

Anna Wierzbicka-Woś^{1*}, Wiesław Deptuła¹

¹ Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński

Wpłynęło w lipcu 2014 r.

1. Wprowadzenie. 2. Bakteriofagi a bakterie w środowisku. 3. Bakterie drapieżne z grupy BALO a bakterie w środowisku. 4. Pierwotniaki a bakterie w środowisku. 5. Drapieżniki bakterii a biofilm. 6. Mechanizmy obronne bakterii oraz ich interakcje z drapieżnikami. 7. Praktyczne wykorzystanie drapieżników bakterii. 8. Podsumowanie

Bacteriophages and bacterial predators as agents limiting the amount of bacteria in the environment

Abstract: Bacterial predators, such as *Bdellovibrio* and *Bdellovibrio* like organisms (BALOs), protozoa and bacteriophages, are the major cause of bacterial mortality. However the correlations between these microorganisms enable their coexistence in the same ecological niche. This review presents the interactions between bacterial prey and their predators, and bacteriophages. In addition, it describes bacterial adaptations helping bacteria to prevent the attack. Taking into account current problems with increasing antibiotic resistance of pathogenic microorganisms, these observations can lead us to the discovery of novel antimicrobial compounds, which are common in nature, and could be used in the future against animal and human pathogens. Moreover, these microorganisms might be also a potential source of novel biocatalysts, which could be applied in biotechnological processes.

1. Introduction. 2. Bacteriophages and bacteria in the environment. 3. Bacterial predators from BALO and bacteria in the environment. 4. Protozoa and bacteria in the environment. 5. Bacterial predators and biofilm. 6. Defense mechanisms of bacteria and their interactions with predators. 7. Practical use of bacterial predators. 8. Summary

Słowa kluczowe: bakteriofagi, *Bdellovibrio* spp., biofilm, drapieżniki bakterii, pierwotniaki

Key words: bacteriophages, *Bdellovibrio* spp., biofilm, bacterial predators, protozoa

1. Wprowadzenie

Wśród zależności kooperacyjnych między organizmami, w tym mikroorganizmami, wyróżnia się m.in. neutralizm, komensalizm, współzawodnictwo, antagonizm, syntropizm oraz drapieżnictwo i pasożytnictwo. Interakcje między różnymi gatunkami mikroorganizmów promują silny wzrost i/lub dominację specyficznych ich grup, jednocześnie stanowiąc ważny element łączący różne grupy organizmów ze względu na możliwość ich współwystępowania na tym samym obszarze, dzięki czemu mogą koegzystować w danym środowisku. Ma to wpływ na różnorodność organizmów na danym obszarze oraz sprzyja obiegowi pierwiastków w przyrodzie [4, 19, 25]. W przedstawionej pracy przybliżono oddziaływanie bakteriofagów, bakterii drapieżnych z grupy BALO obejmującej bakterie *Bdellovibrio* i organizmy do nich podobne (*Bdellovibrio* and like organisms) oraz pierwotniaków na populacje bakterii w środowisku, które wpływając pośrednio lub bezpośrednio na siebie nawzajem, w znacznym stopniu przyczyniają się do kontrolowania populacji bakterii w środowisku [7, 19, 39, 41, 50, 51]. Poznając te relacje przybliżamy się do poznania mechanizmów regulujących liczebność bakterii, w tym patogennych, co jest m.in. istotne w dobie

walki z mikroorganizmami opornymi na stosowane obecnie antybiotyki i chemioterapeutyki.

Mikroorganizmy drapieżne wraz z bakteriami będącymi celem ich ataku, odgrywają w środowisku bardzo ważną rolę w tzw. pętli mikrobiologicznej, która stanowi zespół procesów odpowiedzialnych za transfer i udostępnianie rozpuszczonej w wodzie materii organicznej (*dissolved organic matter* – DOM) różnym mikro- i makroorganizmom heterotroficznym, tworzącym sieci troficzne w danym ekosystemie. Bakterie poprzez asymilację i biokonwersję DOM tworzą upostaciowaną tzw. cząsteczkową materię organiczną (*particulate organic matter* POM), która z kolei może być wykorzystana przez organizmy na innych poziomach troficznych, w tym m.in. bakterie z grupy BALO czy pierwotniaki [4, 25, 26, 33, 57]. Naturalna złożoność populacji mikroorganizmów charakteryzuje się ogromnym zróżnicowaniem, zarówno pod względem filogenetycznym, ale również pod względem ich stanu fizjologicznego i przystosowań fenotypowych komórek [26]. Z badań wynika, że największą śmiertelność bakterii w środowisku obserwuje się na skutek żerowania pierwotniaków, które są znacznie większe od swojej ofiary, dzięki czemu wykorzystują głównie mechanizm endocytozy umożliwiającą pochłanianie w całości komórki bakteryjnej

* Autor korespondencyjny: Katedra Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Szczeciński, ul. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin; e-mail: kurp13@univ.szczecin.pl

[19, 25, 26, 27]. Jednakże wykorzystanie tego zjawiska wśród mikroorganizmów jest ograniczone wielkością ofiary, która musi być mniejsza od drapieżnika [5, 51]. Również bakteriofagi oraz bakterie drapieżne z grupy BALO są zaliczane do bardzo skutecznych czynników biologicznych limitującymi ilość bakterii w środowisku, choć mechanizm ich ataku jest odmienny ze względu na to, że są one mniejsze od komórki ofiary. Stąd w pierwszym etapie zachodzi przyleganie do powierzchni bakterii, a następnie wnikięcie czynnika infekującego do jej wnętrza, przy czym czas od wnikięcia do śmierci komórki bakteryjnej może być różny [11, 26, 27].

2. Bakteriofagi a bakterie w środowisku

Bakteriofagi (fagi) występują we wszystkich środowiskach. Szacuje się, że ich populacja wynosi ok. 10^{31} i stanowi najbardziej zróżnicowaną grupę jednostek biologicznych na świecie, przez co w bardzo istotny sposób wpływają i warunkują liczebność bakterii w różnych ekosystemach [31, 50, 57]. W środowisku wodnym ilość bakteriofagów waha się między 10^4 a 10^8 ml⁻¹, czyli występują 3–10 razy liczniej od bakterii [59]. Fagi atakując bakterie wykorzystują swoiste receptory na powierzchni komórki docelowej, wykazując specyficzność w stosunku do gospodarza. Przyłączenie się faga do komórki bakteryjnej przebiega w dwóch etapach. Pierwszy etap – dyfuzyjny transport faga – jest odwracalny i zależy od stężenia cząstek fagowych, temperatury otoczenia oraz od ilości komórek bakteryjnych w środowisku. Drugim etapem jest związanie się faga ze specyficznym receptorem na powierzchni komórki ofiary i enzymatyczne uszkodzenie ściany komórkowej, a następnie wprowadzenie do jej wnętrza materiału genetycznego faga i jest to proces nieodwracalny [57, 59]. Mimo, że bakteriofagi w większości przypadków wykazują specyficzność w stosunku do gatunku, a nawet szczepu gospodarza, to opisano również fagi o szerokim spektrum gospodarza np. wśród cyjanofagów infekujących morskie *Synechococcus* spp. [26]. Jednocześnie bakteriofagi są niekiedy rozpatrywane dwójako jako pasożyty lub drapieżniki [7, 11, 25, 26, 57], w zależności od strategii wykorzystywanej przez nie do ich replikacji. U bakteriofagów opisane zostały strategie tj. lizogenna, pseudolizogenna, chroniczna oraz lityczna. Genomy bakteriofagów będących w trakcie cyklu lizogenego pozostają w komórce gospodarza w formie utajonej – w postaci profaga – replikując razem z gospodarzem, aż do momentu przejścia w cykl lityczny, który może zostać zaindukowany różnymi czynnikami środowiskowymi, np. zmianą temperatury czy promieniowaniem UV [26, 57, 59, 60]. Jednocześnie geny profaga wbudowane w genom komórki gospodarza mogą wpływać na jego fenotyp w procesie

