



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**Bacterias depredadoras: *Bdellovibrio*
bacteriovorus y sus posibles aplicaciones**

Autor: María Isabel Cortés Prieto

Fecha: Junio 2019

Tutor: Víctor Jiménez Cid

ÍNDICE

I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	2
1. Bacterias depredadoras de bacterias	2
2. <i>Bdellovibrio</i> y organismos similares (BALOs)	2
3. BALOs como herramienta biotecnológica	4
a. Potencial terapéutico.....	4
b. Agente de biocontrol.....	5
III. OBJETIVOS	5
IV. METODOLOGÍA	5
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	5
1. Aplicaciones terapéuticas	6
a. Los BALOs no son patógenos para organismos superiores	6
b. Los BALOs no producen reacciones inmunogénicas graves	7
c. Efecto de los BALOs sobre bacterias patógenas	8
d. Efecto de los BALOs sobre biofilms	8
e. Utilización de <i>B.bacteriovorus</i> como “antibiótico vivo”	9
f. Desarrollo de resistencias frente a <i>Bdellovirbio</i>	12
2. Aplicaciones en biocontrol	13
a. Agricultura.....	13
b. Acuicultura y granjas de animales	14
c. Seguridad del agua y de los alimentos.....	14
3. Otras aplicaciones: <i>Bdellovibrio</i> como biocatalizador	15
4. Limitaciones de los BALOs	15
5. Perspectiva de futuro	16
VI. CONCLUSIONES	17
VII. BIBLIOGRAFÍA	18

I. RESUMEN

Bdellovibrio bacteriovorus es un pequeño depredador de la clase Delta Proteobacteria que ha evolucionado para invadir, matar y digerir otras bacterias Gram-negativas en los suelos y entornos acuáticos. La investigación dedicada a estudiar el sofisticado armamento de estos depredadores tiene como objetivo encontrar nuevas estrategias para combatir las alarmantes resistencias a antibióticos que están adquiriendo muchas bacterias causantes de enfermedades y mortalidad en el mundo. *B. bacteriovorus* posee ciertas características que lo hacen único y que le posicionan como buen candidato en esta carrera científica pues, a diferencia de otros agentes bactericidas, es capaz de depredar sobre biofilms y sobre células que poseen una cápsula bacteriana protectora, lo que supone un gran avance para la terapéutica. Además, estudios *in vivo* han demostrado que no es tóxico ni inmunogénico en diversos modelos animales, y por haber sido encontrado en el intestino de mamíferos se puede hipotetizar su utilidad como probiótico. Por su amplio arsenal de presas, es considerado como un posible agente de biocontrol en varios sectores como la agricultura, ganadería o industria alimentaria. En conclusión, se puede destacar que en las últimas décadas se han conseguido enormes avances que parecen acercarnos a la aplicación práctica de los bdellovibrios, pero la realidad es que aún queda mucho camino por recorrer.

II. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. Bacterias depredadoras de bacterias

La depredación es uno de los tipos de interacciones más comunes. Sus raíces parecen ser antiguas, y podría haber existido desde los orígenes de la vida. La encontramos en todos los niveles: desde los virus más pequeños que parasitan células huésped para después lisarlas, hasta el más grande de los tiburones del océano, y está presente en prácticamente todos los ambientes (1). En el caso de los depredadores eucariotas, suelen depredar sobre células de tamaño inferior, mientras que en procariotas ocurre lo contrario: una célula pequeña depreda sobre una más grande (2). Refiriéndonos a este segundo grupo, podemos diferenciar entre depredadores obligados (necesitan de la presa para su supervivencia) y facultativos (independientes de la presa para replicarse). Existen además diversas estrategias de depredación que se clasifican en función de la interacción con la presa:

- Depredación en grupo, en la que los depredadores secretan enzimas de forma coordinada para degradar las bacterias cercanas.
- Depredación epibiótica, en la que el depredador degrada los componentes de la presa anclándose a la pared celular de la misma.
- Invasión citoplasmática, en la que, como su propio nombre indica, el depredador se divide y establece en el citoplasma de la presa.
- Depredación periplasmática, en la que el depredador invade y crece en un compartimento específico de las bacterias Gram-negativas: el periplasma. A esta categoría pertenece la bacteria que nos concierne, *B. bacteriovorus* (3).

2. *Bdellovibrio* y organismos similares (BALOs)

El género *Bdellovibrio* se conoce desde la década de los sesenta y, como muchos otros descubrimientos científicos, ocurrió por serendipia, cuando Heinz Stolp, en Berlín, trataba de aislar bacteriófagos activos frente a especies de *Pseudomonas* (4).

Los depredadores obligados *Bdellovibrio* spp., *Bacteriovorax* spp. y *Peridibacter* spp. fueron clasificados dentro de la categoría Delta Proteobacteria, aunque posteriormente se ha

descubierto que algunos depredadores obligados pertenecen a otras clases de proteobacterias, como es el caso de *Micavibrio* spp. (Alfa Proteobacteria).

Actualmente se ha conseguido aislarlos de ambientes muy diversos, tanto acuáticos como terrestres. También de hábitats más “exóticos” como biofilms, depósitos de aguas termales, sedimentos marinos árticos e hipersalinos e incluso en capas anaeróbicas de lagos sulfurosos (2). Asimismo, se han encontrado en heces de mamíferos, indicando que, probablemente, están presentes en el intestino de este tipo de animales, sugiriendo su posible uso como probióticos (5).

Los BALOs (*Bdellovibrio And Like Organisms*) están siendo estudiados desde entonces. Son bacilos curvados, de tamaño pequeño (0,3mm – 2 mm), aeróbicos y altamente móviles, que depredan obligadamente otras bacterias Gram-negativas (3). Es interesante el caso de *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 pues, a pesar de su pequeño tamaño, posee un genoma de 3,78 Mb, el cual contiene un enorme arsenal hidrolítico crucial durante la penetración en la presa, degradación de sus componentes y lisis de la misma (150 genes codifican proteasas, 20 DNAasas, 9 RNAasas, 15 lipasas, 10 glucanasas) (6).

Gracias a las técnicas de la microscopía electrónica y la microscopía de contraste de fases, se ha podido estudiar el ciclo de vida de este depredador. Es un ciclo bifásico, pues consta de dos etapas bien diferenciadas: una primera fase de ataque, en la que los depredadores no se pueden replicar y se mueven continuamente gracias a su flagelo ondulante para penetrar en la célula; y una fase posterior de crecimiento en la que *B. bacteriovorus*, ya dentro del periplasma de la célula presa, crece y se divide. Este proceso culmina con la lisis de la bacteria huésped, quedando los bdellovibrios libres en el espacio extracelular, preparados para atacar a otras células.

Para localizar a la presa, además del movimiento gracias al flagelo, es importante tener en cuenta la quimiotaxis. Tras este paso, el bdellovibrio se unirá al huésped por su extremo no flagelado, siendo inicialmente un proceso reversible, pero tras unos minutos el anclaje se hace irreversible. Después, provoca la formación de un pequeño poro en la membrana externa de la presa a través del cual penetra en el espacio periplásmico de la misma. Este paso requiere una gran acción enzimática por parte del depredador, siendo las enzimas peptidasas y glicanasas las liberadas mayoritariamente en los inicios, pues son las encargadas de degradar el peptidoglicano. Por la actividad hidrolítica de los bdellovibrios, la pared celular de la presa se va deteriorando.

Cabe destacar que, una vez dentro de la célula, *B. bacteriovorus* pierde su movilidad flagelar, se estabiliza en el periplasma y forma en bdelloplasto, una estructura esférica y osmóticamente estable limitada por la membrana externa de la presa. A medida que va creciendo dentro del bdelloplasto, la pared celular de la presa se ve modificada, resultando en un redondeamiento de la célula huésped. En esta etapa el crecimiento se hace más evidente, ya que el BALO se elonga formando una larga estructura espiral, y el DNA se replica múltiples veces.

El siguiente paso es la septación, que ocurre cuando el depredador detecta que el citoplasma de la presa está exhausto, y da lugar a la separación en células diferentes. Esta división ocurre por fisión múltiple, y suele dar lugar a entre 5 y 8 células hijas. Éstas empiezan a desarrollar su propio flagelo, que tras la lisis de la presa les permitirá nadar libremente en el medio ambiente para buscar nuevas presas. El proceso completo de multiplicación de los bdellovibrios conlleva una media de 4 horas (2,4,5).

