



**FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

TRABAJO FIN DE GRADO

BDELLOVIBRIO ¿QUÉ HAY DE NUEVO, VIEJO?

AUTOR: RAFAEL GONZALEZ BRIOSO

FECHA: JUNIO 2022

TUTORA: MARIA DEL ROSARIO ESPUNY GÓMEZ

DEPARTAMENTO MICROBIOLOGÍA

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción.....	1
3. Ciclo de vida.....	3
3.1. Ciclo de <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	3
3.2. Ciclo epibiótico.....	6
3.3. Ciclo independiente de hospedador	7
3.4. Señalización durante el ciclo de depredación	8
4. Procesos moleculares durante el ciclo.....	9
4.1. <i>Pilus</i> de tipo IV	9
4.2. Papel del diguanilato cíclico (C-di-GMP)	11
4.3. Expresión génica.....	12
4.4. DivIVA y ParA.....	14
4.5. Mecanismos para evitar la depredación por <i>Bdellovibrio</i>	15
5. Ecología.....	16
5.1. Temperatura.....	17
5.2. Salinidad	18
5.3. Impacto de la presa	18
6. Aplicaciones	19
6.1. Alternativa a los antibióticos	21
6.2. Tratamiento de aguas	23
6.3. Bioextracción de bioplásticos	24
7. Conclusiones y perspectivas futuras.....	25
8. Bibliografía.....	27

1. Resumen

Bdellovibrio bacteriovorus es un pequeño depredador Gram negativo que ha evolucionado para invadir a otras bacterias Gram negativas, alimentarse y multiplicarse en el periplasma a expensas de sus nutrientes. Debido a su estilo de vida único, ha sido reconocido como un agente de biocontrol con muchas aplicaciones. Además, se han encontrado bacterias del género *Bdellovibrio* que son epibióticos, es decir, no se introducen en el periplasma. Los dos tipos de *Bdellovibrio* pueden convertirse en independientes de hospedador si sufren algunas mutaciones específicas en el genoma. En la última década, se han publicado artículos sobre los detalles moleculares que se dan durante el ciclo (expresión de genes, proteínas secretadas, estructuras importantes, etc), además se ha demostrado que existen dos señales en la presa para que ocurra la depredación, una señal temprana y una señal tardía. En este TFG se reúne y resume el conocimiento actual sobre *Bdellovibrio* y sus posibles aplicaciones.

2. Introducción

La depredación es una interacción natural y esencial presente en todos los niveles tróficos y en todos los ecosistemas, que contribuye al mantenimiento del equilibrio ecológico (Johnke *et al.*, 2019). Las bacterias depredadoras están distribuidas en diferentes grupos taxonómicos. Mientras que los depredadores obligados sobreviven consumiendo la célula de la presa, los facultativos cambian fácilmente a un estilo de vida saprofito, consumiendo una amplia gama de sustratos en ausencia de presas adecuadas (Jurkevitch, 2007; Korp *et al.*, 2016).

El descubrimiento de la depredación obligada en bacterias fue accidental; la primera bacteria con este tipo de depredación fue aislada en 1962 por H. Stolp y H. Petzold, cuando intentaban aislar del suelo un bacteriófago para un patógeno vegetal (*Pseudomonas phaseolicola*), pero aparecieron calvas de la que se aisló *Bdellovibrio* (Stolp and Petzold., 1963). *Bellovibrio* engloba a bacterias Gram negativas aerobias o microaerófilas, quimiorganotrofas, con un tamaño promedio de 0,2 a 0,5 μm de ancho y de 0,5 a 2,5 μm de largo, con forma de vibrio; presenta un flagelo polar que la hace altamente móvil, se desplaza 100 veces su tamaño por segundo (Caulton and Lovering, 2020). La alta movilidad le sirve para llevar a cabo una búsqueda selectiva de la presa por hidrodinámica que lleva al depredador donde hay mayor densidad de presa, y cuando entra en contacto con ella, se adhiere a su superficie celular, atraviesa la membrana externa hacia el periplasma, formando al entrar un “bdelloplasto”

donde se inician los procesos digestivos de los componentes de la presa, el crecimiento y la multiplicación del depredador para dar lugar a nueva progenie (Prehna *et al.*, 2014).

A raíz de la expansión de los genes de resistencia a antibióticos en los patógenos bacterianos, la búsqueda de nuevas técnicas para la eliminación de estos patógenos se ha convertido en un objetivo principal. La necesidad de una mejor gestión de nuestro medio ambiente también impulsa la investigación hacia aplicaciones en agricultura, acuicultura y tecnologías ambientales. Así, se están empleando los *Bdellovibrio* en sistemas de control biológico, para el uso de sus enzimas (del tipo de las hidrolasas) y su empleo como depredadores frente a ciertas bacterias (Mookherjee and Jurkevitch, 2021).

Las bacterias del género *Bdellovibrio* han evolucionado para invadir, matar y digerir una amplia gama de hospedadores o presas, todas Gram negativas. El representante más estudiado y conocido es *Bdellovibrio bacteriovorus* un pequeño depredador de bacterias Gram negativas (*Salmonella sp.*, *E. coli* entre otras) y desde entonces este comportamiento ha sido estudiado por bioquímicos, ecólogos y microbiólogos (Negus *et al.*, 2017).

Bdellovibrio presenta dos tipos de ciclos de vida, puede crecer con la presa denominándose dependiente de hospedador (HD) o, más raramente y tras mutaciones, puede crecer axénicamente, es decir, sin hospedador al que depredar, denominándose independiente de hospedador (HI) (Prehna *et al.*, 2014). Los HD pueden presentar un ciclo endobiótico, si entra en el periplasma para replicarse, o epibiótico, si se replica fuera del hospedador. En general, el ciclo de vida es bifásico con una fase de ataque o de vida libre, en la que busca y se adhiere a la presa y una fase de crecimiento, y de división en la que se alimenta de la presa (Deeg *et al.*, 2020).

El pequeño genoma de *B. bacteriovorus* HD100 ha sido secuenciado, posee aproximadamente 3,8 Mb, típico de un depredador obligado, codifica un secretoma (conjunto de proteínas que son secretadas al medio extracelular) de 1520 proteínas de las cuales 293 aproximadamente son proteínas líticas entre ellas 150 proteasas y peptidasas, 10 glicanasas, 20 ADNasa, 9 ARNasa y 15 lipasas (Bratanis *et al.*, 2020); también codifica numerosas proteínas que están implicadas en la vía de señalización del segundo mensajero di-GMP cíclico (c-di-GMP) (Hobley *et al.*, 2012). Las proteínas poseen diferentes tipos de secreción tanto de membrana externa, como de membrana interna, por lo que las proteínas líticas tienen que jugar un papel crucial en su ciclo (Bratanis *et al.*, 2020).

Existen ciertos microorganismos que tienen un comportamiento semejante a *Bdellovibrio*, son los pertenecientes al grupo de los BALO (*Bdellovibrio* and like organisms); constituyen un grupo exclusivo de bacterias Gram negativas depredadoras obligadas que se alimentan únicamente de otras bacterias Gram negativas y, como tales, se consideran agentes potenciales de control biológico y antibióticos vivos (Rotem *et al.*, 2015b). En la naturaleza el grupo de los BALO es importante ya que se considera un equilibrador ecológico de otras comunidades microbianas, y se encuentran tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos y en los intestinos de los animales (Snyder *et al.*, 2002). Debido a que los depredadores obligados no pueden replicarse en ausencia de la presa, la estructura de las poblaciones de los BALO está bajo selección ambiental (Chen *et al.*, 2011).

La clasificación de los BALO ha ido evolucionando a lo largo del tiempo y, actualmente, pertenecen a dos clases, la clase *Oligoflexia* (antes se incluía en las *Deltaproteobacteria*) e incluye a los géneros *Bdellovibrio*, *Bacteriovorax*, *Pseudobacteriovorax* y *Peredibacter* y, la segunda clase *Alfaproteobacteria* que solo tiene a *Micovibrio*, un depredador epibiótico (Ezzedine *et al.*, 2020).

3. Ciclo de vida

3.1. Ciclo de *Bdellovibrio bacteriovorus*

B. bacteriovorus es un depredador obligado, dependiente de hospedador (HD) que posee un ciclo de vida bifásico con una fase de ataque (AP) de vida libre y una fase de crecimiento (GP) intraperiplasmático, existiendo una fase de transición entre estas dos fases (Bratanis *et al.*, 2020).

El ciclo de vida dura unas cuatro horas. Los depredadores se encuentran libres con movimiento muy activo buscando a las presas; cuando se produce el encuentro y el reconocimiento de la presa, se adhiere a ella, en primer lugar de forma reversible, pero, instantes después, la unión se vuelve irreversible. Posteriormente, *Bdellovibrio* hidroliza la membrana externa de la presa utilizando diferentes enzimas y entra por el poro desarrollado. Una vez dentro, el poro se sella para asegurar la mínima pérdida de metabolitos y comienza a asimilar y metabolizar moléculas de la presa lo que le permite el crecimiento en forma de filamento; por último, el filamento se divide y genera la progenie, la célula de la presa se lisa

para que salgan las células hijas y vuelva a comenzar otro ciclo (Caulton and Lovering, 2020) (figura 1).

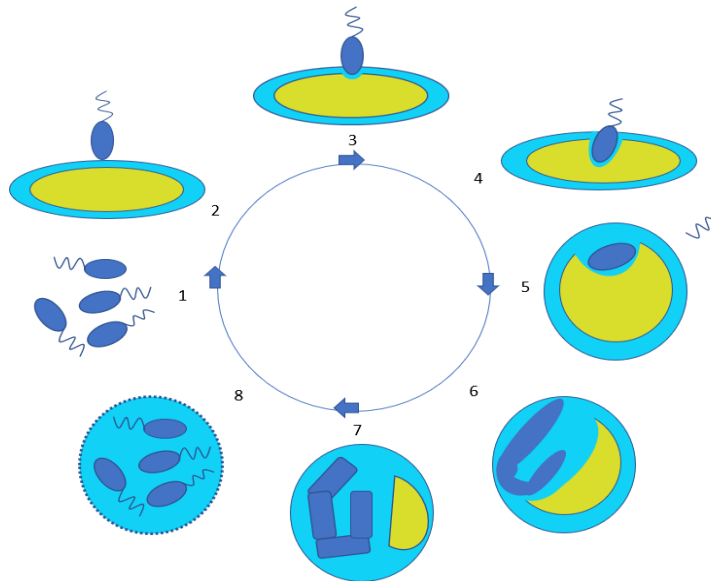


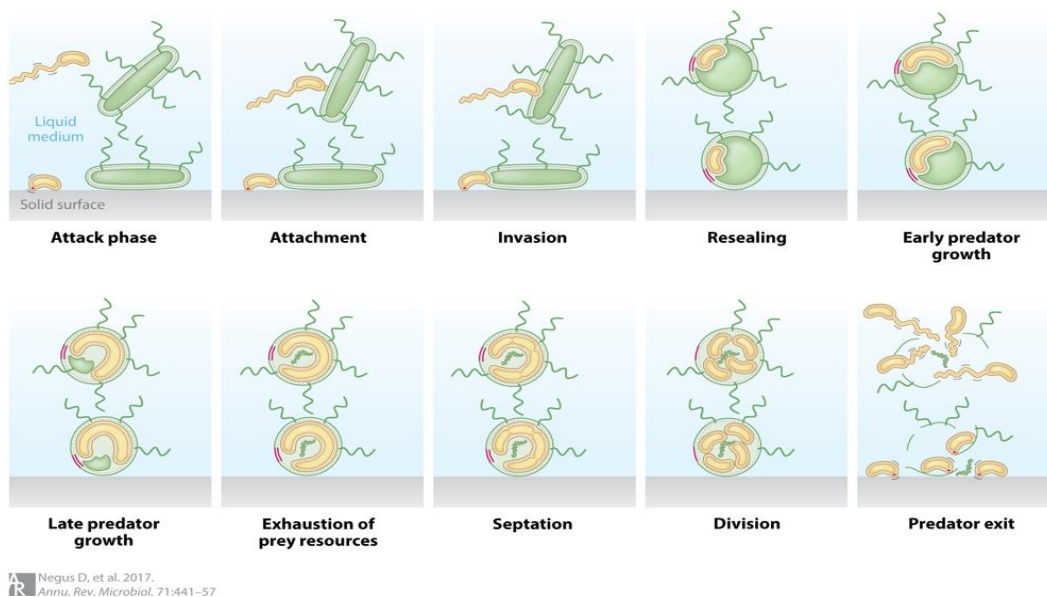
Figura 1. Ciclo de vida de *B. bacteriovorus*. 1. Fase de ataque de nado libre; 2. Adhesión a la presa; 3-4. Invasión de la presa; 5. Pérdida del flagelo, sellado del poro y formación del bdelloplasto; 6. Crecimiento filamentososo; 7. Septación; 8. Lisis. Adaptado de Caulton and Lovering, 2020, elaboración propia.

