



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

Caracterización biológica y ecología de balos en  
una planta de depuración simbiótica de  
aguas residuales

**D. Rafael Solana Guillén**  
**2021**



*Un hombre puede hacer lo que quiere, pero no puede querer lo  
que quiere.*

**Arthur Schopenhauer.**



# **AGRADECIMIENTOS**



*Carta para mi “yo” futuro:*

*No sé dónde te encontrarás dentro de diez años, tampoco sé si el enorme esfuerzo que te ha supuesto hacer una tesis, sin subvención alguna y a puro empeño, valdrá de algo en este país que se empeña en lanzar fuera el talento y mantener a la mediocridad; no sé si tengo de lo primero, pero huyo fervientemente de lo segundo. Tampoco sé si estarás trabajando en algo relacionado con esta tesis, aunque sea de manera muy remota, o si, ni siquiera, estarás investigando. Aunque el peor de los anteriores escenarios tuviera lugar, como si no, deberías tener en cuenta algunas cosas:*

*Agradece cada día a tus padres por haberse matado durante 30 años para que tú te mantuvieses estudiando e intentando perseguir esa utopía de “si tienes carrera y estudios, tendrás trabajo decente seguro”. Hoy sabes lo que es esforzarte por y para lo que te propones porque lo has aprendido de ellos. No se te ocurra pensar que tú solo lo hubieses conseguido, porque no es así, en absoluto.*

*Imprescindible darle un beso a Ana todos los días de tu vida, todos. No sólo te ha hecho querer mejorar, sino que, gracias a ella, has tenido el ejemplo de constancia a escasos centímetros de ti todos los días. Ten absolutamente claro que ni en diez vidas vas a llegar al grado de implicación y del saber hacer que tiene ella y ni en diez vidas vas a agradecerle todo lo que te ha tenido que soportar mientras llevabas a cabo tu tesis. Asume que tienes una persona que brilla con luz propia a tu lado y da gracias de que esa luz brille cerca de ti. Eres un tío con suerte.*

*Tampoco se te ocurra tener la desfachatez de no acordarte de tu tutor y director. Si sabes hacer una simple siembra es únicamente gracias a él y a su innata dedicación a la enseñanza bien enseñada. En los años previos a tu tesis nunca tuviste una persona con tantas ganas de formar, que no es sólo enseñar, como Francisco Torrella. Tampoco olvides sus mucho-más-que-reiteradas broncas ni su exacerbante pasión por la perfección. No estuviste de acuerdo en muchas cosas con él, lo sé, pero, aunque sea “a sangre” te terminó enseñando que lo excelente es mejor que lo muy bueno y que se ha de ser además de parecer.*

*Igualmente, acuérdate de M<sup>a</sup> Carmen y de Maite que, una por ser compañera de laboratorio y otra por ser personal de limpieza, a menudo fueron las caras amables en tu día a día.*

*Por último, agradece a tus hermanos, esos que parece que no miran, pero están y que parece que no sufren, pero apoyan. A tus abuelos que te han enseñado como es entregarse a alguien de verdad, sin concesiones; a tus amigos, aquella familia que has elegido y, aunque sea a collejas y cerveza, te liberan de la presión y te olvidas de la incertidumbre. Por supuesto, agradecer a tus primos, que confían en ti como nadie.*

*A todos los mencionados os debo este trabajo por haberme acompañado, de una u otra manera, en este viaje a Ítaca. Recuerda de nuevo que no hubieses sido algo, si es que lo eres ahora, si no se hubieran cruzado en tu camino.*

*Después de esto, si te queda hueco, acuérdate de que también tú hiciste algo bien.*

# **ABREVIATURAS**



**DNA:** Ácido desoxirribonucleico

**AMS:** Auto-Enrichmented and Monitored Sample

**NA:** Agar nutritivo (“Nutrient Agar”)

**NA-10:** Agar nutritivo (“Nutrient Agar”) diluido 10 veces

**RNA:** Ácido ribonucleico

**BALOs:** *Bdellovibrio* And Like Organisms

**BALO-K:** Tercera generación de BALOs detectados sobre *K. pneumoniae* AA100

**BALO-K12:** Tercera generación de BALOs detectados sobre *E. coli* K-12

**BALO-P:** Tercera generación de BALOs detectados sobre *P. aeruginosa*

**BALO-S:** Tercera generación de BALOs detectados sobre *S. thypimurium* LT2

**BLAST:** Basic Local Aligment Search Tool

**CDR:** Capacidad Depredadora Relativa

**DAPI:** 4'-6 diamidino-2-fenilindol

**DARPA:** Defense Advanced Research Projects Agency

**DBO<sub>5</sub>:** Demanda Biológica de Oxígeno a los 5 días

**DCA:** Técnica de la “Doble Capa de Agar”

**DO<sub>600</sub>:** Densidad óptica a 600nm

**EDAR:** Estación Depuradora de Aguas Residuales

**EMBL-EBI:** European Bioinformatics Institute

**EnvDB:** Environmental Database

**HI:** Host Independent

**iTOL:** Interactive Tree of Life

**MEGA:** Molecular Evolutionary Genetics Analysis

**MuRa1:** BALO detectado sobre *E. coli* K-12 a temperatura ambiente

**MuRa1a:** BALO detectado sobre *E. coli* K-12 a 30°C

**MuRa1b:** BALO detectado sobre *E. coli* K-12 a 37°C

**MuRa2:** BALO detectado sobre *E. coli* 101 a temperatura ambiente

**MuRa2a:** BALO detectados sobre *E. coli* 101 a 30°C

**MuRa2b:** BALO detectados sobre *E. coli* 101 a 37°C

**MuRa3:** BALO detectado sobre *E. coli* C a temperatura ambiente

**MuRa3a:** BALO detectado sobre *E. coli* C a 30°C

**MuRa3b:** BALO detectado sobre *E. coli* C a 37°C

**MuRa4:** BALO detectado sobre *E. coli* Q-13 a temperatura ambiente

**MuRa4a:** BALO detectado sobre *E. coli* Q-13 a 30°C

**MuRa4b:** BALO detectado sobre *E. coli* Q-13 a 37°C

**MuRa5:** BALO detectado sobre *S. thypimurium* LT2 a temperatura ambiente

**MuRa5a:** BALO detectado sobre *S. thypimurium* LT2 a 30°C

**MuRa5b:** BALO detectado sobre *S. thypimurium* LT2 a 37°C

**MuRa6:** BALO detectado sobre *K. pneumoniae* AA100 a temperatura ambiente

**MuRa6a:** BALO detectado sobre *K. pneumoniae* AA100 a 30°C

**MuRa6b:** BALO detectado sobre *K. pneumoniae* AA100 a 37°C

**MuRa7:** BALO detectado sobre *P. aeruginosa* a temperatura ambiente

**MuRa7a:** BALO detectado sobre *P. aeruginosa* a 30°C a 30°C

**MuRa7b:** BALO detectado sobre *P. aeruginosa* a 37°C

**MUSCLE:** Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation

**NB:** Caldo nutritivo (“Nutrient Broth”)

**NB-10:** Caldo nutritivo (“Nutrient Broth”) diluido 10 veces

**NB-50:** Caldo nutritivo (“Nutrient Broth”) diluido 50 veces

**NCBI:** National Center for Biotechnology Information

**PAM:** Point Accepted Mutation

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**PPD:** p-fenilendiamina

**r.p.m.:** revoluciones por minuto

**(SSU) rRNA:** Small Subunit RNA ribosómicos

**TTC:** Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

**UCI:** Unidad de Cuidados Intensivos

**UFP/ml:** Unidades Formadoras de Placa por mililitro

**WHO:** World Health Organization

**WWM:** Wastewater medium

**% GC:** Tanto por ciento molar medio de G+C (Guanina y Citosina)

# ÍNDICE



<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>CAPÍTULO I</b> Microorganismos del grupo BALO: desarrollo histórico	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO II</b> Filogenética de BALOs de nuevo aislamiento en el contexto de la filogenia del grupo	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO III</b> Optimización metodológica de la detección y conservación de BALOs	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO IV</b> Perfil ecológico del grupo BALOs	<b>185</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>281</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>299</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>303</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>325</b>
<b>ANEXO 1:</b> Secuencias genéticas de los BALOs MuRa1a y MuRa6a	<b>327</b>
<b>ANEXO 2:</b> Información obtenida de Genbank de los BALOs seleccionados para el análisis filogenético	<b>329</b>
<b>ANEXO 3:</b> Fórmula y características de los componentes utilizados en medios de cultivo	<b>335</b>
<b>ANEXO 4:</b> Composición de los medios de cultivo para detección y análisis de BALOs	<b>336</b>



# RESUMEN



**Introducción:** *Bdellovibrio* fue descubierto por H. Stolp y H. Petzold en los años 60. Son bacterias gramnegativas, con forma de vibrio, quimioorganótrofas, aerobias y depredadoras de otras bacterias gramnegativas. Poseen un ciclo de vida constituido por dos fases: fase de ataque, donde se fija a la presa, y fase de crecimiento y división, donde crece a expensas de ésta. En la actualidad y ante el problema del incremento de multirresistencias a antimicrobianos, que ha llegado a constituir un desafío para la terapia antimicrobiana, las bacterias del grupo BALOs (del inglés: *Bdellovibrio* And Like Organisms) han suscitado interés como recurso alternativo al uso de antibióticos, tanto en el campo de la patología infecciosa como en la agricultura y acuicultura, ya que son capaces de atacar y destruir una gran variedad de bacterias patógenas gramnegativas.

**Objetivos:** esta investigación tiene como objetivos constatar la diversidad genética entre este grupo bacteriano, establecer una metodología óptima para una recuperación efectiva de BALOs ultracongelados y otra que permita maximizar su detección directamente en el medio, y analizar la capacidad depredadora de BALOs y su especificidad frente a la presa bajo distintas condiciones ambientales.

**Metodología:** los BALOs fueron aislados de la Estación Depuradora de Aguas Residuales (E.D.A.R.) del Campus de Espinardo (Murcia), mediante la llamada “técnica de la doble capa de agar”, empleando como presas, bacterias de interés sanitario, así como distintas condiciones nutritivas y de temperatura para el estudio de su perfil ecológico. Se realizaron experimentos de congelación con concentraciones variables de glicerol para la optimización de la preservación de BALOs a largo plazo y posterior reactivación. El estudio genético y taxonómico de dos cepas de BALOs (MuRa1a y MuRa6a) se realizó por secuenciación y análisis con técnicas bioinformáticas, y búsqueda bibliográfica, respectivamente.

**Resultados:** La revisión bibliográfica sobre la taxonomía del grupo pone de manifiesto los numerosos cambios taxonómicos en los BALOs incluidos actualmente en la clase *Oligoflexia*. En este contexto, los resultados obtenidos tras la secuenciación de los genes del rRNA de algunas cepas de *Bdellovibrio* aisladas en este trabajo sobre hospedadores distintos, revelan clara distancia filogenética entre las mismas, lo que corrobora la variedad genética existente en este grupo bacteriano. De entre las diversas bacterias presa ensayadas para la detección de BALOs directamente del medio acuático, la mayor recuperación con la técnica de la doble capa de agar se obtuvo con cepas de *Escherichia coli* como bacteria presa tras filtración de la muestra por 0,45µm e incubación a 30°C. La detección de BALOs se vio incrementada utilizando un sistema de autoenriquecimiento de la muestra, sin aporte externo de nutrientes. Se ha comprobado que la conservación de BALOs mediante congelación de lisados bimembres de cepas (BALO y hospedador) con glicerol al 20% puede ser realizada de rutina siempre que, en el proceso de recuperación de la cepa, las concentraciones de glicerol residual sean menores del 0,5%. Se observó mayor presencia de BALOs en biotopos de la E.D.A.R donde abundaban las presas independientemente a las condiciones físico-químicas. El mantenimiento en depauperación de lisados de BALOS permitió detectar la transformación de las células infectivas del depredador en diminutas formas cocoides sin capacidad motora.

**Conclusiones:** el grupo BALO es un grupo bacteriano que presenta una gran diversidad genética y de habitat. La disminución de la riqueza del medio de cultivo y el autoenriquecimiento de la muestra, produce una mayor detección de BALOs directamente del medio, observando además que la capacidad depredadora del BALO es mayor si encuentra en el medio la bacteria presa de origen. Además, la concentración baja de glicerol en la congelación favorece la posterior reactivación de las bacterias a estudio. Por ultimo, las nuevas formas cocoides observadas en las cepas de BALOs aisladas parecen aparecer a consecuencia de una depauperación del medio.

# **ABSTRACT**



**Introduction:** *Bdellovibrio* was discovered by H. Stolp and H. Petzold in the 1960s. They are Gram-negative, vibrio shape, chemoorganotrophic, aerobic, and predatory of other Gram-negative bacteria. Their live cycle is composed of two phases: an attack phase for the prey fixing, and another of growth and division, in which *Bdellovibrio* grows at the expense of this. Faced with the problem of the increase in multi-resistance to antimicrobials, that constitutes a challenge for antimicrobial therapy, bacteria of the BALOs group (*Bdellovibrio* And Like Organisms) have raised interest as an alternative resource to the use of antibiotics both in the infectious pathology and agriculture and aquaculture field, due to the capacity that these bacteria present to destroy a wide variety of pathogen bacteria.

**Objectives:** This research aims to verify the genetic diversity among this bacterial group, to establish a methodology that allows an effective recovery of deep-frozen BALOs and another methodology that increase in their detection directly from the medium, and to analyze the BALOs predatory capacity and BALOs specificity against their prey under different Ambiental conditions.

**Methodology:** BALOs were isolated from the Industrial water treatment (E.D.A.R. from the Spanish acronym) located at the University of Murcia, using a procedure called “Double-layer agar technique”. For that issue medically bacteria were used as prey, performing the experiment in a variety of temperature and nutritional conditions for the study of different ecologic aspects. Besides, freezing experiments were performed with a variety of glycerol concentrations to find the optimized methodology for the long-term preservation of BALOs and their subsequent reactivation. For the genetic and taxonomic contextualization, two strains of BALOs (MuRa1a y MuRa6a) were sequenced and both bioinformatics techniques and bibliographic searches were used, respectively.

**Results:** Our bibliography review showed us the numerous taxonomic changes suffered by BALOs, until were placed in their current class: *Oligoflexia*. The results obtained after sequencing the two *Bdellovibrio* strains reveal a phylogenetic distance between them and corroborate the genetic variation of this bacterial group. The detection of BALOs directly from the aquatic environment was higher when using *Escherichia coli* strains as prey bacteria after filtration and incubation of the two bacteria types at 30°C. This detection was increased by using a system that stimulates the self-enrichment of the sample, without the external contribution of nutrients. The freezing experiment resulted in reactivation of BALOs only possible at glycerol concentrations lower than 0.5%, while, in the ecological field, the BALOs showed great predation specificity depending on their original prey bacteria and a greater presence of BALOs was observed in biotopes of the E.D.A.R. where prey abounded regardless of the physico-chemical conditions. Finally, it was possible to observe a transformation of the infective form towards non-mobile compact coccoid forms when BALOs isolated from E.D.A.R. were incubated with their prey during days.

**Conclusions:** BALOs group is a bacterial group with a high genetic and habitat diversity. The decrease in the richness of the culture medium and the self-enrichment of the sample, produces a greater detection of BALOs directly from the medium, also observing that the predatory capacity of the BALO is greater if the prey bacteria of origin are found in the medium. Besides, the use of a low concentration of glycerol during the freezing procedure stimulates the subsequent reactivation of the bacteria under study. Finally, the new

coccoid forms observed in the isolated BALO strains seem to appear as a consequence of the impoverishment of the environment.

# INTRODUCCIÓN



Las infecciones bacterianas resistentes a los antibióticos son un desafío para la salud pública global que ha ido creciendo durante las últimas décadas en importancia. Las infecciones por bacterias resistentes a antibióticos se están volviendo cada vez más usuales y algunos patógenos incluso se han vuelto resistentes a múltiples tipos de antibióticos. Si el problema persiste, la pérdida de antibióticos efectivos no hará sino menoscabar nuestra capacidad para combatir enfermedades y/o complicaciones infecciosas en pacientes vulnerables como lo son aquellos que se encuentren bajo tratamiento de quimioterapia, en diálisis, en cirugía y, de manera especial, en aquellos que necesiten de un trasplante (Shatzkes, Connell, & Kadouri, 2017). En todos estos casos, la capacidad de tratar infecciones secundarias es crucial debido a que la mayoría de las bacterias, virus y otros microbios que se multiplican rápidamente, pueden evolucionar en un corto periodo de tiempo y desarrollar resistencia a los medicamentos antimicrobianos (World Health Organization, 2014). En la lucha contra las bacterias resistentes, la Organización Mundial de la Salud ha lanzado un Plan de Acción Global (GAP de sus siglas en inglés) para frenar la resistencia antimicrobiana (“WHO | Global action plan on AMR,” 2016).

Debido al aumento de la calidad y de la cantidad de nuevas técnicas moleculares, especialmente las genético-moleculares que han aparecido en los últimos 20 años, ha habido un aumento de investigaciones sobre BALOs (del inglés: *Bdellovibrio* And Like Organisms) con objeto de explotar su potencial como agente antimicrobiano (Bratanis, Andersson, Lood, & Bukowska-Faniband, 2020). En consecuencia, se están destinando muchos esfuerzos en la investigación de este grupo bacteriano y prueba de ello es el Programa de Depredadores de Patógenos (Agencia DARPA, EEUU) que fue dotado de un importante presupuesto para la investigación a este respecto (Reardon, 2015).

Son muchas los géneros de bacterias gramnegativas, entre ellas muchas patógenas, que infectan a humanos, animales y vegetales que pueden ser depredadas por una o más cepas de *Bdellovibrio* (Dashiff, Junka, Libera, & Kadouri, 2011). Estas bacterias pertenecen a una amplia gama de posibles hospedadores de BALOs tales como *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Chromatium*, *Spirillum*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bordetella*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Listonella*, *Morganella*, *Proteus*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* entre otras patógenas. Por todo lo anterior, muchos autores han considerado a los BALOs y, en concreto, al género *Bdellovibrio* como un "antibiótico vivo" con enorme potencial como agente antibacteriano tanto en la bioprotección ambiental como en la salud pública (Sinha, Hurakadli, Ravindra, & Agarwal, 2014; Tyson & Sockett, 2017). Además, Markelova y su equipo demostraron que los BALOs son capaces de depredar a patógenos como *Vibrio cholerae*, tanto en crecimiento activo como en estado viable no cultivable (Markelova, 2015). Recientemente, se está consiguiendo controlar la podredumbre de la raíz de patata causada por *Pectobacterium* spp. y *Dickeya* spp. con BALOs (Youdkes, Helman, Burdman, Matan, & Jurkevitch, 2020).

En la actualidad, el interés del estudio de bacterias de grupo BALOs radica en dos vías principales: la primera tiene que ver con la creciente comprensión del microbioma

humano, la cual ha llevado a una nueva apreciación del papel que juegan los microbios de nuestro organismo en la protección contra los patógenos, especialmente en el intestino. Cuando los antibióticos son utilizados, ya sea de una manera más o menos adecuada según las recomendaciones sanitarias, conducen a un desequilibrio del ecosistema microbiano intestinal, lo que permite la colonización por patógenos bacterianos resistentes a los antibióticos. Muchas líneas diferentes de investigación han identificado taxones bacterianos específicos y mecanismos que desempeñan un papel en la resistencia a la colonización por patógenos y estas líneas de investigación pueden, algún día, conducir a terapias microbianas dirigidas a las bacterias invasoras resistentes a los antibióticos (Wong & Santiago, 2017).

La segunda vía de interés en el estudio de estos microorganismos se basa en cuestiones de estrategia de depredación intermicrobiana y en explotar la capacidad depredadora de este grupo bacteriano: debido a la masiva proliferación microbiana, uno de los sistemas en los que los BALOs pueden jugar un importante papel como agentes de control intermicrobiano son en los sistemas biológicos de las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (E.D.A.R.). De hecho, muy recientemente, se han utilizado BALOs conjuntamente con bacteriofagos consiguiendo una mayor eficacia en la lisis de *E. coli* presente en aguas residuales (Hobley et al., 2020). La profundización del papel de los BALOs en este hábitat es importante a nivel de conseguir un mayor conocimiento sobre la capacidad depredadora de estas bacterias depredadoras en cada una de las fases de los sistemas de tratamiento de aguas.

La capacidad depredadora de los BALOs tiene potencial para ser elemento básico de nuevas terapias que combatan a las bacterias resistentes a los antibióticos, además de otras futuras aplicaciones biotecnológicas como las que se están investigando actualmente en base a las enzimas secretadas por BALOs (Bratanis, Andersson, Lood, & Bukowska-Faniband, 2020) y las que tienen como objetivo potencial el mejorar la seguridad de la carne fresca, los preparados de carne y los productos cárnicos preenvasados, así como para reducir, en un futuro, el uso de aditivos en dichos productos (Ottaviani et al., 2020). Debido a lo anterior, las bacterias del grupo BALOs desde hace algunos años han sido propuestas para su uso en control antimicrobiano (Rotem, Pasternak, & Jurkevitch, 2014; Shatzkes et al., 2016), ya que atacan y destruyen a una gran variedad de bacterias patógenas gramnegativas. En la Figura 1 se muestran las líneas actuales de interés en el estudio de los BALOs.



**Fig. 1.** Áreas de interés actual en el estudio de las bacterias depredadoras del grupo BALOs.

Con independencia del potencial de las bacterias del grupo BALOs como agentes de control poblacional microbiano, actualmente existen multitud de aspectos desconocidos de este grupo relacionados con el reconocimiento de la presa por parte del depredador, su comportamiento y función en la naturaleza e incluso su ciclo de vida. Por lo que, con vistas a un futuro uso de bacterias del grupo BALOs como control de patógenos, es necesario mejorar los métodos de detección de este grupo bacteriano directamente del medio ambiente, así como de disponer de información sobre las condiciones en las que las diversas cepas de BALOs han de ser preservadas para permanecer activas y viables a largo plazo. Además, desde un punto de vista ecológico, es necesario realizar investigación básica sobre la capacidad depredadora de BALOs sobre diversidad de bacterias gramnegativas, para conocer mejor ante qué bacterias gramnegativas son más efectivos los BALOs y bajo qué condiciones ambientales. En este contexto, el presente estudio se ha investigado algunos de esos aspectos poco estudiados, sobre todo en lo referente a la biología y a la detección directa de BALOs en el medio natural.

El trabajo se ha diferenciado en cuatro capítulos: el primero consiste en una revisión bibliográfica del desarrollo histórico sobre los aspectos básicos y aplicados de las bacterias que componen el grupo BALO; el segundo capítulo incluye investigación de taxonomía genético-molecular de algunas cepas de BALOs aisladas en este trabajo BALOs empleando herramientas bioinformáticas. El tercer capítulo expone los resultados sobre la optimización metodológica desarrollada para una detección más eficaz de BALOs directamente del medio, así como el trabajo realizado para mejorar las condiciones tanto de una mejor conservación a largo plazo como de su posterior reactivación. El cuarto capítulo expone los resultados obtenidos en el estudio de BALOs a nivel ecológico, como son su capacidad depredadora y sus condiciones ideales de supervivencia en el medio acuático. Asimismo, en este mismo capítulo se describe el

hallazgo de la formación de formas cocoides por parte de células vegetativas de BALOs tras determinadas condiciones de incubación.

En definitiva, en este trabajo, se ha estudiado el grupo BALO en el área de la microbiología de la depuración de aguas residuales presentando resultados sobre aspectos poco estudiados de bacterias del grupo BALOs, en particular de las aisladas de aguas residuales. Todas las bacterias presa que han sido utilizadas en este trabajo corresponden a bacterias gramnegativas tanto de interés sanitario como ambiental, buscando la futura aplicabilidad de lo investigado.

# **OBJETIVOS**



## **OBJETIVOS PRINCIPALES**

- ▣ Estudiar la versatilidad y variabilidad genética y de hábitat entre bacterias del grupo BALOs.
- ▣ Optimizar los métodos de detección y aislamiento de BALOs directamente del medio natural.
- ▣ Analizar de forma crítica la reactivación de cepas de BALOs preservados durante largos periodos mediante congelación a  $-70^{\circ}\text{C}$ .
- ▣ Profundizar en el conocimiento de aspectos ecológicos y del ciclo de vida de las bacterias del grupo BALOs.



# **CAPÍTULO I**

**Microorganismos del  
grupo BALO: desarrollo  
histórico.**



# ÍNDICE DEL CAPÍTULO

<b>I-1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>23</b>
<b>I-1.1. EVOLUCIÓN DE LA TAXONOMÍA DEL GRUPO BALOs</b>	<b>23</b>
<b>I-1.1.1.</b> El género <i>Bdellovibrio</i> (1962-2000)	24
<b>I-1.1.2.</b> Creación del grupo BALOs (2000)	25
<b>I-1.1.3.</b> La clase <i>Oligoflexia</i> (2014-Actualidad)	27
<b>I-1.2. CICLO DE VIDA DE LOS BALOs</b>	<b>29</b>
<b>I-1.2.1.</b> Fase de ataque	29
<b>I-1.2.2.</b> Fase de crecimiento y división	31
<b>I-1.2.2.1.</b> BALOs periplásmicos	31
<b>I-1.2.2.2.</b> BALOs epibióticos	32
<b>I-1.2.3.</b> BALOs independientes de huésped	33
<b>I-1.3. LA DEPREDACIÓN EN BALOs</b>	<b>35</b>
<b>I-1.4. APLICACIONES E INVESTIGACIONES ACTUALES DE BALOs</b>	<b>37</b>
<b>I-1.4.1.</b> Tratamiento de aguas	37
<b>I-1.4.2.</b> Control de patógenos humanos	38
<b>I-1.4.3.</b> Otras investigaciones	39



## I-1. INTRODUCCIÓN

El género *Bdellovibrio* puede describirse como bacterias depredadoras, parásitas, simbioses o parasitoides y la bacteria consumida como presa o huésped (Rosenberg, DeLong, Lory, Stackebrandt, & Thompson, 2013).

La depredación es una interacción importante que afecta tanto al comportamiento como la evolución de los organismos. Si bien las relaciones de depredación son comunes en organismos superiores y bacterianos, los primeros ha sido objeto de multitud de investigaciones mientras que en el ámbito bacteriano la depredación se conoce de manera más superficial. La falta de conocimiento sobre las bacterias depredadoras tiene su razón de ser en lo difícil y lento que resulta encontrar en muestras naturales interacciones depredadoras bacterianas *in vivo*; en un sentido estricto, exceptuando la depredación de microorganismos que llevan a cabo organismos pluricelulares (rotíferos, crustáceos), la depredación microbiana sobre bacterias en un ecosistema más o menos complejo, engloba a diversos tipos de bacterias entre los procariotas, bacteriófagos y protistas como variedad de protozoos. Un aislamiento directo de bacterias depredadoras dependerá del rango de presas y depredadores disponible y estará limitado a la cantidad de presas potenciales que puedan manipularse experimentalmente *in vitro*. Al respecto de dicha manipulación, la mayoría de las presumibles presas que se encuentren en el medio pueden no ser susceptibles de cultivo y, por lo tanto, aunque existieran depredadores ahí, éstos seguirían siendo desconocidos. Las dificultades mencionadas se han visto suavizadas por las relativamente nuevas técnicas que permiten detectar la presencia y aún identificar los tipos de nuevos depredadores atendiendo a su genoma (Pasternak et al., 2013).

### I-1.1. EVOLUCIÓN DE LA TAXONOMÍA DEL GRUPO BALOs

El género *Bdellovibrio* fue aislado por primera vez por H. Stolp y H. Petzold en los años 60 (Stolp & Petzold, 1962). Con el tiempo se obtuvieron aislamientos de bacterias similares, de modo que, debido al amplio espectro de presas aptas para ser infectadas por estas bacterias (incluyendo aquellas con nuevas estrategias infectivas) así como la variedad de ecosistemas donde fueron aisladas, la comunidad científica las designó como un conjunto bacteriano con características semejantes. Esta “progenie taxonómica” del género original *Bdellovibrio*, recibió y todavía conserva, el nombre de BALOs (*Bdellovibrio* And Like Organisms) (Snyder, Williams, Baer, Walker, & Stine, 2002).

Años más tarde, las bacterias del grupo BALOs fueron objeto de una profunda reclasificación: el orden de los *Bdellovibrionales*, del cual procedían multitud de bacterias pertenecientes al grupo, sería incluido en una nueva clase llamada *Oligoflexia* (Nakai et

al., 2014); clase que también abarca a familias existentes como *Bdellovibrionaceae*, *Peredibacteraceae* y *Bacteriovoracaceae*, además de crear nuevas familias como *Pseudobacteriovoracaceae* (McCauley, Haltli, & Kerr, 2015) y *Halobacteriovoraceae* (Susan F. Koval, Williams, & Colin Stine, 2015).

### I-1.1.1. El género *Bdellovibrio* (1962-2000)

*Bdellovibrio bacteriovorus*, la especie original en el género, es una bacteria gramnegativa y un depredador obligado de otras bacterias gramnegativas. Sus células son de pequeño tamaño (0.2–0.5µm de ancho y 0.5–2.5µm de largo), tienen una gran movilidad (posee un sólo flagelo polar envainado) y gran velocidad, la cual fue estimada en 100 veces su tamaño celular por segundo (Rittenberg, 1983). Después del artículo en que se comunicó el descubrimiento de los bdellovibrios (Stolp & Petzold, 1962), en el segundo artículo, *Bdellovibrio bacteriovorus* se presentaba a las bacterias aisladas como depredadores ectoparasitarios y bacteriolíticos (Stolp & Starr, 1963). En esa década, se describió cómo se producía la penetración por parte de *B. bacteriovorus* a las células presa y el posterior crecimiento intraperiplasmático del parásito (Burnham, Hashimoto, & Conti, 1968; Starr & Baigent, 1966). Esas investigaciones pioneras condujeron a conocer más a fondo el ciclo de vida de la bacteria y a considerarlo, como se mostrará detalladamente, un ciclo de vida caracterizado por una *fase de ataque* o de vida libre y una fase de *división y crecimiento* dentro del periplasma de la bacteria presa (Koval et al., 2013). Además, la capacidad de *Bdellovibrio* de sobrevivir más de una semana en un ambiente anóxico y su capacidad de subsistencia en condiciones microaerobias expande los posibles nichos ecológicos en los que estas bacterias depredadoras pueden ser miembros activos (Schoeffield, Williams, Turng, & Falkler, 1996).

Durante algunos años, los nuevos aislamientos de bacterias poseedoras de la misma estrategia que los “bdellovibrios” se incluyeron en el género *Bdellovibrio*, como las cepas de la única especie *Bdellovibrio bacteriovorus*, en función de sus características morfológicas (forma de coma; móviles mediante un único flagelo, polar y envainado) y de su ciclo de vida depredador.

En 1969, R.J. Seidler y M.P. Starr informaron de los contenidos de los porcentajes de guanina y de citosina (%GC) de 11 aislamientos de *Bdellovibrio* y observaron que dos aislamientos de nomenclatura incierta tenían un %GC contenido de G + C mol% menor que el resto de aislamientos (Seidler, Starr, & Mandel, 1969). El hallazgo desembocó en la descripción de dos nuevas especies en 1972: *Bdellovibrio starrii* (el aislado del trabajo original de Stolp y Starr) y *Bdellovibrio stolpii* (Seidler, Mandel, & Baptist, 1972).

Con el desarrollo de la nueva taxonomía genético-molecular (Hespell et al., 1984; Oyaizu & Woese, 1985) basada en el estudio de los ácidos nucleicos (%GC, homología,

secuenciación, etc.), el género *Bdellovibrio* se incluyó al filo de las Proteobacterias, clase  $\delta$ -proteobacteria, orden *Bdellovibrionales* y familia *Bdellovibrionaceae*.

Tras años de inmovilismo a nivel taxonómico, estas nuevas especies serían objeto de los primeros movimientos de categoría tras ser reclasificadas en un nuevo género: el género *Bacteriovorax*, denominándose ambas especies, como se puede observar en la Tabla 1, *Bacteriovorax starri* y *Bacteriovorax stolpii* (Baer, Ravel, Chun, Hill, & Williams, 2000).

### I-1.1.2. Creación del grupo BALOs (2000)

Tras la aparición del género *Bacteriovorax* en el año 2000, los estudios de bacterias con características semejantes al original *Bdellovibrio*, es decir, las actuales bacterias del grupo BALOs (Baer et al., 2000), se referían a un grupo escasamente definido y compuesto por dos géneros: el género *Bdellovibrio* original y el recién designado *Bacteriovorax* (Snyder et al., 2002). Posteriormente, estos dos géneros se encuadraron en la familia *Bdellovibrionaceae* dentro del orden de los *Bdellovibrionales* (Garrity, Bell, Lilburn, Lilburn, & Lansing, 2004).

A partir de entonces, el grupo BALO se ajustó la definición del grupo BALOs al incluir a aquellas bacterias depredadoras gramnegativas, con morfología y ciclo de vida típico de los bdellovibrios, que habitan en ambientes terrestres, de agua dulce y de agua salada. Pero los análisis de las secuencias de ARNr 16S realizados en esos años sugerían que las bacterias del grupo BALO podrían tener múltiples orígenes, al contrario de lo que sugería la agrupación taxonómica unificada basada en la morfología y el ciclo de vida (Snyder et al., 2002).

De modo que, en el año 2004, la división de *Bdellovibrio* sp. marinos en *Bacteriovorax marinus* y *Bacteriovorax litoralis* (Baer, Ravel, Piñeiro, Guether-Borg, & Williams, 2004) trajo consigo la exclusión de *Bacteriovorax starii* del género *Bacteriovorax*, siendo asignado a un nuevo género: el género *Peredibacter*, pasando a denominarse *Peredibacter starrii* (Davidov & Jurkevitch, 2004). En ese mismo año, tanto el género *Bacteriovorax* como el recién formado *Peredibacter* se incluyeron en una nueva familia llamada *Bacteriovoraceae* (Davidov & Jurkevitch, 2004) (Tabla 2) y las bacterias del grupo BALOs recibieron, por consenso, una definición más precisa y cercana a la definición actual: un grupo de bacterias gramnegativas, quimioorganotrofas, aerobias, mesofilicas, con forma de vibrio, con una alta motilidad, depredadoras obligadas de otras bacterias gramnegativas y con una fase diferenciada de ataque o búsqueda de presa y otra de crecimiento y división.

Así, el grupo BALOs, debido a la naturaleza diversa de sus integrantes, en la actualidad comprende a bacterias capaces de proliferar en ambientes salinos (halófitas), valores de %GC aceptablemente próximos, perfiles parecidos de ácidos grasos y similares composiciones tanto de proteínas de membrana como de variaciones antigénicas, como

señalan los numerosos estudios (Jurkevitch, Minz, Ramati, & Barel, 2000; D. C. Sutton & Besant, 1994; Taylor, Baumann, Reichelt, & Allen, 1974).

Unos años después, se incluyó en el grupo BALOs a *Micavibrio* spp, un depredador con una estrategia depredadora epibiótica perteneciente a la clase  $\alpha$ -proteobacteria y no a  $\delta$ -proteobacteria como el resto de los BALOs que poseen además estrategia periplásmica (Davidov, Huchon, Koval, & Jurkevitch, 2006). Por último, el equipo de Piñeiro reclasificó también a *Bacteriovorax stolpii* (una de las primeras bacterias en las que se basó la creación del grupo BALOs) como *Bacteriolyticum stolpii* (Piñeiro, Williams, & Stine, 2008) (Tabla 1), aunque aún se utilizan las dos nomenclaturas (nombre homotípico). De hecho, aparece *Bacteriovorax stolpii* en la *Lista Aprobada de Nombres de Bacterias*.

Reclasificación histórica de bacterias de grupo BALO		
Nomenclatura Anterior	Nomenclatura Posterior	Año del cambio
<i>Bdellovibrio starri</i>	<i>Bacteriovorax starri</i>	2000
<i>Bdellovibrio stolpii</i>	<i>Bacteriovorax stolpii</i>	2000
<i>Bdellovibrio</i> sp.	<i>Bacteriovorax marinus</i>	2004
	<i>Bacteriovorax litoralis</i>	2004
<i>Bacteriovorax starri</i>	<i>Peredibacter starri</i>	2004
<i>Bacteriovorax stolpii</i>	<i>Bacteriolyticum stolpii</i> *	2008
<i>Bacteriovorax marinus</i>	<i>Halobacteriovorax marinus</i>	2015
<i>Bacteriovorax litoralis</i>	<i>Halobacteriovorax litoralis</i>	2015

**Tabla 1.** Reclasificación bacterias pertenecientes al grupo BALOs a lo largo del tiempo.  
\* Nomenclatura homotípica.

En el año 2014, las bacterias del grupo BALO contenían a *Micavibrio* spp. procedente de la clase de las  $\alpha$ -proteobacteria y a especies pertenecientes a  $\delta$ -proteobacteria, distribuidas de tres familias: *Bdellovibrionaceae*, *Bacteriovoracaceae* y *Peredibacteriaceae*, cada una con sus propias divisiones (Tabla 2).

Debido a la irrupción de la secuenciación a gran escala de muestras ambientales, se comprobó que el árbol de la familia *Bdellovibrionaceae*, está dividido en dos grupos: uno que abarca todas las secuencias de cepas cultivadas (así como algunas secuencias de bacterias no cultivadas) y otro grupo sin ningún representante cultivado debido a la imposibilidad de emplear a los organismos utilizados hasta el momento como presas para aislar a los depredadores. Por lo tanto, este último grupo podría representar organismos que son diferentes en cuanto a estrategia depredadora o adaptación al medio del resto de BALOs, (Koval et al., 2013). En esa primera década del año 2000, la familia *Bdellovibrionaceae* contenía el género *Bdellovibrio* y dos especies definidas: *B. bacteriovorus* y *B. exovorus*. A pesar de que *B. bacteriovorus* HD100<sup>T</sup> y *B. exovorus* JSS<sup>T</sup> difieren solo en un 7% en el %GC (Koval et al., 2013), la principal diferencia entre estas especies está en su estrategia depredadora: *B. bacteriovorus* es un depredador periplásmico, es decir, penetra y se instala en el espacio periplásmico de su presa

gramnegativa, mientras que *B. exovorax* es epibiótico, y mientras depreda permanece unido a la pared celular de su presa, sin llegar a penetrarla.

La familia *Bacteriovoraceae*, en cambio, está compuesta por 10 grupos filogenéticos basados en que los aislamientos ambientales poseen 96,5% de similitud genética en la secuencia del gen 16S rRNA (Pineiro et al., 2007). La familia también abarca nueve grupos de *Bacteriovorax* de agua salada, que incluyen *Bacteriovorax marinus* y *Bacteriovorax litoralis* (Baer et al., 2004), así como *Bacteriolyticum stolpii* aislado en agua dulce y en suelo (Piñeiro et al., 2008). Estos grupos resultan ser grupos robustos, como lo demuestra el análisis del gen *rpoB* que codifica la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa y permite subdivisiones taxonómicas más precisas (Piñeiro et al., 2008).

Como se ha indicado anteriormente, la familia *Peredibacteriaceae* se creó como una ramificación monofilética de la familia *Bacteriovoraceae*. Esta división se basó en un contenido de %GC de 43.5%, su presencia en agua dulce y suelo (pero no en ambientes salinos) y en las notables diferencias en la secuencia del gen 16S rRNA con *Bdellovibrionaceae* y *Bacteriovoraceae* (Piñeiro et al., 2008).

Por último, *Micavibrio* forma un clado de ramificación profunda en las  $\alpha$ -proteobacteria (Davidov et al., 2006; Wang, Kadouri, & Wu, 2011) y se compone de dos especies: *M. admirandus* (de contenido de G + C mol% de 57.1%), que solo crece sobre *Stenotrofomonas* (*Pseudomonas*) *maltophilia* (Lambina et al. 1982) y *M. aeruginosavorus* (contenido G+C mol% de 54.7%) que crece en varias enterobacteriáceas y pseudomonas. En lo referente a esta familia, se dispone de muy pocos aislamientos y secuencias ambientales (Rotem et al., 2014).

### **I-1.1.3. La clase *Oligoflexia* (2014-Actualidad)**

En el año 2014 se aisló una nueva especie de proteobacteria en el desierto del Sáhara que era capaz de desempeñar sus funciones biológicas con pocos recursos o en condiciones poco favorables. La cepa conocida más cercana, con un 83% de similitud en su secuencia, resultó ser *Desulfomicrobium orale* perteneciente a la clase  $\delta$ -proteobacterias. La nueva especie dio lugar a una nueva clase en el filo Proteobacteria: la clase *Oligoflexia* y a la nueva especie recién aislada se le denominó *Oligoflexus tunisiensis* Shr3<sup>T</sup>. La designación de la nueva clase trajo consigo la definición de los taxones subordinados: el orden de los *Oligoflexales* y la familia *Oligoflexaceae* (Nakai et al., 2014).

Según la definición original del artículo de Nakai (Nakai et al., 2014):

“*Oligoflexus* (O.li.go.fle'xus. Adj *Oligos*: poco, pocos; Adj. *Flexus*: doblado, curvado); bacteria gramnegativa, no móvil, no formadora de esporas, aerobia, con forma pleomórfica: generalmente presentada como una forma fusiforme

filamentosa, flexible y larga o en una forma helicoidal. Las células de este género crecen en condiciones de bajos nutrientes. [...] El %GC del DNA de la cepa tipo de la especie es 54.0 mol%”

Al año siguiente, se designaron nuevas familias dentro del orden de los *Bdellovibrionales* como *Pseudobacteriovoraceae* (constituyéndose tras aislarse *Pseudobacteriovorax antillogorgiicola* por primera vez) (McCauley et al., 2015) y *Halobacteriovoraceae* (tras producirse la reclasificación de *Bacteriovorax marinus* como *Halobacteriovorax marinus* y *Bacteriovorax litoralis* como *Halobacteriovorax litoralis*) (Koval et al., 2015) (Tabla 1).

Dos años después, también con la participación de Sakai, se produjo una serie de cambios importantes a nivel taxonómico en las bacterias de grupo BALO. El equipo de Sakai aisló otra nueva especie, *Silvanigrella aquatica*, procedente de un lago ubicado en la Selva Negra, Alemania. Tras el aislamiento y nomenclatura de la especie, tal y como sucediera anteriormente con *Oligoflexus tunisiensis* Shr3<sup>T</sup>, tuvo lugar la definición de un nuevo orden y de una nueva familia; el orden de los *Silvanigrellales* y la familia *Silvanigrellaceae*. Estas nuevas adiciones a la clase *Oligoflexia* propiciaron la inclusión del orden *Bdellovibrionales* en la misma, además de la reclasificación de las familias *Bacteriovoraceae* y *Halobacteriovoraceae* en el nuevo orden *Bacteriovoracales*, así como la inclusión en el orden *Oligoflexales* de la recientemente descrita familia *Pseudobacteriovoraceae* (Hahn et al., 2017) (Tabla 2).

Tras los cambios anteriormente descritos, el grupo BALOs quedó constituido de la forma en la que lo está actualmente; las bacterias del grupo BALOs conforman un grupo polifilético en el que se encuentran dos clases diferentes: la  $\alpha$ -proteobacteria, con el género *Micavibrio*, y la clase *Oligoflexia* que incluye cinco familias: *Bdellovibrionaceae*, *Peredibacteraceae*, *Bacteriovoraceae*, *Pseudobacteriovoraceae* y *Halobacteriovoraceae* (Tabla 2). Aun así, existen numerosas cepas pertenecientes a cada una de las familias que aún no se encuentran clasificadas.

Evolución del linaje de las bacterias del grupo BALOs						
Dominio	Filo	Clase	Orden	Familia	Género	Año
Bacteria	Proteobacteria	δ- proteobacteria	Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	<i>Bdellovibrio</i>	2004
					<i>Bacteriovorax</i>	
Bacteria	Proteobacteria	δ- proteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoraceae	<i>Bdellovibrio</i>	2006
					<i>Bacteriovorax</i>	
Bacteria	Proteobacteria	δ- proteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoraceae	<i>Bdellovibrio</i>	2008
					<i>Bacteriovorax</i>	
		α-proteobacteria	No definido	No definido	<i>Micavibrio sp</i>	
Bacteria	Proteobacteria	δ- proteobacteria	Bdellovibrionales	Bacteriovoraceae	<i>Bdellovibrio</i>	2015
					<i>Bacteriovorax</i>	
				<i>Peredibacter</i>		
				Pseudobacteriovoraceae	<i>Pseudobacteriovorax</i>	
		α-proteobacteria	No definido	No definido	<i>Micavibrio sp</i>	
Bacteria	Proteobacteria	Oligoflexia	Bacteriovorales	Bacteriovoraceae	<i>Bacteriovorax</i>	2017
				Peredibacteraceae	<i>Peredibacter</i>	
				Halobacteriovoraceae	<i>Halobacteriovorax</i>	
			Oligoflexales	Pseudobacteriovoraceae	<i>Pseudobacteriovorax</i>	
			Bdellovibrionales	Bdellovibrionaceae	<i>Bdellovibrio</i>	
Bacteria	Proteobacteria	α-proteobacteria	No definido	No definido	<i>Micavibrio</i>	

**Tabla 2.** Resultado de los cambios en la clasificación de los taxa del grupo BALOs en el período 2004-2020.

### I-1.2. CICLO DE VIDA DE LOS BALOs

El ciclo de vida de las bacterias del grupo BALO está compuesto por dos fases principales y diferenciadas: una *fase de ataque* y una fase de *crecimiento y división*. La segunda etapa tiene una importante subdivisión que depende de la estrategia depredadora adoptada: los BALOs pueden ser depredadores periplásmicos (penetrando en la presa y creciendo a expensas de ésta) o epibióticos (no penetran en la presa).

#### I-1.2.1. Fase de ataque

El BALO libre, es móvil mediante su flagelo polar, lo que utiliza para encontrar a su presa (Figura 2). Las células en fase de ataque son pequeñas células altamente móviles y en cuyo denso núcleo se pueden encontrar gránulos, que podrían asemejarse a acidocalcisosomas (orgánulos ácidos y redondeados, densos en electrones, ricos en calcio y polifosfato), enriquecidos en fósforo, calcio y oxígeno (Borgnia, Subramaniam, & Milne, 2008). El potente y único flagelo envainado de los BALOs en fase de ataque está

compuesto por seis proteínas distintas de flagelina (FliC1-6) que los impulsa a altas velocidades de hasta 160  $\mu\text{m/s}$  (Iida et al., 2009; Lambert et al., 2006; Seidler & Starr, 1968; Thomashow & Rittenberg, 1985). En la rotación flagelar se ven implicadas tres pares de proteínas motoras flagelares MotAB (Morehouse, Hobley, Capeness, & Sockett, 2011) que dotan a la bacteria de una movilidad que resulta crucial para encontrar presas, pero que no es necesaria para su penetración, siendo las diversas proteínas de quimiotaxis las encargadas de detectar varios ligandos para posteriormente proporcionar señales quimiotácticas hacia iones inorgánicos, ácidos orgánicos y aminoácidos (Lamarre, Straley, & Conti, 1977; Sourjik & Wingreen, 2012; Straley, LaMarre, Lawrence, & Conti, 1979).

Una vez establecido el contacto con la presa, el BALO conforma un “ensamblaje” con ella que provoca una unión irreversible entre depredador y presa. Para la fijación a la presa (Figura 2), existen muchos factores implicados como la composición y pH del medio, el oxígeno y la temperatura (Varon & Shilo, 1968). Al principio, la fijación es reversible, lo que le permite descartar a células que no sean susceptibles de ser presas (Yair, Yaacov, Susan, & Jurkevitch, 2003), pero en cuestión de minutos, ésta se vuelve irreversible. La base del reconocimiento de presas por parte de BALO aún es siendo objeto de investigación:

En el caso de *B. bacteriovorus*, la bacteria detecta los oligosacáridos centrales de la capa de lipopolisacáridos de la membrana externa de la presa y, cuando esta detección cesa, el proceso de unión con la presa se detiene, pero no se elimina. En contraste, la detección de *Bacteriolyticum stolpii* con su presa es indiferente a la composición de la capa de lipopolisacáridos esta, pero su capacidad se ve reducida en ausencia de porinas específicas presentes en la membrana externa de la célula presa como OmpF y OmpC en *E. coli* (Schelling & Conti, 1986; Varon & Shilo, 1969).

En general, las bacterias del grupo BALOs sintetizan estructuras lipídicas de membrana que varían mucho entre los distintos taxones: por ejemplo, en *B. bacteriovorus*, el lípido A está completamente desprovisto de grupos con carga negativa y posee residuos de  $\alpha$ -D-manopiranososa en lugar de grupos fosfato; *B. stolpii* contiene esfingofosfolípidos y los lípidos de *Peredibacter starrii* incluyen estructuras de fosfatidiletanolamina con un “residuo” adicional de N-glutamilo (Müller, Beck, Strauch, & Linscheid, 2011; Nguyen, Sallans, & Kaneshiro, 2008). Esta variada composición de los lípidos en las diferentes bacterias del grupo BALO sugiere que tanto la fluidez como la permeabilidad de su membrana externa se pueden ver afectados y repercutir, en consecuencia, en su interacción con la superficie de la presa. Sin embargo, la capacidad de diferentes especies de BALOs para depredar la misma presa, a pesar de disponer de estructuras lipídicas distintas, sugiere que estas estructuras o no representan una interacción significativa con la presa, o interactúan con diferentes componentes de la pared celular de la misma, o los componentes de la presa son similares siendo distintos los mecanismos utilizados.

En el grupo BALOs, los pili de tipo IVa están presentes en el polo no flagelado de las bacterias en fase de ataque y son esenciales para la fijación y posterior penetración (y

consecuente invasión) de la presa (Evans, Lambert, & Sockett, 2007; Mahmoud & Koval, 2010). Estos pili permanecen durante la fase de crecimiento y división, y los genes necesarios para su montaje se expresan a lo largo de todo el ciclo de crecimiento, lo que sugiere que los pili también desempeña un papel durante la replicación. Además, un estudio sugiere que el pili tipo IVb promueve la depredación de *B. bacteriovorus* en biofilms (Medina, Shanks, & Kadouri, 2008).

El siguiente estadio en la fase de ataque de BALOs es la invasión de presas y la posterior formación de bdelloplastos (Figura 2). La unión irreversible anteriormente explicada, desencadena la lisis local de la envoltura de la presa (Abram, Castro e Melo, & Chou, 1974) que comienza por medio de la penetración del BALO, a través de un poro, hacia el periplasma de la presa (Evans et al., 2007). Se ha sugerido que el inicio de la invasión a la presa se rige por la producción de diguanilato ciclasa en respuesta a un estímulo desconocido (Hobley, Fung, et al., 2012) y que también puede implicar el uso de pili (Evans et al., 2007; Mahmoud & Koval, 2010). El proceso de penetración se verá completado de 5 a 20 minutos después de la fijación y, en ese tiempo, el peptidoglucano de la presa se modifica produciendo una estructura menos sensible a las variaciones osmóticas llamada bdelloplasto. En esa etapa, el daño causado a la membrana citoplasmática de la presa conduce a una rápida caída de su metabolismo (Rittenberg & Shilo, 1970). La formación del bdelloplasto es provocada por actividad de las enzimas glicanasas del depredador que degradan el peptidoglucano y la solubilización del 10-15% de la N-acetilglucosamina de la pared celular que se altera aún más por la acción de las peptidasas que escinden la lipoproteína de Braun (Thomashow & Rittenberg, 1978), así como por la liberación de ácido diaminopimélico del peptidoglucano durante la penetración. Después de la invasión, el bdelloplasto es inmune a la sobreinfección (Lerner et al., 2012).

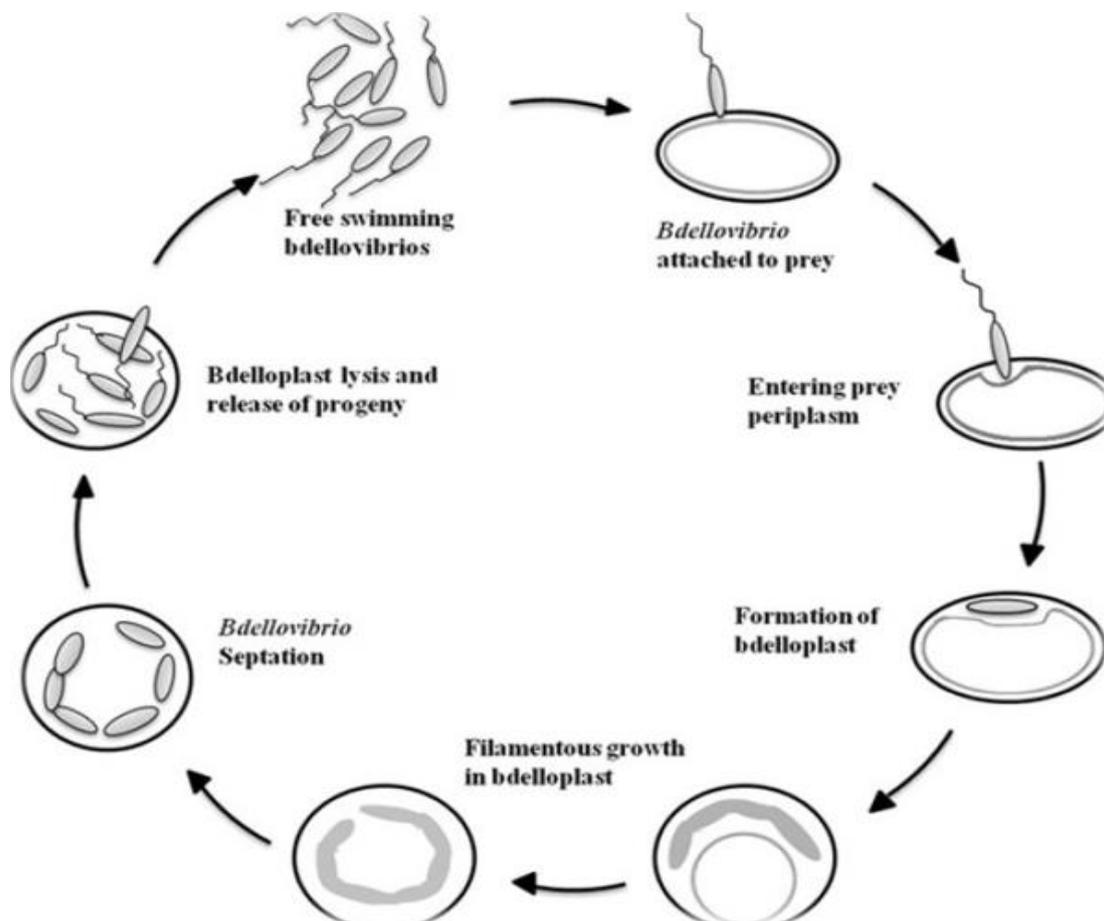
### **I-1.2.2. Fase de crecimiento y división**

#### **I-1.2.2.1. BALOs periplásmicos**

La fase celular de ataque se conserva en todas las especies conocidas del grupo BALO y tiene una vida útil (“infectiva”) relativamente corta a menos que encuentre una célula presa. En cambio, si el depredador periplásmico consigue crecer de manera filamentosa en base al contenido citoplasmático de su presa (Figura 2), comenzará su fase de crecimiento y división adoptando una estrategia periplásmica.

Los BALOs carecen de la capacidad de sintetizar y degradar varios aminoácidos y riboflavina, por lo que deben adquirirlas de la propia presa (Pasternak et al., 2013; Rendulic et al., 2004), proceso que lleva a cabo en esta fase de crecimiento. En ella, incorpora hasta el 70% del DNA de la presa al establecer una digestión secuencial mediante enzimas especializadas (Rosson & Rittenberg, 1979). El depredador también

degrada el 20–40% de los ribonucleótidos del RNA de la presa en la base y los restos ribosa-5-fosfato. Finalmente, desde el interior, el filamento se divide en progenie por septación. El número de individuos resultantes será proporcional al tamaño de la presa (Kessel & Shilo, 1976), pudiendo producir tanto números pares como impares de BALOs (Fenton, Kanna, Woods, Aizawa, & Sockett, 2010). Las nuevas células en fase de ataque resultantes salen al exterior del bdelloplasto por los poros formados en de esta estructura. Por último, tras madurar y aumentar en longitud, las nuevas bacterias están listas para contactar a una nueva presa (Fenton et al., 2010), reiniciando así el ciclo vital de este grupo de depredadores bacterianos.

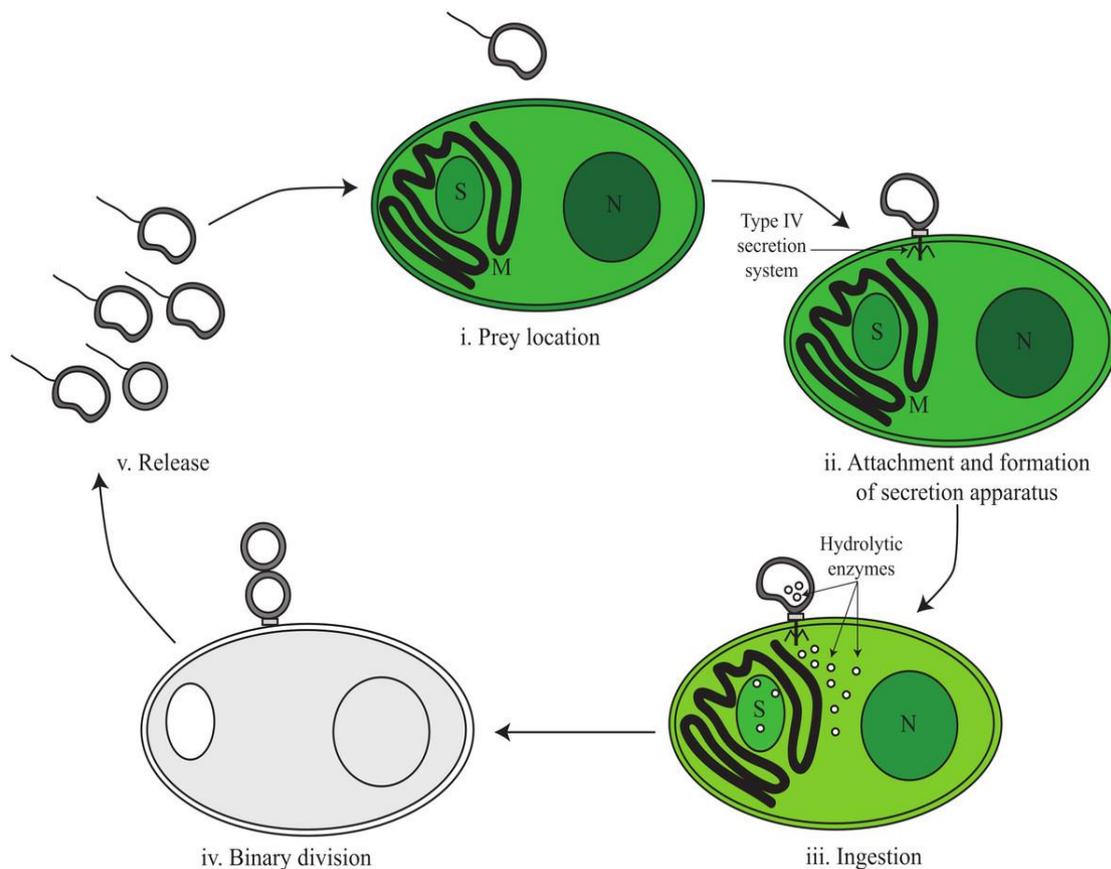


**Fig. 2.** Ciclo de vida de los BALOs periplásmicos según M. Dwidar et al. (2012).

#### I-1.2.2.2. BALOs epibióticos

En contraste con la estrategia periplásmica anteriormente descrita, la fase crecimiento y división de BALOs como *B. exovorius* y *Micavibrio aeruginosavorus* la efectúan por medio de una estrategia epibiótica (Figura 3). Aquí, la depredación es

extracelular ya que los depredadores permanecen unidos a la pared celular de la presa sin llegar a penetrarla. Desde esta posición, consumen a su presa antes de dividirse en dos células hijas por fisión binaria (Koval et al., 2013). El conocimiento de la fisiología, la ecología y los mecanismos moleculares involucrados en la depredación epibiótica, así como de las diferencias con los depredadores periplásmicos es mucho menor que el que se dispone de la estrategia depredadora anteriormente descrita.



**Fig. 3.** Ciclo de vida propuesto para los BALO epibióticos según Rochelle M. Soo et al. (2015).

### I-1.2.3. BALOs independientes de huésped

Poco después del descubrimiento de *Bdellovibrio bacteriovorus*, se aislaron variantes saprófitas capaces de crecer en ausencia de presas (Stolp & Petzold, 1962; H Stolp & Starr, 1963). Según los distintos estudios, las cepas de *B. bacteriovorus* y las especies de *Bacteriovorax* sometidas a pruebas de crecimiento periplásmico, pueden generar derivados independientes de huésped (HI, de sus siglas en inglés) en condiciones de laboratorio (Baer et al., 2000, 2004; Schwudke, Strauch, Krueger, & Appel, 2001; Seidler & Starr, 1969). Estas variantes independientes del huésped mantienen el ciclo de

vida “estándar” y retienen un potencial depredador, lo que las convierte en depredadores facultativos, aunque la depredación es menos eficiente que en las cepas depredadoras obligadas (Cotter & Thomashow, 1992b, 1992a) llegando incluso a perder completamente la capacidad de depredación si se mantiene a estas cepas en un medio lo suficientemente rico (Varon & Seijffers, 1975; Wurtzel, Dori-Bachash, Pietrokovski, Jurkevitch, & Sorek, 2010). Los BALOs HI también pueden aparecer en el medio natural, ya que tales cepas se han conseguido aislar reiteradamente (Diedrich, Denny, Hashimoto, & Conti, 1970; Doskina, 1973; Hobley, Lerner, et al., 2012). Las características únicas de las variantes HI, en comparación con los progenitores de tipo salvaje, sugieren que la independencia del huésped podría ser una etapa propia del estilo de vida de los BALO. A diferencia de las bacterias dependientes de huésped, los aislados HI producen un pigmento amarillento, protector contra el daño fotooxidativo (Friedberg, 1977) e incluso los derivados HI de *B. bacteriovorus*, utilizan una variedad más amplia de fuentes de carbono (Ishiguro, 1974) y sintetizan diferentes estructuras de lipopolisacáridos (Schwudke et al., 2003) además de formar biofilms estables (Medina & Kadouri, 2009).

En el laboratorio, las variantes HI se aíslan en un medio con alto contenido en nutrientes donde la gran mayoría de los aislamientos forman pequeñas colonias llamadas "tipo I" (Seidler & Starr, 1969; Varon & Seijffers, 1975). Estas colonias no pueden subcultivarse después del desarrollo inicial a menos que al medio se le administre un extracto de células de presa para iniciar la síntesis de DNA (Gray & Ruby, 1990). En tales condiciones, aproximadamente el 1% de los aislamientos formarán grandes colonias que pueden regenerarse de manera independiente, formando así mutantes "tipo II" (Thomashow & Cotter, 1992). Por lo tanto, los mutantes HI ‘Tipo I’ dependen del extracto celular (son saprófitos) y resultan de una sola mutación y los mutantes HI de "tipo II" no requieren extracto celular y resultan de una mutación adicional, es decir, son mutantes dobles.

Posteriormente, surgieron estudios genéticos con *B. bacteriovorus* al objeto de comprender los desencadenantes para esta adquisición gradual de la independencia del huésped (Cotter & Thomashow, 1992a, 1992b; Wurtzel et al., 2010). En estos estudios, y en otros sucesivos, se conoció que las mutaciones perjudiciales en bd0108, un gen sin función conocida, conducen al fenotipo tipo I. Sin embargo, no todas las variantes de HI formadoras de BALO contienen homólogos de bd0108 en sus genomas, lo que indica que otros componentes genéticos pueden ser causantes de la aparición de este fenotipo (Lambert, Chang, Capeness & Sockett, 2010; Schwudke et al., 2001; Wurtzel et al., 2010).

A pesar de las investigaciones realizadas hasta la fecha, todavía no se conocen las moléculas procedentes de la presa necesarias para el crecimiento de BALOs dependientes de huésped. Se ha comprobado que el extracto de presa no puede promover la proliferación *de novo* de las células dependientes de huésped en fase de ataque (Gray & Ruby, 1990; Ruby & Rittenberg, 1983; Thomashow & Cotter, 1992), lo cual sugiere que la replicación de las bacterias dependientes de huésped podría ser debida a dos señales por parte de la presa: una que conduce a fisiología un metabolismo propio de la transición de *fase de ataque* a *fase de crecimiento* y *división* y otra que activa la síntesis de DNA.