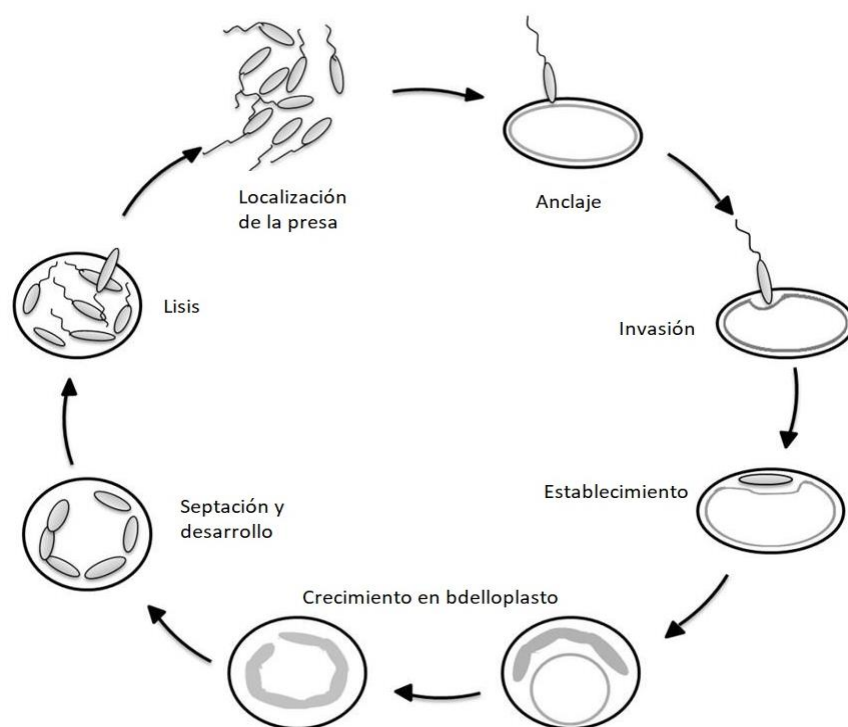


Figura 1: ciclo de vida de *B. bacteriovorus*. Adaptado de: (7)

El ciclo de vida descrito se denomina “dependiente”, pues involucra a la bacteria presa. A pesar de esto, se han podido aislar cepas mutantes de *B. bacteriovorus* independientes de la presa (HI), que aparecen espontáneamente con una frecuencia de 1 entre 10^6 - 10^7 . En los años 90 se vinculó esta mutación a una zona del genoma que denominaron *locus hit*, aunque no se detectó en otras especies del género *Bdellovibrio* (*B. stolpii* o *B. starrii*). Descubrir qué genes son los implicados sería atractivo a nivel de laboratorio, porque simplificaría los cultivos depredador-presa a cultivos que contuvieran únicamente al depredador (8).

3. BALOs como herramienta biotecnológica

Aunque el papel de los bdellovibrios en la naturaleza no se conoce por completo, lo que es seguro es que son omnipresentes en los ambientes terrestres, marinos y de agua dulce y que en ellos controlan el tamaño de la población y la diversidad microbiana local (3). Por tanto, se vislumbra su potencial uso como agente terapéutico y de biocontrol.

a. Potencial terapéutico

Nos encontramos en una época en la que las bacterias patógenas que provocan infecciones están desarrollando resistencia a los antibióticos clásicos. Muchas de ellas adquieren las resistencias por una transmisión horizontal de genes, y se conocen bajo la denominación de bacterias “Multirresistentes”, MDR por sus siglas en inglés (*Multidrug-resistant*). Son especialmente alarmantes las infecciones nosocomiales causadas por los patógenos del grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* spp.), pues su tratamiento supone un enorme desafío en la práctica clínica. De hecho, la Organización Mundial de la Salud publicó en 2017 la primera lista de “patógenos prioritarios” incluyendo aquellas bacterias especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos, ya que pueden provocar infecciones graves y son a menudo letales. Están

clasificados por nivel de prioridad, en tres categorías: patógenos de prioridad crítica, prioridad alta y prioridad media (9).

Surge por tanto la necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamiento, ante la cual se ha propuesto utilizar bacterias depredadoras como “antibióticos vivos” (5). Las bacterias depredadoras más estudiadas son *B. bacteriovorus*, que invade la bacteria, y *Micavibrio aeruginosovorax*, que se adhiere al exterior de la misma para eliminarla (depredación epibiótica) (10).

b. Agente de biocontrol

Además del posible uso en clínica de los BALOs, hay otras aplicaciones importantes con gran extensión económica y con implicaciones ecológicas, como son los sectores de la agricultura, acuicultura y la industria alimentaria. Algunos patógenos transmitidos por los alimentos o el agua como son *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., o *Listeria monocytogenes* son responsables de frecuentes enfermedades y mortalidad en humanos. También se producen pérdidas en las cosechas y enfermedades de plantas a causa de otros patógenos como *Erwinia*, *Pectobacterium* y *Pseudomonas* spp. Sin embargo, existe una gran dificultad en el control de este tipo de bacterias debido a la escasez de productos bactericidas disponibles y a las regulaciones que limitan el uso de antibióticos. Es por ello que se valora la utilización de BALOs como posible alternativa (11).

III. OBJETIVOS

La finalidad del siguiente trabajo es poner de relieve las posibles aplicaciones de la bacteria depredadora *B. bacteriovorus*, tanto a nivel clínico como posible alternativa a antibióticos frente a bacterias resistentes a los mismos, como a nivel industrial como agente de biocontrol. Se ilustran los posibles beneficios que este tipo de terapia podría aportar en comparación con los antibióticos clásicos, así como las limitaciones de esta novedosa herramienta biológica.

IV. METODOLOGÍA

Para la realización de este trabajo se ha procedido a una revisión bibliográfica de distintos artículos científicos utilizando como palabras clave *predatory bacteria*, *BALOs* y *Bdellovibrio bacteriovorus*. Con este fin, se revisaron diversas bases de datos tales como PubMed y Google Académico, así como información contenida en libros y revistas científicas. Se relacionó asimismo las palabras clave mencionadas con otras como *therapeutic*, *biofilms* y *biocontrol*, con la finalidad de profundizar en los contenidos referentes a estas temáticas, pues constituyen el grueso principal de este trabajo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comparado con otros depredadores de bacterias, el género *Bdellovibrio* ha recibido más atención en las últimas décadas, debido a su interesante ciclo de vida y a su elevado potencial como agente antibacteriano en la industria, agricultura y medicina (7). Aproximadamente una década después del descubrimiento de este depredador, los investigadores comenzaron a valorar las posibles aplicaciones de esta bacteria única, por ejemplo, para la lucha contra los patógenos de las plantas y en la reducción de la contaminación en industrias alimentarias. Sin embargo, aún queda mucha investigación por delante.

1. Aplicaciones terapéuticas

Debido a la necesidad inminente de desarrollar nuevos métodos para erradicar bacterias multirresistentes, se pueden evidenciar las ventajas que la utilización de bacterias depredadoras podría aportar: (i) son muy específicos para infectar exclusivamente bacterias, siendo inocuos para los seres eucariotas; (ii) son bien tolerados por los seres humanos, pues su superficie es poco inmunogénica y no inducirá reacciones inmunitarias severas; (iii) depredan sobre una amplia gama de patógenos Gram-negativos humanos; (iv) son capaces de atacar tanto cultivos aislados como biofilms; (v) se cree que las células huésped no desarrollan resistencia como resultado de la depredación (12).

a. Los BALOs no son patógenos para organismos superiores

Los bdellovibrios son altamente específicos para infectar bacterias y por lo tanto son inocuos para los organismos no bacterianos. Pero, para poder utilizar *B. bacteriovorus* en terapéutica, su seguridad debe ser confirmada previamente. Varios estudios y técnicas han demostrado este hecho. El primer estudio data de 1973, en el que se demostró que *B. bacteriovorus* no era patógeno al inyectarlo en ratones, conejos y conejillos de Indias (7). Otro estudio realizado también con modelos animales fue llevado a cabo pocos años después por el grupo de Kramer (13). En este estudio, la cepa MS7 de *Bdellovibrio* fue estudiada en peces, ratones y ranas tras inocularla vía oral. Esta cepa era capaz de multiplicarse en el intestino de estos animales *in vitro*, pero los resultados *in vivo* no fueron concluyentes, pues el número de células viables de *Bdellovibrio* MS7 descendía gradualmente después de 24 horas.

