



FACULTAD DE BIOLOGÍA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA



TRABAJO FIN DE GRADO

## **BDELLOVIBRIO Y BALO. CICLO DE VIDA Y APLICACIONES**

**Autor**

Fernando Claro Linares

**Directora**

María del Rosario Espuny Gómez

Grado en Biología

Curso académico 2022-23

Sevilla, junio de 2023

# ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	1
3. Ciclo de vida y estrategias de depredación .....	4
3.1. Dependiente de hospedador (HD): invasión periplásmica.....	4
3.2. Dependiente de hospedador (HD): invasión epibiótica.....	12
3.3. Independiente de hospedador (HI).....	13
4. Dinámica de la replicación cromosómica y regulación de la expresión génica.....	13
4.1. Coordinación espaciotemporal de la división celular no binaria .....	15
4.2. Establecimiento de la polaridad celular .....	16
4.3. Expresión diferencial de genes en AP y GP.....	17
5. Señalización celular y regulación de la depredación: importancia del c-di-GMP ..	20
5.1. Control de las funciones celulares durante el crecimiento HD .....	20
5.2. Control del cambio de fases: de AP a GP .....	21
6. Aplicaciones de <i>Bdellovibrio</i> y BALOs .....	24
6.1. Agente terapéutico .....	24
6.1.1. Tratamiento de infecciones bacterianas humanas y animales .....	24
6.1.2. Mecanismos de resistencia de la presa frente a <i>Bdellovibrio</i> .....	26
6.1.3. Resistencia frente a antibióticos y terapia combinatoria.....	27
6.2. Agente de biocontrol.....	28
6.2.1. Control de la transferencia horizontal de genes .....	29
6.2.2. Producción agropecuaria.....	29
7. Conclusiones.....	30
8. Perspectivas futuras .....	31
9. Bibliografía.....	32

## 1. Resumen

*Bdellovibrio bacteriovorus* es una bacteria Gram-negativa, depredadora obligada, que ataca e invade otras bacterias Gram-negativas, incluidos patógenos animales y vegetales. Su ciclo de vida consta de tres fases caracterizadas por perfiles transcripcionales específicos y cuyo progreso depende de señalización por c-di-GMP: una fase de ataque (AP), de vida libre y no replicativa, en la que caza a su presa, una fase de transición (TP) y una fase reproductiva o de crecimiento (GP) replicativa. A causa de su ciclo vital único y a su potencial como agente antimicrobiano, *B. bacteriovorus* ha suscitado un gran interés como agente terapéutico y herramienta de biocontrol en industria, acuicultura, ganadería, horticultura y medicina.

## 2. Introducción

La depredación es una interacción ecológica crucial que se da en todos los ecosistemas, incluidos los habitados por microorganismos (Hungate *et al.*, 2021). Las comunidades bacterianas suelen entablar interacciones hostiles cuando compiten tanto por los nutrientes como por los nichos ecológicos, y utilizan diversos métodos para obtener ventaja sobre sus vecinas (Bratanis *et al.*, 2020). Por ejemplo, sintetizan y secretan antibióticos capaces de limitar el crecimiento o lisar a las bacterias vecinas, o cazan y matan a sus presas mediante la depredación bacteriana (Bratanis *et al.*, 2020).

Las bacterias depredadoras pueden clasificarse en depredadores facultativos y depredadores obligados (Hungate *et al.*, 2021). Las depredadoras facultativas poseen la capacidad de cambiar a un modo de vida saprofito, consumiendo una variedad de sustratos en ausencia de su presa preferida. Por el contrario, los depredadores obligados dependen exclusivamente del consumo de células presa para subsistir (Harding, 2019). Este último tipo es en el que se centrará mayoritariamente el presente trabajo.

Actualmente, el estilo de vida depredador obligatorio está restringido a la clase  $\alpha$ -proteobacteria (género *Micavibrio*) y  $\delta$ -proteobacteria (familias: *Bdellovibrionaceae*, *Bacteriovoraceae*, *Peredibacteraceae*, *Halobacteriovoraceae* y *Pseudobacteriovoraceae*), todas agrupadas bajo el término general *Bdellovibrio and like organisms* (BALO) (Bratanis *et al.*, 2020).

Los BALO constituyen un grupo de bacterias Gram-negativas que depredan exclusivamente a otras bacterias Gram-negativas y se localizan tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos (Sockett & Lambert, 2004).

La depredación de los BALO es periplásmica o epibiótica, (Deeg *et al.*, 2020), siendo *Bdellovibrio bacteriovorus* el BALO mejor estudiado y que sirve como organismo modelo para comprender la depredación periplásmica (Bratanis *et al.*, 2020).

*B. bacteriovorus* es un depredador periplásmico obligado que experimenta un ciclo trifásico (Rotem *et al.*, 2015) y dimórfico que dura unas 4 horas y comprende varias etapas microscópicas diferenciables (Sockett & Lambert, 2004). Así, su ciclo de vida se divide espacial y temporalmente en tres fases: fase de ataque (AP) no replicativa, fase de transición (TP) y fase de crecimiento (GP) y replicación intraperiplásmica (Fig. 1).

En la AP, las células nadan libremente para localizar, reconocer y adherirse a la presa. El reconocimiento exitoso desencadena la TP, durante la cual *B. bacteriovorus* evalúa el valor nutricional de la presa (Rotem *et al.*, 2015). Si identifica la presa adecuada, el depredador modifica la superficie celular del hospedador, lo que permite penetrar en su periplasma sin causar daños graves (Caulton & Lovering, 2020).

Tras entrar en el periplasma, *Bdellovibrio* sufre un cambio transcripcional y pasa a la GP, formando un nicho estable denominado bdelloplasto (Bratanis *et al.*, 2020). En esta fase, la célula depredadora se aprovecha de los nutrientes de la presa para crecer hasta convertirse en un filamento multinucleoide. Por último, se divide en múltiples células hijas AP en números pares o impares que escapan del bdelloplasto (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 2019).

El crecimiento de *B. bacteriovorus* en presencia de una presa se conoce como crecimiento dependiente de hospedador (HD). Alternativamente, en entornos ricos en nutrientes, *B. bacteriovorus* puede sobrevivir sin un hospedador, lo que se conoce como crecimiento independiente del hospedador (HI) (Fig. 1). Sin embargo, el crecimiento HI es raro y sólo se produce en aproximadamente 1 de cada  $10^6$ - $10^7$  células (Rotem *et al.*, 2015).

Pese a su importancia, nuestro conocimiento actual de la dinámica molecular de la depredación bacteriana es limitado, pero los estudios al respecto son cada vez más numerosos. Un aspecto clave de estas interacciones es la selección de la presa, que repercute directamente en el desarrollo del depredador. ¿Cuáles son las claves moleculares que hacen que una bacteria depredadora elija una presa y no otra? ¿Cómo se regulan las distintas fases depredadoras? ¿Evalúan estas bacterias el valor nutricional de su presa? Para comprender el papel de la depredación bacteriana en el equilibrio ecológico y sus implicaciones en diversos entornos es necesario profundizar en estas cuestiones que intentaran contestarse en esta revisión bibliográfica.

Así, el objetivo principal de esta revisión es proporcionar una comprensión integral del comportamiento depredador de *B. bacteriovorus* y explorar su uso práctico.

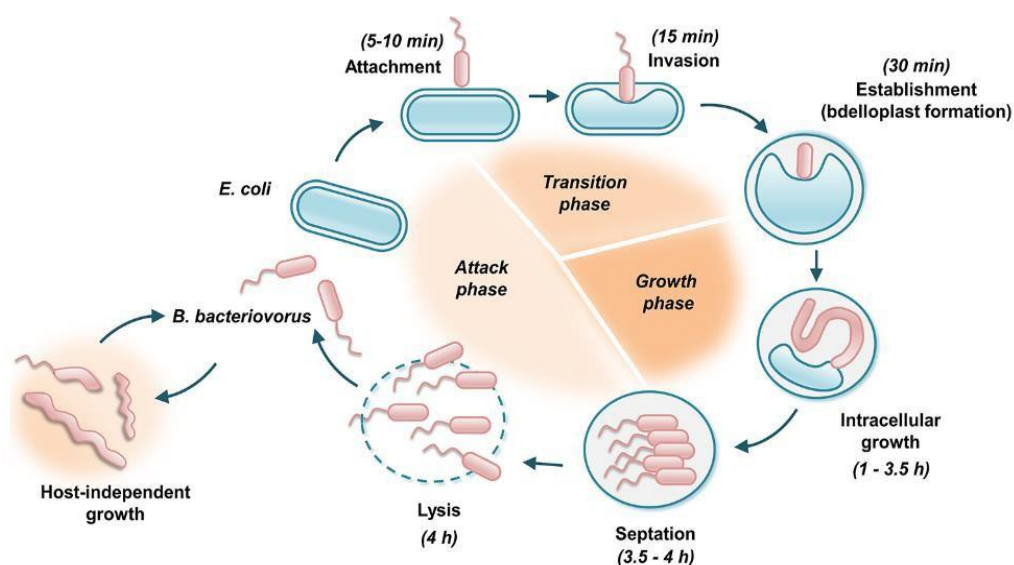


Figura 1. Representación cronológica de las fases y etapas del ciclo de vida de *B. bacteriovorus* HD y HI. El ciclo de vida de *B. bacteriovorus* está constituido por tres fases: la fase de ataque, de vida libre y no replicativa (incluye las etapas desde la septación del bdelloplasto hasta la adhesión a la presa); la fase de transición, en la que se evalúa el valor nutricional de la presa (incluye la etapa tardía de la adhesión, la invasión y el inicio del establecimiento del bdelloplasto); y la fase de crecimiento, replicativa (incluye la formación del bdelloplasto, el crecimiento intracelular, la septación del filamento, la maduración de las nuevas células AP y la lisis del bdelloplasto) (Bukowska-Faniband et al., 2020)

### 3. Ciclo de vida y estrategias de depredación

#### 3.1. Dependiente de hospedador (HD): invasión periplásmica

A continuación, se presentará de forma detallada, y a partir de un enfoque principalmente molecular, las diferentes fases que constituyen el ciclo de vida de *B. bacteriovorus*. También se abordarán aspectos morfológicos relevantes para una comprensión completa del proceso.

##### I. Motilidad y detección de la presa

Las células AP son móviles, pequeñas (0,2-0,5  $\mu\text{m}$  x 0,5-2,5  $\mu\text{m}$ ) y tienen forma de coma. La proteína homóloga de actina eucariota MreB2 juega un papel crucial en el mantenimiento de la forma celular (Fenton *et al.*, 2010) junto con la proteína CcrP, actuando como un andamio por debajo, aunque no es esencial (Fenton *et al.*, 2010). No obstante, pueden intervenir otros factores en el mantenimiento de la forma celular.

Estas células poseen un único flagelo, largo, polar y con envuelta, responsable de su alto grado de motilidad, que les permite nadar a enormes velocidades de hasta  $160 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$  (Lambert *et al.*, 2006). Si bien la motilidad flagelar es importante para encontrar presas en medios líquidos, no es esencial ni para penetrarlas ni para la motilidad de deslizamiento (*gliding*) asociada a superficies sólidas y/o biopelículas (Hobley *et al.*, 2012): inicialmente se creía que *B. bacteriovorus* invadía a las presas perforándolas mecánicamente mediante impactos a alta velocidad, facilitados por la rotación del flagelo. Sin embargo, hallazgos posteriores demostraron que esta hipótesis era incorrecta, ya que los mutantes con movilidad reducida seguían mostrando capacidad depredadora (Caulton & Lovering, 2020). Además, *Bdellovibrio* mantiene la capacidad depredatoria en medios viscosos, aunque su éxito disminuye (Kadouri & O'Toole, 2005), donde la velocidad celular y la rotación de los flagelos son comparativamente menores que en medios líquidos (Caulton & Lovering, 2020).

El flagelo se compone de seis flagelinas (FliC1-6), de las cuales sólo FliC3 es esencial en la depredación (Lambert *et al.*, 2006). El genoma de *B. bacteriovorus* codifica tres pares de proteínas MotAB, cada una de las cuales puede, independientemente, impulsar la rotación flagelar a través de una fuerza protón motriz (Morehouse *et al.*, 2011). La necesidad de ser móvil conduce al mantenimiento de múltiples copias funcionales de los genes *motAB*. Esto evita la posibilidad de que se produzcan mutaciones espontáneas que incapaciten a la célula.