Hasta la fecha, se desconoce la naturaleza de la primera señal, siendo la segunda señal estable al calor y resistente a los tratamientos con ribonucleasas o desoxirribonucleasas (Gray & Ruby, 1990). En definitiva, los mutantes saprófitos (Tipo I) superan la dependencia de la primera señal y los mutantes axénicos (Tipo II) superan también la segunda señal (Thomashow & Cotter, 1992).

### I-1.3. LA DEPREDACIÓN EN BALOs

Si bien la característica más destacada de los BALOs, sin duda es la dependencia obligada (al menos de forma natural, salvaje) de depredar a otras bacterias gramnegativas para su supervivencia, muchos de los detalles sobre como esta bacteria depredadora ataca las presas no está, ni mucho menos, claro. Además, desde un punto de vista ecológico se ha sugerido que *Bdellovibrio* tiene una presencia mayor en biofilms naturales (Kadouri & O’Toole, 2005; Kadouri, Venzon, & O’Toole, 2007) con lo que resulta más eficiente atacando en dichos biofilms que depredando las bacterias presa planctónicas (libres). Esto puede ser debido a que en los biofilms existe una mayor densidad de presas “retenidas” o con dificultad de desplazamiento y, por lo tanto, el BALO dispone de un acceso más rápido y fácil a la presa. Además, *B. bacteriovorus* también puede atacar biofilms hechos por especies individuales y especies mixtas (Dashiff et al., 2011).

Para completar el acto de depredación bacteriana por BALOs, se requiere, como se ha detallado, de células depredadoras libres en fase de ataque para encontrar bacterias presa y de una posterior fase de crecimiento para destruirlas. Las señales, aún desconocidas, procedentes de la bacteria presa que se manifiestan separadas tanto espacial como temporalmente a las que se ha hecho alusión anteriormente, provocan efectos reguladores sobre la transcripción génica de *B. bacteriovorus*. Juntas, delimitan una fase transitoria y mal caracterizada que se situaría entre la *fase de ataque* y la *fase de crecimiento y división*, durante la cual se construye el bdelloplasto. Hay estudios que sugieren que esta fase transitoria puede suponer un “punto de control” en el que la señal tardía presumiblemente actuaría como un determinante del valor nutricional de la presa antes de que el contacto con la presa se vuelva irreversible (Rotem et al., 2015). Además, deben producirse eventos transitorios de fusión de la membrana externa, que proporcionen una interacción estrecha entre un depredador y una presa de *B. bacteriovorus* de modo que la célula de presa esté intacta (Abram et al., 1974) y transcripcionalmente activa mientras el depredador esté penetrándola (Lambert, Ivanov, & Sockett, 2010). Por otro lado, aunque se ha mencionado el contacto del depredador mediado por el pilus, en realidad se conoce poco acerca de las interacciones de la membrana externa entre los depredadores y las presas resultando un área activa de investigación (Negus et al., 2017). Como se puede observar, existen todavía muchos interrogantes alrededor de la depredación de *B. bacteriovorus* como bacteria “insignia” del grupo BALOs, aunque se sabe que las cepas de *B. bacteriovorus* no se atacan entre ellas, incluso si una cepa se cultiva axénicamente como presa y se presenta a un BALO (Hobley, Lerner, et al., 2012).

Desde el punto de vista del reconocimiento de la presa, se sabe que el lípido A de *B. bacteriovorus* es inusual, ya que está desprovisto de una carga negativa en el grupo de cabeza polar, ya que la manosa sustituye a los fosfatos en la estructura. Esta propiedad puede permitir un acceso a las membranas externas de otras bacterias y también parece contribuir a que *B. bacteriovorus* sea menos inmunoestimulante que las bacterias que transportan el lípido A con carga negativa. Esta modificación impediría “marcar” a *B. bacteriovorus* como presa y también permitiría que fuera menos susceptible a ciertos antibióticos catiónicos o péptidos antimicrobianos (Schwudke et al., 2003).

En cuanto a penetración a la presa, aunque primero se pensara que el flagelo polar del BALO contribuía a ella, Straley y su equipo mostraron quimiotaxis de *Bdellovibrio* a aminoácidos y en altas concentraciones de bacterias, ya sean presas o no (Straley & Conti, 1977; Straley et al., 1979) y, a su vez, Lambert y su equipo mostraron que *B. bacteriovorus* 109J con una mutación en uno de los más de 20 genes implicados en proteínas de quimiotaxis redujo significativamente, pero no abolió, la eficacia depredadora en cultivos líquidos (Lambert et al., 2008). Por lo tanto, parece que la motilidad flagelar es importante para encontrar presas, pero no es necesaria para penetrarlas o, por lo menos, no “tan necesaria” como se asumió en los primeros estudios sobre *Bdellovibrio*.

#### **I-1.4. APLICACIONES E INVESTIGACIONES ACTUALES DE BALOs**

Ante el problema del incremento de las multiresistencias a los medicamentos antibióticos por parte de las bacterias responsables de enfermedades infecciosas, la capacidad depredadora de los BALOs ha suscitado interés como agentes de control de bacterias tanto de aquellas que son patógenas en humanos como que son de interés en otros campos como el de la acuicultura o la depuración de las aguas residuales donde el biocontrol bacteriano es necesario.

Como se ha indicado, el factor interesante y que convierte a este grupo bacteriano en potenciales “antibióticos vivos” es que pueden cazar de manera efectiva en biofilms bacterianos, especialmente patógenos resistentes a múltiples fármacos, de modo que los BALOs podrían actuar a la vez, tanto como agentes probióticos (al regular la curva de población en una comunidad microbiana) y como antibióticos (al atacar a bacterias patógenas) a la vez (Dwidar, Monnappa, & Mitchell, 2012). Por lo tanto, son muchos autores los que sitúan a las bacterias del grupo BALOs como microorganismos que podrían desempeñar un importante papel a nivel de ecología bacteriana (en el control de plagas acuáticas y de plantas) e incluso, como destructores de bacterias nocivas para el ser humano (Negus et al., 2017; Sockett, 2009; Tyson & Sockett, 2017a; Tyson & Sockett, 2017b). Su potencial aplicabilidad tiene que ver con la gran variedad de ecosistemas donde puede actuar, hecho que tiene que ver, en parte, con su versatilidad para sobrevivir en ambientes anóxicos durante un tiempo (Schoeffield et al., 1996).

##### **I-1.4.1. Tratamiento de aguas**

La reutilización de las aguas es una tendencia en crecimiento, pero no existe demasiada información sobre la influencia y peligrosidad de los agentes de resistencia a los antibióticos que se encuentran distribuidos en aquellas aguas residuales tratadas previamente. Podría suponerse que los diferentes factores bióticos y abióticos limitan la diseminación de agentes de resistencia a antibióticos, de modo que una percepción más holística de estos factores es crucial para comprender y manejar la transferencia de factores de resistencia microbiana antes de introducir a los BALOs en la “ecuación” (Marano, Zolti, Jurkevitch, & Cytryn, 2019). A pesar de lo anterior, recientemente un estudio ha sugerido que los BALOs pueden ser aplicados para mejorar la eficiencia de tratamientos de eliminación de bacterias gramnegativas, lo cual es crucial para el desarrollo del tratamiento de aguas; el novedoso estudio muestra como bacterias del grupo BALOs se aplicaron como un tratamiento biológico previo a una posterior desinfección fotocatalítica solar dentro de un sistema para el tratamiento del agua de lluvia (Waso et al., 2020).

En cuanto a la acuicultura hay estudios que sugieren que *Bdellovibrio* no depreda a bacterias fijadoras de nitrógeno, mientras que sí depreda a *Burkholderia glumae*, lo que sugiere que *Bdellovibrio* sp. no es perjudicial para los simbiontes beneficiosos de las plantas (Song, 2004).

#### I-1.4.2. Control de patógenos humanos

Para que las bacterias del grupo BALOs acaben siendo utilizadas médicamente en humanos y animales, debe ser confirmada su seguridad y su potencial curativo. Diversos estudios y técnicas han demostrado que los BALOs no son dañinos para humanos o animales: en 1973, un estudio concluyó que *Bdellovibrio* sp. no era patógeno en ratones, conejos y cobayas (Verklova, 1973). Muchos años después, con la llegada de nuevas técnicas y, tal y como muestra el trabajo de varios laboratorios, se volvía a sugerir que la inyección, ingestión o aplicación experimental de *Bdellovibrio* sp. a animales o tejidos vivos, aunque causa cierta inflamación, no es patógena para ellos (Atterbury et al., 2011; Monnappa, Bari, Choi, & Mitchell, 2016; Shatzkes et al., 2015; Shatzkes, Tang, et al., 2017; Willis et al., 2016). En lo referente a células humanas, se mostró que los BALOs no eran citotóxicos para ninguna de las líneas celulares humanas probadas (Gupta, Tang, Tran, & Kadouri, 2016), lo que junto con otros estudios, demuestra la potencialidad para un futuro tratamiento aplicado a las células humanas (Monnappa et al., 2016).

Tras sugerirse desde el principio a los BALOs como potenciales agentes antibióticos (Socket & Lambert, 2004), los primeros estudios intentaron utilizar a *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J como un agente en un tratamiento alternativo no quimioterapéutico de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (Boileau, Clinkenbeard, & Iandolo, 2011), así como de agente de control de la enfermedad causada por *Aeromonas hydrophila* en peces (Chu & Zhu, 2010). Obteniéndose resultados mucho más prometedores en el caso de *A. hydrophila* que en queratoconjuntivitis.

Más tarde, Shatzkes y su equipo sugirieron que aplicando *Bdellovibrio* sp. en pulmones de ratas, se puede mermar la carga bacteriana de *Klebsiella pneumoniae* (Shatzkes et al., 2016) allí ubicada. Sin embargo, la carga de *K. pneumoniae* en sangre así como su transmisión a otros órganos no ha conseguido ser atajada por medio de BALOs, por lo que no parecen resultar efectivos para el tratamiento de infecciones sanguíneas agudas (Shatzkes, Singleton, et al., 2017). Por el contrario, existen datos que respaldan la seguridad de las bacterias depredadoras en la superficie ocular de conejos tras aplicarle BALOs (Romanowski et al., 2016) y, en ese mismo año, Willis y su equipo demostraron que *Bdellovibrio* es capaz de combatir a *Shigella* inyectados en el cerebro de peces cebras, mejorando sustancialmente su supervivencia. Además, el mismo estudio mostraba que el propio sistema inmune del pez colabora con los depredadores en la eliminación del patógeno (Willis et al., 2016).

Una enfermedad donde se está poniendo especial foco de atención es en la fibrosis quística, una enfermedad genética que generalmente presenta colonización pulmonar por biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* y/o *Staphylococcus aureus*. Existen estudios que apuestan por la supervivencia de *B. bacteriovorus* en contacto con una presa grampositiva, en este caso *S. aureus*. El estudio en concreto mostró una actividad bacteriolítica para cada una de las dos cepas (*P. aeruginosa* y *S. aureus*) (Iebba et al., 2014). Con respecto a los biofilms relacionados con la fibrosis quística, un estudio más reciente revela que *B. bacteriovorus* es efectivo para bacterias gramnegativas multirresistentes o resistentes a fármacos y sus correspondientes biofilms. Este estudio indica que el BALO demostró ser eficaz y eficiente en la depredación de biofilms asociados a *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii* cocultivadas (Pantarella et al., 2018; Sun et al., 2017).

Por otro lado, las tres principales enfermedades orales de los humanos son caries, enfermedades periodontales y candidiasis oral y todas sellas están asociadas a cambios en el microbioma (Hoare, Marsh, & Diaz, 2017). Los tratamientos contra la periodontitis se basan en eliminar por completo la microbiota oral (incluso si varias especies en la placa dental demuestran características protectoras) y, para ello, muy recientemente, se están utilizando BALOs. Los resultados del estudio señalan que *B. bacteriovorus* en anaerobiosis no puede ejercer su capacidad depredadora, lo que puede situarlo como agente para prevenir la recolonización de la bolsa periodontal después de la terapia (Patini et al., 2019). Además, otro reciente estudio evaluó los efectos de la administración tópica de *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 sobre la periodontitis experimental en ratas con resultados prometedores (Silva et al., 2019).

Finalmente, ante una presumible aplicación en el interior del cuerpo humano, la absorción y la persistencia de BALOs dentro de las células fagocíticas proporcionan nuevos conocimientos, abriéndose así futuros campos de trabajo debido a su potencial también en el interior de nuestro organismo (Raghunathan et al., 2019).

### **I-1.4.3. Otras investigaciones**

Como el potencial antibacteriano de las bacterias del grupo BALOs es grande, actualmente se están llevando a cabo multitud de estudios en numerosos campos:

Con respecto a las energías renovables y el tratamiento de aguas se ha sugerido que *Bdellovibrio bacteriovorus* puede lisar cultivos puros de las bacterias procedente de las membranas de biorreactores, lo cual le confiere potencial de ser utilizado como un método (parcial o total) de limpieza biológica (Özkan et al., 2018).

El mundo acuático es un campo propicio para el estudio con BALOs. *Halobacteriovorax* representa un candidato potencial para el desarrollo de estrategias de biocontrol de vibrios patógenos en bivalvos desde la cosecha hasta el comercio (Ottaviani et al., 2018). En el

caso de los camarones, una enfermedad grave como la necrosis hepatopancreática aguda, tiene un aliado en *B. bacteriovorus* debido a que depreda a *Vibrio parahaemolyticus*, causante de la enfermedad (Kongrueng et al., 2017). Además, recientemente, se está experimentando con preparaciones líquidas de *Bdellovibrio* para ser comercializadas como agentes para mejorar la calidad del agua debido a que son capaces de controlar los patógenos bacterianos del camarón de patas blancas (*Litopenaeus vannamei*). De modo que, tras encapsular a la bacteria, se ha convertido en un prometedor producto contra vibrios al conseguirse un almacenamiento estable a temperatura ambiente (Cao, Wang, Yu, An, & Chen, 2019).

En cuanto a los antibióticos, los BALOs han demostrado poder actuar conjuntamente con ellos. Esto se ha comprobado en estudios conjuntos con la violaceína es un antibiótico eficaz contra las bacterias grampositivas y *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 depreda a las cepas gramnegativas. Su efectividad combinada se ha demostrado utilizando cultivos mixtos con *S. aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus cereus* y *Klebsiella pneumoniae* (Im, Choi, Son, & Mitchell, 2017). Asimismo, el aumento de las infecciones bacterianas gramnegativas resistentes a múltiples fármacos ha obligado a la reintroducción de antibióticos como la colistina. Sin embargo, la propagación del gen de resistencia a la colistina (*mcr-1*) nos ha acercado a una era de infecciones gramnegativas no tratables. De modo que, para evaluar si las bacterias depredadoras podrían usarse como un potencial terapéutico para tratar esta próxima amenaza, se evaluó la capacidad de *Bdellovibrio bacteriovorus* y *Micavibrio aeruginosavorus* de depredar a bacterias resistentes a colistina y positivas para *mcr-1*. Los resultados mostraron que los BALOs no experimentaron ningún decrecimiento en la capacidad para cazar, tanto de manera libre como en biofilms, a bacterias positivas para *mcr-1* comparado con la capacidad para depredar las cepas negativas de esas bacterias (Dharani, Kim, Shanks, Doi, & Kadouri, 2018).

Además de la eficacia para trabajar en temas de resistencia a antibióticos, existen experimentos que ponen a prueba, con resultados positivos, la capacidad de depredación de BALOs con bacterias que pueden resultar, armas biológicas en el futuro como es el caso de *Yersinia pestis* (Russo et al., 2018).

# **CAPÍTULO II**

**Filogenética de BALOs de  
nuevo aislamiento en el  
contexto de la filogenia del  
grupo**



# ÍNDICE DEL CAPÍTULO

<b>II-1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>45</b>
<b>II-2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO</b>	<b>47</b>
<b>II-3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
<b>II-3.1. SECUENCIACIÓN DE LAS CEPAS DE BALO MuRa1a y MuRa6a</b>	<b>47</b>
<b>II-3.2. OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE RNA BACTERIANO EN FORMATO FASTA</b>	<b>48</b>
<b>II-3.2.1. Obtención de secuencias FASTA de las cepas seleccionadas en base a bibliografía</b>	<b>48</b>
<b>II-3.2.2. Obtención de secuencias FASTA de las dos nuevas cepas secuenciadas</b>	<b>49</b>
<b>II-3.3. EJECUCIÓN DEL ALINEAMIENTO MÚLTIPLE</b>	<b>50</b>
<b>II-3.3.1. Alineamiento múltiple de las secuencias FASTA seleccionadas en base a bibliografía</b>	<b>50</b>
<b>II-3.3.2. Alineamiento múltiple de secuencias FASTA obtenidas por similitud de MuRa1a y MuRa6a</b>	<b>52</b>
<b>II-3.4. FORMACIÓN DE LA MATRIZ DE DISTANCIA</b>	<b>54</b>
<b>II-3.5. OBTENCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO E INFORMACIÓN DEL HÁBITAT</b>	<b>55</b>
<b>II-3.5.1. Obtención del árbol filogenético de las cepas seleccionadas en base a bibliografía</b>	<b>55</b>
<b>II-3.5.2. Obtención del árbol filogenético de las cepas secuenciadas</b>	<b>56</b>
<b>II-4. RESULTADOS</b>	<b>57</b>
<b>II-4.1. ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE BACTERIAS DEL GRUPO BALOs</b>	<b>57</b>
<b>II-4.1.1. Variabilidad genética entre las cepas de BALOs seleccionadas en base a bibliografía</b>	<b>57</b>
<b>II-4.1.2. Variabilidad genética en las nuevas cepas de BALOs secuenciadas</b>	<b>59</b>
<b>II-4.1.2.1. Análisis filogenético de BALO MuRa1a</b>	<b>59</b>
<b>II-4.1.2.2. Análisis filogenético de BALO MuRa6a</b>	<b>61</b>
<b>II-4.1.2.3. Distancia genética entre MuRa1a y MuRa6a</b>	<b>62</b>
<b>II-4.2. LA VARIEDAD DE HÁBITATS DE LOS BALOs SELECCIONADOS</b>	<b>64</b>



## II-1. INTRODUCCIÓN

Tras el descubrimiento en los años sesenta del pasado siglo de la bacteria depredadora, *Bdellovibrio* sp., el conocimiento en el campo de estudio de las interacciones bacterianas depredadoras ha ido claramente en aumento. Durante los años sesenta, setenta y ochenta tuvieron lugar numerosas contribuciones en el conocimiento de la fisiología, ecología, taxonomía, interacciones con presas y ciclo celular de *Bdellovibrio*, principalmente por los grupos de Stolp, Rittenberg, Conti, Diedrich, Hespell, Ruby, Shilo, Starr, Thomashow, Tudor y Varon (Rosenberg et al., 2013). Posteriormente, se produjo un descenso en la cantidad y relevancia de investigaciones relacionadas con este grupo de bacterias, pero desde hace unos quince años se ha venido produciendo un nuevo aumento del número de estudios publicados en este ámbito. Este auge viene dado, en gran medida, por la llegada de las nuevas técnicas de biología molecular, genética y tecnologías genómicas. Sobre todo, el conocimiento en depredación bacteriana se ha beneficiado por la introducción de la biología molecular moderna en los campos de la ecología y la genética microbianas. Este conocimiento ha sido aportado por los grupos de Jurkevitch, Kadouri, Koval, Linscheid, Sockett, Strauch y Williams en los que la mayoría de sus trabajos se realizaron sobre bacterias relacionadas con *Bdellovibrio*.

Aunque en ecología, por definición, la depredación lleva implícita un aumento de las posibilidades de extinción de la población presa, esto solamente ocurre en ambientes homogéneos; la fragmentación de hábitats o heterogeneidad promueve la coexistencia entre especies y mejora la estabilidad de la comunidad (Petrenko et al., 2019). En muchos casos, la presencia, abundancia y riqueza de depredadores es indicador de microbiomas diversos y maduros (Johnke, Fraune, Bosch, Hentschel, & Schulenburg, 2019), llegando a observarse incluso en cultivos (Qian et al., 2020). En dichos ambientes y como ocurre a niveles macroscópicos, las presas también evolucionan con objeto de defenderse de los ataques de depredadores. Un ejemplo de ello son las cepas bacterianas cianogénicas, las cuales se han adaptado hasta poder inhibir su propia depredación con cianuro, que afecta tanto a los depredadores que se encuentren atacando como a los que se encuentren parasitando (Mun et al., 2017), o la coevolución de depredador y presa a nivel genético recientemente estudiada (Nair et al., 2019).

La notable diversidad genética que, como se ha detallado en el capítulo anterior, queda reflejada en la taxonomía del grupo, empezó a ser vislumbrada en el trabajo pionero (Torrella, Guerrero, & Seidler, 1978) en el que se investigó la proximidad o distancia filogenética entre diversas cepas de *Bdellovibrio* y especies descritas entonces (*Bdellovibrio* W; *Bdellovibrio* 3294K, *Bdellovibrio stolpii* Uki2, *Bdellovibrio starrii* A3.12, *Bdellovibrio bacetriovorus* 109D, además de varios aislamientos de suelo y aguas en España, mediante análisis comparativo de su DNA (% molar medio de GC; tamaño del genoma e hibridación de DNA). Esta diversidad genética en el grupo fue completada posteriormente mediante las técnicas de secuenciación del rRNA de 16S. Por otra parte, la diversidad del grupo BALOs también se deduce de la variedad de hábitats en los que

se ha detectado y aislado este tipo de bacteria depredadora. Se pueden obtener BALOs de los ecosistemas marinos, de los de agua dulce y de los terrestres (Davidov y Jurkevitch, 2004; Fratamico & Cooke, 1996; Fry & Staples, 1976; Pineiro et al., 2007; Schoeffield & Williams, 1990; Snyder et al., 2002). Además se han conseguido aislar BALOs de microambientes tales como las branquias de cangrejos, de superficies sumergidas, de arrozales, de la rizosfera de plantas y en lagunas (Chu & Zhu, 2010; E. Jurkevitch, Minz, Ramati, & Barel, 2000; Kelley, Turng, Williams, & Baer, 1997a; Uematsu, 1980; H.N. Williams et al., 1995). Los BALOs incluso ha sido aislados de heces de animales (Schwudke et al., 2003) y constituyen poblaciones importantes en la sanguijuela *Hirudo verbana* (Kikuchi, Bomar, & Graf, 2009). Atendiendo a los hábitats acuáticos, quizás los más propicios para aislar a estas bacterias depredadoras, se han localizado tanto en biofilms de ambientes más cálidos (Kelley, Turng, Williams, & Baer, 1997b) como en ambientes alpinos (Paix, Ezzedine, & Jacquet, 2019).

Igualmente, recientes estudios sugieren que la abundancia, la diversidad y la composición de la comunidad microbiana es más sensible a la presencia de depredadores que a perturbaciones puntuales del sistema (Karakoç, Radchuk, Harms, & Chatzinotas, 2018), por lo que la abundancia y diversidad de las poblaciones de las bacterias del grupo BALOs, parecen haber sido subestimadas. De hecho, las primeras estimaciones del tamaño de la población de BALOs se han situado en más del doble que la obtenida tras recuentos directos en placas (Van Essche et al., 2009; Zheng, Wang, Williams, & Pineiro, 2008) y en 18 veces más en ambientes marinos atendiendo a la depredación de *Halobacteriovorax* a *Vibrio vulnificus* (Chen et al., 2018).

Tanto los numerosos cambios taxonómicos que las bacterias del grupo BALOs han experimentado, como las abundantes reinterpretaciones de su definición, ponen de manifiesto la heterogeneidad de este grupo bacteriano, cuyos integrantes han demostrado tener una variabilidad genética acorde con la diversidad de hábitats de donde han sido usualmente aislados. En relación a lo anterior, hay estudios que indican que tanto la presa como los parámetros ambientales dan forma a las comunidades de BALOs en el medio ambiente y que éstos son un conjunto bacteriano muy versátil (Davidov & Jurkevitch, 2004).

En este capítulo y en base a un limitado estudio taxonómico de base genético-molecular Small Subunit (SSU) rRNA realizado con dos de las cepas aisladas en este mismo trabajo (las cepas MuRa1a y MuRa6a), se confirma la heterogeneidad taxonómica del grupo BALOs y la utilidad de la obtención de un árbol filogenético para el estudio de este grupo de depredadores procarióticos.

## II-2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- ▣ Constatar la variabilidad genética y de hábitat de bacterias del grupo BALOs.
- ▣ Mostrar la distancia filogenética entre dos cepas de BALOs aisladas en E.D.A.R.
- ▣ Aplicar técnicas bioinformáticas para analizar secuencias nucleotídicas de 16S RNA pertenecientes a las cepas MALO MuRa1a y BALO MuRa6a.

## II-3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización los árboles filogenéticos mostrados en los apartados relacionados con la diversidad genética y de hábitat, se utilizó una gran variedad de programas bioinformáticos para tratar la secuencia de nucleótidos inicial.

### II-3.1. SECUENCIACIÓN DE LAS CEPAS DE BALO MuRa1a y MuRa6a

Las cepas de BALOs MuRa1a y MuRa6a fueron aisladas (según la metodología explicada en el capítulo siguiente) a partir de muestras de agua residual bruta de la fase de pretratamiento de la E.D.A.R. del Campus de Espinardo (Murcia). Las bacterias hospedadoras utilizadas en la técnica de la doble capa de agar para el “revelado” y posterior aislamiento de cepas (técnica detallada en el siguiente capítulo), fueron respectivamente, *Escherichia coli* K-12 en el caso de MuRa1a y *Klebsiella pneumoniae* para MuRa6a.

La elección de la cepa de BALOs MuRa6a para la realización de los análisis genéticos y para ser secuenciada estuvo motivada por haber sido la única cepa que produjo calvas de aspecto diferente a las produjeron el resto de cepas con las que se trabajó. Igualmente, la otra cepa escogida fue MuRa1a por haber sido la cepa que mayores recuentos ofrecía en cada uno de los experimentos realizados, los cuales serán mostrados en los capítulos siguientes.

Posteriormente, las cepas de BALO MuRa1a y MuRa6a fueron secuenciadas por la empresa Secugen S.L. (la secuencia completa de ambas cepas se encuentra en el apartado “Anexos”) extrayendo, de una zona de lisis previamente purificada, es decir, sin otra presencia en placa que el depredador y su presa, el DNA. Sobre este material genético extraído se amplificó el gen del RNA 16S mediante el uso de cebadores universales

(16SF1: gastttgatcctggctyag\* y 16SR1: gacgggcggtgwgtrca\*) en las condiciones de la PCR (Polymerase Chain Reaction) descritas a continuación:

95°C 15 min: (95°C 30 s + 53°C 40 s + 72°C 1 min) x 35 + 72°C 8 min. La polimerasa empleada fue TaqGold de Applied Biosystems™.

\* R=A/G; Y=C/T; S=G/C; W=A/T; K=G/T; M=A/C

El producto de la PCR se visualizó en gel de agarosa y se procedió a su secuenciación, desde ambos extremos, mediante el reactivo BigDye 3.1 de Applied Biosystems™, realizándose una posterior electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 3730xl. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas y comparadas mediante la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information), usando la base de datos “Nucleotide collection nr/nt” contra las secuencias de referencia existentes en GenBank y usando la base de datos “16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)”. La herramienta de búsqueda BLAST encuentra regiones de similitud local entre secuencias, compara las secuencias de nucleótidos o proteínas con las bases de datos de secuencias y calcula la importancia estadística de las coincidencias.

## II-3.2. OBTENCIÓN DE LAS SECUENCIAS DE RNA BACTERIANO EN FORMATO FASTA

### II-3.2.1. Obtención de secuencias FASTA de las cepas seleccionadas en base a bibliografía

Como unidad de trabajo inicial, se contó con la secuencia parcial del RNA ribosómico 16S siendo ésta la más indicada para establecer relaciones filogenéticas entre organismos, debido a su presencia en todas las bacterias y a que su estructura y función han permanecido constantes a lo largo de la evolución (Rodicio & Mendoza, 2004). Dicha secuencia parcial de RNA se ha obtenido en formato FASTA el cual es reconocible por GenBank, una base de datos integral que contiene secuencias de DNA disponibles públicamente (Benson, Karsch-Mizrachi, Lipman, Ostell, & Wheeler, 2005). La elección de los microorganismos implicados, todos pertenecientes al género *Bdellovibrio* (un género perteneciente, desde el principio, al grupo BALOs), se basó en el análisis de literatura especializada. Las bacterias depredadoras escogidas para el análisis comparativo fueron las siguientes:

*Bdellovibrio* sp. ETA (Figura 4), *Bdellovibrio* sp. CHI, *Bdellovibrio starrii*, *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 100, *Bdellovibrio stolpii*, *Bdellovibrio* sp. Hefner, *Bdellovibrio* sp. Annapolis, *Bdellovibrio* sp. Cancun7, *Bdellovibrio* sp. Lanham, *Bdellovibrio* sp. Gunpowder, *Bdellovibrio bacteriovorus* strain TRA2 y *Bdellovibrio exovorus* strain JSS. En muchos casos, para conseguir las secuencias FASTA de GenBank, se tuvieron que

emplear las denominaciones antiguas de las bacterias implicadas, debido a que aún estaban indexadas con esa nomenclatura en la base de datos. Estos microorganismos tienen como códigos de entrada en GenBank los siguientes:

AY294225, AY294207, AF084852, AF084850, M34125, AY094114, AY094108, AY094113, AY094116, AF084853, AF148941 y NR116108. La información arrojada por GenBank fue del tipo que se muestra en la Figura 4 para el caso de *Bdellovibrio* sp. ETA.

### **Bdellovibrio sp. ETA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence**

GenBank: AY294225.1

[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

```

LOCUS       AY294225                678 bp    DNA        linear    BCT 24-SEP-2004
DEFINITION  Bdellovibrio sp. ETA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.
ACCESSION   AY294225
VERSION     AY294225.1  GI:34604522
KEYWORDS    .
SOURCE      Bdellovibrio sp. ETA
  ORGANISM  Bdellovibrio sp. ETA
            Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;
            Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.
REFERENCE   1  (bases 1 to 678)
AUTHORS     Davidov,Y. and Jurkevitch,E.
TITLE       Diversity and evolution of Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs),
            reclassification of Bacteriovorax starrii as Peredibacter starrii
            gen. nov., comb. nov., and description of the
            Bacteriovorax-Peredibacter clade as Bacteriovoracaceae fam. nov
            Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (PT 5), 1439-1452 (2004)
  JOURNAL   Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (PT 5), 1439-1452 (2004)
  PUBMED   15388693
REFERENCE   2  (bases 1 to 678)
AUTHORS     Davidov,Y. and Jurkevitch,E.
TITLE       Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (08-MAY-2003) Plant Pathology and Microbiology, Faculty
            of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, The
            Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel
  
```

**Fig. 4.** Información ofrecida por Genbank, para *Bdellovibrio* sp. ETA.

### **II-3.2.2. Obtención de secuencias FASTA de las dos nuevas cepas secuenciadas**

Para la obtención de los análisis filogenéticos de las cepas de BALO MuRa1a y MuRa6a, las secuencias FASTA fueron escogidas según los resultados por similitud arrojados por la herramienta BLAST para ambas cepas. Además, a esta selección resultante se le añadieron cuatro secuencias de BALOs con características diversas para poder delimitar, más concretamente, los “extremos del árbol filogenético”. Estas cuatro bacterias fueron: *Bdellovibrio exovorius* JSS, *Bdellovibrio exovorius* MPR11, *Bdellovibrio* sp. Vietnam y *Peredibacter starrii*.

Los códigos de entrada de las cepas de BALOs obtenidas por similitud, como se ha indicado en el párrafo anterior, son los siguientes:

CP020946.1, CP007656.1, BX842648.2, BX842650.1, AF084850.1, MG957118.1, KT807464.1, EU884925.1, AJ292759.1, GQ427200.1, CP030082.1, KT852580.1,

CP030034.1, DQ302728.1, AF263833.1, AF148939.1, AF148938.1, KU973532.1, AJ278145.1, AY094123.1, NR\_116108.1, MH230062.1 y NR\_024943.1.

### II-3.3. EJECUCIÓN DEL ALINEAMIENTO MÚLTIPLE

#### II-3.3.1. Alineamiento múltiple de las secuencias FASTA seleccionadas en base a bibliografía

Una vez recopiladas todas las secuencias FASTA de aquellas cepas de BALOs escogidas en base a la literatura científica, estas fueron sometidas a un alineamiento múltiple por medio del algoritmo Clustal W (Larkin et al., 2007) aplicándole los parámetros de penalización indicados en la Figura 5. Dicho alineamiento múltiple fue efectuado con el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) en su versión 6.0, al ser un programa indicado para construir alineamientos de tres o más secuencias con el objetivo de encontrar relaciones evolutivas entre ellas, proporcionando árboles filogenéticos y realizando análisis evolutivos moleculares a tal efecto (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013).

DNA

Pairwise Alignment

Gap Opening Penalty 15

Gap Extension Penalty 6.66

Multiple Alignment

Gap Opening Penalty 15

Gap Extension Penalty 6.66

DNA Weight Matrix IUB

Transition Weight 0.5

Use Negative Matrix ON

Delay Divergent Cutoff (%) 30

Keep Predefined Gaps

Specify Guide Tree ...

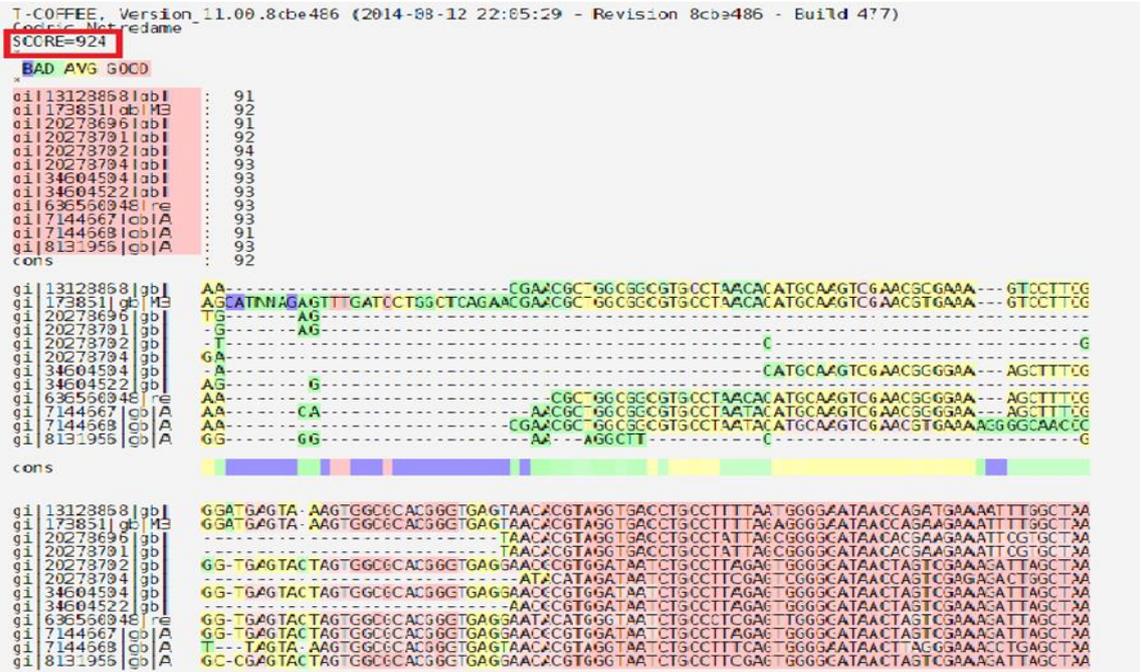
**Fig. 5.** Parámetros de penalización aplicados en el alineamiento múltiple de los BALOs seleccionados.

El resultado del alineamiento múltiple de todos los BALOs seleccionados obtenido en MEGA 6.0 se muestra en la Figura 6.

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	Group Name	*****	
1. <i>Bdellovibrio</i> sp. ETA		AGGGAATATTGCACAATGGAGAAACTCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTCGAGGGGAATA	
2. <i>Bdellovibrio</i> sp. CHI		AGGGAATATTGCACAATGGAGAAACTCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTCGAGGGGAATA	
3. <i>Bdellovibrio</i> sp. Annapolis		GGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGACGCGCAATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCTCTGTCATATGGAAGA	
4. <i>Bdellovibrio</i> sp. Cancun7		GGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGACGCGCAATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGCTCTGTCATATGGAAGA	
5. <i>Bdellovibrio</i> sp. Gunpowder		GGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGACGCGCAATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTAATGAGGAAAA	
6. <i>Bdellovibrio</i> sp. Hefner		AGGGAATATTGCACAATGGAGAAACTCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTCGAGGGGAATA	
7. <i>Bdellovibrio</i> sp. Lanham		AGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGACGCGCAATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTCGATGGGAATA	
8. <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain 100		AGGGAATATTGCACAATGGAGAAACTCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTCGAGGGGAATA	
9. <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain TR2		AGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGACGCGCAATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTCGAGGGGAATA	
10. <i>Bdellovibrio exovorus</i> strain JSS		AGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTCGATGGGACTA	
11. <i>Bdellovibrio starrii</i>		AGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGACGCGCAATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTCGATGGGAAAA	
12. <i>Bdellovibrio stolpii</i>		GGGGAATATTGCACAATGGGGAAGCCTGACGCGCAATGCCCGTGAAGTGAAGGCCCTTCGGGTCGTAAGCTCTGTAATGGAATA	

**Fig. 6.** Resultado del alineamiento múltiple de las cepas de BALOs seleccionadas.

El mismo alineamiento múltiple se realizó, paralelamente, en el programa T-coffee (Notredame, Higgins, & Heringa, 2000) desde la sección herramientas del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI de sus siglas en inglés), debido a que es un programa que resalta y muestra un valor numérico que informa de la calidad del alineamiento como se puede observar en la Figura 7.

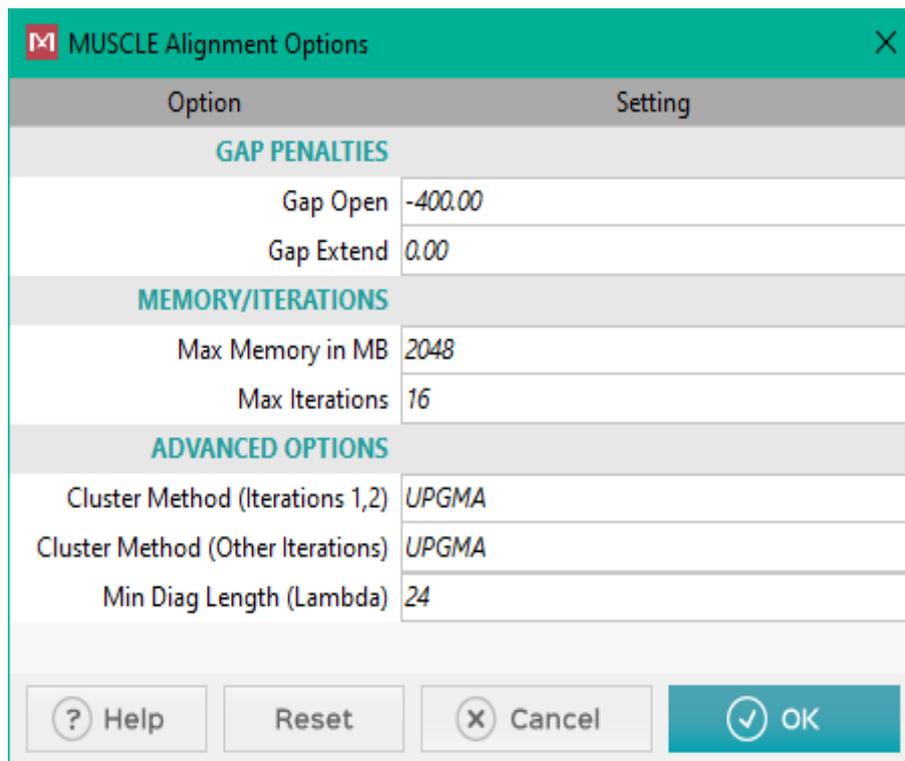


**Fig. 7.** Evaluación del alineamiento múltiple para el género *Bdellovibrio* desde el programa T-coffee . En el recuadro rojo se muestra la puntuación alcanzada en el alineamiento múltiple.

Para el alineamiento múltiple se usó la matriz *PAM350* (del inglés: Point Accepted Mutation), siendo la matriz empleada usualmente para secuencias presumiblemente cercanas entre sí.

### II-3.3.2. Alineamiento múltiple de secuencias FASTA obtenidas por similitud de MuRa1a y MuRa6a

En el caso de las dos cepas de BALOs aisladas en este trabajo y previamente secuenciadas, el alineamiento múltiple fue efectuado siguiendo el algoritmo MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation) (Edgar, 2004), debido a que es el más indicado para este tipo de cepas tan próximas (Sutton, 2008). Dicho alineamiento se realizó con una versión posterior del programa MEGA (MEGA X) con los parámetros que se muestran en la Figura 8.



**Fig. 8.** Parámetros aplicados en el alineamiento múltiple de MuRa1a y MuRa6a realizado con MUSCLE.

El alineamiento múltiple resultante de todas las cepas implicadas por similitud a MuRa1a y a MuRa6a es el mostrado en la Figura 9.



**Fig. 9.** Resultado obtenido en el alineamiento múltiple de las cepas más cercanas a MuRa1a y MuRa6a.

Este alineamiento fue realizado con los parámetros que se muestran en la Figura 10.



**Fig. 10.** Parámetros aplicados para la realización de la matriz de disimilitud del árbol filogenético de los BALOs MuiRa1a y MuRa6a.

#### II-3.4. FORMACIÓN DE LA MATRIZ DE DISTANCIA

Amparándose en las alineaciones anteriores y, de nuevo desde el programa MEGA 6.0, se realizó la matriz de distancia negativa, es decir, la matriz de disimilitud. Para su construcción se escogió el método *p-distance* y, ante la presencia de huecos y/o la ausencia de información, se adoptó una estrategia de “delección por parejas” tal y como se indica en la Figura 11.

Options Summary	
Option	Selection
<b>Analysis</b>	Distance Estimation
Scope	Pairs of taxa
<b>Estimate Variance</b>	
Variance Estimation Method	None
<i>No. of Bootstrap Replications</i>	<i>Not Applicable</i>
<b>Substitution Model</b>	
Substitutions Type	Nucleotide
Model/Method	p-distance
Substitutions to Include	d: Transitions + Transversions
<b>Rates and Patterns</b>	
Rates among Sites	Uniform rates
<i>Gamma Parameter</i>	<i>Not Applicable</i>
Pattern among Lineages	Same (Homogeneous)
<b>Data Subset to Use</b>	
Gaps/Missing Data Treatment	Pairwise deletion
<i>Site Coverage Cutoff (%)</i>	<i>Not Applicable</i>

**Fig. 11.** Parámetros aplicados para la realización de la matriz de disimilitud del árbol filogenético de las cepas de BALOs seleccionadas.

## II-3.5. OBTENCIÓN DEL ÁRBOL FILOGENÉTICO E INFORMACIÓN DEL HÁBITAT

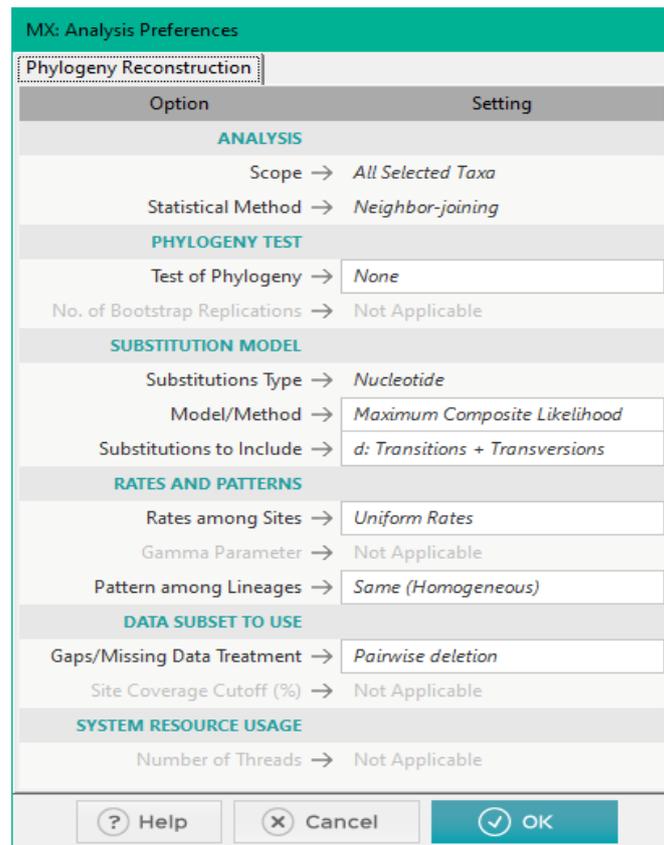
### II-3.5.1. Obtención del árbol filogenético de las cepas seleccionadas en base a bibliografía

Finalmente, para la realización de árbol filogenético se utilizó el programa MEGA 6.0 y se aplicó el método de *neighbour-joining* que es el método en el cual se basan más estudios filogenéticos en la actualidad, además de ser también el indicado entre especies teóricamente cercanas.

Una vez obtenido el árbol filogenético resultante, se editó en otro programa que ofrece más posibilidades visuales, la herramienta online es Interactive Tree Of Life (iTOL) (Letunic & Bork, 2016). La comparación de la cepa con el hábitat asociado a ella se realizó a través de la información obtenida en la plataforma online EnvDB (Environmental Database) (Pignatelli, Moya, & Tamames, 2009), la cual es un soporte para relacionar secuencias de microorganismos con el hábitat donde fueron aislados.

### II-3.5.2. Obtención del árbol filogenético de las cepas secuenciadas

Por otro lado, el árbol filogenético perteneciente a las cepas obtenidas por similitud de las dos cepas de BALOs secuenciadas (MuRa1a y MuRa6a), fue también obtenido usando también el método de *neighbour-joining*, por medio del programa MEGA X, tras la realización del alineamiento múltiple anterior y tras haber aplicado los parámetros mostrados en la Figura 12.



**Fig. 12.** Parámetros aplicados para la realización del árbol filogenético de todas las cepas de BALO cercanas a MuRa1a y MuRa6a.

## II-4. RESULTADOS

### II-4.1. ANALISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE BACTERIAS DEL GRUPO BALOs

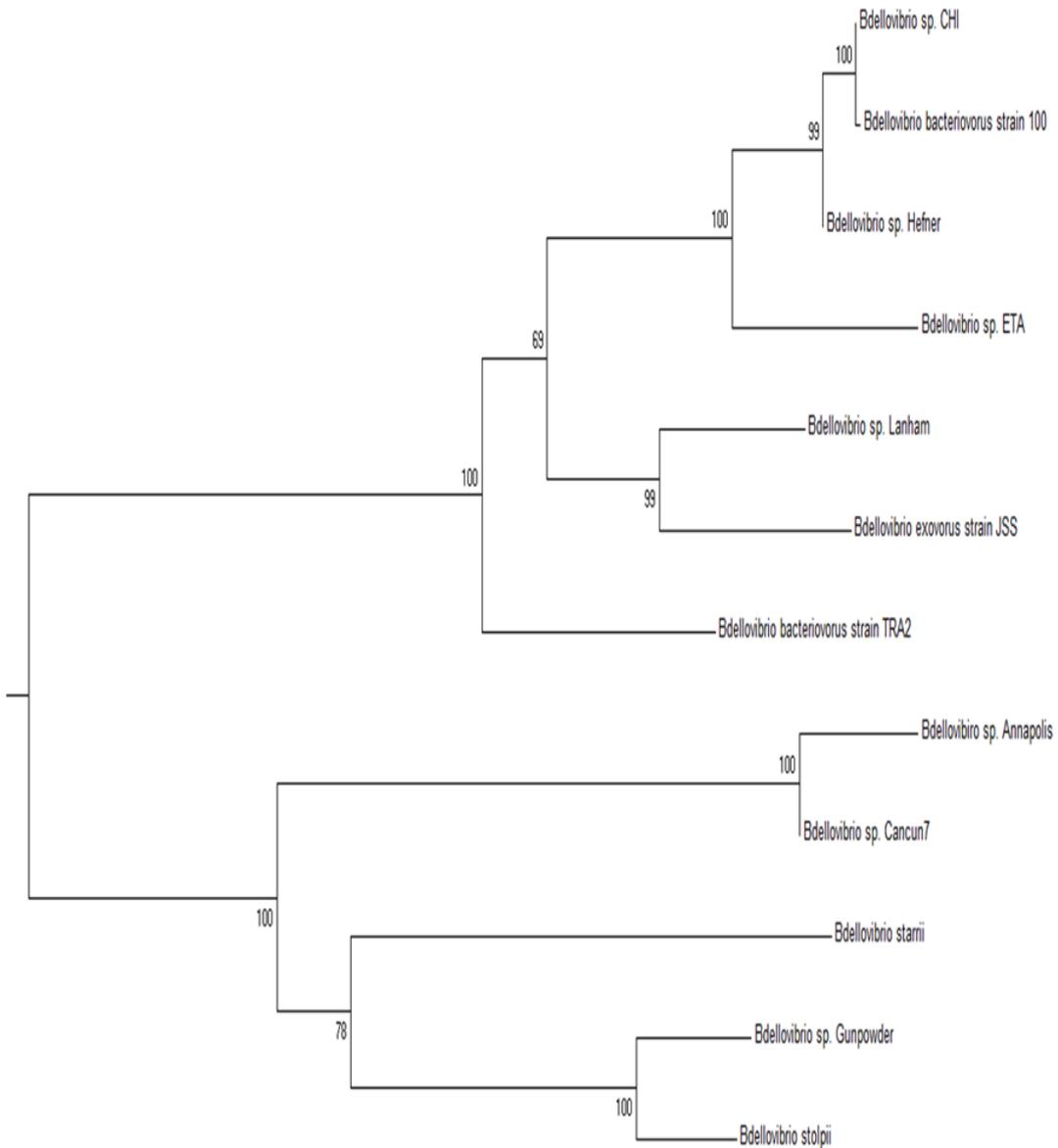
#### II-4.1.1. Variabilidad genética entre las cepas de BALOs seleccionadas en base a bibliografía

La matriz de distancia obtenida de las cepas seleccionadas corresponde, como se ha mencionado, a la disimilitud entre los organismos y en sus valores más extremos alcanzó un valor de 0,249, o lo que es lo mismo, existió alrededor de un 25% de disimilitud y, por lo tanto, hubo un 75% aproximadamente de similitud (Figura 13) entre algunos integrantes del grupo. Por otro lado, hay cepas en las que se observó mucha similitud entre ellas (Figura 13).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. <i>Bdellovibrio</i> sp. ETA		0.042	0.249	0.239	0.237	0.041	0.095	0.041	0.086	0.103	0.241	0.240
2. <i>Bdellovibrio</i> sp. CHI			0.243	0.245	0.240	0.000	0.080	0.000	0.084	0.084	0.255	0.245
3. <i>Bdellovibrio</i> sp. Annapolis				0.010	0.160	0.242	0.246	0.242	0.232	0.240	0.177	0.146
4. <i>Bdellovibrio</i> sp. Cancun7					0.131	0.211	0.211	0.212	0.205	0.206	0.161	0.120
5. <i>Bdellovibrio</i> sp. Gunpowder						0.214	0.212	0.225	0.199	0.205	0.126	0.031
6. <i>Bdellovibrio</i> sp. Hefner							0.071	0.002	0.069	0.072	0.222	0.216
7. <i>Bdellovibrio</i> sp. Lanham								0.072	0.092	0.049	0.219	0.214
8. <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain 100									0.103	0.103	0.237	0.211
9. <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain TRA2										0.094	0.211	0.199
10. <i>Bdellovibrio exovorus</i> strain JSS											0.214	0.200
11. <i>Bdellovibrio starrii</i>												0.126
12. <i>Bdellovibrio stolpii</i>												

**Fig. 13.** Matriz de distancia negativa (disimilitud) del alineamiento de aquellas bacterias del grupo BALOs seleccionadas por bibliografía. La disimilitud más acusada se muestra en el cuadro rojo mientras que las mayores similitudes vienen indicadas en el cuadro verde.

En consecuencia, en el árbol filogenético resultante de la matriz de distancias anterior (Figura 14), se puede observar que *Bdellovibrio* sp. CHI se sitúa en el extremo opuesto del árbol con respecto a *Bdellovibrio stolpii* (*Bacteriovorax stolpii* o *Bacteriolyticum stolpii* actualmente) debido a que su similitud fue de un 75% aproximadamente.



**Fig. 14.** Árbol filogenético de las bacterias del grupo BALOs seleccionadas en base a la literatura científica. La nomenclatura taxonómica atiende denominaciones anteriores y no a actuales géneros de BALOs.

## II-4.1.2. Variabilidad genética en las nuevas cepas de BALOs secuenciadas

### II-4.1.2.1. Análisis filogenético de BALO MuRa1a

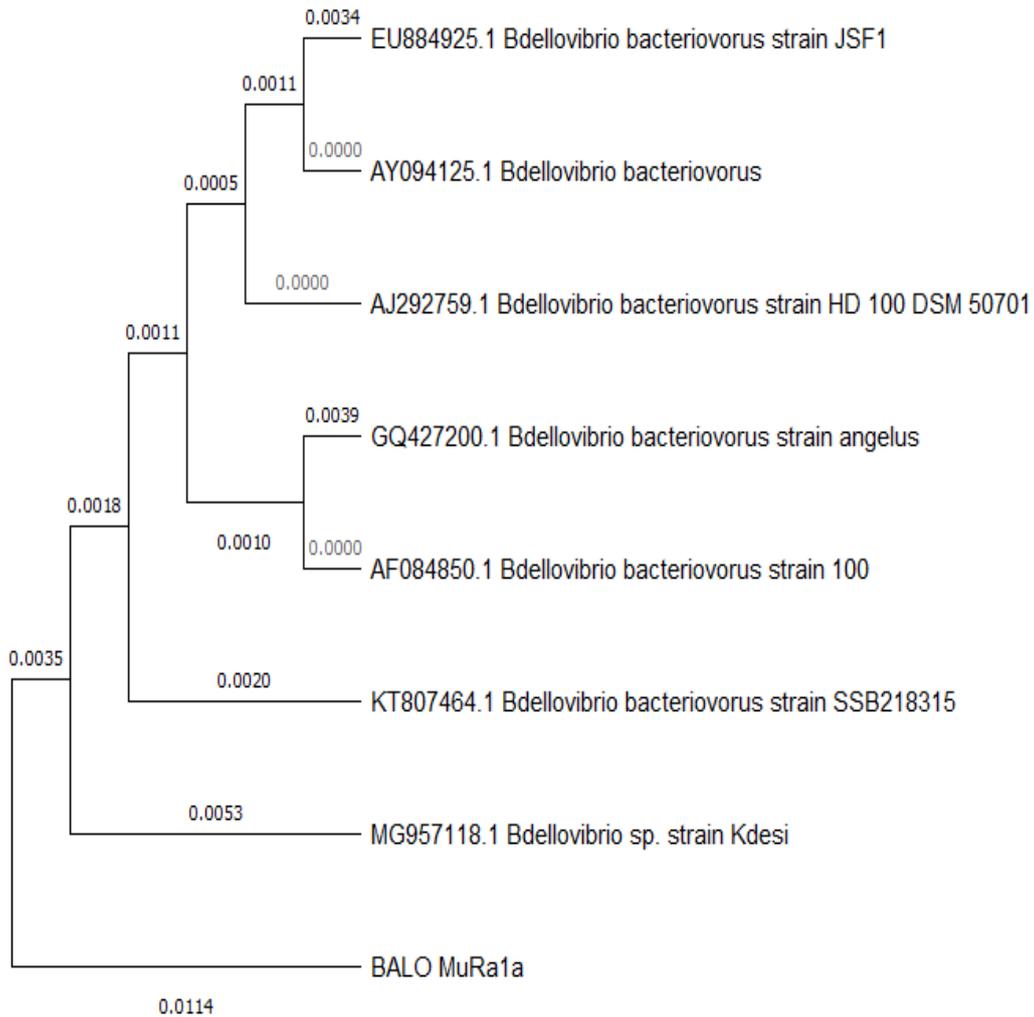
El análisis de la secuencia nucleotídica de la cepa de BALO MuRa1a reveló, como se puede comprobar en la Tabla 3, que la bacteria pertenece al género *Bdellovibrio* y según los resultados obtenidos en la secuenciación, se trata de una cepa muy próxima a *Bdellovibrio bacteriovorus* incluida en las bases de datos. De hecho, el porcentaje de similitud con dos de las cepas clásicas de la especie *Bdellovibrio bacteriovorus*, la cepa 109J (“J=Jerusalem) y la cepa “100” es de un 98,02% en ambos casos. En consecuencia y según el estudio filogenético realizado, se concluye que la cepa de BALO MuRa1a podría ser nombrada como *Bdellovibrio bacteriovorus* MuRa1a.

COMPARACIÓN NUCLEOTÍDICA DEL BALO MuRa1a CON DIVERSAS CEPAS DEL GRUPO BALOs			
Nº acceso	Cepa correspondiente	E - value	Identidad
CP020946.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain SSB218315, complete genome	0.0	98.17%
CP007656.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain 109J, complete genome	0.0	98.02%
BX842648.2	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> complete genome, strain HD100; segment 3/11	0.0	98.02%
BX842650.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> complete genome, strain HD100; segment 5/11	0.0	98.02%
AF084850.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	98.02%
MG957118.1	<i>Bdellovibrio</i> sp. strain Kdesi 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97.94%
KT807464.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain SSB218315 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97.94%
EU884925.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain JSF1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97.94%
AJ292759.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> partial 16S rRNA gene, strain HD 100, DSM 50701	0.0	98%
GQ427200.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain angelus 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	97.64%

**Tabla 3.** Cepas procedentes de la base de datos del NCBI con más porcentaje de similitud con la cepa de BALO MuRa1a.

Como se observa en la tabla anterior, los cinco primeros microorganismos que resultaron tener más similitud con la cepa de BALO MuRa1a corresponden a cepas de *Bdellovibrio bacteriovorus*. De acuerdo con lo anterior, el árbol filogenético compuesto por todas las

cepas resultantes de la comparación nucleotídica (incluida la cepa MuRa1) alineadas, se observa dicha similitud de manera más clara (Figura 15).



**Fig. 15.** Árbol filogenético resultante del alineamiento múltiple de las cepas de BALOs obtenidas por similitud con MuRa1a.

## II-4.1.2.2. Análisis filogenético del BALO MuRa6a

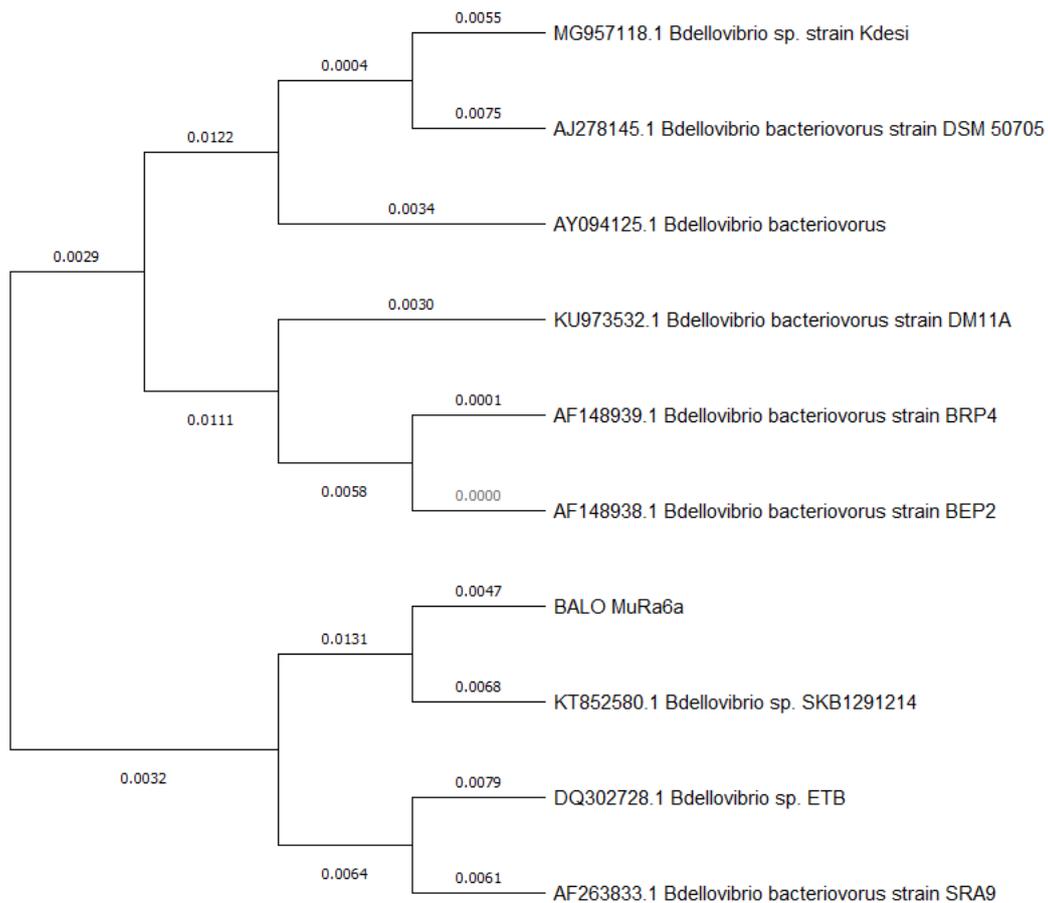
A diferencia de lo que se encontró en el análisis de la secuencia nucleotídica de la cepa de BALO MuRa6a reveló, como se puede comprobar en la Tabla 4, que la bacteria pertenece al género *Bdellovibrio*, siendo muy próxima a *Bdellovibrio* sp.

COMPARACIÓN NUCLEOTÍDICA DEL BALO MuRa6a CON DIVERSAS CEPAS DEL GRUPO BALOs			
Nº acceso	Cepa correspondiente	E value	Identidad
CP030082.1	<i>Bdellovibrio</i> sp. ZAP7 chromosome, complete genome	0.0	96.37%
KT852580.1	<i>Bdellovibrio</i> sp. SKB1291214 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	96.29%
CP030034.1	<i>Bdellovibrio</i> sp. NC01 chromosome, complete genome	0.0	95.08%
DQ302728.1	<i>Bdellovibrio</i> sp. ETB 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	94.72%
AF263833.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain SRA9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	94.4%
AF148939.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain BRP4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	93.97%
AF148938.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain BEP2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	93.97%
KU973532.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> strain DM11A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	93.86%
MG957118.1	<i>Bdellovibrio</i> sp. strain Kdesi 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	0.0	93.61%
AJ278145.1	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> partial 16S rRNA gene, strain DSM 50705	0.0	93.78%

**Tabla 4.** Cepas procedentes de la base de datos del NCBI con más porcentaje de similitud con la cepa de BALO MuRa6a.

De igual manera, como se observa en la tabla anterior para la cepa MuRa1a, los microorganismos que resultaron tener más similitud con la cepa de BALO MuRa6a corresponden a cepas de *Bdellovibrio* sp. No obstante, la cepa MuRa6a aun quedando filogenéticamente, y de forma clara, encuadrada dentro del género *Bdellovibrio*, presenta menor similitud que MuRa1a con la especie *Bdellovibrio bacteriovorus*.

En el árbol filogenético compuesto por todas las cepas obtenidas en la comparación nucleotídica anterior (incluida la cepa MuRa6), también se puede observar claramente el grado de similitud obtenido (Figura 16).

