po dvije različite bakterije, i došli do zaključka da *Bdellovibrio* ima jednaku sposobnost napada na određenu vrstu i u samostalnoj i u mješovitoj kulturi (tablica 1.).

Tablica 1. Sposobnost bakterije *Bdellovibrio bacteriovorus* za reduciranjem broja bakterija u mješovitoj bakterijskoj suspenziji. Preuzeto iz Dashiff i sur. 2010.

Bacteria tested	CFU log reduction following predation in a single-species lysate	CFU log reduction following predation in a mix species lysate
Culture 1		
<i>Acinetobacter baumannii</i> NCIMB 12457	3	3.5 ± 0.5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	2	2
Culture 2		
<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028	4	3.5 ± 0.5
<i>Kl. pneumoniae</i> ATCC 33495	4	4
Culture 3		
<i>Ac. baumannii</i> ATCC 19506	3	3
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 35030	3	3

Raspon plijena za *Bdellovibrio* ispitan je i formiranjem litičkih zona na bakterijskim livadama. U većini slučajeva, raspon plijena se poklapao s onim dobivenim istraživanjem tekućih bakterijskih kultura.

Ispitana je i mogućnost bakterije *Bdellovibrio* za reduciranjem višeslojnih bakterijskih biofilmova pet sojeva bakterija (dva soja *Acinetobacter baumannii*, jedan soj *Acinetobacter lwoffii*, jedan soj *Klebsiella pneumoniae* i jedan soj *Morganella morganii*). Nakon 48 sati inkubacije svi su biofilmovi imali 10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> bakterija manje nego na početku, mjereno brojanjem CFU.

Istražena je i mogućnost reduciranja biofilmova sastavljenih od više različitih bakterija. Napravljena su dva biofilma, svaki sastavljen od dvije bakterijske kulture, koja su inokulirana s *Bdellovibrio* dan nakon formacije. Istovremeno su napravljeni i pojedinačni

<sup>1</sup> *Proteus vulgaris* je Gram-negativna enterobakterija koja nastanjuje crijeva ljudi i životinja, ali je i oportunistički patogen ljudi. Uzrokuje infekcije urinarnog trakta i rana.

<sup>2</sup> *Aeromonas salmonicida* je Gram-negativna bakterija koja uzrokuje bolest furunkulozu u slatkovodnim i morskim ribama.

biofilmovi svakog soja i inokulirane bakterije roda *Bdellovibrio*. *Bdellovibrio* je podjednako u inkovito reducirao bakterije u viševrsnim i u pojedina nim biofilmovima (tablica 2.).

Tablica 2. Smanjenje koli ina vijabilnih bakterija u biofilmova sastavljenih od više vrsta bakterija i u biofilmovima koje tvori samo jedna vrsta prilikom predacije bakterije *Bdellovibrio bacteriovorus*. Preuzeto iz Dashiff i sur. 2010.

Bacteria tested	CFU log reduction following predation in a single-species biofilm	CFU log reduction following predation in a mix species biofilm
Experiment 1		
<i>Acinetobacter baumannii</i> NCIMB 12457	2.5 ± 0.5	2
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 33495	2	1
Experiment 2		
<i>Enterobacter gergoviae</i> ATCC 33028	2	2
<i>Kl. pneumoniae</i> ATCC BAA-1706	3	3

### 3.2. *Micavibrio*

Bakterije iz roda *Micavibrio* su maleni (0.5 do 1.5  $\mu\text{m}$  dugi), Gram-negativni, monoflagelatni štapi i, s obligatnim parazitskim životnim ciklusom. Iste ih se naziva bakterijama sličnim bdellovibrijima - „bdellovibrio-like bacteria“ (Kadouri i sur. 2007), zajedno s još nekim skupinama bakterija koje imaju životni ciklus sličan bakterijama iz roda *Bdellovibrio*.