Dwidar *et al.* (2017) demostraron que la supervivencia de *Bdellovibrio* durante la AP no depende únicamente de las reservas de aminoácidos obtenidas durante la GP, como se proponía en estudios anteriores. La presencia de nutrientes en el medio induce la secreción de proteasas, por lo que pueden incorporar aminoácidos también durante la AP para evitar quedarse sin reservas antes de encontrar a otra presa. También desencadena cambios en el transcriptoma del depredador, similares a los observados durante el crecimiento periplásmico, como se verá más adelante.

En cuanto a la detección de la presa, *B. bacteriovorus* contiene tres genes de aerotaxis y veinte genes de la proteína quimiotáctica de aceptación de metilo (MCP). La delección de un único gen MCP (*mcp2*) reduce significativamente la eficacia de la depredación en el mutante (Lambert *et al.*, 2008). Además, las principales proteínas implicadas en el sistema de señalización de la quimiotaxis (CheY, CheA, CheW, CheB, y CheR) están todas representadas por múltiples copias (Lambert *et al.*, 2008). Todo esto sugiere que la quimiotaxis desempeña un papel importante en la capacidad de la bacteria para localizar presas.

Curiosamente, carece del gen *cheZ*, implicado en la terminación de la señal quimiotáctica en algunos grupos de bacterias mediante fosforilación de CheY. No obstante, el genoma de *B. bacteriovorus* codifica homólogos tanto de *cheC* (Bd3101) como de *cheX* (Bd1823), que pueden desempeñar el papel de *cheZ* (Lambert *et al.*, 2008).

## II. Adhesión e invasión

El mecanismo por el que los depredadores identifican a sus presas siempre ha sido un misterio, pues no se ha conseguido identificar moléculas únicas que intervienen en la adhesión. Por ejemplo, las tasas de adhesión de *Bdellovibrio* varían entre cepas rugosas y lisas de *E. coli* y *Salmonella spp*, lo que indica que los lipopolisacáridos (LPS) puede actuar como ligando (Capeness, 2015). Recientemente, Mun *et al.* (2022) descubrieron que la cepa 109J de *B. bacteriovorus* reconoce la porina F de membrana externa (OmpF) de *E. coli*, y su ausencia retrasa significativamente la depredación. Sin embargo, el reconocimiento de OmpF o de sus homólogos no es esencial para la depredación de otras especies y/o cepas bacterianas. Esto sugiere que los mecanismos de adhesión sean probablemente multifactoriales y que los BALO poseen una diversidad única en sus sistemas de reconocimiento de presas.

Los *pili* de tipo IV (T4P), situados en el extremo no flagelado de las células AP, son filamentos dinámicos que se polimerizan y despolimerizan rápidamente a partir de un *pool* de pilinas (Craig *et al.*, 2019). Los ciclos de extrusión (polimerización y extensión del filamento) y retracción (despolimerización y acortamiento del filamento) desempeñan un papel crucial en las interacciones depredador-presa, pues la supresión del gen *pilA* provoca la pérdida de la capacidad depredadora de *Bdellovibrio* (Chanyi & Koval, 2014).

En este contexto, Bd0108 y Bd0109 son proteínas clave implicadas en el control de la extrusión y retracción de los T4P, así como en la transmisión de señales al depredador cuando el T4P contacta con la presa. Los genes *bd0108* y *bd0109* se coexpresan, y sus ARNm se traducen en proteínas que tienen una secuencia señal reconocida por el sistema de secreción Sec que las trasladan al periplasma (Capeness *et al.*, 2013). Aquí, Bd0108 interactúa con Bd0109, a la que secuestra. Sin embargo, cuando la proteína Bd0109 no está asociada a Bd0108 puede anclarse a la región circundante de la pared celular donde penetra el *pili* y/o a la fibra del T4P debido a un motivo estructural que puede reconocer a los carbohidratos presentes tanto en peptidoglicano (PG) de la pared celular como en las pilinas glicosiladas. La razón por la que Bd0109 se une a la pared celular es porque tiene una función estructural y su ausencia debilita la pared celular en este punto, lo que mata a las células (Capeness *et al.*, 2013).

En la formación del T4P silvestres (*wild type*; WT) las pilinas se mantienen en la membrana interna y luego se ensamblan en la fibra del T4P por su base, probablemente con la ayuda de ATPasas (Capeness *et al.*, 2013; Craig *et al.*, 2019). El equilibrio de interacción entre Bd0108 y Bd0109 en el periplasma permite la extrusión/retracción controlada del T4P con éxito frente a señales ambientales. Un *pilus* completamente funcional activa los genes de depredación tras entrar en la presa (Capeness *et al.*, 2013).

En los casos en que Bd0108 está truncado, como ocurre con la delección de 42 pb comúnmente observada en los mutantes HI, la interacción entre Bd0108 y Bd0109 es más intensa que la observada en el WT. Esto reduce la frecuencia con la que Bd0109 y T4P interactúan, lo que da como resultado T4P extruidos más largos que los WT. Aunque el T4P esté presente, la falta de retracción señala la expresión de genes involucrados en el crecimiento HI (Capeness *et al.*, 2013).

Pero ¿por qué el equilibrio entre la extrusión y retracción del T4P permite a la célula distinguir entre los modos de crecimiento HD y HI? Capeness *et al.* (2013) hipotetizan



que una vía de señalización aún no identificada daría la señal de crecimiento, respondiendo a la concentración de pilinas en el interior de la célula.

Por otro lado, durante la adhesión inicial, *Bdellovibrio* tiene un "periodo de reconocimiento" en el que puede separarse y alejarse nadando antes de adherirse permanentemente y "comprometerse" a la invasión (Harding, 2019).

La unión irreversible de *Bdellovibrio* inicia rápidamente la solubilización de aproximadamente el 10-15% del peptidoglicano de la presa de forma controlada y localizada (Harding, 2019), pues al confinar la maquinaria invasora a una zona de entrada específica, se evita la propagación de los daños y la lisis prematura de la presa (Rotem *et al.*, 2014).

Durante este proceso invasivo, entran en juego dos actividades enzimáticas: una glicanasa y una peptidasa. Mientras que la actividad glicanasa sirve para solubilizar la pared celular de la presa y facilitar la entrada, la actividad peptidasa escinde el ácido diaminopimélico (DAP). El objetivo final de estas dos actividades enzimáticas es abrir el poro de entrada (más estrecho que el propio depredador), por donde *Bdellovibrio* atraviesa con éxito la capa de peptidoglicano (PG) y se instala en el espacio periplásmico (Harding, 2019).

Poco después de que se complete la invasión, la actividad solubilizadora de peptidoglicano de la glicanasa se detiene abruptamente, mientras que la actividad peptidasa continúa escindiendo DAP. La eliminación de DAP anula la reticulación del PG lo que sugiere que es la causa del redondeo de la célula presa y del comienzo de la formación del bdelloplasto (Harding, 2019).

Tras el periodo inicial de escisión del DAP, hay una enzima que lo reincorpora al PG de la presa. Esta actividad ayuda a estabilizar la estructura del bdelloplasto y contribuye al éxito general de la invasión depredadora de *Bdellovibrio* de la presa (Harding, 2019).

Un estudio reciente de Banks *et al.* (2023) reporta el descubrimiento de una nueva lipoproteína lítica transglicosilasa (Bd3285) que *B. bacteriovorus* secreta en el periplasma de una presa en división para escindir el septo, facilitando la conversión de la célula presa en división en un nicho esférico propio del bdelloplasto (Fig. 2).

Otro aspecto importante de la invasión es la forma celular. La morfología bacteriana está conservada evolutivamente y se sabe que confiere ventajas selectivas a diferentes estilos de vida (Banks *et al.*, 2022). En el caso de *B. bacteriovorus*, la curvatura celular vibrioide facilita la invasión. Durante esta etapa, el depredador debe superar las fuerzas físicas que ejercen la pared celular y la membrana de la presa que se oponen a la entrada. Los depredadores curvos pueden distribuir estas fuerzas de forma eficiente y penetrar en la presa con más facilidad que los depredadores en forma de bastón.

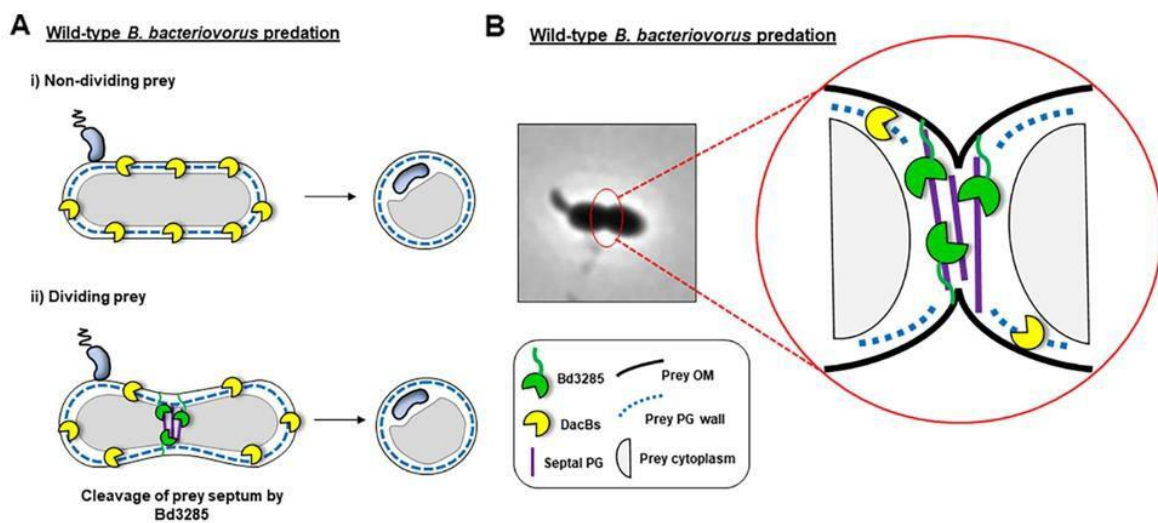


Figura 2. Modelo del mecanismo de acción de la transglicosilasa Bd3285 durante la depredación de *B. bacteriovorus* sobre una presa en división. (Banks *et al.*, 2022). A. (i) presa no replicativa durante la invasión (ii) presa en división durante la invasión. B. Acción de Bd3285 sobre el septo de la presa en división. Esta enzima cataliza la escisión no hidrolítica de los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos entre las moléculas *N*-acetilglucosamina y *N*-actetilmurámico de la pared PG. DacB (DD-carboxipeptidasa) permite el redondeamiento del bdelloplasto (Banks *et al.*, 2022)

Banks *et al.* (2022) identificaron que uno de los factores responsables de la curvatura de *B. bacteriovorus* es la hidrolasa de PG Bd1075. Esta enzima funciona como una LD-carboxipeptidasa, escindiendo la D-alanina terminal de un tetrapéptido PG (compuesto por L-Ala, D-Glu, mesoDap y D-Ala) para generar un tripéptido (compuesto por L-Ala, D-Glu y meso-Dap). De esta forma una reducción localizada de la reticulación de PG podría debilitarlo, haciendo que la célula se deformara ligeramente por la presión de turgencia celular interna, que empuja hacia fuera para generar una curva convexa exterior y, a continuación, pueda ser fijada enzimáticamente (Banks *et al.*, 2022).

Otro mecanismo por el que *Bdellovibrio* consigue mitigar en parte las fuerzas osmóticas de la presa durante la invasión es mediante la función de extrusión/retracción del T4P y poder así introducirse en su interior (Caulton & Lovering, 2020).

Tras el establecimiento en el periplasma, el flagelo no se desprende en la mayoría de casos (80%). Por ello, puede observarse cómo parte del flagelo de *Bdellovibrio* emerge a través de la membrana externa de la célula presa. Es en esta situación en la que la envoltura membranosa del flagelo mencionada anteriormente puede ayudar a su protusión sin comprometer la integridad del bdelloplasto. Por consiguiente, el desprendimiento flagelar no es un componente crucial de la invasión temprana de presas (Lambert *et al.*, 2006).