tw. konwersji lizogennej, przez co nadają komórce bakteryjnej nowych cech [2]. W stanie chronicznym cząstki fagowe są tworzone i uwalniane w sposób ciągły z zainfekowanej komórki gospodarza, nie prowadząc do jego lizy. W przypadku stanu pseudolizogenego materiał genetyczny bakteriofaga występuje w komórce niezintegrowany z genomem gospodarza, a jednocześnie w wyniku niekorzystnych warunków wzrostu bakterii, nie ma systemu utrzymywania swojego genomu w komórce bakteryjnej. Wykazano, że duża część bakteriofagów w populacji bakterii ma charakter lizogeny i stąd są one opisywane jako „pasożyty”, ze względu na swoje uzależnienie od aktywnego aparatu metabolicznego gospodarza oraz występowanie z nim w formie zintegrowanej [2, 26, 60]. W cyklu litycznym, mimo konieczności wykorzystania maszynierii metabolicznej komórki atakowanej, metabolizm gospodarza jest przekierowywany na produkcję potomnych cząstek bakteriofagowych i cykl faga kończy się uwolnieniem ich ze zlizowanej w wyniku działalności enzymów fagowych komórki bakteryjnej. Dlatego też charakter tej relacji, określany jest niekiedy jako drapieżnictwo [7, 26, 57]. Fagi są więc czynnikami atakującymi biernie, choć swoiście. Co więcej liza komórek bakteryjnych wynikająca z aktywności faga jest drugim (po aktywności pierwotniaków) najważniejszym czynnikiem powodującym śmiertelność wśród bakterii [26, 59]. Stąd uważa się, że bakteriofagi mają duży wpływ na skład populacji bakterii, na produkcję DOM i obieg związków odżywczych pochodzenia bakteryjnego. Należy również zwrócić uwagę na fakt, iż śmiertelność bakterii w środowisku wodnym wywołana fagami zmienia się sezonowo (ze zmianą temperatury otoczenia i nasłonecznienia) oraz wraz z głębokością, na której występują [26, 57]. Badania w tym zakresie dotyczące innych środowisk są ograniczone, jednak duże ilości wirusów odnotowanych w osadach oraz glebach sugerują ich zasadniczą rolę w regulacji liczebności bakterii również w tych środowiskach [6, 26, 57]. Przyjmuje się, że mimo opisanej dużej ilości fagów wykazujących duże zróżnicowanie, nadal ogromna ich część nie została „odkryta” ze względu na to, że większość mikroorganizmów środowiskowych jest niehodowalna, w tym gospodarze fagów. Jednocześnie analiza różnorodności wirusów bakteryjnych w oparciu o sam materiał genetyczny jest trudna, z uwagi na brak wspólnych markerów genetycznych dla wszystkich bakteriofagów [50, 57].

3. Bakterie drapieżne z grupy BALO a bakterie w środowisku

Bakterie z grupy BALO zostały opisane po raz pierwszy w latach 60 i są one najlepiej scharakteryzowaną grupą bakterii drapieżnych, choć obecnie opi-

sanych jest już wiele innych grup organizmów prokariotycznych, prowadzących także drapieżny tryb życia [26]. Są one bardzo rozpowszechnione w wielu środowiskach, również ekstremalnych, oraz bardzo zróżnicowane pod względem filogenetycznym. Mikroorganizmy te początkowo zaliczane były do jednej rodziny *Bdellovibrionaceae*, jednakże dzięki zastosowaniu do identyfikacji nowoczesnych metod biologii molekularnej, opisano inne grupy, co przyczyniło się do ich reklasyfikacji [27]. Początkowo do grupy tych mikroorganizmów BALO zaliczano bakterie należące do czterech rodzajów to jest *Bdellovibrio*, *Bacterovorax*, *Micavibrio* oraz *Vampirovibrio*, które zaklasyfikowano do rodziny *Bdellovibrionaceae*, klasy δ -proteobacteria [18]. Analizy ostatnich lat wskazują jednak na ich większe zróżnicowanie [15, 16, 56]. Na chwilę obecną do klasy δ -proteobacteria zalicza się rodzaj *Bdellovibrio* i *Vampirovibrio* z rodziny *Bdellovibrionaceae* oraz rodzaj *Bacterovorax* i nowo opisany rodzaj *Peredibacter* z rodziny *Bacterivoracaceae*, zaś do klasy α -proteobacteria należy rodzaj *Micavibrio*, który jest najbardziej spokrewniony z rzędem *Rhodospiriales* [14, 15, 56]. Dodać należy, że rodzaj *Vampirovibrio*, jako jedyny z rodziny *Bdellovibrionaceae*, żeruje nie na bakteriach, a na eukariotycznych komórkach alg z rodzaju *Chlorella* [18].

Bakterie z grupy BALO izolowane były z wielu środowisk m.in. wód powierzchniowych, ścieków, osadów morskich i oceanicznych, z gleby, ale także z przewodów pokarmowych zwierząt i człowieka. Szacuje się że, liczba bakterii z grupy BALO w środowisku wodnym waha się między 10^1 a 10^4 pfu/ml, przy czym w wodach powierzchniowych może być ich do 10^6 pfu/ml, natomiast w 1g gleby ilość BALO waha się średnio między 10^2 a 10^4 pfu [58]. Wykazano nadto, że w środowisku wodnym największe ilości bakterii z grupy BALO występują w biofilmach tworzących się na powierzchni obiektów oraz zwierząt występujących w tym środowisku, choć także w warstwach powierzchniowych wody, jednak ich ilość zależy w dużej mierze od ilości bakterii występujących tam. Bakterie z grupy BALO odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu składu bakteryjnych populacji w biofilmie. Dane te zostały przedstawione na podstawie eksperymentów w laboratorium w oparciu o hodowalne szczepy referencyjne, jednakże nie wyklucza się, że ilość BALO w naturalnych ekosystemach może być dużo większa [14, 21, 23, 28, 58].