Životni ciklus roda *Micavibrio* razlikuje se od onog koji pokazuje rod *Bdellovibrio* najviše po tome što je *Micavibrio* ektoparazit. Slobodni *Micavibrio* se veže na plijen, raste na njegovoj površini, i na kraju napadnuta stanica umire. Za njega isto govore da ima životni ciklus nalik vampiru (Dashiff i sur. 2010). *Micavibrio* napada izrazito malen broj vrsta bakterija, te je za njegov najpoznatiji soj *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13 u jednom od ranijih istraživanja istraživanju pronađena samo jedna podložna bakterija – *Pseudomonas aeruginosa*.

Taksonomija roda *Micavibrio* je još uvijek predmet rasprava: neki autori ga svrstavaju u  $\alpha$ -proteobakterije, u porodicu *Bdellovibrionaceae*, zajedno s rodovima *Bdellovibrio* i *Vampirovibrio* (Prescott i sur. 2002), dok ga drugi svrstavaju u nerazvrstane  $\alpha$ -proteobakterije (Kadouri i sur. 2007).

#### *Micavibrio* u istraživanjima

Kadouri i suradnici objavili su 2007. Godine istraživanje o podložnosti biofilmova sastavljenih od patogenih bakterija na napad bakterija roda *Micavibrio*. Koristili su soj *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13, i s njime inokulirali 19 sojeva patogenih bakterija. Prvo su inokulirali bakterijske livade tih 19 sojeva i one kod kojih je *Micavibrio* tvorio litičku zonu smatrali su podložnim napadu.

Pronašli su tri takve bakterije: otprije poznate vrste *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*<sup>3</sup> i *Klebsiella pneumoniae* (tablica 3.). U roku od 48 sati, predator je smanjio broj bakterija od 100 do 1000 puta, s početne populacije od  $10^8$  CFU/ml. Inokulirali su 120 kliničkih izolata bakterije *Pseudomonas aeruginosa*, od kojih je *Micavibrio* napadao 104 izolata. Koristili su i 13 sojeva vrste *Klebsiella pneumoniae*, od kojih samo tri nisu bila podložna napadu. Za ispitivanje vrste *Burkholderia cepacia* koristili su jedini klinički izolat.

---

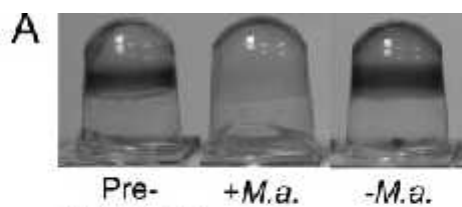
<sup>3</sup> *Burkholderia cepacia* je jedna od sedamnaest vrsta bakterija iz grupe *Burkholderia cepacia* kompleksa. Sve su te bakterije Gram-negativni producenti katalaze koji ne fermentiraju laktozu. Najčešće uzrokuju upalu pluća u imunokompromitiranim osobama.

Tablica 3. Raspon plijena koje napada vrsta *Micavibrio aeruginosavorus*. ( podložni plijen je označen sa +, a ne podložni sa -, n.a.- nije određeno, <sup>b</sup> označava podložnost *Bdellovibrio*). Preuzeto iz Kadouri i sur. 2007.

Organism(s) and origin	Predation (no. of attacked strains/no. of strains tested)	
	Planktonic cells <sup>a</sup>	Biofilm cells <sup>b</sup>
<i>Acetobacter aceti</i>	–	NA
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	–	NA
<i>Burkholderia cepacia</i>	+	+
<i>B. cepacia</i> clinical isolates	1/1	1/1
<i>Enterococcus faecalis</i>	–	NA
<i>Erwinia amylovora</i>	– <sup>c</sup>	NA
<i>Escherichia coli</i>	– <sup>c</sup>	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+ <sup>c</sup>	+
<i>K. pneumoniae</i> clinical isolates	10/13	3/3
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	–	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA14	+	+
<i>P. aeruginosa</i> FAC1	+	+
<i>P. aeruginosa</i> clinical isolates		
Urine	15/16	15/15
Sputa from non-cystic fibrosis patients	21/27	6/13
Sputa from cystic fibrosis patients	7/11	4/4
Eye	38/43	32/34
Miscellaneous organs	22/23	10/15
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	– <sup>c</sup>	NA
<i>Pseudomonas putida</i>	– <sup>a</sup>	NA
<i>Pseudomonas syringae</i>	–	NA
<i>Salmonella enterica</i>	– <sup>c</sup>	NA
<i>Serratia marcescens</i>	–	NA
<i>Shigella flexneri</i>	–	NA
<i>Staphylococcus aureus</i>	–	NA
<i>Staphylococcus simulans</i>	–	NA
<i>Yersinia enterocolitica</i>	–	NA
<i>Vibrio cholerae</i>	–	NA