### **III. Formación del bdelloplasto**

*B. bacteriovorus* utiliza una plétora de enzimas hidrolíticas durante su invasión para transformar la célula presa en un entorno adecuado para el crecimiento y la replicación. Entre estas enzimas se incluyen dos DD-endopeptidasas, Bd0816 y Bd3459, que *Bdellovibrio* secreta en el periplasma de la presa. Allí, catalizan la escisión de los enlaces cruzados de los muropéptidos del PG. El resultado final de esta actividad enzimática es la relajación del PG de la presa, transformando así su morfología bacilar en bdelloplastos esféricos (Harding, 2019).

Para impedir la actividad de sus propias DD-endopeptidasas sobre el PG, *Bdellovibrio* utiliza la proteína anquirina (Bd3460) que puede formar un complejo con Bd3459 y Bd0816 para inhibir su actividad antes de que sean secretadas en la célula presa (Lambert *et al.*, 2015).

A continuación, la acción de las enzimas LD-transpeptidasas, como Bd0886 y Bd1176, añade enlaces cruzados adicionales a estos muropéptidos PG de la presa previamente modificados, formando así un nicho osmóticamente estable, protegido del ataque de fagos, de la fotooxidación y de contaminantes ambientales (Bratanis *et al.*, 2020).

Además, la mayor flexibilidad de la pared celular del bdelloplasto, en comparación con la pared celular de la presa no invadida, tiene un efecto bloqueante sobre la capacidad de invasión de otros bdellovibrios (es decir, evita invasiones posteriores). Esto se debe a la tracción que ejercen los T4P, que se cree que se adhieren a la capa PG. No obstante, bajo una alta multiplicidad de infección, es posible que varias células depredadoras se adhieran y penetren en la presa (Pasternak *et al.*, 2014).

Las GlcNAc-desacetilasas Bd0468 y Bd3279 se secretan en la célula presa e intervienen en la N-desacetilación de los residuos GlcNAc en su pared celular. La desacetilación provoca resistencia a la lisozima, lo que permite estabilizar la estructura del bdelloplasto, así como marcar la pared celular para su destrucción al final del ciclo de vida depredador (Lambert *et al.*, 2016).

Para estabilizar aún más la estructura del bdelloplasto y asegurar el nicho intraperiplásmico, la pared celular de la presa sufre otras modificaciones, como la eliminación de una parte significativa de la lipoproteína Braun (BLP), la fijación de ácidos grasos (acilación) y la reincorporación de DAP.

La BLP se une covalentemente al DAP de la capa de PG. Es responsable del mantenimiento de la integridad estructural de la membrana externa en las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas (Asmar & Collet, 2018). Por tanto, su eliminación causa el deterioro de la integridad estructural de la membrana externa. Se hipotetiza que una enzima con actividad proteasa cataliza la eliminación de la BLP mediante la escisión entre el grupo amino del residuo de lisina C-terminal y el grupo D-carboxilo del DAP (Harding, 2019).

La unión covalente de ácidos grasos de cadena larga al peptidoglicano de la presa, junto con la escisión enzimática de la glucosamina del LPS, aumenta la naturaleza hidrofóbica del bdelloplasto. Este hecho permite estabilizar la membrana externa, que sirve entonces de barrera protectora contra la presión osmótica (Rotem *et al.*, 2014).

Además, los ácidos grasos pueden asociarse a los fosfolípidos de la membrana externa y actuar como estabilizadores, compensando la eliminación de la BLP (Harding, 2019).

Durante el establecimiento del bdelloplasto, la capacidad respiratoria disminuye rápidamente debido a los daños sufridos en la membrana citoplasmática y la célula presa muere (Bratanis *et al.*, 2020). Asimismo, la síntesis del ADN de la presa se detiene y su membrana plasmática se vuelve permeable a pequeñas moléculas hidrofílicas poco después de la invasión. Como resultado, las moléculas citoplasmáticas se liberan y pueden ser absorbidos por una variedad de transportadores primarios que se encuentran en el genoma de *Bdellovibrio*, que son capaces de transportar azúcares, iones, aminoácidos y ácidos grasos de cadena corta (Harding, 2019).

#### IV. Crecimiento y división

*Bdellovibrio* es extremadamente eficiente en términos energéticos debido a su capacidad para degradar y reciclar las biomoléculas de sus presas (Lambert *et al.*, 2006). Gracias a su amplio arsenal hidrolítico – que consta de 150 proteasas y peptidasas, 10 glicanasas, 20 desoxirribonucleasas, 9 ribonucleasas y 15 lipasas (Dwidar *et al.*, 2012) – aprovechan una amplia variedad de nutrientes, incluyendo nucleótidos, aminoácidos, lípidos, ácidos orgánicos (como el acetato y el  $\alpha$ -cetoglutarato) y polihidroxicanoatos (PHA) para generar ATP a través de una cadena funcional de transporte de electrones (Rotem *et al.*, 2014).

Aunque el genoma de *B. bacteriovorus* contiene todos los genes necesarios para el metabolismo de purinas y pirimidinas, puede prescindir de su síntesis hasta cierto punto ya que incorpora una cantidad importante de ADN (70%) y ARN (20-40%) procedente de sus presas (Rotem *et al.*, 2014).

Durante el crecimiento, la producción y el consumo de energía se mantienen equilibrados. Además, *Bdellovibrio* tiene la capacidad de aumentar su eficiencia energética obteniendo directamente ATP del citoplasma de su presa por un mecanismo que aún se desconoce.

Otra molécula que potencialmente podría vincularse a la vida en el periplasma es el sideróforo aerobactina. Durante los primeros minutos de la fase GP, cuando las condiciones oxidantes dominan en el periplasma, es posible que el hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) soluble de la presa se oxide, haciendo que no esté disponible para el depredador (insoluble). En este caso, la aerobactina podría unirse al ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) y transportarlo a la célula depredadora en crecimiento, permitiéndole adquirir los nutrientes necesarios para sobrevivir (Pasternak *et al.*, 2014).

Además, MreB juega un papel crucial durante el crecimiento, ya que la inhibición de su polimerización da como resultado la detención del crecimiento en las etapas iniciales del desarrollo de bdelloplastos (Fenton *et al.*, 2010).

Durante la GP, *Bdellovibrio* crece desde ambos extremos y forma un filamento alargado. Rápidamente duplica sus cromosomas en múltiples copias que se distribuyen a lo largo de la célula antes de la septación. Este filamento sigue creciendo hasta que se agotan los nutrientes de la célula presa, lo que desencadena la división celular. El filamento se divide

simultáneamente en toda su longitud, produciendo tanto números pares como impares de células hija. El tamaño de la célula presa determina el número de la progenie, que suele ser de 4 a 6 células, ya que las presas más grandes permiten mayor aprovechamiento energético (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 2019).

## V. Maduración y lisis

Una vez completada la división, la progenie tarda unos 30 minutos en madurar y convertirse de nuevo en células AP, durante los cuales se activa la síntesis de nuevos flagelos (M. Capeness, 2015). Una vez maduras, las células móviles AP lisan el bdelloplasto para completar el ciclo. Este proceso requiere una enzima específica que actúe sobre residuos desacetilados del PG. Harding *et al.* (2020) descubrieron que la lisozima DslA, que actúa sobre el peptidoglicano desacetilado, está implicada en la salida de la presa. Las cepas con una deleción del gen *dslA* tardan más en abandonar la presa. Además, la adición exógena de DslA causa la liberación prematura de *B. bacteriovorus*. Tras la lisis del bdelloplasto, las células AP nadadoras libres se embarcan en la búsqueda de nuevas presas para comenzar de nuevo el ciclo de depredación.

### 3.2. Dependiente de hospedador (HD): invasión epibiótica

En la estrategia epibiótica, el depredador permanece adherido a la pared celular de la presa, consumiéndola externamente sin penetrar en la célula (Pasternak *et al.*, 2014). Algunos depredadores como *Vampirococcus* y *Vampirovibrio* utilizan esta estrategia, al igual que *Micavibrio aeruginosavorus* y *Bdellovibrio exovor* del grupo BALO (Bratanis *et al.*, 2020).

En conjunto, las diferencias entre los depredadores epibióticos y periplásmicos son enormes y pueden atribuirse al modo de depredación, el método de división celular (fisión binaria vs división no binaria), la capacidad de vivir en ausencia de un hospedador, el tamaño del genoma y del proteoma (Pasternak *et al.*, 2014).

La filogenia de los depredadores epibióticos sugiere que evolucionaron por convergencia: *M. aeruginosavorus* se originó a partir de un ancestro no depredador, mientras que *B. exovor* evolucionó a partir de depredadores periplásmicos por pérdida de genes (Pasternak *et al.*, 2014).

### 3.3. Independiente de hospedador (HI)

*B. bacteriovorus* puede crecer independientemente del hospedador (HI) en un entorno rico en nutrientes debido a mutaciones espontáneas en *bd0108* (HI tipo I) y *rhlB* o *pcnB* (HI tipo II). *Bd0108* participa en interacciones con la maquinaria del *pilus* tipo IVa, mientras que *RhlB* y *PcnB* son componentes del degradadosoma de ARN. Los mutantes HI de tipo I pueden crecer en un medio rico suplementado con extracto de presa y los HI de tipo II pueden crecer sin la necesidad de extracto de presa. Las células HI muestran cambios desregulados entre las fases AP y GP, así como cambios en los patrones de expresión de genes y proteínas. Sin embargo, mantienen los rasgos típicos de GP, incluyendo el crecimiento filamentoso y polinucleoide (Rotem *et al.*, 2016).

En cuanto a diferencias morfológicas, las células HI son generalmente más grandes (0,3-0,4  $\mu\text{m}$  x 1,0-10,0  $\mu\text{m}$ ) y menos móviles que las células HD. Aunque la mayoría de las células HI pueden depredar, lo hacen a un ritmo reducido (Bratanis *et al.*, 2020). Sin embargo, transferencias secuenciales en medio completo sin presas conducen a la pérdida de la capacidad depredadora. Las células HI pueden tener múltiples flagelos, pero no siempre se corresponden con la motilidad y pueden estar en diferentes posiciones.

## 4. Dinámica de la replicación cromosómica y regulación de la expresión génica

El reciente estudio de Płaskowska *et al.* (2023) muestra que *B. bacteriovorus* exhibe un modo singular de reproducción mediante fisión binaria y no-binaria cuya elección depende del tamaño de la presa. En bacterias pequeñas como *Proteus mirabilis* (longitud celular  $< 2 \mu\text{m}$ ), *B. bacteriovorus* experimenta una fisión binaria con ensamblaje de anillos FtsZ en la mitad de la célula, lo que da lugar a dos células hijas. Cuando depreda organismos de mayor tamaño (longitud celular  $> 2 \mu\text{m}$ ), el filamento de *B. bacteriovorus* sufre un proceso de división que no sigue un patrón binario, que da lugar a la producción de un número par o impar de células.

En *B. bacteriovorus* HD, la replicación del cromosoma se produce exclusivamente durante la fase GP, en la que los genes asociados a este evento aumentan su expresión, y comienza generalmente en el polo invasor (94%) (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 2019).

Aunque Zakrzewska-Czerwinska *et al.* (2019) mostraron que tras haberse sintetizado múltiples copias del cromosoma el proceso de septación en *B. bacteriovorus* era sincrónico, Płaskowska *et al.* (2023) revelan que FtsZ se recluta de forma asincrónica en los lugares de división, apareciendo la primera señal antes del final de la síntesis de ADN. Otras señales de reclutamiento de FtsZ aparecen secuencialmente. Por ejemplo, en un filamento que se dividirá en cuatro células, la tercera señal FtsZ sucede 30 min después de la aparición de la primera señal FtsZ.

Según Zakrzewska-Czerwinska *et al.* (2019) el tiempo medio necesario para la replicación cromosómica (desde el ensamblaje del replisoma hasta su desaparición) es de  $144 \pm 26$  minutos. Sin embargo, la replicación de los filamentos que dan lugar a más de dos células hijas concluye en aproximadamente 187 minutos (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 2019). Esto supone que un nuevo ciclo de replicación debe iniciarse antes de que finalice el anterior (Kaljević *et al.*, 2021; Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 2019).

Para sintetizar de dos a tres cromosomas nacientes, *B. bacteriovorus* utiliza el ADN y el ARN de su presa como fuentes directas de nucleótidos. Sin embargo, la síntesis de cromosomas adicionales exige una síntesis *de novo* de nucleótidos, derivados de precursores de carbono y nitrógeno, incluidos los aminoácidos obtenidos a través de la hidrólisis de las proteínas de la presa (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 2019).