La depredación es un proceso multifactorial de encuentro con las presas, reconocimiento y degradación programada, en la que son importantes los flagelos, los orgánulos deslizantes y los *pili* tipo IV (Negus *et al.*, 2017).

Los flagelos proporcionan una alta movilidad a la bacteria lo que es importante para las colisiones depredador-presa y conducir a una depredación eficiente en un medio líquido. El reconocimiento de la presa puede ser al azar pero, en algunas ocasiones, las fuerzas hidrodinámicas aumentan la posibilidad de encontrar a la presa (Jashnsaz *et al.*, 2017). Sin embargo, el flagelo en si no es absolutamente necesario para la depredación, ya que se ha demostrado (Lambert *et al.*, 2006) que mutantes del flagelo pueden depredar aunque con menos eficiencia; esto es debido a que pueden utilizar los orgánulos deslizantes, ya que presentan un mecanismo de polimerización y despolarización de las fibras de pilina en un polo de la célula bacteriana permitiendo el movimiento hacia delante mediante un mecanismo de movilidad por contracción (Luciano *et al.*, 2011). Esta movilidad deslizante está asociada a una flexibilidad inusual de la célula.

La depredación por deslizamiento requiere de complejos multiproteicos que se expresan en la envoltura celular y, aunque el desplazamiento es más lento, permite la entrada y la salida en las bacterias presas que se desarrollan en biopelículas en ambientes con poca humedad (figura 2). Los complejos proteicos se denominan FAC (focal adhesion complexes), se acumulan en el lado ventral periódicamente y en ellos se expresa una proteína de movilidad deslizante (AglZ-YEP). La formación de focos AglZ-YEP requiere del citoesqueleto bacteriano (MreB-actina) y un motor impulsado por la fuerza protón motriz (AglRQS) para poder producirse el deslizamiento (Luciano *et al.*, 2011).

Los *pili* tipo IV son necesarios para la depredación (Milner *et al.*, 2014), el depredador tiene que utilizarlos para poder adentrarse al periplasma a través del poro formado, ya que es más delgado que el propio *Bdellovibrio*, por lo que debe tener la capacidad de deformarse y para eso se ayuda del mencionado *pilus* (Caulton and Lovering, 2020).



Negus D, et al. 2017. Annu. Rev. Microbiol. 71:441–57

Figura 2. Ciclo del depredador *B. bacteriovorus* (en amarillo) con bacteria presa (en verde) . En un medio líquido (parte superior de cada imagen, fondo en azul) la utilidad de la movilidad es importante para los encuentros y la salida de la presa y sobre una superficie (parte inferior con fondo gris) los orgánulos deslizantes producen movilidad para el encuentro y la salida de la presa (Negus *et al.*, 2017:443).

Una vez el depredador está dentro, el poro se sella y se forma el "bdelloplasto", estructura redondeada, osmóticamente estable, en la que el depredador crece absorbiendo eficientemente los nutrientes, proteínas y nucleótidos del citosol del hospedador para su propio crecimiento, además de servirle de protección. Una vez se le acaban los nutrientes, el

depredador deja de multiplicarse y las células hijas, formadas por septación sincrónica del largo filamento con numerosos nucleoides, salen lisando la célula de la presa (Deeg *et al.*, 2020).

Para que la depredación ocurra, las presas deben estar activas energéticamente, es decir, se necesita que haya un contenido de nutrientes aceptable, porque si es bajo, la depredación se detiene y la célula muere. Además, se ha observado que utilizan algunos de los componentes de la presa, por ejemplo, se estima que aproximadamente el 70% del ADN de la presa se incorpora al ADN recién sintetizado del depredador (Bukowska-Faniband *et al.*, 2020), y otros muchos se sintetizan *de novo* (Lambert *et al.*, 2006).

3.2. Ciclo epibiótico

Dentro del grupo de los microorganismos epibióticos se encuentra *Bdellovibrio exovorus* que posee un rango de hospedador muy estrecho y emplea una estrategia de replicación epibiótica con una fase de ataque, igual que la de *B. bacteriovorus*, y una fase de crecimiento en la que las células no penetran al periplasma sino que se quedan adheridas al exterior; se asemeja al comportamiento de *Microvibrio*, pero con algunas diferencias ya que *B. exovorus* genera un bdelloplasto y *Microvibrio* no, y extrae el contenido del citoplasma de la presa a través de las membranas; una vez se agota todo, se produce una fisión binaria liberando dos células (Deeg *et al.*, 2020).

En un estanque de agua dulce eutrófica en la Columbia Británica (Canadá), se aisló un parasitoide al que se le llamó “*Candidatus Bdellovibrio qaytius*” que también es epibiótico, se replica fuera y se alimenta preferiblemente de la *Betaproteobacteria Paraburkholderia fungorum*. A pesar de esto, el genoma es más similar a depredadores intraperiplasmáticos complejos y se sugiere que es un grupo basal y que este tipo de depredación es ancestral (Deeg *et al.*, 2020). “*Candidatus Bdellovibrio qaytius*” es un depredador obligado, no puede crecer axénicamente y, en la fase de ataque, las células en forma de vibrio con flagelo nadan muy rápidamente; cuando las células entran en contacto con la presa adecuada, se adhieren irreversiblemente y forman una amplia sinapsis depredadora, no forma bdelloplasto por lo que es un epibiótico, va vaciando a la célula hospedadora a medida que crece (*figura 3*); al final se produce la fisión y la producción de las células hijas (Deeg *et al.*, 2020).

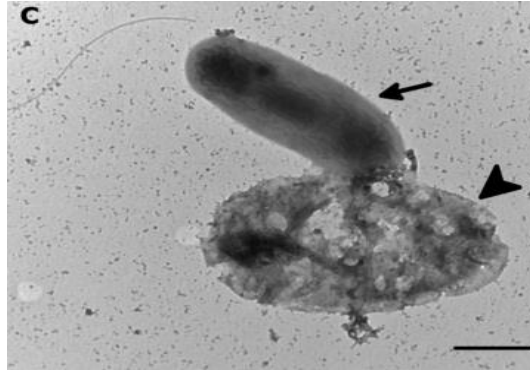


Figura 3. "*California Bdellovibrio qaytius*" estrategia de depredación y replicación. C) Micrografía electrónica de tinción negativa de una fase de crecimiento tardío de "*California Bdellovibrio qaytius*" (flecha) junto a una presa (punta de flecha). El flagelo se desprende para poder producir la fisión binaria. (Deeg *et al.*, 2020).

3.3. Ciclo independiente de hospedador

Algunas bacterias del género *Bdellovibrio* tras mutaciones pueden crecer sin presa (axénicamente), pero este comportamiento es algo raro. Se ha visto que son mutaciones en las proteínas que forman el *pilus* retráctil, de lo que se deduce que para que tenga lugar el ciclo intraperiplasmático es necesario que el *pilus* se encuentre en perfecto estado (Prehna *et al.*, 2014).

Existen dos tipos de mutantes HI; los de tipo I se caracterizan porque pueden formar colonias aisladas en ausencia de presas si se encuentran en un medio rico suplementado con extracto de presa, denominándose mutantes saprófitos y se cree que se debe a una mutación el gen *Bd0108*, implicado en la regulación del desarrollo del *pilus* tipo IV, aunque pueden existir otras mutaciones desconocidas. Los de tipo II pueden crecer en un medio completo estándar pero no necesitan extracto de presa para crecer, a esto se le denomina crecimiento axénico y por tanto son mutantes axénicos; se observó que estos mutantes tenían mutados además de *Bd0108*, dos genes adyacentes, *Bd3461* (codifica RhlB, una ARN helicasa dependiente de ATP que forma parte del degradosoma) y *Bd3464* (que codifica PcnB, la poli(A) polimerasa que cataliza la poliadenilación del ARN en el extremo 3') (Roschanski *et al.*, 2011).

Los mutantes tipo II de *B. bacteriovorus* se replican sin presas y sin extracto de esta, tienen regulados positivamente los genes implicados en el crecimiento general y en la división celular, muestran un crecimiento dimórfico y normalmente, mantienen sus capacidades depredadoras (Bratanis *et al.*, 2020), lo mismo ocurre en crecimiento saprófito, cuando sí existe extracto de presa.

B. bacteriovorus puede generar biopelículas en las que solo crecen mutantes HI en ambientes ricos en nutrientes, pero sin presa, y también en los que se forman comunidades organizadas con un núcleo central de bacterias depredadoras activas y una externa con células no tan activas siendo HI debido a la falta de acceso a las presas (Bratanis *et al.*, 2020). Estos depredadores HI también se multiplican por septación de la célula filamentosa, pero las células son pleiomórficas y la división puede ocurrir de forma sincrónica o no (Milner *et al.*, 2020).

3.4. Señalización durante el ciclo de depredación

Se sabe que el compromiso y el sustento del crecimiento del depredador se logran mediante la detección de dos señales derivadas de la presa, pero no han sido aún identificadas. Los estudios sobre las señales se han llevado a cabo mediante un sistema de cultivo *ex vivo* con células “fantasmas” de la presa, es decir, presas vacías sin citosol con las envolturas celulares intactas, y el depredador *B. bacteriovorus*. (Rotem *et al.*, 2015b).

En el primer experimento se utilizaron células fantasmas de *E. coli* (presa) y *B. bacteriovorus* no fue capaz de reconocer a las presas como tales. Los depredadores se adhirieron transitoriamente a las células fantasmas pero fueron incapaces de anclarse permanentemente debido a que las células de la presa tenían grandes alteraciones similares a poros en la envoltura, generadas posiblemente por la expresión del gen *E* del fago *PhiX17*, usado para la obtención de células fantasmas. Por lo que, estas alteraciones podrían impedir la unión y el reconocimiento por parte del depredador (Rotem *et al.*, 2015b). Este experimento demostró que es necesaria la integridad de la envoltura para la depredación.