Nadalje su istraživali mogućnost napada roda *Micavibrio* na biofilmove bakterije *Pseudomonas aeruginosa* (slike 5. i 6.), oportunisti kog patogena i ključnog modela za istraživanje formacije biofilмова. Osamnaest sati stare biofilmove inokulirali su ili lizatom bakterije *Micavibrio*, ili sterilnim lizatom kao kontrolom. Količinu bakterija provjeravali su bojanjem s bojom kristal-violet. Kod kontrolnog uzorka došlo je do minimalnog smanjenja u bojanju nakon 12 sati, dok je kod ispitivanog došlo do smanjenja od 69%, a nakon 24 sata taj je postotak bio 87%.

Slika 5: Izgled biofilмова bakterije *Pseudomonas aeruginosa* prije tretmana, nakon 24-satnog izlaganja bakteriji *Micavibrio aeruginosavorus* (+*Micavibrio*) i kontrolnog biofilma (-*Micavibrio*). Snimljeno skeniraju im elektronskim mikroskopom, pove anje 10 000 puta, preuzeto i prilago eno iz Kadouri i sur. 2007.



Slika 6: Biofilmovi vrste *Pseudomonas aeruginosa* prije (Pre-), te nakon inkubacije s *Micavibrio aeruginosavorus* (+M.a.). (-M.a.) predstavlja kontrolu. Preuzeto i prilago eno iz Kadouri i sur. 2007.

Mijenjanjem koncentracija lizata predatora, znanstvenici su otkrili da je dovoljno dodati 10 PFU/jažici (PFU- *plaque forming units*; jedinice koje formiraju plakove) da bi došlo do smanjenja biofilma od 74% nakon 96 sati. Isto tako, ispitali su je li potrebna konstanta izloženost patogena predatoru za redukciju biofilмова, ili je dovoljna kratka izloženost. Rezultati su pokazali da je minimalna razlika između kratkotrajne i kontinuirane izloženosti (78% umjesto 81%). Tijekom svog istraživanja otkrili su da u ranim fazama infekcije bakterija *Micavibrio* potiče stvaranje biofilмова jer potiče interakcije između stanica zbog aktivne predacije koju vrši.

Mjerali su i smanjenje biofilмова vrsta *Klebsiella pneumoniae* i *Burkholderia cepacia*, i otkrili da *Micavibrio* reducira sve ispitane sojeve.

Dashiff i sur. su u prije spomenutom istraživanju o rasponu plijena za vrstu *Bdellovibrio bacteriovorus* tražili i patogene bakterijske vrste podložne napadu *Micavibrio aeruginosavorus*. Otkrili su da *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13 napada 57 od 89 ispitivanih vrsti. Najveće redukcije u broju stanica zabilježene su kod bakterija iz rodova *Burkholderia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* i *Shigella*. Slabije smanjenje pokazali su rodovi *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Proteus* i *Yersinia*, a predator nije uopće utjecao na bakterije pripadnike rodova *Bordetella*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Morganella*, *Mycobacterium*, *Serratia*, *Stenotrophomonas* i *Vibrio*. Ti su rezultati posebno zanimljivi jer pokazuju da *Micavibrio* napada puno više i broj bakterija nego što se do tada mislilo.