Bakterie z grupy BALO to małe, bardzo ruchliwe Gram-ujemne bakterie o kształcie pałeczek lub przecinków, które obligatoryjnie żerują na innych Gram-ujemnych bakteriach, a spektrum ich ofiar obejmuje zarówno bakterie niepatogenne, jak i patogenne dla ludzi, zwierząt i roślin [14]. Są one wyposażone w wici i rzęski, umożliwiające im szybki ukierunkowany ruch w stronę ofiary oraz przyleganie do niej [5, 40, 48]. Bakterie z rodzaju *Bdellovibrio* wykorzystują więc

w celu przemieszczania się w kierunku ofiary, zaś pile w celu przylegania i przedostania się do wnętrza atakowanej komórki. Bakterie te podczas przemieszczania się na powierzchni biofilmu i na podłożach stałych oraz podczas wydostawania się ze zlizowanej komórki ofiary, wykazują ruch ślizgowy [4, 36, 37, 40]. Po ich przyłączeniu się do ściany komórkowej bakterii i przedostaniu się do jej wnętrza, przeprowadzają atak i wyłączają metabolizm ofiary, w wyniku czego zaatakowane komórki giną w ciągu 15 minut [4]. W zależności od zagęszczenia komórek ofiary oraz rodzaju środowiska, cykl życiowy BALO może trwać 3–4 h [23]. Jednocześnie, w odróżnieniu od bakteriofagów, bakterie te są zdolne do żerowania na komórkach bakteryjnych będących w różnym stadium rozwojowym, również martwych, przy czym cykl rozwojowy drapieżnika w tym przypadku jest wydłużony [55]. Bakterie drapieżne z grupy BALO mogą występować w różnych fenotypach: wewnątrz komórki atakowanej (*fenotyp periplazmatyczny* – rozwijający się między błoną zewnętrzną a wewnętrzną bakterii Gram-ujemnej, *fenotyp cytoplazmatyczny* – rozwijający się w cytoplazmie ofiary) lub na jej powierzchni (*fenotyp epibiotyczny* – wzrastający się na powierzchni komórki ofiary) [4, 17]. Najczęściej mikroorganizmy te charakteryzują się podwójnym cyklem życiowym, na który składa się faza życia poza komórką ofiary, tzw. faza ataku oraz faza ich wewnątrzperiplazmatycznego wzrostu, mająca miejsce w periplazmie bakterii zaatakowanej, gdzie formowana jest struktura zwana bdelloplastem. Bakterie te po wnikięciu do komórki ofiary uruchamiają mechanizmy prowadzące do „rozłożenia” zawartości swojej ofiary, w celu pozyskania związków odżywczych niezbędnych do swojego wzrostu i rozmnażania [23, 37, 41]. Wykazano także, w oparciu o analizy genetyczne, możliwy udział bakterii z rodzaju *Bdellovibrio* w horyzontalnym transferze genów [46]. Często spotykaną strategią jest również bezpośrednie przyłączenie się bakterii drapieżnej do zewnętrznej ściany komórkowej ofiary, a następnie degradacja komórki gospodarza i asymilacja uzyskanych składników odżywczych poprzez specjalistyczne struktury, jak się dzieje w przypadku np. *Vampirococcus* spp., czy wytwarzanie czynników litycznych, co zarejestrowano w przypadku *Ensifer* spp. [26]. W obrębie prokariotycznych mikroorganizmów drapieżnych mogą być wykorzystywane również inne strategie polowania, przy których nie jest wymagany bezpośredni ich kontakt z ofiarą. Na przykład specyficzna dla bakterii z rodzaju *Myxococcus* i *Lysobacteria* tzw. strategia stadna (*wolffpack strategy*), polegająca na produkcji przez drapieżnika zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych, powodujących uszkodzenie komórek bakteryjnych znajdujących się w bezpośrednim ich otoczeniu, bez konieczności wnikania do wnętrza ofiary [5, 26].

4. Pierwotniaki a bakterie w środowisku

Badania wykazują, że żerowanie pierwotniaków w środowisku ma bardzo istotny wpływ na kształtowanie liczebności bakterii i składu ich populacji, a także na obieg materii organicznej w danym ekosystemie [2, 26, 33, 34, 51, 53]. Interakcje między pierwotniakami a bakteriami w różnych środowiskach są bardzo podobne, przy czym środowisko gleby jest tym, w którym dyfuzja i przemieszczanie się mikroorganizmów są bardziej ograniczone w porównaniu ze środowiskiem wodnym, co sprawia, że występowanie pierwotniaków ogranicza się do filmów wodnych i porów wypełnionych wodą, zaś mikropory występujące w macierzy glebowej mogą być nawet schronieniem dla bakterii przed tymi drapieżnikami [51].

Do pierwotniaków odżywiających się innymi mikroorganizmami, w tym bakteriami, należą orzęski, wiciowce i ameby, przy czym największą grupę bakteriożerców stanowią pierwotniaki heterotroficzne lub miksotroficzne tj. heterotroficzne nanowiciowce (*heterotrophic nanoflagellata*, HNF) i mikrowiciowce, a w mniejszym stopniu orzęski oraz ameby [26, 33, 34, 51, 53]. Średnia ilość komórek HNF w środowisku wodnym waha się między 10^2 a 10^5 ml⁻¹, mikrowiciowców ok. 10^2 ml⁻¹, natomiast ilość bakteriożernych orzęsków wynosi od 1 do 10^3 ml⁻¹, przy czym ilość tych pierwotniaków zależy od ilości bakterii, stanu eutroficznego środowiska, a także od ilości drapieżników żerujących na pierwotniakach [26, 33, 53]. Jednocześnie liczebność eliminowanych przez pierwotniaki bakterii w środowisku wodnym w ciągu godziny wynosi od 10^1 do 10^5 ml⁻¹, choć ilość ta związana jest z warunkami środowiska, dlatego też żerowanie pierwotniaków w okresie zimowym (ze względu na spadek ich liczebności i aktywności) ma dużo mniejsze znaczenie w regulacji liczebności bakterii [19, 33, 34].

Pod względem odżywiania wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy wykorzystywane przez komórki pierwotniaków do pobierania związków odżywczych: wchłanianie proste, pinocytozę oraz fagocytozę [30, 53]. Wchłanianie proste umożliwia pobieranie ze środowiska wody oraz prostych związków np. aminokwasów, bezpośrednio przez błonę komórkową. Pinocytoza u pierwotniaków ma miejsce w określonych miejscach na błonie komórkowej, gdzie tworzą się wpuklenia, a następnie powstają pęcherzyki zawierające wielocząsteczkowe związki, które są rozkładane po dołączeniu lizosomów. Ostatnim i najbardziej złożonym mechanizmem pobierania pokarmu przez pierwotniaki jest fagocytoza, która umożliwia pobieranie całych komórek małych mikroorganizmów. Podczas tego procesu pokarm zostaje wchłonięty w ściśle określonym miejscu na powierzchni komórki, czyli w tzw. cytoście. Po utworzeniu wodniczki pokarmowej dołączane

są do niej lizosomy i zawartość jej jest trawiona, przy czym niestrawione resztki usuwane są na zewnątrz komórki w ściśle określonym miejscu – tzw. cytopycie. W przypadku ameb i niektórych wiciowców wodniczka pokarmowa powstaje poprzez otoczenie pożeranego mikroorganizmu lub cząstki za pomocą tzw. pseudopodiów w dowolnym miejscu komórki [26, 30, 53]. Niektóre pierwotniaki polują na mniejsze mikroorganizmy za pomocą tzw. ekstrusomów, które umożliwiają im chwytanie i unieruchomienie ofiary, a następnie wysysanie jej zawartości. Z kolei młode orzęski przyczepiają się do powierzchni stałych, tracąc swoje rzęski i w tej formie odżywiają się również poprzez czułki przypominające ekstrusomy [47, 53]. Generalnie pierwotniaki żerują na mikroorganizmach mniejszych (komórki o objętości $<0,1 \mu\text{m}^3$) lub podłużnych [43]. Zazwyczaj preferowaną przez nie wielkość komórki, którą pochłaniają, bakterie osiągają tuż przed podziałem i to one są najefektywniej eliminowane ze środowiska przez pierwotniaki. Ponadto drapieżniki te wykazują dużo większą preferencję konsumpcji bakterii aktywnych metabolicznie w stosunku do form martwych lub „uśpionych”, przez co regulują one zarówno liczbę bakterii występujących w środowisku, jak i stosunek liczby komórek aktywnych metabolicznie do liczby komórek nieaktywnych oraz ilość komórek małych i dużych, ale także obecność różnych morfotypów w populacji bakterii mniejszych [33].