En 1978, Lenz y Hespell co-cultivaron diferentes cepas de BALOs (*B. bacteriovorus* 109 J, *Bacteriovorax stolpii* UKi2 y *Peredibacter starrii* A3.12) con células animales aisladas de hígados de ratón, riñones de hámster y glándulas mamarias bovinas (14). En sus experimentos, los BALOs no crecían ni se adherían a las células animales. También realizaron cultivos con suspensiones eritrocíticas, en los cuales se observó un nivel muy bajo de penetración de los BALOs, y ningún crecimiento de los mismos. Por último, inyectaron estas cepas en óvulos de conejo para determinar si existiría crecimiento en este tipo de células, obteniendo resultados negativos al respecto tras 18 horas.

Mientras que la capacidad de las bacterias depredadoras para controlar las infecciones bacterianas *in vitro* está bien documentada (15), el efecto *in vivo* de estos depredadores aún no ha sido detenidamente examinado. Por esta razón, se han realizado varios estudios durante los últimos años a cerca de la seguridad *in vivo* de las bacterias del género *Bdellovibrio*, para su potencial utilización como antibiótico vivo.

En un estudio realizado en 2011 por el grupo de investigación de Sockett se administraron BALOs por vía oral a pollitos, junto con antiácidos para mejorar la supervivencia del bdellovibrio en el estómago y facilitar la colonización intestinal. Obtuvieron como resultado que la presencia de los BALOs modificaba ligeramente la microbiota natural del intestino, pero no había efectos adversos sobre el crecimiento y el bienestar de los animales (16).

En 2015 se examinó la seguridad en la inoculación de dos cepas de *Bdellovibrio* (*B. bacteriovorus* 109J y HD100) por vía respiratoria e intravenosa en ratones. Al introducir los depredadores vía intranasal se produjo una respuesta inflamatoria moderada después de 1 hora, pero ésta no se mantuvo tras 24 horas del experimento. La inyección intravenosa causó un aumento de IL-6 en el riñón y el bazo y TNF (Factor de Necrosis Tumoral) en el hígado durante las 3 horas post-exposición, pero también retornaron a sus niveles basales posteriormente. Además, el análisis histológico de los tejidos no mostró alteraciones

patológicas causadas por las bacterias depredadoras, y éstas se eliminaban rápida y eficazmente del huésped (17).

Willis et al. caracterizaron la capacidad depredadora de *B. bacteriovorus* en larvas de pez cebra, inyectándolo frente al patógeno humano resistente a antibióticos *Shigella flexneri*. Los resultados probaban que el depredador era capaz de atenuar a la población presa, sin efectos adversos claros para el organismo huésped. Además, los depredadores ayudan al sistema inmunológico a promover la supervivencia del animal tras la infección. Por último, el depredador era engullido y finalmente eliminado por los neutrófilos y macrófagos del huésped, habiendo tenido tiempo suficiente para acabar con su presa (18). Romanowski et al. demostraron que *B. bacteriovorus* no es tóxico cuando se aplica a la superficie ocular de ratones vivos, para el tratamiento potencial de infecciones oculares. Además, la presencia de bacterias depredadores no inducía signos clínicos de inflamación ni inhibía la cicatrización de heridas corneales (19).

Los modelos animales *in vivo* han demostrado que las bacterias predatorias no son tóxicas ni inmunogénicas en roedores. Con el fin de considerar el uso de bacterias predatorias como antibióticos vivos, es importante investigar su efecto en las células humanas. Dos estudios recientes (20,21) han demostrado la inocuidad de los bdellovibrios en nueve líneas celulares humanas diferentes, evaluando para ello la respuesta de citoquinas. Para cada una de las combinaciones, la respuesta de citoquinas era negativa o, a lo sumo, leve, en comparación con los resultados obtenidos con *P. aeruginosa* PA14 y *E. coli* MG1655, que fueron utilizadas como control positivo (22).

En conclusión, y con la base de todos estos informes, se puede concluir que BALOs, en gran medida, pueden considerarse no patógenos y no tóxicos para los animales y los seres humanos.

b. Los BALOs no producen reacciones inmunogénicas graves

Asimismo, se han llevado a cabo estudios sobre la inmunogenicidad de bacterias del género *Bdellovibrio*, y los resultados parecen muy prometedores para la salud humana. En primer lugar, las capas de lipopolisacárido de los BALOs resultaron ser únicas en cuanto a que su Lípido A contiene residuos de α -D-manosa en lugar de grupos fosfato y, por lo tanto, está desprovisto de cualquier grupo cargado negativamente. Como consecuencia, tienen una afinidad a los receptores de LPS de las células humanas significativamente muy inferior, además de una actividad endotóxica mucho menor en comparación con la de *E. coli*. Esto último se confirmó porque inducía una producción muy baja de TNF- α e interlequina-6 por parte de los macrófagos humanos cuando eran expuestos a estas bacterias (23).

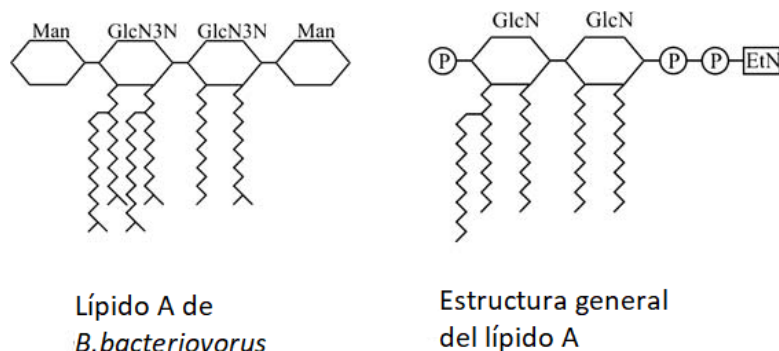


Figura 2: estructura del lípido A. Adaptado de: (24)

c. Efecto de los BALOs sobre bacterias patógenas

En general, en comparación con otras herramientas biológicas, como los bacteriófagos, *B. bacteriovorus* y otros BALOs muestran un rango muy amplio e inespecífico de depredación sobre sus células huésped. Por lo tanto, pueden atacar bacterias Gram negativas de géneros muy diversos y diferentes (25).

Se ha descrito la gama de presas de *B. bacteriovorus* 109J, entre las que destacan cepas de *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Listonella*, *Morganella*, *Proteus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* y *Yersinia* (26). Aunque según sus resultados, *B. bacteriovorus* 109 J no podía atacar a *Campylobacter*, un estudio realizado por Markelova (27) demostró que otra cepa de *B. bacteriovorus*, 100NCJB, sí podría depredar sobre *Campylobacter jejuni* así como sobre *Helicobacter pylori*. Estos resultados demuestran que muchos patógenos Gram-negativos que infectan a los humanos, así como aquellos que infectan animales y vegetales, pueden ser depredados por una o más cepas de *Bdellovibrio* (7). Otro estudio posterior estableció, tras realizar experimentos de depredación, que *B. bacteriovorus* tiene la capacidad de atacar cepas clínicas de una variedad de bacterias Gram-negativas productoras de β -lactamasas independientemente de su resistencia a los antibióticos. Por lo tanto, podrían utilizarse como agentes terapéuticos donde otros antimicrobianos fallan. Se utilizaron como depredadores las cepas 109J y HD100 de *Bdellovibrio*, y entre las presas destacaban *A. baumannii*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, y *Pseudomonas* spp. (15).

Aunque la mayoría de las presas reportadas de *B. bacteriovorus* son bacterias Gram-negativas, parece ser que en caso de deficiencia de nutrientes esta bacteria depredadora también puede eliminar algunas especies Gram-positivas, entre ellas *S. aureus*. Este comportamiento es relevante por su posible uso terapéutico en varias patologías como la fibrosis quística, porque en ella coexisten frecuentemente *S. aureus* y *P. aeruginosa* como agentes infecciosos. En este mismo estudio se observó que *B. bacteriovorus* no depredaba otros Gram-positivos como *Streptococcus mutans* (28).

d. Efecto de los BALOs sobre biofilms

Los biofilms se componen de comunidades de células bacterianas asociadas a una superficie con una matriz polimérica extracelular (29). En general, la complicación principal resultante de la formación de estos biofilms es que las bacterias de su interior están mejor protegidas, y se vuelven mucho más resistentes al tratamiento antibiótico en comparación con las células que crecen en cultivos planctónicos y esto, a su vez, contribuye a la progresión de la infección (25).

Un carácter especial sobre los BALOs que los distingue de otros antibacterianos de base biológica, como los bacteriófagos, es su capacidad para invadir biofilms, penetrando en ellas profundamente para destruirlas de manera eficaz. Esto se ha demostrado en varios estudios, que se detallarán a continuación (7). Se cree que los biofilms podrían ofrecer buenas condiciones para la supervivencia de los bdellovibrios, ya que estos organismos han sido encontrados en biofilms marinos naturales, pero no siempre se recuperan del agua circundante. Se sugiere además que los bdellovibrios pueden beneficiarse de un biofilm por la mayor densidad de presas, que ha demostrado ser necesaria para su supervivencia.