S obzirom na slabu istraženost roda *Micavibrio*, znanstvenici su odlu ili definirati optimalnu temperaturu i količinu kisika za njegovu predaciju. Otkrili su da dolazi do najbržeg smanjenja broja stanica pri 30°C, ali nakon 48 sati redukcija plijena je bila približno jednaka za uzorke uvane pri 25 i 30°C. Do značajnog smanjenje predacije došlo je samo pri 37°C. Kad su stavili uzorke u anaerobne i mikroaerofilne uvjete nije bilo predacije, bez obzira na plijen korišten u pokusu.

### **3.3. *Vampirovibrio***

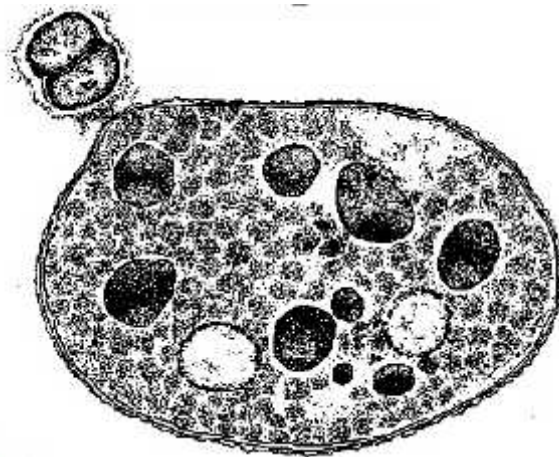
*Vampirovibrio* je Gram-negativna, monoflagelatna bakterija čiji oblik varira od zavijenih štapića do okruglih oblika i dimenzija je od 0.3 do 0.6 µm promjeru. Ektoparazit je eukariotske alge, *Chlorella sp.*, koja mu je jedini plijen. *Vampirovibrio chlorellavorus* prvi put je opisan 1972.godine.

## 4. Ostale predatorske bakterije

Osim bakterija iz porodice *Bdellovibrionaceae*, u zadnjih dvadesetak godina otkrivene su još neke bakterije koje pokazuju predatorske sposobnosti, ali se razlikuju od bdellovibrija morfologijom, rasponom plijena, na inom hranjenja i reprodukcije, te potrebom za kisikom. Većina njih je slabo istražena i definirana, te taksonomski nerazvrstana.

### 4.1. *Vampirococcus*

*Vampirococcus* je Gram-negativna, ovoidna bakterija bez bičica, širine do 0.6µm. Obligatni je anaerob, i dosadašnja istraživanja su pokazala da se dijeli jedino ako je vezan za plijen (slika 7.). Predator je ektoparazit koji napada fototrofne bakterije, na kojima je i otkriven 1983.godine.