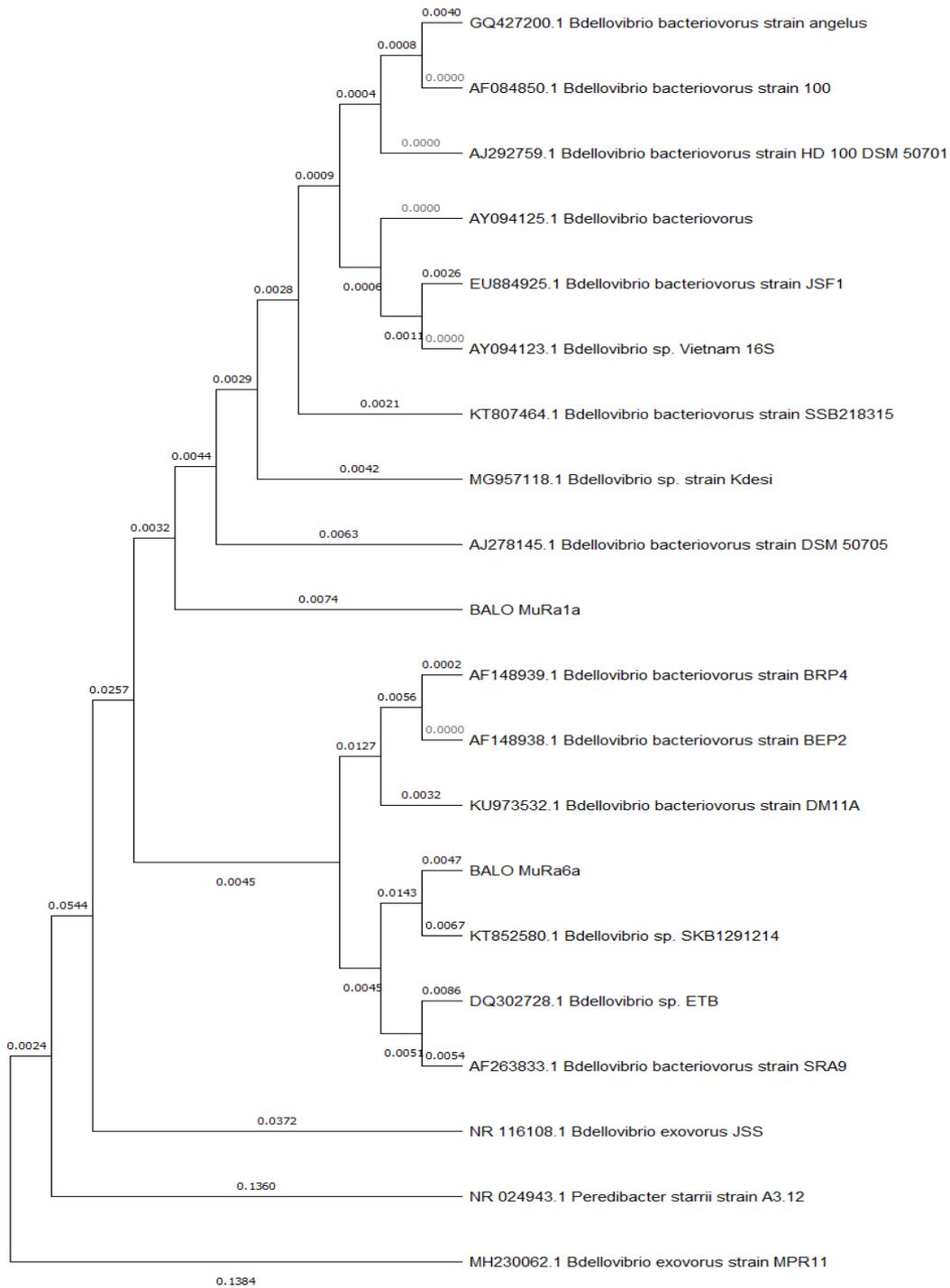


**Fig. 16.** Árbol filogenético resultante del alineamiento múltiple de las cepas de BALOs obtenidas por similitud con MuRa6a.

#### II-4.1.2.3. Distancia genética entre MuRa1a y MuRa6a

Tras haber analizado filogenéticamente las dos cepas de BALOs obtenidas de dos muestras ambientales distintas, en el siguiente árbol filogenético se puede observar, cuánta distancia genética real hay entre MuRa1a y MuRa6a (Figura 17).

Como se ha indicado, para construir el árbol filogenético se incluyeron cepas pertenecientes al grupo BALOs sin una similitud muy alta para delimitar los extremos del árbol, como es el caso de *Bdellovibrio exovorus* JSS que presenta un grado de similitud de 92,98% con MuRa1a y de un 89,47% con MuRa6a.

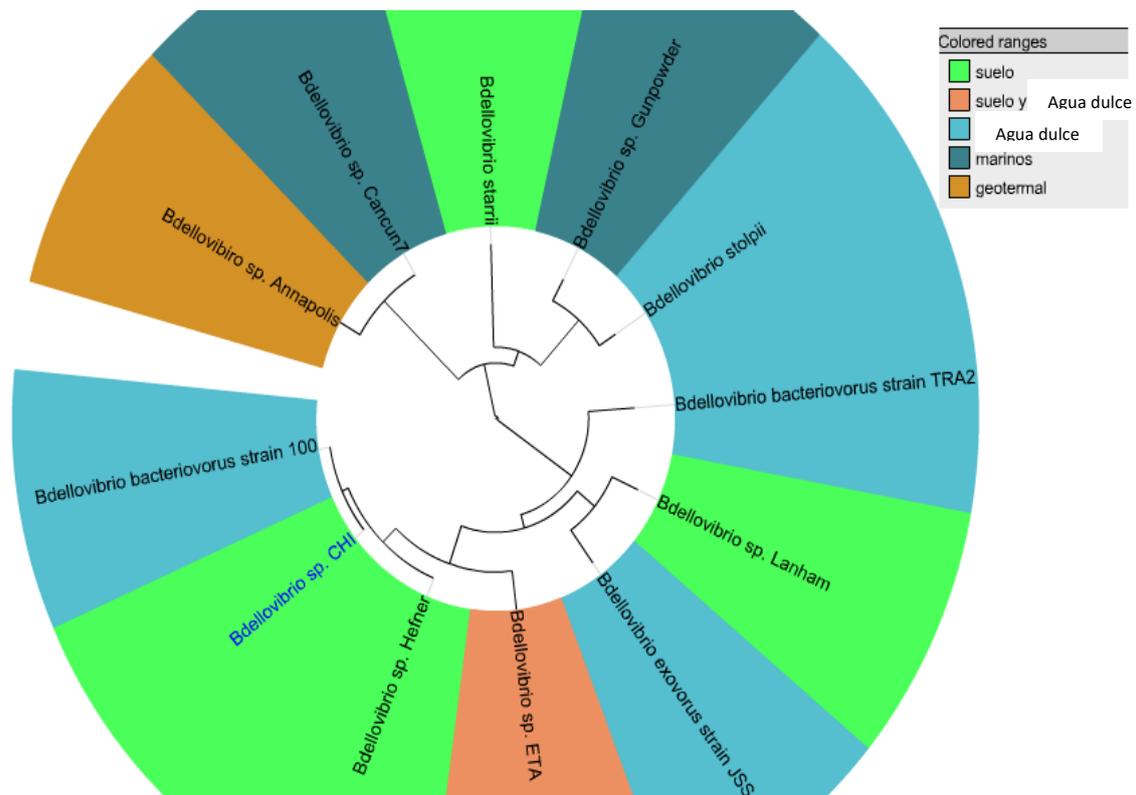


**Fig. 17.** Árbol filogenético resultante del alineamiento múltiple de todas las cepas de BALOs obtenidas por similitud con MuRa1a y con MuRa6a.

En la figura anterior se observa como MuRa1a queda situada más cerca de cepas definidas como *Bdellovibrio bacteriovorus* y a la vez queda relativamente lejos de MuRa6a, que se posiciona cerca de cepas de BALOs con menor afinidad o con un ciclo de vida diferente a *Bdellovibrio bacteriovorus* como es *Bdellovibrio exovorus*.

## II-4.2. LA VARIEDAD DE HÁBITATS DE LOS BALOs SELECCIONADOS

Partiendo del árbol filogenético obtenido de cepas de BALOs seleccionadas de la literatura (Figura 17) y tras haber identificado con datos bibliográficos los ecosistemas donde fueron aisladas, se puede observar la heterogeneidad de ambientes de las bacterias del género *Bdellovibrio* seleccionadas en este estudio (Figura 18).



**Fig. 18.** Árbol filogenético relacionado con los hábitats donde se han encontrado los BALOs del género *Bdellovibrio* seleccionados en base a la literatura científica.

En la figura anterior se observa que BALOs filogenéticamente cercanos entre sí, fueron aislados de diferentes sitios como el suelo, el agua dulce, marinos, o incluso desde un ambiente geotermal.

# **CAPÍTULO III**

## **Optimización metodológica de la detección y conservación de BALOs**



# ÍNDICE DEL CAPÍTULO

<b>III-1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>71</b>
<b>III-1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y ASPECTOS DE BALOs A CONSIDERAR</b>	<b>71</b>
<b>III-1.2. LAS AGUAS TRATADAS EN LAS E.D.A.R.</b>	<b>71</b>
<b>III-1.3. TÉCNICAS ULIZADAS EN AISLAMIENTO DE BALOs</b>	<b>73</b>
<b>III-1.3.1. Aislamiento directo de BALOs desde muestras ambientales</b>	<b>74</b>
<b>III-1.3.2. Aislamiento de BALOs desde muestras marinas</b>	<b>75</b>
<b>III-1.3.3. Aislamiento de BALOs independientes de huésped</b>	<b>75</b>
<b>III-2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO</b>	<b>77</b>
<b>III-3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>77</b>
<b>III-3.1. MANTENIMIENTO DE BACTERIAS PRESA</b>	<b>77</b>
<b>III-3.2. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE AGUA</b>	<b>77</b>
<b>III-3.3. DETECCIÓN DE BALOs</b>	<b>78</b>
<b>III-3.3.1. Detección de BALOs en medio sólido</b>	<b>78</b>
<b>III-3.3.1.1 Indicadores de actividad respiratoria bacteriana</b>	<b>78</b>
<b>III-3.3.2. Detección y seguimiento de lisis bacteriana en medio líquido</b>	<b>79</b>
<b>III-3.3.2.1 Densidad óptica</b>	<b>79</b>
<b>III-3.3.2.2. Determinación de pH</b>	<b>79</b>
<b>III-3.3.2.2.1. Determinación en medio líquido</b>	<b>79</b>
<b>III-3.3.2.2.2. Determinación en medio sólido</b>	<b>79</b>
<b>III-3.4. DENOMINACIÓN DE BALOs AISLADOS DEL E.D.A.R.</b>	<b>80</b>
<b>III-3.4.1. Denominación de BALOs incubados a temperatura ambiente</b>	<b>80</b>
<b>III-3.4.2. Denominación de BALOs incubados a 30°C</b>	<b>81</b>
<b>III-3.4.3. Denominación de BALOs incubados a 37°C</b>	<b>82</b>
<b>III-3.5. TÉCNICA A.M.S. PARA LA DETECCIÓN DE BALOs</b>	<b>83</b>
<b>III-3.5.1. Parámetros físico-químicos del agua de muestra</b>	<b>84</b>
<b>III-3.5.2. Tinción de bacterias resistentes a la depredación</b>	<b>84</b>
<b>III-3.6. PRESERVACIÓN DE BALOs A LARGO PLAZO</b>	<b>85</b>

<b>III-3.6.1.</b> Congelación de BALOs	85
<b>III-3.6.2.</b> Recuperación de BALOs	85
<b>III-3.7. MICROSCOPIA</b>	<b>86</b>
<b>III-3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>86</b>
<b>III-4. RESULTADOS</b>	<b>87</b>
<b>III-4.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE BALOs SILVESTRES DE AGUA DULCE Y SU ESPECTRO DE PARASITISMO</b>	<b>87</b>
<b>III-4.1.1.</b> Detección de BALOs sin filtración previa	87
<b>III-4.1.1.1.</b> BALOs detectados en medio rico	87
<b>III-4.1.1.2.</b> BALOs detectados en medio pobre	88
<b>III-4.1.2.</b> Detección de BALOs tras filtración por 1,2µm	91
<b>III-4.1.2.1.</b> Detección en placa tras incubación a temperatura ambiente	91
<b>III-4.1.2.1.1.</b> Recuento diario	91
<b>III-4.1.2.1.2.</b> Comparación de recuentos a temperatura ambiente	94
<b>III-4.1.2.2.</b> Detección en placa tras incubación a 30°C	94
<b>III-4.1.2.2.1.</b> Recuento diario	95
<b>III-4.1.2.2.2.</b> Comparación de recuentos a 30°C	97
<b>III-4.1.2.3.</b> Detección en placa tras incubación a 37°C	99
<b>III-4.1.2.3.1.</b> Recuento diario	99
<b>III-4.1.2.3.2.</b> Comparación de recuentos a 37°C	101
<b>III-4.1.3.</b> Detección de BALOs tras filtración por 0,45µm	102
<b>III-4.1.3.1.</b> Detección en placa tras incubación a temperatura ambiente	103
<b>III-4.1.3.1.1.</b> Recuento diario	105
<b>III-4.1.3.1.2.</b> Comparación de recuentos a temperatura ambiente	108
<b>III-4.1.3.2.</b> Detección en placa tras incubación a 30°C	110
<b>III-4.1.3.2.1.</b> Recuento diario	110
<b>III-4.1.3.2.2.</b> Comparación de recuentos a 30°C	113
<b>III-4.1.3.2.3.</b> Diferencias morfológicas entre regiones líticas	115
<b>III-4.1.3.3.</b> Detección en placa tras incubación a 37°C	117
<b>III-4.1.3.3.1.</b> Recuento diario	118
<b>III-4.1.3.3.2.</b> Comparación de recuentos a 37°C	121
<b>III-4.1.4.</b> Comparaciones generales y espectro de parasitismo de BALOs	123
<b>III-4.1.4.1.</b> Recuentos por temperatura tras una filtración de 0,45µm	123

<b>III-4.1.4.2.</b> Recuentos de MuRa1 por temperatura y tras filtración de 0,45µm	126
<b>III-4.1.4.4.</b> Comparativa de los recuentos de MuRa1, MuRa2 y MuRa3 según el tamaño de poro	127
<b>III-4.1.5.</b> Actividad respiratoria de <i>E. coli</i> K-12	128
<b>III-4.2. DETECCIÓN DE BALOs DE AGUA DULCE MEDIANTE LA TÉCNICA AMS</b>	<b>129</b>
<b>III-4.2.1.</b> Detección de BALOs MuRa1	130
<b>III-4.2.2.</b> Detección de BALOs MuRa1a	131
<b>III-4.2.3.</b> Detección BALOs MuRa1b	133
<b>III-4.2.4.</b> Comparativa de la detección de MuRa1 por temperatura	134
<b>III-4.2.5.</b> Comparativa entre la detección de MuRa1 y MuRa1a	135
<b>III-4.2.6.</b> Comparativa entre detecciones máximas de MuRa1 y MuRa1b	136
<b>III-4.2.7.</b> Comparativa entre detecciones máximas de MuRa1a y MuRa1b	137
<b>III-4.2.8.</b> Comparativas de las características físico-químicas del agua de muestra a cada temperatura	138
<b>III-4.2.8.1.</b> pH	138
<b>III-4.2.8.2.</b> Conductividad eléctrica	139
<b>III-4.2.8.3.</b> Oxígeno disuelto	139
<b>III-4.2.8.4.</b> Potencial Red-ox	140
<b>III-4.2.8.5.</b> Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días	141
<b>III-4.2.9.</b> Recuperación de BALOs sometidos a condiciones límite	142
<b>III-4.2.9.1.</b> Recuperación de BALOs en condiciones de depauperación	142
<b>III-4.2.9.2.</b> Detección de BALOs a 40°C	143
<b>III-4.2.10.</b> Recuento de enterobacterias tras la detección de BALOs MuRa1	145
<b>III-4.2.11.</b> Variación en la detección de enterobacterias según la temperatura	147
<b>III-4.2.12.</b> Colonias de <i>E. coli</i> K-12 resistentes a la depredación	150
<b>III-4.2.13.</b> Eficiencia de la técnica AMS en la detección de BALOs MuRa1	151
<b>III-4.2.13.1.</b> Comparativa a temperatura ambiente	151
<b>III-4.2.13.2.</b> Comparativa a 30°C	151
<b>III-4.2.13.3.</b> Comparativa a 37°C	152
<b>III-4.3. PRESERVACIÓN DE BALOs A LARGO PLAZO Y DEFINICIÓN DE UNA TÉCNICA PARA SU REACTIVACIÓN</b>	<b>153</b>
<b>III-4.3.1.</b> Reactivación directa de BALOs	153
<b>III-4.3.2.</b> Recuperación de BALOs en placa desde su ultracongelación	154

III-4.3.2.1. Detección de MuRa1	154
III-4.3.2.2. Detección de MuRa1 añadiendo 0,5% de extracto de levadura	155
III-4.3.2.3. Detección de MuRa5	157
III-4.3.2.4. Detección de MuRa5 añadiendo 0,5% de extracto de levadura	158
III-4.3.2.5. Detección de MuRa6	159
III-4.3.2.6. Detección de MuRa6 añadiendo 0,5% de extracto de levadura	160
<b>III-4.3.3. Características de la proliferación de las cepas hospedadoras</b>	161
III-4.3.3.1. Restricción de fuentes de carbono en las cepas hospedadoras	161
III-4.3.3.1.1. Proliferación de <i>E. coli</i> K-12	161
III-4.3.3.1.2. Proliferación de <i>K. pneumoniae</i> AA100	162
III-4.3.3.1.3. Proliferación de <i>S. typhimurium</i> LT2	163
<b>III-4.3.4. Reactivación de BALOs en medio líquido a distintas concentraciones de glicerol</b>	165
III-4.3.4.1. Proliferación de MuRa1a a altas concentraciones de glicerol	165
III-4.3.4.2. Proliferación de MuRa1a a bajas concentraciones de glicerol	166
III-4.3.4.3. Proliferación de MuRa5a a altas concentraciones de glicerol	168
III-4.3.4.4. Proliferación de MuRa5a a bajas concentraciones de glicerol	168
III-4.3.4.5. Proliferación de MuRa6a a altas concentraciones de glicerol	170
III-4.3.4.6. Proliferación de MuRa6a a bajas concentraciones de glicerol	170
<b>III-4.3.5. Proliferación de bacterias presa a distintas concentraciones de glicerol</b>	172
<b>III-4.3.6. Recuperación de BALOs ultracongelados en fase de ataque y en fase de bdelloplasto</b>	173
III-4.3.6.1. Recuperación a una concentración mayor de 0,5% de glicerol	173
III-4.3.6.2. Recuperación a una concentración menor de 0,5% de glicerol	174
III-4.3.6.2.1. Recuperación de MuRa1a	175
III-4.3.6.2.2. Recuperación de MuRa5a	177
III-4.3.6.2.3. Recuperación de MuRa6a	179
III-4.3.6.3. Recuperación de BALOs según el tiempo en ultracongelación	182

## III-1. INTRODUCCIÓN

### III-1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES Y ASPECTOS DE BALOs A CONSIDERAR

Como se ha explicado anteriormente, las especies pertenecientes al grupo BALOs son depredadoras, de pequeño tamaño, móviles y que invaden a otras bacterias gramnegativas, digiriéndolas y lisándolas finalmente (Snyder et al., 2002). Como se ha indicado, el ciclo de vida de las bacterias pertenecientes al grupo se encuentra medianamente definido en dos fases: una fase de ataque (donde no se experimenta una replicación de DNA ni una división por parte de la bacteria) y una fase de crecimiento y división (a expensas de la bacteria presa). Durante el reconocimiento de dicha presa es donde existe actualmente más controversia, pues se debate si los BALOs contactan con su presa por colisión aleatoria (Varon & Shilo, 1980) o por quimiotaxis (Lambert, Smith, & Sockett, 2003).

Al igual que la bioquímica de este grupo es, en su mayor parte, desconocida, también lo es el hábitat donde son predominantes, aunque se han señalado a los biofilms como uno de los nichos donde se suele detectar una mayor abundancia de BALOs (Rotem et al., 2014).

Igualmente, no se suelen aislar relativamente altos niveles de BALOs directamente del medio debido, probablemente, a su preferencia por los biofilms y a que existen muchas bacterias que no son susceptibles de ser su presa e interfieren en las cantidades detectadas en placa. Asimismo, los BALOs pueden no aparecer revelados en placas debido a la inhibición que provocan algunos componentes secretados por otras bacterias, así como por la acción de bacteriófagos presentes en el medio (Jurkevitch, 2006).

Uno de los sistemas donde se cumplen más condiciones para la detección de BALOs es en las E.D.A.R. En estos sistemas se favorece la proliferación y persistencia de este tipo de bacterias al existir multitud de presas potenciales y al encontrarse en un medio que favorece la formación de biofilms, debido a la gran cantidad de materia orgánica que se acumula, sobre todo en las fases iniciales de depuración.

### III-1.2. LAS AGUAS TRATADAS EN LAS E.D.A.R.

El agua se convierte en agua residual cuando se ha utilizado previamente y puede contener aceites, productos químicos, alimentos, desechos o mezcla de otras aguas residuales, necesitando de procesos físicos, químicos y biológicos para eliminar, de una forma lo suficientemente segura, los contaminantes presentes. Uno de los subproductos más importantes del tratamiento de aguas residuales son los lodos y tanto estos como

otros materiales de desecho tienen características que varían conforme a los cambios en nuestro estilo y ritmo de vida, presentando una gran cantidad de nuevas sustancias químicas. Los efectos a largo plazo en la salud de la exposición a sustancias presentes en las aguas residuales o a aquellas producidas en las plantas de tratamiento son más difíciles de medir, especialmente, cuando sus concentraciones son muy pequeñas o cuando existen varias vías de exposición (Saxena, Bharti, Singh, Pradesh, & Pradesh, 2018).

Hasta ahora, se han identificado cuatro tipos principales de aguas residuales: domésticas, industriales, agrícolas y urbanas. A menudo, las aguas residuales urbanas se consideran una combinación de aguas residuales domésticas e industriales y también se consideran así a las aguas infiltradas tanto residuales como de lluvia. A las aguas residuales agrícolas se las considera aguas residuales generadas a través de procesos en granjas y actividades agrícolas en general, pudiendo traer consigo la contaminación de aguas subterráneas (Naidoo & Olaniran, 2013). Aunque el foco se sitúa, principalmente, en las aguas residuales domésticas e industriales, al considerarse las más peligrosas en cuanto a potencial contaminación del medio ambiente, la escorrentía agrícola es cada vez más importante debido a las altas cantidades de pesticidas y fertilizantes que se utilizan, lo que, en última instancia, contribuye a la eutrofización y contaminación de las aguas superficiales. En cambio, las aguas residuales domésticas se definen como aguas residuales negras (compuestas de materia fecal tanto humana como animal) junto con fuentes de aguas grises, que son las compuestas por otros contaminantes propios de la actividad humana (Naidoo & Olaniran, 2013). En términos generales, las aguas residuales municipales también podrían ser consideradas como un tipo de agua residual, aunque presenta una composición diferente debido a la mezcla de aguas residuales, industriales y agua de lluvia no absorbida (Ramseur, 2018).

Por lo tanto, para que las aguas residuales puedan ser sometidas a un proceso (o una serie de ellos) de eliminación de sus contaminantes y convertir el agua resultante en una apta para ser devuelta a su ciclo con un impacto mínimo en el medio ambiente o para ser reutilizada, es necesaria la existencia de una planta de tratamiento de aguas residuales. Dichas plantas residuales están ideadas y diseñadas para reducir la concentración de contaminantes, incluidos los microorganismos patógenos, en el efluente antes de devolverlo a cuerpos de agua receptores (Frigon, Biswal, Mazza, Masson, & Gehr, 2013).

Tras haber pasado por los diferentes procesos detallados en el siguiente capítulo, las aguas tratadas en las plantas especializadas pueden contener elementos capaces todavía de causar grandes efectos negativos sobre la vida biológica. Para ello existen diferentes tipos de lagunas de estabilización (o lagunas de tratamiento de aguas residuales) que corresponden al tratamiento secundario del agua en una E.D.A.R. Dichas lagunas se subdividen en varios tipos:

Las lagunas anaeróbicas son las unidades más pequeñas de la serie y se clasifican de acuerdo con su *carga orgánica volumétrica* (volumen de agua a tratar por metro cuadrado de superficie y tiempo); las altas cargas producen un ambiente anaeróbico estricto en todo el volumen de la laguna (no existe oxígeno disuelto y el potencial red-ox es negativo). La

profundidad de las lagunas anaeróbicas suele comprender de los 2 m a los 5 m y funcionan bien en climas cálidos; por ejemplo, una laguna diseñada adecuadamente logrará alrededor del 60% de eliminación de DBO<sub>5</sub> (Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días) a 20 °C (Varón, 2004).

Las lagunas facultativas se diferencian en dos tipos: las lagunas facultativas primarias, que reciben aguas residuales sin tratar (después del cribado y eliminación de arena) y las lagunas facultativas secundarias, las cuales reciben aguas residuales sedimentadas desde la etapa primaria (generalmente el efluente de los estanques anaeróbicos). Las lagunas facultativas están diseñadas para la eliminación de DBO<sub>5</sub> en función de su *carga orgánica superficial* (término que se refiere a la cantidad de materia orgánica, aplicada a cada hectárea de superficie de la laguna). Por otro lado, el mantenimiento de una población sana de algas en la laguna es muy importante ya que éstas generan el oxígeno que necesitan las bacterias para eliminar la DBO<sub>5</sub> pretendida (Varón, 2004).

Por último, las lagunas de maduración son aquellas que reciben el efluente de las lagunas facultativas y su tamaño y número depende de la calidad bacteriológica requerida del efluente final. Son menos profundos que las lagunas facultativas (entre 1m y 1.5m). Debido a las menores cargas orgánicas recibidas, las lagunas de maduración están bien oxigenadas en toda su profundidad y las poblaciones de algas son mucho más diversas que las de las lagunas facultativas. En general, las lagunas de maduración solo logran una pequeña eliminación adicional de DBO<sub>5</sub>, pero hacen una contribución significativa a la eliminación de nitrógeno y fósforo (Varón, 2004).

En definitiva, con la tecnología adecuada, es posible reutilizar los efluentes de aguas residuales para el agua potable, aunque esto, generalmente, se hace solo en lugares con suministros limitados de agua. En los países áridos, las aguas residuales tratadas se utilizan a menudo en la agricultura y en los humedales, los cuales también proporciona hábitats para la flora y la fauna (Karamouz, Zahraie, Araghi-Nejhad, Shahsavari, & Torabi, 2001).

### III-1.3. TÉCNICAS ULIZADAS EN AISLAMIENTO DE BALOs

El peculiar ciclo celular de *Bdellovibrio* dicta su método de aislamiento, ya sea a partir de aguas residuales o lagunas de estabilización, de partes de plantas, de aguas más profundas o muestras de agua superficial. Básicamente, los BALOs y los fagos se aíslan de manera similar: la muestra, o sus diluciones en serie, se mezclan con una posible bacteria presa en agar fundido y se vierte sobre otro agar (de sustento y ya solidificado) que constituye un medio de crecimiento. Esta es la llamada técnica de la “doble capa de agar” (DCA).

### III-1.3.1. Aislamiento directo de BALOs desde muestras ambientales

Teniendo en cuenta lo anterior, la técnica de detección más común es la que se basa en el trabajo de H. Stolp. Dicha técnica requiere de una muestra de agua o de suelo, que se deberá agitar vigorosamente y ser posteriormente centrifugada para eliminar las partículas gruesas. El sobrenadante se pasa a través de una serie de filtros de membrana de tamaño de poro decreciente y los filtrados de los dos últimos pasos se diluyen en serie para mezclarse con alícuotas de la bacteria presa en agar “blando” con bajo contenido de nutrientes o agar tamponado. Posteriormente, la mezcla se vierte en una placa de agar con bajo contenido de nutrientes o tamponada y se incuba (Stolp, 1981; Stolp & Starr, 1981).

Tras lo anterior, las placas que presentan regiones líticas visibles en 2 a 3 días y que muestran una expansión adicional por unos días más son, potencialmente, placas con presencia de BALOs y estas regiones deben diferenciarse de las formadas por protozoos o bacteriófagos. A los protozoos y bacteriófagos le corresponden unas regiones líticas de rápido desarrollo que ya son visibles después de 24h. Estas regiones suelen ser pequeñas y muestran un bajo poder de crecimiento a partir de esas 24h. Para poder diferenciar las regiones líticas producidas en placa por protozoos y bacteriófagos de las producidas por bacterias del grupo BALOs, las regiones deben ser marcadas durante el primer día para que el crecimiento más lento pero continuo de BALOs contraste de aquellas que alcanzaron su tamaño máximo al primer día. Las células pequeñas y altamente móviles de BALOs se pueden detectar en un microscopio de contraste de fase tras exponer el material de la placa triturado en soportes húmedos (Stolp & Starr, 1981).

Esta técnica tiene dos inconvenientes o limitaciones principales: con este método solo se pueden recuperar BALOs capaces de aprovecharse de la bacteria empleada, lo que no resulta muy efectivo para realizar una estimación de su abundancia en el medio y el segundo inconveniente deriva de la propia muestra: de las fuentes ambientales se suele recuperar niveles relativamente bajos de BALOs al contener niveles mucho más altos de bacterias no susceptibles que "emborronan" o contaminan las placas debido a su sobrecrecimiento en la placa dificultando la detección de BALOs. Además, el crecimiento de BALOs puede verse obstaculizado por los compuestos excretados por bacterias, así como por los bacteriófagos presentes.

### III-1.3.2. Aislamiento de BALOs desde muestras marinas

Los BALOs halotolerantes se han aislado de ambientes marinos como estuarios, sedimentos, aguas de cercanías a la orilla, mar abierto y superficies sumergidas (Kelley et al., 1997a; Williams et al., 1995; Williams y Falkler Jr., 1984) y la baja abundancia relativa de bacterias del grupo BALOs en estas biotas puede requerir la concentración de grandes volúmenes de muestra, pudiéndose utilizar enfoques tanto directos como de enriquecimiento. De modo que, si es necesario, las muestras de agua se pueden concentrar por centrifugación o se pueden recolectar en una membrana de tamaño de poro de 0.1  $\mu\text{m}$  (Marbach, Varon, & Shilo, 1975). Luego, el concentrado se mezclaría con una posible bacteria huésped en agar blando y se vertería en agar de “base”, en el cual, al igual que en los aislamientos en muestras ambientales, la concentración de agar es mayor que en el de “cobertera”. Igual que en la otra técnica, en el agar de “cobertera”, alternativamente, se agrega muestra que contiene una suspensión de bacterias presa y la mezcla resultante se vierte posteriormente en placas de Petri, incubándose posteriormente a 25° C (Schoeffield & Williams, 1990).

### III-1.3.3. Aislamiento de BALOs independientes de huésped

Los BALOs independientes de huésped o BALOs HI se aíslan mediante la introducción de células en fase de ataque en un medio rico en nutrientes y sin presa, seleccionando las zonas de lisis directamente en placa (Seidler & Starr, 1969). Un inconveniente de esta técnica es el crecimiento adyacente de bacterias presa residuales en la placa de donde se obtienen los BALOs, las cuales pueden ser trasladadas, junto con los depredadores, al medio líquido. Para superar este inconveniente, las suspensiones líticas se filtran a través de una membrana con tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , separando, de manera eficiente, las células de BALOs de las bacterias presa, (Shilo & Bruff, 1965). Los mutantes HI saprofitos (tipo I) se cultivan esencialmente con bacterias de presa muertas por choque térmico o en medio rico modificado con extracto de células. Ambos medios son adecuados tanto para el crecimiento líquido como para el agar. Los mutantes HI de tipo I cultivados con presas muertas también deben colocarse sobre un medio semisólido en consonancia con la técnica de la “doble capa de agar” (Schwudke et al., 2001). Las colonias resultantes se observarían rodeadas de halos claros (Cotter & Thomashow, 1992b).



## III-2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO

- ▣ Establecer un método de aislamiento de BALOs directamente del medio que maximice la cantidad detectada en placa.
- ▣ Obtener un método eficiente de preservación a largo plazo y posterior reactivación de cepas de BALOs aisladas.

## III-3. MATERIAL Y MÉTODOS

### III-3.1. MANTENIMIENTO DE BACTERIAS PRESA

Las bacterias utilizadas como presas fueron *E. coli* K-12, *E. coli* 101, *E. coli* C, *E. coli* Q-13, *K. pneumoniae* AA100, *S. typhimurium* LT2 y *P. aeruginosa*.

En medio sólido, *E. coli* K-12, *E. coli* 101, *E. coli* C y *E. coli* Q-13 fueron incubadas a 37°C (estufa P-Selecta®) en agar McConkey Cristal Violeta (Oxoid™) y McConkey Rojo Neutro (Oxoid™) (la composición de los medios empleados queda detallada en el apartado “Anexos”) durante 24 h. Los recuentos de enterobacterias del agua cruda de la E.D.A.R. también fueron realizados en placas de agar McConkey con Cristal Violeta (Oxoid™). En cambio, *K. pneumoniae* AA100, *S. typhimurium* LT2 y *P. aeruginosa* fueron incubadas a 37°C (estufa P-Selecta®) en NA (Nutrient Agar, Oxoid™) durante 24h.

En medio líquido, todas las bacterias presas de la investigación fueron cultivadas en NB (Nutrient Broth) o NB-10 (Nutrient Broth diluido 10 veces) a 30°C y 70 r.p.m. en baño termostático (incubadora Memmert™).

### III-3.2. PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS DE AGUA

Las muestras de agua para una posterior detección de BALOs provinieron de los rotofiltros situados en el sistema de pretratamiento de la E.D.A.R. del Campus de Espinardo (Murcia), por lo que se empleó un agua tratada solamente con la retirada de arenas y gruesos, es decir, agua bruta o cruda. Las características físico-químicas de esas muestras se encuentra descritas en el apartado “Resultados y discusión”.

### III-3.3. DETECCIÓN DE BALOs

#### III-3.3.1. Detección de BALOs en medio sólido

Para el revelado de BALOs realizado en los estudios de optimización de la técnica de detección directamente del medio (n=4), los realizados en el espectro de parasitismo de BALOs (n=4) y en la reactivación de BALOs tras ultracongelación (n=4), la técnica empleada estuvo basada, en todos los casos, en la llamada técnica de la “doble capa de agar” (Seidler & Starr, 1969; Stolp, 1981) resumida anteriormente y que se diferencia en dos partes sucesivas:

Primeramente, tras la preparación de diluciones seriadas en solución isotónica de Ringers  $\frac{1}{4}$  (Microkit™), una cantidad de 0,1ml de una suspensión de BALOs y presa en medio NB-10 se adicionó a 0,4ml de NA (Nutrient Agar, Oxoid™) o NA-10 (Nutrient Agar diluido 10 veces, Oxoid™) a una concentración del 0,65% (constituyendo el “agar de cobertera”), concentración que permitió el movimiento de los depredadores hacia sus presas. El agar de cobertera se calentó hasta los 42°C (incubadora Memmert™), temperatura que permite que el agar permanezca fundido a la vez que posibilita la supervivencia de depredador y presa.

En segunda instancia, la preparación anterior fue vertida a placas con medio NA o NA-10 con una concentración de agar del 0,85% que sirvió de sustento tanto a la presa como al depredador (constituyendo el “agar de base”) y, tras ser expandida suavemente por la placa, la muestra fue incubada a 30°C (estufa P-Selecta®). Tanto el agar de “base” como el de “cobertera” tuvieron un pH de 7,2 y la presencia de cationes de Calcio (2mM) y Magnesio (3mM).

El proceso anterior, variante de la técnica DCA original, fue ejecutada tanto sin una filtración previa de la suspensión de BALOs, como tras una filtración previa por filtros de 1,2 o de 0,45µm de tamaño de poro (Milipore™). La optimización de la técnica viene detallada el apartado de “Resultados” de este capítulo.

##### III-3.3.1.1 Indicadores de actividad respiratoria bacteriana

Para comprobar la actividad respiratoria de MuRala (previa filtración por 0,45µm) y *E. coli* K-12 en placas (n=4) se emplearon 5ml de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) (C<sub>19</sub>H<sub>15</sub>CIN<sub>4</sub>) a una concentración de 0,1% en medio NB que fueron vertidos directamente a las placas antes de ser incubadas a 30°C.

### **III-3.3.2. Detección y seguimiento de lisis bacteriana en medio líquido**

#### **III-3.3.2.1 Densidad óptica**

La comprobación de la lisis de BALOs en sistemas bimembres en medio líquido NB-10 fue efectuada mediante la medida de su Densidad Óptica a 600nm ( $DO_{600}$ ) en un espectrofotómetro (Spectronic 20<sup>TM</sup>), realizando controles visuales periódicos mediante microscopía de contraste de fase.

#### **III-3.3.2.2. Determinación de pH**

##### **III-3.3.2.2.1. Determinación en medio líquido**

La medida del pH en medio líquido se realizó por medio de pH-metro (XS pc52 series<sup>TM</sup>) en medios NB-10 con cultivos bimembres BALO-presa.

##### **III-3.3.2.2.2. Determinación en medio sólido**

La medida de pH en medio sólido se obtuvo tras el corte de una porción de NA-10 y un machacado manual en 3ml de agua destilada estéril. Posteriormente, la medida se realizó a través del pH-metro (XS pc52 series<sup>TM</sup>).

### III-3.4. DENOMINACIÓN DE BALOs AISLADOS DEL E.D.A.R.

Como se ha indicado, las diferentes cepas de BALOs empleadas en la investigación fueron aisladas a partir de agua residual cruda perteneciente a la fase de pretratamiento de la E.D.A.R. del Campus Universitario de Espinardo (Murcia).

A todas las cepas de BALOs detectadas, dependiendo de la cepa utilizada como bacteria hospedadora (presa) y de la temperatura de incubación, se les asignó una nomenclatura distinta.

#### III-3.4.1. Denominación de BALOs incubados a temperatura ambiente

A aquellas cepas de BALOs detectadas tras ser incubadas a temperatura ambiente fueron denominadas como *MuRa-x* según su hospedador (Tabla 5):

Nomenclatura de BALOs detectados a temperatura ambiente	
Hospedador	Denominación
<i>E. coli</i> K-12	<b>MuRa1</b>
<i>E. coli</i> 101	<b>MuRa2</b>
<i>E. coli</i> C	<b>MuRa3</b>
<i>E. coli</i> Q-13	<b>MuRa4</b>
<i>S. typhimurium</i> LT2	<b>MuRa5</b>
<i>K. pneumoniae</i> AA100	<b>MuRa6</b>
<i>P. aeruginosa</i>	<b>MuRa7</b>

**Tabla 5.** Nomenclatura empleada para aquellos BALOs detectados en agua cruda e incubados a temperatura ambiente y según la bacteria hospedadora utilizada para su revelado.

**III-3.4.2. Denominación de BALOs incubados a 30°C**

Igualmente, a cepas de BALOs detectadas tras ser incubadas a 30°C se les denominó *MuRa-xa* según su hospedador (Tabla 6):

<b>Nomenclatura de BALOs detectados a 30°C</b>	
<b>Hospedador</b>	<b>Denominación</b>
<i>E. coli</i> K-12	<b>MuRa1a</b>
<i>E. coli</i> 101	<b>MuRa2a</b>
<i>E. coli</i> C	<b>MuRa3a</b>
<i>E. coli</i> Q-13	<b>MuRa4a</b>
<i>S. typhimurium</i> LT2	<b>MuRa5a</b>
<i>K. pneumoniae</i> AA100	<b>MuRa6a</b>
<i>P. aeruginosa</i>	<b>MuRa7a</b>

**Tabla 6.** Nomenclatura empleada para aquellos BALOs detectados en agua cruda e incubados a 30°C y según la bacteria hospedadora utilizada para su revelado.

**III-3.4.3. Denominación de BALOs incubados a 37°C**

Igualmente, a cepas de BALOs detectadas tras ser incubadas a 30°C también recibieron una denominación propia, *MuRa-xb*, según la bacteria hospedadora utilizada (Tabla 7):

<b>Nomenclatura de BALOs detectados a 37°C</b>	
<b>Hospedador</b>	<b>Denominación</b>
<i>E. coli</i> K-12	<b>MuRa1b</b>
<i>E. coli</i> 101	<b>MuRa2b</b>
<i>E. coli</i> C	<b>MuRa3b</b>
<i>E. coli</i> Q-13	<b>MuRa4b</b>
<i>S. typhimurium</i> LT2	<b>MuRa5b</b>
<i>K. pneumoniae</i> AA100	<b>MuRa6b</b>
<i>P. aeruginosa</i>	<b>MuRa7b</b>

**Tabla 7.** Nomenclatura empleada para aquellos BALOs detectados en agua cruda e incubados a 37°C y según la bacteria hospedadora utilizada para su revelado.

Para la obtención de sistemas bimembres de BALOs-presa, los BALOs cultivados a las diferentes temperaturas fueron mantenidos en cultivo mixto (junto con la bacteria presa) en medio líquido NB-10 a 30°C tanto en incubadora orbital a 70 r.p.m. (SANYO Gallenkamp™) como en estático (estufa P-Selecta®).

Por otro lado, como se mostrará en el apartado “Resultados” de este capítulo, hubieron BALOs que fueron detectados a una temperatura de 40°C usando *E. coli* K-12 como bacteria hospedadora. A dichos BALOs se les denominó BALO *MuRa1a*.

### III-3.5. TÉCNICA A.M.S. PARA LA DETECCIÓN DE BALOs

En el estudio realizado para maximizar la detección de BALOs procedentes de la E.D.A.R. (n=4), se emplearon 150ml de agua procedente de su fase de pretratamiento. Esta muestra de agua fue mantenida en la infraestructura (frascos y manómetros) propia de la técnica de la DBO<sub>5</sub> (Figura 19) y fue filtrada por medio de filtros de 0,45µm de tamaño de poro (Milipore™) antes de emplearse la técnica de “la doble capa de agar” y proceder a la detección, usando como cebo a la bacteria presa que correspondiera. El agua de muestra contenida en la botella de DBO<sub>5</sub> no recibió aporte externo alguno de nutrientes, por lo que los BALOs utilizaron, únicamente, los nutrientes disponibles producto de la evolución del microcosmos. A esta técnica se le ha denominado la técnica AMS (Auto-Enrichmented and Monitored Sample).



**Fig.19.** Frasco y manómetro, propios de la realización de la técnica de la DBO<sub>5</sub>, utilizados para contener el agua cruda recolectada de la fase de pretratamiento de la E.D.A.R. Base para la técnica AMS.

Como se ha indicado, las botellas de DBO con el agua de la E.D.A.R. fueron incubadas durante 5 días a 30 r.p.m. tanto a temperatura ambiente para la detección de BALOs

*MuRa-x*, como a 30°C (estufa P-Selecta<sup>®</sup>) para la detección de BALOs *MuRa-xa* y a 37°C (incubadora Memmert<sup>™</sup> BM500) para la detección de BALOs *MuRa-xb*.

### III-3.5.1. Parámetros físico-químicos del agua de muestra

La técnica AMS llevó consigo la monitorización de los parámetros físico-químicos del agua de muestra. La medida de la DBO<sub>5</sub> se obtuvo de los manómetros de los frascos (VELP<sup>®</sup>) donde permaneció incubada el agua de muestra y la medición del pH fue realizada por medio de pH-metro (XS pc52 series<sup>™</sup>). En cambio, las mediciones de la conductividad a 25°C, el oxígeno disuelto y el potencial red-ox del agua de muestra fueron realizadas por medio del conductímetro, el oxígeno y el medidor de potencial red-ox respectivamente (Hanna Instruments<sup>®</sup>).

### III-3.5.2. Tinción de bacterias resistentes a la depredación

La tinción se realizó perfundiendo 10µl de azul de metileno a la muestra previamente cortada de agar de revelado. Este colorante orgánico, cuyo nombre científico es Cloruro de Metiltionina (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>ClS), no es diferencial porque tiñe a todas las bacterias por igual pero sí que sirve para diferenciar bacterias de lo que no lo son, así como para resaltar sus núcleos.

### III-3.6. PRESERVACIÓN DE BALOs A LARGO PLAZO

La conservación a largo plazo de las cepas de BALOs en el ensayo con glicerol (n=4), fue realizada mediante dos fases: una de congelación de BALOs y otra de recuperación de BALOs tras congelación, tanto en placa como en medio líquido.

#### III-3.6.1. Congelación de BALOs

Las cepas de BALOs MuRa1, MuRa6 y MuRa5 procedentes de cultivos lisados en medio NB-10 con la adición de un 20% de glicerol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) fueron ultracongeladas (SANYO™ MDF-192) a < -70°C y en crioviales de polipropileno de 2,5ml. Las muestras fueron congeladas tanto con lisados de BALOs en fase infectiva y como BALOs en fase de bdelloplasto. El proceso de mantenimiento a largo plazo se mostrará en el apartado “Resultados” de este capítulo.

#### III-3.6.2. Recuperación de BALOs

Las cepas de BALOs MuRa1, MuRa6 y MuRa5 ultracongeladas tanto en fase de ataque como en fase de bdelloplasto, fueron atemperadas a temperatura ambiente durante 20min, para luego ser adicionadas a matraces con medio líquido NB-10 y mantenidas a 30°C y a 70 r.p.m. (SANYO Gallenkamp™). A partir de ahí, dichos matraces se emplearon para dos fines:

Si la recuperación fue en medio sólido (placa), los cultivos bimembres se mantuvieron 1 hora en matraces antes de ser filtrados por filtros de 0,45µm de tamaño de poro (Milipore™) e iniciarse posteriormente la técnica DCA, mostrada en el apartado de “detección en medio sólido” de este capítulo, así como la posterior incubación de las placas a distintas temperaturas (estufa P-Selecta®).

En cambio, si la recuperación resultó en medio líquido, esos matraces se mantuvieron durante el tiempo necesario en incubación y en agitación a 70 r.p.m. (SANYO Gallenkamp™). Posteriormente y según requerimientos de la investigación, el caldo fue “pulsado” con 0,5% de extracto de levadura (Oxoid™) o 0,5% de proteosa peptona (ver el apartado “Anexos”).

Además, para la realización de las diferentes comprobaciones de crecimiento bacteriano en los experimentos de preservación de cepas, se mantuvieron tres líneas de sistemas bimembres BALO-presa en incubación durante 3 días en medio sintético M9 (ver el apartado “Anexos”) a 30°C y a 70 r.p.m. (SANYO Gallenkamp™). Una línea solo

contuvo al sistema bimembre en dicho medio sintético, a otra se le adicionó 0,5% de concentración de glucosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) y una última se le añadió glicerol ( $C_3H_8O_3$ ) al 0,5%. El proceso de recuperación de BALOs tras su mantenimiento a largo plazo también se mostrará en el apartado “Resultados” de este capítulo.

### III-3.7. MICROSCOPIA

Para efectuar los controles visuales de las lisis y proliferaciones de BALOs en medio líquido, se empleó el microscopio óptico. Dicha microscopía óptica fue llevada a cabo por medio del microscopio óptico en contraste de fase, de campo claro y de campo oscuro. Los microscopios ópticos (Olympus™ BH2 o BX53) estuvieron provistos de cámara de vídeo y captación de imagen (Olympus™ DP72).

### III-3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de este trabajo se encuentran expresados como media +/- desviación estándar. El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado con el programa informático GraphPad Prism 5<sup>®</sup>, realizando el análisis *t de Student* para la comparación entre dos grupos, el ANOVA de una vía para la comparación entre tres o más grupos de datos y el ANOVA de dos vías para dos o más variables con una de intervalo. En todos los casos, los resultados se consideraron como significativos a partir de un valor de  $p < 0,05$ .

## III-4. RESULTADOS

### III-4.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE DETECCIÓN DE BALOs SILVESTRES DE AGUA DULCE Y SU ESPECTRO DE PARASITISMO

#### III-4.1.1. Detección de BALOs sin filtración previa

##### III-4.1.1.1. BALOs detectados en medio rico

Del estudio de la detección de bacterias del grupo BALOs sin efectuar filtración alguna sobre la muestra y empleando medio NB, se obtuvieron los siguientes resultados:

La detección realizada usando *E. coli* K-12, *E. coli* 101, *E. coli* C, *E. coli* Q-13, *K. pneumoniae* AA100, *S. typhimurium* LT2 y *P. aeruginosa* como bacterias presa resultó nula en cualquier caso. Como se observa en Figura 20, en las placas, tras su incubación, existía demasiada carga bacteriana que no resultaban objeto de estudio y no fue posible diferenciar claramente alguna región lítica propia de BALOs.

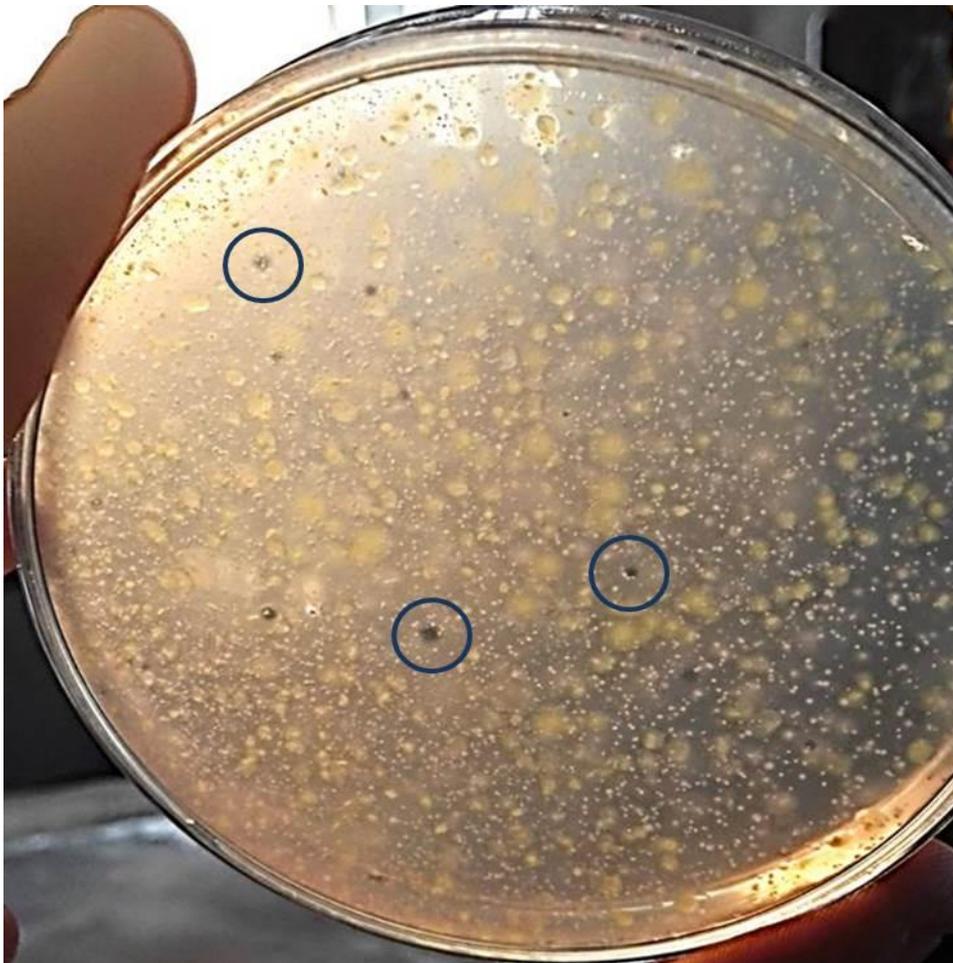


**Fig. 20.** Aspecto de la placa para la detección de BALOs MuRa1a correspondiente al 3<sup>er</sup> día de incubación, utilizando un medio NB y sin filtración alguna de la muestra.

### III-4.1.1.2. BALOs detectados en medio pobre

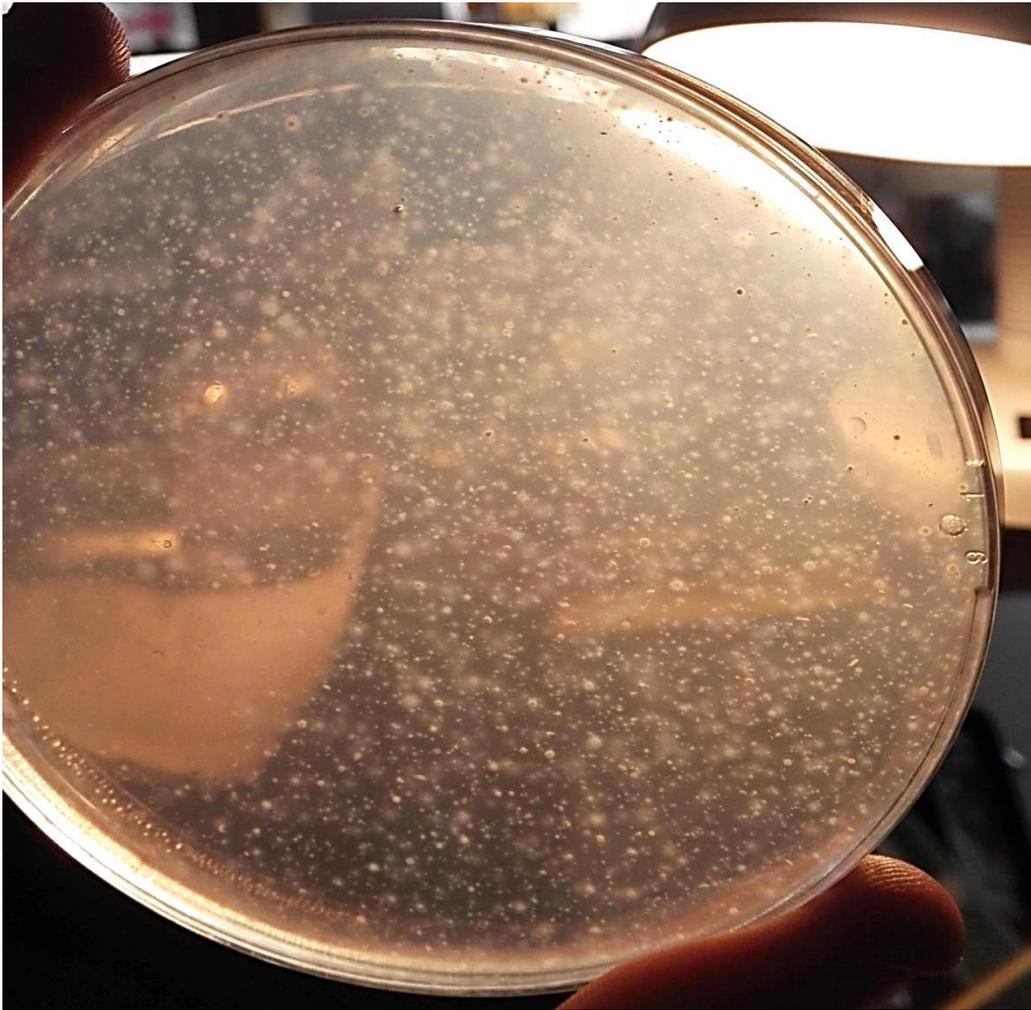
Ante los resultados anteriormente mostrados, se optó por emplear placas con una riqueza menor (NB-10) con objeto de mejorar la detección de BALOs y que esta pudiera llevarse a cabo sin tanta presencia de colonias bacterianas no deseadas.

En esas condiciones, la cantidad presente de bacterias que no eran objetivo fue similar y sólo se observaron unas pequeñas regiones líticas aisladas de MuRa1a que no presentaron la nitidez ni el tamaño propios de las regiones líticas típicas de BALOs (Figura 21).



**Fig. 21.** Detalle de la placa empleada en la detección de BALOs MuRa1a, al 3<sup>er</sup> día de incubación, utilizando medio NB-10 y sin filtración alguna. Se observaron algunas zonas de lisis aisladas y de pequeño tamaño (círculos azules).

Al aumentar la temperatura, los resultados para la detección del BALO MuRa2b volvieron a ser muy poco significativos (Figura 22) observándose, en todo caso, colonias bacterianas ajenas al estudio.

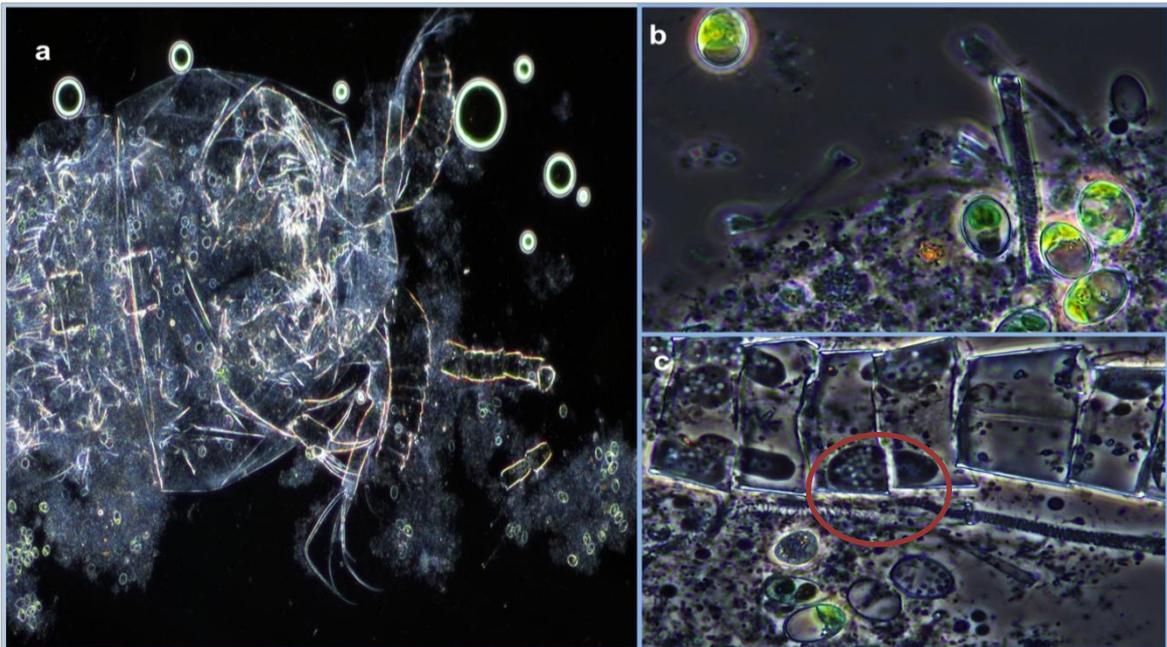


**Fig. 22.** Aspecto de la placa para la detección de BALOs MuRa2b correspondiente al 3<sup>er</sup> día de incubación, utilizando medio NB-10 y sin filtración previa.

Por otro lado, al microscopio se observó que en el agua de donde se pretendió detectar BALOs presentaba gran cantidad de comunidades bacterianas procariotas y eucariotas. En dichas muestras de agua, organismos como amebas (Figura 23) u otras estructuras procedentes del microcosmos presente en la E.D.A.R. (Figura 24) fueron fácilmente observables.



**Fig. 23.** Diversidad microbiana observada en la muestra de agua obtenida de la fase de pretratamiento del E.D.A.R. Observaciones realizadas en contraste de fase. Objetivo de 40x.



**Fig. 24.** Observaciones realizadas en la muestra de agua obtenida de la fase de pretratamiento del E.D.A.R. **a)** Acumulación bacteriana constituyendo un biofilm. **b)** Presencia de bacterias procariotas y eucariotas y **c)** Presencia de amebas dentro de estructuras más grandes (círculo rojo). Observaciones realizadas en contraste de fase. Objetivo de 40x.

### III-4.1.2. Detección de BALOs tras filtración por 1,2 $\mu$ m

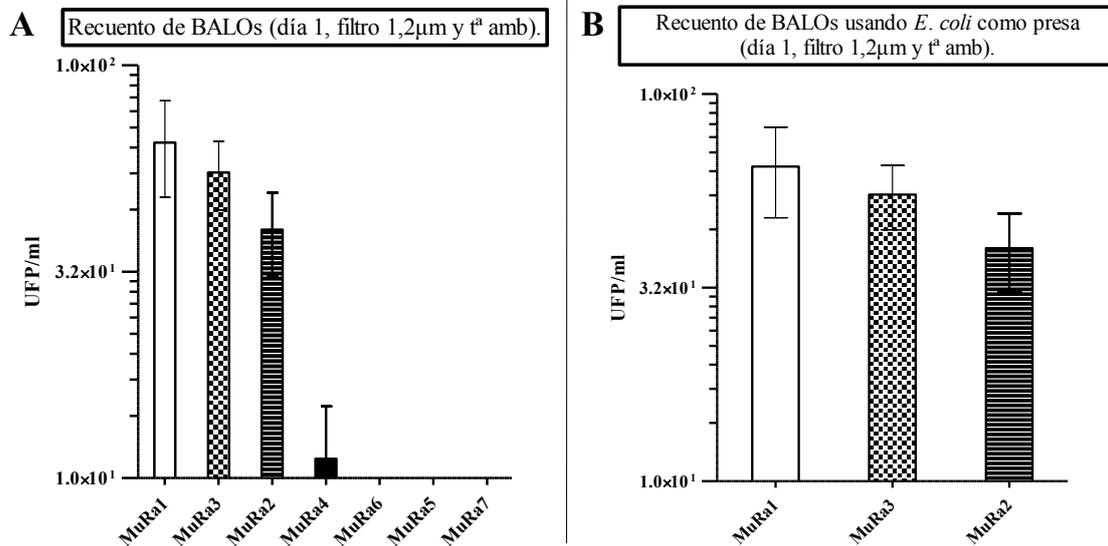
Tras la imposibilidad de una detección efectiva de BALOs en cualquiera de las condiciones anteriores, se procedió a su detección en placas con medio más pobre en nutrientes como el NB-10 y tras una filtración previa de la muestra por un filtro de 1,2 $\mu$ m de tamaño de poro. Los resultados del estudio fueron los siguientes:

#### III-4.1.2.1. Detección en placa tras incubación a temperatura ambiente

##### III-4.1.2.1.1. Recuento diario

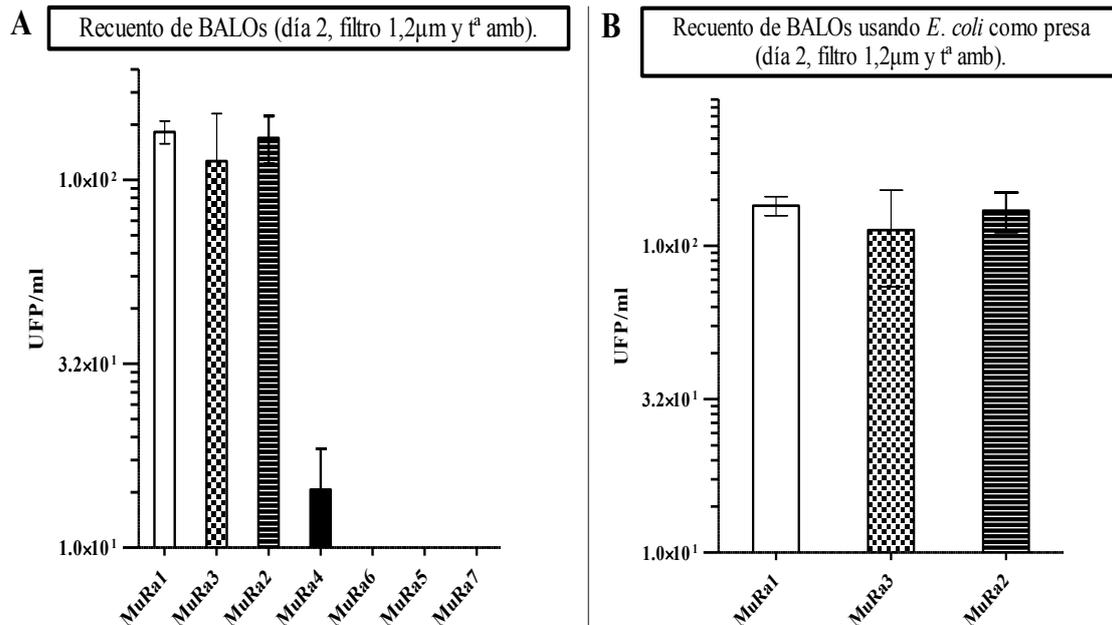
Tras la incubación de BALOs a temperatura ambiente y con las muestras previamente filtradas, se pudieron observar regiones líticas pertenecientes a BALOs:

Al primer día de incubación, la cantidad media obtenida del BALO MuRa1 fue de  $6,55 \times 10^1$  UFP/ml;  $4,01 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa2 y  $5,52 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa3. En el resto de cepas, la cantidad detectada fue muy inferior:  $1,11 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4; 6,75 UFP/ml para la cepa MuRa5; 1,67 UFP/ml para la cepa MuRa6 y 1,92 UFP/ml para la cepa MuRa7 (Figura 25).