5. Drapieżniki bakterii a biofilm

Mikroorganizmy w środowisku naturalnym mogą występować w postaci wolnej jako tzw. plankton, choć często wykazują tendencję do adsorpcji na granicy faz ciała stałe – ciecz, ciecz – gaz czy ciecz – ciecz. Tworząc skupiska w postaci biofilmu mogą one przylegać zarówno do stałych powierzchni abiotycznych lub biotycznych – komórek innych organizmów. Biofilm jest tworem wielokomórkowym, przy czym mikroorganizmy wchodzące w jego skład mogą należeć do jednej, bądź wielu różnych grup systematycznych – bakterii, archeonów, grzybów czy pierwotniaków, i mogą to być zarówno organizmy niechorobotwórcze, jak i patogenne [13, 32, 45]. Biofilm tworzy swojego rodzaju wysoce zorganizowany układ biologiczny, w którym mikroorganizmy tworzą skoordynowaną dynamiczną strukturę, a ich komórki komunikują się ze sobą i kooperują w procesie rozkładu substancji oraz pozyskiwania energii. Zdolność kolonizacji powierzchni stałych mikroorganizmy zawdzięczają właściwościom adhezyjnym, natomiast cały biofilm stabilizowany jest dzięki polimerycznym substancjom wchodzącym w skład ściany komórkowej lub wydzielanym pozakomórkowo, jako tzw. EPS (*extracellular*

polymeric substances). Jednocześnie komórki drobnoustrojów wchodzących w skład biofilmu wykazują specjalizację do pełnienia różnych funkcji oraz wykazują inne cechy niż te same komórki występujące w postaci wolnej. Konsorcja komórek mikroorganizmów zgrupowane w biofilm są dzięki temu chronione przed niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, w tym przed drapieżnikami, ale również forma taka stwarza zdecydowanie łatwiejszy dostęp do związków odżywczych. Ponadto prawidłowe funkcjonowanie biofilmu jest możliwe między innymi dzięki zjawisku *quorum sensing*. Mechanizm ten oparty jest na produkcji cząstek sygnałnych przez komórki występujące w biofilmie i ich swobodnej dyfuzji do innych komórek w jego obrębie, które dzięki odpowiednim receptorom są w stanie reagować na dany bodziec. Sposób, w jaki mikroorganizmy grupują się i funkcjonują w postaci biofilmu, może więc przypominać prymitywny organizm, jednak to zapewnia im często możliwość funkcjonowania w warunkach, w których jako pojedyncze komórki nie miałyby możliwości przeżyć [13, 32]. W środowisku biofilm jest powszechny i co więcej, bierze aktywny udział w wielu procesach mikrobiologicznych tj. samoczyszczanie się wód powierzchniowych, podziemnych czy gruntowych, dzięki obecności wielu mikroorganizmów zapewniających prawidłowe procesy rozkładu. Z drugiej jednak strony mikroorganizmy tworzące biofilm mogą być także źródłem rozprzestrzeniania się patogenów, a także strat w gospodarce, poprzez kolonizację powierzchni roboczych i urządzeń medycznych oraz przemysłowych, a nawet produktów spożywczych. Mikroorganizmy chorobotwórcze zdolne do tworzenia biofilmu są często przyczyną groźnych chorób ludzi, zwierząt oraz roślin i takie skupiska drobnoustrojów w postaci biofilmów są bardziej odporne na działanie związków przeciwdrobnoustrojowych czy czynników fizykochemicznych, co sprawia, że walka z nimi jest dużo trudniejsza [32, 45].

Badania wykazały, że *Bdellovibrio bacteriovorus* również wpływa na tworzenie biofilmu bakterii, jako że jego obecność nie tylko istotnie wpływa na jego formowanie, ale fizycznie zaburza strukturę biofilmu i przesuwając równowagę populacji mikroorganizmów z formy osiadłej, prowadząc do uwolnienia pojedynczych komórek do środowiska. Wykazano również zdolność wnikania tych drapieżników w głąb biofilmu i niszczenia bakterii w nim występujących, co odróżnia bakterie z grupy BALO od bakteriofagów czy pierwotniaków. Bakterie te są zdolne do produkcji i wydzielania olbrzymiej ilości enzymów hydrolitycznych, w tym proteolitycznych i nukleolitycznych, wykorzystywanych do wydajnego niszczenia struktur komórkowych ofiary. Ze względu na to, że bakterie te żywią się bakteriami Gram-ujemnymi, oddziałując na biofilm w znacznym stopniu wpływają na skład całej populacji mikroorga-

nizmów tworzących tę strukturę, choć mogą również doprowadzić do jego całkowitego niszczenia [17, 44, 45]. Co więcej bakterie z grupy BALO są w stanie żywić się martwymi i nieaktywnymi komórkami bakterii, co sprawia, że bakterie uśpione w biofilmie, są nadal celem ataku, mimo iż mogą być niewrażliwe na infekcje fagowe czy antybiotyki, których efekt działania zależny jest od możliwości wzrostu i rozmnażania się komórki bakteryjnej [17, 45].

6. Mechanizmy obronne bakterii oraz ich interakcje z drapieżnikami

Jak wykazano, komórki bakteryjne nie są całkowicie bezbronne w walce z drapieżnikami, jako że powszechne jest pojawianie się w środowisku mutantów bakteryjnych opornych na obecne w środowisku drapieżniki, a nadto bakterie wykształciły różne mechanizmy umożliwiające im uniknięcie ataku [26, 41]. W warunkach naturalnych konsorcja bakterii tworzące biofilm z jednej strony mają ułatwiony dostęp do substancji odżywczych oraz są chronione przed niekorzystnymi warunkami zewnętrznymi, w tym przed działaniem środków przeciwdrobnoustrojowych, a także struktura ta chroni je przed atakami drapieżników [32, 42, 45, 57]. W przypadku obrony bakterii przed fagami i bakteriami z grupy BALO, głównie wykorzystywany jest mechanizm „maskowania”, polegający na zmienności cząsteczek LPS oraz białek na powierzchni ściany komórkowej bakterii, co zapobiega ich rozpoznaniu przez drapieżniki [5, 7, 20].