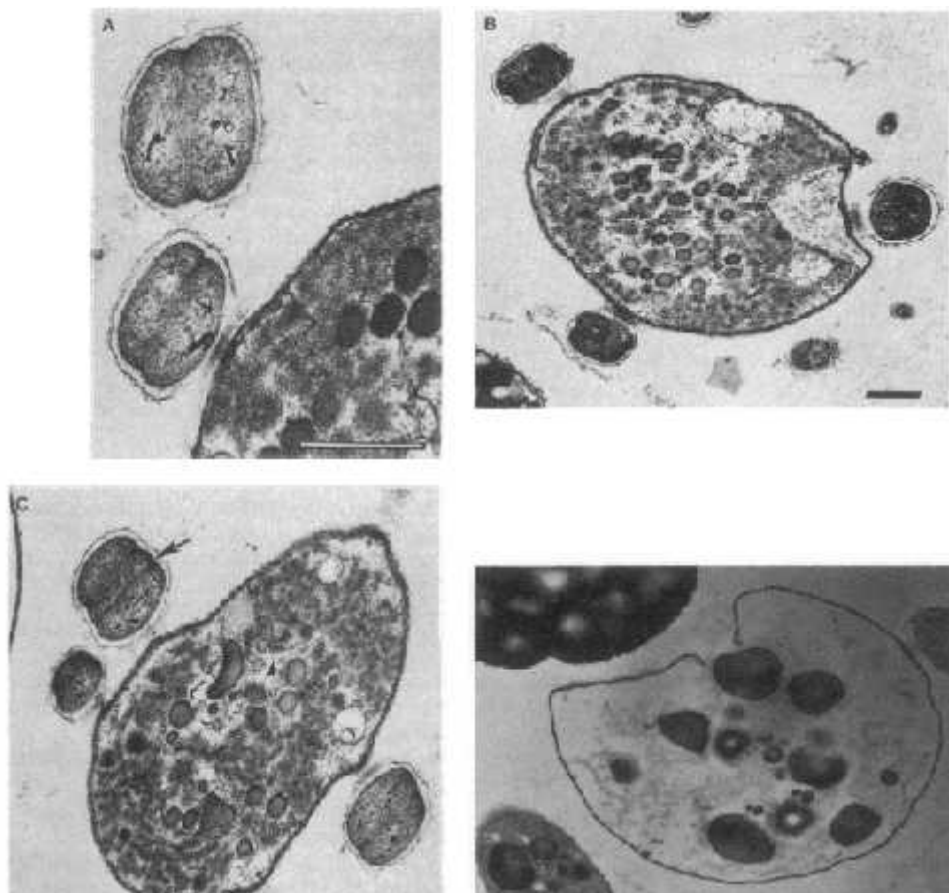


Slika 7: Shematski prikaz interakcije bakterije roda *Vampirococcus* i plijena. Preuzeto i prilagođeno prema Prescott i sur.2002.

U slatkovodnim jezerima sjevernoistočne Španjolske pronađena je 1986. godine prihvaćena za nekoliko vrsta purpurnih sumpornih bakterija vrste *Chromatium* spp. (Guerrero i sur. 1986). *Vampirococcus* se dijeli površinski vezan za plijen, dok isisava unutrašnjost plijena, nalik na vampira, zbog čega je i dobio svoje ime.

U uzorcima iz jezera Ciso na Španjolskoj pronađene su samo jedna vrsta roda *Chromatium* – *Chromatium minus*, a u uzorcima iz jezera Estanya pronađene su tri vrste: *Chromatium minus*, *Chromatium okenii* i *Chromatium vinosum*. Proučavanjem vrste *Chromatium minus* pod svjetlosnim mikroskopom znanstvenici su otkrili ili manje bakterije pri vršenju na njima. Te prihvaćene bakterije su bile pogotovo brojne u jesen i u dubljim slojevima, gdje *Chromatium* ima manju mogućnost preživljenja zbog nedostatka svjetlosti. Na temelju tih činjenica znanstvenici su zaključili ili da je *Vampirococcus* oportunistički patogen koji iskorištava nepovoljne uvjete okoliša za *Chromatium*.

Na jednu stanicu bakterije *Chromatium* može biti vezano do 6 stanica bakterije *Vampirococcus*. Jedan *Vampirococcus* može dati maksimalno tri potomka. Nakon završenog životnog ciklusa predatora od žrtve preostaje samo stani na stijenka, citoplazmatska membrana, i dijelovi citoplazmatskih struktura (slika 8.).

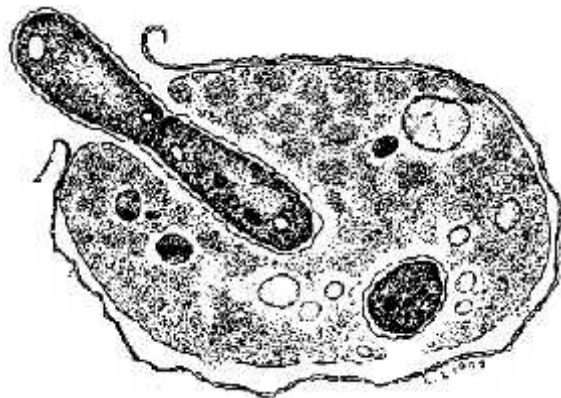


Slika 8: Životni ciklus bakterije *Vampirococcus* snimljen transmisijskim elektronskim mikroskopom, preuzeto i prilagođeno prema Guererro i sur. 1986.