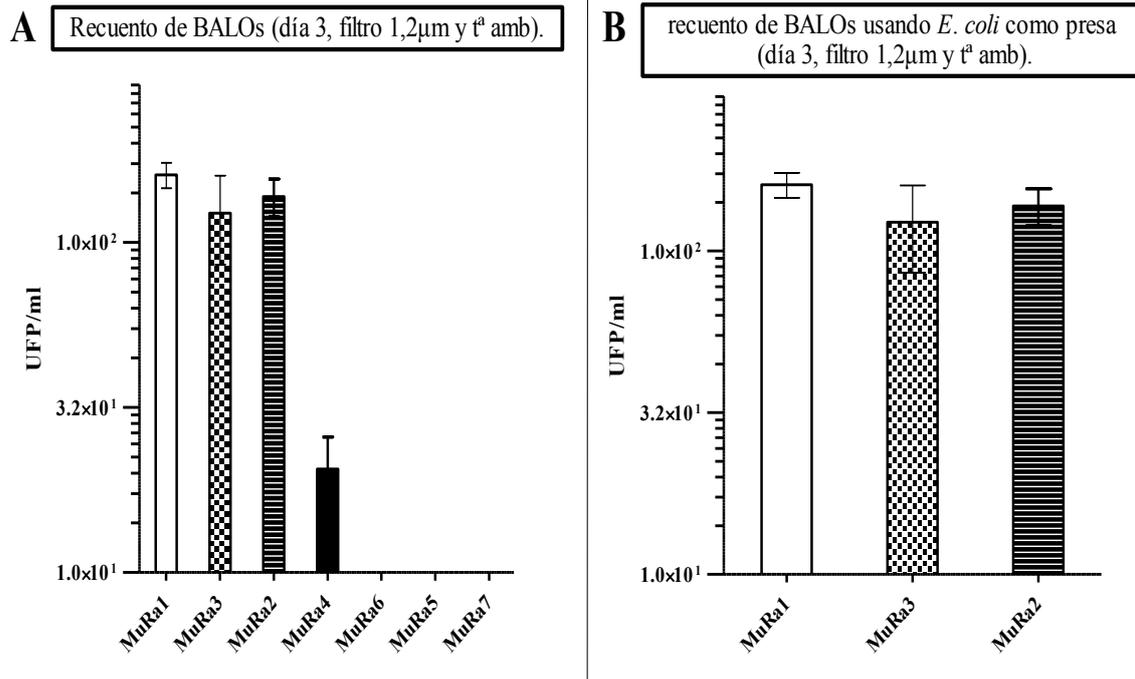
**Fig. 25.** **A)** Cantidad de BALOs detectada tras el primer día de incubación a temperatura ambiente y tras una filtración por 1,2 $\mu$ m de la muestra. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de las cepas MuRa1, MuRa2 y MuRa3, cepas que se detectaron en mayor cantidad. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Al segundo día de incubación, la cantidad media obtenida aumentó hasta situarse en  $1,35 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa de BALO MuRa1;  $1,33 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2 y  $1,12 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa3. La cantidad detectada en el resto de cepas volvió a ser muy baja con respecto a las anteriores:  $1,44 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4; 6,08 UFP/ml para la cepa MuRa5; 1,77 UFP/ml para la cepa MuRa6 y 2,13 UFP/ml para la cepa MuRa7 (Figura 26).

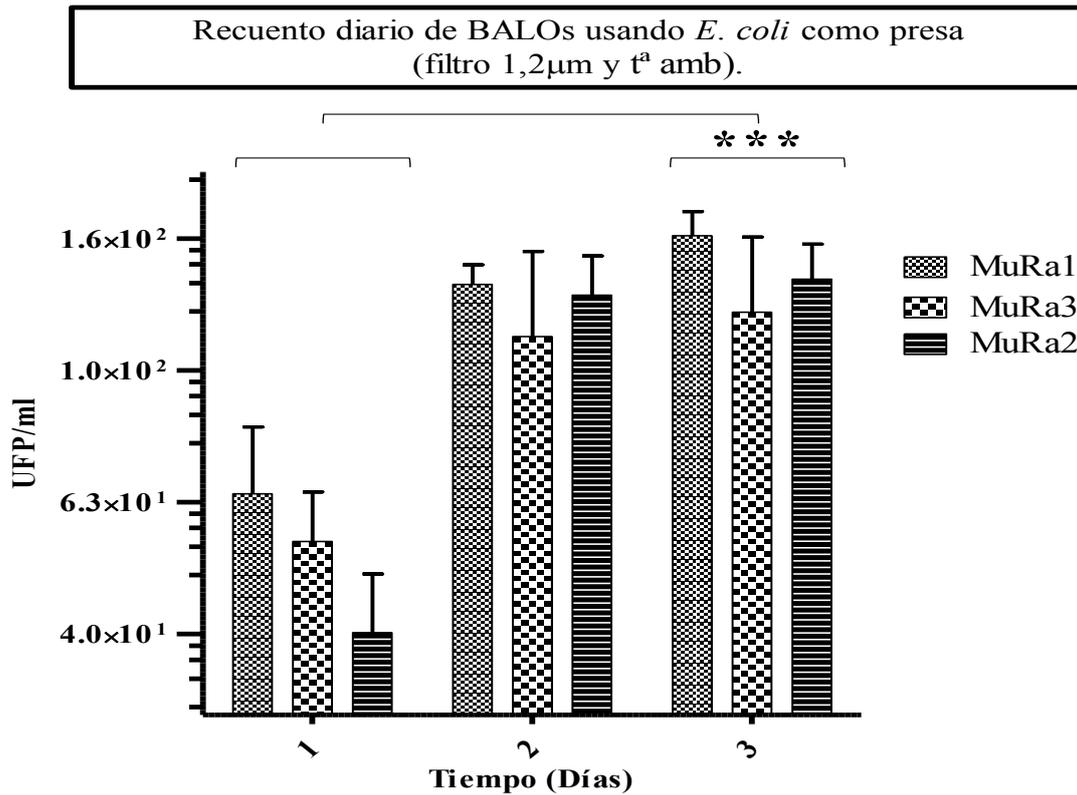


**Fig. 26.** A) Cantidad de BALOs detectada tras el segundo día de incubación a temperatura ambiente y tras una filtración por 1,2μm de la muestra de agua. B) Detalle de las mayores detecciones de BALOs obtenidas en esas condiciones. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Al tercer día de incubación, la cantidad media ofrecida fue similar, obteniéndose  $1,66 \times 10^2$  UFP/ml en BALO MuRa1;  $1,38 \times 10^2$  UFP/ml en la cepa MuRa2 y  $1,23 \times 10^2$  UFP/ml en la cepa MuRa3. La cantidad de las cepas siguientes continuaron siendo mucho más bajas que las anteriores cepas indicadas:  $2,06 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4; 7,76 UFP/ml para la cepa MuRa5; 2,71 UFP/ml para la cepa MuRa6 y 1,63 UFP/ml para la cepa MuRa7 (Figura 27).



**Fig. 27. A)** Cantidad de BALOs detectada tras el tercer día de incubación a temperatura ambiente y tras una filtración por 1,2µm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos más altos de detección (cepas MuRa1, MuRa2 y MuRa3). Datos representados: medias +/- desviación estándar.



**Fig. 28.** Cantidad de BALOs MuRa1, MuRa2 y MuRa3 detectada utilizando previamente un filtro de 1,2 $\mu$ m de tamaño de poro sobre la muestra de agua.  $p < 0,001$ \*\*\*: el aumento fue significativo en la detección de cualquier cepa de BALOs en el tercer día de incubación con respecto al primer día. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### III-4.1.2.1.2. Comparación de recuentos a temperatura ambiente

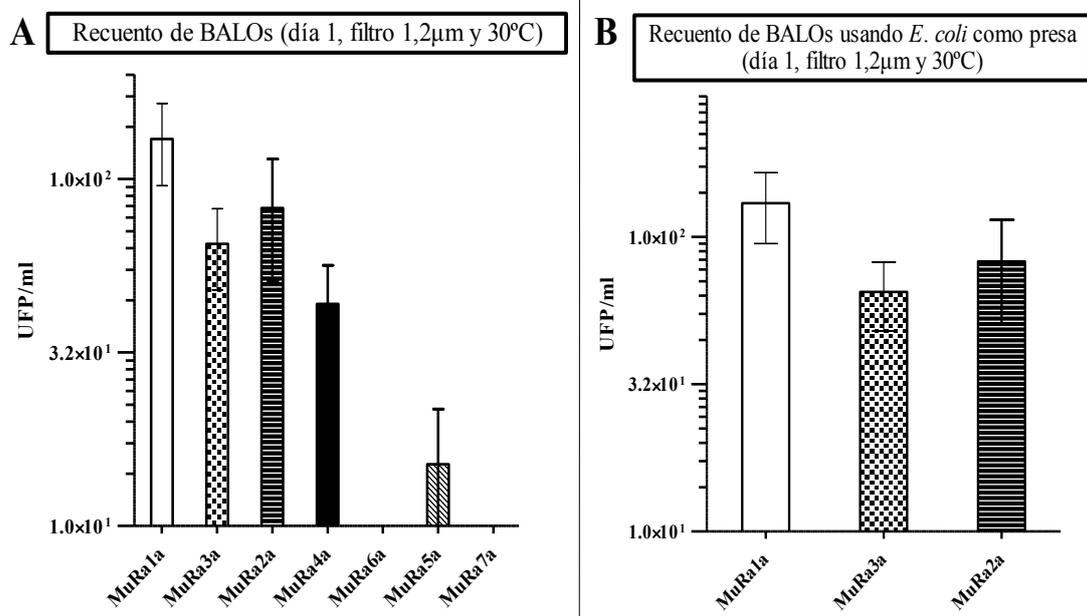
En la comparación con los resultados obtenidos en BALOs detectados con diferentes especies de *E. coli*, es decir, en las cepas de BALOs MuRa1, MuRa2 y MuRa3 (donde la detección de BALOs resultó más alta), se observó que al segundo y al tercer día de incubación las cantidades detectadas fueron superiores a las del primer día (Figura 28).

#### III-4.1.2.2. Detección en placa tras incubación a 30°C

Tras la incubación de BALOs a 30°C y con las muestras previamente filtradas, se consiguió detectar una mayor cantidad de BALOs que en las condiciones anteriormente descritas.

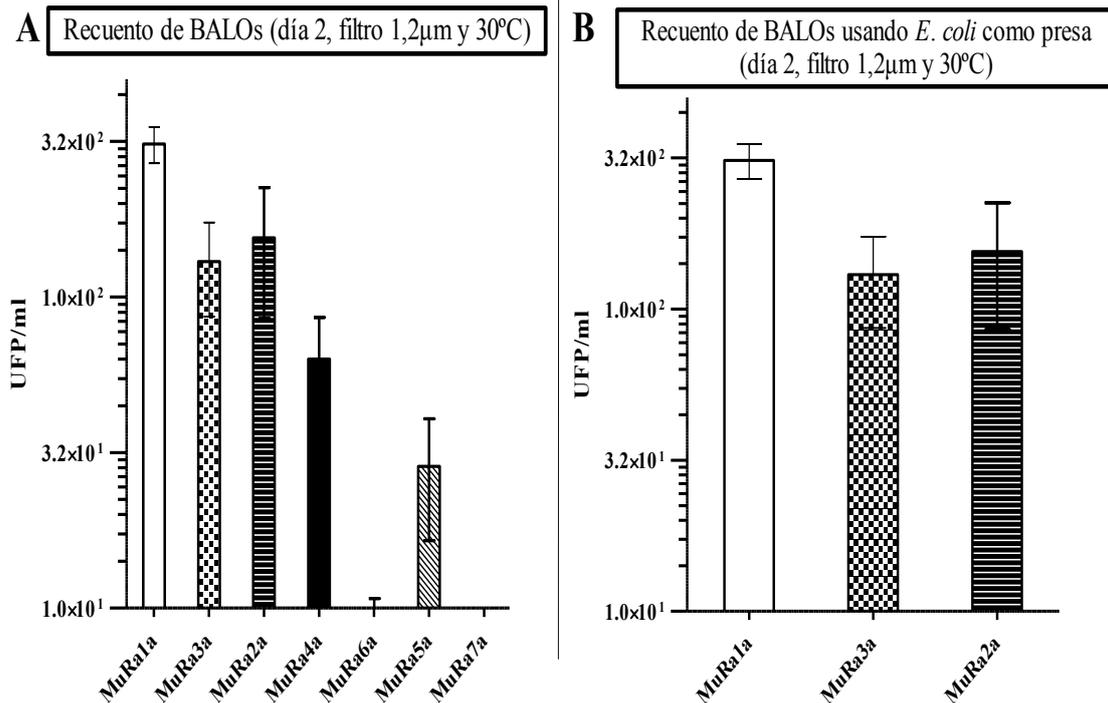
III-4.1.2.2.1. Recuento diario

Tras el primer día de incubación, se encontró una cantidad media de  $1,31 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa1a;  $8,25 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa2a y  $6,52 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa3a. En este ensayo, la cepa de BALO MuRa4a mostró una mayor detección que a menor temperatura:  $4,36 \times 10^1$  UFP/ml. El resto de cepas de BALOs continuaron mostrando cantidades muy inferiores al resto de cepas:  $1,51 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa5a;  $1,67 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa6a y  $1,93$  UFP/ml para la cepa MuRa7a (Figura 29).



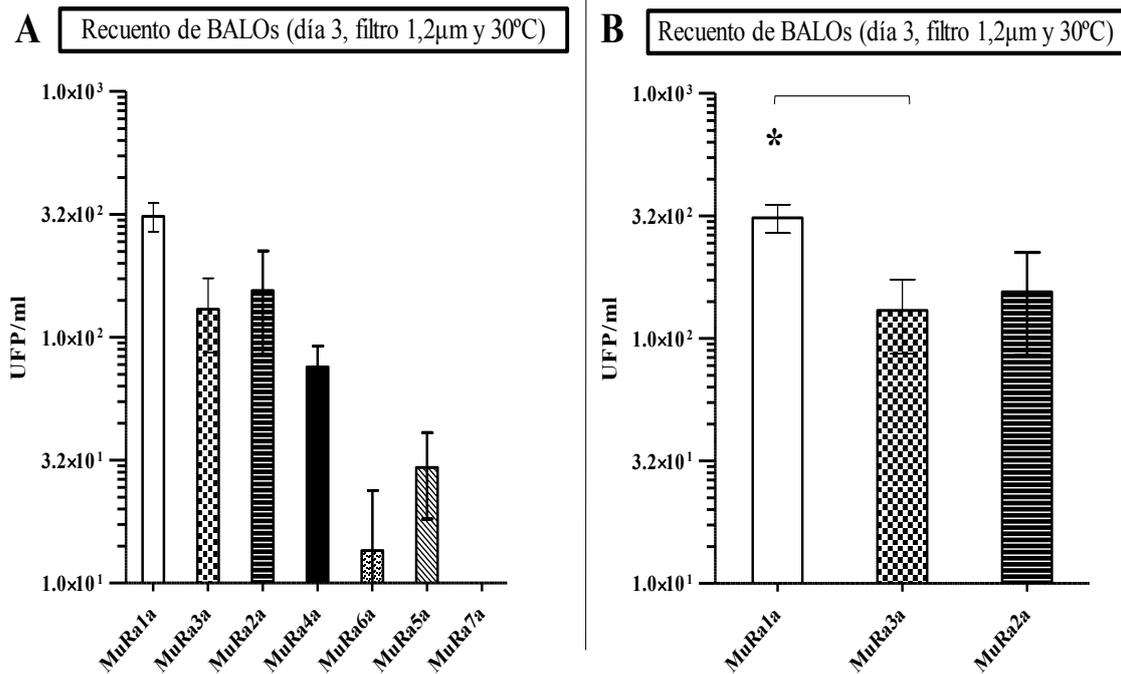
**Fig. 29.** **A)** Cantidad de BALOs detectada tras el primer día de incubación a 30°C y tras una filtración por 1,2 $\mu$ m de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa 1a, MuRa2a y MuRa3a. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Tras el segundo día de incubación, las cepas de BALOs MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a mostraron cantidades similares: de media, se obtuvo  $3,11 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa1a;  $1,55 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2a;  $1,30 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa3a y  $6,32 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4a. El resto de cepas mostraron, igualmente, cantidades muy inferiores:  $2,85 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa5a;  $7,80 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa6a y  $1,83$  UFP/ml para la cepa MuRa7a (Figura 30).



**Fig. 30.** **A)** Cantidad de BALOs detectada tras el segundo día de incubación a 30°C y tras una filtración por 1,2µm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

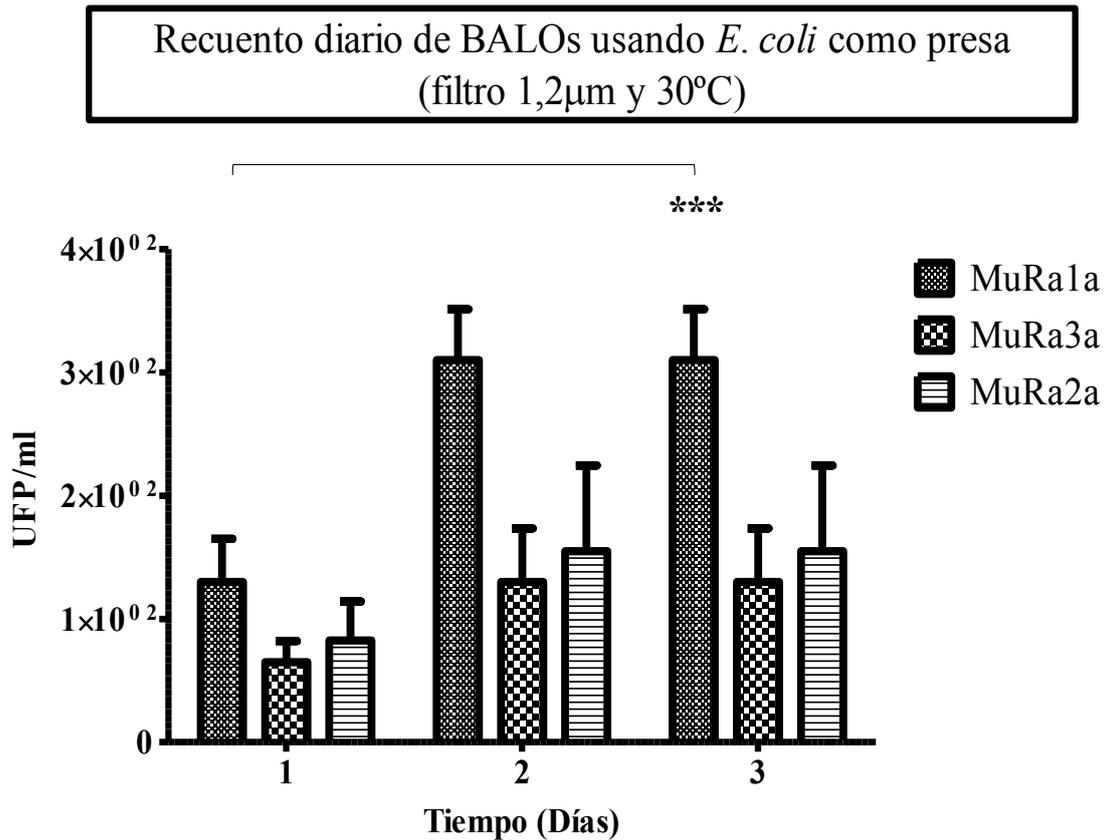
Al tercer día de incubación, las cepas de BALOs MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a ofrecieron también resultados similares a los mostrados para el día anterior. Las cantidades de BALOs detectadas tras el tercer día de incubación, fueron, de media:  $3,10 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa1a;  $1,76 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2a;  $1,42 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa3a y  $7,56 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4a. El resto de cepas mostró un amento en la detección, pero aún continuaban mostrando menos cantidad que las anteriores:  $2,96 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa5a;  $1,35 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa6a y  $2,48$  UFP/ml para la cepa MuRa7a (Figura 31).



**Fig. 31. A)** Cantidad de BALOs detectada tras el tercer día de incubación a 30°C y tras una filtración por 1,2µm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a;  $p < 0,05^*$ : el aumento fue significativo en la detección de BALOs MuRa1a con respecto a MuRa3a. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

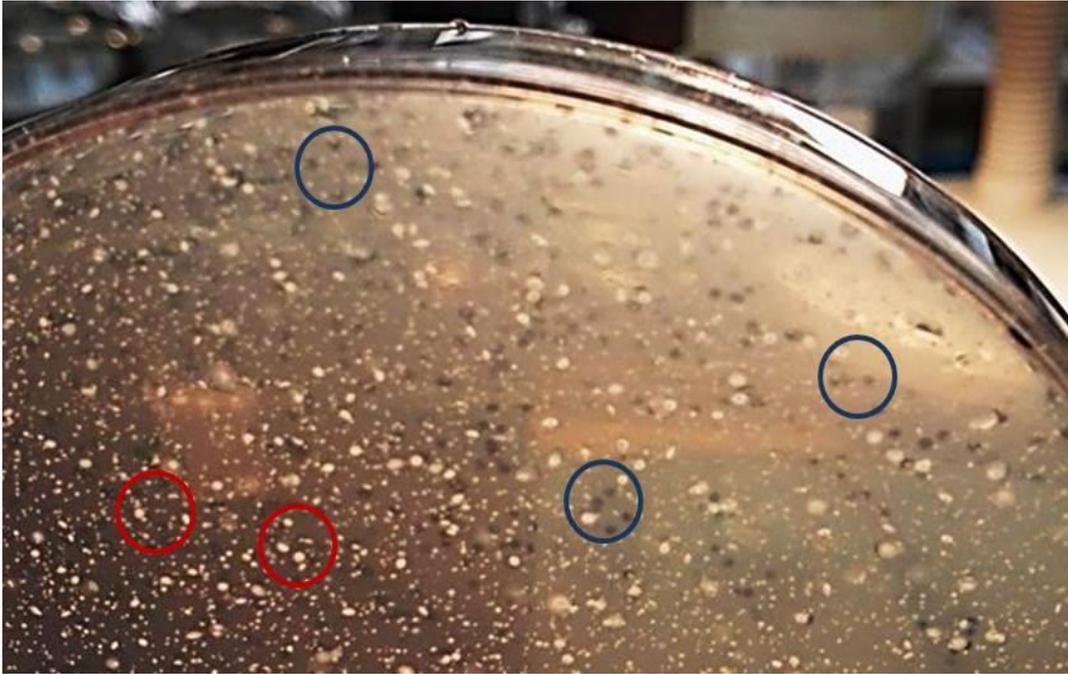
#### III-4.1.2.2.2. Comparación de recuentos a 30°C

Como ocurriera en la incubación efectuada a menor temperatura, MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a también mostraron cantidades superiores durante al segundo y tercer día de incubación que las mostradas tras el primer día (Figura 32).



**Fig. 32.** Cantidad de BALOs MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a detectada utilizando previamente un filtro de 1,2 $\mu$ m de tamaño de poro sobre la muestra de agua;  $p < 0,001$ \*\*\*: el aumento fue significativo en la detección del BALO MuRa1a con respecto al detectado el primer día de incubación. Datos representados: medias  $\pm$  desviación estándar.

Aunque con estas nuevas condiciones de filtración y riqueza de nutrientes se consiguió rebajar la cantidad de colonias bacterianas presentes en placa y a pesar de que se pudo detectar BALOs por medio de las condiciones de filtración y temperatura descritas, las placas incubadas mostraron aún una gran cantidad de colonias bacterianas, las cuales consiguieron pasar por el filtro y se desarrollaron en placa coexistiendo con regiones líticas pertenecientes a BALOs (Figura 33).



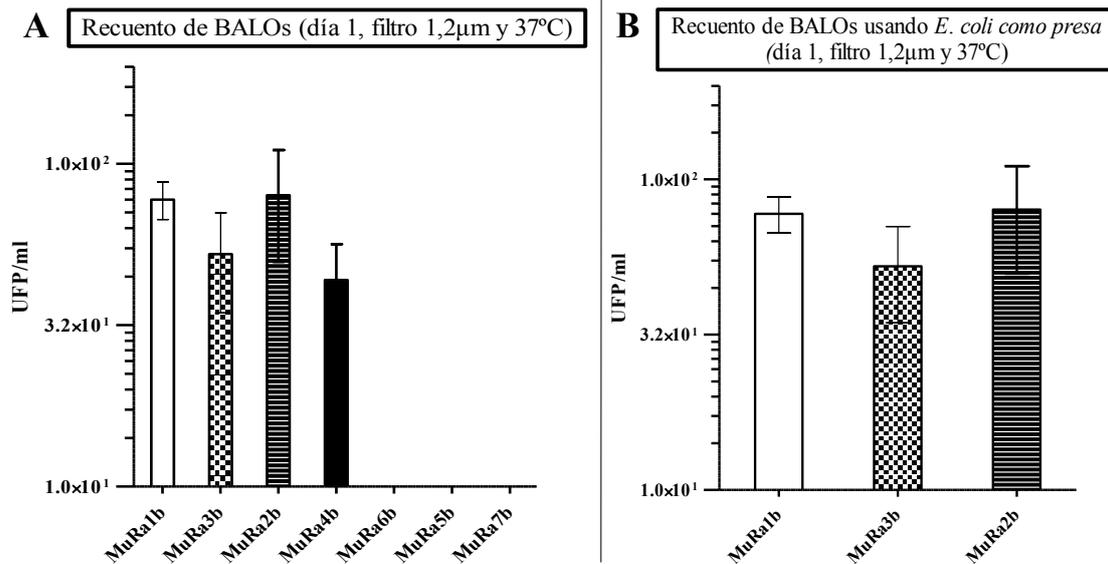
**Fig. 33.** Aspecto de la placa de una muestra de agua filtrada por  $1,2\mu\text{m}$  e incubada a  $30^\circ\text{C}$ . Se observan pequeñas zonas líticas propias de BALOs (círculos azules), así como colonias bacterianas que no son objetivo (círculos rojos).

#### III-4.1.2.3. Detección en placa tras incubación a $37^\circ\text{C}$

Tras aumentar, de nuevo, la temperatura de incubación, también se observaron cepas de BALOs en las placas de revelado.

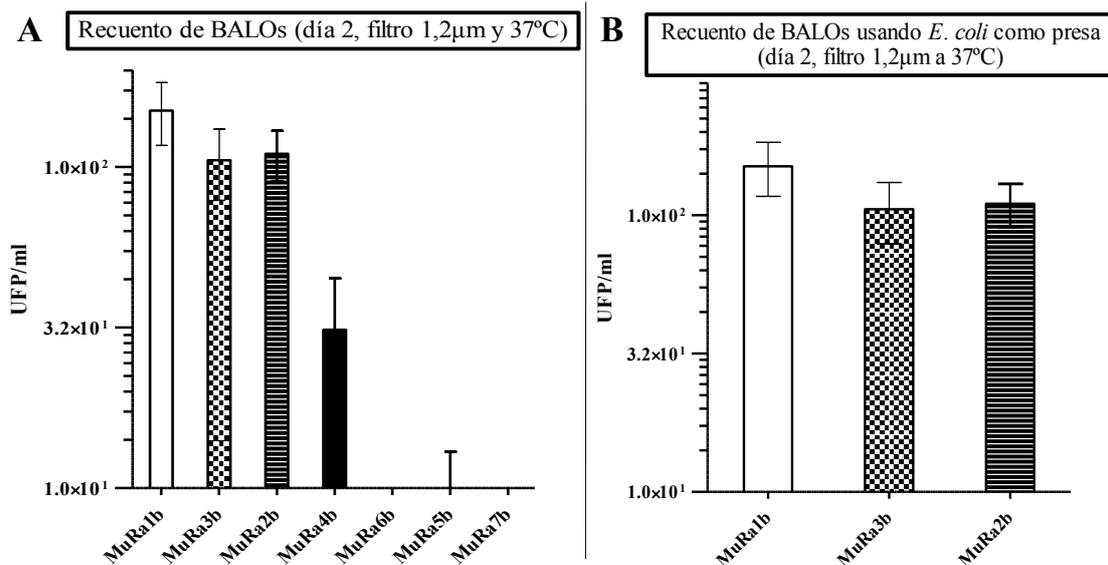
##### III-4.1.2.3.1. Recuento diario

Las cepas de BALOs incubadas esta vez a  $37^\circ\text{C}$  y con las muestras previamente filtradas, mostraron, tras el primer día de incubación, una cantidad media de  $7,76 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa1b;  $8,01 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2b y  $5,26 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa3b. Nuevamente, las cepas de BALOs MuRa4b, MuRa5b, MuRa6b y MuRa7b fueron detectadas en cantidades inferiores:  $4,37 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4b; 6,26 UFP/ml para la cepa MuRa5b; 1,88 UFP/ml para la cepa MuRa6b y 1,98 UFP/ml para la cepa MuRa7b (Figura 34).



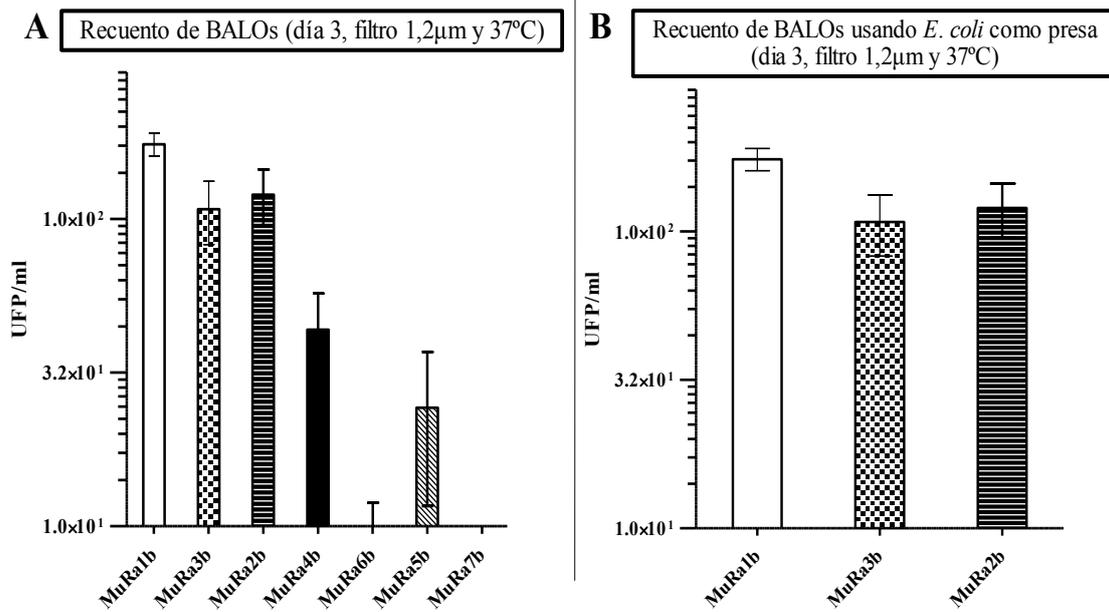
**Fig. 34. A)** Cantidad de BALOs detectada tras el primer día de incubación a 37°C y tras una filtración por 1,2µm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de BALOs MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Tras el segundo día de incubación, la detección de BALOs se mantuvo similar para todas sus cepas. 1,55x10<sup>2</sup> UFP/ml para la cepa MuRa1b; 1,15x10<sup>2</sup> UFP/ml para la cepa MuRa2b; 1,06x10<sup>2</sup> UFP/ml para la cepa MuRa3b; 3,12x10<sup>1</sup> UFP/ml para la cepa MuRa4b; 8,83 UFP/ml para la cepa MuRa5b; 1,69 UFP/ml para la cepa MuRa6b y 1,92 UFP/ml para la cepa MuRa7b (Figura 35).



**Fig. 35. A)** Cantidad de BALOs detectada tras el segundo día de incubación a 37°C y tras una filtración por 1,2µm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a las cepas con las detecciones más altas. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

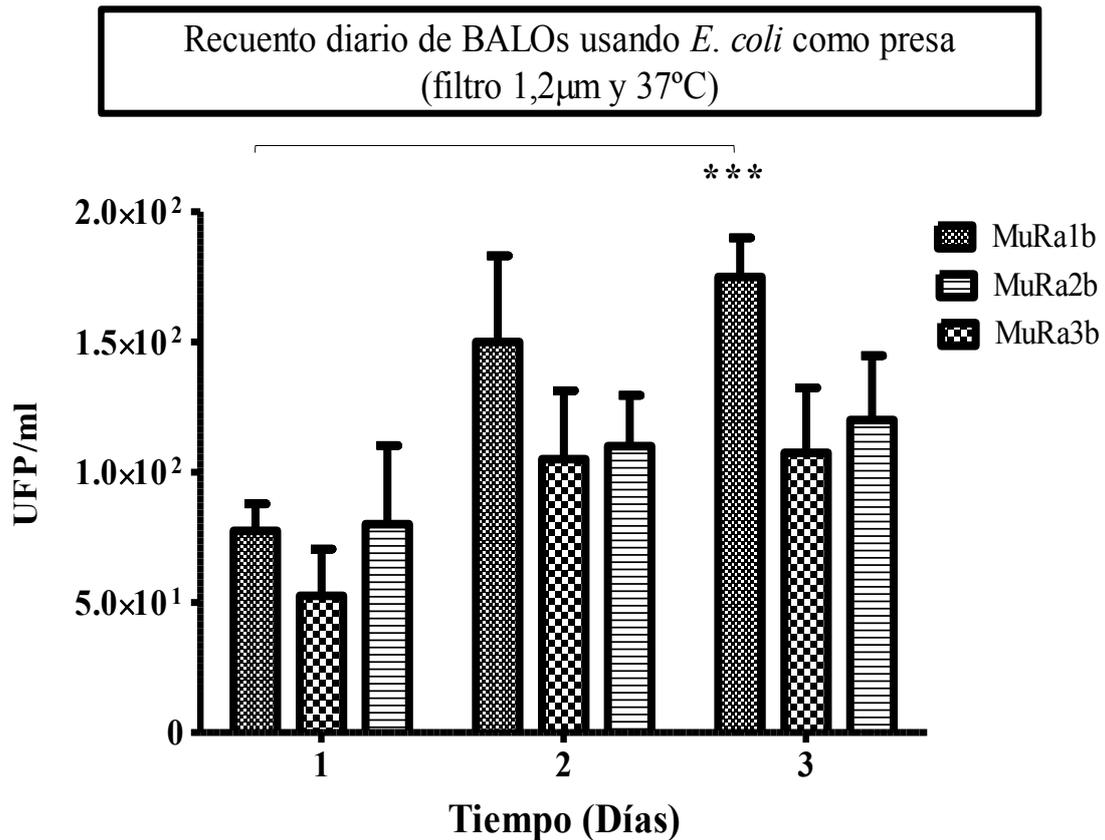
Por último, las cepas mostraron tras el tercer día de incubación una cantidad media de  $1,75 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa1b;  $1,22 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2b;  $1,08 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa3b;  $4,37 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4b;  $2,43 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa5b; 8,28 UFP/ml para la cepa MuRa6b y 2,12 UFP/ml para la cepa MuRa7b. Como se puede observar en la Figura 36 la cantidad de MuRa5b detectada fue muy superior a lo mostrado los días previos.



**Fig. 36.** A) Cantidad de BALOs detectada tras el tercer día de incubación a 37°C y tras una filtración por 1,2µm de sobre la muestra de agua. B) Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de BALOs MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b (los más abundantes). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### III-4.1.2.3.2. Comparación de recuentos a 37°C

Como se observa en la Figura 37, las cepas de BALOs MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b mostraron valores similares al segundo y al tercer día de incubación, pero en ambos días fueron detectados en mayor medida que al primer día.



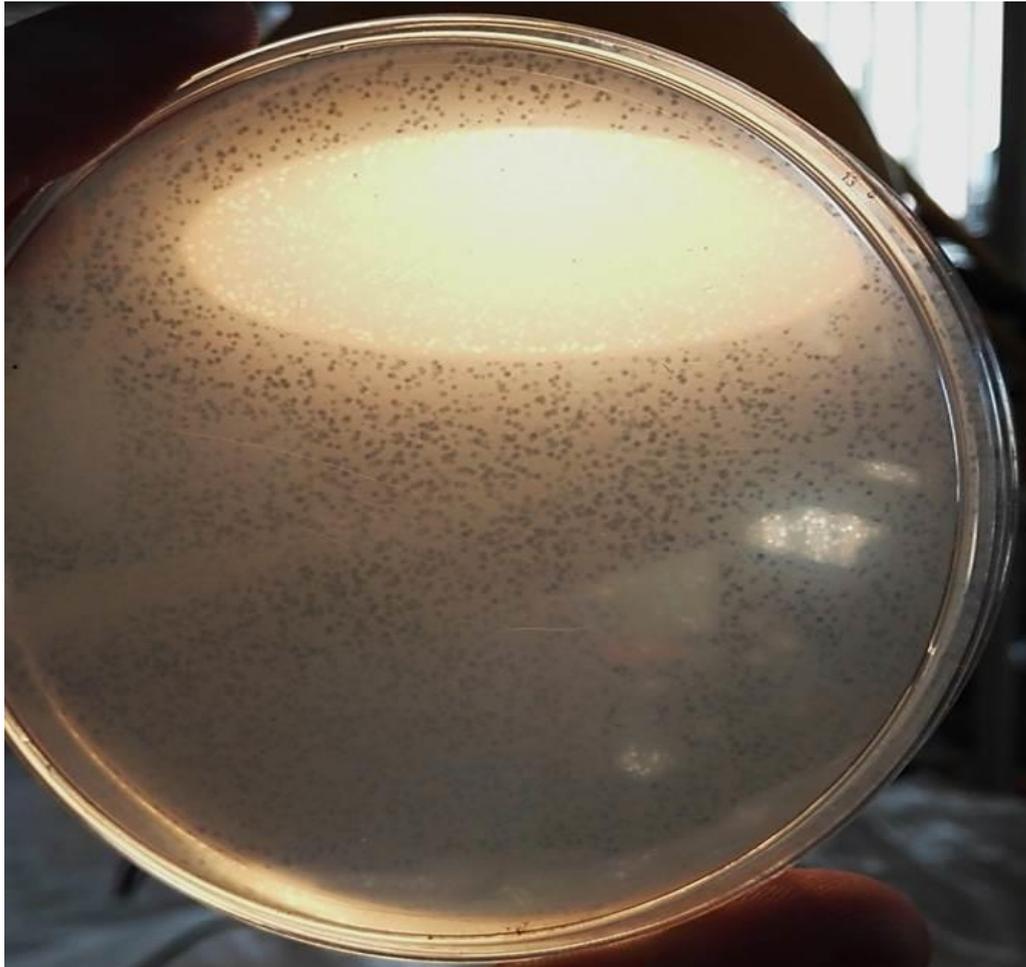
**Fig. 37.** Cantidad de BALOs MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b detectada utilizando previamente un filtro de 1,2 $\mu$ m de tamaño de poro sobre la muestra de agua.  $p < 0,001$ \*\*\*: el aumento en la detección del BALO MuRa1b fue significativo con respecto al primer día de incubación. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### III-4.1.3. Detección de BALOs tras filtración por 0,45 $\mu$ m

Como se ha indicado, en el estudio de la detección de las distintas cepas de BALOs detectados con el medio NB-10 y el tamaño de poro anterior (1,2 $\mu$ m), existió una gran cantidad de bacterias no objetivo en las placas de revelado y las zonas líticas producidas por BALOs fueron poco importantes. De modo que se llevó a cabo un estudio optando por reducir el tamaño de poro para la filtración de la muestra a 0,45 $\mu$ m para así reducir aún más la presencia de bacterias que interfirieran en la propia detección de BALOs en placa. El estudio se llevó a cabo incubando las muestras a las mismas temperaturas que en los estudios anteriores y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

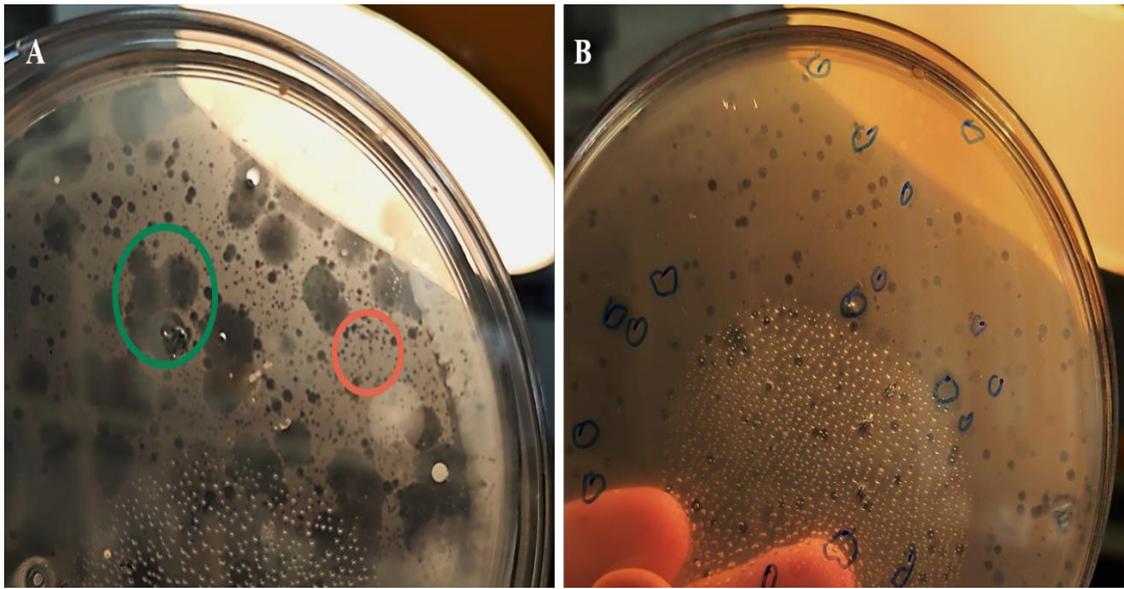
### III-4.1.3.1. Detección en placa tras incubación a temperatura ambiente

Las placas resultantes tras su incubación a temperatura ambiente y tras la filtración del agua de muestra por  $0,45\mu\text{m}$  mostraron un aspecto casi desprovisto de colonias bacterianas ajenas al estudio, mostrando, como se puede observar en la Figura 38, solamente las regiones líticas propias de BALOs.



**Fig. 38.** Detalle del 3<sup>er</sup> día de incubación de una placa de revelado de BALOs MuRa2 utilizando un medio NB-10 y tras una filtración de  $0,45\mu\text{m}$  de tamaño de poro sobre la muestra.

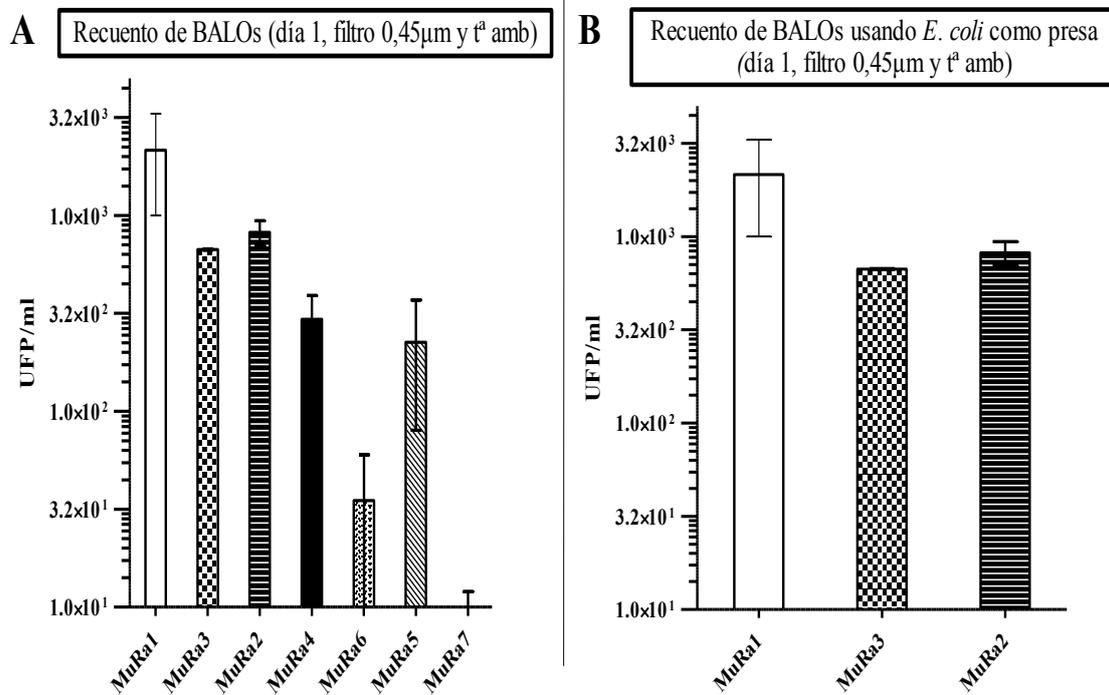
Sin embargo, a pesar de que en estas nuevas condiciones las placas presentaron un aspecto mucho más apto para la detección y recuento de BALOs, con frecuencia se detectaron regiones líticas producidas por bacteriófagos además de regiones líticas propias de BALOs como se observa en la Figura 39(A), lo cual, para este estudio tuvieron que ser marcadas todas las zonas líticas aparecidas durante las primeras 24 horas de incubación (Figura 39, B).



**Fig. 39. A)** Placa de medio NB-10 con la muestra filtrada por  $0,45\mu\text{m}$  de tamaño de poro con presencia de virus (círculo verde) además de la presencia de regiones líticas de BALOs MuRa4a (círculo rojo). **B)** Marcaje con tinta de las primeras regiones líticas (presumiblemente pertenecientes a virus) aparecidas tras las primeras 24h de incubación.

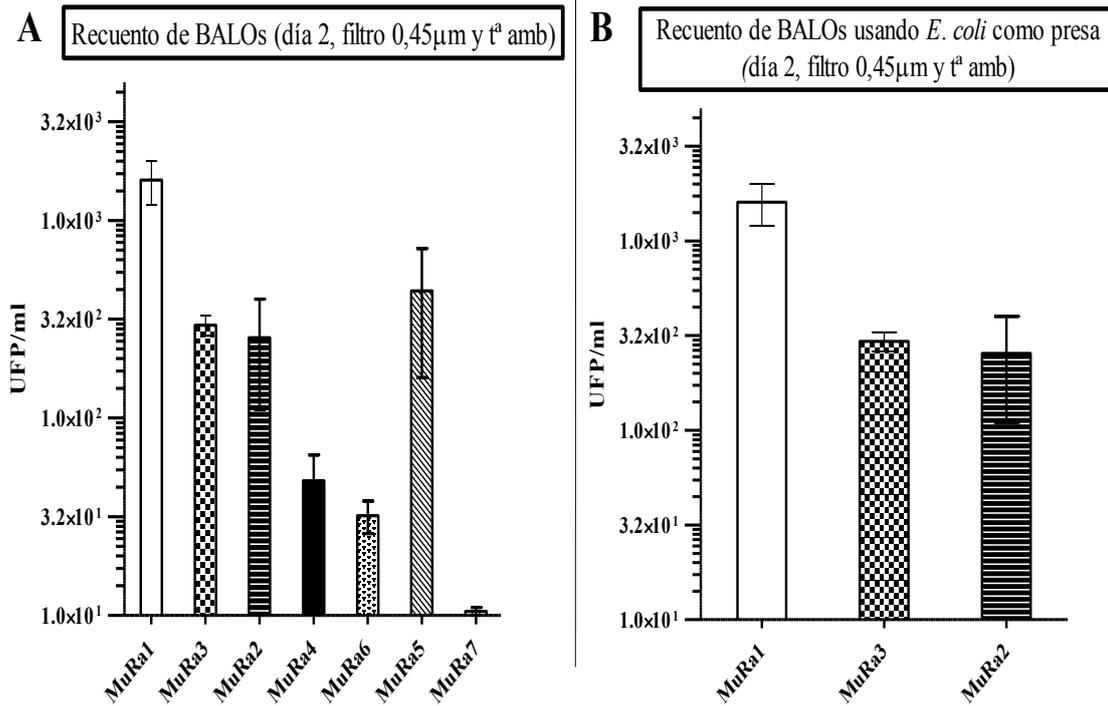
III-4.1.3.1.1. Recuento diario

Todas las cepas de BALOs de este estudio tuvieron una mayor presencia que en estudios anteriores, de modo que, centrándose en el primer día de incubación, la detección de BALOs a temperatura ambiente y con las muestras filtradas por  $0,45\mu\text{m}$ , dio como resultado una cantidad media de  $2,16 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa1;  $8,28 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2 y  $6,70 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa3. Las cepas restantes, si bien fueron detectadas en mayor medida que en las otras condiciones, volvieron ofrecer menos cantidad con respecto al resto de cepas de BALO como se puede observar en la Figura 40:  $2,96 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa4;  $2,25 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa5;  $3,53 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa6 y  $1,11 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa7.



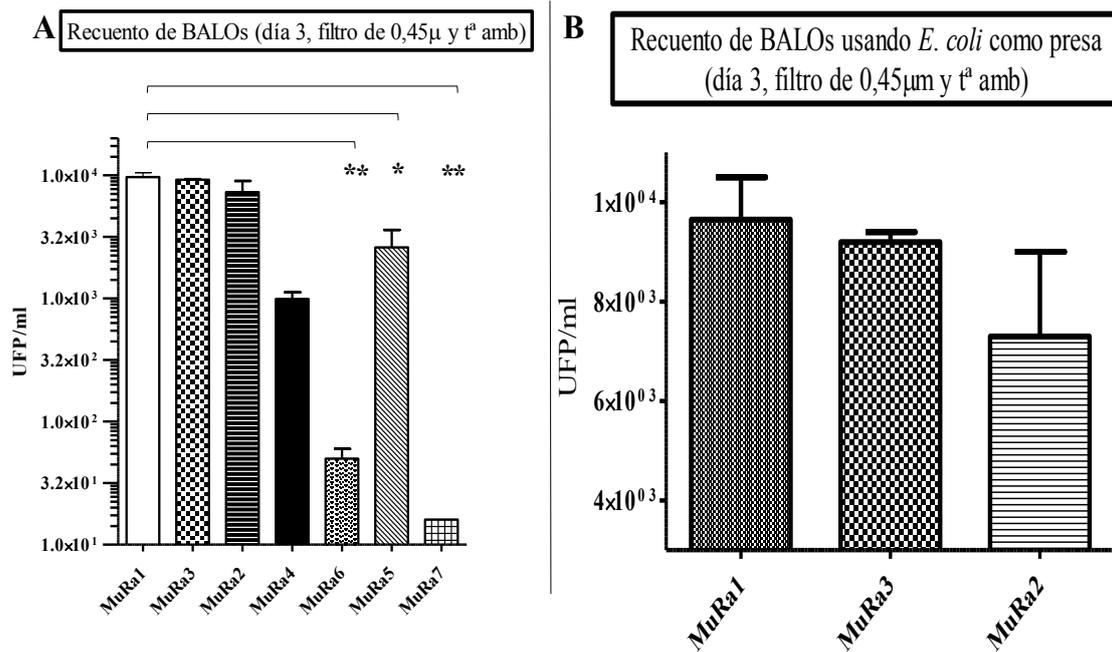
**Fig. 40.** **A)** Cantidad de BALOs detectada tras el primer día de incubación a temperatura ambiente y tras una filtración por  $0,45\mu\text{m}$  de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a las cepas de BALOs detectadas en mayores cantidades. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Al segundo día de incubación, la detección de BALOs mostró una tenencia a aumentar con respecto al día anterior: la cantidad detectada fue, de media:  $1,66 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa1;  $2,56 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2;  $2,96 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa3;  $4,86 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4;  $4,42 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa5;  $3,23 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa6 y  $1,06 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa7. Tal y como se puede observar en la Figura 41, la cepa MuRa5, durante el segundo día de incubación mostró un aumento en su detección.



**Fig. 41.** **A)** Cantidad de BALOs detectada tras el segundo día de incubación a temperatura ambiente y tras una filtración por 0,45µm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1, MuRa2 y MuRa3.  $p < 0,01^{**}$ : Las cantidades detectadas de BALOs MuRa1 fueron significativamente mayores con respecto al BALO MuRa3. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

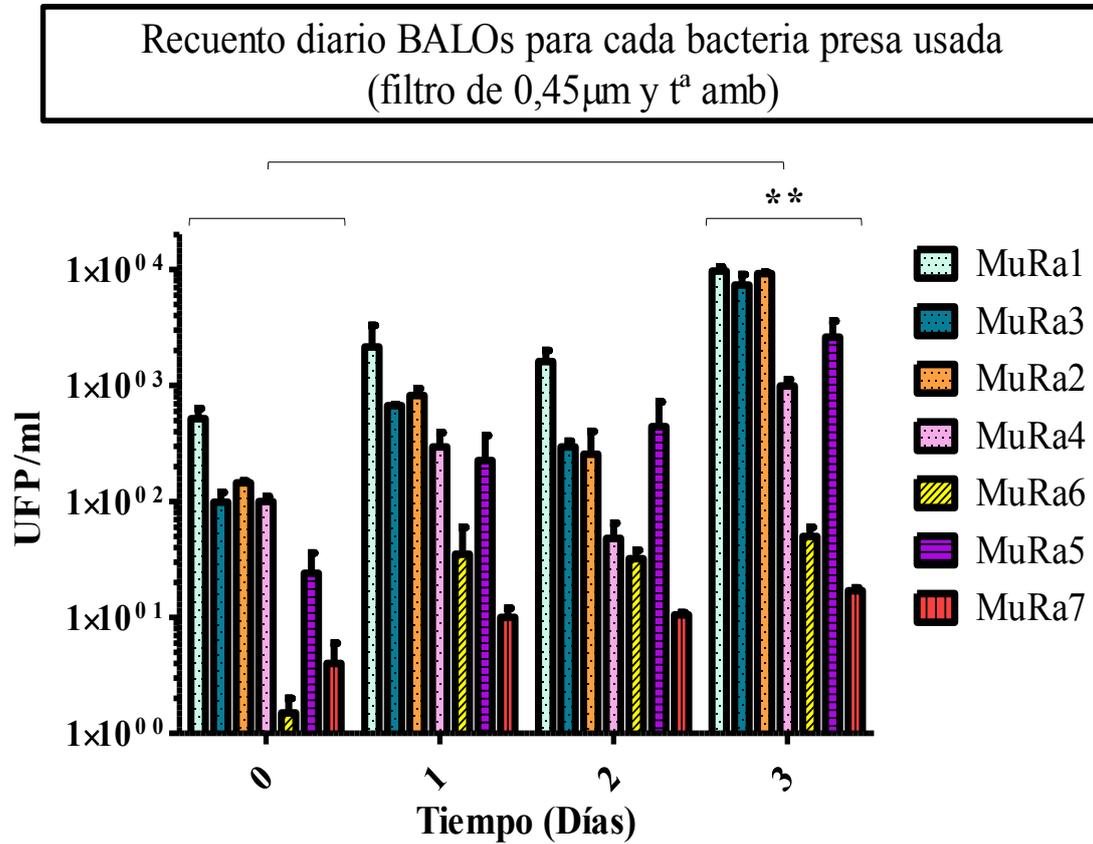
Por último, al tercer día de incubación, las cepas de BALOs MuRa1, MuRa2 y MuRa3 terminaron por mostrar cantidades muy similares. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 42, resultaron, de nuevo, superiores al resto de cepas del estudio. La detección de BALOs mostró una cantidad media de  $9,65 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa1;  $7,32 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa2;  $9,22 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa3;  $9,98 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa4;  $2,61 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa5;  $5,11 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa6 y  $1,61 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa7.



**Fig. 42.** **A)** Cantidad de BALOs detectada tras el tercer día de incubación a temperatura ambiente y tras una filtración por  $0,45\mu$ m de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1, MuRa2 y MuRa3.  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ : las cantidades de BALOs MuRa1 detectadas al tercer día de incubación fueron significativamente mayores que las de MuRa5, MuRa6 y MuRa7. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

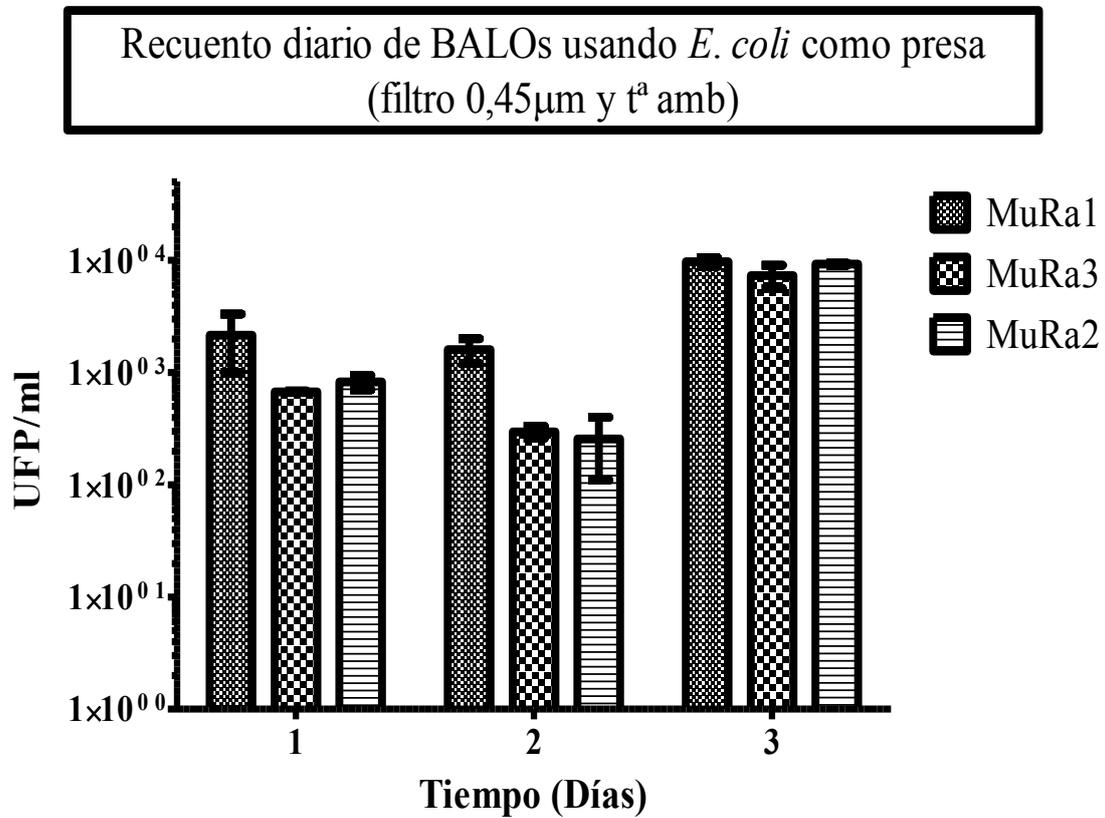
III-4.1.3.1.2. Comparación de recuentos a temperatura ambiente

Teniendo en cuenta todas las cepas, éstas fueron detectadas en mayor medida con el paso de los días como se puede observar en Figura 43.



**Fig. 43.** BALOs detectados día a día, incubados a temperatura ambiente y tras utilizar un filtro de 0,45µm, utilizando las diferentes bacterias hospedadoras: MuRa1, MuRa2, MuRa3, MuRa4, MuRa5, MuRa6 y MuRa7.  $p < 0,01^{**}$ : Las cantidades detectadas al tercer día de incubación fueron significativamente mayores que a tiempo 0. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

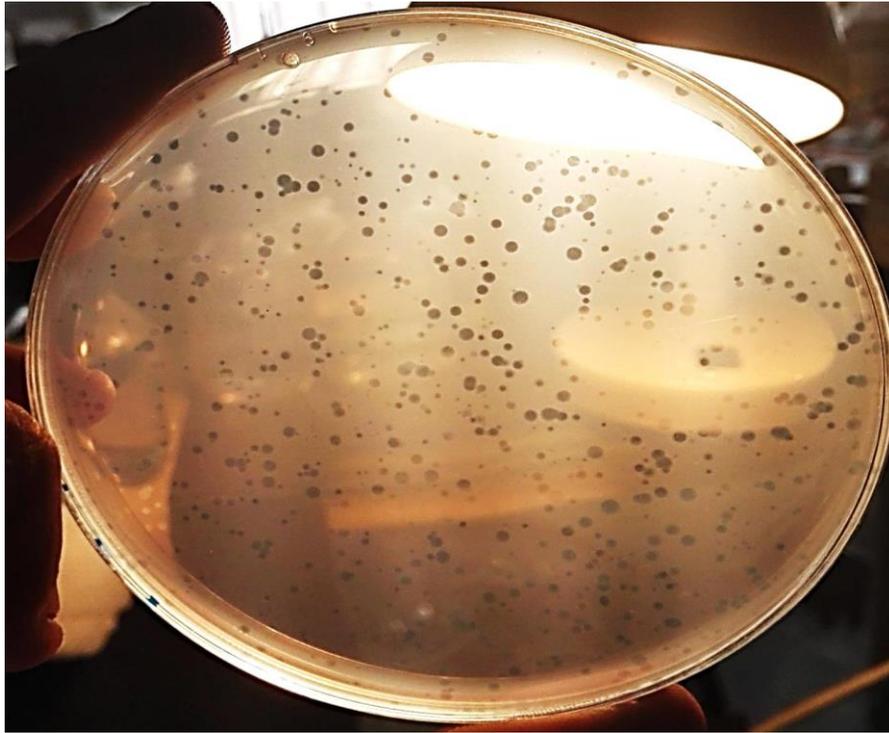
En cambio, las detecciones obtenidas para las cepas de BALOs MuRa1, MuRa2 y MuRa3 fueron siempre superiores al resto de cepas y, como se puede observar en la Figura 44, con tendencia al aumento.



**Fig. 44.** Cantidad detectada de BALOs MuRa1, MuRa2 y MuRa3 utilizando previamente un filtro de 0,45µm de tamaño de poro sobre la muestra de agua. Las cantidades variaron significativamente con respecto al día de incubación:  $p < 0,001^{***}$  y cepa utilizada:  $p < 0,01^{**}$ . Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### III-4.1.3.2. Detección en placa tras incubación a 30°C

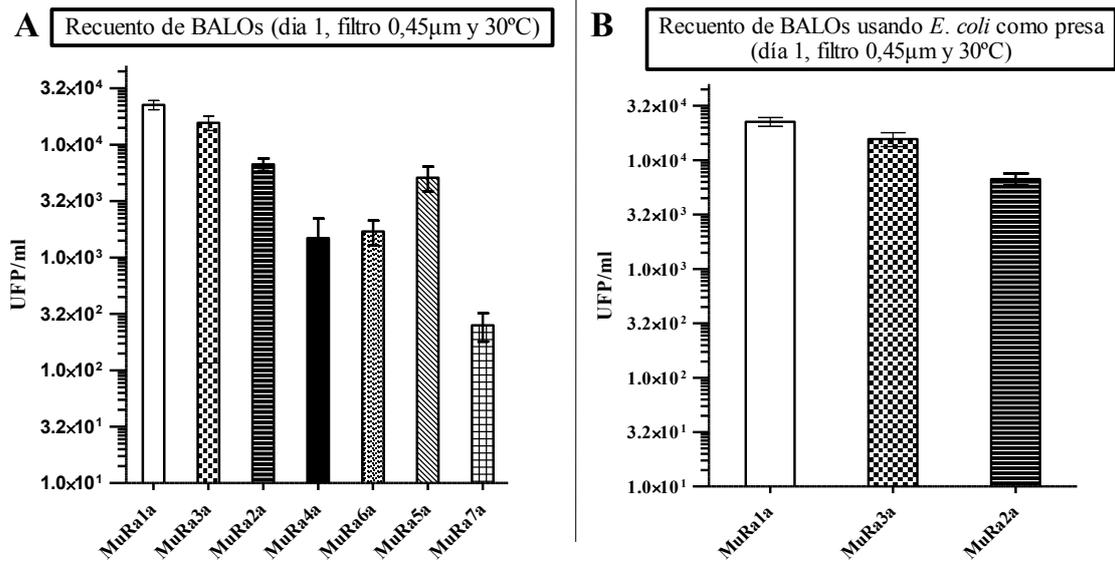
Tras la incubación a 30°C, también se observó como la cantidad y la nitidez de las zonas de lisis correspondientes a BALOs fue superior y como, además, las cantidades de colonias bacterianas que crecieron en placa fueron muy poco significativas (Figura 45).



**Fig. 45.** Detalle del 3<sup>er</sup> día de incubación de una placa de revelado de BALOs MuRa2b en medio NB-10 y tras una filtración de 0,45µm de tamaño de poro sobre la muestra de agua.