El grupo de Kadouri realizó un estudio para evaluar la capacidad y la dinámica depredadora de *B. bacteriovorus* 109J sobre un biofilm formado por *E. coli*. Se utilizó la tinción violeta como identificativo de la muerte celular, obteniendo resultados de reducción

del biofilm tras apenas 3 horas de exposición al depredador, y llegando hasta niveles de reducción en la tinción del 87% después de 24 horas. Estos niveles permanecían prácticamente inalterados incluso después de periodos de exposición más prolongados y de la reinoculación de las muestras con *Bdellovibrio* fresco; sin embargo, no detectaron células genéticamente resistentes. Además, observaron que era suficiente con una cantidad de bdellovibrios pequeña (10^2 UFP/pocillo) o con un tiempo de exposición corto (30 minutos) para reducir el biofilm previamente formado. La capacidad de *B. bacteriovorus* para reducir el biofilm existente fue confirmada por microscopía electrónica de barrido. También realizaron estudios con biofilms de *P. fluorescens* (30).

Otros investigadores realizaron estudios similares durante el mismo año, utilizando la microscopía de fuerza atómica para visualizar el ataque de *B. bacteriovorus* 109J sobre biofilms de *E. coli*, porque esta técnica permitía además investigar los cambios morfológicos nanométricos ocurridos en el depredador, especialmente los relacionados con la motilidad. Los resultados obtenidos también fueron satisfactorios (31).

En Japón se ha evaluado la eficacia prometedora de *B. bacteriovorus* para prevenir la formación de biofilms y dispersar otras ya establecidas, utilizando biofilms formadas por diferentes especies como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, y *A. baumannii*. *Bdellovibrio* fue capaz de reducir la formación de la mismas en un 65.2%, 37.1%, 44.7%, y 36.8%, respectivamente, y fue capaz de reducir significativamente los biofilms ya formados en 83.4%, 81.8%, 83.1%, y 79.9%, respectivamente. Estos resultados fueron comprobados además por microscopía electrónica de barrido (32).

Un descubrimiento importante fue el hecho de que *B. bacteriovorus* puede depredar biofilms formados por patógenos orales (*Eikenella corrodens* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*), desarrolladas sobre superficies de hidroxiapatita, y también podría atacar biofilms metabólicamente inactivos. Además, puede atacarlos en presencia de saliva. Esto será de gran importancia para el uso de BALOs en el futuro como un agentes antibacterianos orales en enjuagues bucales, gárgaras, etc., ya que la saliva es bien conocida por sus efectos antibacterianos que ejerce en un amplio espectro de microorganismos (33).

En el año 2014 surgió un estudio que ponía de manifiesto la capacidad depredadora de *B. bacteriovorus* HD100 sobre biofilms de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, que son los principales colonizadores del pulmón en la fibrosis quística. Esto se analizó de varias formas: (i) cultivo planctónico en caldo, (ii) biofilms “estáticos”, (iii) microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM), (iv) biofilms “de flujo” y (v) técnica zimográfica, que es una técnica electroforética que incluye un sustrato co-polimerizado en un gel de poliacrilamida, útil para la detección de actividad enzimática. La capacidad depredadora sobre un patógeno Gram-positivo era novedosa, y se produce de forma epibiótica en lugar de periplásmica (34).

Estos hallazgos, junto con los enumerados anteriormente en esta sección, apoyan firmemente el concepto de usar *B. bacteriovorus* para el tratamiento de biofilms relacionados con la enfermedad y, particularmente, para infecciones orales.

e. Utilización de *B. bacteriovorus* como “antibiótico vivo”

La mayoría de las enfermedades inflamatorias e infecciosas crónicas bacterianas que afectan a los seres humanos implican la formación de biofilms, como las infecciones del tracto urinario producidas por *E. coli* uropatógeno, infecciones gastrointestinales por *E. coli* enterohemorrágico o heridas, quemaduras e infecciones respiratorias causadas por *P.*

aeruginosa. Se puede incluir además la periodontitis, que es una infección polimicrobiana en la que se involucran numerosos patógenos Gram negativos incrustados en un complejo biofilm denominado placa dental (25).

La capacidad de las bacterias depredadoras para aprovecharse de los biofilms llevó a sugerir los siguientes enfoques terapéuticos: (i) aplicación tópica de *B. bacteriovorus* en heridas producidas por quemaduras, (ii) inhalación de aerosoles que contienen depredadores dirigidos a *Burkholderia* y *Pseudomonas* en los pulmones de pacientes con fibrosis quística, (iii) uso en el control de infecciones urinarias e (iv) infecciones bucales, principalmente periodontitis (24).

i. HERIDAS POR QUEMADURAS

Kadouri realizó un extenso estudio preparado para la investigación médica del ejército de los Estados Unidos. En él demostraba que *B. bacteriovorus* es capaz de atacar y reducir las cargas microbianas de *A. baumannii* resistente a antibióticos recogida de los guerreros heridos, por lo que *Bdellovibrio* sería adecuado para lidiar con las infecciones de los entornos militares. Además, demostraron la capacidad de *Bdellovibrio* para atacar las bacterias patógenas en cultivos de especies mixtas, destacando su posible uso sobre heridas en la vida real, que con frecuencia implican más de un patógeno microbiano. (35)

Las infecciones de quemaduras o heridas producidas por este tipo de patógenos suelen progresar a septicemia e infecciones oculares, lo cual conduce a menudo a una queratitis ulcerosa (36). Esta complicación también ocurre con bacterias como *K. pneumoniae*, otro patógeno de especial interés del grupo ESKAPE que provoca septicemias graves. El grupo investigador Shatzkes publicó en 2017 los resultados de un estudio que evaluaba la posible atenuación, provocada por *Bdellovibrio*, de carga bacteriana sistémica administrada a un organismo vivo, habiendo demostrado previamente la eficacia en la reducción de bacterias de pulmones de rata. Después de evaluar la seguridad de la inoculación intravenosa, obteniendo resultados positivos, se pasó a determinar si las depredadoras podían reducir la carga bacteriana *in vivo*, inyectando para ello *K. pneumoniae* en venas de las colas de las ratas, seguida de múltiples dosis de bacterias depredadoras 16 y 24 horas después. Los resultados obtenidos mostraban que las depredadoras no reducían significativamente la carga de *K. pneumoniae* en la sangre ni podían prevenir la diseminación a otros órganos. Esto sugiere que las bacterias depredadoras pueden no ser efectivas para el tratamiento de las infecciones agudas de la sangre (37).

Las infecciones superficiales oculares, como la conjuntivitis bacteriana y la queratitis microbiana, tienen un gran coste para la sociedad y son una fuente importante de pérdida de la visión. Estas infecciones son a menudo causadas por bacterias Gram-negativas como *Haemophilus influenzae* y *Serratia marcescens* además de *P. aeruginosa*; las dos últimas han sido verificadas como susceptibles a la depredación por *B. bacteriovorus*. Para este estudio se expusieron los aislados oculares a *Bdellovirbio* y *Micavibrio*. Cada uno de los 19 aislados estudiados era sensible a, al menos, uno de los depredadores, lo que sugiere que en un futuro podrían utilizarse combinados para tratar infecciones oculares. Además, se investigó la toxicidad de los depredadores en las células eucariotas, utilizando como muestra células epiteliales humanas de la córnea y exponiéndolas a altas concentraciones de depredadores. Los ensayos de citotoxicidad demostraron que las bacterias depredadoras no dañan las células oculares ni aumentan la producción de citoquinas proinflamatorias, mientras que la *P. aeruginosa* utilizada como control positivo sí era altamente tóxica (38).

ii. FIBROSIS QUÍSTICA

P. aeruginosa es también la causa más común de infecciones pulmonares crónicas en pacientes con fibrosis quística (FQ). A pesar de la agresiva terapia con antibióticos, la infección es persistente en los pacientes con FQ y se asocia con un aumento de la mortalidad y la morbilidad (36). En su estudio, Dashiff et al. (26) mostraron que *P. aeruginosa* tenía baja susceptibilidad al ataque de *B. bacteriovorus* 109 J. Sin embargo, podría ser atacado por otra bacteria depredadora, *Micavibrio*, que depreda de forma epibiótica y se replica por fisión binaria, en contraste con la cepa de *Bdellovibrio*. Estos hallazgos sugieren que puede ser posible utilizar una combinación de depredadores diferentes para atacar simultáneamente las infecciones de múltiples cepas (7).

El Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) de Madrid realizó en 2017 un seguimiento anual de la microbiota pulmonar de 15 pacientes adultos con fibrosis quística. Encontraron, por primera vez, bacterias depredadoras en el microbioma pulmonar de FQ, que había sido recientemente redefinido utilizando secuenciación de segunda generación. Entre ellas se encontraron especies de *Bdellovibrio* y *Vampirovibrio*. El modelo computacional de nuevo diseño permite presuponer que la inoculación de depredadores en el microbioma pulmonar podría contribuir al control de la colonización crónica de patógenos durante las etapas tempranas de la colonización (39).

iii. CONTROL DE INFECCIONES URINARIAS

Serratia marcescens es un patógeno humano involucrado en infecciones nosocomiales, particularmente bacteriemia asociada al catéter, infecciones del trato urinario debidas a la formación de una capa mucilaginosa e infecciones de la herida. La mayoría de cepas de *S. marcescens* son resistentes a varios antibióticos debido a la presencia de unos plásmidos que llevan uno o más genes de resistencia. Todas se consideran intrínsecamente resistentes a ampicilina, macrólidos y cefalosporinas de primera generación (como cefalexina). Se ha demostrado la reducción *in vitro* de un biofilm formado por *S. marcescens* utilizando *B. bacteriovorus* como depredador (40). Los BALOs también son activos contra patógenos del género *Proteus* y por lo tanto tienen potencial en el control de las infecciones del tracto urinario, particularmente en pacientes cateterizados (5).

iv. PERIODONTITIS

Las enfermedades periodontales son afecciones inflamatorias que afectan las estructuras en las que se sostienen los dientes. La acumulación de biofilms, junto con la respuesta inmune local, provoca inflamación gingival o gingivitis. La inflamación adicional, como se observa en la periodontitis, resulta en la destrucción de las uniones de tejido conectivo, la resorción ósea alveolar y la eventual pérdida de diente. La periodontitis puede clasificarse como agresiva o crónica, según la presentación clínica y la tasa de progresión (12). La forma agresiva de la periodontitis se caracteriza por proporciones elevadas de *A. actinomycetemcomitans*, entre otras bacterias Gram-negativas, y se ha demostrado que *B. bacteriovorus* HD100 puede depredar a esta bacteria (41).

En un estudio posterior realizado el mismo grupo (42), mostraron que una o más cepas de *Bdellovibrio* podían atacar diferentes especies bacterianas involucradas en la periodontitis, incluso si la presa era anaerobia estricta. Esto es notable ya que, por un lado, los BALOs son aerobios estrictos y requieren oxígeno para completar su ciclo de depredación mientras que, por otro, su presa morirá si se expone a oxígeno durante demasiado tiempo (7).

HERIDAS POR QUEMADURAS	FIBROSIS QUÍSTICA	INFECCIONES URINARIAS	PERIODONTITIS
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Acinetobacter baumannii</i> • <i>Serratia marcescens</i> • Especies mixtas 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Staphylococcus aureus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Escherichia coli</i> uropatógeno • <i>Serratia marcescens</i> • <i>Proteus</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Eikenella corrodens</i> • <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> • Bacterias anaerobias estrictas

Tabla 1: resumen de los enfoques terapéuticos de *B. bacteriovorus* según sus presas

f. Desarrollo de resistencias frente a *B. bacteriovorus*

Uno de los aspectos más prometedores del uso de BALOs como agentes antimicrobianos es el hecho de que la resistencia de las presas es extremadamente rara y, hasta la fecha, ningún grupo ha aislado una presa mutante completamente resistente. Es cierto que los BALOs nunca erradican a su presa por completo, a pesar de que el ratio depredador-presa es muy elevado. Este hecho puede conllevar a cuestionar si los organismos no depredados podrían ser resistentes.

Con este contexto, el grupo Sockett realizó un estudio buscando cepas de *E. coli* resistentes, pero demostraron que su resistencia a los bdellovibrios es transitoria y, si se realizaban cultivos sucesivos, reganaban susceptibilidad a la depredación. Shemesh y Jurkevitch (43) describen experimentos similares y concluyen que la resistencia a la depredación por las bacterias del género *Bdellovibrio* es un “respuesta fenotípica plástica” en lugar de un acontecimiento mutacional (5).

A pesar de ser una importante ventaja, es necesario considerar los posibles mecanismos por los que algunas bacterias escapan de la depredación. En primer lugar, puede ocurrir por variaciones en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, estructura más próxima al medio, a la que el bdellovibrio se adhiere antes de la invasión. Recientemente se ha reportado que algunos patógenos Gram-negativos pueden variar la composición de carbohidratos de las cadenas laterales del antígeno O e incluso parte de lípidos A en función de estímulos clínicos, inmunológicos o ambientales. Estos cambios no evitan completamente la depredación, pero algunos aún están pendientes de ser probados (**Figura 3a**).

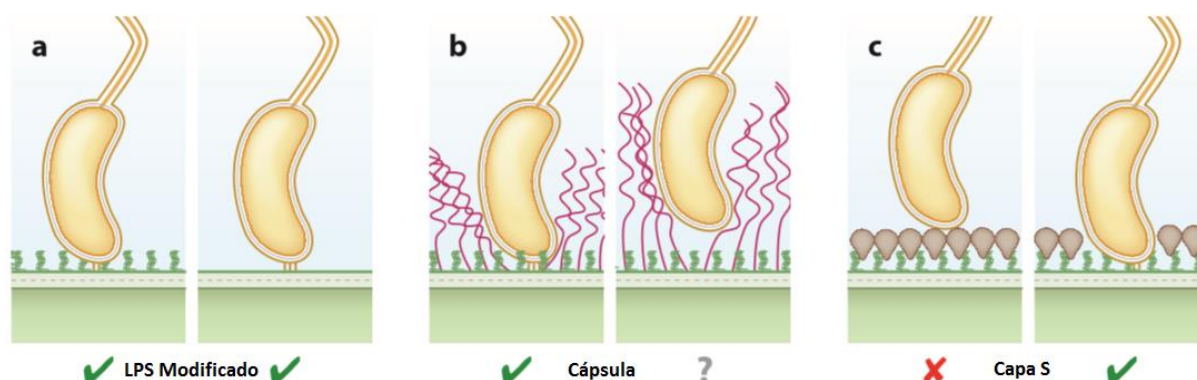


Figura 3: Posibles mecanismos de resistencia a *B. bacteriovorus*. Adaptado de: (29)

Además, puede haber estructuras adicionales por fuera de la membrana externa que representan una barrera para la unión del BALO. Entre estas, se incluyen cápsulas bacterianas

y capa superficial “S”. La cápsula bacteriana, que es una limitación para los antibióticos clásicos y para la acción de bacteriófagos por enmascarar receptores de superficie necesarios para su unión, ha resultado no ser un problema para *B. bacteriovorus*. Koval & Bayer lo demostraron frente a la cápsula polisacáridica de *E. coli* K29, pues el depredador podía penetrar en esta presa a pesar de la cápsula. Estos autores propusieron que el mecanismo de penetración se producía utilizando la fuerza móvil generada por la actividad flagelar. Sin embargo, es posible que algunas cápsulas más extensas impidan el acceso completo de los depredadores, pero no hay datos suficientes al respecto (**Figura 3b**).

La capa “S” se expresa en miembros de casi todos los grupos taxonómicos principales bacterianos, y consiste en una estructura cristalina compuesta por repeticiones de subunidades proteicas, que pueden cubrir la célula por completo. Koval & Hynes (44) reportaron que las capas S de *Aquaspirillum serpens* y *Aquaspirillum sinuosum* protegían contra la depredación por *B. bacteriovorus* 6-5-S, y la capa S de *Aeromonas salmonicida* protege contra la cepa 109J. Sin embargo, estos autores descubrieron que, si la capa S se expresaba de forma irregular (haciendo subcultivos repetidos de la presa), quedaban áreas de la membrana externa expuestas, con la consecuente unión del depredador a las mismas incluso si las grietas eran muy pequeñas. Al igual que en el caso anterior, se requiere más información al respecto para llegar a una conclusión válida (**Figura 3c**) (29).

Las bacterias pueden utilizar otras estrategias además de barreras físicas para evitar la depredación. Un ejemplo es la producción de cianuro que realiza *Chromobacterium piscinae*, anión que impide la depredación por parte de *B. bacteriovorus* HD100. Sin embargo, esto solo ocurría en medio de crecimiento diluido denominado DNB (*diluted nutrient broth*), pero no en el tampón zwitteriónico HEPES, y dependía también de la etapa del ciclo de vida en la que se encontrase el depredador: en la fase de ataque, el cianuro causaba simplemente pérdida de motilidad en los bdellovibrios, mientras que para los depredadores en fase intraperiplásmica se interrumpía el desarrollo y la lisis de la presa. Por último, se descubrió que la adición de hidroxicalamina, quelante del cianuro, permitía que la depredación prosiguiera (45).