## 4.2. *Daptobacter*

*Daptobacter* je Gram-negativni, monoflagelatni, fakultativno anaerobni štapi dimenzija 0.5 x 1.5 µm. Ime mu potječe od grčke riječi „*dapto*“, što znači proždirati, i latinske riječi „*bacter*“ – štapi. Unutarstanični je predator nekoliko vrsta iz porodice *Chromatiales*. Predator prodire i kroz staničnu stijenku i kroz citoplazmatsku membranu, te se nastanjuje u citoplazmi, kojom se hrani i gdje se dijeli binarnom fizijom, dajući dva potomka. Po završetku njegovog životnog ciklusa od bakterije plijena ostaje samo stanična stijenka, citoplazmatska membrana i skladišne granule (slika 9).



Slika 4: Shematski prikaz napada bakterije *Daptobacter* na plijen, preuzeto i prilagođeno prema Prescott i sur. 2002.

## 5. Zaključci

Predatorske bakterije su široko rasprostranjena grupa organizama čije predstavnike možemo pronaći gdje god ih potražimo: u morima, u zemlji, u rijekama... Iako su otkrivene tek polovicom prošlog stoljeća, znanstvenici smatraju da bi te bakterije mogle imati značajnu ulogu u održavanju mikrobioloških zajednica u cijelom svijetu. Ipak, u posljednjih desetak godina fokusiraju se na njihovu sposobnost da napadaju mnoge ljudske patogene, i to one koji su već postali otporni na većinu lijekova („*multi-drug resistant*“ bakterije). Predatorske bakterije daju nadu za suzbijanje mnogih trenutno neizljezivih bolesti, od kojih je većina vezana uz bolne infekcije.

Ipak, korištenje predatorskih bakterija kao živog antibiotika ima svoje prednosti i mane, kao i upotreba bilo kojeg drugog antibiotika. Prednost predatorskih bakterija je u tome što su vršno-specifične i napadaju sve bakterije, te što bi mogle evoluirati mutacijama, baš kao i njihov plijen. Mana je ta što to znači unošenje stranog, živog organizma u ljudsko tijelo, a bez dodatnih ispitivanja ne možemo znati kakve bi to sve posljedice moglo imati na ljudski organizam. Drugi problem je što je kod nekih predatora zabilježeno povećanje raspona plijena koji napada, što bi teoretski moglo značiti da će poći napadati i simbiotske bakterije u ljudskom organizmu. To su glavna pitanja koja će znanstvenici morati istražiti prije početka korištenja predatorskih bakterija kao živih antibiotika.

## 6. Literatura

Dashiff A, Junka R.A, Libera M, Kadouri D.E, 2010. Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Appl Microbiol* **110**, 431-444.

Dworkin M, Falkow S, 2006. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria 3rd ed, Ed. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, Springer, New York, NY, **7**, pp. 12-30

Esteve I, Gaju N, 1999. Bacterial symbioses. Predation and mutually beneficial associations. *Internatl Microbiol* **2**, **1999**, 81-86.

Ferarra A, 2006. Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. *Int J Antimicrob Ag* **Vol 27, Issue 3**, 183-195.

Guerrero R, Pedros-Alio C, Esteve I, Mas J, Chase D, Margulis L, 1986. Predatory prokaryotes: Predation and primary consumption evolved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**, 2138-2142.

Hampton T, 2004. Researches Eye „Predatory“ Bacterium for Novel Antimicrobial Strategies. *JAMA* **291**, 1188-1189.

Kadouri D, Venzon N.C, O'Toole G.A, 2007. Vulnerability of Pathogenic Biofilms to *Micavibrio aeruginosavorus*. *Appl Environ Microbiol* **73**., 605-614.

Lambert C, Morehouse K.A, Chang C, Sockett R.E, 2006. *Bdellovibrio*: growth and development during the predatory cycle. *Curr opin Microbiol* **9**, 639-644.