W przypadku fagów przyjmuje się, że obrona bakterii przed nimi obejmuje cztery mechanizmy, a mianowicie: (1) blokowanie przylegania faga do powierzchni komórki poprzez zmiany w eksponowanych na powierzchni receptorach i tworzenie biofilmu, (2) blokowanie wprowadzania materiału genetycznego faga do komórki poprzez zmiany w budowie ściany i nabycie oporności na lizyny fagowe, (3) występowanie systemu restrykcji-modyfikacji, który degraduje materiał faga po wniknięciu do komórki gospodarza oraz (4) infekcja poronna polegająca na samobójczej śmierci komórki uniemożliwiającej w ten sposób replikację faga [3, 57]. Znany jest również system CRISPR-Cas, który w komórkach bakteryjnych pełni rolę swojego rodzaju „adaptacyjnego układu odpornościowego komórek prokariotycznych” na poziomie kwasów nukleinowych. W jego skład wchodzi sekwencje CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) oraz geny kodujące enzymy z grupy Cas, położone w pobliżu CRISPR (*CRISPR associated sequences*). Enzymy z grupy Cas odpowiedzialne są za mechanizm regulacji oporności i dzięki nim podczas infekcji fagowej obce DNA jest trawione, a następnie

uzyskane fragmenty wbudowane są do sekwencji CRISPR, jako nowe sekwencje łącznikowe. System ten funkcjonuje analogicznie do systemu interferencyjnego RNA w komórkach organizmów eukariotycznych, przez co wprowadzone do genomu bakterii sekwencje DNA fagowego nadają im trwałą oporność na kolejną infekcję tym fagiem [3, 24].

Wykazano, że bakteriofagi i bakterie z grupy BALO występujące w tym samym środowisku, mogą atakować bakterie z tego samego gatunku, a nawet te same komórki (koinfekcja) [11, 54]. Nie ma jednak dowodów na to, jakoby wnikanie jednego z tych dwóch czynników warunkowane było obecnością drugiego. Hipotetyczny przebieg koinfekcji przedstawiono w oparciu o znajomość cyklu życiowego bakterii z grupy BALO oraz stwierdzoną obecność cząstek fagowych występujących w bdelloplacie. Przypuszcza się, że w pierwszej kolejności komórka bakteryjna jest atakowana przez bakteriofaga, który zaczyna replikować i tworzyć potomne cząstki fagowe wykorzystując aparat metaboliczny gospodarza, przy czym obecność tego faga w komórce bakteryjnej nie wyklucza jej z puli komórek, które mogą zostać zaatakowane przez bakterie z grupy BALO. Kiedy do komórki bakteryjnej wnika komórka BALO, dochodzi do wyłączenia metabolizmu komórki atakowanej, a następnie drapieżnik pożywia się jej zawartością. Stan taki powoduje ograniczenie, a nawet zatrzymanie replikacji faga w zainfekowanej komórce, przy czym bakteria z grupy BALO może kontynuować wzrost i rozmnażanie, nie będąc wrażliwa na obecnego w bakterii faga, co kończy się lizą komórki ofiary i uwolnieniem zarówno komórek BALO, ale także powstałych cząstek fagowych. Dodać należy, że fagi wydajniej replikują w komórkach bakteryjnych będących w fazie szybkiego wzrostu, natomiast bakterie z grupy BALO lepiej rosną na hodowli bakteryjnej w fazie stacjonarnej [11, 54]. Stwierdzono również, że wzrost liczby komórek BALO wzrasta z liczbą komórek bakterii [26], przy czym podczas rywalizacji o pożywienie, bakterie z grupy BALO mają przewagę w stosunku do komórek ofiary, która ma ograniczony dostęp do związków odżywczych i rośnie wolniej. W przypadku koinfekcji bakterii przez faga i komórkę BALO stan ten może być korzystny dla obu stron, ale ma też swoje konsekwencje. Bdelloplasty, powstałe po wniknięciu drapieżnika z grupy BALO do komórki bakteryjnej, stanowią ochronę przed niekorzystnymi warunkami zarówno dla bakterii z grupy BALO, jak i dla faga, choć drapieżcy rywalizują o tego samego gospodarza. Taką rywalizację można by określić jako „konkurencyjny sojusz” [11]. Jednocześnie wykazano, że bakterie z grupy BALO tj. *Bdellovibrio bacteriovorus* [1, 22, 29] są wrażliwe na pewną grupę bakteriofagów (bdellofagów), przy czym niektóre bdellofagi są w stanie namnażać się jedynie w tzw. układzie potrójnym (*three-*

-membered system) składającym się z faga, bakterii drapieżnej i jej ofiary [29, 49]. Bdellofagi te przyłączają się do ściany komórkowej swojego gospodarza, przy czym po wprowadzeniu swojego materiału genetycznego do jego wnętrza, komórka *Bdellovibrio* spp. traci zdolność ruchu, co sprawia, że po kilku minutach od infekcji uniemożliwione jest jej przyłączenie do swojej ofiary. Jednocześnie zauważono, że po wniknięciu bdellofaga do komórki *Bdellovibrio* spp. przyłączonej już do swojej ofiary, nadal może dochodzić do penetracji komórki drapieżnej. Wykazano [29], że bdellofagi przyłączają się do powierzchni bakterii drapieżnej w momencie jej wnikania do zaatakowanej komórki, a po wprowadzeniu swojego materiału genetycznego puste kapsydy są usuwane podczas przenikania *Bdellovibrio* spp. przez ścianę komórkową bakterii. Po wniknięciu do wnętrza zainfekowana komórka *Bdellovibrio* spp. nie wydłuża się i nie dzieli tak, jak komórka niezainfekowana bdellofagiem, przy czym w obu przypadkach komórka ofiary w efekcie końcowym jest lizowana, co pozwala na uwolnienie nowopowstałych cząstek bdellofaga.

Rozważając zależność między bakteriami a bakteriofagami warto zauważyć, że niekiedy wchodzą one w korelacje oparte na lizogenii, odnosząc tym samym obopólne korzyści. Wykazano, że infekcje fagowe mogą wzmacniać metabolizm komórki bakteryjnej, jej oporność, rozprzestrzenianie się, co może kształtować w pozytywnym aspekcie proces ewolucji [50]. Bakteriofagi integrując się z genomem gospodarza mogą nie tylko rozprzestrzeniać się, ale także nabywać nowych cech genetycznych, przez co uczestniczą w horyzontalnym transferze genów, niosąc niekiedy korzystne geny dla komórki bakteryjnej, a to z kolei w dużym stopniu może wpływać na zmienność i tym samym różnorodność bakterii [2, 7, 39, 50]. Wiele bakteriofagów niesie geny kodujące enterotoksyny, które w zależności od typu faga mogą być produkowane podczas cyklu lizogennego, litycznego po indukcji profaga lub w obu przypadkach [2]. Stan taki powoduje, że bakterie wykorzystując profagi jako broń przeciwko żerującym na nich pierwotniakom, stanowią nową formę obrony przed drapieżnikami [2, 7, 39]. Mechanizm ten został opisany na przykładzie komórek *Escherichia coli* i *Corynebacterium diphtheriae*, produkujących odpowiednio toksynę Shiga (Stx) i toksynę błoniczą (Dtx), które kodowane są przez geny występujące w genomie profaga. Podczas ataku na bakterie, drapieżne pierwotniaki z rodzaju *Tetrahymena* wydzielają nadtlenek wodoru uszkadzający komórki bakteryjne, jednocześnie powodując indukcję profaga w komórkach bakteryjnych będących w otoczeniu drapieżnika. W przypadku pierwotniaków z rodzaju *Tetrahymena* obie toksyny tj. Stx i Dtx, po uwolnieniu do środowiska są zdolne do wiązania się z odpowiednimi receptorami na powierzchni komórki drapieżnika, a wnikając do jego wnętrza prowadzą do