En bacterias modelo, y también en *Bdellovibrio*, la segregación cromosómica está regulada por el sistema ParABS formado por las proteínas ParA y ParB. ParB se une a secuencias de ADN similares al centrómero llamadas ParS para formar el complejo nucleoproteico ParBS. ParA es una ATPasa que se dimeriza y reconoce al ADN de forma inespecífica en presencia de ATP. La interacción entre ParA-ATP y el complejo ParBS activa la actividad ATPasa de ParA facilitando la segregación cromosómica. El ParA-ADP puede entonces ser fosforilado y se unirá de nuevo al ADN. Esto permite que el ParBS se mueva unidireccionalmente a lo largo de un gradiente de concentración de ParA-ATP (Kaljević *et al.*, 2021)

Curiosamente, las células que invaden rápidamente nuevas presas tras ser liberadas del bdelloplasto inician la replicación mucho antes que en células depredadoras de vida libre que tardaron más en invadir a otras células (23 min frente a 74 min) (Zakrzewska-



Czerwinska *et al.*, 2019). Es posible que las proteínas implicadas en la replicación cromosómica, como la proteína iniciadora de la replicación DnaA, no se degraden completamente en las células de *B. bacteriovorus* que experimentan una replicación temprana.

Tras la finalización de la replicación, el filamento multinucleoide de *B. bacteriovorus* sufre septación múltiple para garantizar que cada nueva célula depredadora reciba una única copia cromosómica. El proceso de septación del filamento tarda unos 40 minutos en completarse, independientemente del número de células hija que se produzcan (Zakrzewska-Czerwinska *et al.*, 2019).

#### **4.1. Coordinación espaciotemporal de la división celular no binaria**

En bacterias modelo, el control espaciotemporal de la división celular se logra mediante reguladores negativos, como el sistema Min y los factores de oclusión de nucleoides (Rowlett & Margolin, 2015). El primero impide la formación del septo en los polos celulares, mientras que el último evita su formación hasta que se haya replicado el cromosoma. Además, existen reguladores positivos que promueven la formación del septo reclutando a FtsZ (Rowlett & Margolin, 2015). Sin embargo, en el genoma de *B. bacteriovorus* no se han identificado genes homólogos de reguladores negativos, lo que sugiere la posible existencia de reguladores desconocidos implicados en el control de la división celular.

Según la revisión de Laloux (2020), la división celular se inicia por el agotamiento de un factor procedente de la presa o por la acumulación de un compuesto liberado por *B. bacteriovorus* a medida que crece. Esta conclusión se ve respaldada por varios hallazgos. Por ejemplo, cuando una misma presa es invadida simultáneamente por dos depredadores, ambos se dividen al mismo tiempo, aunque produzcan un número diferente de células hijas. Esto implica que la división no depende únicamente del número de la progenie, sino más bien de una señal procedente de la presa que puede ser percibida por ambas células depredadoras.

Además, investigaciones anteriores han establecido un vínculo entre el tamaño de la presa y la longitud del filamento del depredador, lo que refuerza la idea de que la disponibilidad de nutrientes rige el crecimiento y el momento de la división.

## 4.2. Establecimiento de la polaridad celular

Tras la septación, las células hijas deben establecer su polaridad. En la división no-binaria, algunas células hijas adquieren dos polos nuevos en lugar de heredar un polo antiguo de la célula madre como ocurre en la fisión binaria. Esto plantea la cuestión de cómo y cuándo se establece la polaridad en la progenie, en la que uno de los polos es el invasivo, con el T4P, y otro el polo flagelado (Laloux, 2020).

Para determinar la identidad de los polos celulares, existen grupos de proteínas y complejos de señalización específicos conocidos como centros polares o *polar hubs*. El genoma de *B. bacteriovorus* contiene información para codificar DivIVA y un homólogo de la bactofilina, lo que sugiere que podrían ser posibles candidatos para establecer o mantener la polaridad celular (Laloux, 2020).

Milner *et al.* (2020) proponen que *B. bacteriovorus* utiliza una vía de señalización en la que está implicada DivIVA, junto con un homólogo de ParA y proteínas sensoras del contenido nutricional y del estado oxidativo de la célula presa. Esto ayuda a definir las proporciones en el momento en el que los recursos de la célula presa se han agotado.

DivIVA se ha caracterizado por tener diversas funciones, desde la regulación de la septación hasta el crecimiento de los polos celulares, principalmente en bacterias Gram-positivas. En *B. bacteriovorus* existe un homólogo de DivIVA codificado por *bd0464* (DivIVA<sub>Bd</sub>) que se expresa constitutivamente y se localiza en ambos polos durante el crecimiento del depredador. Esto sugiere que DivIVA<sub>Bd</sub> podría coordinar el posicionamiento del septo durante la replicación, dando lugar a una funcionalidad similar a MinC y MinD, que no están presentes en *B. bacteriovorus* (Milner *et al.*, 2020).

Además, DivIVA<sub>Bd</sub> interacciona con proteínas sensoras de señales metabólicas relacionadas con cambios en el estado redox o la biosíntesis de aminoácidos. Estas señales podrían ser importantes indicadores para el depredador, señalando el consumo de oxígeno y nutrientes de la presa dentro del bdelloplasto. Entre los candidatos se encuentran Bd0548, una proteína citoplasmática asociada con la síntesis de una menaquinona que permitir el transporte de electrones en condiciones anaeróbicas; Bd2106 y Bd2107, asociadas con la remodelación de los componentes de transporte de electrones, como las proteínas Fe-S y los citocromos, a medida que disminuye la concentración de oxígeno en el bdelloplasto; y Bd3538, un homólogo de TrmJ, como

una posible proteína de respuesta al estrés oxidativo (Milner *et al.*, 2020).

Por otro lado, ParA, una proteína responsable de la segregación cromosómica, también está involucrada en la septación en muchas especies. *B. bacteriovorus* posee tres homólogos de ParA (ParA1, ParA2 y ParA3). ParA3 está asociado al proceso de división celular junto con DivIVA y además se coexpresa junto a ParB. ParA1 y ParA2 no son esenciales en la división celular, pero ParA2 interviene en la motilidad tipo *gliding*. La interacción entre ParB y la proteína citoesquelética bactofilina frena la maquinaria de segregación cromosómica cerca de los polos. Esta interacción puede contribuir a la coordinación de la segregación cromosómica durante la división (Milner *et al.*, 2020).

### 4.3. Expresión diferencial de genes en las AP y GP

La gran mayoría de los genes de *B. bacteriovorus* muestran una expresión diferencial entre las fases AP, TP y GP (Karunker *et al.*, 2013), sin embargo, aún no se conocen bien los mecanismos moleculares a nivel génico que desencadenan la importante transición de los fenotipos AP a GP de *Bdellovibrio*. Los experimentos recientes de Tsao *et al.* (2022) demuestran la existencia de secuencias ricas en guanina en el genoma de *Bdellovibrio* que pueden formar cuádruplex de ADN (o G4) *in vivo*. Este hallazgo sugiere que los G4 podrían desempeñar un papel en la regulación de la expresión génica durante el ciclo de vida de *B. bacteriovorus*. Adicionalmente, los datos transcriptómicos muestran que los genes ubicados cerca de estas secuencias ricas en guanina no se activan o desactivan al unísono durante las mismas fases del ciclo de vida, lo que respalda aún más esta idea.

Otro punto importante en la regulación de la expresión génica es el factor de transcripción FliA ( $\sigma_{28}$ ). En la mayoría de bacterias, los genes regulados por FliA no están relacionados con el ciclo celular. Sin embargo, en *B. bacteriovorus* FliA actúa como regulador maestro de la AP, controlando la transcripción de, aproximadamente, el 77% de los genes de esta fase (Avidan *et al.*, 2017). La transcripción del resto de genes AP son probablemente controlados por factores sigma adicionales, como RpoE (Bd3314) (Lambert *et al.*, 2012). En este caso, RpoE no es esencial para la depredación, pero sí afecta a su eficiencia. Los mutantes *fliA*<sup>-</sup> resultan ser letales tanto en las células HD como HI. Esto sugiere que FliA desempeña un papel crucial en la regulación de procesos celulares vitales, fenómeno que no se observa en otras especies bacterianas.

Por tanto, la regulación de FliA es necesaria para la progresión del ciclo (Avidan *et al.*, 2017).

Las principales funciones de los genes AP están relacionadas con la motilidad, la quimiotaxis, la adhesión y las funciones de la membrana externa, que son esenciales para detectar, adherirse y penetrar en la célula presa. Por otro lado, los genes GP consisten en genes asociados con el crecimiento y la división, incluidas las proteínas ribosómicas y los componentes de la ARN polimerasa. Además, los genes GP abarcan varios genes de transporte y metabolización del peptidoglicano, que probablemente desempeñan un papel en el procesamiento y la internalización de los nutrientes de la presa (Karunker *et al.*, 2013).

Según Karunker *et al.* (2013), el 67% de los genes expresados por *B. bacteriovorus* están activos en GP (1557 genes), el 15% se expresan en AP (353 genes) y el 18% se genes se expresan durante ambas fases. De los genes expresados simultáneamente (18%), 114 eran más dominantes en la fase AP y 66 lo eran en la fase GP. Según este patrón de expresión, los genes se activan en AP o GP, pero no en ambas al mismo tiempo, lo que sugiere que hay una regulación específica de la expresión génica en cada fase del ciclo. De los genes expresados en AP, el 59% codifican proteínas hipotéticas que aún no se conocen y el 41% restante intervienen en la quimiotaxis, motilidad y composición de la superficie celular. Por otro lado, los genes expresados durante la fase GP están involucrados principalmente en la biogénesis de los ribosomas, la división celular, la ADN polimerasa, las proteínas de partición cromosómica y el metabolismo energético.

Además, Karunker *et al.* (2013) descubrieron ocho *Small non-coding RNA* (sRNA) específicos de la fase AP. Tres de estos sRNAs poseen motivos FliA, capaces de reconocer la secuencia consenso de este factor sigma en el ADN, lo que sugiere un papel en la regulación de las funciones específicas de AP. Cabe destacar que uno de los sRNA identificados se expresaba en gran medida durante AP y contenía un *riboswitch* de c-di-GMP (diguanilato cíclico). Este tipo específico de sRNA se denominan merRNA (*massively expressed riboswitch*).

El *riboswitch* c-di-GMP posee un aptámero con gran afinidad por el c-di-GMP. Cuando el merRNA se sobreexpresa en la célula, el *riboswitch* actúa como un reservorio de c-di-GMP durante la fase AP (Rotem *et al.*, 2016). Esto podría significar que el merRNA desempeña un papel en la transición de la fase AP a la GP. Es posible que los cambios en el entorno celular provocados por la adhesión a la presa, como los cambios en un metabolito específico o en el nivel de pH, provoquen cambios estructurales o la

descomposición del merRNA. Esto liberaría una gran cantidad de c-di-GMP en la célula que podría entonces controlar rápidamente la transición de la forma atacante y móvil (AP) a una forma no móvil en crecimiento (GP) (Karunker *et al.*, 2013). Sin embargo, esta hipótesis aún debe demostrarse.

Es tentador pensar que los componentes RhlB o PcnB del degradasoma puedan tener la función de escindir/modificar la estructura del merRNA, promoviendo así la liberación del c-di-GMP y, en consecuencia, la transición de la AP a la GP. Esto se ve respaldado por las mutaciones espontáneas en los genes *rhlB* o *pcnB* que inducen la aparición de mutantes HI tipo II y, por tanto, células que se mantienen permanentemente en AP (con elevada concentración de merRNA). Por ahora, conocemos que el degradasoma desempeña un papel importante en el procesamiento del rRNA y en la degradación del mRNA (Górna *et al.*, 2012). Aunque se desconoce si el degradasoma puede degradar directamente los riboswitches, se ha observado que la RNasa E, un componente del degradasoma de *E. coli*, puede escindir parte del riboswitch unido a su ligando de forma independiente – es decir, sin formar parte del complejo multiproteico – (J. Richards & Belasco, 2021). Es importante mencionar que la composición del degradasoma varía ampliamente en las proteobacterias (Carpousis, 2007), y aún se desconoce si el degradasoma de *Bdellovibrio* desempeña esta función propuesta.