Lambert C, Smith MCM, Sockett R.E, 2003. A Novel assay to monitor predator-prey interactions for *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J reveals a role for methyl-accepting chemotaxis proteins in predation. *Environ microbiol* 127-132.

Prescott L.M, Harley J.P, Klein D.A, 2002. Microbiology 5th Edition, Ed. D. Allen, McGraw – Hill Companies, New York, NY, pp. 510-512, 607-609.

Seidler R.J, Starr M.P, 1969. Factors affecting the intracellular parasitic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* developing within *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **97**, 912-923.

Sockett L, Hopley L, Fenton A, Woods R, Lambert C, Chang C, Atterbury R, Till R, Whitworth M, Capeness M, Fung R, Ahmad R, Milner D, Lerner T, King S, 2008. An inside job: *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Microbiology today* **November 8 2008**, 184-187.

Stolp H, Petzold H, 1962. Untersuchungen über einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivität für *Pseudomonas*-Bakterien. *Phytopatho Zeit* **45**, 364-390.

Tudor J.J, Conti S.F, 1978. Characterization of germination and activation of *Bdellovibrio* bdellocests. *J. Bacteriol* **133**, 130-138.

## 7. Sažetak

Predatorske bakterije daju nadu za zaustavljanje mnogih patogenih bakterija, od kojih su neke postale otporne na do sada poznate antibiotike i uzrokuju velike probleme, pogotovo u slučaju bolničkih infekcija. Dosadašnja istraživanja su pokazala da značajno reduciraju broj nekih od najpoznatijih patogenih bakterija poput vrste *Klebsiella pneumoniae*, uzročnika atipične upale pluća, ali i oportunističkog patogena koji može uzrokovati infekcije rana i urinarnog trakta, najčešće u bolnici.

Njihova je prednost i u tome što napadaju samo određene bakterijske vrste, što znači da u slučaju upotrebe kao živog antibiotika neće ubijati bakterije koje normalno žive u ljudskom tijelu, niti štetiti ljudima jer ne mogu napadati stanice sisavaca. Dosadašnja istraživanja pokazuju da nije moguće prijenos gena između predatora i plijena, pa se smatra malo vjerojatnim da bi predator mogao postati patogenim za ljude ili druge sisavce. Za razliku od standardnih antibiotika, takav živ antibiotik mogao bi evoluirati paralelno sa svojim plijenom, te plijen ne bi mogao postati rezistentan; bar ne za duže.

Ipak, i dalje se da se raspon plijena za neke predatore može povećati, što je jedna od glavnih tema novijih istraživanja. Drugi aspekti koje znanstvenici trebaju detaljno istražiti prije početka upotrebe predatorskih bakterija kao antibiotika jesu sve posljedice koje bi moglo imati unošenje stranog organizma u ljudsko tijelo.

## 8. Summary

Predatory bacteria raise hope for stopping a multitude of pathogenic bacteria, some of which have become resistant to currently used antibiotics and cause severe problems, primarily related to hospital-acquired infections. Research conducted so far has shown that predatory bacteria have the ability to significantly reduce some of the most famous pathogenic bacteria, such as *Klebsiella pneumoniae*, cause of an atypical pneumonia, but also an opportunistic pathogen that can cause urinary and wound infection, most commonly hospital-acquired.

Another advantage of predatory bacteria is their tendency to attack only some species of bacteria. Therefore, if used as a living antibiotic they will not kill bacteria that are normal inhabitants of the human body, nor can they be harmful to humans as they cannot attack mammalian cells. Up to this date a case of gene transfer between the predatory bacteria and its prey hasn't been recorded, so it is considered unlikely for the predator to become pathogenic for humans or other mammals. Unlike standard antibiotics, a living antibiotic could evolve simultaneously with its prey, which would mean that the prey could not become resistant to it, at least not for long.

Still, it seems that the prey-range of some predators can be breached and expanded, a feature that is currently being extensively researched. Another aspect that must be investigated in detail before using predatory bacteria as antibiotics is all the possible consequence that an introduction of such a foreign element could have.