En el siguiente experimento, se utilizaron envolturas de presas fantasmas intactas sin contenido citosólico, obtenidas empleando otra metodología y en este caso se produjo una unión rápida, seguida de una unión estable y de la entrada del depredador en la presa. Sin embargo, los depredadores no fueron capaces de escapar de las células fantasmas, ni de entrar en fase de crecimiento. Además, no se desprendieron del flagelo, seguían móviles en el interior de la presa; por lo que la simple entrada del depredador en la presa no es suficiente para el desprendimiento del flagelo. Con este experimento se demostró que se requiere del citosol para que se produzca el crecimiento y la replicación del depredador y la consiguiente salida de las células de la presa (Rotem *et al.*, 2015b).

En el último experimento, se utilizaron células presas fantasmas intactas con extracto de presa; observándose que se mantenía el ciclo de vida completo en un 60% de los casos. (Rotem *et al.*,2015). Por lo que quedó demostrado que se requieren tanto de una envoltura celular íntegra, como de un citosol para poder completar el ciclo de vida del depredador.

En estos experimentos queda demostrado que una señal temprana se encuentra en la envoltura de la presa y una señal tardía se encuentra dentro de la fracción soluble de la presa (citosol). Por tanto, estas dos señales están separadas temporal y espacialmente, provocan efectos sobre la transcripción de genes, además de delimitar la fase transitoria entre la fase de ataque y de crecimiento. La fase transitoria constituye un punto de control en el que la señal más tardía actúa como un determinante del valor nutricional de la presa antes de que el depredador comience a crecer. Presuntamente, la primera señal promueve la entrada del depredador en la presa, la formación del bdelloplasto y el consumo de la presa, y la segunda señal promueve la síntesis de ADN y es necesaria para el crecimiento celular sostenido (Rotem *et al.*,2015b).

4. Procesos moleculares durante el ciclo

4.1. *Pilus* de tipo IV

El *pilus* tipo IV es retráctil, es decir, sufre extrusión y retracción; se encuentra entre la membrana interna y la membrana externa y permite una entrada más eficaz en el interior de las células de la presa. Se ha podido observar que existe un vínculo entre el *pilus* y una señal que involucra a proteínas periplásmicas estructurales de la pilina para iniciar el crecimiento del depredador. Además, cambios en la extrusión del *pilus* son una señal de inicio de depredación e invasión de las presas, para el posterior crecimiento del depredador en su interior (Negus *et al.*, 2017).

Los *pili* tipo IV están codificados por ocho o más genes con función en la conjugación, adhesión célula-célula y superficie y en la secreción de proteínas. Estos productos génicos se pueden dividir en pilinas mayores, que son las proteínas estructurales centrales, y las pilinas menores, que son proteínas reguladoras y menos abundantes (Giltner *et al.*, 2012), por lo que el *pilus* tipo IV va a tener una estricta regulación y solo se libera al ambiente cuando se dan las condiciones adecuadas.

El desarrollo del *pilus* tipo IV está regulado por las proteínas Bd0108 y por la interacción de un producto génico vecino que da como resultado a la proteína Bd0109; la proteína Bd0108 es una proteína intrínsecamente desordenada (IDP) y su interacción con Bd0109 es de baja afinidad (Prehna *et al.*, 2014). Estas proteínas trabajan en conjunto para promover la liberación del *pilus* de *B. bacteriovorus* y para regular su longitud.

Bd0109 es una proteína de 62,5 kDa que muestra homología con proteínas de la familia de los puntos calientes de recombinación (RHS). Los dominios RHS tienen funciones diversas, como la regulación de los *pili*, competencia intercelular y en la secreción de toxinas ABC; mientras que la proteína Bd0108 es una proteína de 101 aminoácidos y no se ha encontrado homología hasta el momento (Figura 4) (Capeness *et al.*, 2013).

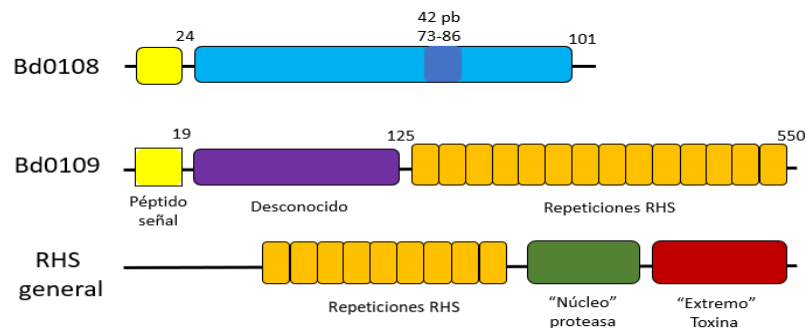


Figura 4. Representación de las proteínas Bd0108 y Bd0109. Los esquemas de Bd0108 y Bd0109 están basados en la homología de secuencias y predicción de estructura con una comparación con las proteínas de la familia RHS. En amarillo se representa el péptido señal y en naranja 13 elementos repetidos RHS, además, se muestra en Bd0108 la delección de 42 pb que caracteriza a los mutantes HI y la estructura general de la familia de proteínas RHS. Adaptado de Prehna *et al.*, 2014, elaboración propia.

A nivel molecular y celular, la expresión de *Bd0108* está relacionada con la capacidad de la bacteria para extender y retraer el *pilus*, y el cambio de vida de HD a HI se centra en que Bd0108 y Bd0109 funcionan como un complejo regulador en el periplasma, y se plantean la hipótesis de que Bd0109 secuestra a Bd0108 para regular y controlar la señal de depredación (Prehna *et al.*, 2014), por lo que mutaciones importantes en los genes que codifican Bd0108 y Bd0109 dan lugar a bacterias HI.

Actualmente se ha visto que el 89% de los aislamientos que desarrollan un estilo de vida HI contienen una mutación en *Bd0108*; de ellos, el 46% muestran una mutación específica de una delección de 42 pb que se caracterizó por primera vez en el trabajo de Cotter y Thomashow, (1992). Si se introducen plásmidos con el gen *Bd0108* silvestre al mutante tipo

I éste vuelve al estilo de vida HD, por lo que este gen permite junto con otros mecanismos la conversión de HD a HI (Prehna *et al.*, 2014).

4.2. Papel del diguanilato cíclico (C-di-GMP)

El di-GMP cíclico (C-di-GMP) es uno de los principales moduladores en el comportamiento bacteriano (transición móvil-inmóvil, crecimiento biopelícula-plantónico), y es fundamental al inicio de la depredación porque actúa como un segundo mensajero bacteriano y como un regulador en la movilidad bacteriana. Las enzimas que producen C-di-GMP se denominan diguanilato ciclasas (DGC) y las que producen su hidrólisis fosfodiesterasas (PDE), ambas están controladas por dominios sensores que responden a distintos estímulos, y se ha visto que tanto en la entrada como en la salida del depredador se produce C-di-GMP, además estas enzimas tienen un papel fundamental en la fase de crecimiento de *Bdellovibrio* (Caulton and Lovering, 2020). El C-di-GMP se une a efectores (proteínas receptoras) y afecta a la catálisis, las interacciones de proteínas y a la expresión genética (Rotem *et al.*, 2015a).

merRNA (massively expressed riboswitch RNA) es un ARN no codificante que funciona como almacén del *riboswitch* di-GMP cíclico (c-di-GMP); *merRNA* sufrirá cambios estructurales o se degradará para liberar grandes cantidades de C-di-GMP al citosol dependiendo de los cambios en la célula, a su vez, este C-di-GMP regulará la transformación rápida y extensa de *Bdellovibrio* desde su fase de ataque en forma móvil a forma sésil en la fase de crecimiento (Karunker *et al.*, 2013).

El DgcA es una de las enzimas que produce C-di-GMP, y la falta de DgcA hace que las bacterias se conviertan en no depredadoras, ya que aunque son capaces de completar la degradación de los metabolitos de la presa, son incapaces de propagarse debido a que quedan atrapados en los restos de la célula presa por un déficit en la movilidad de deslizamiento al final de la depredación (*figura 5*) (Caulton and Lovering, 2020).

El papel del DgcB es la producción de C-di-GMP durante la interacción depredador/presa, es decir, al inicio de la depredación (*figura 5*), y se ha visto que si no se produce DgcB las bacterias cambian su estilo de vida a un ciclo HI o no son capaces de terminar el ciclo (Caulton and Lovering, 2020). En la ruta de síntesis de DgcB actúa CdgA (*Bd3125*) que carece de actividad enzimática pero funciona como receptor de di-GMP cíclico y mutaciones en el gen *Bd3125* disminuye sustancialmente la depredación. CdgA interactúa con un

complejo proteico regulador del *pilus* para la penetración eficiente en las células presas (figura 5) (Hobley *et al.*, 2012), (Rotem *et al.*, 2015b).

DgcC permite el cambio de morfología en las células de la presa, y si se muta genera depredadores obligados, por lo que es necesaria para la conversión de *Bdellovibrio* al crecimiento axénico (figura 5) (Hobley *et al.*, 2012).

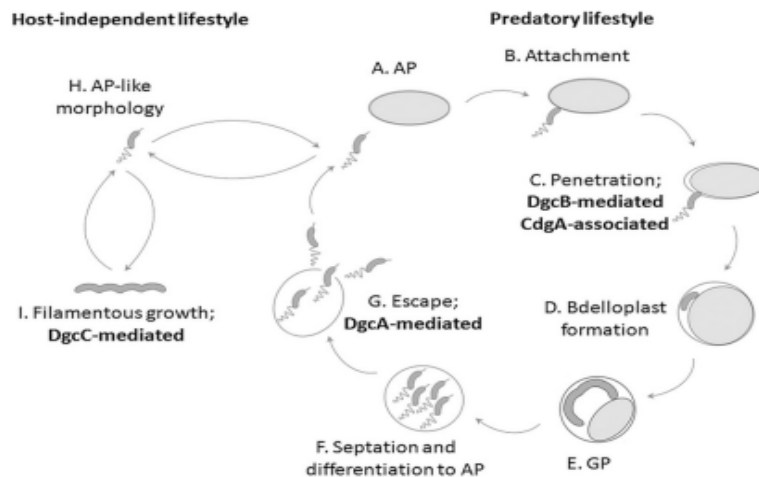


Figura 5. Control del C-di-GMP en el ciclo celular de *Bdellovibrio*: derecha ciclo de vida HD e izquierda ciclo de vida HI. A) Células en AP buscan a la presa. B y C) El encuentro de la presa va seguido de una unión irreversible, la invasión es dependiente de DgcB y está asociada a CdgA que es un efector de C-di-GMP e interactúa con el centro regulador del *pilus* de tipo IV en el citosol para la invasión. D) Formación del Bdelloplasto. E) El depredador entra en GP consumiendo a la presa. F y G) Se agotan los nutrientes y el filamento se divide generando células hijas que consiguen la movilidad flagelar y deslizante gracias a DgcA, para la posterior salida de la presa. H e I) Para mutantes HI es importante el DgcC ya que se requiere para la conversión al crecimiento axénico (Rotem *et al.*, 2015a).

Como conclusión, la maquinaria di-GMP cíclico es esencial tanto para la entrada en la presa como para la salida de la progenie al final del ciclo replicativo del depredador, indicando que este segundo mensajero está involucrado en la transducción de la primera señal para que ocurra la depredación (Rotem *et al.*, 2015b).