śmierci, tym samym chroniąc pozostałą część populacji zaatakowanych bakterii [2, 39, 35]. Jednak, co ciekawe, w przypadku pierwotniaków z rodzaju *Acanthamoeba*, na powierzchni ich komórek nie wykryto receptorów dla toksyn Stx i Dtx. Toksyny te powodują śmierć drapieżnika wyłącznie po pochłonięciu przez niego bakterii niosących geny tych toksyn, co powoduje, że bakterie te zachowują się jak „koń trojański”, niszcząc drapieżnika od wewnątrz. Dzięki takiej strategii możliwe jest wykorzystanie profaga do walki z drapieżnymi pierwotniakami nawet, jeżeli nie są one wrażliwe na obecność produkowanych przez bakterie toksyn w środowisku. Co więcej, badania wykazały, że pochłonięte bakterie niezdolne do produkcji toksyn są w stanie przeżyć wewnątrz *Acanthamoeba*, co z kolei sugeruje, że pierwotniak ten może również pełnić rolę ochronną dla bakterii, a jednocześnie być ich wektorem [2, 39].

W przypadku pierwotniaków, jednym z wykorzystywanych mechanizmów obrony przez komórki bakterii przed ich atakiem jest formowanie struktur wielokomórkowych i biofilmu, bądź zmiany morfologii komórki poprzez jej zwiększanie, co w znacznym stopniu utrudnia pochłonięcie ofiary [4, 5, 7, 20, 33, 43, 51]. Dlatego też gatunki bakterii wykazujące tzw. polimorfizm komórkowy, czyli genetyczne możliwości tworzenia ekstremalnie dużych lub małych komórek, są lepiej przystosowane do środowisk, w których obserwuje się silną presję pokarmową ze strony pierwotniaków [33]. Innym sposobem ochrony bakterii przed drapieżnymi pierwotniakami jest tendencja do zwiększania ruchliwości komórki potencjalnej ofiary w połączeniu ze zmniejszeniem jej rozmiarów, co także utrudnia jej schwytywanie. Obserwuje się także uwalnianie toksyn przez zaatakowane komórki bakteryjne, co powoduje lizę komórki pierwotniaka i uwolnienie jej zawartości, w rezultacie stanowiąc dodatkowe źródło związków odżywczych dla bakterii [4, 5, 7, 20, 43, 51]. Wykazano również, że niektóre bakterie wytwarzają związki barwne takie jak wiołaceina, która znacznie obniża liczbę pierwotniaków żerujących na populacji tych bakterii. Produkowana wiołaceina indukuje u pierwotniaków proces podobny do apoptozy występującej w komórkach organizmów wielokomórkowych, co potwierdzono na liniach komórek ssaczy, w których związek ten aktywował apoptozę badanych komórek, co może mieć w przyszłości duże znaczenie terapeutyczne [43].

7. Praktyczne wykorzystanie drapieżników bakterii

Drapieżne bakterie, które żerują na innych bakteriach oraz produkują związki przeciwbakteryjne mogą być doskonałym źródłem nowych antybiotyków [8, 10, 12]. Badania nad możliwością wykorzystania bak-

terii z grupy BALO wskazują na ich wysoki potencjał w walce z mikroorganizmami patogennymi (w tym antybiotykoopornymi) dla ludzi oraz zwierząt. Wykazano, że opracowywanie nowych strategii do walki z patogenami z wykorzystaniem bakterii drapieżnych, analogicznie jak stosowanie bakteriofagów, może być naturalną bronią przeciwko tym mikroorganizmom. Ponadto, podobnie jak fagi, bakterie z grupy BALO nie mają negatywnego wpływu na komórki eukariotyczne [9, 12, 17, 21, 23, 38, 44, 57]. Badania prowadzone nad wpływem *Bdellovibrio bacteriovorus* na infekcję oka wywołaną przez *Shigella flexneri* u królika wykazały, że bakterie drapieżne są w stanie w znacznym stopniu ograniczyć, a nawet cofnąć zakażenie wywołane tym patogenem. Również analizując odchody zwierząt domowych wykazano zależność między ich stanem zdrowia a ilością izolowanych bakterii z grupy BALO. Wykazano, że w próbach pochodzących od zwierząt z infekcjami jelitowymi lub płucnymi występuje znacznie niższa ilość bakterii drapieżnych, co wskazuje na istotny wpływ tych bakterii na „kondycję” przewodu pokarmowego oraz ich znaczenie w kontroli patogennych enterobakterii tj. *Pseudomonas* spp., *Pasteurella* spp. czy *Campylobacter* spp. [52, 58]. Ponadto dowiedziono, że mikroorganizmy z grupy BALO żerują również na bakteriach patogennych dla człowieka. Badania wykazały, że *Bdellovibrio bacteriovorus* atakuje bakterie patogene z rodzajów *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Bordetella* spp., *Burkholderia* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Listonella* spp., *Morganella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Serratia* spp., *Shigella* spp., *Spirillum* spp., *Vibrio* spp. czy *Yersinia* spp. [17]. Słabszą stroną wykorzystania bakterii z grupy BALO jest fakt, że nie wykazują one zdolności atakowania i żerowania na bakteriach Gram-dodatnich, które stanowią dużą grupę bakterii patogennych dla człowieka. Jednak udowodniono [44], że bakterie z grupy BALO wydzielając zewnątrzkomórkowe enzymy tj. proteazy/peptydazy i inne hydrolazy niezbędne w procesie niszczenia makromolekuł swojej ofiary, są jednocześnie zdolne do hamowania formowania się biofilmu bakterii Gram-dodatnich takich jak *Staphylococcus aureus* i *Staphylococcus epidermidis*. Co więcej, wydzielane enzymy mogą obniżyć również wirulencję patogennych bakterii *S. aureus* czy *Listeria monocytogenes* [44] poprzez hydrolizę białek występujących na ich powierzchni, będących czynnikami wirulencji. Inne badania prowadzone w kierunku wykorzystania bakterii drapieżnych sprawiają, że rozważa się również opcję zastosowania ich nie tylko jako alternatywę dla antybiotyków, ale również jako ewentualne probiotyki, które mogłyby chronić makroorganizm m.in. przed mikroorganizmami patogennymi [17, 45]. Jednocześnie warte zastanowienia się jest stosowanie podejścia dwubiegowego, gdzie bakterie

z grupy BALO mogłyby być stosowane w połączeniu np. z antybiotykami, związkami chemicznymi, czynnikami fizycznymi, a nawet innymi drapieżnikami bakterii, głównie w celu zwiększenia wydajności usuwania biofilmów, czy zwalczania patogenów [45]. Wykazano także, że bakterie drapieżne np. *Bdellovibrio bacteriovorus* mogłyby znaleźć zastosowanie przy kontrolowaniu i usuwaniu biofilmów występujących w środowisku, dzięki czemu mogłyby być z powodzeniem wykorzystane przy niwelowaniu niepożądanych bakterii z naturalnych zbiorników wodnych, zbiorników do hodowli ryb, a nawet ścieków [17, 44, 45, 58, 59]. Zakłada się, że dzięki mikroorganizmom drapieżnym oraz bakteriofagom możemy w znacznym stopniu usprawnić niektóre procesy technologiczne oraz ograniczyć ilość patogennej bakterii, które mogą zagrażać człowiekowi, zwierzętom czy roślinom [25].