2. Aplicaciones en biocontrol

Algunos estudios muestran que los BALOs también tienen amplias aplicaciones en el campo agrícola, la cría de animales y la industria de los alimentos. Sin embargo, las implicaciones terapéuticas de estas bacterias son bastante más importantes y significativas.

a. Agricultura

El primer ejemplo en el que los BALOs fueron descritos como agentes de biocontrol fue en el año 1972, mostrando resultados prometedores en el control de *Pseudomonas glycinea* en la planta de soja. En este estudio se descubrió *B. bacteriovorus* (Bd-17) en la rizosfera de la planta, y se desarrollaron co-inoculaciones de estos depredadores con el patógeno mencionado en otras plantas, sin detectar casos de post-infección en las mismas (46). Es sorprendente que no se haya realizado un seguimiento más acentuado a partir de este descubrimiento, aunque el problema potencial es la amplia gama de presas que *Bdellovibrio* puede depredar, lo que probablemente significa que también depreda sobre bacterias que son beneficiosas para la planta, como especies de *Sinorhizobium* (5).

En un estudio realizado ya entrado el siglo XXI (47), seis cepas de *B. bacteriovorus*, que depreda sobre el patógeno *Burkholderia glumae* en el agua de arrozales y en el suelo de la rizosfera, fueron identificadas y caracterizadas. Fueron probadas contra bacterias asociadas

con la antibiosis o la fijación de nitrógeno, incluyendo *Azospirillum brasilense*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, y *Serratia marcescens*. No se produjo depredación sobre los fijadores de nitrógeno o las bacterias asociadas a antibiosis, mientras que *B. glumae* sí era depredado, sugiriendo una vez más que bdellovibrio no es perjudicial para los simbioses vegetales beneficiosos (7).

b. Acuicultura y granjas de animales

Los bdellovibrios se han aislado de otros reservorios, incluyendo ríos y aguas residuales. En dos estudios diferentes de los años ochenta que analizaban aguas contaminadas por bacterias Gram-negativas, se identificaron altas concentraciones de bdellovibrios, y se relacionó este hecho con una disminución en la carga bacteriana de estas mismas muestras. Se propuso por tanto la utilización de bdellovibrios para implementar la limpieza de las aguas residuales. Sin embargo, no está claro si esta aplicación se implementó alguna vez. La acuicultura es una industria en crecimiento debido a la sobrepesca en aguas dulces y marinas, y el uso de bdellovibrio como profiláctico o tratamiento en la contaminación producida por *Aeromonas hydrophila* podría tener impactos positivos sobre esta industria (48). Hay estudios que demuestran que, entre varias cepas de *Bdellovirbio* ensayadas, al menos una de ellas podía depredar a este patógeno (49).

El estudio realizado por Attebury et al. en 2011 ya mencionado, se había evaluado la seguridad de administrar bdellovibrios por vía oral en polluelos no infectados, concluyendo con que no había efectos adversos para los animales. Pero, además, el BALO se utilizó para tratar polluelos infectados con *Salmonella enterica*. Como resultado se observó una disminución en el número de *Salmonella*, así como reducción de anomalías y de inflamación cecales, indicando que el tratamiento con bdellovibrios era un agente de biocontrol útil contra *Salmonella* en pollos (16).

c. Seguridad del agua y de los alimentos

Las bacterias patógenas transmitidas por los alimentos son problemáticas porque las tecnologías físicas (rayos UV y gamma), químicas (ozono, peróxido de hidrógeno) y antimicrobianas utilizadas actualmente pueden ser eficaces o no dependiendo de factores entre los que destacan el método de aplicación, la duración del mismo o el sistema de embalaje. Considerando las limitaciones de los métodos convencionales mencionados, es necesario encontrar alternativas nuevas, ecológicas y seguras que puedan complementarlos (11).

Varios investigadores han documentado la depredación de patógenos entéricos como *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *L. monocytogenes* y otros patógenos de los alimentos realizada por algunos BALOs. Frantamico & Cooke observaron la capacidad de los bdellovibrios para reducir estos patógenos en superficies de acero inoxidable, lo que sugiere una posible aplicación sobre los equipos de procesamiento de alimentos (50). En una línea similar, se sugiere la utilidad de estos BALOs para descontaminar biofilms bacterianos de las superficies que están en contacto con alimentos.

Del mismo modo, la posible aplicación de bacterias depredadoras se puede extender también a los mariscos, por ejemplo Richards et al. mostraron que las bacterias depredadoras encontradas en ecosistemas marinos podían actuar como moduladores naturales de *Vibrio vulnificus* y *Vibrio parahaemolyticus* en ostras en el propio agua del mar (51).

Otro ejemplo es la depredación de *Pseudomonas tolaasii*, un patógeno problemático de las setas cultivadas, que produce manchas de color marrón oscuro en las superficies de los hongos y que causa su deterioro. Es difícil de tratar porque, para el crecimiento de la seta, son necesarias otras bacterias comensales como *P. putida*, por lo que el tratamiento debe ser relativamente específico. *B. bacteriovorus* HD100 elimina esta bacteria y, en algunos casos, permitía un sobrecrecimiento de bacterias presumiblemente comensales, de modo que podría ser utilizado para evitar el deterioro en las setas embaladas para la venta (52).

AGRICULTURA	ACUICULTURA Y ANIMALES	AGUA Y ALIMENTOS
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Pseudomonas glycinea</i> • <i>Burkholderia glumae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Aeromonas hydrophila</i> • <i>Salmonella enterica</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> O157:H7 • <i>Salmonella</i> spp. • <i>Listeria monocytogenes</i> • <i>Vibrio</i> spp. (mariscos) • <i>Pseudomonas tolaasii</i> (setas)

Tabla 2: resumen de las aplicaciones en biocontrol de *B. bacteriovorus* según sus presas

3. Otras aplicaciones: *Bdellovibrio* como biocatalizador

Aunque la producción mundial de plástico continúa creciendo cada día, con el cambio climático considerado como importante desafío social, se ha incrementado la investigación acerca de la producción de bioplásticos. Nos conciernen aquellos producidos por microorganismos, pues son capaces de producir polímeros naturales acumulados en su citoplasma, conocidos como polihidroxialcanoatos (PHAs).

Los sintetizan las Arqueas y un amplio rango de microorganismos, tanto Gram-positivos como Gram-negativos, en respuesta a un desequilibrio nutricional en presencia de una fuente de carbono excesiva. Se pueden clasificar, acorde al número de monómeros de su cadena lateral, en PHAs de cadena corta (scl-PHA) o de cadena media (mcl-PHA), según se compongan de monómeros con 4 o 5 átomos de carbono o de 6 a 14 átomos, respectivamente. Cuando el ambiente se hace más favorable, los microorganismos degradan los PHAs a sus monómeros correspondientes y los utilizan como fuentes de energía y de carbono (53).

Como se ha comentado anteriormente, los BALOs liberan una gran cantidad de enzimas hidrolíticas que son cruciales en el ciclo de vida de los mismos. Por ejemplo, *B. bacteriovorus* HD100 posee dos depolimerasas de polihidroxialcanoatos (PHA), que pueden degradar específicamente PHA de cadena corta y de cadena media, respectivamente, de una manera eficiente (54). Gracias a la capacidad lítica de *B. bacteriovorus*, es posible utilizar este depredador como herramienta lítica biológica para la extracción de bio-productos intracelulares de valor tales como los PHA, utilizando como presa una bacteria productora de estos bioplásticos como puede ser *P. putida* o *Cupriavidus necator* (55).

4. Limitaciones de los BALOs

Como se ha comentado anteriormente, la utilización de bdellovibrios en la práctica puede tener ventajas tanto en terapéutica como en biocontrol. Sin embargo, es de vital importancia tener en cuenta los inconvenientes que pueden derivar de la utilización de esta bacteria, para valorar si los beneficios superan los riesgos.

El género *Bdellovibrio* no depreda bacterias Gram-positivas. El único caso reportado es su capacidad para prevenir la formación de biofilms de *S. aureus* y atacar las ya formadas, gracias a su arsenal de enzimas hidrolíticas (34). Si bien es improbable que sea factible tratar las infecciones con cepas que expresan las proteasas en exceso, ya que podría tener un efecto negativo sobre el tejido circundante, este estudio sirve como prueba de que las enzimas producidas por *B. bacteriovorus* podrían ser manipuladas para el biocontrol de bacterias Gram-positivas.