4.3. Expresión génica

La expresión de los genes en el ciclo de *Bdellovibrio* es muy cambiante, siendo bastante desconocida en la fase de transición entre la fase de ataque y de crecimiento. En la fase de ataque hay un pequeño número de genes transcritos activamente (33%) en comparación con

la fase de crecimiento (85%) y el 18% de estos genes se transcriben en ambas etapas. En la fase de crecimiento hay un gran número de genes que codifican proteínas, muchas de ellas involucradas en la regulación transcripcional, modificación/degradación del peptidoglicano y degradación/modificación/síntesis de ácidos nucleicos y diversas proteasas que reflejan la digestión de los componentes de la presa y la posterior síntesis de nuevas macromoléculas para el crecimiento de *B. bacteriovorus* (Lambert *et al.*, 2010).

En la fase de ataque temprano se regula al alza el gen *Bd0108*, que es imprescindible para la depredación y la entrada en la presa; también se expresa al alza *merARN*, ya que regula la movilidad bacteriana, *fliC* (codificante de la flagelina) que es un gen responsables del movimiento de los depredadores, y el factor sigma 28 (*fliA*) regulador transcripcional específico de la fase de ataque que regula dos terceras partes del programa en la fase de ataque, en el que se incluyen genes flagelares y genes relacionados con la movilidad, quimiotaxis y adhesión (*figura 6*) (Karunker *et al.*, 2013), (Rotem *et al.*, 2015b).

Una vez el depredador se encuentra con la presa, se prepara para la transición entre la fase de ataque y la de crecimiento y empieza a bajar la expresión de los genes *Bd0108* y *merARN*, probablemente ante un cambio de una señal específica; además, aumenta la expresión de otros genes como los de las proteínas PBP4 (proteínas de unión a la penicilina, *Bd3459* y *Bd0816*), estos genes codifican peptidocarboxilasas generando poros en la membrana externa de la presa, y están implicados en la formación del bdelloplasto a través de la remodelación del peptidoglicano y el gen *Bd3125* que va a sintetizar CdgA, que se encarga de organizar procesos en *Bdellovibrio* para que tenga lugar rápida invasión en la presa (Hobley *et al.*, 2012). También se expresan otros genes, como *Bd3464* que codifica PcnB (Poli(A) polimerasa I), y *Bd0742* que codifica DgcB (putativa diguanilato ciclasa), y los factores sigma de la ARN polimerasa *rpoD* y *rpoH* para inducir la fase de crecimiento y, cuando se detectan las señales de nutrientes en el citosol de la presa, se pasa a la fase de crecimiento (*figura 6*) (Bonfiglio *et al.*, 2020); (Rotem *et al.*, 2015b).

En la fase de crecimiento el depredador induce un bdelloplasto. En esta fase hay un cambio en la expresión de los genes y muchos genes se transcriben al alza como ya se ha explicado anteriormente; se van a sintetizar una gran diversidad de enzimas que van a degradar al depredador (metabolización del peptidoglicano), que carece de defensa frente a ellas, además de inducirse genes asociados al crecimiento y división, como proteínas ribosómicas y componentes de las ARN polimerasas y genes de transporte (Karunker *et al.*, 2013).

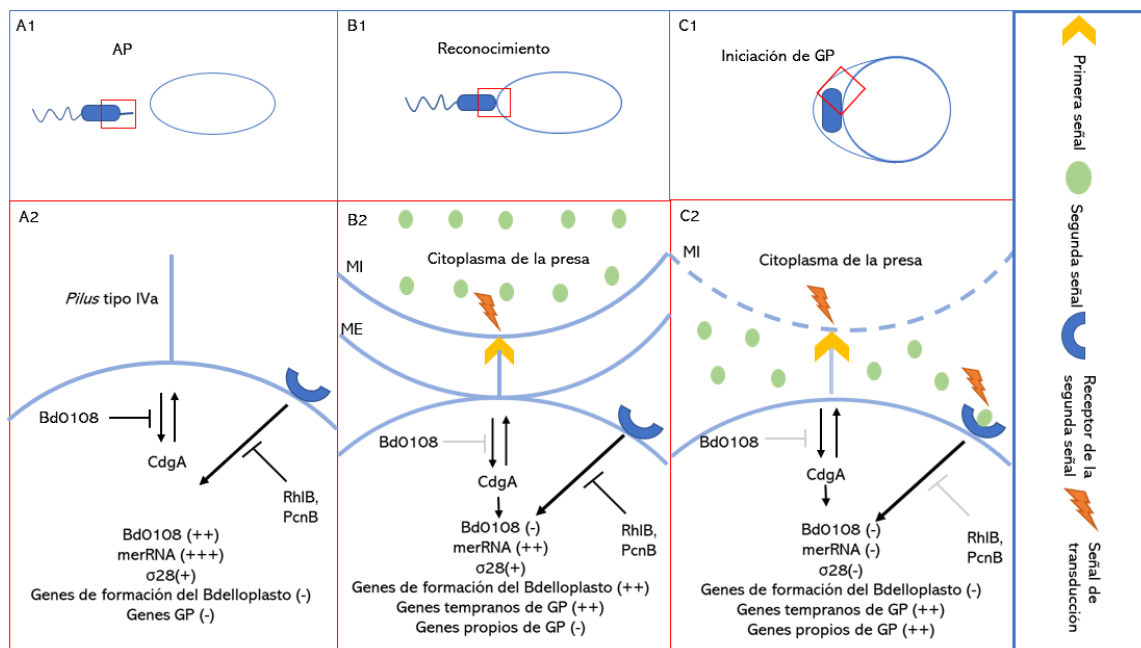


Figura 6. Expresión diferencial de los genes en cada fase de transición de *B. bacteriovorus*. A1) *B. bacteriovorus* en fase de ataque (AP). B1) *B. bacteriovorus* en fase de reconocimiento. C1) *B. bacteriovorus* en inicio de fase de crecimiento (GP). A2) Durante la AP no hay detección de la presa y se expresan al alza los genes *bd0108* y *merRNA*. B2) El reconocimiento causa cambios en la extrusión/ retracción del *pilus* tipo IV, se logra después de detectar la primera señal de la membrana citoplasmática, y CdgA receptor de C-di-GMP que interactúa con el complejo proteico regulador del *pilus*. Comienzan a activarse los genes de formación del bdelloplasto y los genes tempranos de GP. C2) La perforación de la membrana conduce a la liberación de la segunda señal citosólica que provoca la inducción de genes GP para permitir la replicación y síntesis de ADN. Adaptado de Rotem *et al.*, 2015b, elaboración propia.

Los laboratorios de Sockett y Lovering en colaboración han demostrado que *B. bacteriovorus* tiene una proteína de autoprotección que inhibe a las proteínas PBP4 una vez está dentro de la presa para proteger así las propias paredes celulares del hospedador, por lo que la expresión de estos genes aumenta en la fase de crecimiento (Lambert *et al.*, 2015).

4.4. DivIVA y ParA

Bdellovibrio se divide por división sincrónica dentro de la presa y, a partir de una sola célula filamentosa alargada y polinucleada, se formará toda la progenie que suele ser de entre 5 a 8 células hijas. La replicación y la división celular van a depender de los nutrientes que tenga la presa en su interior (Milner *et al.*, 2020).

La proteína DivIVA interviene en el crecimiento polar y la formación de esporas en bacterias Gram positivas; parece que en *Bdellovibrio* controla la morfología filamentosa durante la

división celular y, además, puede interactuar con proteínas que responden a indicadores metabólicos de biosíntesis de aminoácidos o cambios en el estado redox (puede ser un indicador del agotamiento de nutrientes para el depredador ya que el bdelloplasto está totalmente sellado) (Milner *et al.*, 2020).

La expresión constitutiva de DivIVABd y su localización bipolar a lo largo de 2 horas desde el crecimiento del depredador hasta la hora de la tabicación y la nueva especificación del polo celular, sugiere que DivIVABd coordina procesos importantes de los polos celulares durante el crecimiento del depredador (Milner *et al.*, 2020).

La proteína ParA interviene en la segregación de cromosomas y contribuye en la septación, además de ser importante para la motilidad flagelar. Se ha visto que en el caso de los depredadores HI también hay una septación de la célula filamentosa pero las células son pleiomórficas y la división puede ocurrir de forma sincrónica o no (Milner *et al.*, 2020). Antes de la división celular, los componentes celulares deben repartirse a lo largo del filamento y es un proceso fundamental para la organización celular, en el caso de la segregación de cromosomas se lleva a cabo por el sistema ParAB canónico (Milner *et al.*, 2020).

4.5. Mecanismos para evitar la depredación por *Bdellovibrio*

Se sabe que *B. bacteriovorus* nunca erradica completamente a sus presas y persiste una pequeña población resistente debido a que hay un tipo de resistencia plástica; pero la resistencia de las presas es algo extremadamente raro y es algo transitorio. Shemesh y Jurkevitch (2003) usando cultivos sucesivos han demostrado que se recupera la susceptibilidad a la depredación.

Antes de la invasión, *Bdellovibrio* se adhiere a la membrana externa de la presa y la composición de carbohidratos de las cadenas laterales del antígeno O de esta membrana pueden variar pero no suponen un problema para la depredación, ya que no son específicos (*figura 7. a*). Pueden existir barreras físicas como las cápsulas bacterianas (*figura 7. b*) que, en algunos casos, impiden el acceso total de los depredadores, pero muchas otras veces no supone ninguna barrera, como es el caso de la invasión de *B. bacteriovorus* a través de capsulas de *E.coli* (Koval and Bayer, 1997). En el caso de la capa S (*figura 7. c*), una estructura paracristalina con repeticiones proteicas, el depredador tiene que buscar huecos

que les permita penetrar en la célula de la presa, por lo que la depredación no suele ser eficiente (Koval and Hynes, 1991).

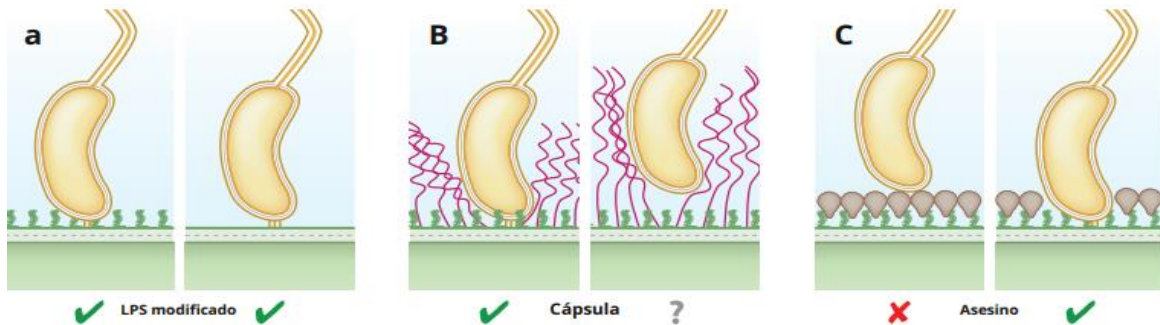


Figura 7. a) *B. bacteriovorus* (amarillo) se adhiere al antígeno O de la membrana externa de un lipopolisacárido (LPS) de una bacteria Gram negativa (izquierda) o sin antígeno O (derecha) y hay depredación. b) *B. bacteriovorus* se adhiere a una bacteria Gram negativa con cápsula, la cápsula de polisacáridos de *E. coli* no es una barrera para la depredación (izquierda), pero de otras no se ha estudiado (derecha). c) *B. bacteriovorus* se adhiere a una bacteria Gram negativa con una capa superficial proteica (capa S), solo en los puntos donde la capa S está incompleta (Derecha) (Negus *et al.*, 2017).