## **5. Señalización celular y regulación de la depredación: importancia del c-di-GMP**

El diguanilato cíclico (c-di-GMP) es un segundo mensajero que juega un papel crucial en el control de una amplia gama de funciones bacterianas como el cambio en el estilo de vida de células móviles e independientes a la formación de biopelículas (Hobley *et al.*, 2012). En el caso de las bacterias depredadoras, la maquinaria del c-di-GMP es esencial tanto para la fase de invasión de la presa como para el escape de las células hijas al final del ciclo replicativo del depredador (Rotem *et al.*, 2015).

### **5.1. Control de las funciones celulares durante el crecimiento HD**

El c-di-GMP se sintetiza por enzimas de la familia diguanilato ciclasa (DGC) con dominios GGDEF y se degrada por fosfodiesterasas con dominios EAL o HD-GYP. El c-di-GMP actúa celularmente mediante su interacción con diferentes proteínas efectoras (Hobley *et al.*, 2012).

Uno de los efectores más frecuentes son las proteínas que contienen un dominio PilZ, esencial para la biogénesis del *pili* tipo IV (Hobley *et al.*, 2012).

Sin embargo, existen algunas DGC, conocidas como GGDEF híbridas promiscuas (Hypr), que son capaces de sintetizar GMP-AMP cíclico (cGAMP) en lugar de c-di-GMP, o ambos segundos mensajeros (Rangarajan & Waters, 2022). Recientemente se ha descubierto la proteína Bd0367 con actividad Hypr GGDEF, que sintetiza tanto cGAMP como c-di-GMP (Lowry *et al.*, 2022). Estos segundos mensajeros intervienen en la regulación de dos mecanismos de motilidad diferentes (Fig. 3): el deslizamiento (*gliding*) y la motilidad natatoria (*swimming*), respectivamente, ambos necesarios para que la bacteria complete con éxito su ciclo de vida. Tras la lisis del bdelloplasto, *B. bacteriovorus* utiliza la motilidad flagelar para salir de sus presas en medios líquidos y el *gliding* para abandonarlas en superficies sólidas, entrando así en AP.

Por otro lado, la invasión y el crecimiento de *B. bacteriovorus* también están regulados por DGCs (DgcA-D). DgcA (Bd0367) y DgcB (Bd0742) son cruciales para el modo de vida depredador, mientras que DgcC (Bd1434) es esencial para el crecimiento HI (Rotem *et al.*, 2016). Aún no se conocen todos los mecanismos a través de los cuales estas proteínas Dgc ejercen sus diversas funciones.

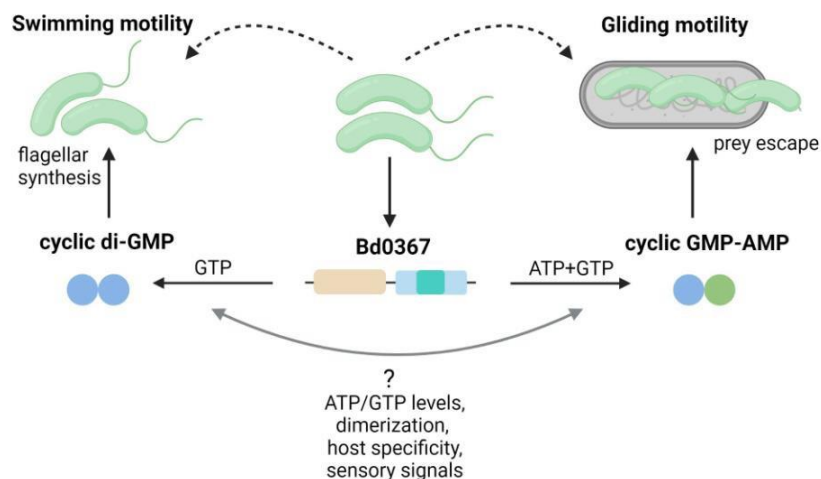


Figura 3. Bd0367 en *B. bacteriovorus* tiene doble función, sintetizando cGAMP y c-di-GMP para regular el deslizamiento y la motilidad natatoria, respectivamente. Sin embargo, no está claro qué señales desencadenan la síntesis de estos segundos mensajeros. (Rangarajan & Waters, 2022)

El inicio de la invasión de la presa está controlado por DgcB. Estructuralmente, está constituida por los dominios GGDEF y FHA formando un dímero. El dominio FHA es un sensor fosfopéptido consenso, y el ligando para la activación se deriva de la región

N-terminal de la propia DgcB. Sin embargo, el estímulo que activa DgcB y permite la síntesis de c-di-GMP para la señalización de la invasión se desconoce. Cuando se alcanza un umbral máximo, DgcB se inhibe a través de retroalimentación negativa mediada por el sitio I (región inhibitoria del dominio GGDEF) (Meek *et al.*, 2019).

DgcB controla la invasión de la presa junto con CdgA (Bd3125), un DGC inactivo, que facilita la rápida penetración de la presa y tal vez sea activado por una proteína reguladora situada en el extremo de invasión de la presa. Cabe destacar que una proteína con dominio PilZ (Bd1482) podría recibir señales de DgcA para facilitar la motilidad tipo *gliding* (Rotem *et al.*, 2016).

## 5.2. Control del cambio de fases: de AP a GP

Rotem *et al.* (2015) propusieron un modelo que describe las posibles vías reguladoras que intervienen en el comportamiento depredador de *B. bacteriovorus* (Fig 4).

Asimismo, los trabajos de Avidan *et al.* (2017) y Capeness *et al.* (2013) completan este modelo mostrando cómo las interacciones entre Bd0108 y Bd0109 regulan la extrusión/retracción del T4P que resulta en el envío de una señal de crecimiento.

*B. bacteriovorus* HD debe diferenciar entre células presa y no presa y determinar la disponibilidad de nutrientes para que la depredación sea efectiva. Estos puntos de control están marcados por dos señales separadas espacial y temporalmente.

La primera señal está presente en la membrana plasmática de la presa, mientras que la segunda señal se localiza más tarde en el citoplasma. Estas señales, tienen efectos distintos en la regulación de la transcripción genética que definen la transición entre AP y GP (Rotem *et al.*, 2015).

Durante la fase AP, las vías de señalización implicadas en la recepción de las señales temprana y tardía están inhibidas. La señal inicial, que se transmite a través de membrana plasmática mediante el T4P, está inhibida por Bd0108 (una proteína implicada en la extrusión/retracción del T4P). La segunda señal se transduce a través de una vía de señalización posterior que utiliza un receptor no identificado. Esta vía es suprimida por las subunidades RhlB o PcnB del degradosoma de ARN. Las células AP expresan un perfil transcripcional “por defecto” en el que el merRNA se transcribe masivamente y se expresan el factor  $\sigma_{28}$  (FliA) y bd0108, pero no se expresan los genes responsables de la formación de bdelloplastos y GP. (Fig 4. A1, A2).

Cuando una célula AP se une de forma estable con la célula presa, percibe la primera señal presente en la membrana plasmática. Esta detección reduce la inhibición de Bd0108 y altera el estado de extrusión/retracción del T4P. Esta alteración conduce al inicio de la transducción de señales. CdgA, un efector de di-GMP cíclico, es esencial para la invasión eficiente de la célula presa, e interactúa con el complejo proteico regulador del *pilus*, facilitando potencialmente este proceso. Mientras tanto, la señal tardía se mantiene inactiva (Fig 4. B1, B2).

Una vez que se produce la detección temprana, el perfil transcripcional cambia de un programa AP a un programa de reconocimiento, lo que caracteriza la fase de transición AP-GP. La represión parcial de *merRNA*, que induce la liberación de c-di-GMP, y el silenciamiento completo de *bd0108* son indicativos de este cambio. A su vez, se activan los genes GP tempranos que permiten la penetración y la formación de bdelloplastos, así como la expresión de funciones relacionadas con el crecimiento. A pesar de este cambio, el regulador FliA permanece activo (Fig 4. B1, B2).

En este punto, la célula depredadora aún no se ha comprometido totalmente a entrar en el GP y todavía tiene un aspecto morfológico similar al de una célula AP. Esta fase transitoria puede durar hasta una hora, que es el tiempo que transcurre entre la entrada de la presa y el inicio del crecimiento. Durante esta fase, la membrana citoplasmática del bdelloplasto se vuelve totalmente permeable a las moléculas pequeñas.

La liberación de la segunda señal desde el citosol de la presa al periplasma del bdelloplasto es necesaria para que la célula depredadora avance hacia la GP. La detección simultánea de ambas señales mientras la célula está adherida a la membrana citoplasmática provoca el silenciamiento de FliA y de los genes de formación del bdelloplasto, el silenciamiento completo del *merRNA* y un aumento de la expresión de los genes GP, lo que da lugar a una célula GP completamente formada (Fig 4. C1, C2).



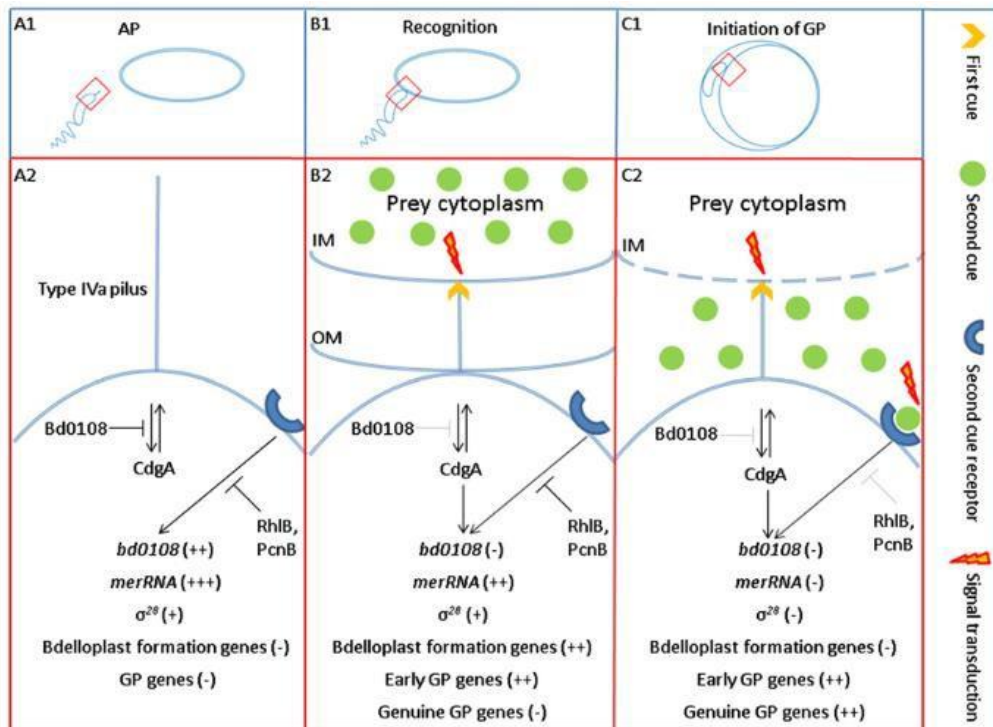


Figura 4. Representación esquemática del perfil de expresión génica conocida de *B. bacteriovorus* durante el crecimiento HD en las diferentes fases del ciclo. (A1) Búsqueda de una presa. (A2) La transducción de señales temprana es inhibida por Bd0108 y la transducción de señales tardía es reprimida por las subunidades del degradosoma de ARN RhlB o PcnB. (B1) Adhesión y reconocimiento de la célula AP la presa. (B2) El reconocimiento se logra después de detectar la primera señal en la membrana citoplásmica. Como resultado, se atenúa la inhibición por Bd0108, lo que desencadena la transducción de señales. La detección temprana induce el programa transcripcional de reconocimiento de la presa: *bd0108* está completamente silenciado y los genes de formación de bdelloplast y los genes GP tempranos son inducidos. (C1) Inicio de la GP dentro del bdelloplasto. (C2) La perforación de la membrana citoplásmica libera la segunda señal del citosol y promueve la alteración del perfil transcripcional al programa GP en el que todos los genes AP activos y los genes de formación de bdelloplast reducen su expresión y se inducen genes GP para permitir la replicación de ADN y el crecimiento.. (Rotem *et al.*, 2016)

La segunda señal liberada por la presa es importante para determinar si hay suficientes nutrientes presentes en el entorno citoplasmático del bdelloplasto para sostener el crecimiento, pero no contribuye directamente a la nutrición. El efecto promotor del crecimiento de la segunda señal depende de su concentración (Rotem *et al.*, 2016). Esto podría explicar por qué algunas células de *B. bacteriovorus*, aunque pocas, necesitan una segunda presa para completar su ciclo de vida, fenómeno observado por Zakrzewska-Czerwinska *et al.* (2019).