Un inconveniente de las bacterias depredadoras es su susceptibilidad a la defensa del huésped y a los antibióticos, probablemente porque no entran en contacto con ellos en su hábitat natural. Por ejemplo, la superficie ocular humana es un lugar inhóspito para los microbios debido a las defensas inmunes innatas, por lo que el uso de bacterias predatorias como probiótico podría no ser factible. Son necesarios más estudios para superar esta limitación.

Otra posible desventaja que deriva de la utilización de bacterias depredadoras para el control de infecciones es que, como otros depredadores en la naturaleza, nunca erradica su presa por completo. Aunque parece un obstáculo mayor, el depredador es capaz de despejar la mayor parte de la infección, permitiendo que el sistema inmunológico lidie con los patógenos residuales. Por otro lado, es concebible que ciertos pacientes desarrollen alergias a las bacterias predatorias, lo cual podría afectar su uso generalizado en terapéutica (38).

A primera vista, que los BALOs posean una amplia gama de presas parece beneficioso, como puede ocurrir en infecciones multibacterianas como la fibrosis quística. Pero es una limitación potencial que debe ser considerada, debido a que los efectos sobre la flora natural de diferentes cavidades del organismo no han sido estudiados en profundidad. En este caso, el uso de BALOs debería ser monitorizado.

De acuerdo con los primeros estudios, los BALOs resultaron ser aerobios estrictos, lo que por supuesto puede ser un inconveniente que limita su uso potencial en entornos del cuerpo humano donde el oxígeno es limitado, como son el intestino o el tracto urinario. No obstante, el análisis del genoma de la cepa HD100 muestra que puede sobrevivir en condiciones microaerófilas, gracias a que posee genes para una citocromo c oxidasa que tiene mayor afinidad por el oxígeno.

Otro desafío para los BALOs es poder eliminar bacterias protegidas por una capa superficial "S" pues, como se ha comentado anteriormente, si esta capa no presenta discontinuidades el bdellovibrio es incapaz de depredar a la bacteria. Además, influye el estado fisiológico de la presa y la presencia de otras bacterias, que podrían disminuir la actividad depredadora del BALO. Otros parámetros que pueden modificar la capacidad de depredación son las elevadas concentraciones de glucosa o glicerol y un pH bajo. Por lo tanto, este tipo de interacciones se deberá tener en cuenta para la aplicación real de las bacterias depredadoras en un organismo vivo (7).

5. Perspectiva de futuro

Actualmente, no se ha aplicado *B. bacteriovorus* terapéuticamente ni en la industria o la agricultura como agentes antibacterianos, pues aún quedan muchas preguntas que deben abordarse para poder aplicar lo que por ahora es tan solo un concepto teórico.

Aunque en los últimos años se han revelado más detalles de los factores implicados en el ciclo de vida de *B. bacteriovorus*, no se ha demostrado plenamente qué estructuras son necesarias o suficientes para que se produzca la depredación (56). Por ejemplo, se pueden hacer preguntas acerca de qué produce el cambio de cepas independientes de la presa a ser dependientes, qué genes son responsables de este comportamiento, qué nucleasas específicas degradan el DNA y RNA de la presa, qué genes juegan un papel importante en la invasión de biofilms, y muchas otras preguntas (11).

¿Cuál es la prevalencia de los bdellovibrios en la flora normal de los seres humanos y los animales, y cuál es el efecto de agregarla exógenamente? Este es otro interrogante que está por resolver (56). El estudio de Attebury et al. en polluelos construye como hipótesis que el tracto gastrointestinal puede ser un lugar permisivo para la aplicación de bacterias predatorias, ya que la administración por esta vía no provocaba efectos adversos en los animales (16). Curiosamente, el género *Bdellovibrio* tiene mayor prevalencia y abundancia en el tracto gastrointestinal de humanos sanos comparado con muestras de pacientes con enfermedades inflamatorias intestinales, celíacos y con fibrosis quística, por lo que el impacto en cada paciente podría variar notablemente (57).

Por otro lado, es esencial caracterizar la interacción depredadores-presas además de la respuesta inmune generada, para valorar qué dosis de *B. bacteriovorus* sería adecuado administrar terapéuticamente (29). Se especula además que para su éxito terapéutico los depredadores deberán acoplarse con otras terapias como antibióticos o fagos, garantizando con ello que no se desarrolle resistencia a los mismos y mejorando además la efectividad de la terapia (38).

Además de estas incógnitas por resolver, siempre habrá una cuestión social respecto al uso de bacterias para tratar las infecciones, especialmente en el mundo actual donde todas las bacterias son consideradas “peligrosas” (48).

VI. CONCLUSIONES

- *B. bacteriovorus* es el depredador obligado mejor estudiado y capaz de eliminar un gran número de bacterias, principalmente Gram negativas, entre las que destacan aquellas del grupo ESKAPE, resistentes a antibióticos.
- Es específico de bacterias, lo que implica seguridad para el hombre. Se requieren más estudios *in vivo* y en células humanas para corroborar este hecho.
- A diferencia de otros antibacterianos biológicos novedosos, como los bacteriófagos, los bdellovibrios pueden depredar sobre biofilms, que suelen tener una resistencia a antibióticos más desarrollada.
- Por esta característica, se ha estudiado su aplicación terapéutica en heridas por quemaduras, fibrosis quística, infecciones urinarias y periodontitis.
- Hasta la fecha, no se han descubierto mutantes que escapen completamente a la depredación por *B. bacteriovorus*, exceptuando casos de resistencia parcial.
- Por su amplio arsenal de presas, podría ser utilizado para el biocontrol en agricultura, ganadería y seguridad del agua y de los alimentos.
- Puede ser utilizado en la industria para extracción de bioproductos intracelulares.
- Aún queda mucha investigación por hacer para que los BALOs puedan emplearse en la práctica como agentes terapéuticos y de biocontrol.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Jurkevitch E. A Brief History of Short Bacteria: A Chronicle of *Bdellovibrio* (and Like Organisms) Research. In: *Predatory Prokaryotes*, vol 4. Heidelberg: Springer; 2007. p. 1–10.
2. Jurkevitch E, Davidov Y. Phylogenetic diversity and evolution of predatory prokaryotes. In: *Predatory Prokaryotes*, vol 4. Heidelberg: Springer; 2007. p. 11–56.
3. Martin MO. Predatory prokaryotes: an emerging research opportunity. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2002;4(5):467–77.
4. Stolp H. The *Bdellovibrios*: Bacterial Parasites of Bacteria. *Annu Rev Phytopathol*. 1973;11(1):53–76.
5. Sockett RE, Lambert C. *Bdellovibrio* as therapeutic agents: a predatory renaissance? *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(8):669–75.
6. Rendulic S, Jagtap P, Rosinus A, Eppinger M, Baar C, Lanz C, et al. A Predator Unmasked: Life Cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a Genomic Perspective. *Science*. 2004;303(689):689–92.
7. Dwidar M, Monnappa AK, Mitchell RJ. The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Rep*. 2012;45(2):71–8.
8. Williams HN, Baer ML, Tudor JJ. *Bdellovibrio*. In: *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 2015. p. 1–22.
9. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017 [cited 2019 Feb 27]. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
10. Tyson J, Sockett RE. Predatory Bacteria: Moving from Curiosity Towards Curative. *Trends Microbiol*. 2017;25(2):90–1.
11. Olanya M, Lakshman D. Potential of predatory bacteria as biocontrol agents for foodborne and plant pathogens. *J PLANT Pathol*. 2015;97(3):405–17.
12. Hoare A, Marsh PD, Diaz PI. Ecological therapeutic opportunities for oral diseases. *Microbiol Spectr*. 2017;5(4):1–36.
13. Westergaard JM, Kramer TT. *Bdellovibrio* and the Intestinal Flora of Vertebrates. *Appl Environ Microbiol*. 1977;34(5):506–11.
14. Lenz RW, Hespell RB. Attempts to grow bdellovibrios micurgically-injected into animal cells. *Arch Microbiol*. 1978;119(3):245–8.
15. Kadouri DE, To K, Shanks RMQ, Doi Y. Predatory bacteria: a potential ally against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *PLoS One*. 2013;8(5):e63397.
16. Atterbury RJ, Hopley L, Till R, Lambert C, Capeness MJ, Lerner TR, et al. Effects of orally administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the well-being and *Salmonella* colonization of young chicks. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77(16):5794–803.
17. Shatzkes K, Chae R, Tang C, Ramirez GC, Mukherjee S, Tsenova L, et al. Examining the safety of respiratory and intravenous inoculation of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* in a mouse model. *Nat Publ Gr*. 2015; 5(12899):1–12
18. Willis AR, Moore C, Mazon-Moya M, Krokowski S, Lambert C, Till R, et al. Injections of Predatory Bacteria Work Alongside Host Immune Cells to Treat *Shigella* Infection in Zebrafish Larvae. *Curr Biol*. 2016;26(24):3343–51.
19. Funderburgh ML, Funderburgh JL, Shanks RMQ, Dharani S, Romanowski EG, Yates KA, et al. Predatory bacteria are nontoxic to the rabbit ocular surface. *Sci Rep*. 2016;6(1):1–9.
20. Monnappa AK, Bari W, Yeol Choi S, Mitchell RJ. Investigating the Responses of Human Epithelial Cells to Predatory Bacteria. 2016; 6(33485):1–14
21. Gupta S, Tang C, Tran M, Kadouri DE. Effect of predatory bacteria on human cell