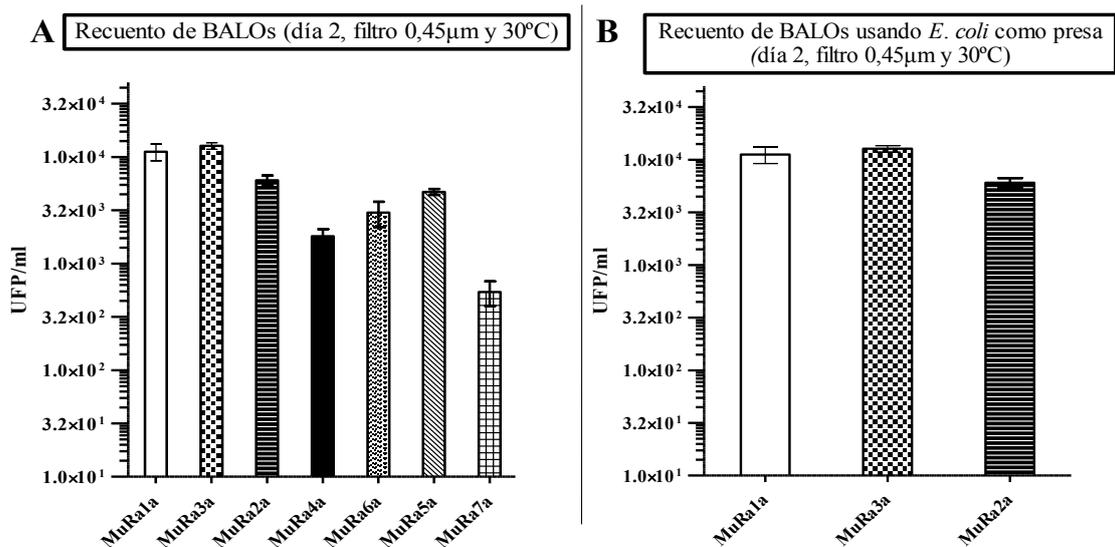
#### III-4.1.3.2.1. Recuento diario

La detección de las diferentes cepas de BALOs al primer día de incubación fue en aumento con respecto a la observada a menor temperatura. los resultados obtenidos fueron, de media:  $2,26 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa1a;  $6,71 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa2a;  $1,57 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa3a;  $1,49 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa4a;  $5,11 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa5a;  $1,71 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa6a y  $2,50 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa7a. Como se puede observar en la Figura 46, existió una mayor similitud entre las cantidades detectadas por todas las cepas del estudio, a excepción de MuRa7a.



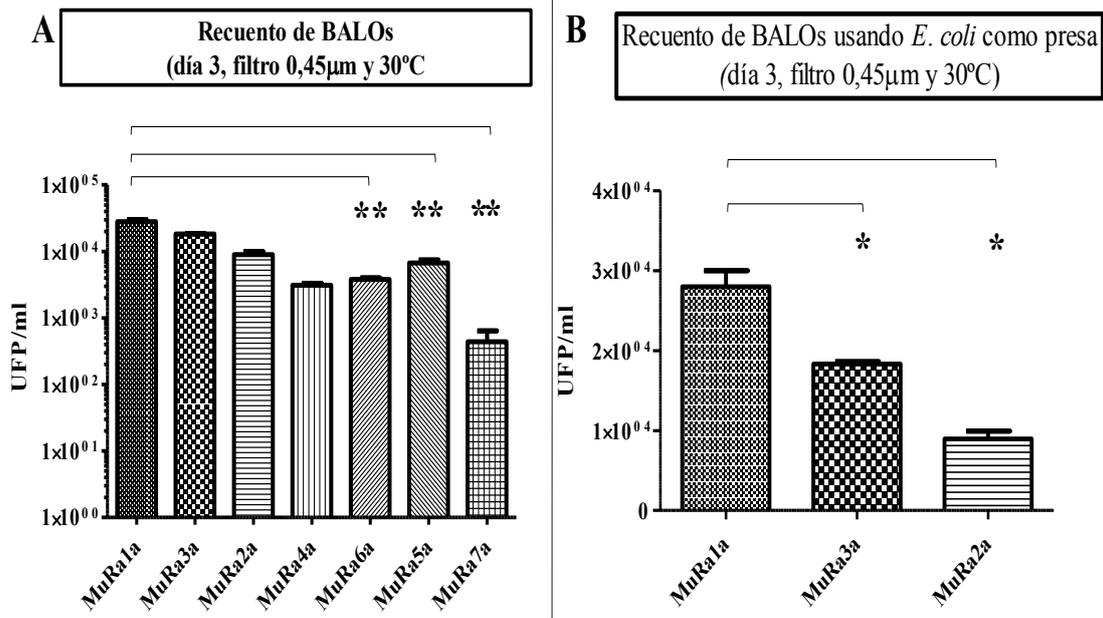
**Fig. 46. A)** Cantidad de BALOs detectada tras el primer día de incubación a 30°C y tras una filtración por 0,45µm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En el segundo día de incubación, las cepas de BALOs mostraron una cantidad parecida a la mostrada al día anterior, como se puede observar en la Figura 47. Las cantidades detectadas fueron, de media:  $1,12 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa1a;  $6,05 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa2a;  $1,27 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa3a;  $1,80 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa4a;  $4,71 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa5a;  $3,03 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa6a y  $5,41 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa7a.



**Fig. 47. A)** Cantidad de BALOs detectada tras el segundo día de incubación a 30°C y tras una filtración por 0,45µm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de BALOs MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

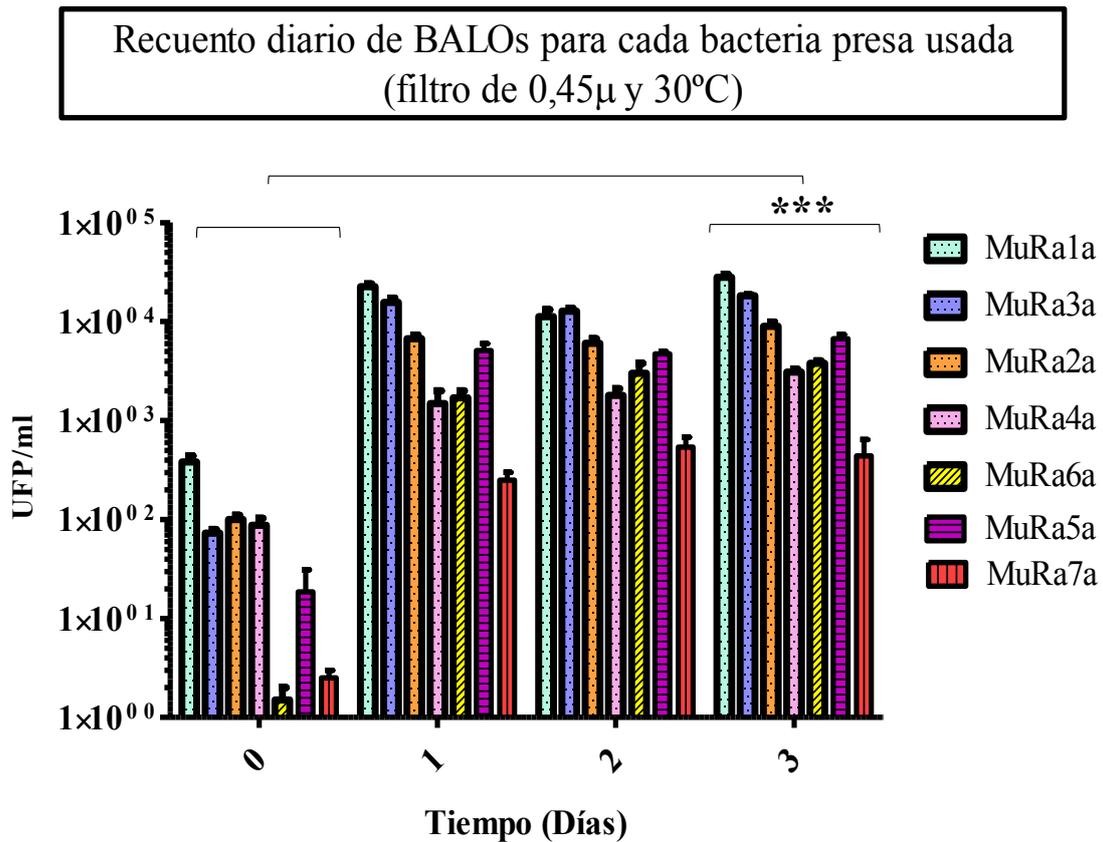
Por último, las cantidades detectadas fueron las siguientes:  $2,81 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa1a;  $8,96 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa2a;  $1,83 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa3a;  $3,11 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa4a;  $6,61 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa5a;  $3,83 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa6a y  $4,44 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa7a. Como se observar en la Figura 48, las cantidades, si bien similares al resto de días de incubación, sitúan a las cepas MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a como las más prolíficas.



**Fig. 48.** A) Cantidad de BALOs detectada tras el tercer día de incubación a 30°C y tras una filtración por 0,45µm de sobre la muestra de agua. B) Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a.  $p < 0,01$  \*\*: Las cantidades de BALOs MuRa1a detectadas al tercer día de incubación fueron significativamente mayores que las de BALOs MuRa5a, MuRa6a y MuRa7a;  $p < 0,05$  \*: las cantidades detectadas del BALO MuRa1a fueron significativamente mayores que ellos BALOs MuRa3a y MuRa2a. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

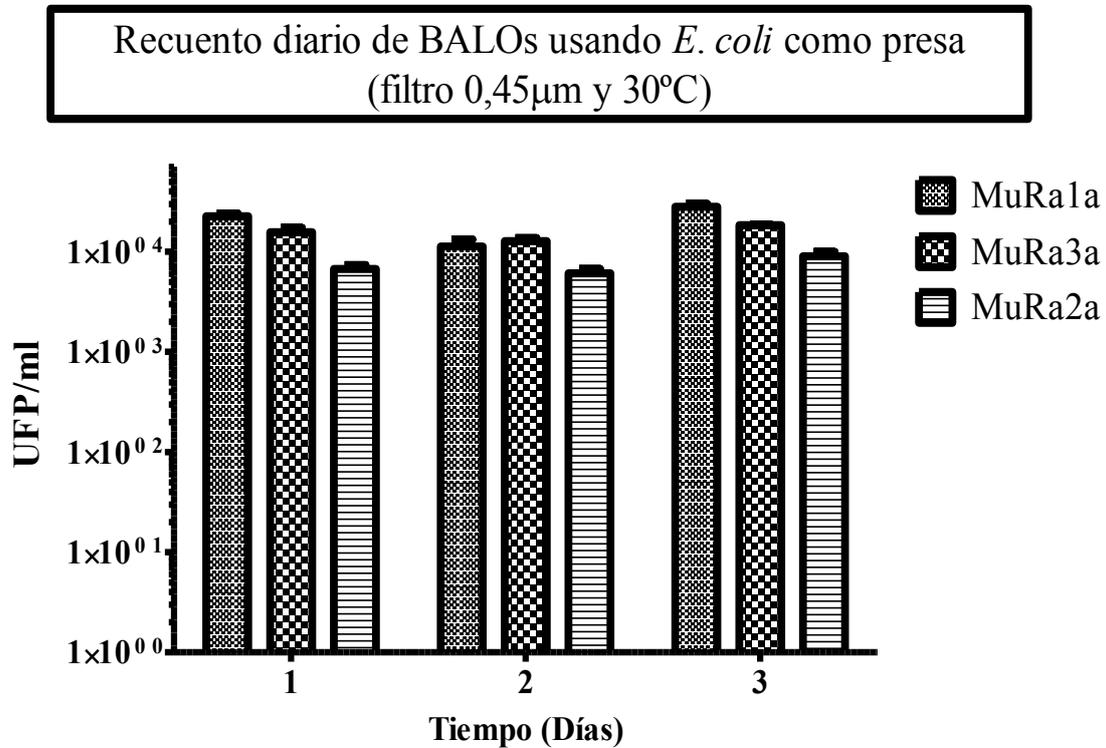
III-4.1.3.2.2. Comparación de recuentos a 30°C

Teniendo en cuenta todas las cepas, a 30°C se observó que la cantidad de BALOs fue mayor que en la obtenida en las anteriores condiciones. Además, fueron más los BALOs detectados al tercer día de incubación con respecto a los días anteriores, como se observa en la Figura 49.



**Fig. 49.** BALOs detectados día a día, incubados a 30°C y tras utilizar un filtro de 0,45µm, utilizando diferentes bacterias hospedadoras: MuRa1a, MuRa2a, MuRa3a, MuRa4a, MuRa5a, MuRa6a y MuRa7a.  $p < 0,001^{***}$ : las cantidades medias detectadas al tercer día de incubación fueron significativamente mayores al tercer día de incubación que a tiempo 0. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

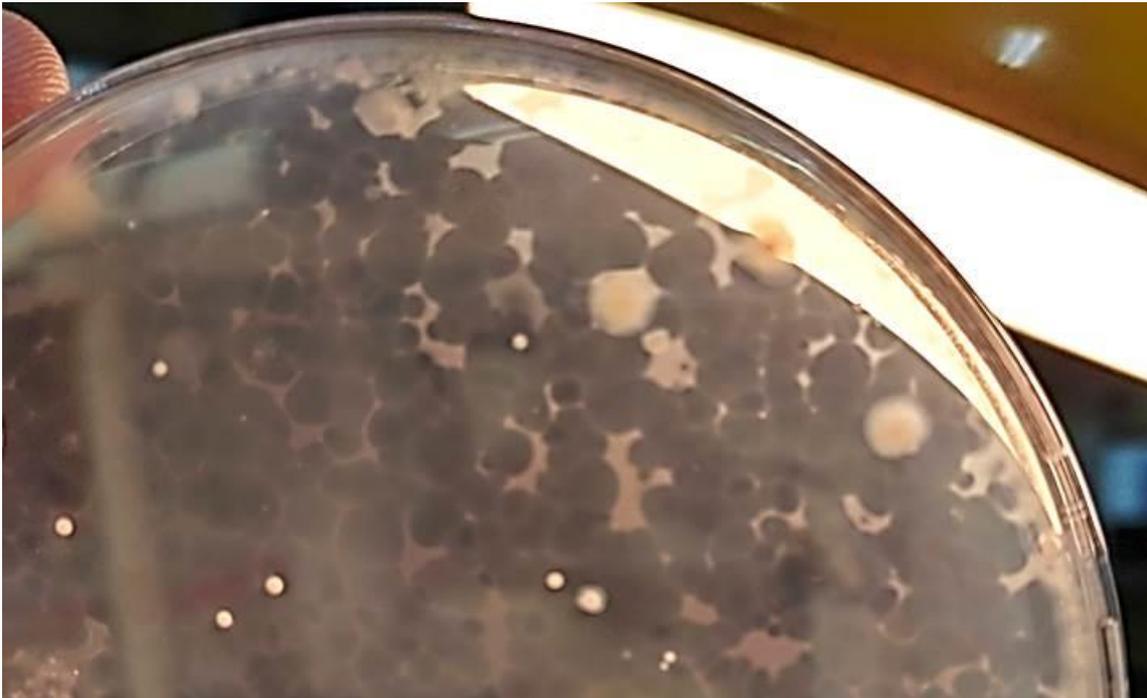
Igualmente, se observó como las cantidades de BALOs MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a detectadas fueron en aumento (Figura 50).



**Fig. 50.** Cantidad de BALOs MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a utilizando previamente un filtro de 0,45µm de tamaño de poro sobre la muestra de agua. Las cantidades variaron significativamente según el día de incubación:  $p < 0,001^{***}$  y con la cepa hospedadora utilizada en la detección:  $p < 0,01^{**}$ . Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.1.3.2.3. *Diferencias morfológicas entre regiones líticas*

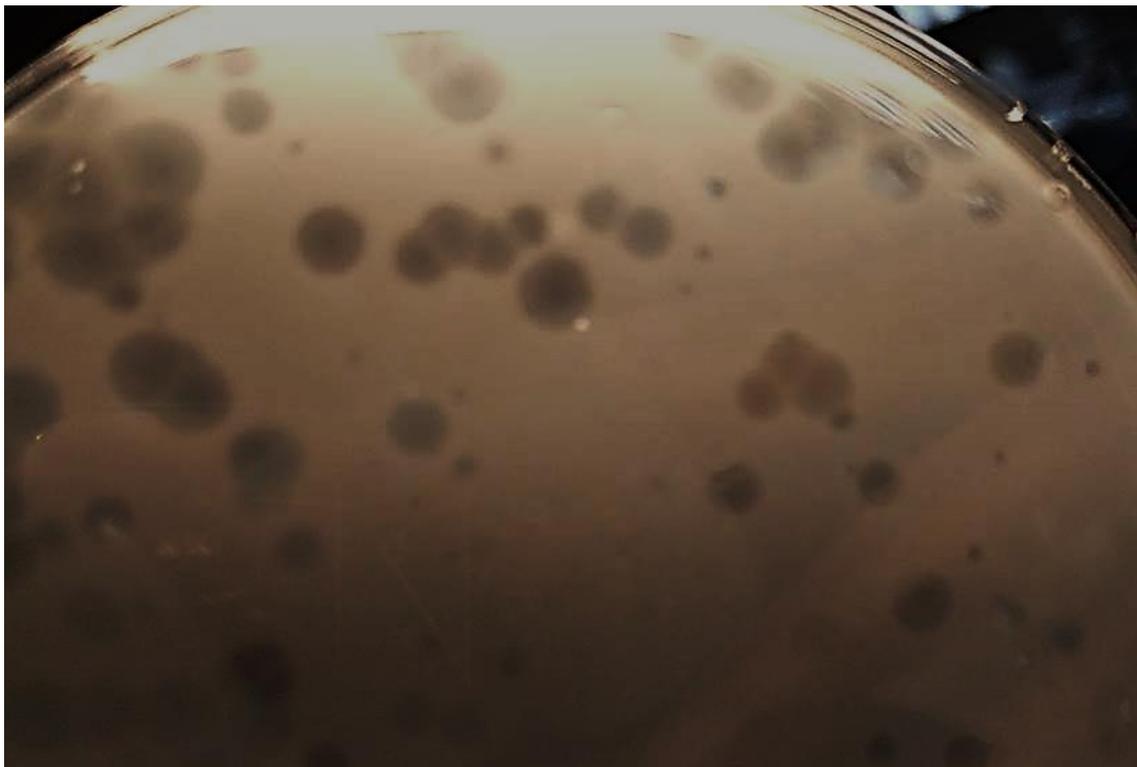
En el mismo estudio, tras las incubaciones, se observaron diferencias entre la morfología de las regiones líticas de BALOs MuRa1a (Figura 51), MuRa2a (Figura 52) y también con los detectados con MuRa6a (Figura 53). Las zonas líticas que mostró MuRa1a fueron regiones menos nítidas, pero más grandes que las mostradas por MuRa2a. En cambio, las zonas líticas del BALO MuRa6a fueron grandes, translúcidas y con una zona lítica más pequeña en el centro de la otra más grande.



**Fig. 51.** Detalle de la morfología de las zonas de lisis producidas por BALOs MuRa1a.



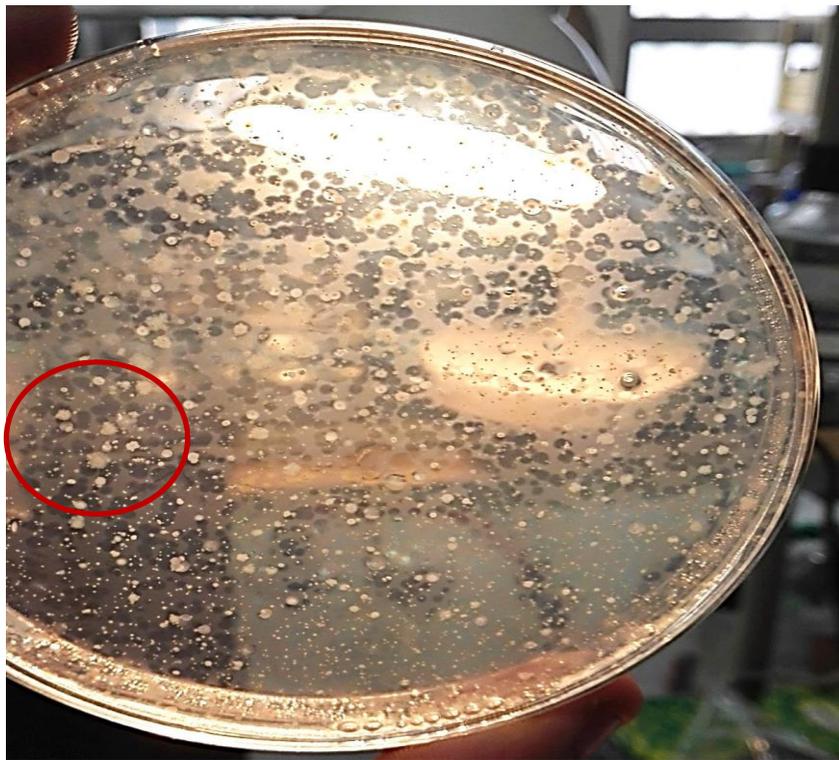
**Fig. 52.** Detalle de la morfología de las zonas de lisis producidas por BALOs MuRa2a.



**Fig. 53.** Detalle de la morfología de las zonas de lisis producidas por BALOs MuRa6a.

### III-4.1.3.3. Detección en placa tras incubación a 37°C

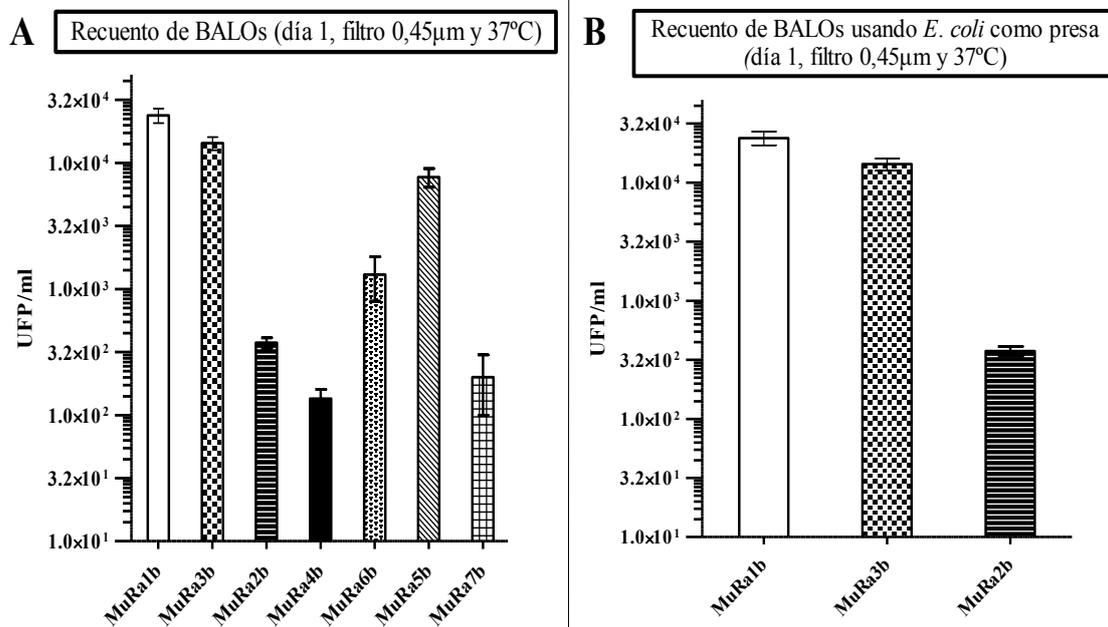
Las cepas de BALOs incubadas a 37°C también mostraron una mayor detección que con una filtración con un tamaño de poro mayor. Igualmente, y como se puede observar en la Figura 54, las placas mostraron una menor presencia de bacterias que las placas incubadas a la misma temperatura, pero con una filtración con un tamaño de poro mayor. No obstante, se observaron más colonias bacterianas no deseadas en placa que a temperaturas anteriormente estudiadas en este experimento (Figura 54).



**Fig. 54.** Detalle de placa de revelado de BALOs MuRa1b al 3er día de incubación, a temperatura ambiente, utilizando medio NB-10 y con una filtración de 0,45 $\mu$ m de tamaño de poro sobre la muestra. Se puede observar la presencia de colonias bacterianas (círculo rojo).

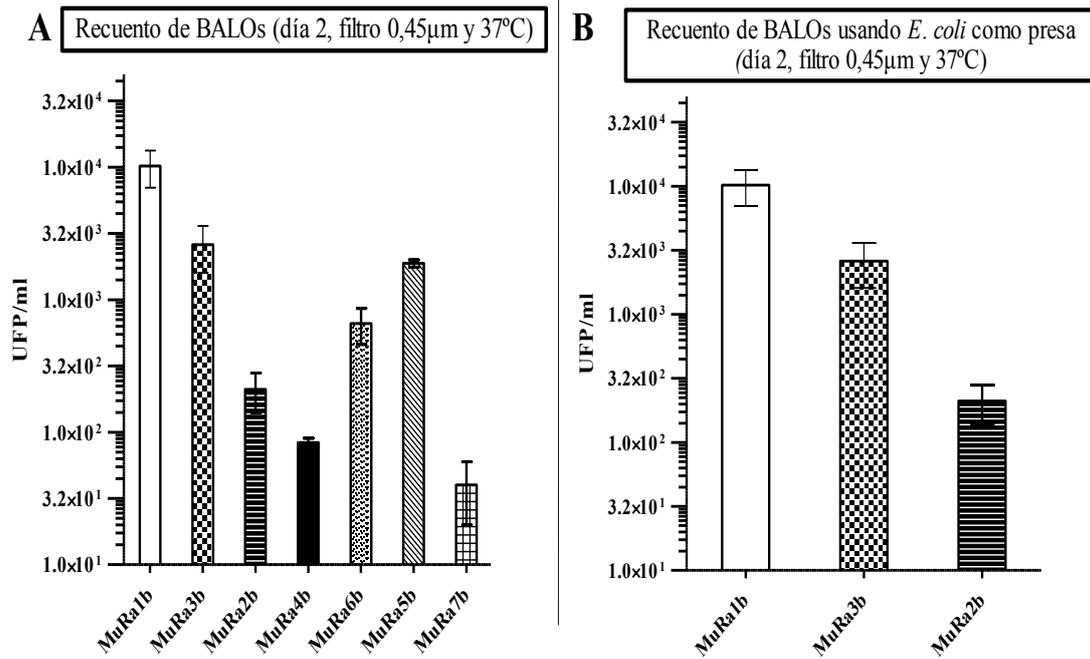
III-4.1.3.3.1. Recuento diario

Tras el primer día de incubación, algunas cepas de BALOs mostraron cantidades similares a las observadas a menor temperatura, pero se observó una tendencia a una disminución. Los resultados en la detección de las diferentes cepas de BALOs, fueron, de media:  $2,38 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa1b;  $3,76 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2b;  $1,43 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa3b;  $1,36 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa4b;  $7,71 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa5b;  $1,31 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa6b y  $2,07 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa7b. Como se puede observar en la Figura 55, las cepas MuRa2b y MuRa4b ofrecieron cantidades muchos menores que anteriormente.



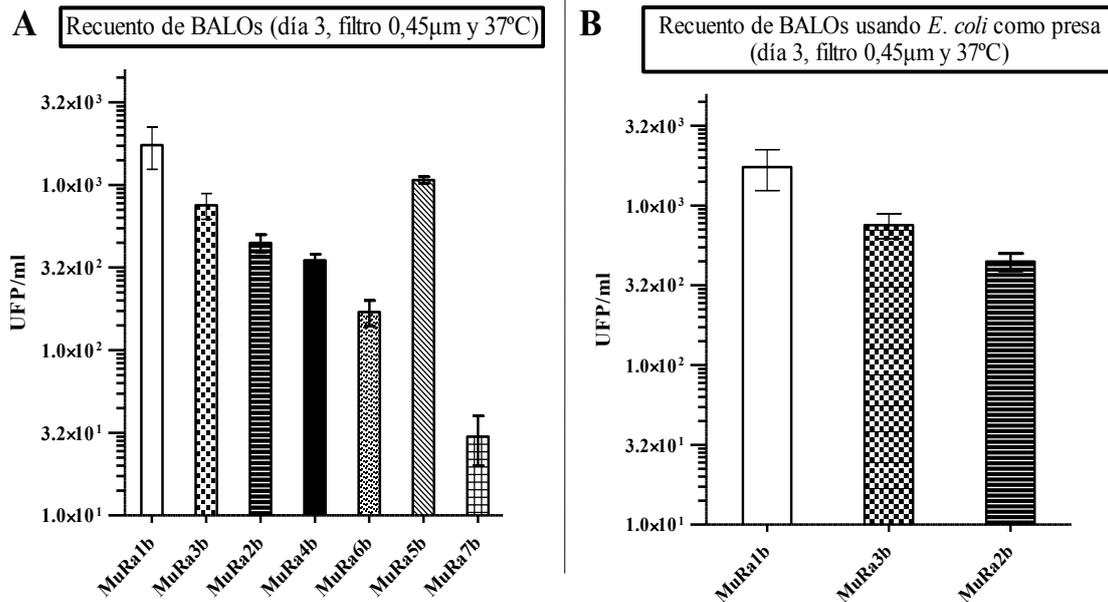
**Fig. 55.** A) Cantidad de BALOs detectada tras el primer día de incubación a 37°C y tras una filtración por 0,45µm de sobre la muestra de agua. B) Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Al segundo día de incubación, se observó de nuevo una menor cantidad de BALOs de todas las cepas. En particular, se observaron los siguientes resultados:  $1,02 \times 10^4$  UFP/ml para la cepa MuRa1b;  $2,13 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2b;  $2,66 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa3b;  $8,35 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa4b;  $1,89 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa5b;  $6,61 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa6b y  $4,01 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa7b (Figura 56).



**Fig. 56. A)** Cantidad de BALOs detectada tras el segundo día de incubación a 37°C y tras una filtración por 0,45μm de sobre la muestra de agua. **B)** Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b.  $p < 0,05^*$ : las cantidades de variaron significativamente entre BALOs MuRa1b con respecto a BALOs MuRa3b. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

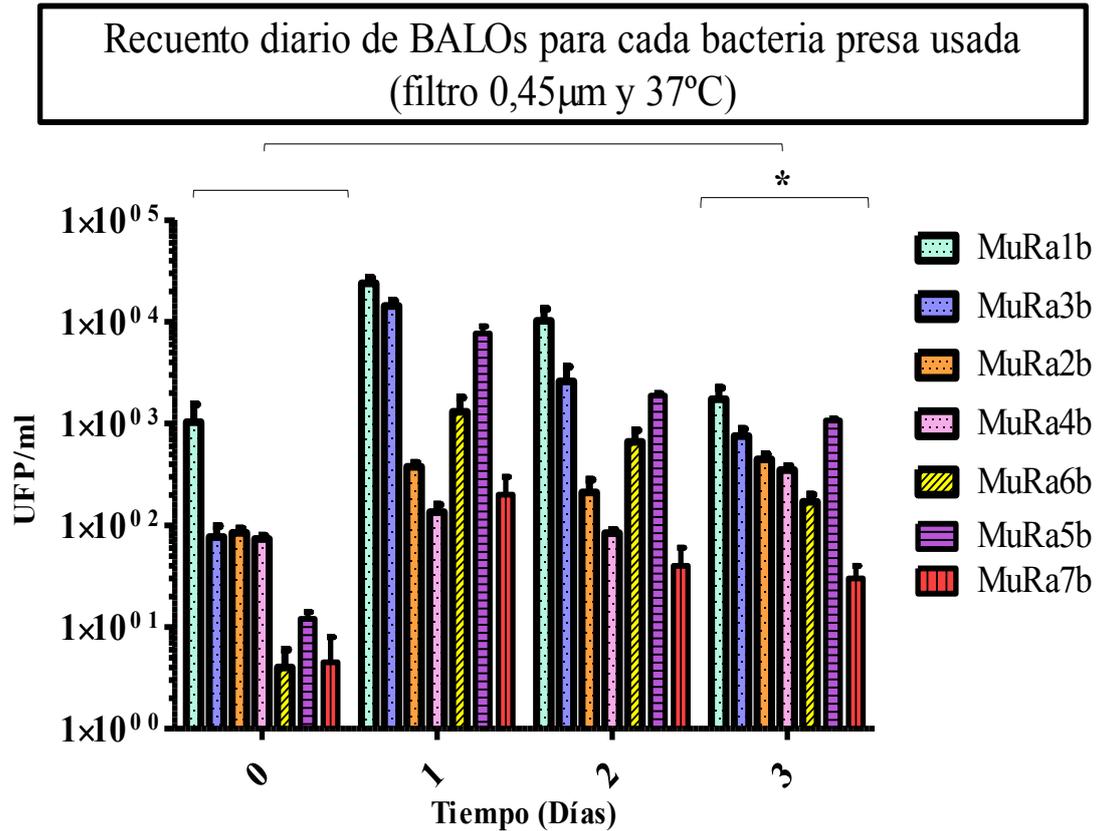
Tras el tercer día de incubación, las cepas mantuvieron sus cantidades salvo, como se puede observar en la Figura 57, la cepa MuRa4b la cual se detectó en mayor medida que los días previos. Los resultados son los siguientes:  $1,74 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa1b;  $4,46 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa2b;  $7,54 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa3b;  $3,51 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa4b;  $1,09 \times 10^3$  UFP/ml para la cepa MuRa5b;  $1,71 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa6b y  $2,09 \times 10^1$  UFP/ml para la cepa MuRa7b.



**Fig. 57.** A) Cantidad de BALOs detectada tras el tercer día de incubación a 37°C y tras una filtración por 0,45µm de sobre la muestra de agua. B) Detalle de la gráfica correspondiente a los datos de MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

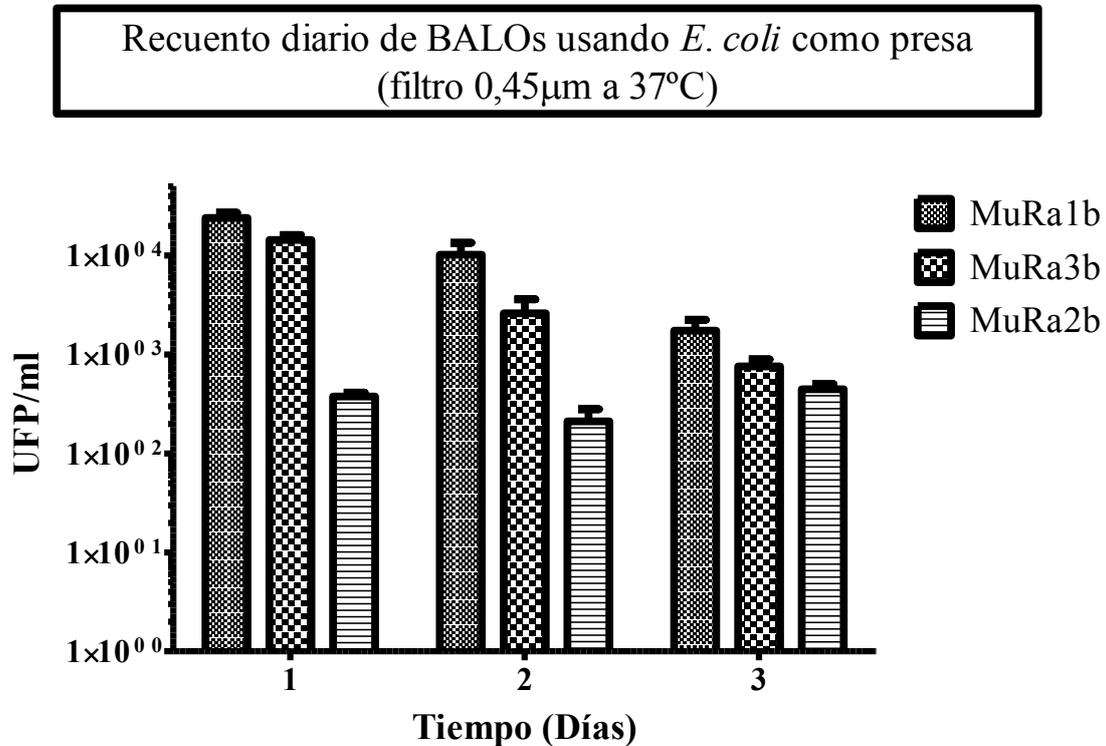
III-4.1.3.3.2. Comparación de recuentos a 37°C

En todas las cepas del estudio, tras la incubación a 37°C, se observó como las cantidades obtenidas mostraron una tendencia variable atendiendo al día en el que se efectuó la detección (Figura 58).



**Fig. 58.** BALOs detectados día a día, incubados a 37°C y tras utilizar un filtro de 0,45µm, utilizando diferentes bacterias hospedadoras: MuRa1a, MuRa2a, MuRa3a, MuRa4a, MuRa5a, MuRa6a y MuRa7a. \*p<0,05: Las cantidades medias detectadas al tercer día de incubación fueron significativamente mayores que a tiempo 0. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En cuanto a las cepas de BALOs MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b, las cantidades detectadas fueron mayores durante el primer día de incubación, en comparación con las detectadas al tercer día (Figura 59).

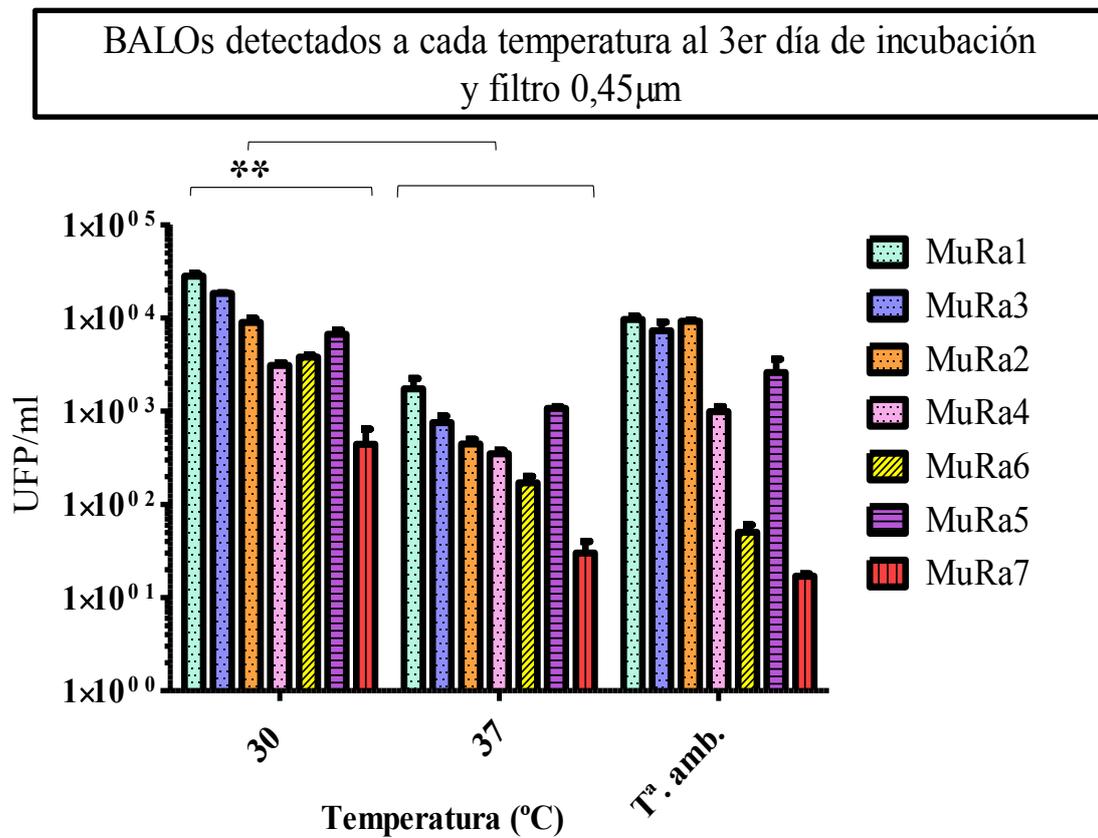


**Fig. 59.** Cantidad de BALOs MuRa1b, MuRa2b y MuRa3b detectada utilizando previamente un filtro de 0,45µm de tamaño de poro sobre la muestra de agua. Las cantidades variaron significativamente según el día de incubación (sobre todo MuRa1b);  $p < 0,001^{***}$  y de la cepa utilizada (MuRa1b);  $p < 0,05^*$ . Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### III-4.1.4. Comparaciones generales y espectro de parasitismo

#### III-4.1.4.1. Recuentos por temperatura tras una filtración de 0,45µm

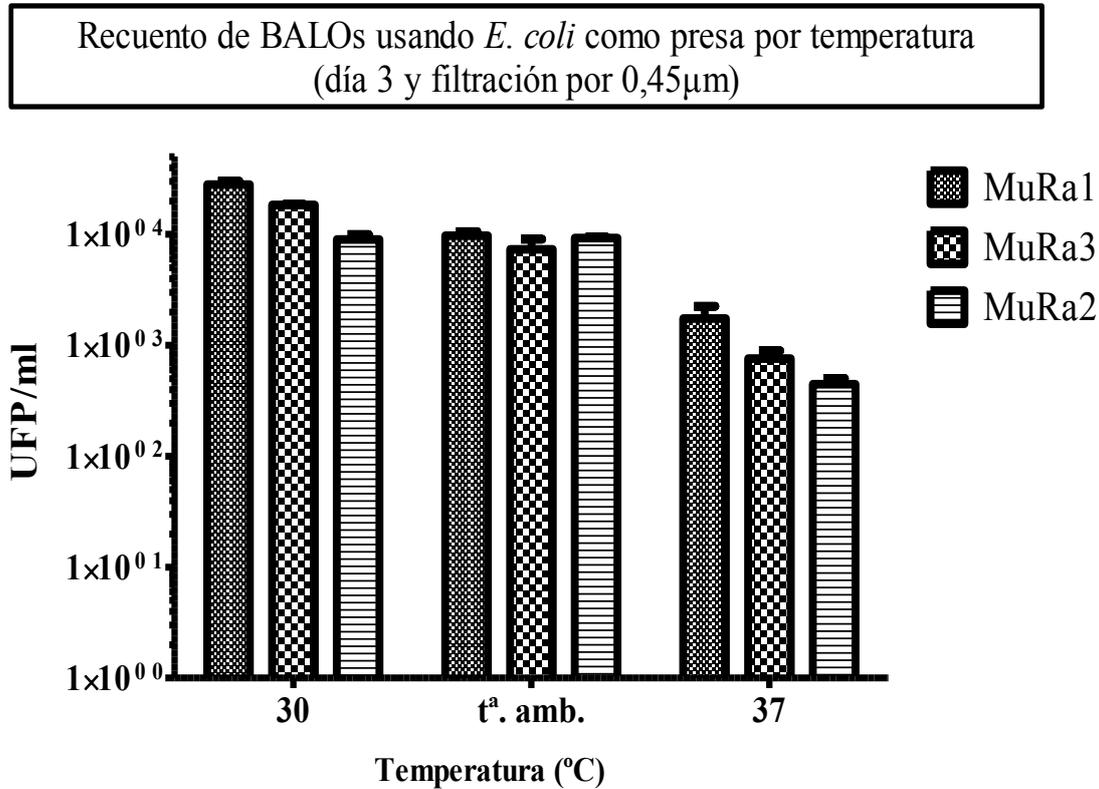
Como se puede observar en la Figura 60, aquellas cepas filtradas previamente por un tamaño de poro de 0,45µm, mostraron una detección mayor a 30°C al tercer día de incubación que a 37°C. Por otro lado, entre la detección a temperatura ambiente y la detectada a 30°C no se observaron diferencias significativas.



**Fig. 60.** BALOs detectados durante el 3<sup>er</sup> día de incubación a las diferentes temperaturas estudiadas, tras una filtración de 0,45µm y utilizando las diferentes bacterias hospedadoras.  $p < 0,01^{**}$ : Las cantidades medias de BALOs detectadas a 30°C fueron significativamente superiores que las detectadas a 37°C. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

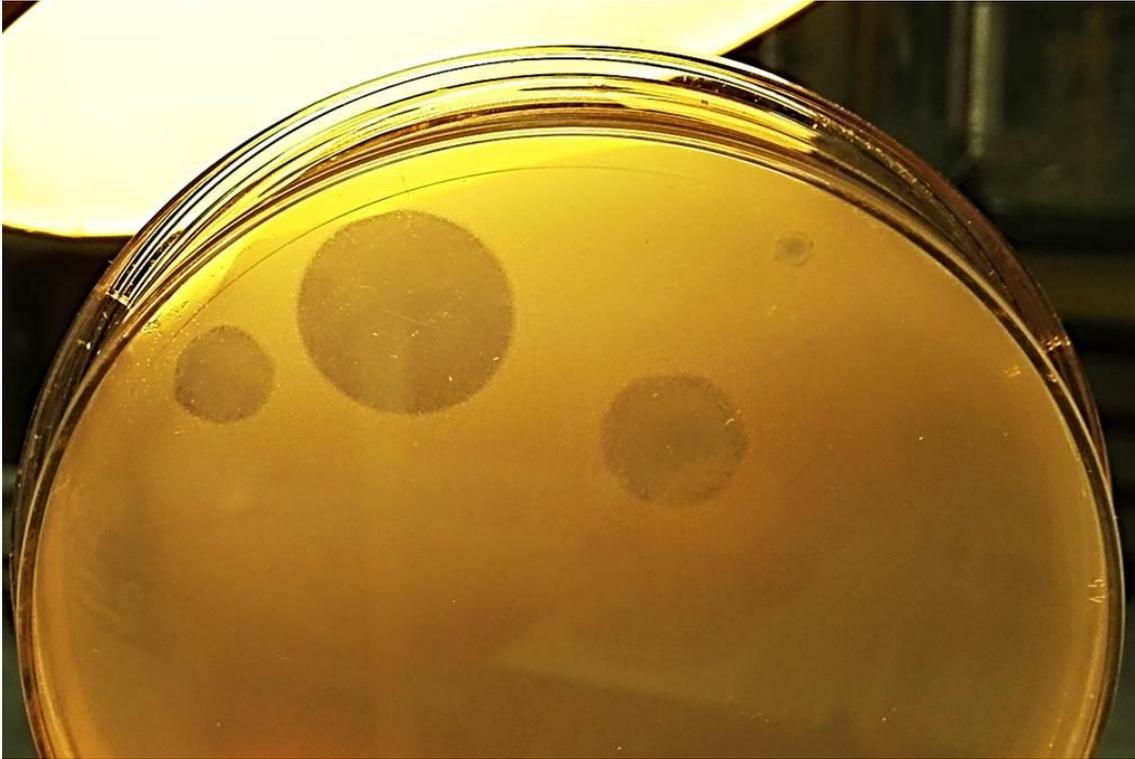
Dados los resultados anteriores y centrándonos en *E. coli* como bacteria presa (que resultaron ser las cepas sobre las que se observaron los mejores resultados, tanto en cada temperatura como en cada tamaño de filtro de los estudios), se efectuó una comparativa sobre BALOs detectados con MuRa1, MuRa2 y MuRa3, filtrados por 0,45µm y con respecto al resto de temperaturas (Figura 61). La Figura 61 muestra como, en términos

absolutos, la cantidad de BALOs detectados usando *E. coli* K-12 como cepa hospedadora (MuRa1) resultó ser mayor a 30°C que a ninguna otra temperatura.



**Fig. 61.** Comparación por temperaturas de la cantidad de BALOs MuRa1, MuRa2 y MuRa3 detectados del 3<sup>er</sup> día de incubación y tras una filtración de 0,45µm de tamaño de poro sobre el aguade la muestra. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

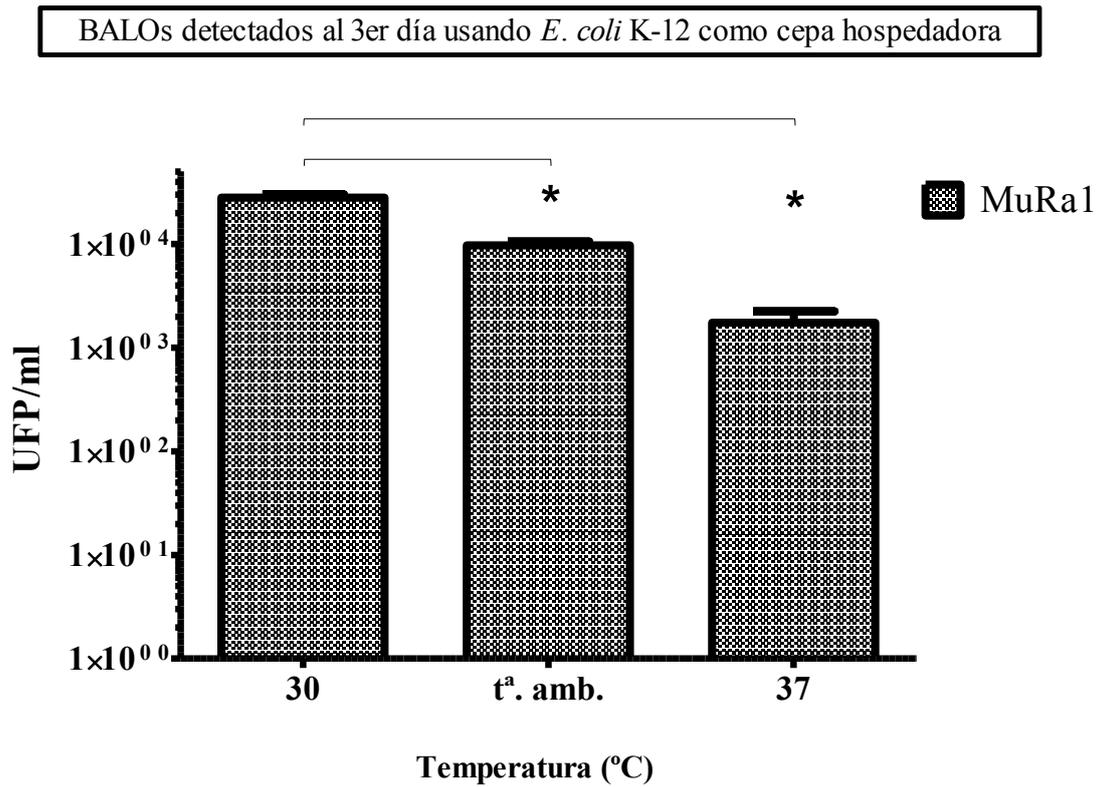
Por otro lado, y como se ha observado anteriormente, las placas en las que se detectaron BALOs a menudo mostraron zonas de lisis muy nítidas en las primeras 24 horas de incubación atribuidas a la acción de bacteriófagos. Estas primeras zonas de lisis aparecidas mostraron un tamaño mayor que las zonas de lisis “convencionales” producidas por BALOs (Figura 62). Además, las placas en las que se empleó *E. coli* C como presa (MuRa3) mostraron una mayor incidencia de bacteriófagos, dificultando el aislamiento de BALOs asociados a esta cepa.



**Fig. 62.** Zonas de lisis detectadas en placas de detección del BALO MuRa3a antes de las primeras 24 horas de incubación, las cuales fueron consideradas como provocadas por bacteriófagos.

III-4.1.4.2. Recuentos de MuRa1 por temperatura y tras filtración de 0,45µm

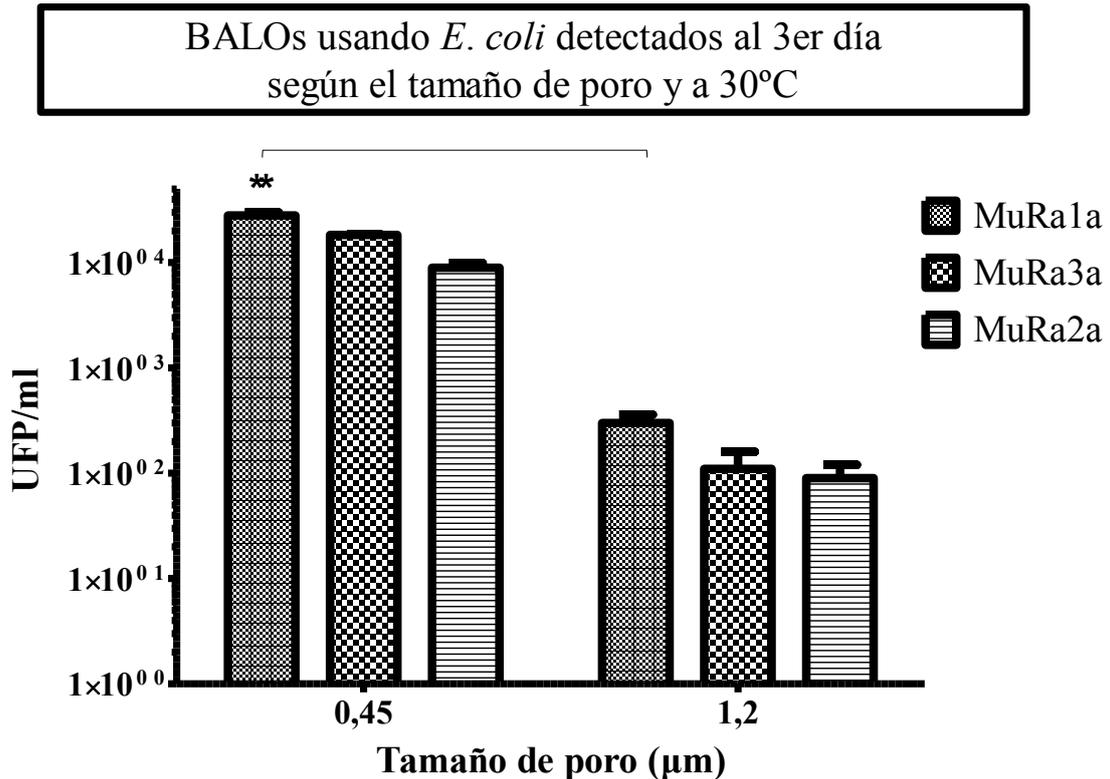
Centrándose en los resultados obtenidos con la cepa MuRa1, la Figura 63 muestra como la cantidad de BALOs detectados con esta cepa fue significativamente mayor tras incubación a 30°C que al resto de temperaturas estudiadas (Figura 63).



**Fig. 63.** Comparación de la cantidad de BALOs MuRa1 detectada al 3<sup>er</sup> día de incubación y tras una filtración de 0,45µm de tamaño de poro sobre la muestra.  $p < 0,05^*$ : la cantidad de MuRa1 fue significativamente mayor a 30°C que a ninguna otra temperatura. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.1.4.4. Comparativa de los recuentos de MuRa1, MuRa2 y MuRa3 según el tamaño de poro

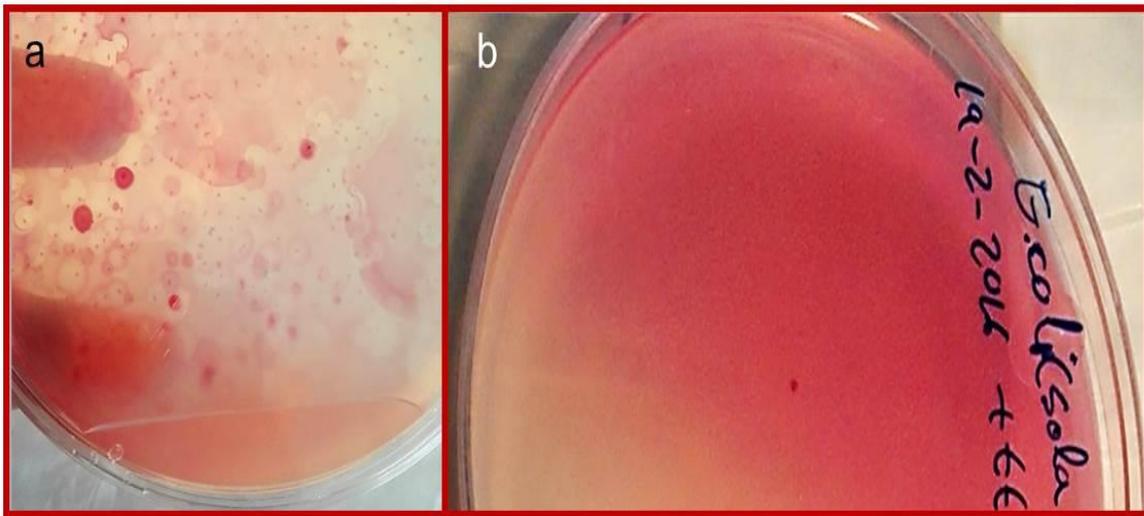
Tras efectuar la comparación entre el tamaño de poro y a la temperatura que mejores resultados se obtuvieron (a 30°C) se observó que la cantidad detectada de MuRa1a con un filtro de 0,45µm fue superior a la detectada a 1,2µm (Figura 64).



**Fig. 64.** Cantidad de MuRa1a, MuRa2a y MuRa3a detectada a 30°C, al 3er día de incubación y según el tamaño de poro usado en la filtración.  $p < 0,01^{**}$ : La cantidad de BALOs MuRa1a filtrados previamente con un tamaño de poro de 0,45µm fue significativamente superior a los detectados con 1,2µm. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### III-4.1.5. Actividad respiratoria de *E. coli* K-12

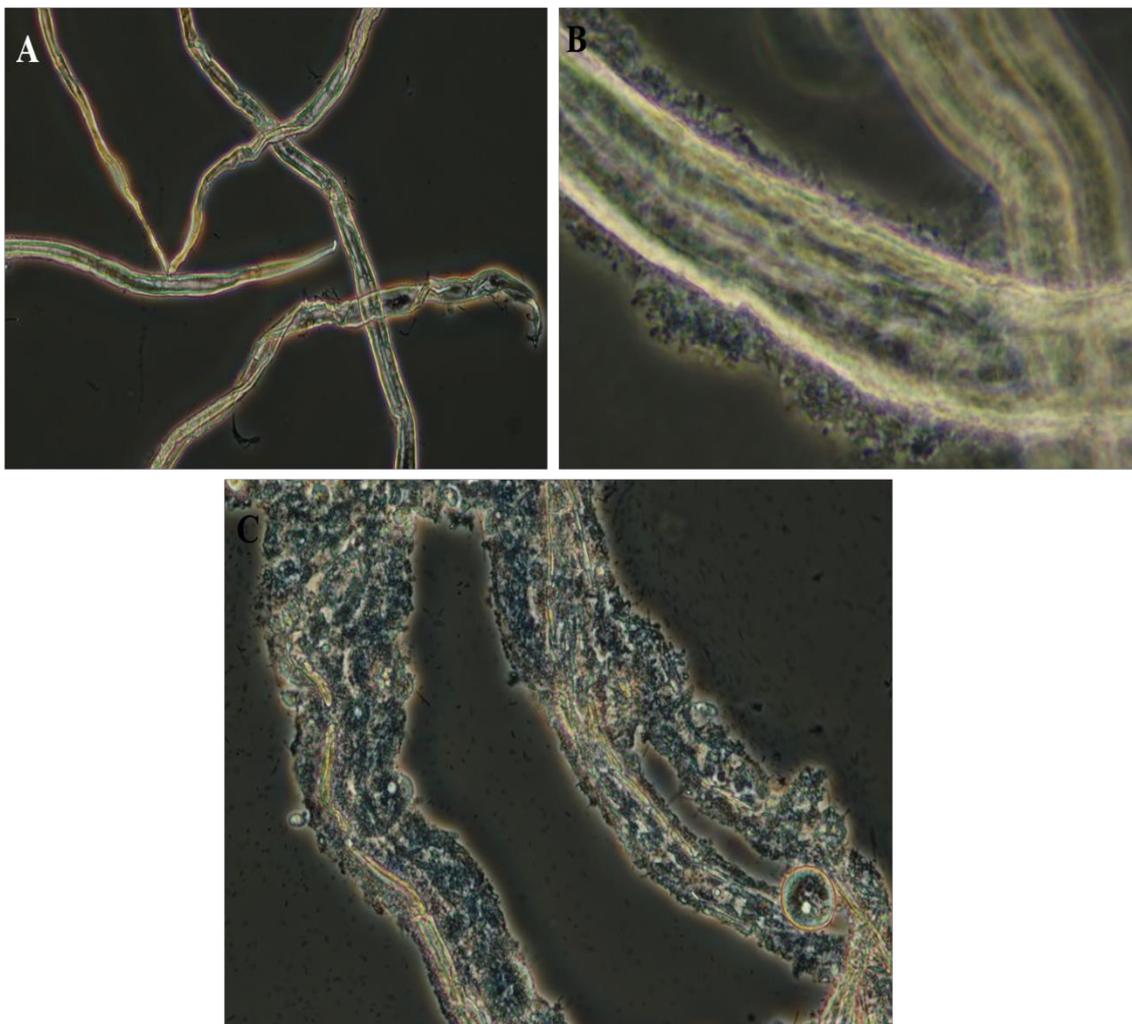
Para comprobar la actividad metabólica de la comunidad bacteriana crecida en las placas de los anteriores estudios, se realizó un estudio aplicando TTC directamente a placas en la que se habían detectado BALOs MuRa1. La placa con la única presencia de bacterias presa presentó un color mucho más acusado por la acción del TTC que en la que estuvieron presentes tanto el depredador como otras bacterias de las muestras (Figura 65).



**Fig. 65.** Placas de revelado de BALOs a las que se les añadió TTC. **a)** Detalle de la placa con *E. coli* K-12, BALOs MuRa1 y de otras bacterias procedentes del agua cruda de la muestra. **b)** Detalle de la placa con la sola presencia de *E. coli* K-12.

### III-4.2. DETECCIÓN DE BALOs DE AGUA DULCE MEDIANTE LA TÉCNICA AMS

El estudio del espectro de parasitismo de BALOs aislados de la E.D.A.R. se realizó aprovechándose de que la técnica AMS (descrita en el apartado “Material y Métodos” de este capítulo) permite un autoenriquecimiento de la muestra en las botellas de DBO<sub>5</sub> en cada uno de los 5 días de incubación. En este estudio, la disponibilidad de nutrientes dependió de la comunidad microbiana existente, la cual evolucionó y colonizó progresivamente diferentes superficies como se puede observar en la Figura 66.

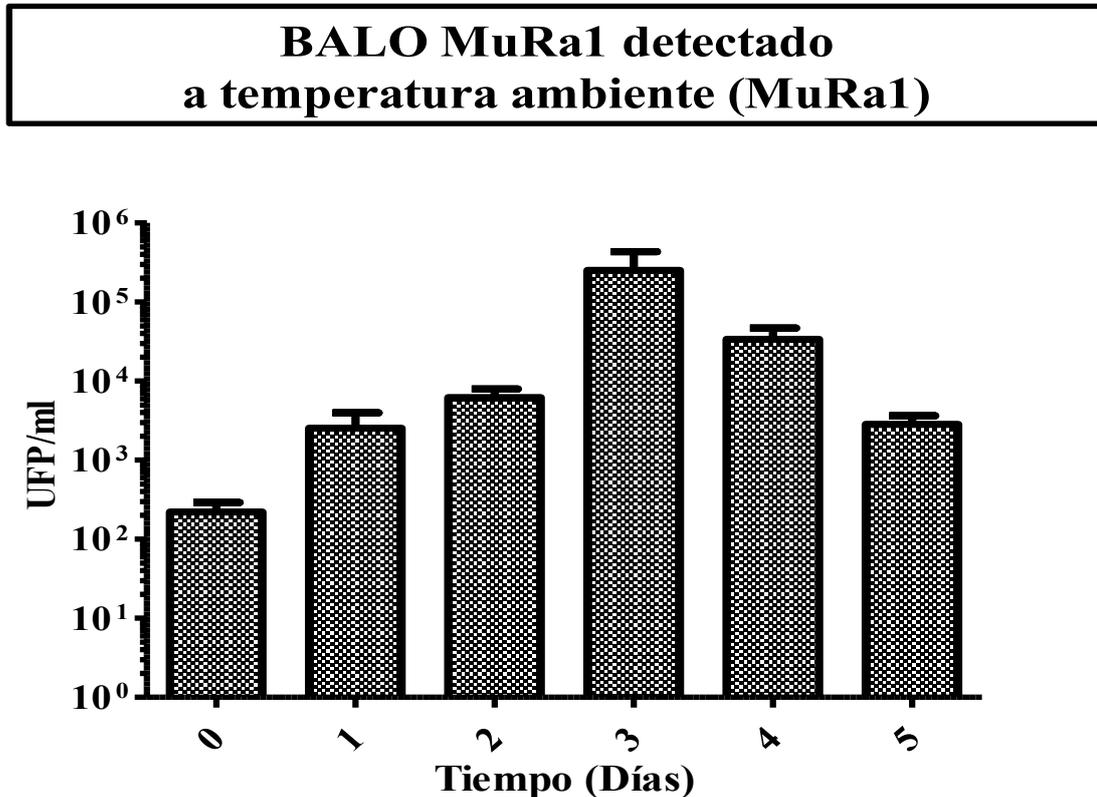


**Fig. 66.** Evolución de la comunidad microbiana del agua de muestra contenida en botellas de DBO<sub>5</sub> **A)** Fibras de la muestra de agua sin colonizar. Día 1. Objetivo 10x. **B)** Fibras de la muestra de agua con microorganismos asociados. Día 3. Objetivo 40x. **C)** Fibra de la muestra de agua colonizada. Día 5. Objetivo 20x.