## 6. Aplicaciones de *Bdellovibrio* y BALO

Recientemente, *Bdellovibrio* y BALO han despertado un creciente interés por sus posibles aplicaciones en diferentes campos (industria, agricultura, sanidad) debido a su interesante ciclo de vida y a su capacidad para eliminar bacterias patógenas o indeseables. En este apartado se revisarán algunas de las aplicaciones potenciales más importantes de estos microorganismos depredadores.

### 6.1. Agente terapéutico

Debido a su baja inmunogenicidad junto con la rareza y transitoriedad de la resistencia de las presas a su ataque, *B. bacteriovorus* puede representar una alternativa válida a los antibióticos en el tratamiento de patógenos multirresistentes (Marine *et al.*, 2020).

Además, Willis *et al.*, (2016) han demostrado que *Bdellovibrio* coopera junto con el sistema inmunitario del hospedador de forma sinérgica (en este caso pez cebra, *Danio rerio*) para acabar con una cepa resistente a antibióticos del patógeno humano *Shigella flexneri*. También, la eficiencia de depredación de *B. bacteriovorus* no se ve afectado por la presencia de bacterias Gram-positivas (Waso-Reyneke *et al.*, 2022). Esto es significativo pues podría usarse en comunidades bacterianas para eliminar específicamente Gram-negativas.

#### 6.1.1. Tratamiento de infecciones bacterianas en humanos y en animales

En la actualidad, las bacterias patógenas que causan infecciones están desarrollando resistencia a los antibióticos tradicionales. Muchas de ellas adquieren resistencias a través de la transmisión horizontal de genes y se conocen como bacterias multirresistentes o MDR (*Multidrug-resistant*).

Además, las infecciones nosocomiales causadas por patógenos del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) son particularmente preocupantes ya que su tratamiento representa un gran desafío en la práctica clínica (Pérez *et al.*, 2020). Por lo tanto, surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamiento. Una propuesta es utilizar bacterias depredadoras como “antibióticos vivos”.

El notable potencial de *Bdellovibrio* para aplicaciones terapéuticas se deriva de su capacidad para eludir las fuertes reacciones inflamatorias típicamente asociadas a las

infecciones bacterianas. Esto puede atribuirse a una serie de características únicas que presentan los lipopolisacáridos (LPS) de *Bdellovibrio* y que lo distinguen de otros patógenos. En particular, el lípido A de los LPS de *Bdellovibrio* comprende residuos de  $\alpha$ -D-manosa en lugar de los grupos fosfato convencionales, lo cual los hace carecer de grupos cargados negativamente. Este rasgo distintivo confiere a *Bdellovibrio* una afinidad de unión significativamente menor a los receptores de LPS presentes en células humanas, mitigando así su actividad endotóxica en comparación con patógenos Gram-negativos. La validez de esta afirmación está respaldada por la producción atenuada de citoquinas inflamatorias clave, concretamente TNF- $\alpha$  e IL-6, en macrófagos humanos cuando se enfrentan a estas bacterias (Schwudke *et al.*, 2003).

Aunque la depredación de *Bdellovibrio* está limitada en cuanto al rango de presas que puede atacar (sólo cepas Gram-negativas), excepcionalmente puede impedir la formación de biopelículas de *S. aureus* y combatir las ya existentes mediante su arsenal de enzimas hidrolíticas (Im *et al.*, 2018; Monnappa *et al.*, 2014). Si bien es cierto que dichas cepas son capaces de expresar proteasas en cantidades óptimas para efectuar la degradación enzimática de las biopelículas de *S. aureus*, es importante reconocer que su uso podría tener efectos negativos para el microambiente tisular contiguo.

No obstante, el uso terapéutico de *Bdellovibrio* supone ciertos problemas de eficacia cuando se utilizan para tratar infecciones de patógenos específicos, por ejemplo, de *Pseudomonas aeruginosa*. Una investigación reciente del grupo de Hoshiko *et al.* (2021) reveló que la depredación de *E. coli* por *B. bacteriovorus* se inhibió en presencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Estudiaron la posible implicación de los mecanismos de *quorum sensing* con la inhibición de la depredación. Los resultados mostraron que el sistema PQS (*Pseudomonas Quinolone Signal*) en *P. aeruginosa* activó una reacción defensiva contra *B. bacteriovorus* mediante la producción de compuestos de quinolona, en particular 4-hidroxi-2-heptilquinolina (HHQ).

Otro problema lo supone el modo respiratorio de *Bdellovibrio*. Es una bacteria aerobia estricta, lo que puede restringir su aplicación potencial en microambientes del cuerpo humano con limitaciones de oxígeno, como el intestino (Dwidar *et al.*, 2012). Sin embargo, el uso de cepas como la HD100 permitiría su supervivencia en condiciones microaerófilas debido a la presencia de genes para la enzima citocromo c oxidasa que tiene una mayor afinidad por el oxígeno (Socket & Lambert, 2004).

### 6.1.2. Mecanismos de resistencia de la presa frente a *Bdellovibrio*

Varias investigaciones (Sockett & Lambert, 2004; Shemesh & Jurkevitch, 2004) han demostrado que la resistencia a la depredación es una respuesta fenotípica plástica, en lugar de ser el resultado de mutaciones y selección natural. Esto, desde el punto de vista de la supervivencia de *Bdellovibrio*, puede suponer una estrategia útil y eficaz, ya que erradicar por completo la fuente de nutrientes podría resultar catastrófico para un depredador bacteriano que depende de replicarse dentro de la célula presa (Capeness, 2015).

Para comprender la forma en que las bacterias eluden la depredación en ciertas ocasiones, es necesario examinar los múltiples mecanismos en juego: (i) Aunque el LPS de la superficie de la célula presa puede ser un factor importante, se ha observado que mutantes "rugosos" (aquellos que producen una capa LPS defectuosa) de *E. coli* y *Salmonella spp.* pueden ser depredados con éxito, lo que sugiere que otros factores también influyen en el proceso (Fig. 5a); (ii) Además, las cápsulas bacterianas pueden dificultar el acceso total de *Bdellovibrio* a la célula presa, aunque esto no siempre ocurre (Fig. 5b); (iii) Finalmente, la capa S, una estructura extracelular de proteínas o glicoproteínas, puede dificultar el reconocimiento de la presa, lo que hace que la depredación sea menos eficaz y requiera buscar discontinuidades en la capa S (Fig. 5c) (Koval y Hynes, 1991).

En general, el proceso de invasión de *Bdellovibrio* es complejo y dinámico, con muchos factores en juego que pueden afectar a la eficacia de la depredación.

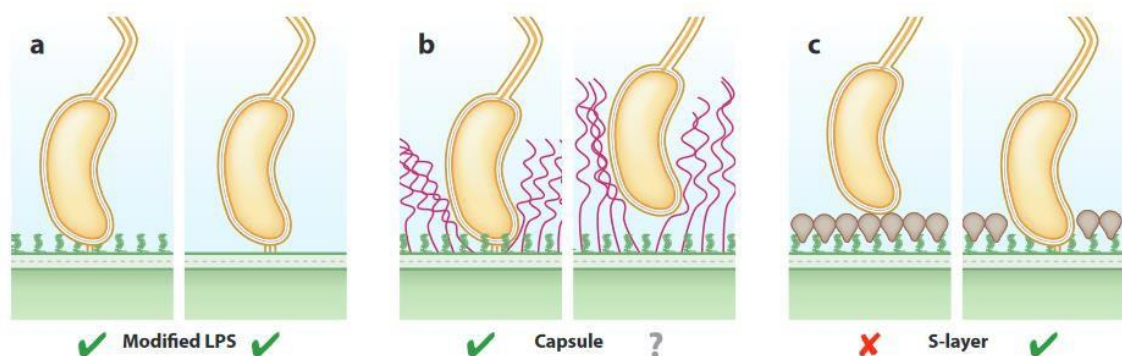


Figura 5. (a) *B. bacteriovorus* se adhiere a bacterias gramnegativas con/sin antígeno LPS O (izquierda/derecha). (b) *B. bacteriovorus* se adhiere a bacterias con cápsula. Las cápsulas de *E. coli* no bloquean la depredación (izquierda), pero se desconocen los efectos de otras cápsulas (derecha). (c) *B. bacteriovorus* se adhiere a bacterias con una capa S sólo donde está incompleta (derecha), por lo que la depredación es menos eficiente en presas con capa S.

### 6.1.3. Resistencia frente a antibióticos y terapia combinatoria

La estrategia de integrar la naturaleza depredadora de *B. bacteriovorus* con el uso de antibióticos presenta una opción viable para impulsar la potencia terapéutica de los tratamientos existentes (Marine & Pos, 2020). Sin embargo, primero hay que comprender mejor la capacidad intrínseca de *B. bacteriovorus* para resistir los efectos de los antimicrobianos y los antibióticos.

Im *et al.* (2017) realizaron un estudio en el que exploraron la eficacia del uso de *B. bacteriovorus* en combinación con violaceína, un antimicrobiano con actividad contra bacterias Gram-positivas, para tratar poblaciones de patógenos MDR heterogéneos. Concluyeron que el tratamiento combinado es más eficaz, frente al uso de los agentes individuales de forma aislada (*B. bacteriovorus* o la violaceína).

Por otro lado, los resultados derivados de los experimentos de Marine *et al.* (2020) revelan que la trimetoprima es el antibiótico con menor efecto sobre *B. bacteriovorus* de entre todos los probados en el estudio. Además, concluyeron que el mecanismo de resistencia a la trimetoprima en *B. bacteriovorus* se debe a la baja afinidad de este por la enzima dihidrofolato reductasa (asume una función vital al participar en la síntesis, metilación y reparación del ADN, formando parte del ciclo de ácido fólico).

Aparte de la combinación de bacterias depredadoras junto con antibióticos, la combinación de bacteriófagos y *B. bacteriovorus* también constituye una alternativa terapéutica potencial, tal y como demuestran Hopley *et al.* (2020) Esta terapia combinatoria de depredadores puede tener más potencial que el uso de depredadores individuales porque los cambios en la superficie de la presa seleccionados por un depredador no protegen a la presa contra el otro depredador.

## 6.2. Agente de biocontrol

Además de su posible uso clínico, el empleo de BALOs en áreas como la industria alimentaria o la gestión de aguas residuales tiene importantes implicaciones económicas y ecológicas (Jurkevitch, 2020; Reyneke *et al.*, 2020). Algunas de las enfermedades y causas de mortalidad por patógenos más frecuentes en los seres humanos son causadas por bacterias presentes en los alimentos y el agua, como *E. coli* enterohemorrágica, *Salmonella spp.*, *Campylobacter* y *Listeria monocytogenes* (World Health Organization (WHO)). Además, otros patógenos como *Pectobacterium* y *Pseudomonas spp.* pueden

provocar pérdidas de cosechas y fitopatologías (Aizawa, 2014). El control de estas bacterias es un desafío debido a la escasez de productos bactericidas disponibles y las regulaciones que limitan el uso de antibióticos (*World Health Organization (WHO)*). Por lo tanto, se valora el uso potencial de BALO como alternativa para controlar estos patógenos.

### **6.2.1. Control de la transferencia horizontal de genes**

La resistencia a antibióticos (AMR) es un grave problema mundial que supone una amenaza para la salud pública. Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) se han identificado como focos de aparición y transmisión de AMR a través de la presión selectiva y la transferencia horizontal de genes (HGT) (Zhang *et al.*, 2018). No obstante, a pesar de la eliminación de la mayoría de bacterias durante la depuración de aguas tradicional, todavía se pueden detectar genes de resistencia a los antibióticos (ARG). Por ello, se ha sugerido el uso de bacterias depredadoras para regular la propagación de ARG. Se ha demostrado que *B. bacteriovorus* puede eliminar eficazmente cepas bacterianas recombinantes presentes en medios acuosos y en el suelo, gracias a su capacidad de degradar casi por completo el ADN de sus presas. A su vez, esto ayuda a reducir la HGT y las reservas de ARG, lo que resulta especialmente beneficioso en entornos donde la densidad de presas es alta, como en las EDAR (Bratanis *et al.*, 2020).