8. Podsumowanie

Reasumując można stwierdzić, że drapieżnictwo wśród mikroorganizmów, mimo iż jest stosunkowo słabo poznane, to nie ma wątpliwości, że ma znaczący wpływ na mikroorganizmy występujące w środowisku [5, 7, 11]. Obecnie coraz więcej bakterii patogennych jest opornych na stosowane antybiotyki, co wiąże się z koniecznością poszukiwania nowych związków przeciwdrobnoustrojowych i metod walki z tymi mikroorganizmami, a także poszukiwania alternatywy dla antybiotyków i chemioterapeutyków. Stąd uważa się, że bardzo ważnym elementem w tej walce jest natura, jako źródło nowych leków i związków przeciwdrobnoustrojowych. Przykładem mogą być drapieżniki bakterii, które żerują na nich oraz naturalnie produkują związki przeciwbakteryjne, a więc mogą być doskonałym źródłem nowych antybiotyków [8, 10]. Co więcej, ze względu na różny zakres atakowanych komórek bakteryjnych, rodzaj usuwanych bakterii przez drapieżniki może być bardzo specyficzny lub polegający na ograniczeniu ogólnej ich liczby. Stosując bakteriofagi i wykorzystując ich wysoką specyficzność w stosunku do gospodarza, można eliminować bakterie należące do konkretnej grupy taksonomicznej. Bakterie drapieżne z kolei atakują przede wszystkim bakterie Gram-ujemne niekoniecznie należące do tej samej grupy systematycznej. Wykorzystanie pierwotniaków natomiast prowadzi do usuwania ogólnej liczby bakterii w środowisku. Również o wyborze drapieżnika mogą decydować warunki środowiska oraz stadium rozwojowe eliminowanych bakterii [25].

Badania nad możliwością wykorzystania bakterii z grupy BALO wskazują na ich wysoki potencjał w walce z patogenami u zwierząt, a w przyszłości również u ludzi [9]. Dlatego też sugeruje się opraco-

wywanie nowych strategii przeciwdrobnoustrojowych, wykorzystujących do walki z patogenami, w tym antybiotkoopornymi, bakterii drapieżnych oraz bakteriofagów będących naturalną bronią przeciwko tym mikroorganizmom, a jednocześnie nieuszkodzających komórek eukariotycznych [12]. Stąd zakłada się, że wiedza o zależnościach między organizmami w środowisku naturalnym może być nieocenionym źródłem zarówno informacji na temat ich koegzystencji, jak również źródłem mikroorganizmów i związków przez nie produkowanych, które mogłyby w przyszłości być wykorzystane w walce z drobnoustrojami zarówno patogennymi, jak i zakażającymi hodowle mikroorganizmów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych. Ponadto ważnym elementem może być także pozyskiwanie enzymów i biokatalizatorów dla biotechnologii pochodzących z mikroorganizmów drapieżnych, bakteriofagów czy pierwotniaków [17, 41]. Zauważyć należy, że coraz częściej podejmowane są próby wykorzystania drapieżników bakterii w różnych gałęziach przemysłu, poczynając od wspomnianej alternatywy dla antybiotyków, przez utrzymanie czystości hodowli przemysłowych, do oczyszczania zbiorników wodnych oraz ścieków [9, 17, 23, 59]. Duży udział drapieżników bakterii w regulacji liczby i składu populacji mikroorganizmów może mieć istotne znaczenie już teraz w ochronie środowiska, w tym przy oczyszczaniu ścieków [19, 25, 59]. Stąd badania prowadzone w tym kierunku wydają się mieć ogromny potencjał zarówno poznawczy, jak i biotechnologiczny.

Piśmiennictwo

1. Althausen M., Samsonoff W.A., Anderson C., Conti S.F.: Isolation and preliminary characterization of bacteriophages for *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Virol.* **10**, 516–523 (1972)
2. Arnold J.W., Koudelka G.B.: The Trojan horse of the microbiological arms race: phage-encoded toxins as a defence against eukaryotic predators. *Environ. Microbiol.* **16**, 454–466 (2014)
3. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P.: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, **315**, 1709–1712 (2007)
4. Barton L.L., Northup D.E.: *Microbial ecology*. Wydanie pierwsze. Wyd. John Wiley & Sons Inc., New Jersey 2011, s. 159–182
5. Berleman J.E., Kirby J.R.: Deciphering the hunting strategy of a bacterial wolfpack. *FEMS Microbiol. Rev.* **33**, 942–957 (2009)
6. Brockhurst M.A., Fenton A., Roulston B., Rainey P.B.: The impact of phages on interspecific competition in experimental populations of bacteria. *BMC Ecology*, **6**, 19 (2006)
7. Brüßow H.: Bacteria between protists and phages: from antipredation strategies to the evolution of pathogenicity. *Mol. Microbiol.* **65**, 583–589 (2007)
8. Cain C.C., Lee D., Waldo R.H., Henry A.T., Casida Jr. E.J., Wani M.C., Wall M.E., Oberlies N.H., Frankinham J.O.: Synergistic antimicrobial activity of metabolites produced by a nonobligate bacterial predator. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2113–2117 (2003)