B. bacteriovorus también ataca a presas que se encuentran formando parte de una biopelícula, es decir, formando comunidades bacterianas asociada a una superficie con matriz polimérica extracelular. A pesar de que el desarrollo de bacterias en biopelículas determina más resistencia a antibióticos y antimicrobianos, *Bdellovibrio* sigue atacando y reduce la biomasa de la biopelícula (Negus *et al.*, 2017). En este tipo de depredación, se expresan genes relacionados con la biosíntesis flagelar, la movilidad deslizante, la quimiotaxis y la proteólisis; y puede afectar además a bacterias Gram positivas ya que se liberan muchas enzimas extracelulares (Mookherjee and Jurkevitch, 2021).

5. Ecología

El género *Bdellovibrio* posee una amplia distribución de hábitats por todo el planeta, sobre todo en aguas dulces y en el medio terrestre. Los factores ambientales que se han estudiado para la supervivencia y ecología de *Bdellovibrio* y organismos similares (BALO) son la temperatura, salinidad y distribución de la presa. Estos factores van a influir en el éxito para habitar un nicho particular, en su abundancia, en las funciones celulares y metabólicas y en las interacciones con otros miembros de la comunidad (William and Chen, 2020).

Estos microorganismos participan en los ciclos biogeoquímicos y tienen un papel importante en el medio ambiente, ya que pueden afectar la estructura y la dinámica de las comunidades bacterianas; además, son organismos omnipresentes, se encuentran en aguas dulces, aguas saladas, aguas residuales, suelos, sedimentos, en sistemas vegetales como en el cuerpo de los animales (Mookherjee and Jurkevitch, 2021).

Los BALO tienen una gran importancia funcional en las redes tróficas; son considerados depredadores superiores y afectan fuertemente a la diversidad porque pueden limitar la abundancia de especies dominantes y liberar así nichos para taxones que son menos abundantes (Jabiol *et al.*, 2013). Según Hungate *et al.*, (2021) los depredadores obligados aplican un fuerte control trófico “top-down”, es decir, de arriba abajo en la red alimentaria, y de acuerdo con la teoría ecológica predice, que la importancia funcional de los depredadores aumenta con la productividad.

5.1. Temperatura

La temperatura es importante porque influye sobre el crecimiento bacteriano de los BALO, su temperatura óptima es más baja para los de agua salada que para los de agua dulce y terrestres. Además, no es solo importante la temperatura para los depredadores, sino que también hay que tener en cuenta el crecimiento de las presas (William and Chen, 2020).

Los estudios revelan que los BALO no halotolerantes, es decir, aquellos que no habitan en agua salada, crecen mejor a una temperatura alta de entre 30- 37 °C, y los halotolerantes crecen mejor a una temperatura menor, de entre 20 a 30 °C (William and Chen, 2020). Además, se han conseguido aislar bacterias epibióticas del género *Bdellovibrio* en aguas termales a temperaturas de entre 57-91 °C (Sangwan *et al.*, 2015).

Cuando se supera cierta temperatura, o la temperatura es demasiado baja, los BALO se inhiben. Por lo que, la distribución de los BALO va a depender también de la estación del año, suelen aparecer más bacterias en verano que en invierno, ya que la temperatura también influye en el crecimiento de las presas. Además, el sedimento cuando llega el invierno protege más que la columna de agua, por lo que en invierno se trasladan al sedimento y, en primavera, empiezan a multiplicarse y a salir a la columna de agua (William and Chen, 2020).

5.2. Salinidad

La salinidad es otro parámetro importante. Hay BALO halófitos, que requieren sal para realizar sus funciones celulares y solo se encuentran en lugares salados, con distinto grado de tolerancia a la sal, y los BALO de agua dulce/terrestres que son no halotolerantes se inhiben con concentraciones de sal superiores al 0,5% (William and Chen, 2020).

La sal es un determinante ambiental importante en la ecología, fisiología, genética y distribución de *Halobacteriovorax*, un organismo halófilo. Dentro de los ambientes salinos pueden existir diferencias en el óptimo de sal. El NaCl no se puede reemplazar por otra sal (William and Chen, 2020), y existen diferencias de salinidad en los mares y océanos del planeta por lo que las bacterias han tenido que adaptarse a esas condiciones. Por ejemplo, en el Mar Mediterráneo (Marbach *et al.*, 1976) los BALO requieren más sal que los BALO del océano Pacífico (Taylor *et al.*, 1974).

Se han realizado estudios con cuatro cationes (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+}). Los resultados fueron que, en ausencia de K^+ se redujo mucho la velocidad y movilidad de las bacterias, por lo que disminuyó la depredación y la supervivencia. En el caso de ausencia de Ca^{2+} se inhibe el crecimiento continuo de los depredadores sobre la presa. En ausencia de Mg^{2+} , el ciclo del depredador fue prolongado y alteró las concentraciones de la presa; se piensa que este ion promueve la fijación, penetración, y la formación del bdelloplasto, es decir, interviene en la integridad estructural de los BALO. La conclusión de este estudio es que los efectos de los cationes son específicos e interdependientes, si no están estos cuatro la depredación no ocurriría (William and Chen, 2020).

5.3. Impacto de la presa

Bdellovibrio y BALO son principalmente depredadores obligados, y se encargan de controlar las poblaciones bacterianas. Por tanto, dependen de la presa para la nutrición, reproducción y protección (William and Chen, 2020). Por lo que la presa es un factor ambiental crítico en la distribución de estos organismos, como ya sabemos los BALO se alimentan de bacterias Gram negativas aunque recientemente se ha demostrado que algunas pueden obtener nutrientes de bacterias Gram positivas que forman biopelículas, sin penetrar en la pared celular (Waso *et al.*, 2019). Además, los BALO poseen sistemas quimiotácticos

(Lambert *et al.*, 2003), y les ayudan a detectar altas densidades de presas potenciales, al menos, en los sistemas acuáticos.

Las presas estructuran la comunidad de los BALO a nivel de filotipo (grupo taxonómico); para estos estudios se han utilizado métodos moleculares, como análisis comparativos de ARNr 16S y la metagenómica, para permitir distinguir las comunidades ya que no se cultivan fácilmente en un cultivo puro (William and Chen, 2020).

Los BALO halófilos se alimentan con mayor frecuencia y eficiencia de bacterias marinas que de bacterias terrestres o de agua dulce; en el caso de *Halobacteriovorax* las bacterias que son más susceptibles a la depredación son las especies clasificadas como *Vibrio* con un 97,5%, las bacterias fotótrofas y relacionadas son también altamente susceptibles con un 80%, y, dentro de las eubacterias no marinas que incluía especies entéricas, las más susceptibles fueron *Vibrio cholerae* con un 76,9% y *Aeromonas formicans* con un 100% de susceptibilidad (William and Chen, 2020).

Los BALO no halotolerantes formados por los géneros *Bdellovibrio*, *Peredibacter* y *Bacteriovorax* se encuentran en agua dulce, suelo, aguas residuales, en plantas y animales. Generalmente las bacterias más susceptibles a su depredación son Gram negativas y no halófilas (William and Chen, 2020). Un estudio en aguas residuales y lodos (Yu *et al.*, 2017) demostró que las bacterias más susceptibles a la depredación son la de los géneros *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Raoultella* y *Enterobacter*. Además, se ha conseguido aislar muchas bacterias susceptibles de muestras de suelo y rizosfera (Jurkevitch *et al.*, 2000).

6. Aplicaciones

Las bacterias depredadoras están ganando ahora una mayor atención, en gran parte debido a los informes alarmantes sobre el aumento de la resistencia a los antimicrobianos y un aumento general de la conciencia ambiental. Varios informes han propuesto y demostrado el potencial uso de bacterias depredadoras como antibióticos vivos, agentes de limpieza del agua y biocontrol, además de ser fuente para el descubrimiento de nuevas herramientas biotecnológicas para la investigación (Yair *et al.*, 2009; Pérez *et al.*, 2016).

Cuando fallan los métodos convencionales para la eliminación de microorganismos contaminantes y/o patógenos, los agentes de control biológico, en la que se utiliza

organismos para atacar a una población indeseable, es una técnica cada vez más reconocida por su bajo coste y sus limitados efectos adversos sobre el medio ambiente, la vida silvestre y la salud pública (Kergunteuil *et al.*, 2016) podrían constituir una alternativa viable.

Los BALO tienen muchas posibles aplicaciones, pueden utilizarse en avicultura para reducir a *Salmonella*, en acuicultura para eliminar patógenos, en agricultura para combatir contra fitopatógenos, en la industria alimentaria para prevenir el deterioro de ciertos alimentos por bacterias, y así ser una alternativa natural a los antioxidantes y conservantes, limitar la contaminación bacteriana en estanques abiertos de microalgas para la producción de biocombustibles, como tratamiento de los fangos activados en las plantas de aguas residuales, para reducir la corrosión de tuberías causadas por bacterias reductoras de sulfatos, como agente lítico para la recuperación de productos intracelulares producidos por bacterias Gram negativas (bioextracción de bioplásticos), para combatir contra bacterias patógenas de humanos con resistencia a antibióticos llamadas “ESKAPE” (*Enterobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*), utilizar las enzimas bacterianas como herramientas biotecnológicas, etc. (figura 8) (Bratanis *et al.*, 2020).

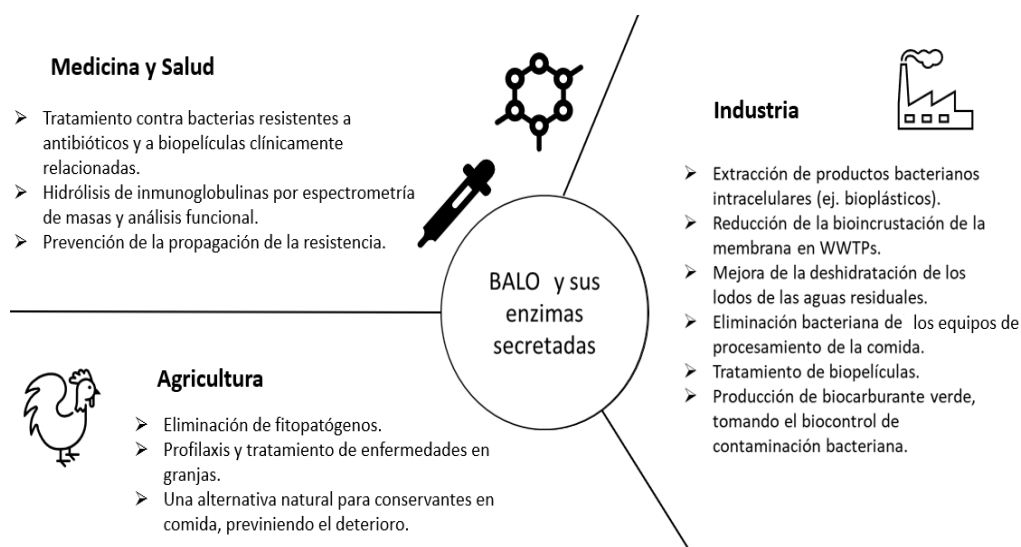


Figura 8. Listados de las posibles aplicaciones biotecnológicas que pueden tener los BALO y sus enzimas secretadas en el campo de medicina, agricultura e industria. Adaptado de Bratanis *et al.*, 2020, elaboración propia.