- lines. PLoS One. 2016;11(8):1–15.
22. Choi SY, Im H, Mitchell RJ. Violacein and bacterial predation: promising alternatives for priority multidrug resistant human pathogens. *Future Microbiol.* 2017;12(10):835–8.
 23. Schwudke D, Linscheid M, Strauch E, Appel B, Zähringer U, Moll H, et al. The Obligate Predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* Possesses a Neutral Lipid A Containing α -D-Mannoses That Replace Phosphate Residues. *J Biol Chem.* 2003;278(30):27502–12.
 24. Strauch E, Beck S, Appel B. *Bdellovibrio* and Like Organisms: Potential Sources for New Biochemicals and Therapeutic Agents? In: *Predatory Prokaryotes*, vol 4. 2007. p. 234–41.
 25. Sinha A, Hurakadli M, Ravindra S, Agarwal A. *Bdellovibrio* Like Organisms: The Predatory Assassin. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences.* 2014;12(10):32-36
 26. Dashiff A, Junka RA, Libera M, Kadouri DE. Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Appl Microbiol.* 2011;110(2):431–44.
 27. Markelova NY. Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with bacteria *Campylobacter jejuni* and *Helicobacter pylori*. *Microbiology.* 2010;79(6):777–9.
 28. Pantanella F, Iebba V, Mura F, Dini L, Totino V, Neroni B, et al. Behaviour of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the presence of gram-positive *Staphylococcus aureus*. *New Microbiol.* 2018;41(2):145–52.
 29. Negus D, Moore C, Baker M, Raghunathan D, Tyson J, Sockett RE. Predator Versus Pathogen: How Does Predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* Interface with the Challenges of Killing Gram-Negative Pathogens in a Host Setting? *Annu Rev Microbiol.* 2017;71:441–57.
 30. Kadouri D, O’Toole GA. Susceptibility of Biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* Attack. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(7):4044–51.
 31. Núñez ME, Martin MO, Chan PH, Spain EM. Predation, death, and survival in a biofilm: *Bdellovibrio* investigated by atomic force microscopy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2005;42(3–4):263–71.
 32. Sun Y, Ye J, Hou Y, Chen H, Cao J, Zhou T. Predation Efficacy of *Bdellovibrio bacteriovorus* on Multidrug-Resistant Clinical Pathogens and Their Corresponding Biofilms. *Jpn J Infect Dis.* 2017;70(5):485–9.
 33. Dashiff A, Kadouri DE. Predation of oral pathogens by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Mol Oral Microbiol.* 2011;26(1):19–34.
 34. Iebba V, Totino V, Santangelo F, Gagliardi A, Ciotoli L, Virga A, et al. *Bdellovibrio bacteriovorus* directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Cystic fibrosis isolates. 2014;5(280):1-9
 35. Kadouri DE. The use of Predatory Prokaryotes to control drug-resistant bacteria and microbial biofilms associated with burn and wound infections. 2011.
 36. Fothergill JL, Winstanley C, James CE. Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10(2):219–35.
 37. Shukla S, Gupta S, Shatzkes K, Kadouri DE, Rinaggio J, Tang C, et al. Examining the efficacy of intravenous administration of predatory bacteria in rats. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–11.
 38. Shanks RM, Kadouri DE. Predatory prokaryotes wage war against eye infections. *Futur Microbiol.* 2014;9(4):429–32.
 39. De Dios Caballero J, Vida R, Cobo M, Máiz L, Suárez L, Galeano J, et al. Individual Patterns of Complexity in Cystic Fibrosis Lung Microbiota, Including Predator Bacteria, over a 1-Year Period. 2017;8(5): e00959-17

40. Jadhav Manjiri, Nair Rohan, Purkar Anjali, Kininge Pallavi, Kulkarni Chitrarekha. Studying in-vitro applicability of hostindependent strain of *Bdellovibrio bacteriovorus* as a biofilm reducing agent. *Int J Curr Res Rev.* 2011;03(11):184–9.
41. Van Essche M, Quiryne M, Sliepen I, Van Eldere J, Teughels W. *Bdellovibrio bacteriovorus* attacks *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *J Dent Res.* 2009;88(2):182–6.
42. Van Essche M, Quiryne M, Sliepen I, Loozen G, Boon N, Van Eldere J, et al. Killing of anaerobic pathogens by predatory bacteria. *Mol Oral Microbiol.* 2011;26(1):52–61.
43. Shemesh Y, Jurkevitch E. Plastic phenotypic resistance to predation by *Bdellovibrio* and like organisms in bacterial prey. *Environ Microbiol.* 2004;6(1):12–8.
44. Koval SF, Hynes SH. Effect of paracrystalline protein surface layers on predation by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J Bacteriol.* 1991;173(7):2244–9.
45. Mun W, Kwon H, Im H, Choi SY, Monnappa AK, Mitchell RJ. Cyanide Production by *Chromobacterium piscinae* Shields It from *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 Predation. *MBio.* 2017;8(6): e01370-17
46. Scherff RH. Control of Bacterial Blight of Soybean by *Bdellovibrio bacteriovorus*. Vol. 63, *Phytopathology.* 1973. p. 400–2.
47. Song WY. Identification and characterization of *Bdellovibrio bacteriovorus*, a predator of *Burkholderia glumae*. *J Microbiol Biotechnol.* 2004;14(1):48–55.
48. Damron FH, Barbier M. Predatory bacteria: Living Antibiotics, Biocontrol Agents, or Probiotics? *J Postdr Res.* 2013;1(12):10–5.
49. Cao H, He S, Wang H, Hou S, Lu L, Yang X. *Bdellovibrios*, potential biocontrol bacteria against pathogenic *Aeromonas hydrophila*. *Vet Microbiol.* 2012;154(3–4):413–8.
50. McIntyre L, Hudson JA, Billington C, Withers H. Biocontrol of Foodborne Bacteria. In: *Novel Technologies in Food Science.* New York, NY: Springer; 2012. p. 183–204.
51. Richards GP, Fay JP, Dickens KA, Parent MA, Soroka DS, Boyd EF. Predatory Bacteria as Natural Modulators of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in Seawater and Oysters. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(20):7455–66.
52. Jackson RW, Bhumbra S, Smith T, Sockett R, Saxon EB. *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 guards against *Pseudomonas tolaasii* brown-blotch lesions on the surface of post-harvest *Agaricus bisporus* supermarket mushrooms. *BMC Microbiol.* 2014;14(1):163.
53. Prieto MA, Eugenio LI de, Galàn B, Luengo JM, Witholt B. Synthesis and Degradation of Polyhydroxyalkanoates. In: *Pseudomonas.* Dordrecht: Springer Netherlands; 2007. p. 397–428.
54. Martínez V, de la Peña F, García-Hidalgo J, de la Mata I, García JL, Prieto MA. Identification and biochemical evidence of a medium-chain-length polyhydroxyalkanoate depolymerase in the *Bdellovibrio bacteriovorus* predatory hydrolytic Arsenal. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(17):6017–26.
55. Martínez V, Herencias C, Jurkevitch E, Prieto MA. Engineering a predatory bacterium as a proficient killer agent for intracellular bio-products recovery: The case of the polyhydroxyalkanoates. *Sci Rep.* 2016;6(1):24381.
56. Sockett RE. Predatory Lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annu Rev Microbiol.* 2009;63(1):523–39.
57. Iebba V, Santangelo F, Totino V, Nicoletti M, Gagliardi A, Valerio De Biase R, et al. Higher Prevalence and Abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the Human Gut of Healthy Subjects. *PLoS One.* 2013;8(4):e61608.