**III-4.2.1. Detección de BALOs MuRa1**

Como se ha indicado anteriormente, la detección de cepas MuRa1 fue realizada con la infraestructura necesaria para la técnica de la DBO<sub>5</sub>. La muestra de agua contenida en dicha infraestructura se mantuvo durante 5 días a temperatura ambiente, ofreciendo los siguientes recuentos diarios:

A tiempo 0, la cantidad media de BALOs MuRa1 detectados fue de  $2,23 \times 10^2$  UFP/ml. Durante los días mantenidos en incubación a temperatura ambiente se detectó, de media  $2,54 \times 10^3$  UFP/ml durante el primer día,  $6,13 \times 10^2$  UFP/ml durante el segundo,  $2,51 \times 10^5$  UFP/ml durante el tercero,  $3,87 \times 10^4$  UFP/ml durante el cuarto y  $2,84 \times 10^3$  UFP/ml al quinto día (Figura 67).



**Fig. 67.** Cantidad de BALOs MuRa1 detectada en cada uno de los días y tras incubación a temperatura ambiente utilizando la técnica AMS. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En la Tabla 8 se muestran los valores medios de las diferentes características físico-químicas del agua, obtenidos durante cada día de incubación a temperatura ambiente.

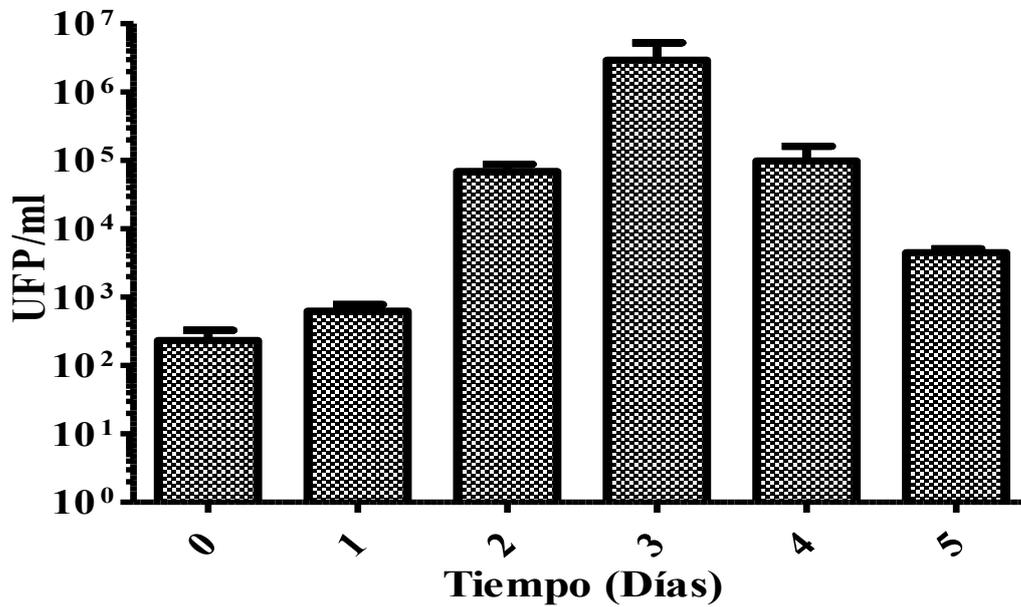
Parámetro	Tiempo 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
pH	8,49	8,08	8,26	8,42	8,54	8,72
C25 (mS)	3,12	3,58	3,89	3,62	3,51	3,76
[O <sub>2</sub> ] (mg/l)	1,32	0,88	1,73	1,83	1,90	2,24
T <sup>a</sup> (°C)	16,4	19,2	20,3	21,6	22,4	22,8
Red/ox (mV)	57,83	106,43	132,36	127,86	134,75	133,68
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l)	-----	144,66	199,33	284,27	337,01	366,34

**Tabla 8.** Valores medios de pH, conductividad a 25°C, oxígeno disuelto, temperatura, potencial red-ox y DBO<sub>5</sub> en cada uno de los días de incubación a temperatura ambiente de la muestra en la que detectaron BALOs.

### III-4.2.2. Detección de BALOs MuRa1a

Como puede observarse en la Figura 68, la cantidad de BALOs MuRa1, a 30°C, fue superior a la ofrecida a temperatura ambiente. De modo que, a tiempo 0, la cantidad media de BALOs MuRa1a detectada fue de  $2,33 \times 10^2$  UFP/ml. Durante los días mantenidos en incubación se detectó, de media  $6,27 \times 10^2$  UFP/ml durante el primer día,  $6,92 \times 10^4$  UFP/ml durante el segundo,  $2,93 \times 10^6$  UFP/ml durante el tercero,  $9,89 \times 10^4$  UFP/ml durante el cuarto y  $4,47 \times 10^3$  UFP/ml al quinto día.

**BALO MuRa1 detectado a 30°C (MuRa1a)**



**Fig. 68.** Cantidad de BALOs MuRa1 detectada en cada uno de los días y tras incubación a 30°C (MuRa1a) utilizando la técnica AMS. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

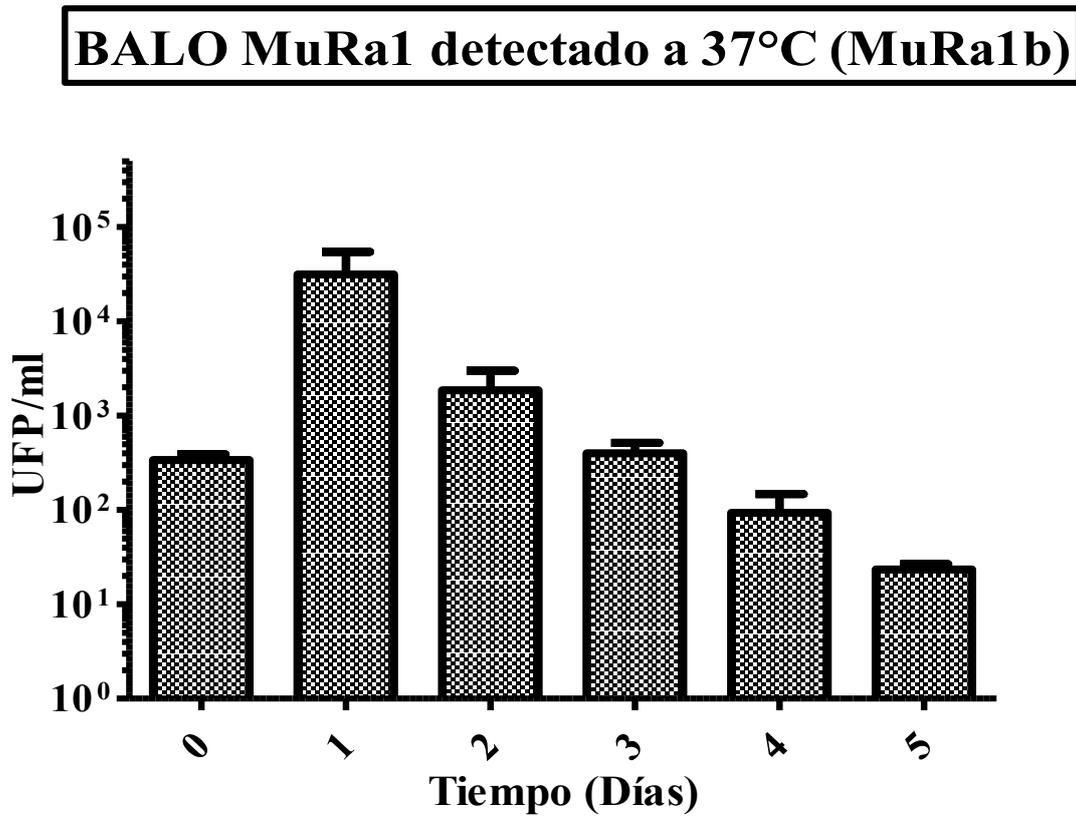
Los valores medios de las distintas características físico-químicas del agua de muestra a 30°C fueron similares a los obtenidos a temperatura ambiente (Tabla 9).

Parámetro	Tiempo 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
pH	8,29	8,06	8,26	8,53	8,66	8,67
C25 (mS)	3,29	3,51	3,37	3,76	3,54	3,08
[O2] (mg/l)	1,18	0,97	2,37	3,01	3,64	4,38
Red/ox (mV)	83,60	105,73	121,26	126,13	115,56	116,23
DBO5 (mg O <sub>2</sub> /l)	-----	156,33	317,33	404,66	447,66	489,69

**Tabla 9.** Valores medios de pH, conductividad a 25°C, oxígeno disuelto, potencial red-ox y de DBO<sub>5</sub> en cada uno de los días de incubación a 30°C de la muestra en la que detectaron BALOs.

III-4.2.3. Detección BALOs MuRa1b

Se puede observar en la Figura 69 cómo, a 37°C, MuRa1 fue detectada en menor medida que a temperaturas previas. A tiempo 0, la cantidad media detectada fue de  $3,40 \times 10^2$  UFP/ml. Durante los días mantenidos en incubación se detectó, de media  $3,13 \times 10^4$  UFP/ml durante el primer día,  $1,86 \times 10^3$  UFP/ml durante el segundo,  $4,03 \times 10^2$  UFP/ml durante el tercero,  $9,33 \times 10^1$  UFP/ml durante el cuarto y  $2,37 \times 10^1$  UFP/ml al quinto día.



**Fig. 69.** Cantidad de BALOs MuRa1 detectada en cada uno de los días y tras incubación a 37°C (MuRa1b) utilizando la técnica AMS. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

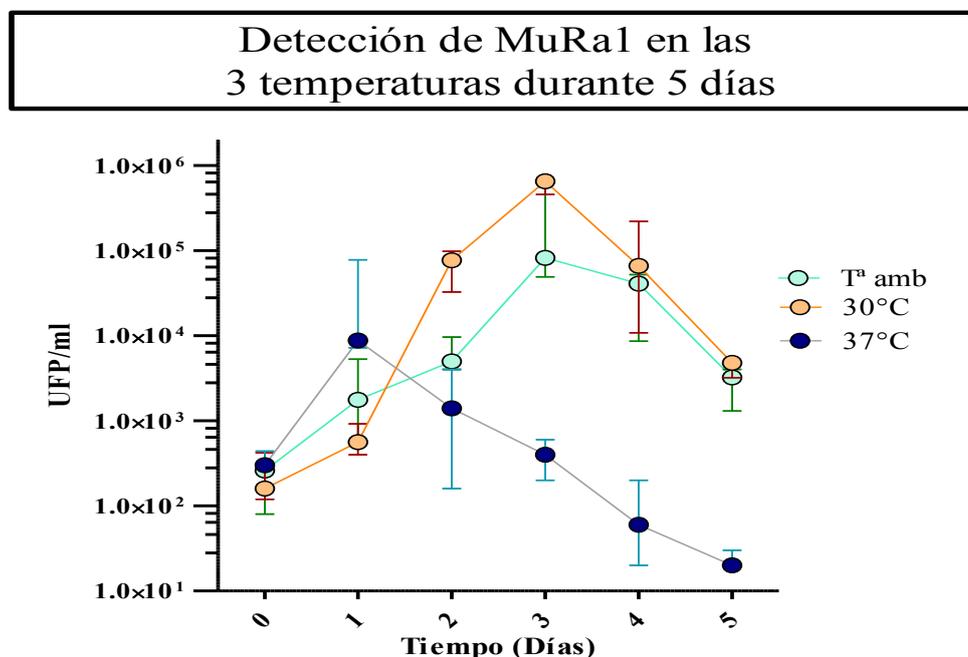
Igual que ocurriera en las anteriores, las características del agua procedente del pretratamiento de la E.D.A.R. e incubada a 37°C fueron muy similares (Tabla 10).

Parámetro	Tiempo 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
pH	8,24	8,07	8,33	8,51	8,65	8,84
C25 (mS)	3,37	3,06	2,93	2,70	3,14	3,13
[O <sub>2</sub> ] (mg/l)	0,44	0,79	2,12	3,38	4,21	4,40
Red/ox (mV)	46,55	59,45	70,83	117,76	115,06	76,46
DBO <sub>5</sub> (mg O <sub>2</sub> /l)	-----	110,66	237,66	261,21	365,06	360,66

**Tabla 10.** Valores medios de pH, conductividad a 25°C, oxígeno disuelto, potencial red-ox y de DBO<sub>5</sub> en cada uno de los días de incubación a 37°C de la muestra en la que se detectaron BALOs.

### III-4.2.4. Comparativa de la detección de MuRa1 por temperatura

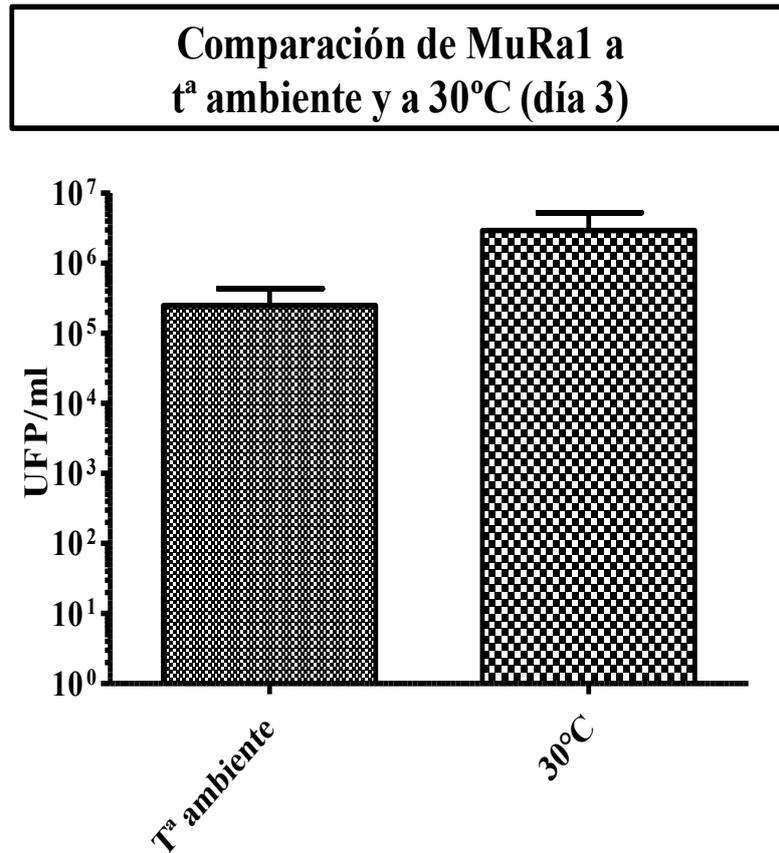
Según los datos anteriores, recogidos en la Figura 70, el BALO MuRa1 se detectó en mayor cantidad a 30°C que al resto de temperaturas del estudio. Además, a medida que la temperatura de incubación aumentó MuRa1 ofreció su recuento máximo un día antes.



**Fig. 70.** Recuento de BALOs sobre *E. coli* K-12 (MuRa1x) utilizando la técnica AMS, a distintas temperaturas (MuRa1, MuRa1a y MuRa1b) y en días sucesivos.  $p < 0,001$ \*\*\*. Tanto la temperatura como el tiempo de incubación tuvieron efecto significativo en la cantidad de BALOs detectada. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.2.5. Comparativa entre la detección de MuRa1 y MuRa1a

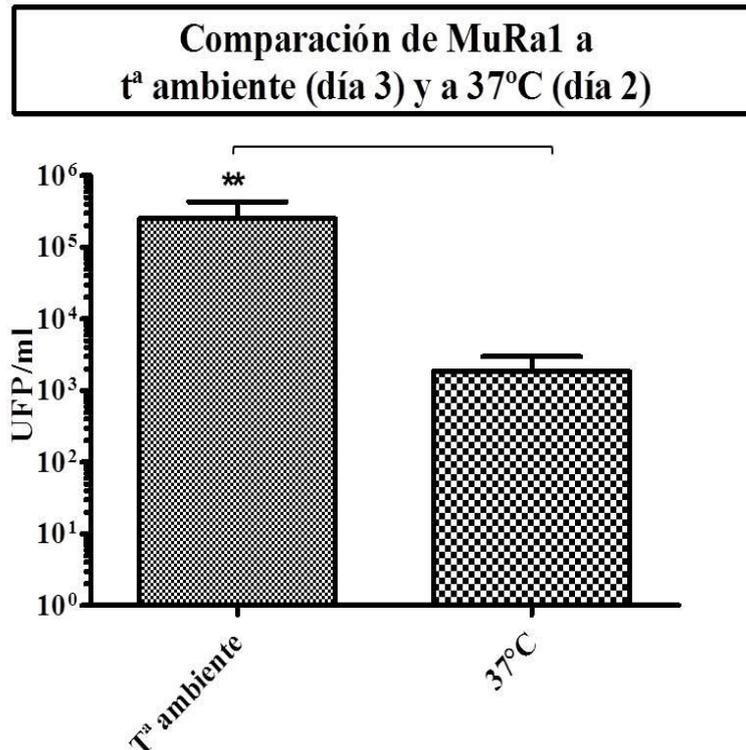
Atendiendo a los resultados que se obtuvieron al 3<sup>er</sup> día de incubación para BALOs MuRa1 detectados a temperatura ambiente y a 30°C utilizando la técnica AMS, las diferencias entre sus máximas detecciones no fueron notorias (Figura 71).



**Fig. 71.** Comparativa entre la cantidad de BALOs MuRa1 detectada a temperatura ambiente (MuRa1) y la detectada a 30°C (MuRa1a), ambos al tercer día de incubación. Las diferencias no fueron significativas. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### III-4.2.6. Comparativa entre detecciones máximas de MuRa1 y MuRa1b

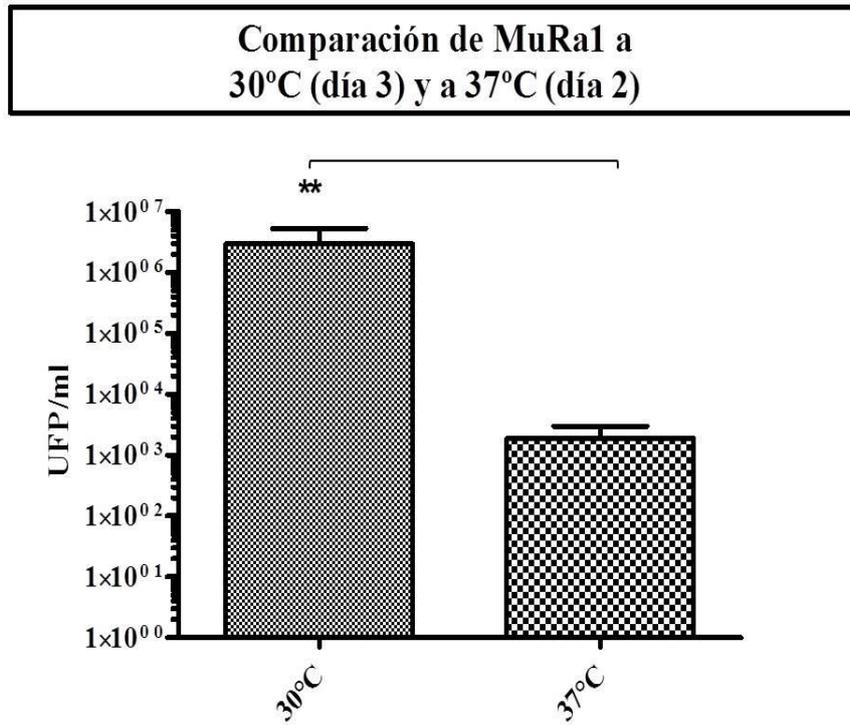
En cambio, comparando las detecciones máximas de BALOs MuRa1, con la misma técnica AMS, a temperatura ambiente con los detectados a 37°C, las diferencias sí que fueron significativas en favor de la obtenida a temperatura ambiente, como se puede observar en la Figura 72.



**Fig. 72.** Comparativa entre la cantidad de BALOs MuRa1 detectada a temperatura ambiente (MuRa1) en el tercer día de incubación y la detectada a 37°C (MuRa1b) al segundo día de incubación.  $p < 0,01$  \*\*: La detección de BALOs MuRa1 es significativamente mayor que MuRa1b. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

**III-4.2.7. Comparativa entre detecciones máximas de MuRa1a y MuRa1b**

De igual manera, las detecciones máximas de BALOs MuRa1 a 30°C también resultaron superiores con los BALOs detectados a 37°C, como muestra la Figura 73.



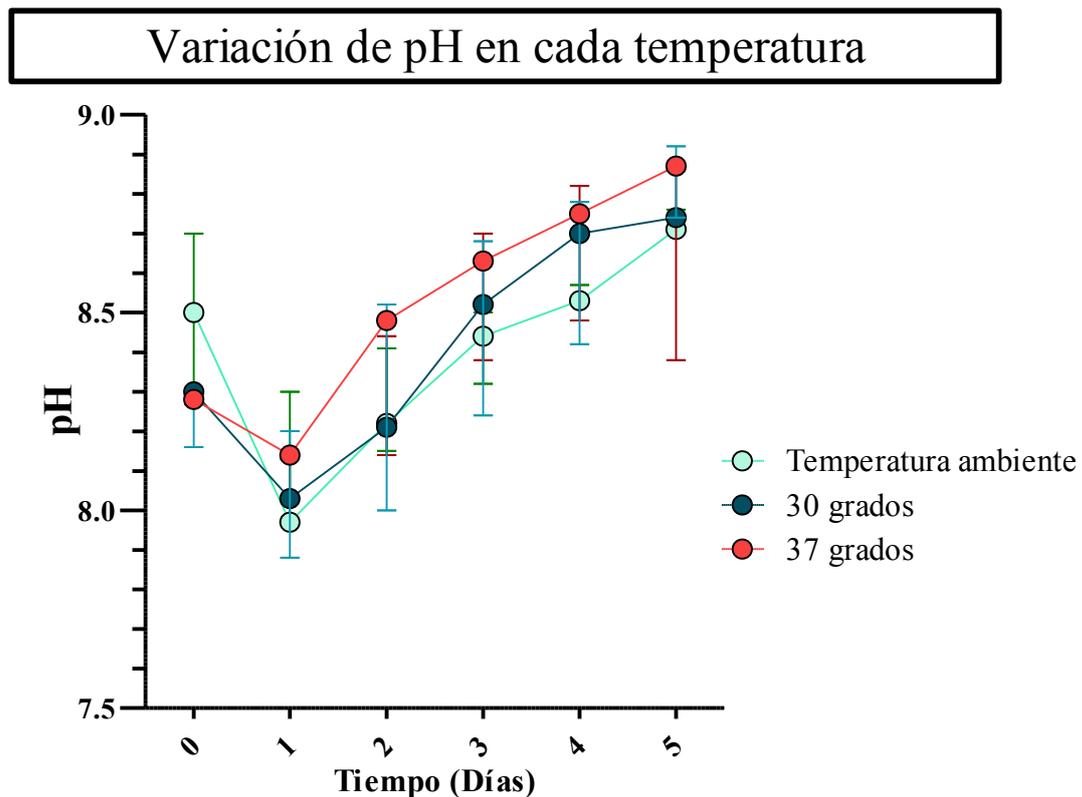
**Fig. 73.** Comparativa entre la cantidad de BALOs MuRa1 detectada a 30°C en el tercer día de incubación (MuRa1a) y la detectada a 37°C (MuRa1b) al segundo día de incubación.  $p < 0,01^{**}$ : la detección de BALOs MuRa1a fue significativamente mayor que MuRa1b. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### III-4.2.8. Comparativas de las características físico-químicas del agua de muestra a cada temperatura

La técnica AMS permitió la monitorización de multitud de parámetros importantes del agua a medida que se fueron detectando, día a día, bacterias del grupo BALOs.

#### III-4.2.8.1. pH

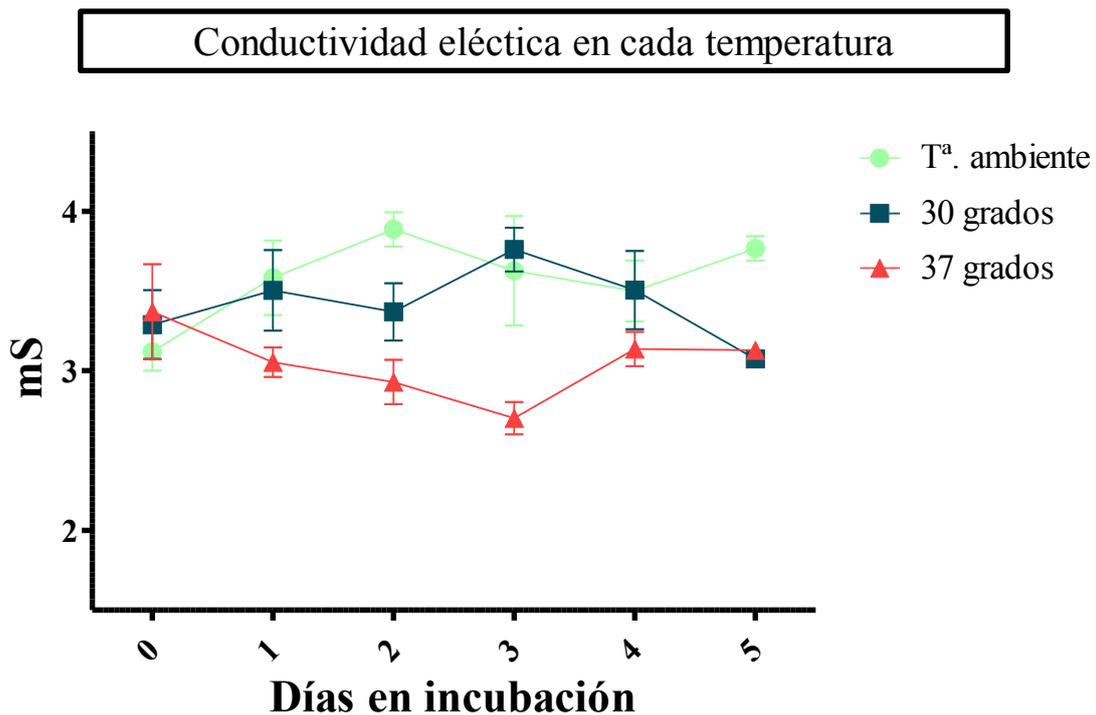
Con respecto al pH del agua cruda, de la cual los BALOs MuRa1 fueron detectados, se observó un descenso al primer día de incubación para luego ir basificándose con el paso de los días. El pH osciló entre el 8 y el 8,8 para cada temperatura estudiada (Figura 74).



**Fig. 74.** Comparativa entre la variación de pH del agua de muestra a cada una de las tres temperaturas objeto de estudio. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.2.8.2. Conductividad eléctrica

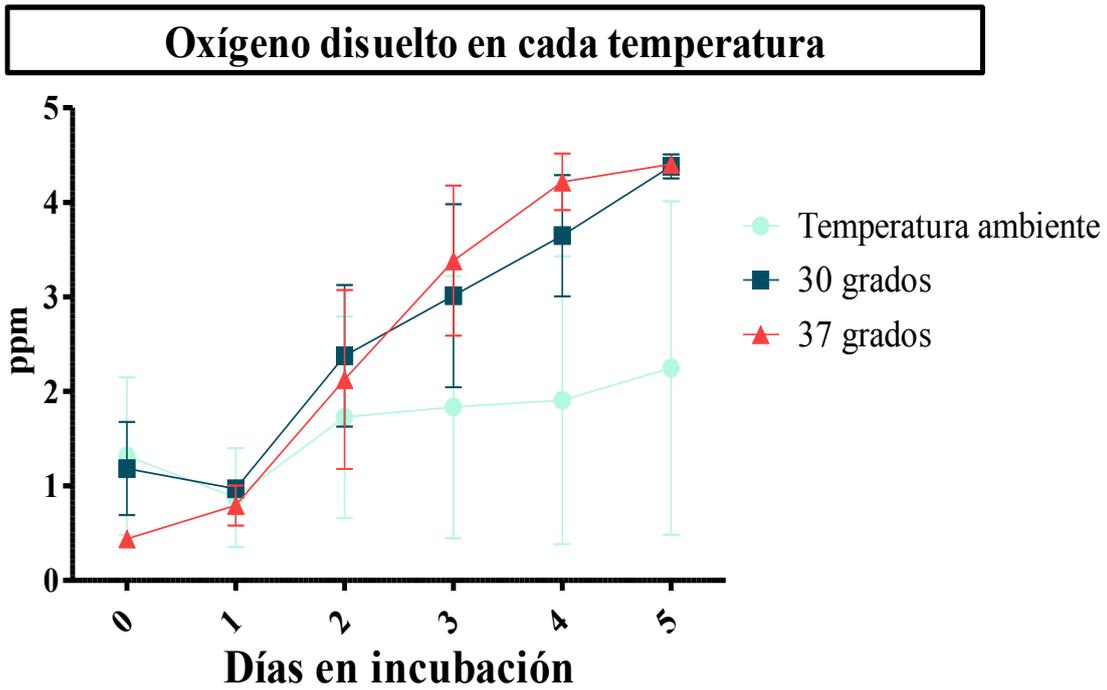
La conductividad eléctrica a 25°C presentó valores similares entre aguas incubadas a temperatura ambiente y a 30°C (de 3,2mS a 3,7mS). Además, se observó que, a 37°C, el valor fue menor, presentando valores cercanos a 3mS (Figura 75).



**Fig. 75.** Comparativa entre la variación de la conductividad a 25°C medida en el agua de muestra incubada a cada una de las tres temperaturas del estudio. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.2.8.3. Oxígeno disuelto

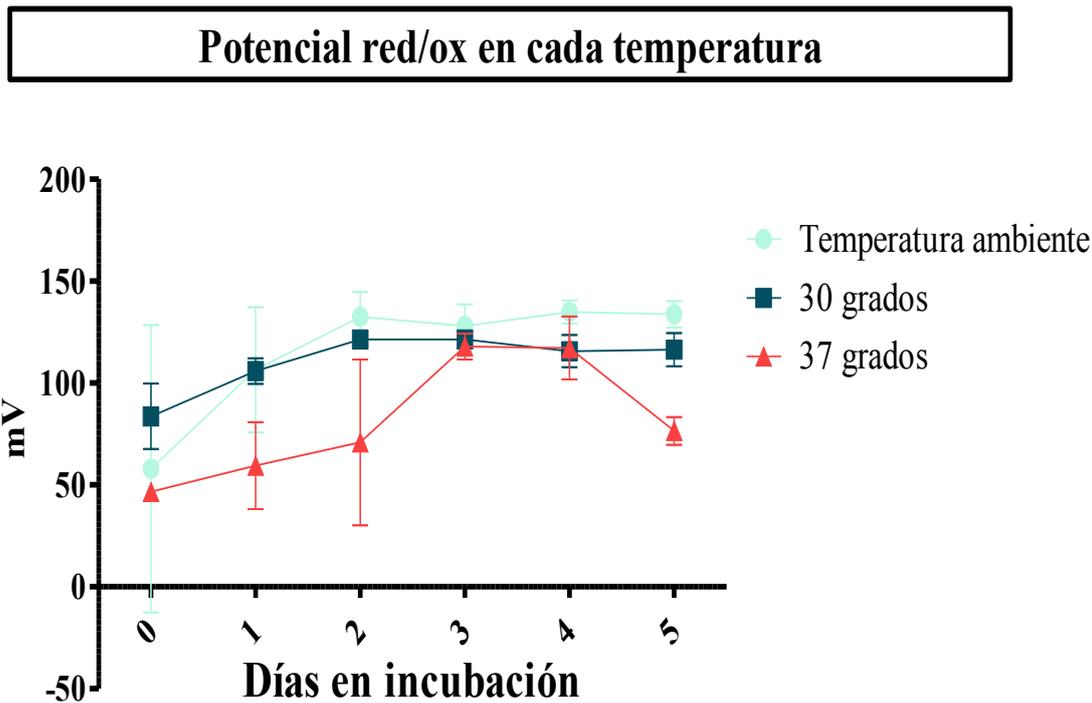
En la medición de este parámetro, se observó un ascenso a medida que pasaban los días. Este aumento de la cantidad de oxígeno disuelto tuvo lugar en las tres temperaturas estudiadas, aunque fue más acusado a 30°C y a 37°C (de 0,6 mg/l a 4,3 mg/l) que a temperatura ambiente. Los valores medios de oxígeno disuelto, aun con gran variabilidad entre ellos, se situaron entre 1,2 mg/l y 2,3 mg/l (Figura 76).



**Fig. 76.** Comparativa entre la variación del oxígeno disuelto medido en el agua de muestra y a cada una de las tres temperaturas objeto de estudio. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### III-4.2.8.4. Potencial Red-ox

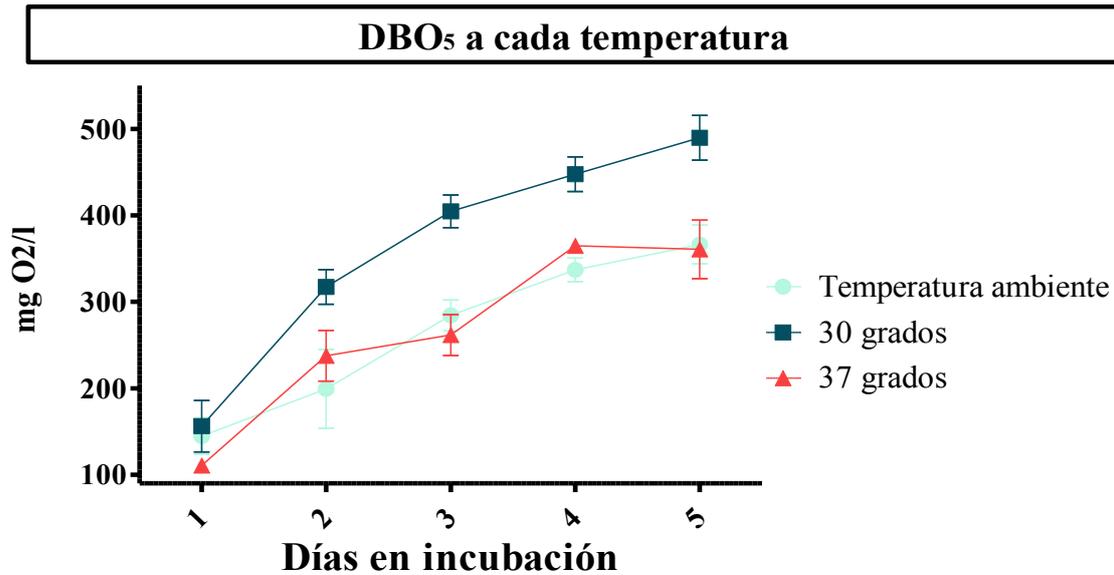
El potencial red-ox se ha mantuvo entre un rango similar en todas las muestras de agua a las diferentes temperaturas estudiadas. En particular, se observó que a temperatura ambiente la variabilidad de valores fue mayor que al resto de temperaturas. No obstante, los valores observados se situaron, de media entre 40-75mS como mínimo y entre 120-130mS como valores máximos (Figura 77).



**Fig. 77.** Comparativa entre la variación del potencial red-ox medida en el agua de muestra incubada a cada una de las tres temperaturas objeto de estudio. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### III-4.2.8.5. Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días

La Demanda Bioquímica de Oxígeno fue aumentando a con el paso de los días. Esto se observó en todas las temperaturas estudiadas y los valores mostraron un rango desde 100 mg O<sub>2</sub>/l a 500 mg O<sub>2</sub>/l (Figura 78).

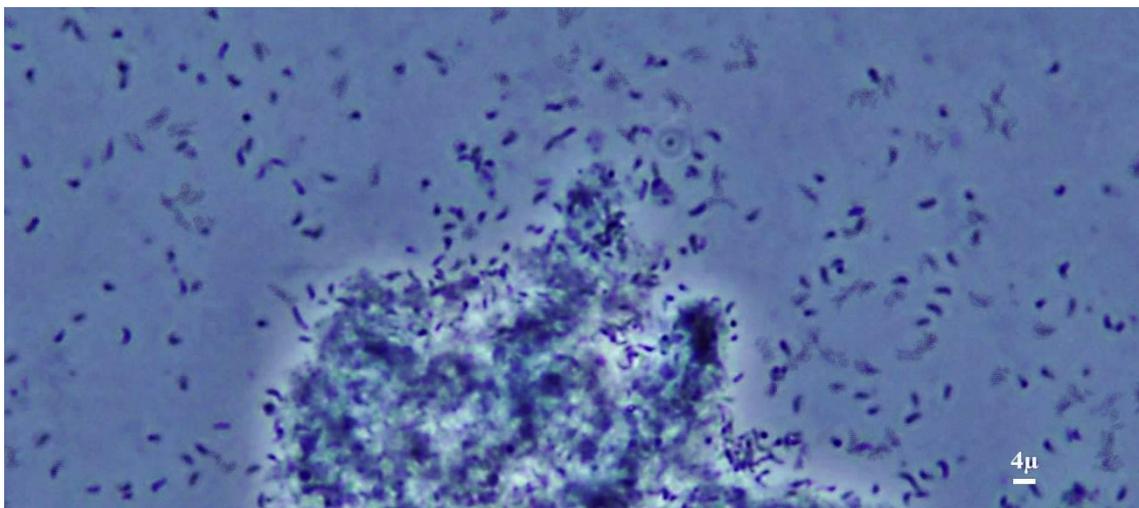


**Fig. 78.** Comparativa entre la variación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno medida en el agua de muestra incubada a cada una de las tres temperaturas objeto de estudio. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### III-4.2.9. Recuperación de BALOs sometidos a condiciones límite

#### III-4.2.9.1. Recuperación de BALOs en condiciones de depauperación

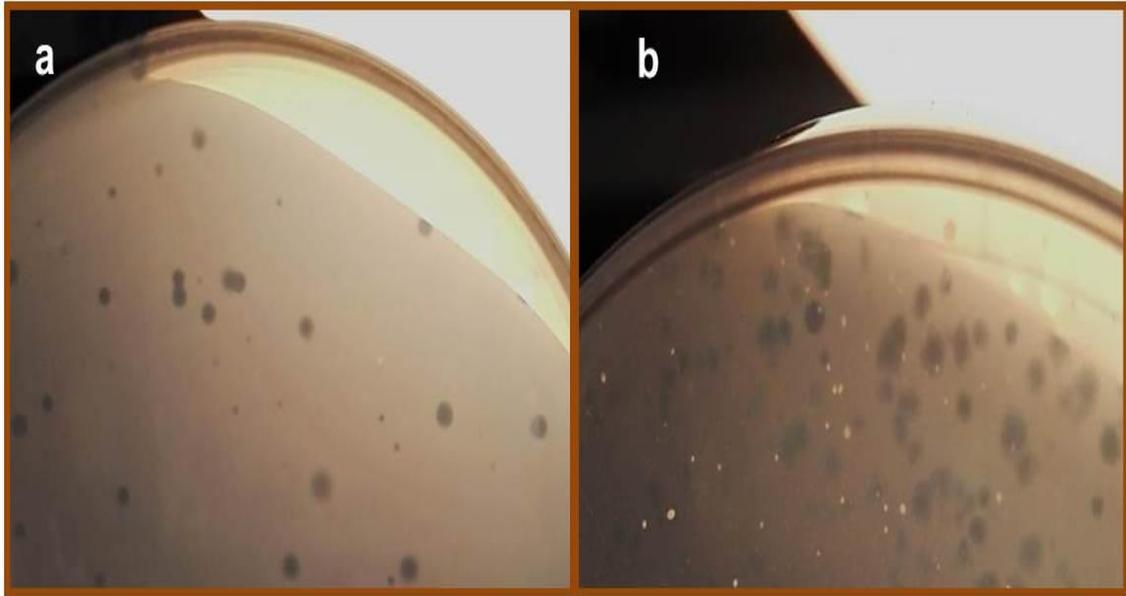
Al aumentar el tiempo de incubación de las muestras del agua con la técnica AMS, se recuperaron BALOs capaces de lisar a *E. coli* K-12 después de haber permanecido 2 meses en sin aporte externo de nutrientes (Figura 79).



**Fig. 79.** Proliferación de BALOs MuRa1 tras ser mantenidos durante 2 meses en depauperación y a una temperatura de 37°C. Microscopio óptico. Objetivo de 100x.

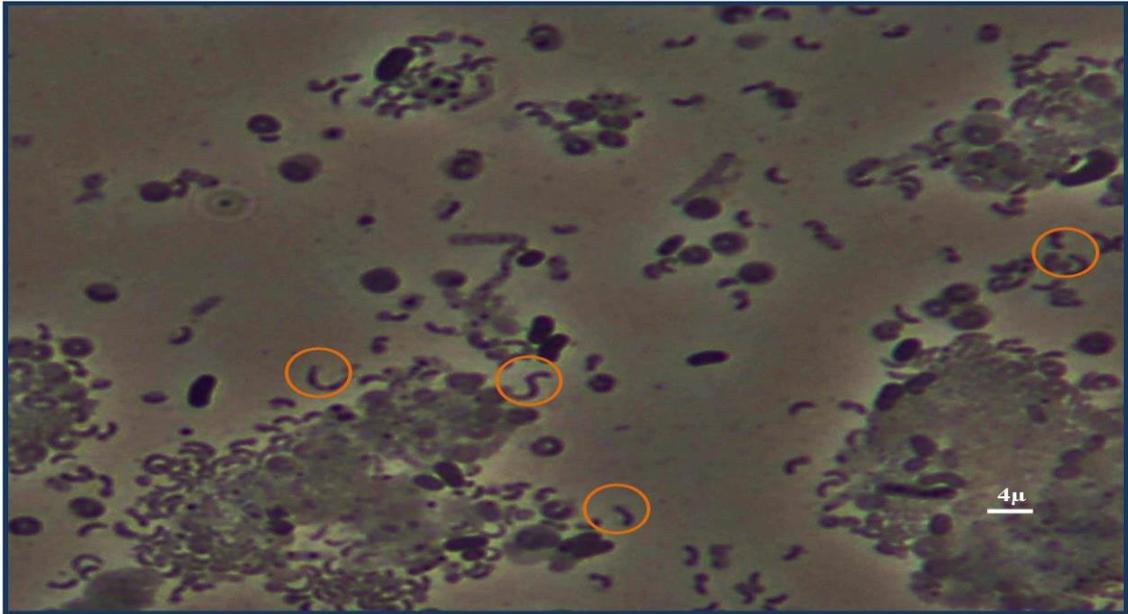
III-4.2.9.2. Detección de BALOs a 40°C

Igualmente, con el uso de la misma técnica, se detectaron y aislaron BALOs capaces de deprestar a 40°C. Como se observa en la Figura 80, las zonas de lisis aparecieron después de dos días en incubación a 40°C, resultando más difusas que las aparecidas a temperaturas inferiores.



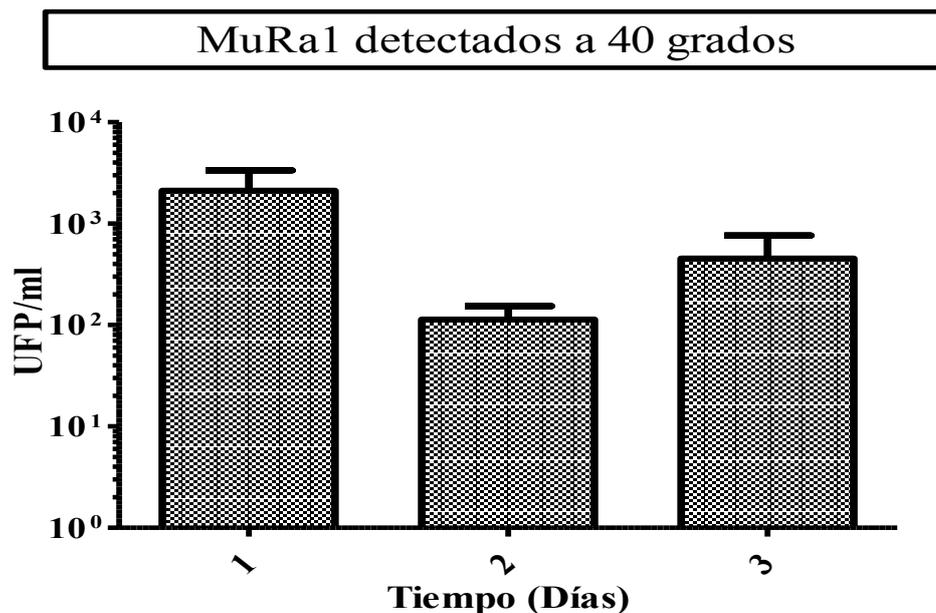
**Fig. 80.** Proliferación de MuRa1 tras una incubación a 40°C. **a)** BALOs MuRa1 detectados directamente de la muestra de agua a tiempo 0 y **b)** BALOs MuRa1 obtenidos en la misma placa tras haber permanecido 2 días en incubación a 40°C (MuRa1 $\alpha$ ).

Además, a partir de este tipo de zonas de lisis “difusas” a 40°C, se detectaron BALOs morfológicamente diferentes a los BALOs típicos (Figura 81), resultando ser un tipo de BALO con un mayor tamaño y una movilidad menor los BALOs “estándar” (denominado MuRa1 $\alpha$ ).



**Fig. 81.** BALOs MuRa1 $\alpha$  detectados a partir del BALO MuRa1 tras una incubación a 40°C. Se puede observar el aumento de tamaño de las cepas (rodeado de naranja). Objetivo 100x.

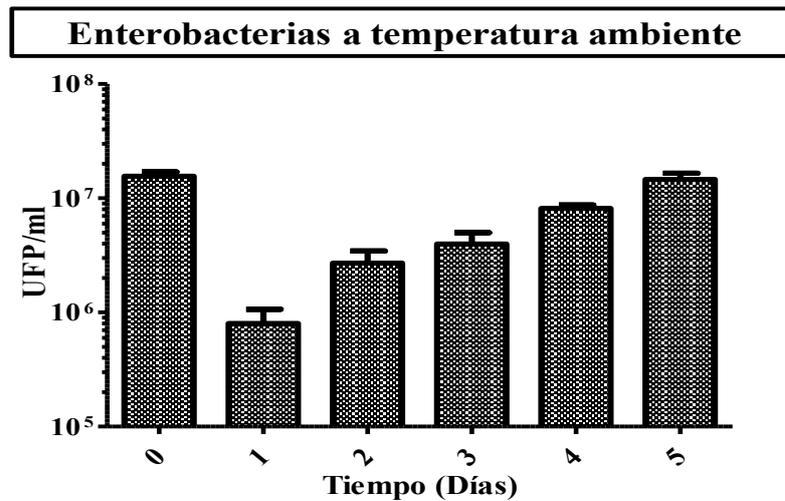
Tras el recuento diario de la cepa de BALO MuRa1 $\alpha$  utilizando la técnica AMS, y como muestra la Figura 82, se observó como las cantidades de BALOs detectadas son inferiores a los BALOs obtenidos en las demás temperaturas del estudio. También se observó una cantidad de BALOs MuRa1 $\alpha$  mayor en el primer día de incubación en comparación con el resto (Figura 82).



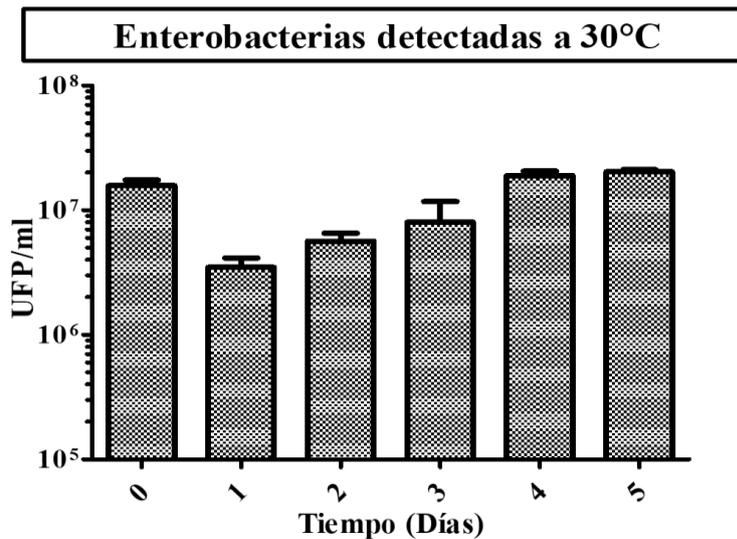
**Fig. 82.** Cantidad de BALOs MuRa1 detectada en cada uno de los días incubados a 40°C (MuRa1 $\alpha$ ). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

**III-4.2.10. Recuento de enterobacterias tras la detección de BALOs MuRa1**

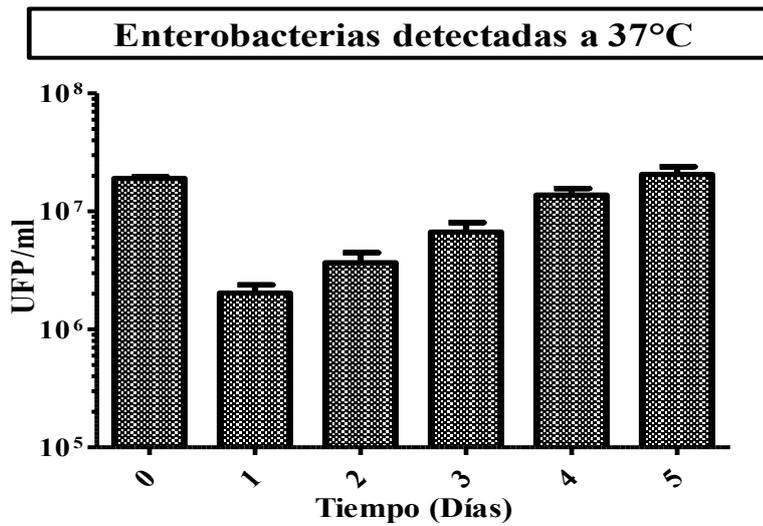
A la vez que se detectaron BALOs MuRa1 de las muestras de agua con la técnica AMS, se estableció un recuento diario de enterobacterias (posibles bacterias presa) procedentes la misma muestra. Según este estudio, se observó que la población de enterobacterias detectadas se mantuvo baja hasta el 3<sup>er</sup> día de incubación, donde aumentó tanto a temperatura ambiente (Figura 83), como a 30°C (Figura 84) y a 37°C (Figura 85).



**Fig. 83.** Cantidad de enterobacterias detectadas en cada uno de los días tras la incubación de la muestra a temperatura ambiente. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

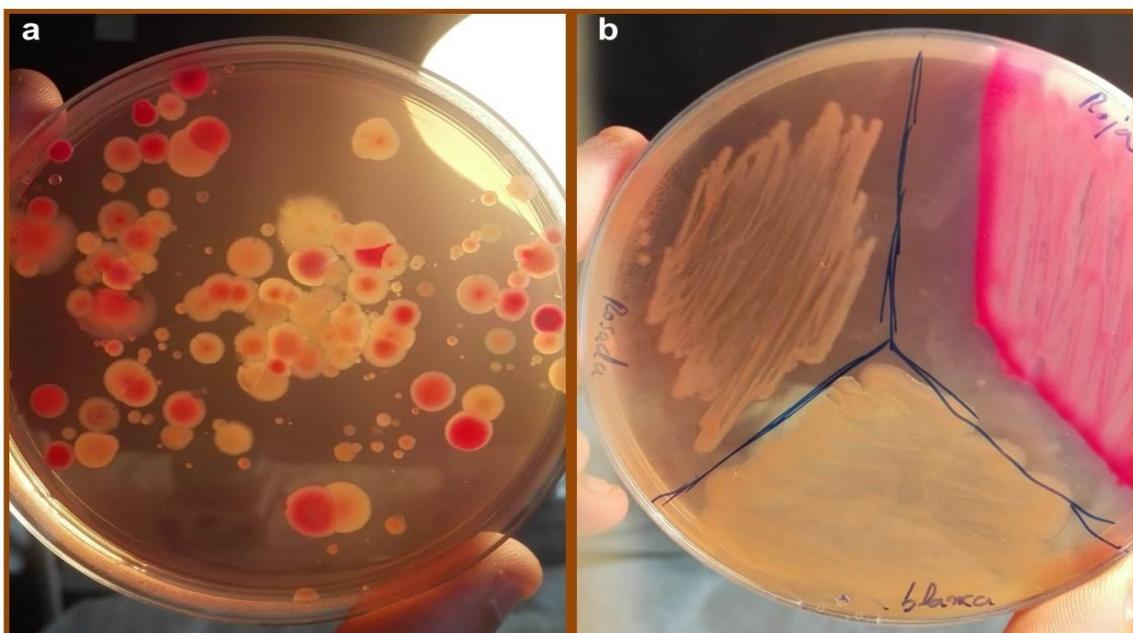


**Fig. 84.** Cantidad de enterobacterias detectadas en cada uno de los días tras una incubación de la muestra a 30°C. Datos representados: medias +/- desviación estándar.



**Fig. 85.** Cantidad de enterobacterias detectadas en cada uno de los días tras la incubación de la muestra a 37°C. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

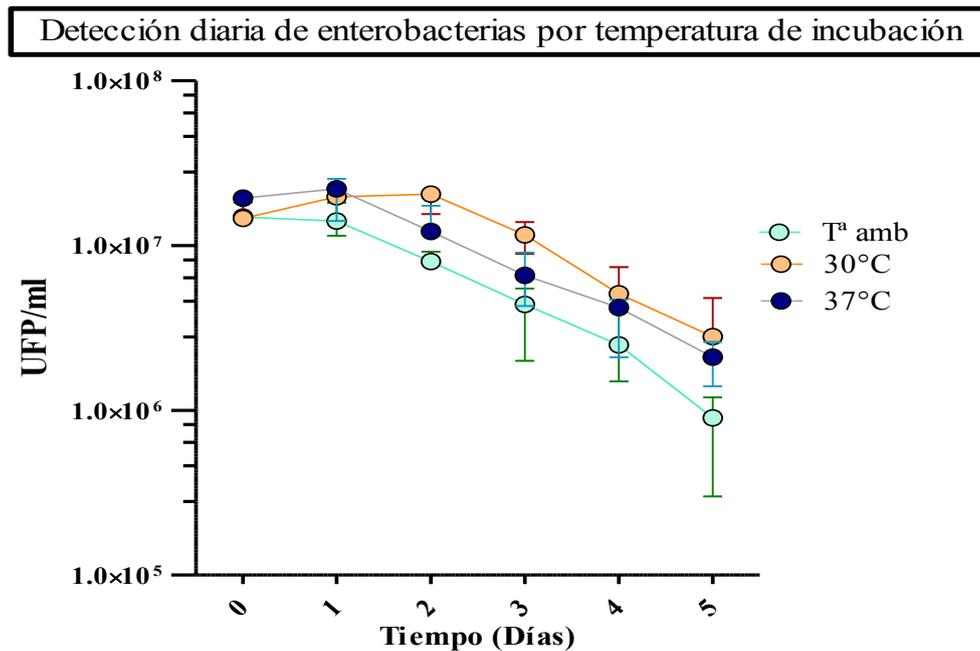
También se observaron, al menos, tres tipos de colonias distintas de enterobacterias según observaciones directas en placa (Figura 86).



**Fig. 86.** Enterobacterias detectadas en placas de McConkey Cristal Violeta tras una incubación a 30°C. **a)** Colonias detectadas directamente del agua de muestra y **b)** esas mismas colonias resembradas y aisladas.

### III-4.2.11. Variación en la detección de enterobacterias según la temperatura

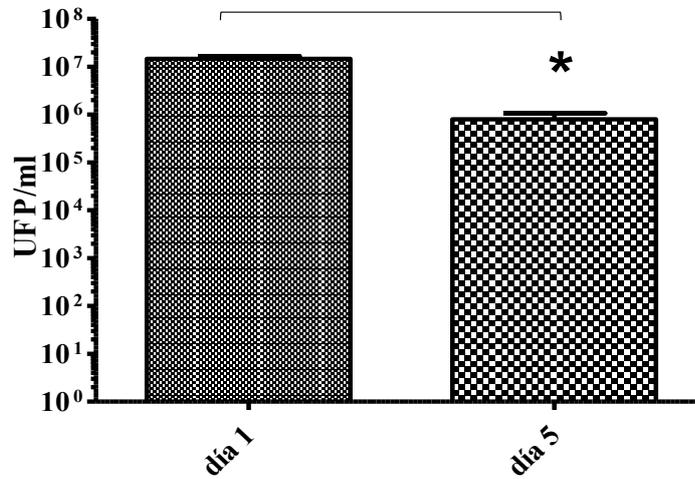
Basándose en los datos anteriores, en el estudio comparativo de las enterobacterias detectadas en la misma muestra de donde se detectaron BALOs MuRa1, se observó un descenso de la cantidad de enterobacterias con el paso del tiempo. Esta tendencia fue observada para cada temperatura del estudio (Figura 87).



**Fig. 87.** Recuento de enterobacterias utilizando la técnica AMS, a distintas temperaturas y en días sucesivos. La cantidad detectada es similar. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

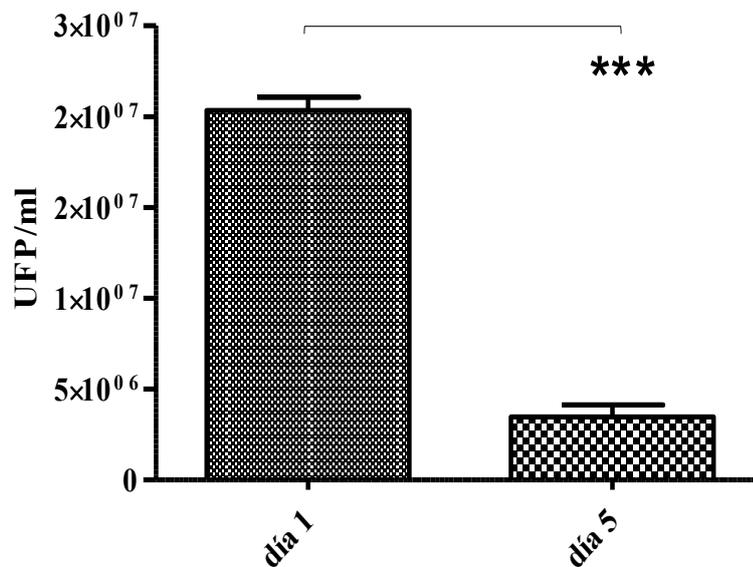
Tanto a temperatura ambiente (Figura 88), como a 30°C (Figura 89) y a 37°C (Figura 90), resultaron significativas las diferencias entre las enterobacterias detectadas al 1<sup>er</sup> día de incubación y las detectadas al 5<sup>o</sup> día.

Detección de enterobacterias al primer y último día de incubación a  $t^a$  ambiente

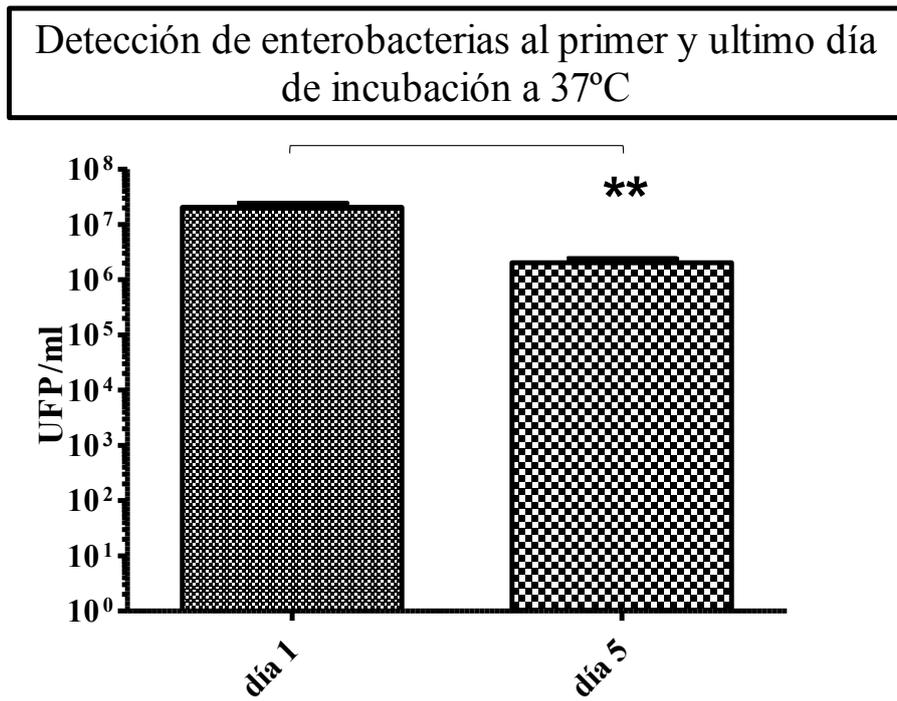


**Fig. 88.** Comparativa entre la cantidad de enterobacterias detectada a temperatura ambiente en el primer día de incubación y la detectada al quinto día de incubación;  $p < 0,05^*$ : la cantidad detectada en el primer día fue significativamente superior con respecto a las detectadas al quinto día. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Detección de enterobacterias al primer y último día de incubación a  $30^{\circ}\text{C}$



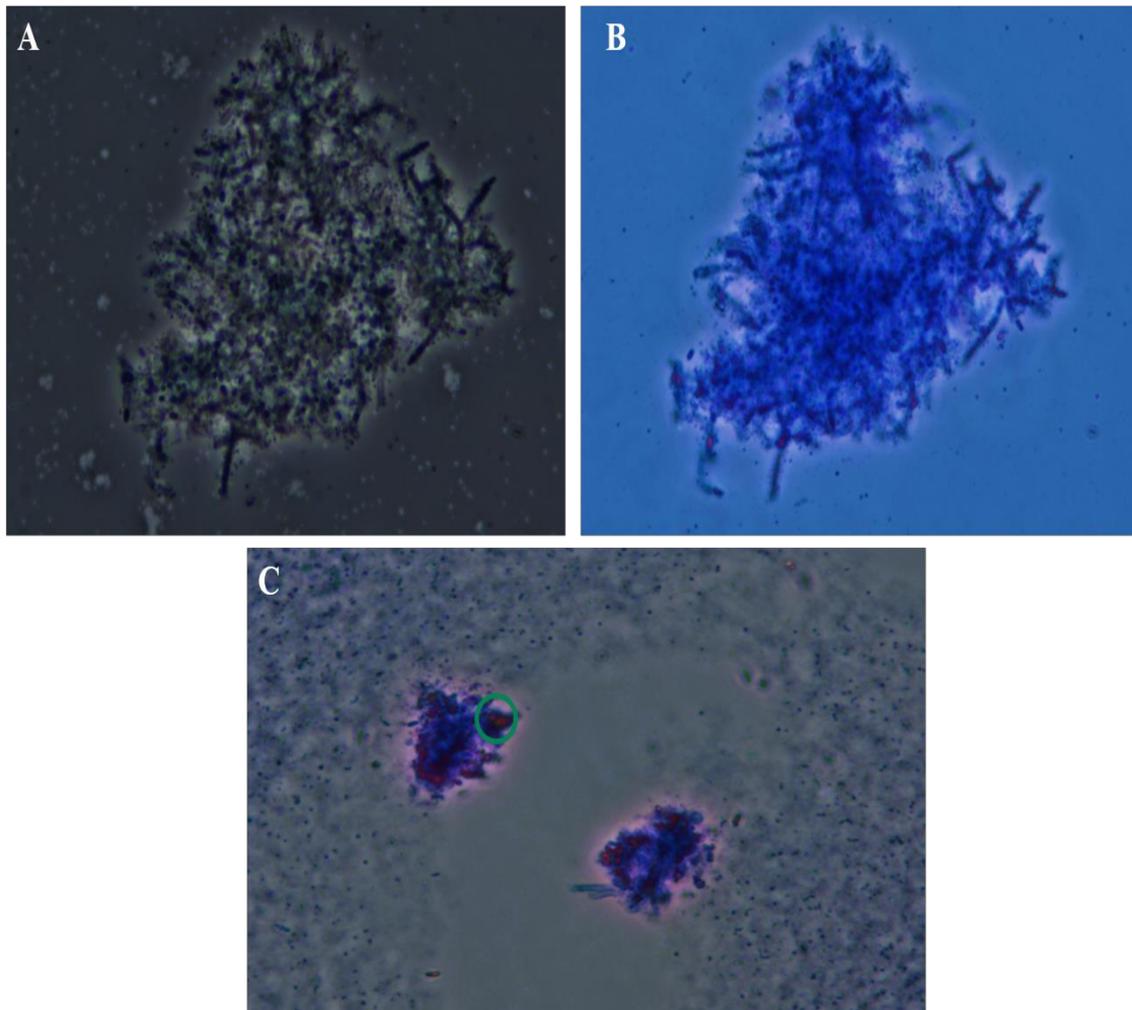
**Fig. 89.** Comparativa entre la cantidad de enterobacterias detectada a  $30^{\circ}\text{C}$  en el primer día de incubación y la detectada al quinto día de incubación;  $p < 0,001^{***}$ : la cantidad detectada en el primer día fue significativamente superior con respecto a las detectadas al quinto día. Datos representados: medias +/- desviación estándar.