6.1. Alternativa a los antibióticos

Los antibióticos son productos naturales, o sus derivados semisintéticos, producidos por microorganismos que matan o impiden el crecimiento de otros microorganismos, por lo que las bacterias han necesitado desarrollar algunas formas de resistencia a los antibióticos para sobrevivir (Pérez *et al.*, 2020). Por ejemplo, algunas bacterias inactivan los antibióticos al producir enzimas que los modifican, también pueden alterar su diana, o evitar que los antibióticos se acumulen, ya sea porque se expulsan mediante bombas de eflujo o alterando la permeabilidad de la membrana (Blair *et al.*, 2015).

Los genes de resistencia a los antibióticos se ven favorecidos en la naturaleza debido a la presión selectiva de la producción natural de antibióticos por parte de las bacterias (Pérez *et al.*, 2020). Sin embargo, el uso excesivo o la aplicación incorrecta de estos con fines terapéuticos o en la alimentación animal y en la agricultura, han supuesto una presión selectiva adicional (Gudda *et al.*, 2020) y han acelerado la capacidad de las bacterias para evolucionar y, en consecuencia, conducir a la inevitable aparición y propagación de genes de resistencia. Además, las bacterias pueden acumular múltiples mecanismos de resistencia, y este hecho ha propiciado la aparición de las denominadas superbacterias multirresistentes, que son cepas que han adquirido resistencia a una amplia variedad de antibióticos (Pérez *et al.*, 2020). En medicina, uno de los patógenos multirresistentes a antibióticos que más preocupa es *K. pneumoniae*, y se están realizando estudios *in vitro* e *in vivo* con ratas para poder utilizar a *Bdellovibrio* para su biocontrol (Shatzkes *et al.*, 2016).

Una de las posibles soluciones a esta problema mundial es la utilización de los BALO ya que las pueden depredar y acabar eliminándolas. Se ha demostrado que *B. bacteriovorus* es incapaz de invadir las células de mamíferos y que no tiene efectos patológicos para la salud humana (Bratanis *et al.*, 2020); pudiendo contribuir además a la salud como parte de la microbiota intestinal, pero aún se necesitan hacer más estudios. Además, *Bdellovibrio* es resistente a los *beta*-lactámicos debido a que tiene modificado su peptidoglicano (Kuru *et al.*, 2017), y se puede utilizar como tratamiento combinando con penicilina (Sockett and Lambert, 2004; Dwidar *et al.*, 2012). Por todo esto, es interesante y esperanzador el uso de los BALO ya que se podría convertir en un tratamiento alternativo a los antibióticos para ciertas enfermedades.

Otro problema que existe ante la resistencia de las bacterias es que muchas de las poblaciones bacterianas crecen en biopelículas dado que la matriz polimérica extracelular contiene ADN

extracelular, polisacáridos, lípidos y proteínas (*figura 9*) que dificultan la erradicación de los organismos que están incrustados en ella y le da mayor resistencia ante los agentes antimicrobianos porque dificulta que lleguen hasta las presas e incluso pueden bloquear antibióticos (Mookherjee and Jurkevitch, 2021). Las biopelículas son una fuente de infecciones recurrentes por bacterias patógenas en humanos y en otros animales. Por lo tanto, controlar el crecimiento de biopelículas es de suma importancia.

B. bacteriovorus puede reducir las estructuras de biopelículas formadas por varias especies, aunque no de una forma tan eficiente como cuando las bacterias crecen de forma planctónicas. Interfiere con las biopelículas formadas por patógenos Gram positivos y Gram negativos secretando proteasas extracelulares que degradan e inhiben eficientemente la biopelícula y su formación (*figura 9*), reduciendo así su virulencia (Mookherjee and Jurkevitch, 2021).

B. bacteriovorus también es interesante porque puede contribuir a la salud de la microbiota intestinal humana (Iebba *et al.*, 2013), aunque se considera una bacteria aeróbica obligada puede sobrevivir en condiciones de anoxia, y ciertas cepas pueden llegar a atacar y crecer en condiciones con poco oxígeno en el ambiente (Kadouri and Tran, 2013; Patini *et al.*, 2019).

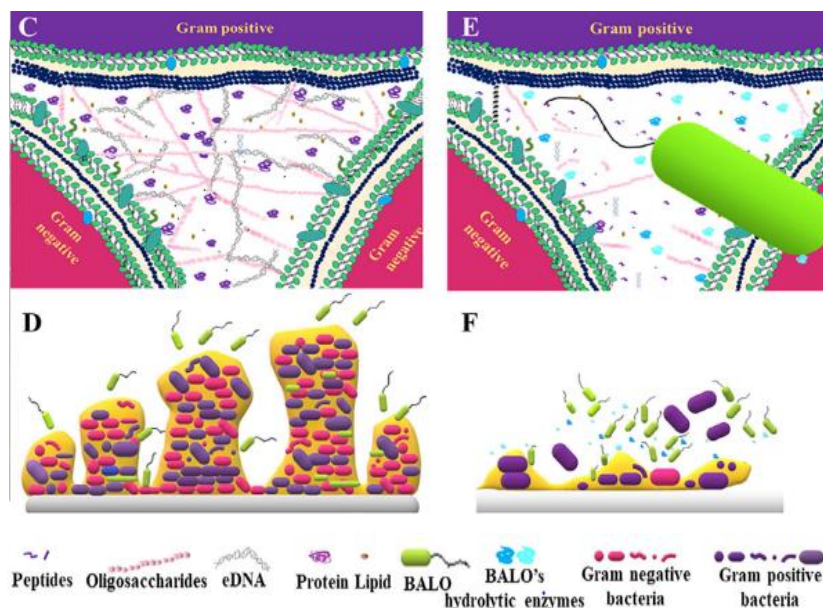


Figura 9. La interacción de *Bdellovibrio* y organismos similares (BALO) con biopelículas compuestas de bacterias mixtas Gram positivas (no presas) y Gram negativas (presas y no presas). C) Matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuestas de ADN extracelular, polisacáridos, lípidos y proteínas. D) Las células BALO en fase de ataque buscan presas y utilizan la matriz EPS como fuente de alimento, iniciando el crecimiento celular. E) Los BALO atacan las células presa y secretan enzimas hidrolíticas (proteasas y nucleasas) que degradan los componentes de la matriz de la biopelícula. F) La biopelícula y las células presa se consumen en gran medida y las células que no son presa y las presas restantes se liberan al medio ambiente. (Mookherjee and Jurkevitch, 2021).

6.2. Tratamiento de aguas

Se está investigando aplicar una técnica combinada en la potabilización del agua, utilizando tratamientos biológicos junto con la depredación de bacterias. En algunas aguas, la presencia de ciertos organismos oportunistas y patógenos puede ser un riesgo para la salud de la zona, este es el caso de *V. cholerae*, una de las causas principales de mortalidad en África (Reyneke *et al.*, 2020).

Con el tratamiento biológico, las bacterias depredadoras eliminarían de forma selectiva a los microorganismos y, posteriormente, se utilizarían unos biofiltros que eliminarían lo no selectivo de los contaminantes bacterianos, es decir, lo que no pueden eliminar las bacterias depredadoras (Reyneke *et al.*, 2020). Se ha propuesto, la utilización de *Bdellovibrio* y BALO como tratamiento previo a la filtración durante el tratamiento de potabilización y en las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR); ya que pueden reducir la carga microbiana inicial, sobre todo, de bacterias Gram negativas (Reyneke *et al.*, 2020).

Uno de los principales problemas es que puede haber transferencia horizontal entre bacterias de los genes de resistencia a los antibióticos en las aguas residuales. Pero el uso de la cepa de *B. bacteriovorus* HD 100 posee una ventaja, es capaz de eliminar bacterias recombinantes degradando completamente el ADN ; controlando así la transferencia horizontal de genes de resistencia en el medio ambiente, mediante la liberación proteasas y nucleasas (Bratanis *et al.*, 2020).

Este tratamiento requiere de más estudio, debido a que este tipo de bacterias depredadoras también se encuentran con algunos problemas; se ha observado que en algunos entornos debido a la entrada de contaminantes se puede reducir la actividad depredadora de *Bdellovibrio*, aunque estos microorganismos se ven menos afectados a los contaminantes si se encuentran formando una biopelícula y se asocian a una superficie. Si hay contaminantes las condiciones se vuelven desfavorables y se forman bdelloplastos para poder sobrevivir y resistir al contaminante (Markelova and Gariev, 2005). Algunos de los contaminantes por los que se ve afectado son altas concentraciones de cadmio (Markelova and Gariev, 2005), además del fenol y la urea, que son compuestos muy comunes en las aguas residuales, también son sensibles a docecilsulfato de sodio (SDS) que es un compuesto que aparece en detergentes (Bratanis *et al.*, 2020).

En la mayoría de plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas, se adopta una tecnología de lodos activados como paso de tratamiento secundario en el que se produce la

mayor parte del proceso de purificación del agua. Los reactores contienen una mezcla de flóculos y jugos; los flóculos comprenden biopelículas bacterianas de múltiples especies, que degradan la materia orgánica, así como el fósforo y el nitrógeno (Mookherjee and Jurkevitch, 2021) .

Feng *et al.*, (2017) observaron que los BALO pueden depredar a especies sensibles dentro de los flóculos al degradar la matriz polimérica extracelular de la biopelícula. Por lo que, los BALO reducen la biomasa microbiana; y la solubilización de los componentes de la biopelícula genera beneficios directos al depredador, ya que al hidrolizar las proteínas, se suministran aminoácidos que soportan altos niveles de ATP (Im *et al.*, 2018).

6.3. Bioextracción de bioplásticos

B. bacteriovorus se podría emplear como agente lítico para la recuperación de bioproductos intracelulares como poliésteres bacterianos o polihidroxialcanoatos (PHA) (Bratanis *et al.*, 2020). El PHA es un poliéster único producido por ciertas bacterias de forma natural. Debido a los problemas relacionados con la eliminación de residuos y la cinética de degradación lenta de los plásticos tradicionales, se están intentando buscar soluciones y los PHA biodegradables se están convirtiendo en una alternativa (Bratanis *et al.*, 2020). Este poliéster es fabricado por algunas bacterias del género *Pseudomonas* y por cepas de *E. coli* recombinantes y, a medida que se va produciendo, se van acumulando en forma de gránulos intracelulares en el citoplasma bacteriano (*figura 10*), lo que hace que su extracción sea difícil y costosa, por lo que se están desarrollando métodos eficientes para su recuperación (Bratanis *et al.*, 2020).

Uno de los métodos más utilizados es la rotura mecánica de las células mediante homogeneización a alta presión (Tamer *et al.*, 1998); otros métodos incluyen centrifugación, filtración, digestión con enzimas o el uso de detergentes, y aunque se recupera gran cantidad del bioproducto, estos métodos requieren altos costes, son procedimientos complicados y generan problemas ambientales (Bratanis *et al.*, 2020).

El problema del uso de *B. bacteriovorus* como agente lítico, es que posee una aplicación general y robusta, ya que se alimenta de una amplia gama de bacterias Gram negativas. Se ha visto que éste produce una despolimerasa extracelular específica (PhaZBd) que degrada el PHA y lo utiliza como fuente de energía y de carbono (Bratanis *et al.*, 2020). Por lo que

para que se puedan utilizar este mecanismo biológico se deben generar mutantes; se utilizan cepas de *B. bacteriovorus* Bd3709 mutantes en el gen *PhaZBd* para la recuperación de bioproductos intracelulares (figura 10), para poder así evitar la degradación de PHA (Bratanis *et al.*, 2020). Con los mutantes se puede recuperar más del 80% del PHA que se acumula en las células de la presa, en comparación con el 54-60% con las cepas de tipo silvestre (Martínez *et al.*, 2016).