Las poblaciones de bacterias resistentes a antibióticos pueden propagar ARG a través de eventos de conjugación, transformación y transducción. Así, los mecanismos empleados por los BALO para reducir la frecuencia de este fenómeno consisten en la depredación de células bacterianas (limitando la conjugación), la degradación nucleolítica del ADN libre de células (limitando la transformación) y la inactivación de partículas de fago a través de proteasas secretadas (limitando la transducción).

### **6.2.2. Producción agropecuaria**

En agricultura, *B. bacteriovorus* se ha utilizado para controlar patógenos como *Pseudomonas glycinea* en la planta de soja y *Burkholderia glumae* en el agua de arrozales y en la rizosfera (Song, 2004). En ambos casos, la frecuencia de depredación sobre bacterias beneficiosas para la planta, como especies de *Sinorhizobium* o fijadores de nitrógeno es muy reducida (Dwidar *et al.*, 2012). Dado que las biopelículas permiten un nivel de supervivencia al ataque por *Bdellovibrio*

superior al observado en células de vida libre (Kadouri & O'Toole, 2005) y la gran cantidad de EPS que producen los rizobios (Sayyed *et al.*, 2011), *Bdellovibrio* requiere poblaciones con alta densidad de células ( $6 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ ) para conseguir depredar sobre rizobios de forma eficaz y rápida (Keya & Alexander, 1975).

En el ámbito de la acuicultura y la cría de animales, también se han reportado casos de éxito en la aplicación de *B. bacteriovorus*, logrando reducir la carga bacteriana en muestras altamente contaminadas por bacterias Gram-negativas y ofreciendo un tratamiento profiláctico contra la contaminación por *Aeromonas hydrophila* en la acuicultura (Damron & Barbier, 2013). Asimismo, en las granjas de animales, la aplicación de *B. bacteriovorus* ha demostrado ser altamente efectiva en el control de *Salmonella* sp. en gallinas, lo que sugiere que existe un enorme potencial en la utilización de estos microorganismos en la mejora de la salud y bienestar animal (Atterbury *et al.*, 2011).

En lo que respecta a la seguridad alimentaria, también se ha evidenciado la utilidad de *Bdellovibrio* en la depredación de patógenos entéricos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes*, lo que los convierte en una posible herramienta de limpieza para equipos de procesamiento de alimentos y la eliminación de biofilms bacterianos (Kazi & Annapure, 2016). Además, se ha demostrado que, en ambientes marinos, estos microbios pueden modular de manera natural el crecimiento de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus* en ostras, enriqueciendo así el potencial de estos seres microscópicos para el cuidado y protección de nuestros alimentos y ecosistemas (Richards *et al.*, 2012).

## 7. Conclusiones

Con todo, comprender los mecanismos moleculares y la organización espaciotemporal del ciclo de vida de *B. bacteriovorus* es importante por dos motivos principales. En primer lugar, desde el punto de vista de la ciencia básica, el método de proliferación único de *B. bacteriovorus*, puede utilizarse para explorar cuestiones biológicas que no son posibles de investigar con organismos modelo procariotas tradicionales. Esto podría conducir a nuevos conocimientos sobre principios funcionales sobre el modo de división o el control del ciclo celular. En segundo lugar, enfocado en la ciencia aplicada, *Bdellovibrio* ha demostrado su potencial como agente eficaz contra bacterias patógenas, y las investigaciones en curso se centran en comprender sus mecanismos de acción.

## 8. Perspectivas futuras

Posibles rutas que se pueden tomar en las investigaciones futuras sobre la biología y aplicaciones de *Bdellovibrio* y BALO incluyen:

1. Explorar e identificar más componentes de la superficie de las presas y sus respectivos roles en la depredación, dado el pobre conocimiento que aún tenemos sobre el reconocimiento y adhesión a las presas.
2. El desarrollo de herramientas genéticas como CRISPR-Cas9, para manipular los genomas de *Bdellovibrio* o riboswitches sintéticos (Dwidar & Yokobayashi, 2017), para controlar la expresión génica, son importantes hacia la ingeniería de bacterias depredadoras enfocadas a casos prácticos. Por ejemplo, para generar cepas resistentes a factores de estrés fisiológicamente relevantes como la temperatura y los péptidos antimicrobianos (Zurick *et al.*, 2023).
3. La investigación de la diversidad de las cepas de *Bdellovibrio* y sus funciones ecológicas en diferentes entornos podría proporcionar información sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas. Las diferentes cepas pueden tener diferentes especificidades y habilidades de depredación, así como diferentes habilidades para sobrevivir en diferentes entornos de presas.
4. El desarrollo de estrategias de aplicación/administración efectivas teniendo en cuenta el patógeno objetivo, la cepa específica de *Bdellovibrio*, la dosis óptima, la formulación farmacéutica y la proporción óptima de tamaño entre depredador y presa para obtener la máxima eficacia (Płaskowska *et al.*, 2023).
5. Explorar el potencial de *Bdellovibrio* para usarse en combinación con otros depredadores microbianos para desarrollar estrategias de depredación más efectivas y específicas. La comprensión de las interacciones y sinergias entre diferentes especies de depredadores podría conducir al desarrollo de enfoques novedosos para controlar los patógenos bacterianos en una variedad de entorno



## 9. Bibliografía

- Aizawa, S.-I. (2014). Chapter 18—Pectobacterium carotovorum—Subpolar Hyper-Flagellation. En S.-I. Aizawa (Ed.), *The Flagellar World* (pp. 58-59). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417234-0.00018-9>
- Asmar, A. T., & Collet, J.-F. (2018). Lpp, the Braun lipoprotein, turns 50—major achievements and remaining issues. *FEMS Microbiology Letters*, 365(18). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny199>
- Atterbury, R. J., Hopley, L., Till, R., Lambert, C., Capeness, M. J., Lerner, T. R., Fenton, A. K., Barrow, P., & Sockett, R. E. (2011). Effects of Orally Administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the Well-Being and Salmonella Colonization of Young Chicks  $\nu$ . *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5794-5803. <https://doi.org/10.1128/AEM.00426-11>
- Avidan, O., Petrenko, M., Becker, R., Beck, S., Linscheid, M., Pietrokovski, S., & Jurkevitch, E. (2017). Identification and Characterization of Differentially-Regulated Type IVb Pilin Genes Necessary for Predation in Obligate Bacterial Predators. *Scientific Reports*, 7(1), 1013. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00951-w>
- Banks, E. J., Lambert, C., Mason, S. S., Tyson, J., Radford, P. M., McLaughlin, C., Lovering, A. L., & Sockett, R. E. (2023). An MltA-Like Lytic Transglycosylase Secreted by *Bdellovibrio bacteriovorus* Cleaves the Prey Septum during Predatory Invasion. *Journal of Bacteriology*, 0(0), e00475-22. <https://doi.org/10.1128/jb.00475-22>
- Banks, E. J., Valdivia-Delgado, M., Biboy, J., Wilson, A., Cadby, I. T., Vollmer, W., Lambert, C., Lovering, A. L., & Sockett, R. E. (2022). Asymmetric peptidoglycan editing generates cell curvature in *Bdellovibrio* predatory bacteria. *Nature Communications*, 13(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29007-y>
- Bratanis, E., Andersson, T., Lood, R., & Bukowska-Faniband, E. (2020). Biotechnological Potential of *Bdellovibrio* and Like Organisms and Their Secreted Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00662>
- Capeness, M. (2015). *Growth switching, motility and application of Bdellovibrio bacteriovorus*. <https://www.semanticscholar.org/paper/Growth-switching%2C-motility-and-application-of-Capeness/1c4f6dabc00d3ae447f4a599d3a3ea7772e92f35>
- Capeness, M. J., Lambert, C., Lovering, A. L., Till, R., Uchida, K., Chaudhuri, R., Alderwick, L. J., Lee, D. J., Swarbreck, D., Liddell, S., Aizawa, S.-I., & Sockett, R. E. (2013). Activity of *Bdellovibrio* Hit Locus Proteins, Bd0108 and Bd0109, Links Type IVa Pilus Extrusion/Retraction Status to Prey-Independent Growth Signalling. *PLoS ONE*, 8(11), e79759. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079759>
- Carpousis, A. J. (2007). The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. *Annual Review of Microbiology*, 61(1), 71–87. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093440>
- Caulton, S. G., & Lovering, A. L. (2020). Bacterial invasion and killing by predatory *Bdellovibrio* primed by predator prey cell recognition and self protection. *Current Opinion in Microbiology*, 56, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.07.002>
- Chanyi, R. M., & Koval, S. F. (2014). Role of Type IV Pili in Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS ONE*, 9(11), e113404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113404>

- Craig, L., Forest, K. T., & Maier, B. (2019). Type IV pili: Dynamics, biophysics and functional consequences. *Nature Reviews Microbiology*, *17*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0195-4>
- Damron, F. H., & Barbier, M. (2013). Predatory bacteria: Living Antibiotics, Biocontrol Agents, or Probiotics? *Postdoc Journal*. <https://doi.org/10.14304/SURYA.JPR.V1N12.2>
- Deeg, C. M., Le, T. T., Zimmer, M. M., & Suttle, C. A. (2020). From the Inside Out: An Epibiotic *Bdellovibrio* Predator with an Expanded Genomic Complement. *Journal of Bacteriology*, *202*(8). <https://doi.org/10.1128/JB.00565-19>
- Dwidar, M., Im, H., Seo, J. K., & Mitchell, R. J. (2017). Attack-Phase *Bdellovibrio* bacteriovorus Responses to Extracellular Nutrients Are Analogous to Those Seen During Late Intraperiplasmic Growth. *Microbial Ecology*, *74*(4), 937-946. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-1003-1>
- Dwidar, M., Monnappa, A. K., & Mitchell, R. J. (2012). The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio* bacteriovorus. *BMB Reports*, *45*(2), 71-78. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.2.71>
- Dwidar, M., & Yokobayashi, Y. (2017). Controlling *Bdellovibrio* bacteriovorus Gene Expression and Predation Using Synthetic Riboswitches. *ACS Synthetic Biology*, *6*(11), 2035-2041. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00171>
- Fenton, A. K., Hobley, L., Butan, C., Subramaniam, S., & Sockett, R. E. (2010). A coiled-coil-repeat protein «Ccrp» in *Bdellovibrio* bacteriovorus prevents cellular indentation, but is not essential for vibroid cell morphology. *FEMS Microbiology Letters*, *313*(2), 89-95. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02125.x>
- Fenton, A. K., Lambert, C., Wagstaff, P. C., & Sockett, R. E. (2010). Manipulating Each MreB of *Bdellovibrio* bacteriovorus Gives Diverse Morphological and Predatory Phenotypes. *Journal of Bacteriology*, *192*(5), 1299-1311. <https://doi.org/10.1128/JB.01157-09>
- Harding, C. J. (2019). *Structural and functional investigations of bdellovibrio bacteriovorus lifecycle proteins* [D\_ph, University of Birmingham]. <https://etheses.bham.ac.uk/id/eprint/9260/>
- Harding, C. J., Huwiler, S. G., Somers, H., Lambert, C., Ray, L. J., Till, R., Taylor, G., Moynihan, P. J., Sockett, R. E., & Lovering, A. L. (2020). A lysozyme with altered substrate specificity facilitates prey cell exit by the periplasmic predator *Bdellovibrio* bacteriovorus. *Nature Communications*, *11*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18139-8>
- Hobley, L., Fung, R. K. Y., Lambert, C., Harris, M. A. T. S., Dabhi, J. M., King, S. S., Basford, S. M., Uchida, K., Till, R., Ahmad, R., Aizawa, S.-I., Gomelsky, M., & Sockett, R. E. (2012). Discrete Cyclic di-GMP-Dependent Control of Bacterial Predation versus Axenic Growth in *Bdellovibrio* bacteriovorus. *PLoS Pathogens*, *8*(2), e1002493. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002493>
- Hobley, L., Summers, J. K., Till, R., Milner, D. S., Atterbury, R. J., Stroud, A., Capeness, M. J., Gray, S., Leidenroth, A., Lambert, C., Connerton, I., Twycross, J., Baker, M., Tyson, J., Kreft, J.-U., & Sockett, R. E. (2020). Dual Predation by Bacteriophage and *Bdellovibrio* bacteriovorus Can Eradicate *Escherichia coli* Prey in Situations where Single Predation Cannot. *Journal of Bacteriology*, *202*(6), e00629-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00629-19>
- Hoshiko, Y., Nishiyama, Y., Moriya, T., Kadokami, K., López-Jácome, L. E., Hirano, R., García-Contreras, R., & Maeda, T. (2021). Quinolone Signals Related to *Pseudomonas* Quinolone Signal-Quorum Sensing Inhibits the Predatory Activity of *Bdellovibrio* bacteriovorus. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 722579. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722579>