**Fig. 90.** Comparativa entre la cantidad de enterobacterias detectada a 37°C en el primer día de incubación y la detectada al quinto día de incubación;  $p < 0,01$  \*\*: la cantidad detectada en el primer día fue significativamente superior con respecto a las detectadas al quinto día. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

**III-4.2.12. Colonias de *E. coli* K-12 resistentes a la depredación**

De forma general, ante la depredación en placa del BALO MuRa1, en cualquiera de sus variantes, a *E. coli* K-12, se observaron agrupaciones de bacterias presa que no fueron devoradas por los BALOs. Los cúmulos bacterianos que se pueden observar en la Figura 91, resistieron a la depredación aun habiendo una lisis generalizada en la placa de revelado.

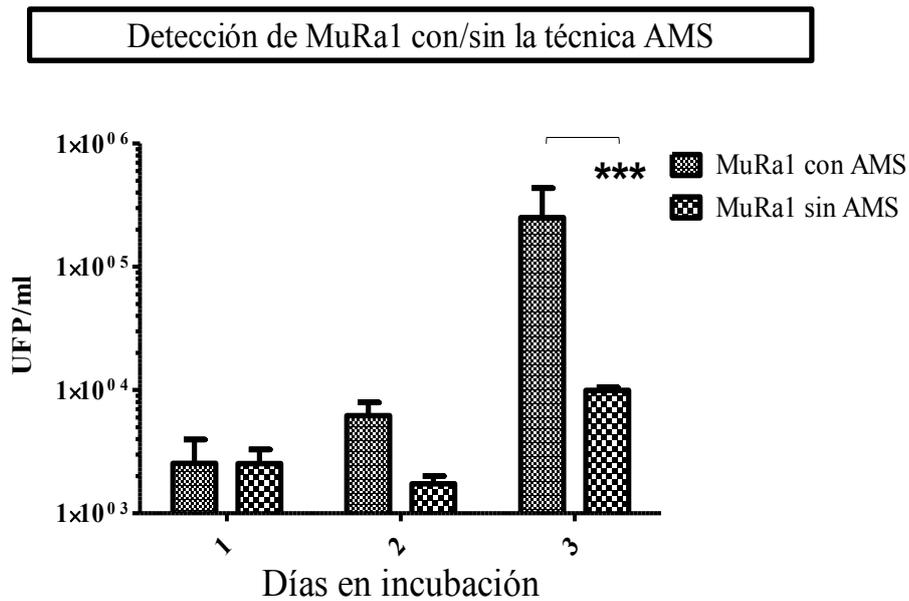


**Fig. 91.** Agrupaciones en placa de *E. coli* K-12 no depredadas por el BALO MuRa1a. **A)** *E. coli* K-12 resistentes si tinción alguna. **B)** la misma agrupación de *E. coli* K-12 teñidas con azul de metileno para favorecer el contraste de los nucleoides bacterianos. **C)** nucleoides bacterianos contrastados en rojo (círculo verde). Imágenes realizadas en contraste de fase (objetivo de 100x).

### III-4.2.13. Eficiencia de la técnica AMS en la detección de BALOs MuRa1

#### III-4.2.13.1. Comparativa a temperatura ambiente

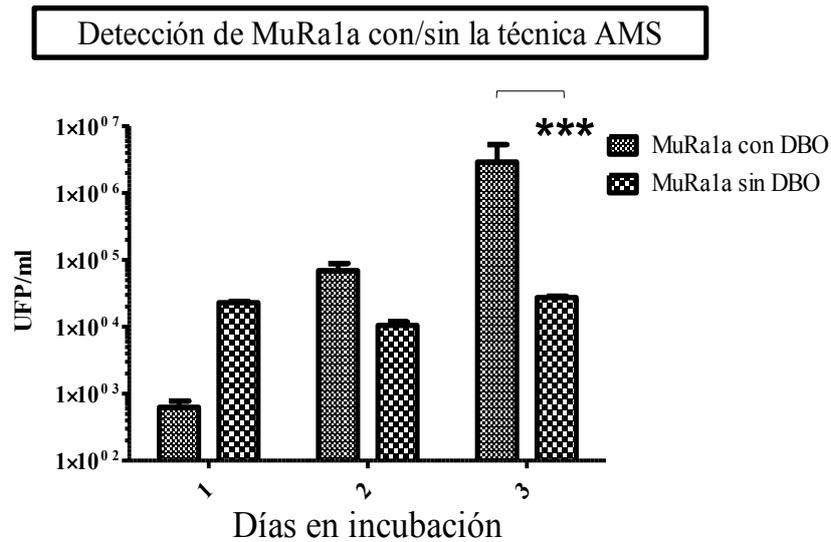
A temperatura ambiente se observó cómo, en el día de detección máxima (al 3<sup>er</sup> día de incubación), la cantidad de BALOs MuRa1 detectada utilizando la técnica AMS fue un 96% mayor que la que se detectó sin el uso de esta técnica (Figura 92).



**Fig. 92.** Comparativa entre la cantidad de BALOs MuRa1 detectada al tercer día de incubación y a temperatura ambiente utilizando la técnica AMS y sin ella.  $p < 0,001^{***}$ : la cantidad de MuRa1 detectada utilizando la técnica AMS resultó significativamente superior con respecto a cuando no empleó. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### III-4.2.13.2. Comparativa a 30°C

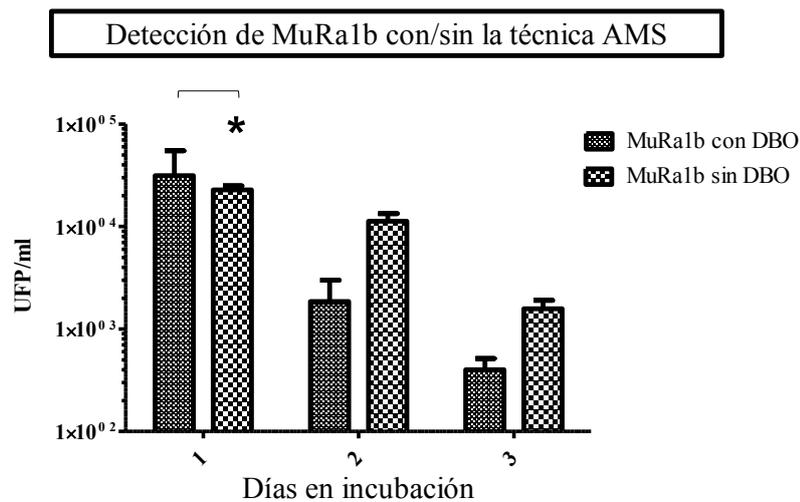
A 30°C, también se observó como en el día de detección máxima (durante el 3<sup>er</sup> día), la diferencia entre MuRa1a detectado por medio de la técnica AMS fue un 99% mayor que la detectada sin autoenriquecimiento de la muestra (Figura 93).



**Fig. 93.** Comparativa entre la cantidad de BALOs MuRa1a detectada al tercer día de incubación y a 30°C utilizando la técnica AMS y sin usarla.  $p < 0,001$  \*\*\*: la cantidad de MuRa1a detectada utilizando la técnica AMS fue significativamente superior con respecto a cuando no utilizó. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### III-4.2.13.3. Comparativa a 37°C

A 37°C, de igual manera, se observó como en el día de detección máxima (durante el 1<sup>er</sup> día), aunque la diferencia resultó ser menos acusada que al resto de temperaturas. En concreto, la diferencia entre MuRa1b detectado utilizando la técnica AMS fue un 27,2% mayor que la que se detectó sin el uso de esta técnica (Figura 94).



**Fig. 94.** Comparativa entre la cantidad de BALOs MuRa1b detectada al tercer día de incubación y a 37°C utilizando la técnica AMS y sin hacer uso de ella.  $p < 0,05$  \*: la cantidad de MuRa1b detectada utilizando la técnica AMS fue significativamente superior con respecto a cuando no se empleó. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

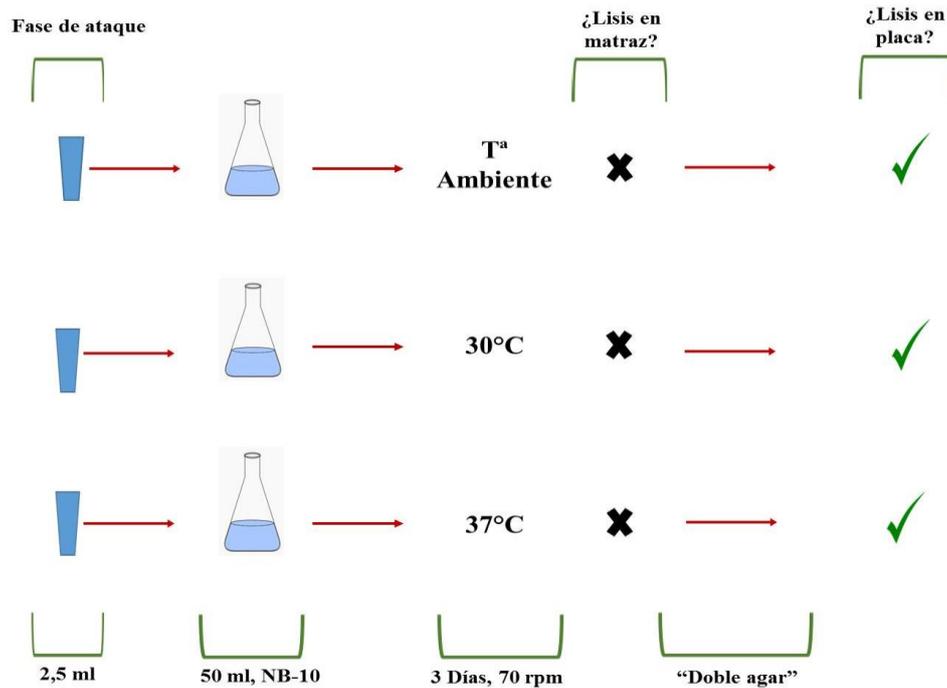
### **III-4.3. PRESERVACIÓN DE BALOs A LARGO PLAZO Y DEFINICIÓN DE UNA TÉCNICA PARA SU REACTIVACIÓN**

Las diferentes investigaciones que se realizaron en este estudio tuvieron como objetivo el lograr una preservación a largo plazo de aquellas bacterias del grupo BALOs aisladas de la E.D.A.R y, sobre todo, obtener una técnica de recuperación efectiva de BALOs MURa1, MuRa5 y MuRa6 tanto en placa como en medio líquido.

#### **III-4.3.1. Reactivación directa de BALOs**

Tras realizar previamente una ultracongelación efectiva de los BALOs MuRa1 MuRa5 y MuRa6 como se indica en “Material y Métodos”, se propuso reactivar dichas cepas añadiendo el contenido del criovial directamente al medio líquido NB-10. En esas condiciones, las distintas cepas de BALOs previamente ultracongeladas mostraron una capacidad nula de recuperación a los 3 días de permanecer a temperatura ambiente y tampoco tras una incubación a 30°C o a 37°C.

Tras comprobar que las bacterias presa conseguían crecer en esos matraces sin presencia de BALOs, se volvió a intentar una reactivación en placa partir una alícuota de los matraces inactivos anteriores resultando en una reactivación positiva para MuRa1, MuRa5 y MuRa6 a temperatura ambiente, a 30°C y a 37°C. El resumen del procedimiento para la reactivación de BALOs se muestra en la Figura 95.



**Fig. 95.** Esquema del procedimiento seguido en la reactivación a distintas temperaturas, en medio líquido NB-10 y posteriormente en placas NA-10, de BALOs MuRa1, MuRa6 y MuRa5 ultracongelados previamente en fase de ataque

### III-4.3.2. Recuperación de BALOs en placa desde su ultracongelación

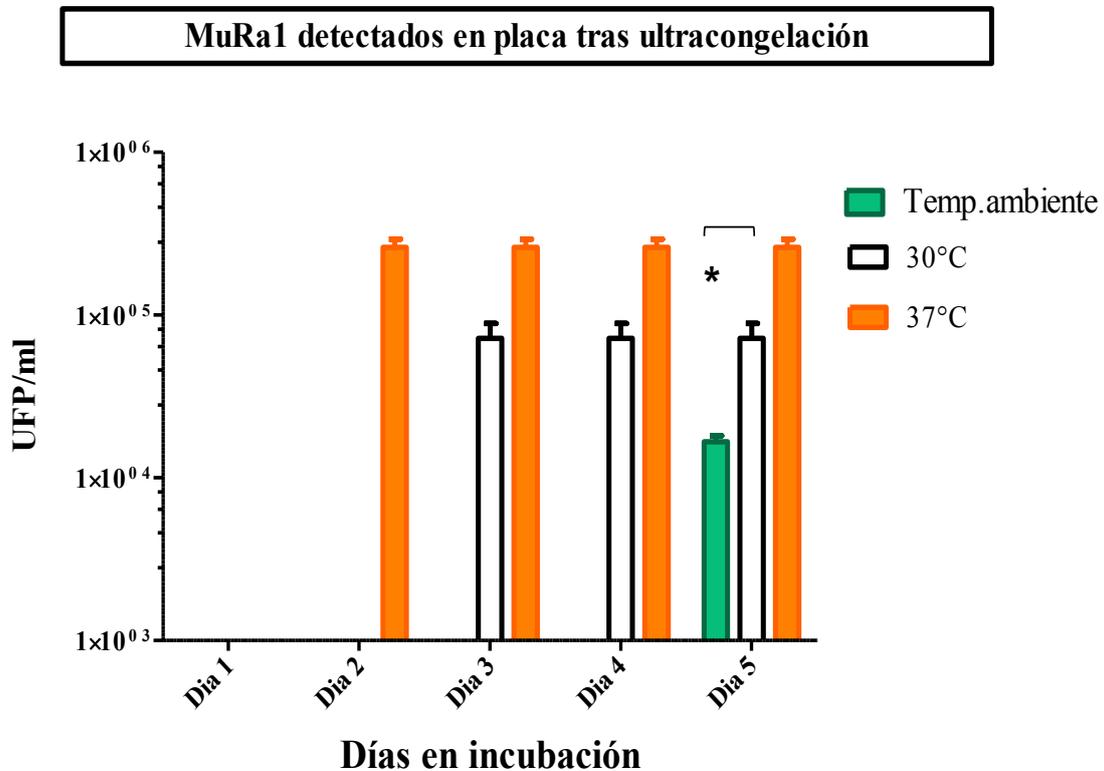
Debido a haber logrado la reactivación de las cepas de BALOs MuRa1, MuRa5 y MuRa6 en placa tras no haberse detectado lisis de las mismas en medio líquido, se realizó un estudio para analizar la capacidad de recuperación y el tiempo transcurrido en la detección en placa de las distintas cepas de BALO, a distintas temperaturas y con la adición de dos tipos de nutrientes.

#### III-4.3.2.1. Detección de MuRa1

La detección en placa de MuRa1 desde los matraces inactivos previamente filtrados, fue cuantificada a distintas temperaturas, ofreciendo los siguientes resultados:

A temperatura ambiente, la cepa MuRa1 se detectó al 5º día de incubación con una cantidad media de  $1,77 \times 10^4$  UFP/ml, a 30°C, la detección se hizo efectiva al 3º día de incubación y con una cantidad media de  $7,21 \times 10^4$  UFP/ml y a 37°C se detectó al 2º día y con una cantidad media de  $2,63 \times 10^5$  UFP/ml. Como se puede observar en la Figura 96, la

detección de MuRa1 tenía lugar más tarde cuando la temperatura de incubación fue menor.

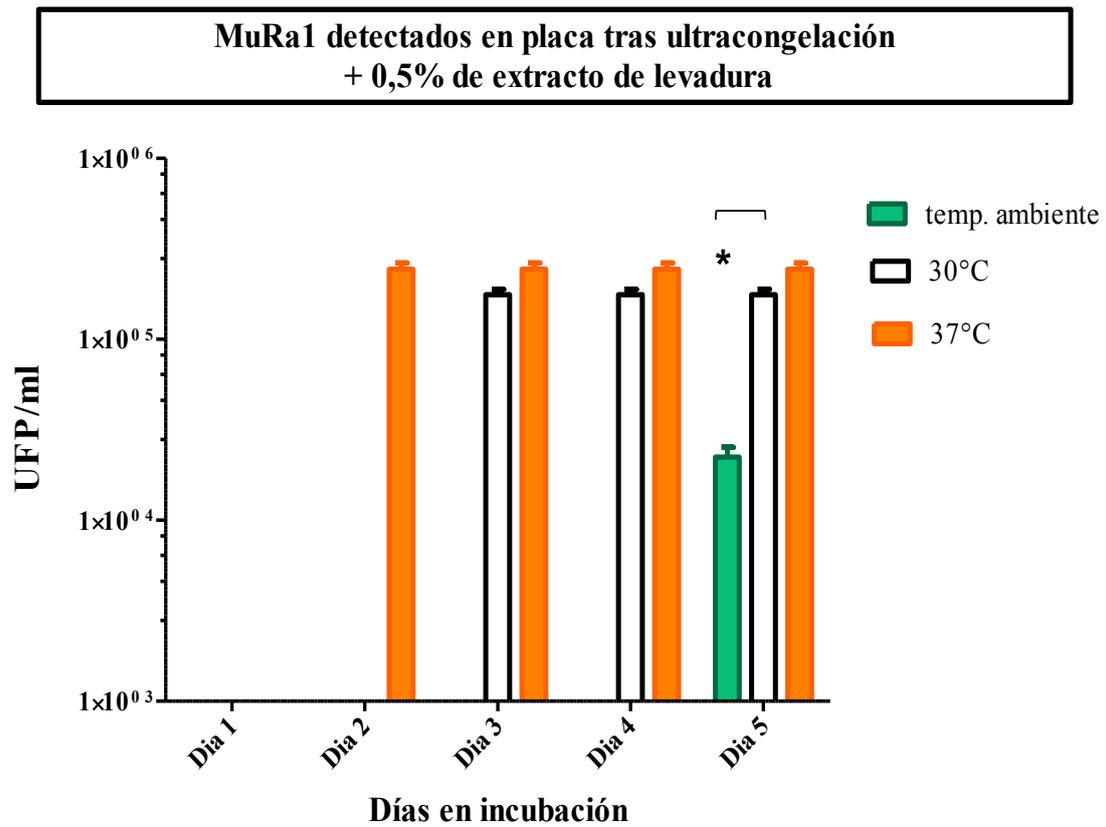


**Fig. 96.** Cantidad de BALOs MuRa1 detectada para cada una de las temperaturas de incubación y tras haber sido ultracongelados en fase de ataque.  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALOs detectada a 30°C fue significativamente mayor que a temperatura ambiente. Datos representados: medias  $\pm$  desviación estándar.

#### III-4.3.2.2. Detección de MuRa1 añadiendo 0,5% de extracto de levadura

Igual que en el ensayo anterior, se cuantificó la cantidad y el tiempo en el que la cepa de BALO MuRa1 fue detectada a distintas temperaturas tras añadir extracto de levadura al cultivo líquido inactivo, ofreciendo los siguientes resultados:

A temperatura ambiente, la cepa MuRa1 se detectó al 5º día de incubación con una cantidad media de  $2,23 \times 10^4$  UFP/ml, a 30°C, la detección se produjo al 3º día de incubación y con una cantidad media de  $1,76 \times 10^5$  UFP/ml y a 37°C se detectó al 2º día y con una cantidad media de  $2,23 \times 10^4$  UFP/ml. Como indica la Figura 97, tras la adición de extracto de levadura al cultivo inactivo, la detección en placa de MuRa1 tuvo lugar en mayor medida.

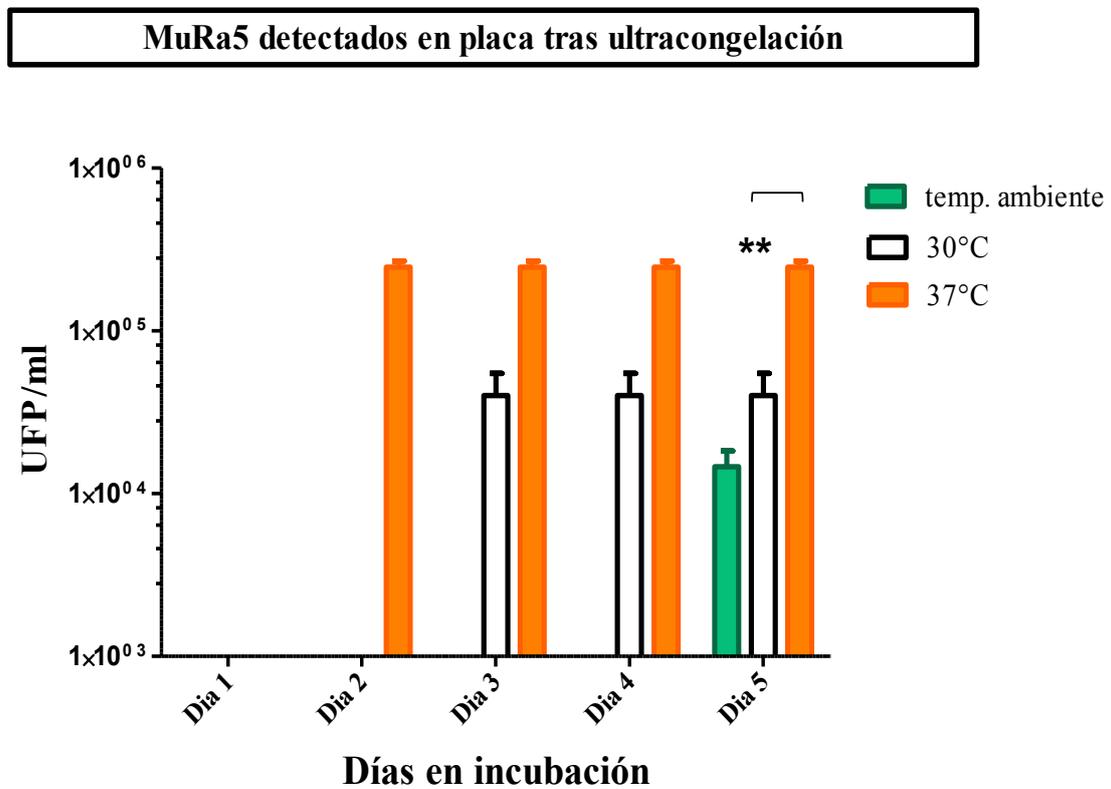


**Fig. 97.** Cantidad de BALOs MuRa1 detectada para cada una de las temperaturas de incubación y tras haber sido ultracongelados en fase de ataque y 0.5% de extracto de levadura.  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALOs detectada a 30°C fue significativamente mayor que a temperatura ambiente. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.3.2.3. Detección de MuRa5

Para la cepa de BALO MuRa5 la cantidad detectada en placa a lo largo de los 5 días de incubación en el cultivo inactivo fue la siguiente:

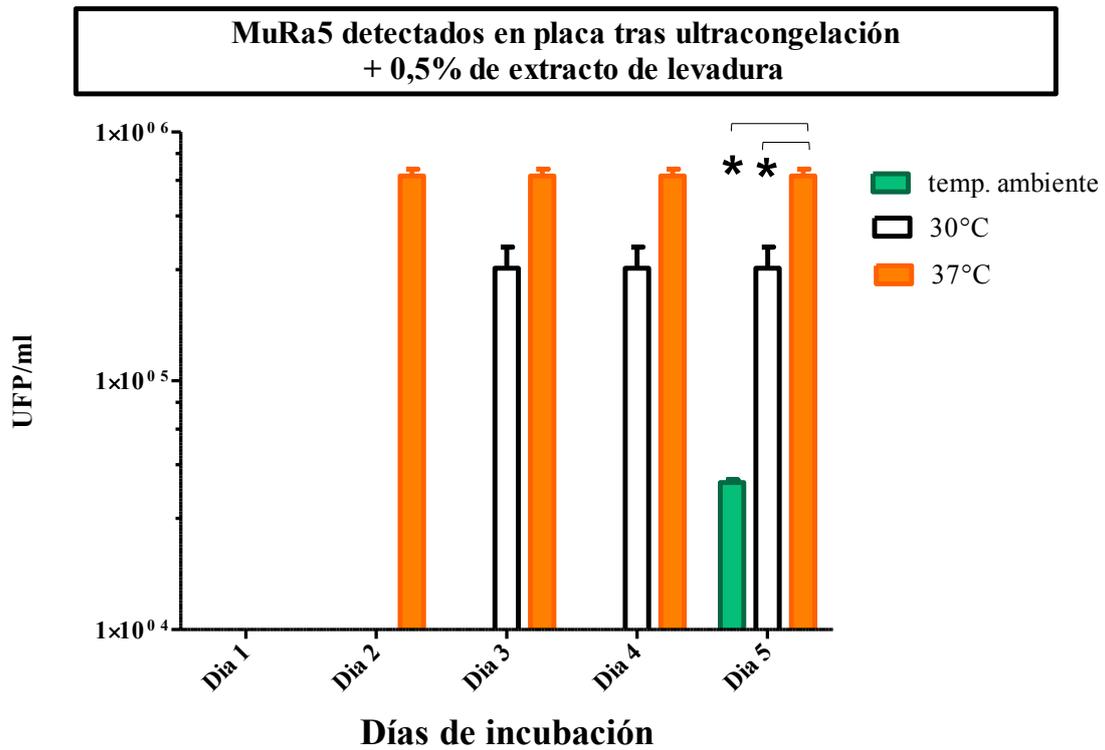
A temperatura ambiente, la cepa MuRa5 se detectó de nuevo al 5º día de incubación con una cantidad media de  $1,47 \times 10^4$  UFP/ml, a 30°C y al 3º día de incubación se detectaron  $4,03 \times 10^4$  UFP/ml y a 37°C se detectó al 2º día y con una cantidad media de  $2,55 \times 10^5$  UFP/ml. La detección de MuRa5 fue bastante similar a la producida por MuRa1 en las mismas condiciones, como se pudo observar en la Figura 98.



**Fig. 98.** Cantidad de BALOs MuRa5 detectada para cada una de las temperaturas de incubación y tras haber sido ultracongelados en fase de ataque.  $p < 0,01^{**}$ : la cantidad de BALOs detectada a 37°C fue significativamente mayor que a 30°C. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.3.2.4. Detección de MuRa5 añadiendo 0,5% de extracto de levadura

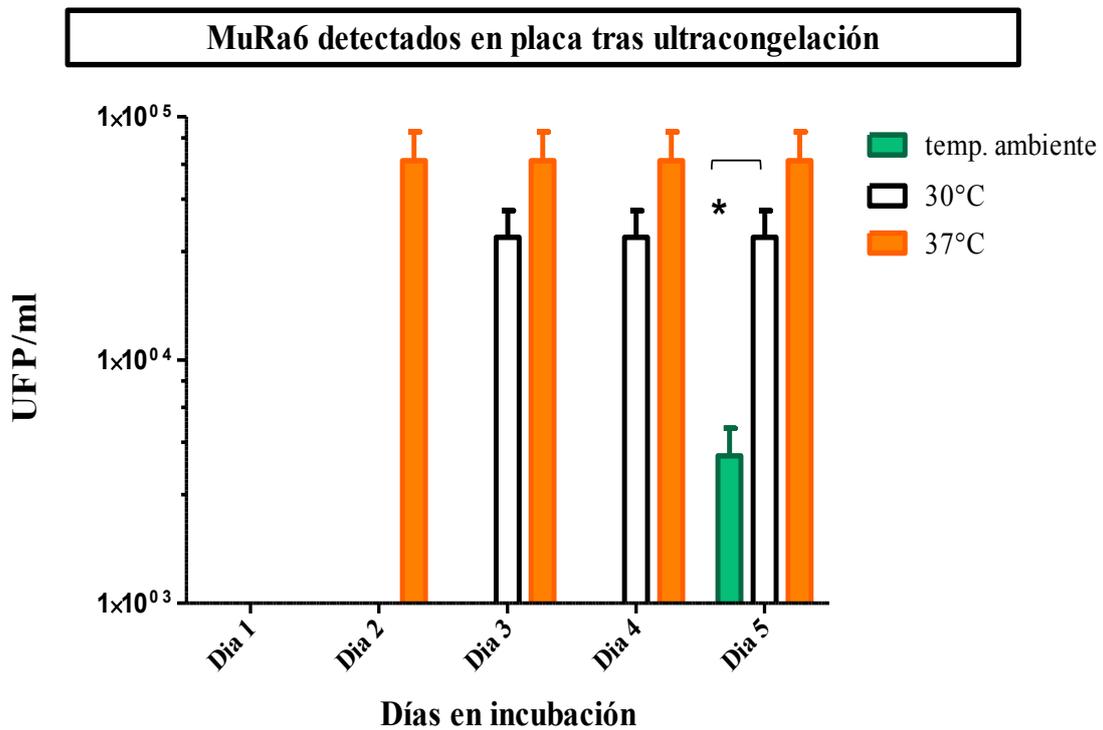
Tras la adición de extracto de levadura, las cantidades de la cepa MuRa5 detectadas experimentaron un aumento, como se puede observar en la (Figura 99). A temperatura ambiente la cepa MuRa5 se volvió a detectar al 5º día de incubación con una cantidad media de  $3,92 \times 10^4$  UFP/ml, a 30°C, la detección se hizo efectiva al 3º día de incubación y con una cantidad media de  $2,83 \times 10^5$  UFP/ml y a 37°C se detectó al 2º día y con una cantidad media de  $6,67 \times 10^5$  UFP/ml.



**Fig. 99.** Cantidad de BALOs MuRa5 detectada para cada una de las temperaturas de incubación y tras haber sido ultracongelados en fase de ataque y 0.5% de extracto de levadura.  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALOs detectada a 37°C fue significativamente mayor que a 30°C y a temperatura ambiente. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.3.2.5. Detección de MuRa6

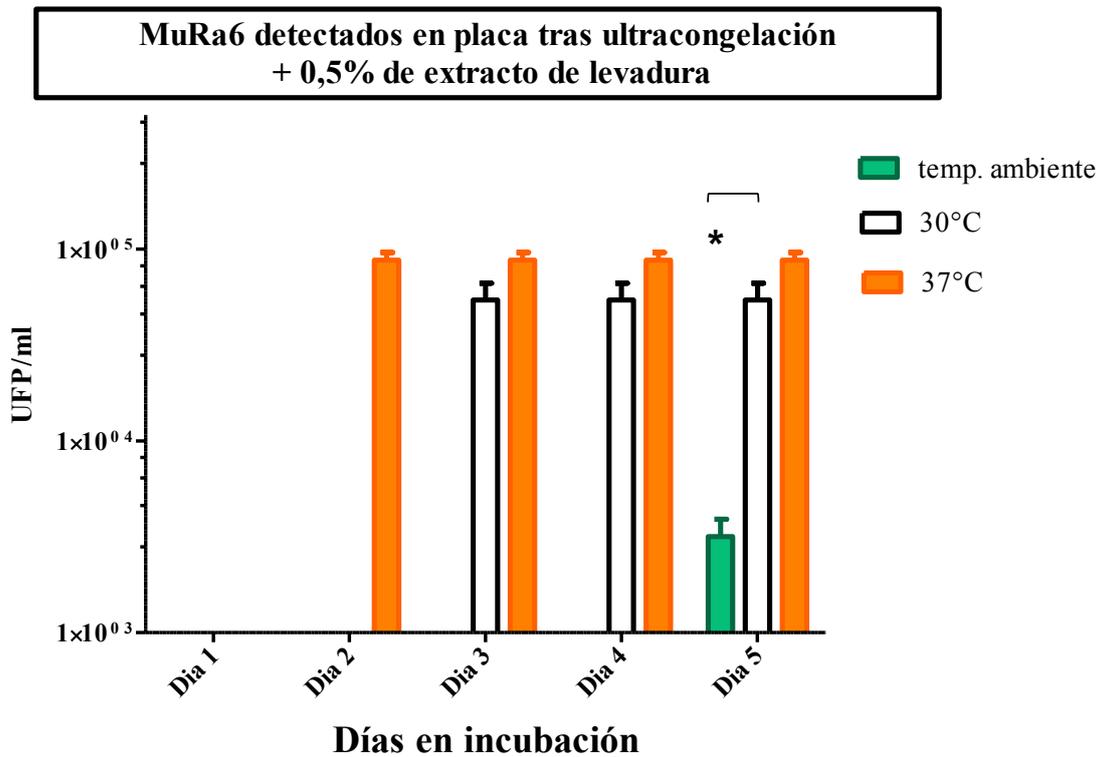
Por último, la cepa MuRa6 también mantuvo similares las cantidades detectadas en placa como los días en los que se produjeron, como se puede observar en la Figura 100. Por lo tanto, a temperatura ambiente, MuRa6 también se detectó al 5º día de incubación con una cantidad media de  $4,03 \times 10^3$  UFP/ml, a 30°C, la detección se hizo efectiva al 3er día de incubación y con una cantidad media de  $3,23 \times 10^4$  UFP/ml y a 37°C se detectó al 2º día y con una cantidad media de  $6,61 \times 10^4$  UFP/ml.



**Fig. 100.** Cantidad de BALOs MuRa6 detectada para cada una de las temperaturas de incubación y tras haber sido ultracongelados en fase de ataque.  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALOs detectada a 30°C fue significativamente mayor que a temperatura ambiente. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.3.2.6. Detección de MuRa6 añadiendo 0,5% de extracto de levadura

Igualmente, tras la adición de extracto de levadura, a temperatura ambiente la cepa MuRa6 se volvía a detectar en placa al 5º día de incubación con una cantidad media de  $3,16 \times 10^3$  UFP/ml, a 30°C, la detección se hizo efectiva al 3º día de incubación y con una cantidad media de  $5,43 \times 10^4$  UFP/ml y a 37°C se detectó al 2º día y con una cantidad media de  $8,37 \times 10^4$  UFP/ml. La Figura 101 muestra cómo MuRa6 se detectó en mayor medida.



**Fig. 101.** Cantidad de BALOs MuRa6 detectada para cada una de las temperaturas de incubación y tras haber sido ultracongelados en fase de ataque y 0.5% de extracto de levadura.  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALOs detectada a 30°C fue significativamente mayor que a temperatura ambiente. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Aunque se detectaron BALOs activos en placa con cada una de las cepas hospedadoras anteriores, sólo las zonas de lisis detectadas a 30°C mostraron una nitidez propia de BALOs (las demás zonas líticas resultaron traslucidas) y fueron las únicas que continuaron creciendo con el paso de los días. De igual forma, las zonas líticas siempre permanecieron pequeñas en todos los casos como se pudo observar en la Figura 102.



**Fig. 102.** Detalle de zonas de lisis pequeñas, pertenecientes a BALOs MuRa1, detectadas en placas (NA) a 30°C (placa de la izquierda) y zonas de lisis más tenues tras la incubación a temperatura ambiente (placa de la derecha).

### III-4.3.3. Características de la proliferación de las cepas hospedadoras

Como se ha mostrado, debido a que se detectaron BALOs en placa (aunque de manera tenue) desde viales ultracongelados sin conseguir la lisis de éstos en medio líquido, se pretendió observar si las bacterias presa eran capaces de utilizar como fuentes de carbono tanto al glicerol (utilizado como anticongelante en la ultracongelación), como a la glucosa.

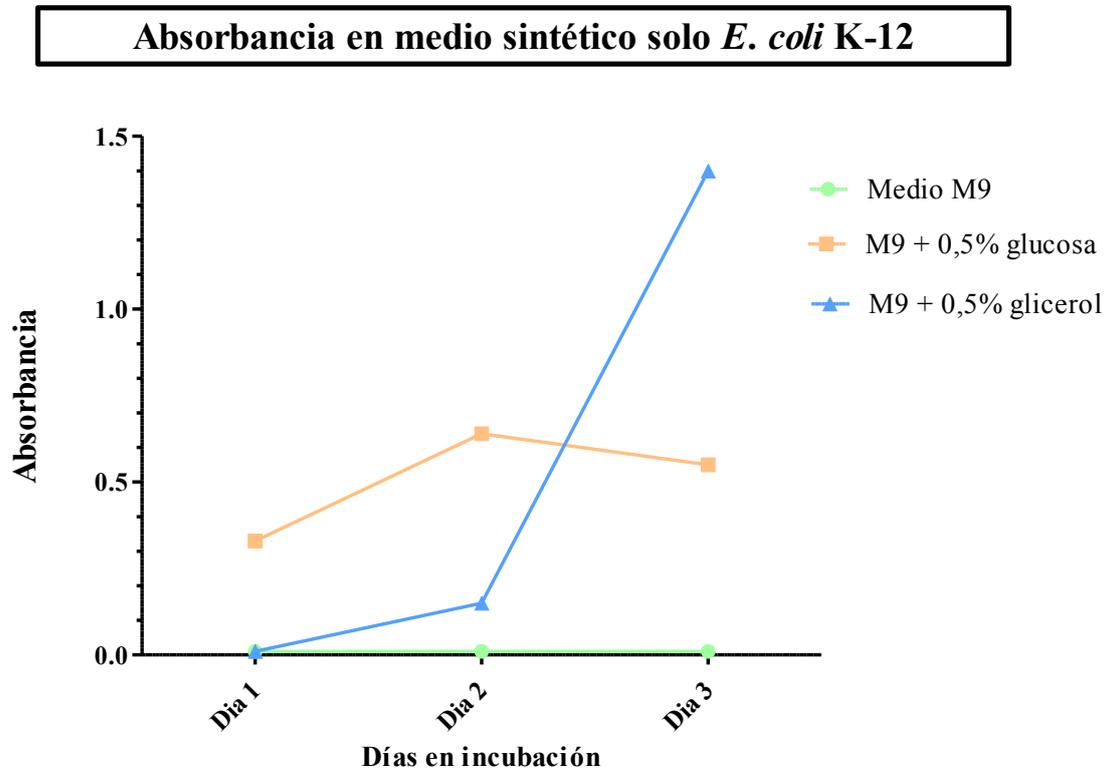
#### III-4.3.3.1. Restricción de fuentes de carbono en las cepas hospedadoras

##### III-4.3.3.1.1. Proliferación de *E. coli* K-12

Tras realizar cultivos con *E. coli* K-12 en medio sintético sin carbono (M9), se determinó que se produjo un nulo crecimiento de la bacteria presa (control).

En relación a las fuentes de carbono, en cultivos de medio sintético con la adición de glucosa, se observó proliferación bacteriana desde el primer día de incubación. En cambio, con glicerol no se observó crecimiento de *E. coli* K-12 hasta el segundo día, tal y como muestra la absorbancia en la Figura 103. Además, en el medio con presencia de

glicerol, la absorbancia, aunque comenzara a aumentar al segundo día, resultó ser superior a la absorbancia producida por la glucosa (Figura 103).

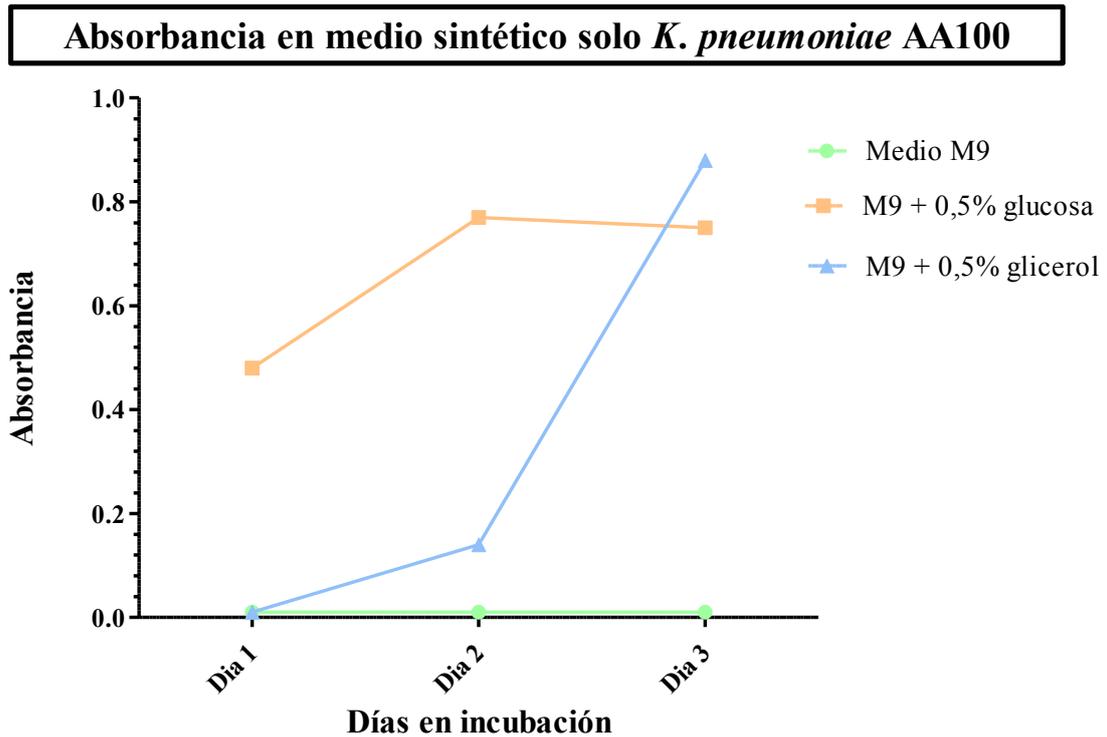


**Fig. 103.** Absorbancia producida por *E. coli* K-12 en medio M9 (control), en M9+ 0,5% de glucosa y en M9 +0,5% glicerol. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### III-4.3.3.1.2. Proliferación de *K. pneumoniae* AA100

Igualmente, los resultados también mostraron que se produjo un nulo crecimiento de *K. pneumoniae* AA100 en medio sintético sin fuente de carbono (control).

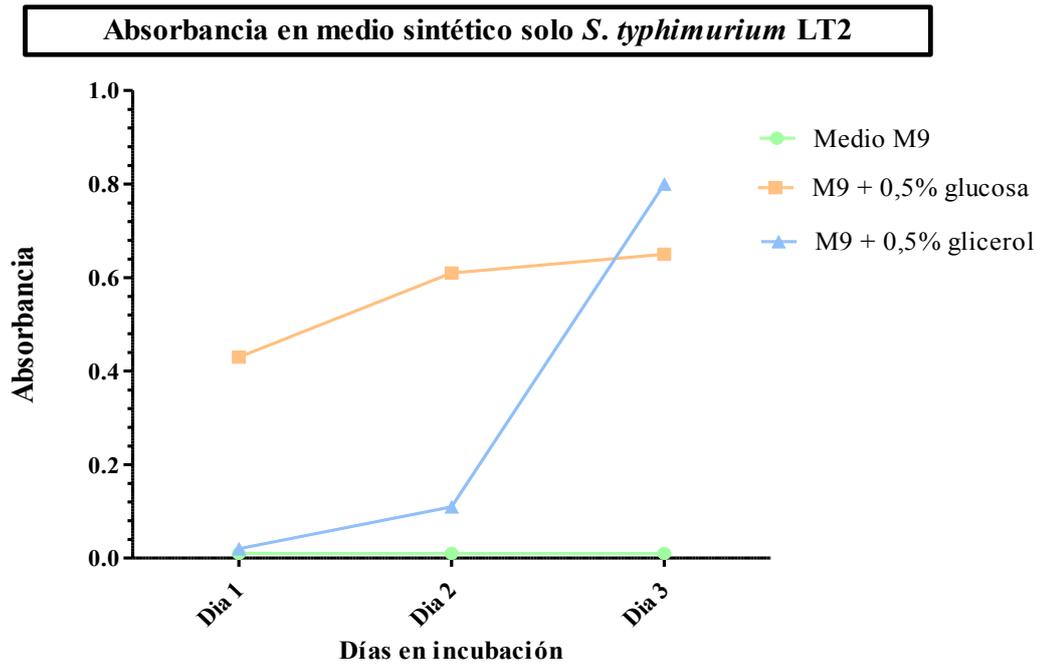
Igual que con *E. coli* K-12, en el medio con glicerol no se observó crecimiento de *K. pneumoniae* AA100\_hasta el segundo día, en el cual tuvo lugar un aumento de la absorbancia. En el medio con glucosa, desde el primer día se observó proliferación bacteriana (Figura 104).



**Fig. 104.** Absorbancia producida por *K. pneumoniae* en medio M9 (control), en M9 + 0,5% de glucosa y en M9 + 0,5% glicerol. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

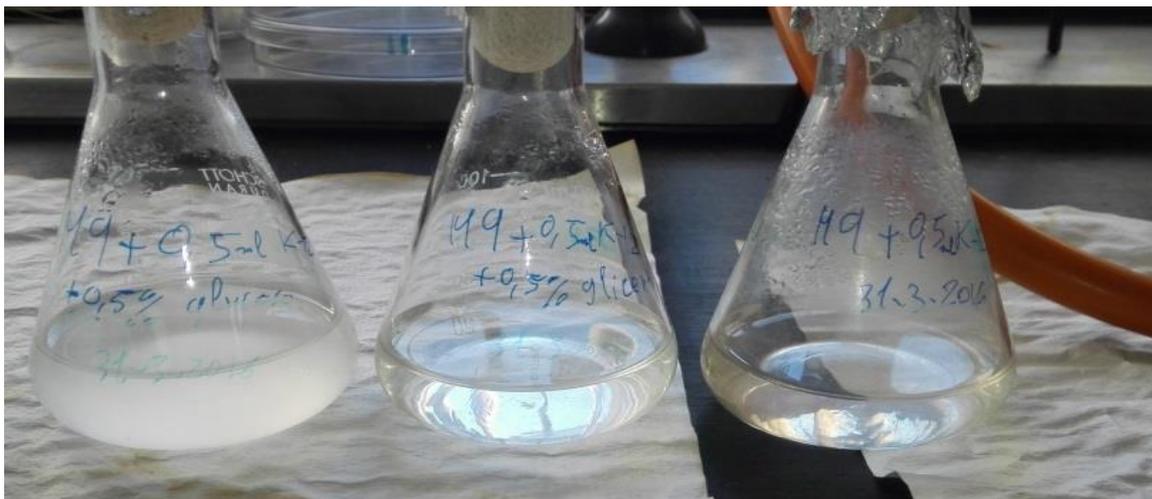
#### III-4.3.3.1.3. Proliferación de *S. typhimurium* LT2

En la tercera cepa hospedadora estudiada (*S. typhimurium* LT2), los resultados mostraron una situación muy similar a las dos cepas anteriores; tras un nulo crecimiento en el medio sintético sin adición de fuente de carbono alguna (control), en presencia de glicerol tampoco se observó crecimiento de *S. typhimurium* LT2 hasta el segundo día, como también indica la absorbancia de la Figura 105. En el medio con glucosa, desde el primer día, también se observó proliferación bacteriana (Figura 105).



**Fig. 105.** Absorbancia producida por *S. typhimurium* LT2 en medio M9 (control), en M9+ 0,5% de glucosa y en M9 +0,5% glicerol. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En definitiva, para cada una de las cepas presa estudiadas en la investigación, se produjo un retraso del crecimiento de los cultivos en medio sintético con la adición de glicerol, como muestra la Figura 106 en la que se observan las diferencias de turbidez en los diferentes cultivos durante su primer día.



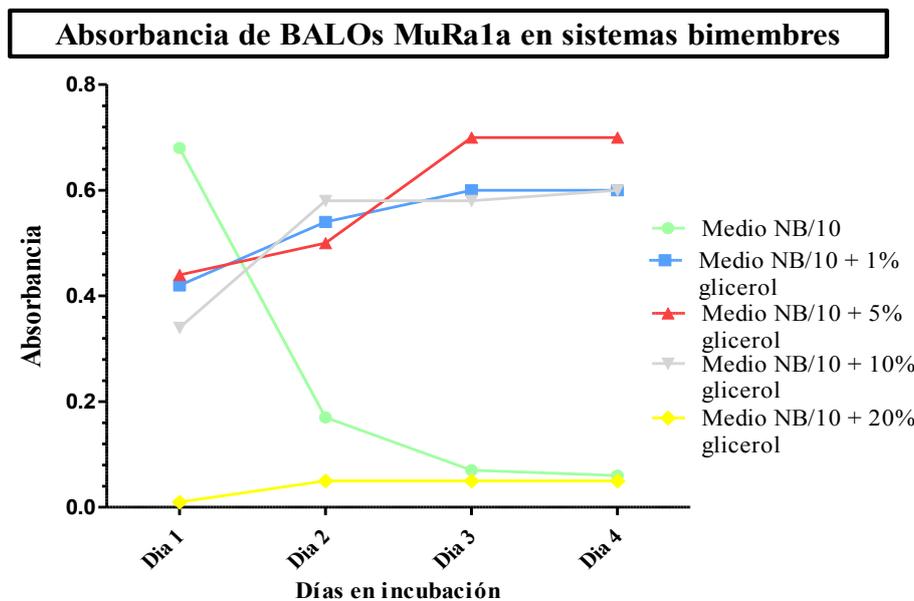
**Fig. 106.** Matrazes de *E. coli* K-12 tras su primer día de incubación a 30°C. De izquierda a derecha: matraz con 50ml de medio M9 y 0,5% de glucosa, matraz con 50ml medio M9 y 0,5% de glicerol y matraz con 50ml de medio M9 (control). Se puede observar la diferencia en la turbidez producida por el crecimiento bacteriano.

### III-4.3.4. Reactivación de BALOs en medio líquido a distintas concentraciones de glicerol

Tras comprobar que la cepa hospedadora no inhibió su crecimiento en presencia de glicerol (sí lo retrasó un día), se realizó un ensayo para reintentar una reactivación de BALOs en líquido poniendo el foco en la concentración de glicerol. En la investigación se estudió el crecimiento de BALOs con cada una de las cepas hospedadoras que sí crecieron en glicerol (MuRa1a, MuRa6a y MuRa5a). Usando para ello medio líquido NB-10, con la adición de diferentes concentraciones de glicerol e incubado a 30°C.

#### III-4.3.4.1. Proliferación de MuRa1a a altas concentraciones de glicerol

Atendiendo a la absorbancia mostrada en la Figura 107, se observó que en sistemas bimembres MuRa1a- *E. coli* K-12 con porcentajes de glicerol que fueron del 1% al 20% no se obtuvo lisado y la absorbancia de los matraces permaneció alta debido a la presencia de bacteria presa. En matraces solamente con medio NB-10 (control), sí que se observó una pérdida de turbidez y, por tanto, un lisado de BALOs. En el matraz de glicerol al 20% y tal como ocurriera con las bacterias presa, la turbidez permaneció baja pero no debido a lisis, sino a la nula presencia bacteriana de cualquier tipo en esas condiciones.



**Fig. 107.** Absorbancia de sistemas bimembres de BALOs MuRa1a y presa en medio NB-10 y con distintas concentraciones de glicerol (concentraciones altas). A una concentración del 20% no se observó crecimiento bacteriano alguno y en el resto de concentraciones solo proliferó la cepa hospedadora. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

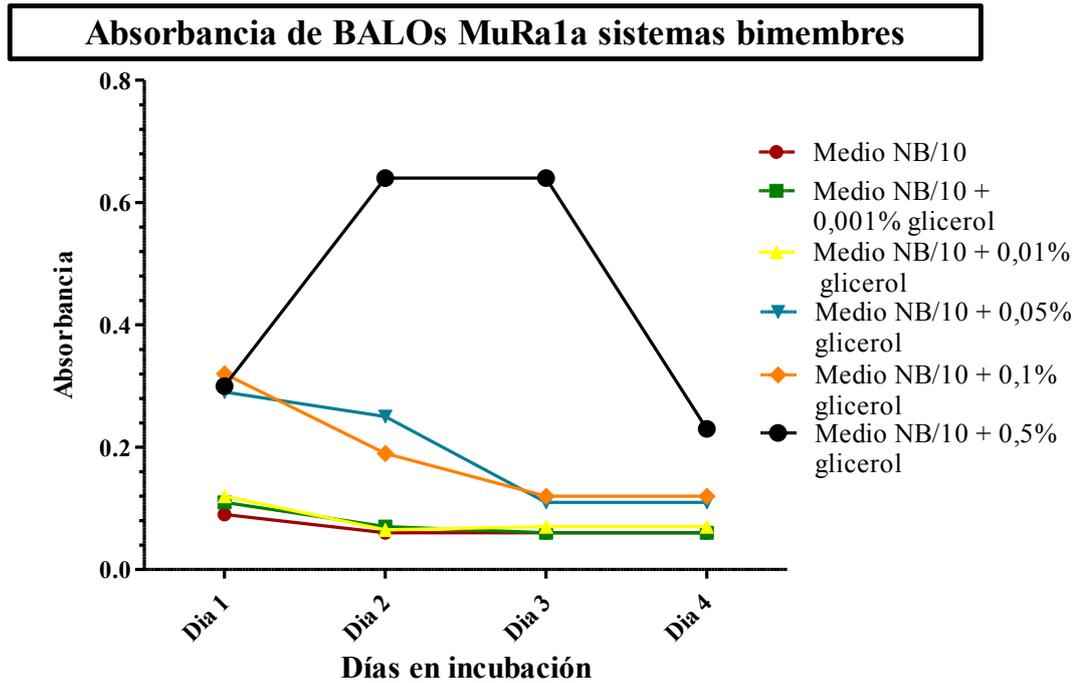
Como se ha indicado, salvo en medios con un 20% de concentración de glicerol, la alta turbidez indicó que la bacteria presa sí que proliferó desde el primer día, pero no así los BALOs (Figura 108).



**Fig. 108.** Matracas tras el primer día de incubación; de izquierda a derecha: matraz con 50ml de medio NB-10 +1% de glicerol, con un 5% de glicerol, con un 10% y con un 20% de glicerol donde no se observa turbidez y, por tanto, crecimiento bacteriano alguno.

#### III-4.3.4.2. Proliferación de MuRa1a a bajas concentraciones de glicerol

En cambio, como indica la pérdida de absorbancia mostrada en la Figura 109, en el mismo medio con concentraciones más bajas de glicerol, MuRa1a mostró una proliferación al segundo día de incubación en aquellos cultivos con 0,01% y con 0,001% de glicerol. Al tercer día, se produjo lisis en los matracas al 0,05% y 0,1% de glicerol y, por último, al 4º día, la lisis fue efectiva en el matraz al 0,5% de glicerol (Figura 109).



**Fig. 109.** Absorbancia de sistemas bimembres de BALOs MuRa1a y presa en medio NB-10 y con distintas concentraciones de glicerol (concentraciones bajas). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Se observa como a las dos concentraciones más bajas de glicerol propuestas, la lisis ocurre al primer día y esta va apareciendo más tarde a medida que aumenta la concentración. En definitiva y a modo de resumen, en la Tabla 11 se muestra la presencia o no de lisis en función de la absorbancia producida cada día y a cada concentración de glicerol.

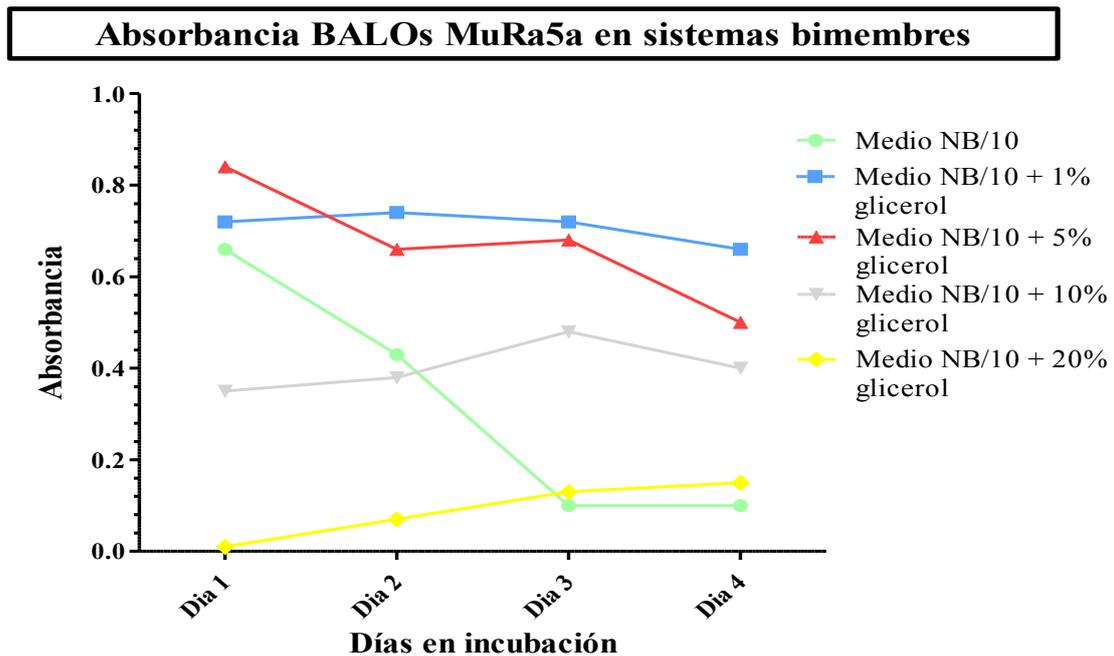
Glicerol (%)	Glicerol (M)	Lisis día 1/A	Lisis día 2/A	Lisis día 3/A	Lisis día 4/A
Control	-	- / 0,68	+ / 0,17	+ / 0,06	+ / 0,06
0,001%	$6,82 \times 10^{-4}$	- / 0,11	+ / 0,07	+ / 0,06	+ / 0,06
0,01%	$6,82 \times 10^{-3}$	- / 0,12	+ / 0,065	+ / 0,07	+ / 0,07
0,05%	$3,41 \times 10^{-2}$	- / 0,29	- / 0,25	+ / 0,11	+ / 0,12
0,1%	$6,82 \times 10^{-2}$	- / 0,32	- / 0,19	+ / 0,12	+ / 0,12
0,5%	$3,41 \times 10^{-1}$	- / 0,30	- / 0,64	- / 0,64	+ / 0,23
1%	$6,82 \times 10^{-1}$	- / 0,42	- / 0,54	- / 0,60	- / 0,60
5%	3,41	- / 0,44	- / 0,50	- / 0,70	- / 0,70
10%	6,82	- / 0,34	- / 0,58	- / 0,58	- / 0,60
20%	13,64	- / 0,01	- / 0,05	- / 0,05	- / 0,05

M = Molaridad, A = Absorbancia media.

**Tabla 11.** Control de la lisis del BALO MuRa1a sobre *E. coli* K12 en presencia de distintas concentraciones de glicerol a lo largo del tiempo (días).

III-4.3.4.3. Crecimiento de MuRa5a a altas concentraciones de glicerol

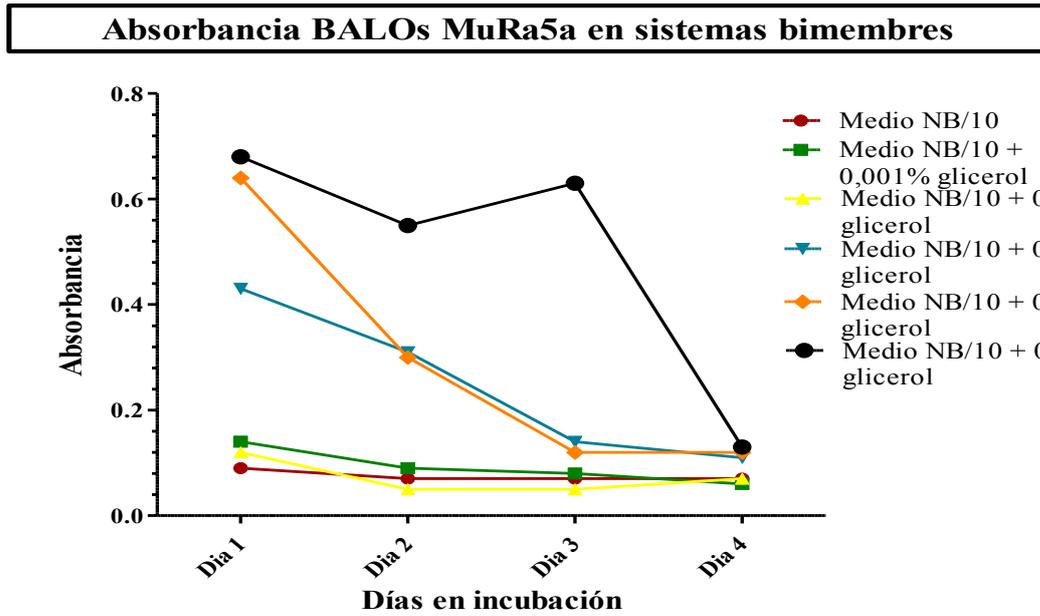
Tras volver a realizar el estudio con los mismos parámetros con la cepa de BALO MuRa5a, se observaron resultados similares a los anteriores; a concentraciones desde el 20% hasta el 1% de glicerol no se observó presencia de BALOs, pero sí crecimiento de cepa hospedadora (alta absorbancia). A una concentración del 20% de glicerol tampoco se produjo crecimiento bacteriano alguno (Figura 110).



**Fig. 110.** Absorbancia de sistemas bimembres de BALOs MuRa5a y presa en medio NB-10 y con distintas concentraciones de glicerol (concentraciones altas). A una concentración del 20% no se observó crecimiento bacteriano alguno y en el resto de concentraciones solo creció la cepa hospedadora, no llegando nunca a haber lisis. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.3.4.4. Proliferación de MuRa5a a bajas concentraciones de glicerol

De igual manera, en concentraciones más bajas de glicerol, a partir de un 0,5% la lisis de MuRa5a se produjo dando lugar a una absorbancia baja (Figura 111). Como ocurriera en la cepa anterior, a medida que la concentración de glicerol fue más baja, la aparición de la lisis de BALOs tuvo lugar antes (Figura 111).



**Fig. 111.** Absorbancia de sistemas bimembres de BALOs MuRa5a y presa en medio NB-10 y con distintas concentraciones de glicerol (concentraciones bajas). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

La Tabla 12 especifica a qué concentración de glicerol y a qué tiempo se ha producido la lisis de BALOs MuRa5a en función de la absorbancia producida por cada concentración de glicerol del estudio.