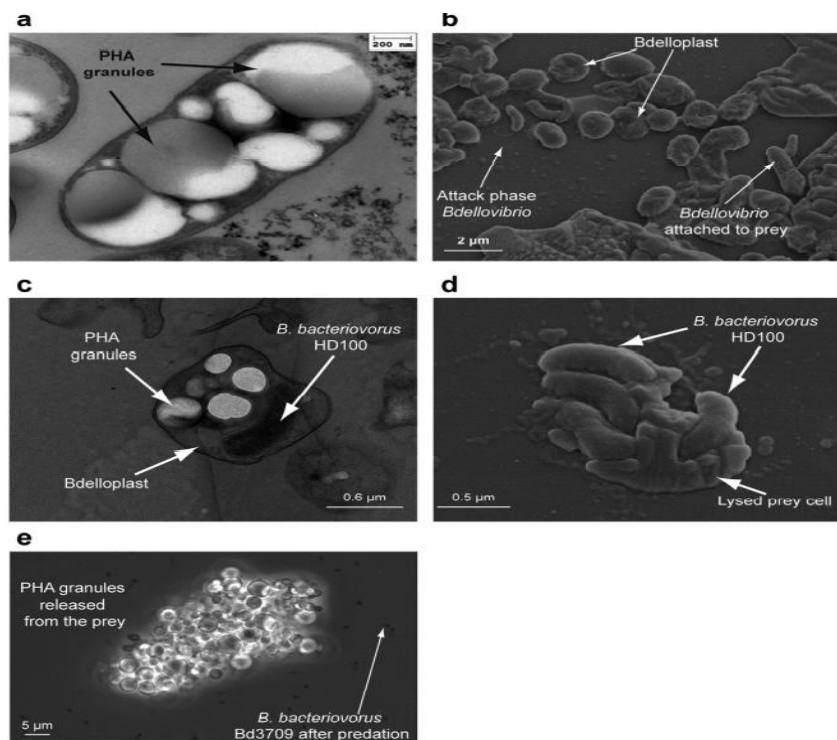


Figura 10. Diferentes etapas de crecimiento de *B. bacteriovorus* HD100 depredando a *Pseudomonas putida* KT2400. (a) Imagen TEM *P. putida* KT2400 acumulando PHA en gránulos. (b) Imagen SEM de *B. bacteriovorus* HD100 depredando a *P. putida* KT2400 en fase de ataque, entrando en el periplasma de la presa y creciendo dentro de la presa en bdelloplastos. (c) Imagen TEM detallada del desarrollo del depredador dentro de la presa en un Bdelloplasto. (d) Imagen SEM detallando la lisis de las células de la presa y liberación de la progenie del depredador en el medio. (e) Gránulos de PHA liberados por *B. bacteriovorus* mutante Bd3709 después de 24 h de depredación. (Martínez *et al.*, 2016).

7. Conclusiones y perspectivas futuras

En este TFG se resumen los conocimientos y la comprensión actual de los tipos de ciclo de vida de *Bdellovibrio*, su biología, los procesos moleculares que ocurren durante la depredación, la ecología, y algunas de sus posibles aplicaciones.

Comprender y caracterizar las etapas de desarrollo de *Bdellovibrio* dentro de la presa requiere de más estudios genómicos, una microscopía muy fina y un seguimiento de la expresión genómica más exhaustivo, pero la tecnología está avanzando y permitiendo conocer más de sus procesos moleculares. Se sabe que existen dos señales necesarias para que ocurra la depredación pero no conocen exactamente, una de ellas se encuentra en la membrana celular de la presa y la otra se encuentra en el citosol de la presa. Además, la mutación en un gen puede llegar a conducir a depredadores HI y que tiene mucho que ver con genes del sistema de secreción y relacionados con el *pili* tipo IV. También se sabe que no todas las cepas bacterianas tienen la misma susceptibilidad a la depredación de *Bdellovibrio*, por ejemplo la capa S proporciona resistencia frente a la depredación. Se desconoce los mecanismos por los cuales el depredador es capaz de diferenciar entre las bacterias presa y no presas.

Se ha podido demostrar que *Bdellovibrio* altera biopelículas bacterianas tanto de Gram positivas como de Gram negativas, y pueden disminuir considerablemente las poblaciones bacterianas nocivas que causan enfermedades en humanos, en otros animales y en plantas. Por lo que, la aplicación de los BALO para fines medioambientales, como biotecnológico son factibles y deben de estudiarse más a fondo. Y debido a la capacidad que tiene *Bdellovibrio* de eliminar a bacterias Gram negativas, este tiene un gran potencial como agente de biocontrol, pero actualmente existe una falta de conocimiento en su ecología. Además se puede utilizar a *Bdellovibrio* como probiótico intestinal ya que no produce una respuesta inflamatoria fuerte.

Debido al aumento de genes de resistencia a los antibióticos acumulado en muchas bacterias patógenas, hacen necesario buscar nuevas alternativas para matar a estos patógenos, y una de las estrategias que están más en auge y que es esperanzadora, es el uso de bacterias depredadoras de esas bacterias patógenas, pero se requiere de más investigación *in vivo* para poder usarlo como una alternativa a los antibióticos.

Queda aún que seguir investigando en toda la biología básica, avanzar en el estudio de otras posibles aplicaciones, y mejorar las aplicaciones actuales, además de poder utilizar otras bacterias más simples y que se puedan llevar a mayor escala con el uso de mutantes necesita de una investigación mayor y es muy importante en el mundo actual.

8. Bibliografía:

- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O. and Piddock, L.J.V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1),42–51. Disponible en: doi: 10.1038/nrmicro3380
- Bonfiglio, G., Neroni, B., Radocchia, G., Marazzato, M., Pantanella, F. and Schippa, S. (2020). Insight into the Possible Use of the Predator *Bdellovibrio bacteriovorus* as a Probiotic. *Nutrients*. 12(8), 2252. Disponible en: doi: 10.3390/nu12082252
- Bratanis, E., Andersson, T., Lood, R. and Bukowska-Faniband, E. (2020). Biotechnological Potential of *Bdellovibrio* and Like Organisms and Their Secreted Enzymes. *Frontiers in Microbiology*. 11. Disponible en: doi: 10.3389/fmicb.2020.00662
- Bukowska-Faniband, E., Andersson, T. and Lood, R. (2020). Studies on Bd0934 and Bd3507, Two Secreted Nucleases from *Bdellovibrio bacteriovorus*, Reveal Sequential Release of Nucleases during the Predatory Cycle. *Journal of Bacteriology*. 202(18). Disponible en: doi: 10.1128/jb.00150-20
- 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. and 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), 79759. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pone.0079759
- Caulton, S. G. and 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. Disponible en: doi: 10.1016/j.mib.2020.07.002
- Chen, H., Athar, R., Zheng, G., and Williams, H. N. (2011). Prey bacteria shape the community structure of their predators. *ISME Journal*, 5(8), 1314-1322. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.4>
- Cotter, T. W. and Thomashow, M. F. (1992). Identification of a *Bdellovibrio bacteriovorus* genetic locus, hit, associated with the host-independent phenotype. *Journal of Bacteriology*. 174(19), 6018–6024. Disponible en: doi: 10.1128/jb.174.19.6018-6024.1992
- Deeg, C. M., Le, T. T., Zimmer, M. M. and Suttle, C. A. (2020). From the Inside Out: an Epibiotic *Bdellovibrio* Predator with an Expanded Genomic Complement. *Journal of Bacteriology*. 202(8). Disponible en: doi: 10.1128/jb.00565-19
- Dwidar, M., Monnappa, A. K., and Mitchell, R. J. (2012). The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Rep*. 45, 71–78. doi: 10.5483/BMBRep.2012.45.2.71
- Ezzedine, J.A., Jacas, L., Desdevises, Y. and Jacquet, S. (2020). *Bdellovibrio* and Like Organisms in Lake Geneva: An Unseen Elephant in the Room? *Frontiers in Microbiology*, 11. Disponible en: doi: 10.3389/fmicb.2020.00098
- Feng, S., Tan, C.H., Constancias, F., Kohli, G.S., Cohen, Y. and Rice, S.A. (2017). Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* significantly reduces viability and alters the microbial community composition of activated sludge flocs and granules. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(4). Disponible en: doi: 10.1093/femsec/fix020
- Giltner, C.L., Nguyen, Y. and Burrows, L.L. (2012). Type IV Pilin Proteins: Versatile Molecular Modules. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76(4), 740–772. Disponible en: doi: 10.1128/MMBR.00035-12
- Gudda, F.O., Waigi, M.G., Odinga, E.S., Yang, B., Carter, L. and Gao, Y. (2020). Antibiotic-contaminated wastewater irrigated vegetables pose resistance selection risks to the gut microbiome. *Environmental Pollution*, 264, p.114752. Disponible en: doi: 10.1016/j.envpol.2020.114752
- 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. y Sockett, R. E. (2012). Discrete Cyclic di-GMP-Dependent Control of Bacterial Predation versus Axenic Growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS Pathogens*, 8(2),1002493.Disponible en: doi: 10.1371/journal.ppat.1002493
- 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. and Propster, J.R. (2021). The Functional Significance of Bacterial Predators. *mBio*, 12(2). Disponible en : doi: 10.1128/mBio.00466-21
- Iebba, V., Santangelo, F., Totino, V., Nicoletti, M., Gagliardi, A., De Biase, R.V., Cucchiara, S., Nencioni, L., Conte, M.P. and Schippa, S. (2013). Higher Prevalence and Abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the Human Gut of Healthy Subjects. *PLoS ONE*, 8(4), p.e61608. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pone.0061608
- Im, H., Dwidar, M. and 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. Disponible en : doi: 10.1038/s41396-018-0154-5