9. Cao H., He S., Wang H., Hou S., Lu L., Yang X.: *Bdellovibrios*, potential control bacteria against pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Vet. Microbiol.* **154**, 413–418 (2012)
10. Casida Jr. L.E.: Minireview: Nonobligate bacterial predation of bacteria in soil. *Microb. Ecol.* **15**, 1–8 (1988)
11. Chen H., Williams H.N. Sharing of prey: Coinfection of a bacterium by a virus and a prokaryotic predator. *mBio*, **3**, e00051–12 (2012)
12. Dashiff A., Junka R.A., Kibera M., Kadouri D.E.: Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Appl. Microbiol.* **110**, 431–444 (2010)
13. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 847–867 (2000)
14. Davidov Y., Friedjung A., Jurkevitch E.: Structure analysis of a soil community of predatory bacteria using culture-dependent and culture-independent methods reveals a hitherto undetected diversity of *Bdellovibrio*-and-like organisms. *Environ. Microbiol.* **8**, 1667–1673 (2006)
15. Davidov Y., Huchon D., Koval S.F., Jurkevitch E.: A new α -proteobacterial clade of *Bdellovibrio*-like predators: implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environ. Microbiol.* **8**, 2179–2188 (2006)
16. Davidov Y., Jurkevitch E.: Diversity and evolution of *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the *Bacteriovorax*-*Pedibacter* clade as *Bacteriovoracaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **54**, 1439–1452 (2004)
17. Dwidar M., Monnappa A.J., Mitchell R.J.: The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Reports*, **45**, 71–78 (2012)
18. Garrity G.M., Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T.: Bergey's manual of systematic bacteriology. The Proteobacteria. Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria. Wyd. II. Springer, New York, 2005, s.1040–1058
19. González J.M., Iriberry J., Barcina I. Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 998–1004 (1992)
20. Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P.: Bacterial biofilms: from the natural environment to the infectious diseases. *Nature Rev.* **2**, 95–108 (2004)
21. Harini K., Ajila V., Hegde S.: *Bdellovibrio bacteriovorus*: A future antimicrobial agent? *J. Indian Soc. Periodontol.* **17**, 823–825 (2013)
22. Hashimoto T., Diedrich D.L., Conti S.F.: Isolation of bacteriophage for *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. Virol.* **5**, 97–98 (1970)
23. Iebba V., Santangelo F., Nicoletti M., Gagliardi A., De Biase R.V., Cucchiara S., Nencioni L., Conte M.P., Schippa S.: Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PLoS One*, **8**, e61608 (2013)
24. Jaworski A. i Dobrowolska A.: System interferencyjnego RNA bakterii (CRIPSR-Cas) i jego rola w obronie przed infekcją fagową. *Post. Mikrobiol.* **48**, 23–30 (2009)
25. Johnke J., Cohen Y., de Leeuw M., Kushmaro A., Jurkievitch E., Chatzinotas A.: Multiple micro-predators controlling bacterial communities in the environment. *Curr. Opin. Biotechnol.* **27**, 185–190 (2014)
26. Jürgens K. Predation on bacteria and bacterial resistance mechanisms: comparative aspects among different predator groups in aquatic systems. (w) *Predatory prokaryotes. Biology, Ecology and Evolution. Microbiology Monographs*, red. Jurkevitch E. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2007, 4, s. 57–92
27. Jurkevitch E., Davidov Y. Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes. (w) *Predatory prokaryotes. Biology, Ecology and Evolution. Microbiology Monographs*, red. Jurkevitch E., Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007, 4, s. 11–56
28. Jurkevitch E., Ramati B.: Design and uses of *Bdellovibrio* 16S rRNA-targeted oligonucleotides. *FEMS Microbiol. Lett.* **184**, 265–271 (2000)
29. Kessel M., Varon M.: Development of *Bdellophage* VL-1 in parasitic and saprofitic *Bdellovibrios*. *J. Virol.* **12**, 1522–1533 (1973)
30. Kilarski W. Strukturalne podstawy biologii komórki. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa 2007, s. 160–171
31. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J.: Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. 9th report of the International Committee on Taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press 2012
32. Kołwzan B.: Analiza zjawiska biofilmu – warunki jego powstania i funkcjonowania. *Ochr. Środow.* **33**, 3–14 (2011)
33. Koton-Czarnecka M., Chróst R.: Konsumpcja bakterii przez pierwotniaki w ekosystemach wodnych. *Post. Mikrobiol.* **40**, 219–240 (2001)
34. Koton-Czarnecka M., Chróst R.J.: Measurement of protozoa grazing on bacteria by means of [³H-tymidine]-labeled natural assemblages of lake bacteria. *Pol. J. Environ. Studies*, **11**, 385–393 (2002)
35. Lainhart W., Stolfa G., Koudelka G.B.: Shiga toxin as a bacterial defence against a eukaryotic predator, *Ttrahymena thermophile*. *J. Bacteriol.* **191**, 5116–5122 (2009)
36. Lambert C., Fenton A.K., Hobbey L., Sockett R.E.: Predatory *Bdellovibrio* bacteria use gliding motility to scout for prey on surfaces. *J. Bacteriol.* **193**, 3139–3141 (2011)
37. Lambert C., Morehouse K.A., Chang C.-Y., Sockett R.E.: *Bdellovibrio*: growth and development during the predatory cycle. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**, 639–644 (2006)
38. Li H., Liu C., Chen L., Zhang X., Cai J.: Biological characterization of two marine *Bdellovibrio*-and-like organisms isolated from Daya bay of Shenzhen, China and their application in the elimination of *Vibrio parahaemolyticus* in oyster. *Int. J. Food Microbiol.* **151**, 36–43 (2011)
39. Łoś J., Łoś M., Węgrzyn A., Węgrzyn G.: Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2**, 1–8 (2013)
40. Mahmud K.K., Koval S.F.: Characterization of type IV pili in the life cycle of the predator bacterium *Bdellovibrio*. *Microbiol.* **156**, 1040–1051 (2010)
41. Markelova N.Y., Gariev I.A.: Predatory bacteria *Bdellovibrio*: survival strategy. *Process Biochem.* **40**, 1089–1094 (2005)
42. Markelowa N.Y.: Predacious bacteria, *Bdellovibrio* with potential for biocontrol. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **313**, 428–431 (2010)
43. Matz C., Webb J.S., Schupp P.J., Phang S.Y., Penesyan A., Egan S., Steinberg P., Kjelleberg S. Marine biofilm bacteria evade predation by targeted chemical defence. *PLoS One*, **3**, e2744 (2008)
44. 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.* **4**, 3811 (2014)
45. Núñez M.E., Martin M.O., Chan P.H., Spain E.M.: Predation, death and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surf. B*, **42**, 263–271 (2005)
46. Pan A., Chanda I., Chakrabarti J.: Analysis of the genome and proteome composition of *Bdellovibrio bacteriovorus*: indication for recent prey-derived horizontal gene transfer. *Genomics*, **98**, 213–222 (2011)
47. Paul E.A., Clark F.E. *Mikrobiologia i biochemia gleb*. Wyd. UMCS, Lublin 2000, s. 116–120
48. Rendulic S., Jagtap P., Rosinus A., Eppinger M., Baar C., Lanz C., Keller H., Lambert C., Evans K.J., Goemann A., Meyer E.,

- Sockett R.E., Schuster S.C.: A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science*, **30**, 689–692 (2004)
49. Roberts R.C., Keefer M.A., Ranu R.S.: Characterization of *Bdellovibrio bacteriovorus* bacteriophage MAC-1. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 3065–3070 (1987)
50. Rohwer F., Thurber R.V.: Viruses manipulate the marine environment. *Nature*, **459**, 207–212 (2009)
51. Rønn R., McCaig A.E., Griffiths B.S., Prosser J.I.: Impact of protozoan grazing on bacterial community structure in soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 6094–6105 (2002)
52. Schwudke D., Strauch E., Krueger M., Appel B. Taxonomic studies of predatory bdellovibrios based on 16S analysis, ribotyping and the hit locus and characterization of isolates from the gut of animals. *System Appl. Microbiol.* **24**, 385–394 (2001)
53. Sigeo D.C. *Freshwater Microbiology. Biodiversity and dynamic interactions of microorganisms in the aquatic environment.* Wyd. John Wiley & Sons Inc., Chichester 2005, s. 401–423
54. Varon M., Levisohn R.: Three-membered parasitic system: a bacteriophage, *Bdellovibrio bacteriovorus*, and *Escherichia coli*. *J. Virol.* **9**, 519–525 (1972)
55. Varon M., Shilo M. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria. *J. Bacteriol.* **95**, 744–753 (1968)
56. Wang Z., Kadouri D.E., Wu M.: Genomic insights into an obligate epibiotic bacterial predator: *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13. *BMC Genomics*, **12**, 453 (2011)
57. Weinbauer M.G.: Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 127–181 (2004)
58. 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, s. 213–248
59. Withey S., Cartmell E., Avery L.M., Stephenson T.: Bacteriophages – potential for application in wastewater treatment processes. *Sci. Total Environ.* **339**, 1–18 (2005)
60. Wommack K.E., Colwell R.R.: Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 69–114 (2000)