- Hungate, B. A., Marks, J. C., Power, M. E., Schwartz, E., van Groenigen, K. J., Blazewicz, S. J., Chuckran, P., Dijkstra, P., Finley, B. K., Firestone, M. K., Foley, M., Greenlon, A., Hayer, M., Hofmockel, K. S., Koch, B. J., Mack, M. C., Mau, R. L., Miller, S. N., Morrissey, E. M., ... Pett- Ridge, J. (2021). The Functional Significance of Bacterial Predators. *mBio*, *12*(2), e00466-21. <https://doi.org/10.1128/mBio.00466-21>
- Im, H., Choi, S. Y., Son, S., & Mitchell, R. J. (2017). Combined Application of Bacterial Predation and Violacein to Kill Polymicrobial Pathogenic Communities. *Scientific Reports*, *7*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14567-7>
- Im, H., Dwidar, M., & Mitchell, R. J. (2018). Bdellovibrio bacteriovorus HD100, a predator of Gram-negative bacteria, benefits energetically from Staphylococcus aureus biofilms without predation. *The ISME Journal*, *12*(8), 2090-2095. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0154-5>
- Jurkevitch, E. (2020). *The Ecology of Bdellovibrio and Like Organisms in Wastewater Treatment Plants* (E. Jurkevitch & R. J. Mitchell, Eds.; pp. 37-64). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-45599-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-030-45599-6_2)
- Kaljević, J., Saaki, T. N. V., Govers, S. K., Remy, O., van Raaphorst, R., Lamot, T., & Laloux, G. (2021). Chromosome choreography during the non-binary cell cycle of a predatory bacterium. *Current Biology*, *31*(17), 3707-3720.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.06.024>
- Karunker, I., Rotem, O., Dori-Bachash, M., Jurkevitch, E., & Sorek, R. (2013). A Global Transcriptional Switch between the Attack and Growth Forms of Bdellovibrio bacteriovorus. *PLoS ONE*, *8*(4), e61850. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061850>
- Laloux, G. (2020). Shedding Light on the Cell Biology of the Predatory Bacterium Bdellovibrio bacteriovorus. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 3136. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03136>
- Lambert, C., Cadby, I. T., Till, R., Bui, N. K., Lerner, T. R., Hughes, W. S., Lee, D. J., Alderwick, L. J., Vollmer, W., Sockett, E. R., & Lovering, A. L. (2015). Ankyrin-mediated self-protection during cell invasion by the bacterial predator Bdellovibrio bacteriovorus. *Nature Communications*, *6*. <https://doi.org/10.1038/ncomms9884>
- Lambert, C., Evans, K. J., Till, R., Hobbey, L., Capeness, M., Rendulic, S., Schuster, S. C., Aizawa, S.-I., & Sockett, R. E. (2006). Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by Bdellovibrio bacteriovorus. *Molecular Microbiology*, *60*(2), 274-286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05081.x>
- Lambert, C., Hobbey, L., Chang, C.-Y., Fenton, A., Capeness, M., & Sockett, L. (2008). A Predatory Patchwork: Membrane and Surface Structures of Bdellovibrio bacteriovorus. En *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 54, pp. 313-361). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)00005-2)
- Lambert, C., Lerner, T. R., Bui, N. K., Somers, H., Aizawa, S.-I., Liddell, S., Clark, A., Vollmer, W., Lovering, A. L., & Sockett, R. E. (2016). Interrupting peptidoglycan deacetylation during Bdellovibrio predator-prey interaction prevents ultimate destruction of prey wall, liberating bacterial-ghosts. *Scientific Reports*, *6*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep26010>
- Lambert, C., Morehouse, K. A., Chang, C.-Y., & Sockett, R. E. (2006). Bdellovibrio: Growth and development during the predatory cycle. *Current Opinion in Microbiology*, *9*(6), 639-644. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.002>

- Lambert, C., Till, R., Hobley, L., & Sockett, R. E. (2012). Mutagenesis of RpoE-like sigma factor genes in *Bdellovibrio* reveals differential control of groEL and two groES genes. *BMC Microbiology*, *12*, 99. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-99>
- Lowry, R. C., Hallberg, Z. F., Till, R., Simons, T. J., Nottingham, R., Want, F., Sockett, R. E., Hammond, M. C., & Lambert, C. (2022). Production of 3',3'-cGAMP by a *Bdellovibrio* bacteriophage promiscuous GGDEF enzyme, Bd0367, regulates exit from prey by gliding motility. *PLoS Genetics*, *18*(5), e1010164. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010164>
- Marine, E., Milner, D. S., Lambert, C., Sockett, R. E., & Pos, K. M. (2020). A novel method to determine antibiotic sensitivity in *Bdellovibrio* bacteriophage reveals a DHFR-dependent natural trimethoprim resistance. *Scientific Reports*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62014-x>
- Marine, E., & Pos, K. M. (2020). Antimicrobial Sensitivity Assay for *Bdellovibrio* bacteriophage. *Bio-protocol*, *10*(24), e3865. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3865>
- Meek, R. W., Cadby, I. T., Moynihan, P. J., & Lovering, A. L. (2019). Structural basis for activation of a diguanylate cyclase required for bacterial predation in *Bdellovibrio*. *Nature Communications*, *10*(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12051-6>
- Milner, D. S., Ray, L. J., Saxon, E. B., Lambert, C., Till, R., Fenton, A. K., & Sockett, R. E. (2020). DivIVA Controls Progeny Morphology and Diverse ParA Proteins Regulate Cell Division or Gliding Motility in *Bdellovibrio* bacteriophage. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 542. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00542>
- Monnappa, A. K., Dwidar, M., Seo, J. K., Hur, J.-H., & Mitchell, R. J. (2014). *Bdellovibrio* bacteriophage Inhibits *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation and Invasion into Human Epithelial Cells. *Scientific Reports*, *4*, 3811. <https://doi.org/10.1038/srep03811>
- Morehouse, K. A., Hobley, L., Capeness, M., & Sockett, R. E. (2011). Three motAB Stator Gene Products in *Bdellovibrio* bacteriophage Contribute to Motility of a Single Flagellum during Predatory and Prey-Independent Growth. *Journal of Bacteriology*, *193*(4), 932-943. <https://doi.org/10.1128/JB.00941-10>
- Mun, W., Upatissa, S., Lim, S., Dwidar, M., & Mitchell, R. J. (2022). Outer Membrane Porin F in *E. coli* Is Critical for Effective Predation by *Bdellovibrio*. *Microbiology Spectrum*, *10*(6), e0309422. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03094-22>
- Pasternak, Z., Njagi, M., Shani, Y., Chanyi, R., Rotem, O., Lurie-Weinberger, M. N., Koval, S., Pietrovski, S., Gophna, U., & Jurkevitch, E. (2014). In and out: An analysis of epibiotic vs periplasmic bacterial predators. *The ISME Journal*, *8*(3), 625-635. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.164>
- Pérez, J., Contreras-Moreno, F. J., Marcos-Torres, F. J., Moraleda-Muñoz, A., & Muñoz-Dorado, J. (2020). The antibiotic crisis: How bacterial predators can help. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *18*, 2547-2555. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2020.09.010>
- Pląskowska, K., Makowski, Ł., Strzałka, A., & Zakrzewska-Czerwińska, J. (2023). Binary or Nonbinary Fission? Reproductive Mode of a Predatory Bacterium Depends on Prey Size. *mBio*, *0*(0), e00772-23. <https://doi.org/10.1128/mbio.00772-23>
- Rangarajan, A. A., & Waters, C. M. (2022). Double take: A dual-functional Hypr GGDEF synthesizes both cyclic di-GMP and cyclic GMP—AMP to control predation in *Bdellovibrio* bacteriophage. *PLOS Genetics*, *18*(7), e1010263. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1010263>

Reyneke, B., Waso, M., Khan, S., & Khan, W. (2020). Rainwater treatment technologies: Research needs, recent advances and effective monitoring strategies. *Current Opinion in Environmental Science & Health*, 16, 28-33. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.02.010>

Richards, J., & Belasco, J. G. (2021). Riboswitch control of bacterial RNA stability. *Molecular Microbiology*, 116(2), 361–365. <https://doi.org/10.1111/mmi.14723>

Rotem, O., Nesper, J., Borovok, I., Gorovits, R., Kolot, M., Pasternak, Z., Shin, I., Glatter, T., Pietrokovski, S., Jenal, U., & Jurkevitch, E. (2016). An Extended Cyclic Di-GMP Network in the Predatory Bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 198(1), 127-137. <https://doi.org/10.1128/JB.00422-15>

Rotem, O., Pasternak, Z., & Jurkevitch, E. (2014). *Bdellovibrio* and Like Organisms. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, & F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* (pp. 3-17). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9\\_379](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9_379)

Rotem, O., Pasternak, Z., Shimoni, E., Belausov, E., Porat, Z., Pietrokovski, S., & Jurkevitch, E. (2015). Cell-cycle progress in obligate predatory bacteria is dependent upon sequential sensing of prey recognition and prey quality cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(44), E6028-E6037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515749112>

Rowlett, V. W., & Margolin, W. (2015). The Min system and other nucleoid-independent regulators of Z ring positioning. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00478>

Schwudke, D., Linscheid, M., Strauch, E., Appel, B., Zahringer, U., Moll, H., Muller, M., Brecker, L., Gronow, S., & Lindner, B. (2003). The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid A containing alpha-D-Mannoses that replace phosphate residues: Similarities and differences between the lipid As and the lipopolysaccharides of the wild type strain B. *bacteriovorus* HD100 and its host-independent derivative HI100. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27502-27512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303012200>

Shemesh, Y., & Jurkevitch, E. (2004). Plastic phenotypic resistance to predation by *Bdellovibrio* and like organisms in bacterial prey. *Environmental Microbiology*, 6(1), 12-18. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00530.x>

Sockett, R. E., & Lambert, C. (2004). *Bdellovibrio* as therapeutic agents: A predatory renaissance? *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nrmicro959>

Song, W.-Y. (2004). *Identification and Characterization of Bdellovibrio bacteriovorus, a Predator of Burkholderia glumae* -*Journal of Microbiology and Biotechnology | Korea Science*. <https://koreascience.kr/article/JAKO200411923002078.page>

Tsao, L. H., Shepardson-Fungairiño, S., Murayama, H., Cecere, A., Wren, E., & Núñez, M. (2022). Assessing the Potential for DNA Quadruplex Formation in the Predatory Bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Biochemistry*, 61(19), 2073-2087. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00443>

Willis, A. R., Moore, C., Mazon-Moya, M., Krokowski, S., Lambert, C., Till, R., Mostowy, S., & Sockett, R. E. (2016). Injections of Predatory Bacteria Work Alongside Host Immune Cells to Treat *Shigella* Infection in Zebrafish Larvae. *Current Biology*, 26(24), 3343-3351. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.067>

World Health Organization (WHO). Recuperado 23 de marzo de 2023, de <https://www.who.int/es>

- Zakrzewska-Czerwinska, J. (2019). *Dynamics of Chromosome Replication and Its Relationship to Predatory Attack Lifestyles in Bdellovibrio bacteriovorus*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00730-19>
- Zhang, Y., Li, A., Dai, T., Li, F., Xie, H., Chen, L., & Wen, D. (2018). Cell-free DNA: A Neglected Source for Antibiotic Resistance Genes Spreading from WWTPs. *Environmental Science & Technology*, 52(1), 248-257. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b04283>
- Zurick, R., Azenon, J., & Volle, C. B. (2023). Exploring and characterizing the sensitivity of Bdellovibrio bacteriovorus against different stressors. *Biophysical Journal*, 122(3), 369a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.11.2035>