- Jabiol, J., McKie, B.G., Bruder, A., Bernadet, C., Gessner, M.O. and Chauvet, E. (2013). Trophic complexity enhances ecosystem functioning in an aquatic detritus-based model system. *Journal of Animal Ecology*, 82(5), 1042–1051. Disponible en: doi: 10.1111/1365-2656.12079
- Jashnsaz, H., Al Juboori, M., Weistuch, C., Miller, N., Nguyen, T., Meyerhoff, V., McCoy, B., Perkins, S., Wallgren, R., Ray, B. D., Tsekouras, K., Anderson, G. G. and Pressé, S. (2017). Hydrodynamic Hunters. *Biophysical Journal*. 112(6), 1282–1289. Disponible en: doi: 10.1016/j.bpj.2017.02.011
- Johnke, J., Fraune, S., Bosch, T.C.G., Hentschel, U. and Schulenburg, H. (2019). *Bdellovibrio* and Like Organisms Are Predictors of Microbiome Diversity in Distinct Host Groups. *Microbial Ecology*, 79(1), 252–257. Disponible en: 10.1007/s00248-019-01395-7
- Jurkevitch E. (2007). Predatory behaviors in bacteria — diversity and transitions. *Microbe*, 2, 67–73. Disponible en: 10.1128/microbe.2.67.1
- Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B., and Barel, G. (2000). Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2365– 2371. doi: 10.1128/AEM.66.6.2365-2371.2000
- Kadouri, D.E. and Tran, A. (2013). Measurement of Predation and Biofilm Formation under Different Ambient Oxygen Conditions Using a Simple Gasbag-Based System. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5264–5271. Disponible en: doi: 10.1128/AEM.01193-13
- Karunker, I., Rotem, O., Dori-Bachash, M., Jurkevitch, E. y Sorek, R. (2013). A Global Transcriptional Switch between the Attack and Growth Forms of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS ONE*. 8(4), 61850. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pone.0061850
- Kergunteuil, A., Bakhtiari, M., Formenti, L., Xiao, Z., Defosse, E., and Rasmann, S. (2016). Biological control beneath the feet: a review of crop protection against insect root herbivores. *Insects*, 7:70. Disponible en doi: 10.3390/insects7040070
- Korp, J., Vela Gurovic, M.S. and Nett, M. (2016). Antibiotics from predatory bacteria. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, 594–607. Disponible en: doi: 10.3762/bjoc.12.58
- Kuru, E., Lambert, C., Rittichier, J., Till, R., Ducret, A., Derouaux, A., Gray, J., Biboy, J., Vollmer, W., VanNieuwenhze, M., Brun, Y.V. and Sockett, R.E. (2017). Fluorescent D -amino-acids reveal bi-cellular cell wall modifications important for *Bdellovibrio bacteriovorus* predation. *Nature Microbiology*, 2(12), 1648–1657. Disponible en: 10.1038/s41564-017-0029-y
- Koval, S.F. and Bayer, M.E. (1997). Bacterial capsules: no barrier against *Bdellovibrio*. *Microbiology*, 143(3), 749–753. Disponible en: doi: 10.1099/00221287-143-3-749
- Koval, S.F. and Hynes, S.H. (1991). Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 173(7), 2244–2249. Disponible en: doi: 10.1128/jb.173.7.2244-2249.1991
- 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, R.E. and Lovering, A.L. (2015). Ankyrin-mediated self-protection during cell invasion by the bacterial predator *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Nature Communications*, 6(1), 8884. Disponible en: doi: 10.1038/ncomms9884
- Lambert, C., Chang, C.-Y., Capeness, M.J. and Sockett, R.E. (2010). The First Bite— Profiling the Predatosome in the Bacterial Pathogen *Bdellovibrio*. *PLoS ONE*, 5(1), 8599. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pone.0008599
- Lambert, C., Morehouse, K. A., Chang, C.-Y. and Sockett, R. E. (2006). *Bdellovibrio*: growth and development during the predatory cycle. *Current Opinion in Microbiology*. 9(6), 639–644. Disponible en: doi: 10.1016/j.mib.2006.10.002
- Lambert, C., Smith, M.C.M. and Sockett, R.E. (2003). A novel assay to monitor predator-prey interactions for *Bdellovibrio bacteriovorus* 109 J reveals a role for methyl-accepting chemotaxis proteins in predation. *Environmental Microbiology*, 5(2), 127–132. Disponible en: doi: 10.1046/j.1462-2920.2003.00385.x
- Livermore, D.M., Blaser, M., Carrs, O., Cassell, G., Fishman, N., Guidos, R., Levy, S., Powers, J., Norrby, R., Tillotson, G., Davies, R., Projan, S., Dawson, M., Monnet, D., Keogh-Brown, M., Hand, K., Garner, S., Findlay, D., Morel, C. and Wise, R. (2011). Discovery research: the scientific challenge of finding new antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(9), 1941–1944. Disponible en: 10.1093/jac/dkr262
- Luciano, J., Agrebi, R., Le Gall, A. V., Wartel, M., Fiegna, F., Ducret, A., Brochier-Armanet, C. y Mignot, T. (2011). Emergence and Modular Evolution of a Novel Motility Machinery in Bacteria. *PLoS Genetics*. 7(9), 1002268. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pgen.1002268
- Marbach, A., Varon, M., and Shilo, M. (1976). Properties of marine *bdellovibri*os. *Microbial Ecol.* 2, 284–295. Disponible en: doi: 10.1007/BF02011648

- Martínez, V., Herencias, C., Jurkevitch, E. and Prieto, M.A. (2016). Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates. *Scientific Reports*, 6(1). Disponible en: doi : 10.1038/srep24381
- Markelova, N. Y. and Gariev, I. A. (2005). Predatory bacteria *Bdellovibrio*: survival strategy. *Process Biochemistry*. 40(3-4), 1089–1094. Disponible en: doi: 10.1016/j.procbio.2004.03.017
- Milner, D. S., Ray, L. J., Saxon, E. B., Lambert, C., Till, R., Fenton, A. K. and Sockett, R. E. (2020). DivIVA Controls Progeny Morphology and Diverse ParA Proteins Regulate Cell Division or Gliding Motility in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Frontiers in Microbiology*. 11. Disponible en: doi: 10.3389/fmicb.2020.00542
- Milner, D.S., Till, R., Cadby, I., Lovering, A.L., Basford, S.M., Saxon, E.B., Liddell, S., Williams, L.E. and Sockett, R.E. (2014). Ras GTPase-Like Protein MglA, a Controller of Bacterial Social-Motility in Myxobacteria, Has Evolved to Control Bacterial Predation by *Bdellovibrio*. *PLoS Genetics*, 10(4), 1004253. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pgen.1004253
- Mookherjee, A. and Jurkevitch, E. (2021). Interactions between *Bdellovibrio* and like organisms and bacteria in biofilms: beyond predator–prey dynamics. *Environmental Microbiology*. 24(3), 998-1011. Disponible en: doi:10.1111/1462-2920.15844
- Negus, D., Moore, C., Baker, M., Raghunathan, D., Tyson, J. and Sockett, R. E. (2017). Predator Versus Pathogen: How Does Predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* Interface with the Challenges of Killing Gram-Negative Pathogens in a Host Setting?. *Annual Review of Microbiology*. 71(1), 441–457. Disponible en: doi: 10.1146/annurev-micro-090816-093618
- Patini, R., Cattani, P., Marchetti, S., Isola, G., Quaranta, G. and Gallenzi, P. (2019). Evaluation of Predation Capability of Periodontopathogens Bacteria by *Bdellovibrio Bacteriovorus HD100*. An in Vitro Study. *Materials*, 12(12), 2008. Disponible en: doi: 10.3390/ma12122008
- Pérez, J., Contreras-Moreno, F. J., Marcos-Torres, F. J., Moraleda-Muñoz, A. and Muñoz-Dorado, J. (2020). The antibiotic crisis: How bacterial predators can help. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 18, 2547–2555. Disponible en: doi: 10.1016/j.csbj.2020.09.010
- Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F. J., and Muñoz-Dorado, J. (2016). Bacterial predation: 75 years and counting! *Environ. Microbiol.* 18, 766–779. Disponible en: doi: 10.1111/1462-2920.13171
- Prehna, G., Ramirez, B. E. and Lovering, A. L. (2014). The Lifestyle Switch Protein Bd0108 of *Bdellovibrio bacteriovorus* Is an Intrinsically Disordered Protein. *PLoS ONE*. 9(12), 115390. Disponible en: doi: 10.1371/journal.pone.0115390
- Reyneke, B., Waso, M., Khan, S. and Khan, W. (2020). Rainwater treatment technologies: Research needs, recent advances and effective monitoring strategies. *Current Opinion in Environmental Science & Health*. 16, 28–33. Disponible en: doi: 10.1016/j.coesh.2020.02.010
- Roschanski, N., Klages, S., Reinhardt, R., Linscheid, M. and Strauch, E. (2011). Identification of Genes Essential for Prey-Independent Growth of *Bdellovibrio bacteriovorus HD100*. *Journal of Bacteriology*, 193(7), 1745–1756. Disponible en: doi:10.1128/JB.01343-10
- Rotem, O., Nesper, J., Borovok, I., Gorovits, R., Kolot, M., Pasternak, Z., Shin, I., Glatter, T., Pietrokovski, S., Jenal, U. y Jurkevitch, E. (2015a). An Extended Cyclic Di-GMP Network in the Predatory Bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 198(1), 127–137. Disponible en: doi:10.1128/jb.00422-15
- Rotem, O., Pasternak, Z., Shimoni, E., Belausov, E., Porat, Z., Pietrokovski, S. and Jurkevitch, E. (2015b). 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), 6028–6037. Disponible en: doi: 10.1073/pnas.1515749112
- Sangwan, N., Lambert, C., Sharma, A., Gupta, V., Khurana, P., Khurana, J. P., Sockett, R. E., Gilbert, J. A. y Lal, R. (2015). Arsenic rich Himalayan hot spring metagenomics reveal genetically novel predator-prey genotypes. *Environmental Microbiology Reports*. 7(6), 812–823. Disponible en: doi: 10.1111/1758-2229.12297
- Shatzkes, K., Singleton, E., Tang, C., Zuena, M., Shukla, S., Gupta, S., Dharani, S., Onyile, O., Rinaggio, J., Connell, N.D. and Kadouri, D.E. (2016). Predatory Bacteria Attenuate *Klebsiella pneumoniae* Burden in Rat Lungs. *mBio*, 7(6). Disponible en: doi: 10.1128/mBio.01847-16
- Shemesh, Y. and Jurkevitch, E. (2003). Plastic phenotypic resistance to predation by *Bdellovibrio* and like organisms in bacterial prey. *Environmental Microbiology*, 6(1), 12–18. Disponible en: 10.1046/j.1462-2920.2003.00530.x
- Snyder, A. R., Williams, H. N., Baer, M. L., Walker, K. E., and Stine, O. C. (2002). 16S rDNA sequence analysis of environmental *Bdellovibrio*-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(6), 2089-2094. Disponible en: doi: 10.1099/ijs.0.02261-
- Socket, R.E. and Lambert, C. (2004). *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 669–675. Disponible en: 10.1038/nrmicro959

- Stolp, H. and Starr, M.P. (1963). *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie van Leeuwenhoek*, 29(1), 217–248. Disponible en: doi: 10.1007/BF02046064.
- Tamer, I.M., Moo-Young, M. and Chisti, Y. (1998). Disruption of *Alcaligeneslatus* for Recovery of Poly(β -hydroxybutyric acid): Comparison of High-Pressure Homogenization, Bead Milling, and Chemically Induced Lysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 37(5), 1807–1814. Disponible en: doi: 10.1021/ie9707432
- Taylor, V.I., Baumann, P., Reichelt, J.L. and Allen, R.D. (1974). Isolation, enumeration, and host range of marine *bdellovibrios*. *Archives of Microbiology*, 98(1), 101–114. Disponible en: doi: 10.1007/BF00425273
- Waso, M., Khan, S. and Khan, W. (2019). Assessment of predatory bacteria and prey interactions using culture-based methods and EMA-qPCR. *Microbiological Research*, 228, 126305. Disponible en: doi:10.1016/J.MICRES.2019.126305
- Williams, H. N. and Chen, H. (2020). Environmental Regulation of the Distribution and Ecology of *Bdellovibrio* and Like Organisms. *Frontiers in Microbiology*. 11. Disponible en: doi: 10.3389/fmicb.2020.545070
- Yair, S., Yaacov, D., Susan, K. and Jurkevitch, E. (2009). Small Eats Big: Ecology and Diversity of *Bdellovibrio* and Like Organisms, and their Dynamics in Predator-Prey Interactions. *Sustainable Agriculture*, 275–284. Disponible en: 10.1007/978-90-481-2666-8_18
- Yu, R., Zhang, S., Chen, Z. and Li, C. (2017). Isolation and application of predatory *Bdellovibrio*-and-like organisms for municipal waste sludge biolysis and dewaterability enhancement. *Frontiers of Environmental Science & Engineering*, 11(1). Disponible en: doi: 10.1007/s11783-017-0900-3