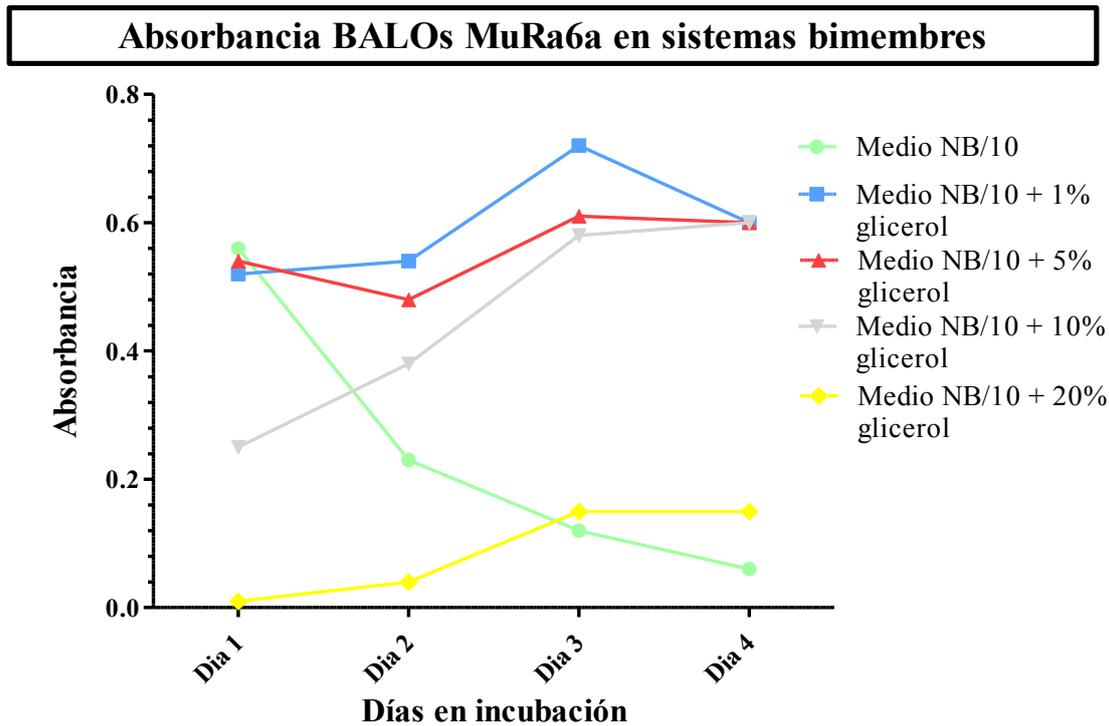
Glicerol (%)	Glicerol (M)	Lisis día 1/A	Lisis día 2/A	Lisis día 3/A	Lisis día 4/A
Control	-	- / 0,66	- / 0,43	+ / 0,10	+ / 0,10
0,001%	$6,82 \times 10^{-4}$	- / 0,14	+ / 0,09	+ / 0,08	+ / 0,06
0,01%	$6,82 \times 10^{-3}$	- / 0,12	+ / 0,05	+ / 0,05	+ / 0,07
0,05%	$3,41 \times 10^{-2}$	- / 0,43	- / 0,31	+ / 0,14	+ / 0,11
0,1%	$6,82 \times 10^{-2}$	- / 0,64	- / 0,30	+ / 0,12	+ / 0,12
0,5%	$3,41 \times 10^{-1}$	- / 0,68	- / 0,55	- / 0,63	+ / 0,13
1%	$6,82 \times 10^{-1}$	- / 0,72	- / 0,74	- / 0,72	- / 0,66
5%	3,41	- / 0,84	- / 0,66	- / 0,68	- / 0,50
10%	6,82	- / 0,35	- / 0,38	- / 0,48	- / 0,40
20%	13,64	- / 0,01	- / 0,07	- / 0,13	- / 0,15

M = Molaridad, A = Absorbancia media.

**Tabla 12.** Control de la lisis del BALO MuRa5a sobre *S. typhimurium* LT2 en presencia de distintas concentraciones de glicerol a lo largo del tiempo (días).

III-4.3.4.5. Proliferación de MuRa6a a altas concentraciones de glicerol

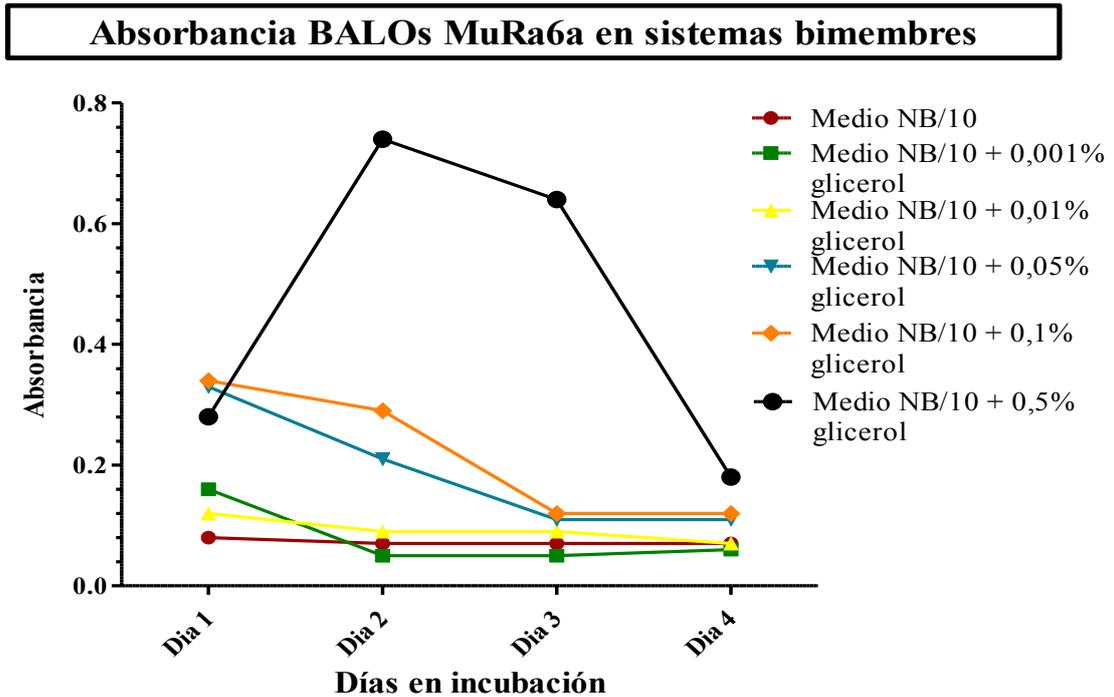
En el caso de la cepa de BALO MuRa6a, se observaron resultados similares a los obtenidos para las demás cepas; a concentraciones de hasta el 1% de glicerol no se produjo lisis, pero sí crecimiento de cepa hospedadora al observarse una absorbancia alta (menos, como en las otras cepas de BALOs, al 20% de concentración que no produjo crecimiento bacteriano alguno) (Figura 112).



**Fig. 112.** Absorbancia de sistemas bimembres de BALOs MuRa6a y presa en medio NB-10 y con distintas concentraciones de glicerol (concentraciones altas). A una concentración del 20% no se observó crecimiento bacteriano alguno y en el resto de concentraciones solo proliferó la cepa hospedadora, no llegando a existir presencia de BALOs. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.3.4.6. Proliferación de MuRa6a a bajas concentraciones de glicerol

A partir de una concentración de 0,5% de glicerol, la lisis de MuRa6a tuvo lugar, igualmente, al cuarto día de incubación y, en concentraciones más bajas, la lisis tuvo lugar antes (Figura 113).



**Fig. 113.** Absorbancia de sistemas bimembres de BALOs MuRa6a y presa en medio NB-10 y con distintas concentraciones de glicerol (concentraciones bajas). Se observa como a las dos concentraciones más bajas de glicerol la lisis ocurrió al primer día, aumentando el tiempo a medida que lo hace la concentración. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En la Tabla 13 se muestra resumida la presencia o no de lisis en función de la absorbancia y de la concentración de glicerol empleada en el estudio.

Glicerol (%)	Glicerol (M)	Lisis día 1/A	Lisis día 2/A	Lisis día 3/A	Lisis día 4/A
Control	-	- / 0,56	+ / 0,23	+ / 0,12	+ / 0,06
0,001%	$6,82 \times 10^{-4}$	- / 0,16	+ / 0,05	+ / 0,05	+ / 0,06
0,01%	$6,82 \times 10^{-3}$	- / 0,12	+ / 0,09	+ / 0,09	+ / 0,07
0,05%	$3,41 \times 10^{-2}$	- / 0,33	- / 0,21	+ / 0,11	+ / 0,11
0,1%	$6,82 \times 10^{-2}$	- / 0,34	- / 0,29	+ / 0,12	+ / 0,12
0,5%	$3,41 \times 10^{-1}$	- / 0,28	- / 0,74	- / 0,64	+ / 0,18
1%	$6,82 \times 10^{-1}$	- / 0,52	- / 0,54	- / 0,72	- / 0,60
5%	3,41	- / 0,54	- / 0,48	- / 0,61	- / 0,60
10%	6,82	- / 0,25	- / 0,38	- / 0,58	- / 0,60
20%	13,64	- / 0,01	- / 0,04	- / 0,15	- / 0,15

M = Molaridad, A = Absorbancia media.

**Tabla 13.** Control de la lisis del BALO MuRa6a sobre *K. pneumoniae* en presencia de distintas concentraciones de glicerol a lo largo del tiempo (días).

### III-4.3.5. Proliferación de bacterias presa a distintas concentraciones de glicerol

Para comprobar la acción retardante para la proliferación de BALOs del glicerol, se realizó un estudio en el que se monitorizó la proliferación de las tres bacterias presa usadas en el estudio, usando aquellas concentraciones de glicerol a las que existió lisis de BALOs en el estudio anterior.

De modo que, en consonancia con el retardo de las lisis de BALOs aparecidas en el estudio anterior, *E. coli* K-12 (Tabla 14), *K. pneumoniae* (Tabla 15) y *S. typhimurium* LT2 (Tabla 16) mostraron un desfase en su proliferación (una mayor absorbancia) a medida que se aumentó la concentración de glicerol.

Medio	A* (Día 1)	A* (Día 2)	A* (Día 3)	pH medio
Medio M9 (blanco)	0,01	0,01	0,01	6,68
M9 +0,1% glicerol	0,01	0,68	0,95	6,35
M9 + 0,5% glicerol	0,01	0,68	1,10	6,41
M9 + 5% glicerol	0,01	0,03	0,75	6,70

\*A=Absorbancia

**Tabla 14.** Absorbancia media medida diariamente en cultivos de *E. coli* K-12 a distintas concentraciones de glicerol. La absorbancia baja fue debida a la ausencia de proliferación bacteriana.

Medio	A* (Día 1)	A* (Día 2)	A* (Día 3)	pH medio
Medio M9 (blanco)	0,01	0,01	0,01	6,60
M9 +0,1% glicerol	0,01	0,46	0,95	6,85
M9 + 0,5% glicerol	0,01	0,77	0,90	6,47
M9 + 5% glicerol	0,01	0,03	0,77	6,79

\*A=Absorbancia

**Tabla 15.** Absorbancia media medida diariamente en cultivos de *K. pneumoniae* AA100 a distintas concentraciones de glicerol. La absorbancia baja vino dada por la ausencia de proliferación bacteriana.

Medio	A* (Día 1)	A* (Día 2)	A* (Día 3)	pH medio
<b>Medio M9 (blanco)</b>	0,01	0,01	0,01	6,72
<b>M9 +0,1% glicerol</b>	0,01	0,58	0,85	6,55
<b>M9 + 0,5% glicerol</b>	0,01	0,68	0,90	6,58
<b>M9 + 5% glicerol</b>	0,01	0,03	0,96	6,62

\*A=Absorbancia

**Tabla 16.** Absorbancia media medida día a día en cultivos de *S. typhimurium* LT2 a distintas concentraciones de glicerol. La absorbancia baja indicó una ausencia de crecimiento bacteriano.

En todos los casos, tanto cuando existió proliferación bacteriana como cuando no la hubo, el pH en el medio se mantuvo entre 6,5 y 6,7.

### III-4.3.6. Recuperación de BALOs ultracongelados en fase de ataque y en fase de bdelloplasto

#### III-4.3.6.1. Recuperación a una concentración mayor de 0,5% de glicerol

Para comprobar que, efectivamente, se produjo la recuperación de MuRa1, MuRa5 y MuRa6 en medio líquido cuando la concentración de glicerol fue menor o igual a 0,5%, se cultivaron sistemas bimembres BALOs-presa a una concentración inmediatamente superior a ese “límite” (llevando el cultivo a 0,6% de concentración de glicerol). Las diferentes cepas de BALOs mostraron una ausencia de proliferación, ni tras ser ultracongelados en fase de ataque, ni en bdelloplasto y ni en medio con la adición 0,5% de proteosa peptona, como se puede observar en la Tabla 17.

<b>MuRa1a</b>				
<b>Fase</b>	<b>Concentración de glicerol</b>	<b>¿Lisis día 3?</b>	<b>¿Lisis día 10?</b>	<b>¿Lisis tras proteosa peptona?</b>
Ataque	0,60%	-	-	-
Bdelloplasto	0,60%	-	-	-
<b>MuRa5a</b>				
<b>Fase</b>	<b>Concentración de glicerol</b>	<b>¿Lisis día 3?</b>	<b>¿Lisis día 10?</b>	<b>¿Lisis tras proteosa peptona?</b>
Ataque	0,60%	-	-	-
Bdelloplasto	0,60%	-	-	-
<b>MuRa6a</b>				
<b>Fase</b>	<b>Concentración de glicerol</b>	<b>¿Lisis día 3?</b>	<b>¿Lisis día 10?</b>	<b>¿Lisis tras proteosa peptona?</b>
Ataque	0,60%	-	-	-
Bdelloplasto	0,60%	-	-	-

**Tabla 17.** Recuperación, en medio NB-10, de BALOs MuRa1, MuRa6 y MuRa5 tras una ultracongelación en fase de ataque y de bdelloplasto y a una concentración de 0,6% de glicerol. Se observó la ausencia de recuperación de BALOs a los 3 días y 10 días de incubación.

### III-4.3.6.2. Recuperación a una concentración menor de 0,5% de glicerol

A concentraciones de glicerol donde se produjo la lisis de las cepas de BALOs MuRa1a, MuRa5a y MuRa6a (desde una concentración de 0,5% hasta 0,001%), existieron diferencias en su capacidad de activación dependiendo de la fase en la que la cepa BALO hubiera sido ultracongelada previamente. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

III-4.3.6.2.1. Recuperación de MuRa1a

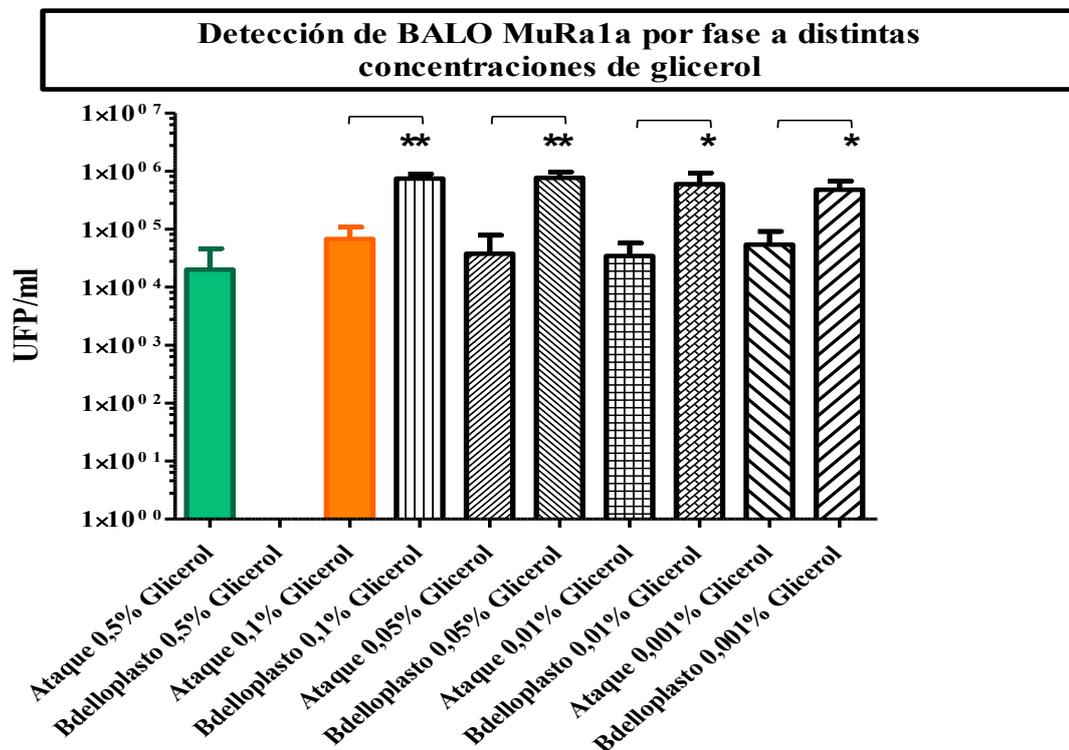
Como se ha comprobado anteriormente, el BALOs MuRa1a, tanto en fase de ataque como en fase de bdelloplasto, se reactivó una vez que el medio de cultivo estuvo diluido a una concentración menor a 0,5% de glicerol. Pero poniendo el foco en la fase del BALO en el momento de la ultracongelación, la Tabla 18 refleja que, para todas las concentraciones de glicerol de la comparación, las cepas de BALO ultracongeladas en fase de ataque proliferaron antes que la que las ultracongeladas en fase de bdelloplasto.

MuRa1a					
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,50%	No	No	Si	Si
Bdelloplasto	0,50%	No	No	No	No
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,10%	No	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,10%	No	No	No	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,05%	No	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,05%	No	No	Si	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,01%	Si	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,01%	No	Si	Si	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,001%	Si	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,001%	No	Si	Si	Si

**Tabla 18.** Comparativa de la recuperación del BALO MuRa1a partiendo de su ultracongelación en fase de ataque o en fase de bdelloplasto a diferentes concentraciones de glicerol.

La Figura 114 muestra cómo, además de que MuRa1 mostrara una proliferación más tardía tras ser ultracongeladas en fase de bdelloplasto, la cantidad de BALOs detectados fue significativamente mayor que la obtenida cuando se partió desde bacterias en fase de ataque.

En concreto, se obtuvo una cantidad media de  $2,76 \times 10^4$  UFP/ml en la cepa ultracongelada en fase de ataque y reactivada a 0,5% de glicerol mientras que para MuRa1 ultracongelada en fase de bdelloplasto, no se produjo recuperación a esta concentración. La cepa MuRa1 reactivada a 0,1% de glicerol mostró una cantidad de  $6,63 \times 10^4$  UFP/ml tras su ultracongelación en fase de ataque y  $7,43 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto. En una concentración al 0,05% de glicerol, se contabilizó  $3,76 \times 10^4$  UFP/ml tras ultracongelación en fase de ataque y  $7,66 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto. A 0,01% de concentración de glicerol, MuRa1 mostró  $3,06 \times 10^4$  UFP/ml tras ultracongelación en fase de ataque y  $6,16 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto. Por último, a una concentración de 0,001% se obtuvo  $5,43 \times 10^4$  UFP/ml en fase de ataque y  $4,81 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto (Figura 114).



**Fig. 114.** BALOs MuRa1a detectados a distintas concentraciones de glicerol, partiendo de fase de ataque o de bdelloplasto ultracongeladas.  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ : la cantidad detectada de BALOs ultracongelados en fase de bdelloplasto fue significativamente mayor con respecto a los ultracongelados en fase de ataque. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

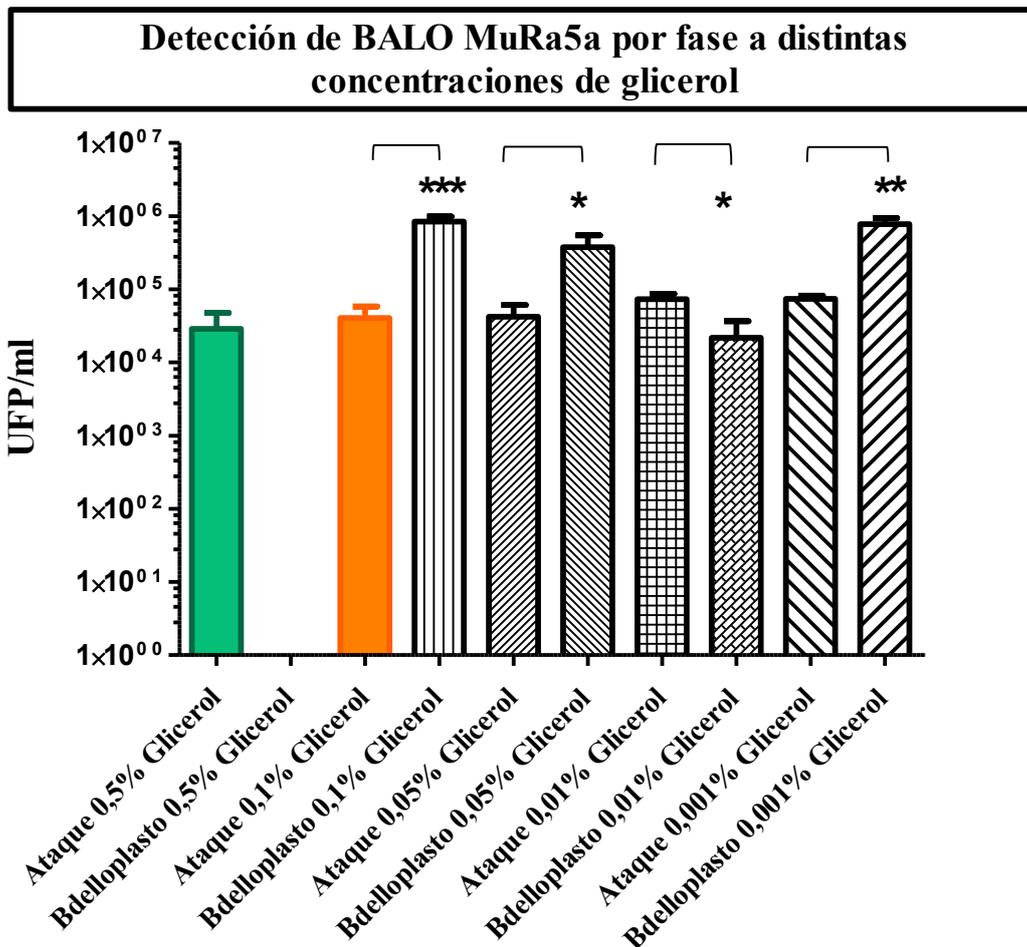
III-4.3.6.2.2. Recuperación de MuRa5a

En la cepa MuRa5a la tendencia fue similar a MuRa1a: tanto en fase de ataque como en fase de bdelloplasto, la activación se produjo una vez se hubo diluido el medio de cultivo al 0,5% de glicerol y, además, la Tabla 19 muestra cómo, en fase de bdelloplasto, la recuperación de MuRa5a sucedió después que la recuperación en fase de ataque.

MuRa5a					
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,50%	No	No	Si	Si
Bdelloplasto	0,50%	No	No	No	No
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,10%	No	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,10%	No	No	No	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,05%	No	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,05%	No	No	Si	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,01%	Si	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,01%	No	Si	Si	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,001%	Si	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,001%	No	Si	Si	Si

**Tabla 19.** Comparativa de la recuperación del BALO MuRa5a partiendo de su ultracongelación en fase de ataque o en fase de bdelloplasto a diferentes concentraciones de glicerol.

En cuanto a las cantidades medias detectadas, la cepa de BALOs MuRa5a mostró, a una concentración de 0,5% de glicerol, una media de  $2,91 \times 10^4$  UFP/ml para MuRa5a ultracongelada en fase de ataque y para MuRa5a ultracongelada en fase de bdelloplasto, tampoco se produjo recuperación a esta concentración. A una concentración de glicerol del 0,1%, se detectó una cantidad de  $4,03 \times 10^4$  UFP/ml tras la ultracongelación de MuRa5a en fase de ataque y de  $8,44 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto. A 0,05% de glicerol, MuRa5a mostró  $4,23 \times 10^4$  UFP/ml tras su ultracongelación en fase de ataque y  $3,77 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto. A una concentración del 0,01% de de glicerol, se produjo  $7,01 \times 10^4$  UFP/ml tras MuRa5a ultracongelada en fase de ataque y  $2,16 \times 10^4$  UFP/ml en fase de bdelloplasto. Por último, a la concentración más baja del estudio (0,001%) se obtuvo  $7,74 \times 10^4$  UFP/ml ultracongelada en fase de ataque y  $7,72 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto (Figura 115).



**Fig. 115.** BALOs MuRa5a detectados a distintas concentraciones de glicerol, partiendo de fase de ataque o de bdelloplasto ultracongeladas previamente.  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$  y  $p < 0,001^{***}$ : la cantidad detectada de BALOs ultracongelados en fase de bdelloplasto fue significativamente mayor con respecto a los ultracongelados en fase de ataque. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

III-4.3.6.2.3. Recuperación de MuRa6a

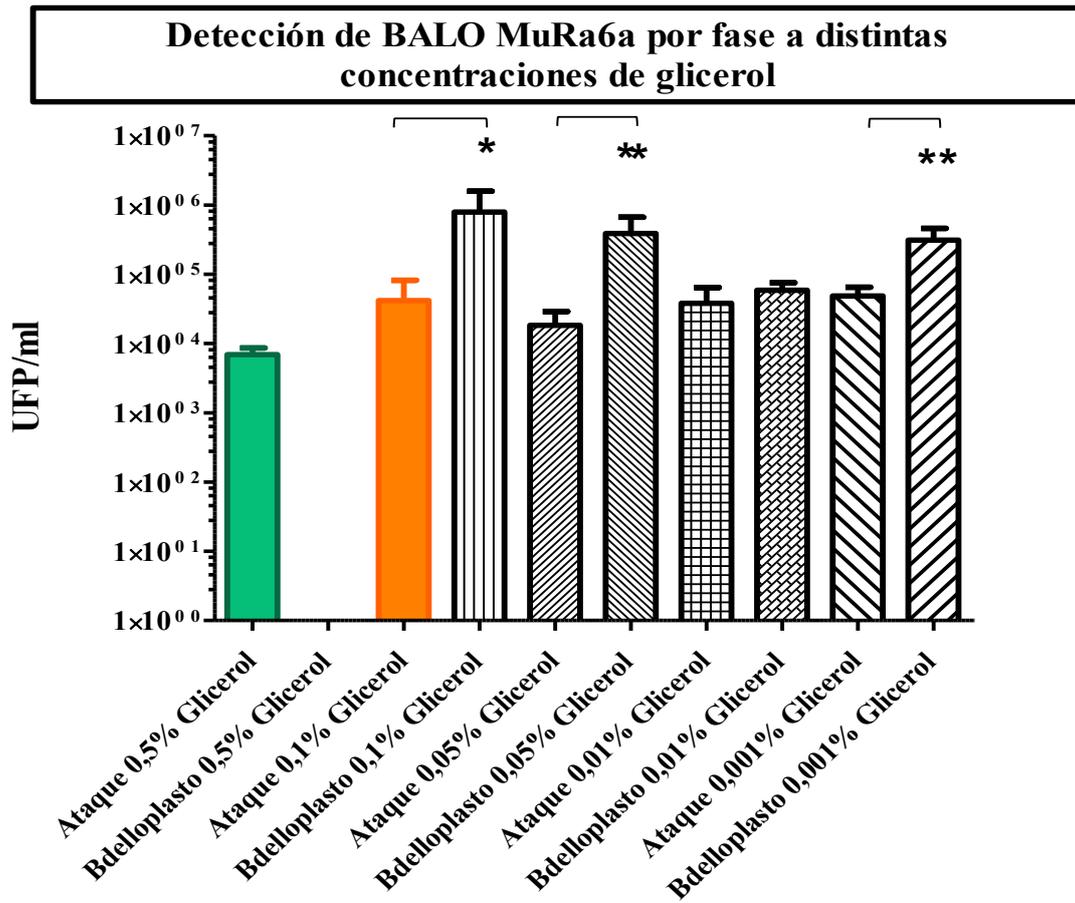
Igualmente, se observó como en MuRa6a, la tendencia fue similar: se produjo su reactivación una vez el cultivo se hubo diluido por con una concentración inferior a 0,5% e, igualmente, también se observó que, en fase de bdelloplasto, la recuperación sucedió después de que la cepa MuRa6a fuera ultracongelada en fase de ataque (Tabla 20).

MuRa6a					
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,50%	No	No	Si	Si
Bdelloplasto	0,50%	No	No	No	No
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,10%	No	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,10%	No	No	No	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,05%	No	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,05%	No	No	Si	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,01%	Si	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,01%	No	Si	Si	Si
Fase de ultracongelación	Concentración de glicerol	¿Lisis al 2º día?	¿Lisis al 3er día?	¿Lisis al 4º día?	¿Lisis al 5º día?
Ataque	0,001%	Si	Si	Si	Si
Bdelloplasto	0,001%	No	Si	Si	Si

**Tabla 20.** Comparativa de la recuperación de BALOs MuRa6a partiendo de su ultracongelación en fase de ataque o en fase de bdelloplasto a diferentes concentraciones de glicerol.

También en MuRa6a, al igual que ocurrió con el resto de cepas de BALOs del estudio, se observó una diferencia significativa entre la cantidad de BALOs detectados partiendo de fase de bdelloplasto con los detectados partiendo de fase de ataque:

La cantidad media de MuRa6a ultracongelada en fase de ataque y reactivada a 0,5% de glicerol fue de  $6,93 \times 10^3$  UFP/ml, para MuRa6a ultracongelada en fase de bdelloplasto, tampoco se observó proliferación alguna a esta concentración. A 0,1% de glicerol se produjo una cantidad de  $2,38 \times 10^4$  UFP/ml tras la ultracongelación en fase de ataque y  $4,33 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto. A concentración de 0,05% de glicerol, se contabilizó  $1,88 \times 10^4$  UFP/ml de la cepa MuRa6a tras su ultracongelación en fase de ataque y  $2,71 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto. A 0,01%, se produjo  $3,81 \times 10^4$  UFP/ml tras ser ultracongelada en fase de ataque y  $5,91 \times 10^5$  UFP/ml tras serlo en fase de bdelloplasto. Para finalizar, a una concentración de 0,001% se obtuvo  $5,33 \times 10^4$  UFP/ml para MuRa6a ultracongelada en fase de ataque y  $2,42 \times 10^5$  UFP/ml en fase de bdelloplasto (Figura 116).



**Fig. 116.** BALOs MuRa6a detectados a distintas concentraciones de glicerol, partiendo de fase de ataque o de bdelloplasto ultracongeladas previamente.  $p < 0,05^*$ ,  $p < 0,01^{**}$ : la cantidad detectada de BALOs ultracongelados en fase de bdelloplasto fue significativamente mayor con respecto a los ultracongelados en fase de ataque. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En consonancia con los datos anteriores y como se puede observar en la Figura 117, tras haber transcurrido el mismo intervalo de tiempo para cada uno de los cultivos, los cultivos para la recuperación de BALOs que estuvieron ultracongelados en fase de bdelloplasto aún presentaron turbidez debido a la presencia de bacteria. Mientras, los cultivos para la recuperación de BALOs en fase de ataque, presentaban una turbidez menor al haber menos bacterias presa (ya la estaban lisando masivamente).

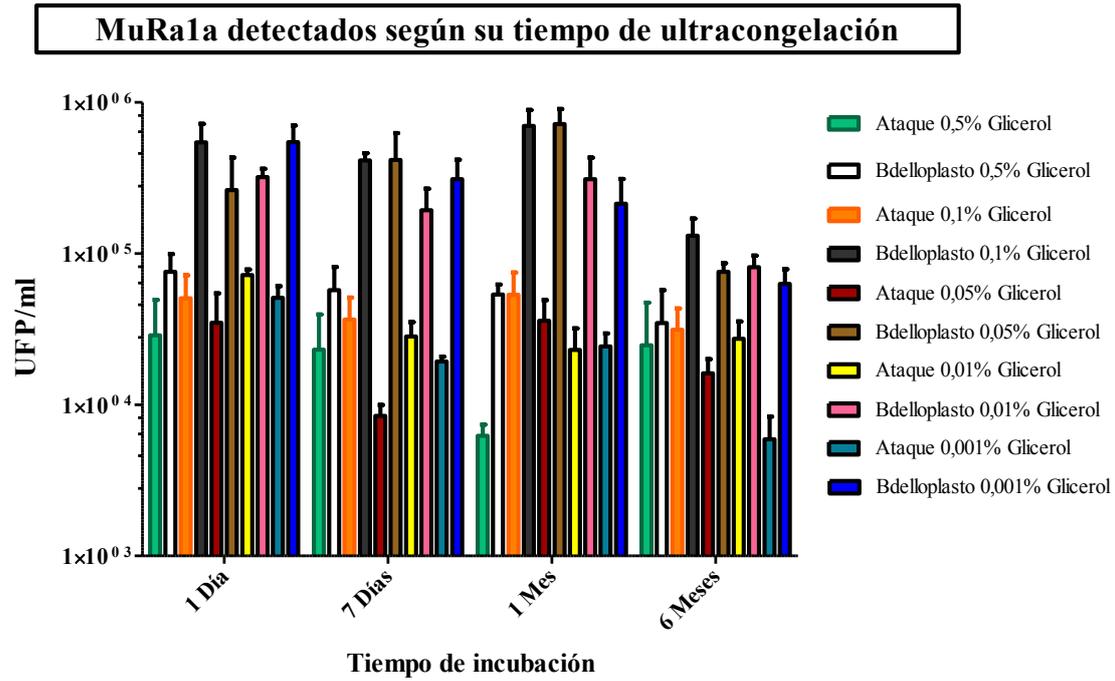


**Fig. 117.** Detalle del proceso de reactivación de BALOs desde su ultracongelación en fase de ataque y de bdelloplasto. Se observa como la turbidez del matraz de la izquierda (cultivo que provino del ultracongelado en fase de bdelloplasto) es mayor que el de la derecha (ultracongelado en fase de ataque).

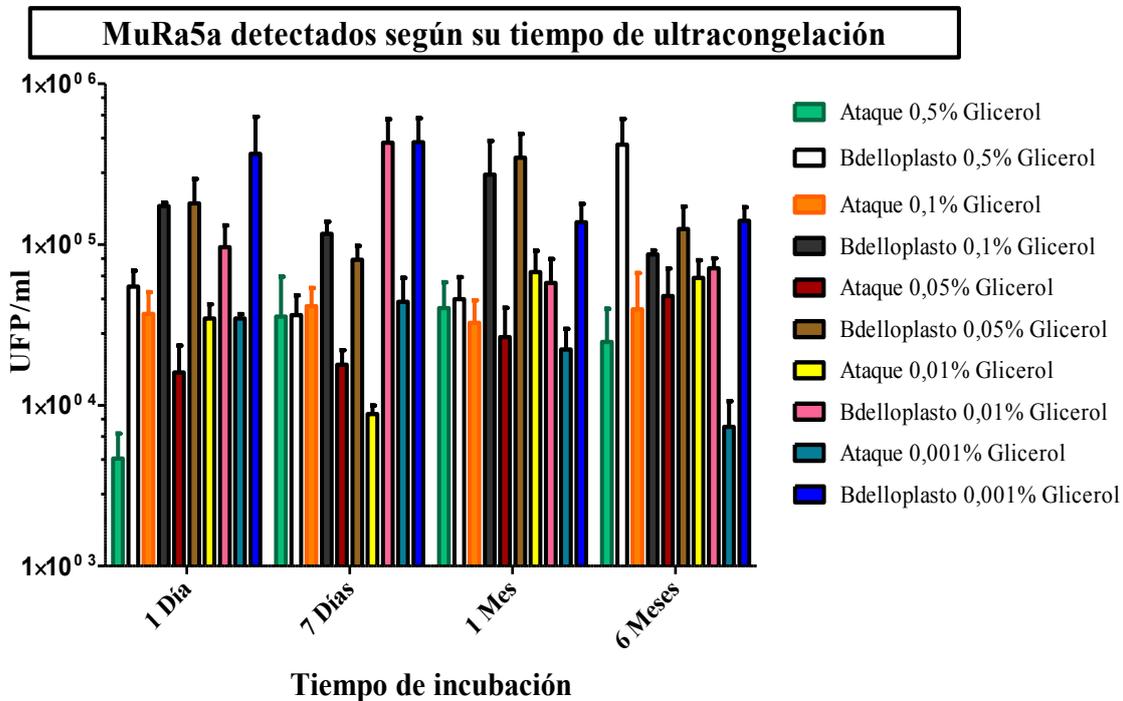
#### III-4.3.6.3. Recuperación de BALOs según el tiempo en ultracongelación

Por último, se realizó un estudio para determinar si el periodo de tiempo de ultracongelación de la cepa de BALO guardó relación con la cantidad de BALOs que se recuperaron posteriormente a distintas concentraciones de glicerol. Los resultados obtenidos del estudio son los siguientes:

Con independencia del tiempo permanecido en ultracongelación, las cepas de BALOs MuRa1a, MuRa5a y MuRa6a se reactivaron a las concentraciones de glicerol determinadas en estudios anteriores. La viabilidad de la cepa MuRa1a ultracongelada en fase de bdelloplasto decreció tras haber permanecido ultracongelada durante 6 meses en relación a esa misma cepa tras un día en ultracongelación (Figura 118); Para la cepa MuRa5a la diferencia de viabilidad en bdelloplasto resultó muy poco notoria (Figura 119) y en MuRa6a la diferencia tampoco fue significativa. Incluso aumentó ligeramente su detección (Figura 120).

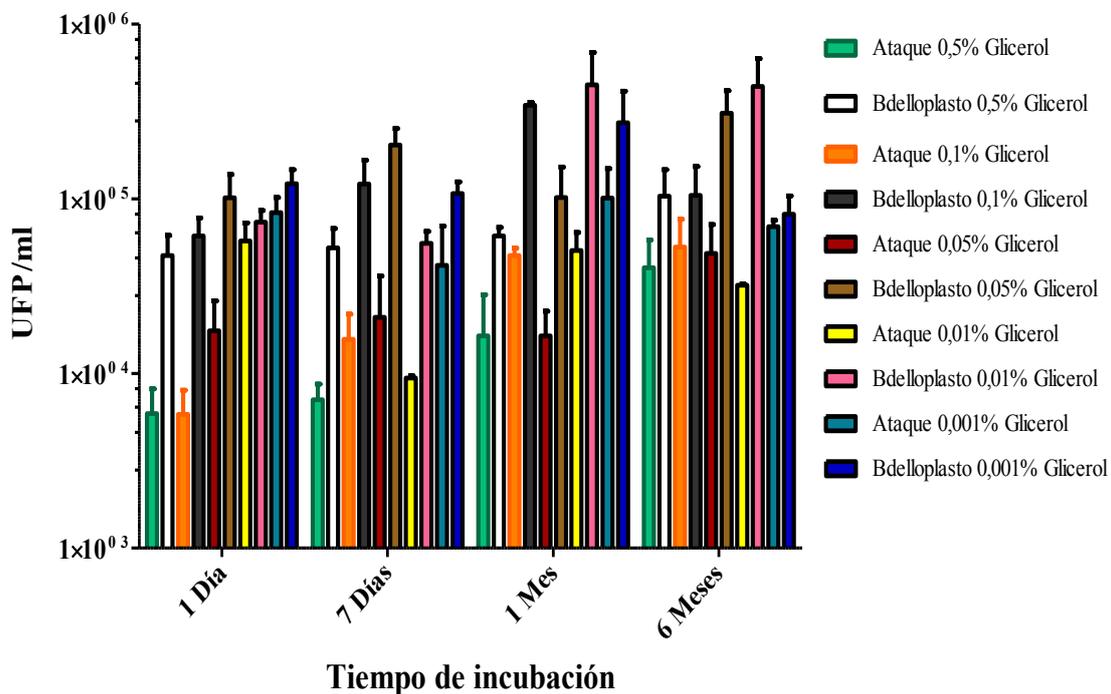


**Fig. 118.** Cantidad de BALOs MuRa1a recuperada según la concentración de glicerol final y según tanto su tiempo mantenido en ultracongelación como su fase. Datos representados: medias +/- desviación estándar.



**Fig. 119.** Cantidad de BALOs MuRa5a recuperada según la concentración de glicerol final y según tanto su tiempo mantenido en ultracongelación como su fase. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

**MuRa6a detectados según su tiempo de ultracongelación**



**Fig. 120.** Cantidad de BALOs MuRa6a recuperada según la concentración de glicerol final y según tanto su tiempo en ultracongelación como su fase. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

# **CAPÍTULO IV**

**Perfil ecológico del grupo**

**BALOs**



# ÍNDICE DEL CAPÍTULO

<b>IV-1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>191</b>
<b>IV-1.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS E.D.A.R.</b>	<b>191</b>
<b>IV-1.2. PROCESOS GENERALES DE LAS E.D.A.R.</b>	<b>192</b>
<b>IV-1.2.1. Pretratamiento y tratamiento primario</b>	192
<b>IV-1.2.1.1. Decantación</b>	192
<b>IV-1.2.1.2. Filtración</b>	192
<b>IV-1.2.2. Tratamiento secundario</b>	193
<b>IV-1.2.2.1. Oxidación</b>	193
<b>IV-1.2.2.2. Lagunas de estabilización</b>	194
<b>IV-1.2.3. Tratamiento terciario</b>	194
<b>IV-1.2.3.1. Desinfección</b>	195
<b>IV-1.2.4. Tratamiento cuaternario</b>	195
<b>IV-1.3. BACTERIAS GRAMNEGATIVAS DE INTERÉS</b>	<b>196</b>
<b>IV-1.3.1. Características generales de las bacterias gramnegativas</b>	196
<b>IV-1.3.2. Características generales de las bacterias presa utilizadas</b>	197
<b>IV-1.3.2.1. <i>Escherichia coli</i></b>	197
<b>IV-1.3.2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	198
<b>IV-1.3.2.3. <i>Salmonella typhimurium</i></b>	198
<b>IV-1.3.2.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	199
<b>IV-2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO</b>	<b>201</b>
<b>IV-3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>201</b>
<b>IV-3.1. MANTENIMIENTO DE BACTERIAS PRESA</b>	<b>201</b>
<b>IV-3.2. DETECCIÓN DE BALOs</b>	<b>201</b>
<b>IV-3.2.1. Detección en medio sólido</b>	201
<b>IV-3.2.2. Seguimiento de lisis bacteriana en medio líquido</b>	201
<b>IV-3.2.3. Detección de virus bacteriófagos</b>	202
<b>IV-3.3. DETERMINACIÓN DE LA C.D.R. DE BALOs</b>	<b>202</b>
<b>IV-3.3.1. Nomenclatura de BALOs para el experimento</b>	202

IV-3.3.2. Preparación del medio WWM	203
IV-3.3.3. Cultivos de bacterias presa	203
IV-3.3.3.1. Mantenimiento de los cultivos bacterianos	203
IV-3.3.3.2. Cultivos en medio líquido	204
IV-3.3.3.3. Cultivos en placa	204
IV-3.3.4. Diseño de experimentos: C.D.R en medio NB-10 y medio WWM	205
IV-3.3.4.1. Comparativa entre BALO-K12 - BALO-K	205
IV-3.3.4.2. Comparativa entre BALO-K12 - BALO-S	206
IV-3.3.5. Diseño de experimentos: C.D.R. en medio NB-50 y medio WWM	208
IV-3.3.6. La C.D.R. determinada en sistemas trimembres	209
IV-3.3.7. Consideración de tiempo 0	210
<b>IV-3.4. PRESENCIA DE BALOs EN DIFERENTES FASES DEL E.D.A.R.</b>	<b>211</b>
IV-3.4.1. Recolección de muestras	211
IV-3.4.2. Detección y recuento de BALOs de la E.D.A.R.	211
IV-3.4.3. Medición de los parámetros físico-químicos del agua de muestra	211
IV-3.4.4. Características de las fases del E.D.A.R. del Campus de Espinardo	211
IV-3.4.4.1. Fases iniciales de depuración	212
IV-3.4.4.2. Fases avanzadas de depuración	214
<b>IV-3.5. TINCIÓN Y ADECUACIÓN DE MUESTRAS</b>	<b>216</b>
IV-3.5.1. Protocolo para la visualización en microscopia confocal y de fluorescencia	216
IV-3.5.2. Adecuación de la muestra para su visualización al microscopio electrónico	216
IV-3.5.3. Protocolo para la realización de la sección ultrafina de la muestra	217
<b>IV-3.6. CONSERVACIÓN DE BALOs A LARGO PLAZO</b>	<b>218</b>
<b>IV-3.7. MICROSCOPIA</b>	<b>218</b>
IV-3.7.1. Microscopía óptica	218
IV-3.7.2. Microscopía electrónica	218
IV-3.7.3. Microscopía de epifluorescencia	219
IV-3.7.4. Microscopía confocal	219
<b>IV-3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>219</b>
<b>IV-4. RESULTADOS</b>	<b>221</b>

<b>IV-4.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DEPREDADORA RELATIVA (C.D.R.) DE BALOs CON DISTINTO HOSPEDADOR</b>	<b>221</b>
<b>IV-4.1.1. Estudio de la C.D.R. de BALO-K12 y BALO-K</b>	221
<b>IV-4.1.1.1. C.D.R. en sistemas bimembres y medio NB-10</b>	221
<b>IV-4.1.1.2. C.D.R. en sistemas trimembres y medio NB-10</b>	222
<b>IV-4.1.1.3. C.D.R. en sistemas bimembres y medio WWM</b>	223
<b>IV-4.1.1.4. C.D.R. en sistemas trimembres y medio WWM</b>	224
<b>IV-4.1.1.5. Comparación entre la C.D.R. en medio WWM y NB-10</b>	226
<b>IV-4.1.1.5.1. Lisis de BALO-K12 y BALO-K en los distintos medios</b>	226
<b>IV-4.1.1.5.2. Comparativa de lisis de presas homólogas y heterólogas</b>	227
<b>IV-4.1.2. Estudio de la C.D.R. de BALO-K12 y BALO-S</b>	231
<b>IV-4.1.2.1. C.D.R en sistemas bimembres y medio NB-10</b>	231
<b>IV-4.1.2.2. C.D.R. en sistemas trimembres y en medio NB-10</b>	232
<b>IV-4.1.2.3. C.D.R. en sistemas bimembres y medio WWM</b>	233
<b>IV-4.1.2.4. C.D.R. en sistemas trimembres y medio WWM</b>	234
<b>IV-4.1.2.5. Comparación entre la C.D.R. en medio WWM y NB-10</b>	236
<b>IV-4.1.2.5.1. Lisis de BALO-K12 y BALO-S en los distintos medios</b>	236
<b>IV-4.1.2.5.2. Comparativa de lisis de presas homólogas y heterólogas</b>	237
<b>IV-4.1.3. Estudio de la C.D.R. de BALO-K12, BALO-K, BALO-S y BALO-P en medios pobres en nutrientes</b>	241
<b>IV-4.1.3.1. C.D.R. en sistemas bimembres y medio NB-50</b>	241
<b>IV-4.1.3.2. C.D.R. en sistemas bimembres y medio WWM</b>	243
<b>IV-4.1.3.3. Comparativa de la C.D.R. en medio NB-50 y WWM</b>	247
<b>IV-4.2. CUANTIFICACIÓN DE BALOs Y BACTERIOFAGOS EN LAS DISTINTAS FASES DE LA E.D.A.R</b>	<b>249</b>
<b>IV-4.2.1. Parámetros físico-químicos del agua en cada fase de depuración</b>	249
<b>IV-4.2.1.1. Oxígeno disuelto</b>	249
<b>IV-4.2.1.2. Turbidez</b>	250
<b>IV-4.2.1.3. pH</b>	251
<b>IV-4.2.1.4. Conductividad eléctrica</b>	252
<b>IV-4.2.2. BALOs detectados en cada fase de depuración</b>	254
<b>IV-4.2.2.1. Tratamiento primario</b>	254
<b>IV-4.2.2.1.1. Recuento de BALOs en el pretratamiento</b>	254

IV-4.2.2.2. Tratamiento secundario	255
IV-4.2.2.2.1. Recuento de BALOs en la Fase I	255
IV-4.2.2.2.2. Recuento de BALOs en la Fase II	255
IV-4.2.2.2.3. Recuento de BALOs en la Fase III	256
IV-4.2.2.2.4. Recuento de BALOs en la Fase IV	257
IV-4.2.3. Fagos detectados en las distintas fases de depuración	259
<b>IV-4.3. EVOLUCIÓN DE BALOs EN FASE DE ATAQUE A FORMAS</b>	
<b>COCOIDES: VISUALIZACIÓN Y ULTRAESTRUCTURA</b>	<b>261</b>
IV-4.3.1. Transición de cepas de BALOs infectivos a bdellococos	261
IV-4.3.1.1. Transición tras incubación a temperatura ambiente	261
IV-4.3.1.2. Transición tras incubación a 30°C	262
IV-4.3.1.3. Transición tras incubación a 37°C	264
IV-4.3.2. Variación del pH en la transición	266
IV-4.3.3. Estudio de bdellococos en distintos sistemas de microscopía	267
IV-4.3.3.1. Estudio en microscopía óptica	267
IV-4.3.3.2. Estudio en microscopía de epifluorescencia	271
IV-4.3.3.3. Estudio en microscopía confocal	274
IV-4.3.4. Ultraestructura de bdellococos	276
IV-4.3.4.1. Ultraestructura vista al microscopio electrónico	276
IV-4.3.4.2. Sección fina de bdellococos	278

## IV-1. INTRODUCCIÓN

### IV-1.1. ASPECTOS GENERALES DE LAS E.D.A.R.

A menudo y como se ha explicado, el agua necesita de tratamiento para cumplir con las estrictas condiciones de calidad requeridas para su utilización en ámbitos específicos. Este tratamiento ha de ser llevado a cabo en las E.D.A.R.

El tratamiento de aguas tiene como uno de sus mejores recursos a los procesos de carácter biológico, siendo las lagunas de estabilización, los sistemas de fangos activados o filtros de arena algunos de los sistemas empleados a tal efecto.

Algunos tipos de aguas residuales requieren previamente de métodos de tratamiento distintos al biológico; tratamientos que también son específicos: en la fase más básica, el agua residual se trata mediante la separación de sus componentes sólidos, generalmente por sedimentación. En las fases intermedias, la separación de partículas en suspensión del agua se lleva a cabo por multitud de procesos tanto físicos, como químicos y biológicos. Al final del tratamiento terciario, el agua tratada se encuentra higienizada para poder ser utilizada como recurso hídrico alternativo.

De esta forma, a la vez que se van produciendo sólidos como consecuencia de la eliminación del material disuelto del agua a lo largo de las sucesivas fases del tratamiento (flóculo biológico), el efluente resultante va aumentando de pureza (USEPA, 2004).

#### IV-1.1.1. Las relaciones microbianas

Tanto en el flóculo biológico como en el efluente, el componente microbiológico es clave. En el mundo microbiano, como en otros ecosistemas, tienen lugar relaciones como la competencia y la depredación constituyendo un ambiente en el que es, prácticamente, un “comer o ser comido” (Martin, 2002). En estas interacciones, los microorganismos depredadores de bacterias resultan clave siendo los principales grupos conocidos los metazoos, los protistas, las propias bacterias depredadoras y los bacteriófagos (Jurgens, 2007). En general, los dos primeros grupos están formados por organismos eucariotas fagotróficos que engloban en su interior a la bacteria presa, mientras que los otros dos comprenden microorganismos que penetran y se multiplican en el interior de la misma.

## **IV-1.2. PROCESOS GENERALES DE LAS E.D.A.R.**

### **IV-1.2.1. Pretratamiento y tratamiento primario**

El primer proceso al que el agua residual se ve sometida es al pretratamiento. El pretratamiento es un proceso previo al tratamiento (a la depuración de aguas propiamente dicha) donde los sólidos grandes, las arenas y las grasas son eliminadas del agua a depurar. Se utilizan dispositivos como el pozo de gruesos, desbaste de gruesos, el desbaste de finos y el sistema de desarenado-desengrasado (Bennett & Shammas, 2010).

Una vez retirados los materiales más voluminosos, el tratamiento primario de las aguas residuales permite la separación de material flotante y sólidos pesados de los residuos líquidos. El líquido restante, generalmente, contiene menos de la mitad de su contenido en sólidos original y aproximadamente dos tercios en forma de coloides y compuestos orgánicos disueltos (Almuktar, Abed, & Scholz, 2018).

Desde este punto parten dos fases distintas de actuación: una centrada en el tratamiento de los fangos resultantes de la purificación sucesiva del agua y otra centrada en el propio tratamiento del agua. En cualquier caso, la grasa y el aceite resultantes del tratamiento del agua se pueden recuperar para su uso como combustible y los sólidos, a menudo, requieren de deshidratación (entre otros procesos que varían según la propia naturaleza del sólido) en una planta especializada para poder ser reutilizados (Mishra, 2016).

#### **IV-1.2.1.1. Decantación**

En el tratamiento primario, el proceso básico para la separación eficaz de los sólidos del agua es aquel que se vale de la gravedad. La decantación es un proceso físico de separación en el que se favorece el depósito de las partículas en suspensión por la propia acción de la gravedad y tiene lugar en los tanques de sedimentación primaria. De tal forma que, por medio de la decantación, las partículas cuya densidad sea mayor que el agua, sedimentarán en el fondo del decantador mientras que el agua quedará libre de partículas más densas (McGhee & Steel, 1991).

#### **IV-1.2.1.2. Filtración**

Los sólidos suspendidos y las suspensiones coloidales de sólidos finos procedentes del proceso anterior de decantación pueden, en general, ser coaguladas de nuevo para ser eliminadas posteriormente por filtración a través de barreras físicas. Estas barreras físicas son barras finas que se diferencian de las pantallas o tamices más gruesos

al poseer la capacidad de eliminar partículas más pequeñas por sus aberturas (Hagar & Elder, 1981).

#### **IV-1.2.2. Tratamiento secundario**

El tratamiento secundario de las aguas residuales tiene como objetivo continuar con el proceso de eliminación de contaminantes comenzado por medio del pretratamiento y el tratamiento primario. Los procesos secundarios de tratamiento de aguas residuales eliminan los residuos orgánicos de las mismas, generalmente mediante procesos de tratamiento biológico. La Demanda Bioquímica de Oxígeno, es la medida de referencia en estos tratamientos y expresa la cantidad de oxígeno necesario para oxidar la materia orgánica en una muestra de agua. Por lo tanto, los residuos orgánicos que pueda contener el agua son indicadores de contaminación y la Demanda Bioquímica de Oxígeno resulta un parámetro esencial para medir la magnitud de dicha contaminación (College Technical Learning, 2018).

##### **IV-1.2.2.1. Oxidación**

El tratamiento secundario de las aguas residuales utiliza la oxidación como herramienta de purificación. Dicho tratamiento se aplica, generalmente, después de que el tratamiento primario haya eliminado los sólidos sedimentables y el material flotante.

La oxidación reduce la Demanda Bioquímica de Oxígeno de las aguas residuales e incluso puede reducir la toxicidad de algunos elementos presentes en ellas. La oxidación tiene como objetivo la descomposición de los contaminantes en dióxido de carbono, agua y componentes inorgánicos o, al menos, la transformación de contaminantes en productos menos lesivos o inofensivos. Los procesos de oxidación avanzados, aunque utilizan diferentes sistemas de reacción, se caracterizan por la misma característica química: la producción de radicales OH (radical hidroxilo). Los radicales OH son extraordinariamente reactivos con la mayor parte de las moléculas orgánicas. Debido a esto, los procesos de oxidación avanzada representan un poderoso medio para la reducción de contaminantes refractarios y/o tóxicos en las aguas residuales. Además, la concentración de algunos compuestos menos digeribles puede reducirse por cometabolismo (degradación simultánea de dos compuestos, donde la degradación del segundo compuesto depende de la presencia del primero) (Andreozzi, Caprio, Insola, & Marotta, 1999).

#### **IV-1.2.2.2. Lagunas de estabilización**

Explicadas en el capítulo anterior, las lagunas de estabilización de desechos suelen ser el método más apropiado de tratamiento de aguas residuales domésticas y municipales en climas más cálidos. Este proceso, también perteneciente al tratamiento secundario, es de bajo coste, de bajo mantenimiento, altamente eficiente, completamente natural y altamente sostenible. La única energía que utilizan las lagunas de estabilización es la energía solar directa, por lo que no necesitan ningún equipo electromecánico, ahorrando así gastos en electricidad y/o en operaciones con personal más cualificado. Por el contrario, requieren mucha más superficie que los procesos convencionales de tratamiento, como son los fangos activados (tratamiento a partir de la acción de microorganismos).

Los sistemas basados en lagunas de estabilización son procesos de una o más series de lagunas con diferentes características. Como se ha explicado, por lo general, la primera laguna de la serie es un estanque anaeróbico y la segunda corresponde a un estanque facultativo. Según la calidad requerida del efluente, se deberá añadir a la serie una laguna de maduración, cuyas características dependerán del uso final del efluente: para riego restringido o no restringido, para el cultivo de peces o vegetales acuáticos o para su descarga en aguas superficiales o subterráneas (Varón, 2004). Una vez haya actuado la laguna facultativa y, tras una nueva decantación, el agua puede continuar su depuración en el tratamiento terciario.

#### **IV-1.2.3. Tratamiento terciario**

El propósito del tratamiento terciario (también llamado "tratamiento avanzado") es proporcionar una etapa de tratamiento final para mejorar aún más la calidad del efluente antes de que se descargue al entorno receptor (mar, río, lago, humedales, suelo, etc.). En dicho tratamiento se consigue la eliminación de contaminantes concretos y puede incluir la eliminación de nutrientes biológicos y la desinfección y eliminación de microcontaminantes (Ayaz, Aktaş, Akça, & Fındık, 2015). Las tecnologías más comunes son la microfiltración o las membranas sintéticas, las cuales provocan que las aguas residuales resultantes sean casi indistinguibles de las aguas de origen natural (sin sus minerales).

El tratamiento de aguas residuales terciarias está diseñado para eliminar, sobre todo, el nitrógeno inorgánico del efluente, consiguiéndolo por nitrificación: el agua con contenido en nitrato se somete a un tratamiento anóxico en el que la desnitrificación reduce el nitrato a  $N_2$ . De esta forma, el efluente no aumenta el nitrógeno biodisponible en las aguas receptoras. Sin embargo, el tratamiento terciario es un sector costoso del tratamiento de aguas residuales, especialmente porque, además de coste en los sistemas de

microfiltración antes descritos, implica el cultivo de microorganismos difíciles de cultivar y el uso secuencial de especies anóxicas, lo que generalmente requiere múltiples tanques y sistemas de bombeo (Ward, 2008).

#### **IV-1.2.3.1. Desinfección**

Además del tratamiento microbiano y la nitrificación, uno de los principales procesos del tratamiento terciario en una E.D.A.R. es la desinfección. El propósito de la desinfección en el tratamiento de aguas residuales es reducir sustancialmente el número de microorganismos en el agua para poder ser descargada nuevamente al medio ambiente. La efectividad de la desinfección depende de la calidad del agua que se está tratando, del tipo de desinfección que se está utilizando, de la dosis de desinfectante (concentración y tiempo) y de otras variables ambientales. Tradicionalmente, el uso de cloro gaseoso ha sido el método más común de desinfección de aguas residuales al resultar relativamente económico, pero es un químico altamente tóxico que debe transportarse y manipularse con extrema precaución. Se almacena bajo presión en grandes tanques y se libera en las aguas residuales como gas (College Technical Learning, 2018). Otros métodos comunes de desinfección incluyen al ozono, cloro, luz ultravioleta o hipoclorito de sodio. Pero, aunque la utilización del ozono está en auge, la cloración sigue siendo la forma más común de desinfección de aguas residuales debido a su bajo coste y su historial de efectividad a largo plazo.

#### **IV-1.2.4. Tratamiento cuaternario**

Los contaminantes emergentes son aquellos de creciente y reciente preocupación. Son principalmente compuestos orgánicos como: pesticidas, productos farmacéuticos y de cuidado personal, hormonas, plastificantes, aditivos alimentarios, conservantes de madera, detergentes para la ropa y demás tensioactivos, desinfectantes y otros compuestos orgánicos que se están empezando a encontrar en corrientes naturales de aguas residuales generadas por actividades humanas e industriales. La mayoría de estos contaminantes emergentes no tienen una regulación exhaustiva y podrían provocar efectos letales en la vida humana y acuática, incluso estando presentes a bajas concentraciones.

Las plantas de tratamiento de agua primarias y secundarias convencionales no eliminan o degradan estos contaminantes tóxicos de manera eficiente. Dicha eliminación de contaminantes emergentes tiene como uno de sus aliados más prometedores a la técnica de la adsorción. Adsorción se refiere al proceso o fenómeno por el cual iones, moléculas, líquidos, sólidos o gases disueltos en el agua quedan retenidos en una superficie. Lo

atractivo del método se debe a que es de bajo costo inicial para la implementación, a que es altamente eficiente y a que tiene un diseño operativo simple (Sophia A. & Lima, 2018). En relación con los productos farmacéuticos, las siguientes sustancias han sido identificadas como "toxicológicamente relevantes" y por tanto, propuestas para ser eliminadas prioritariamente mediante el tratamiento cuaternario del agua residual: sustancias con efectos de alteración endocrina, sustancias genotóxicas y sustancias que mejoran el desarrollo de resistencias bacterianas (Lienert, Bürki, & Escher, 2007).

### IV-1.3. BACTERIAS GRAMNEGATIVAS DE INTERÉS

Ya sea en las E.D.A.R. o en otros hábitats, la presencia de determinadas bacterias aumenta la posibilidad de transmisión a seres humanos o a otros hábitats con valor ambiental. Por lo tanto, en este trabajo, las bacterias presa utilizadas para la depredación de BALOs correspondieron a cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*. Todas ellas bacterias gramnegativas y con interés sanitario.

#### IV-1.3.1. Características generales de las bacterias gramnegativas

En microbiología, se denominan bacterias gramnegativas a aquellas que no se tiñen de azul oscuro o de violeta por la tinción de Gram, resultando en un color rosado debido a la contratinción con safranina que se realiza como parte de dicha técnica: de ahí el nombre de "gramnegativas" o también "Gram-negativas" (Salton & Kim, 1996). Esta característica está íntimamente ligada a la envoltura celular bacteriana, la cual presenta una doble membrana celular (una externa y la otra citoplasmática) que conforma un tipo natural de organización bacteriana. Las bacterias gramnegativas poseen dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias grampositivas presentan solo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa (Madigan, Martinko, Stahl, & Clark, 2018). De modo que, en las bacterias gramnegativas, al resultar la envoltura celular de poco grosor, no retiene el colorante violeta durante la tinción de Gram de ahí que se les denomine "negativas" (Gram, 1884). Las bacterias gramnegativas muestran, principalmente, las siguientes características (Ghuysen & Hakenbeck, 1994):

- Presencia de una membrana celular interna (citoplásmica).
- Presencia de una capa delgada de peptidoglicano.
- La membrana externa contiene lipopolisacáridos y fosfolípidos.
- Existencia de porinas en la membrana externa, que actúan como poros para moléculas particulares.

- Entre la membrana externa y la membrana citoplásmica existe un espacio relleno de una sustancia concentrada y similar a un gel llamada periplasma.
- Si están presentes, los flagelos tienen cuatro anillos de soporte en lugar de dos
- Ausencia de ácidos teicoicos o ácidos lipoteicoicos.
- Algunos contienen lipoproteínas de Braun, que sirven como enlace entre la membrana externa y la cadena de peptidoglicano por un enlace covalente.
- La mayoría, con muy pocas excepciones, no forman esporas.

### IV-1.3.2. Características generales de las bacterias presa utilizadas

#### IV-1.3.2.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria gramnegativa, con forma de bacilo y que utiliza flagelos peritricos (multitud de flagelos que se proyectan en todas las direcciones) cuando es móvil, aunque también puede ser inmóvil. Es una bacteria quimiorganótrofa anaeróbica facultativa, al ser capaz de metabolizar de forma tanto respiratoria como fermentativa. Tiene un tamaño aproximado de 0,5mm x 2mm y, además de resultar un componente importante de la biosfera, *E. coli* cumple una función de control en el interior de organismos al suprimir el crecimiento de especies bacterianas dañinas y al sintetizar cantidades apreciables de vitaminas (Proteomes - *Escherichia coli* (strain-clone D i2'),” 2018).

Dicha bacteria, como se ha mencionado, coloniza el intestino inferior de los animales y sobrevive cuando se libera al medio ambiente natural, lo que permite una amplia difusión a nuevos huéspedes. El genoma central de *E. coli* posee, aproximadamente, 2000 genes con múltiples puntos de integración que se conservan en todos los genomas de las cepas incluidas en la especie. Los puntos de integración corresponden a regiones de inserciones y deleciones abundantes y paralelas de material genético (Madigan, Martinko, Parker, y Gacto Fernández, 2004). Desde el año 2006, se encuentran disponibles secuencias altamente precisas para las cepas de *Escherichia coli* K-12/MG1655 y K-12/W3110, las cuales habían permanecido separadas desde mediados de los años 50. La secuenciación indica que solo hay ocho verdaderas inserciones/eliminaciones o diferencias de bases entre las dos cepas (Blattner et al., 1997).

Algunas cepas de *E. coli* pueden producir enfermedades y causar diarrea. El tipo más virulento de *E. coli* provoca diarrea hemorrágica y, en los sistemas inmunológicos más débiles, también puede causar insuficiencia renal e incluso la muerte (Wasey & Salen, 2018).

#### IV-1.3.2.2. *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* es una bacteria anaerobia facultativa, con forma de bacilo, gramnegativa, no móvil, encapsulada y fermentadora de lactosa. Posee un tamaño entre 0.5µm y 2.0µm y aparece como un fermentador de lactosa mucoide en agar MacConkey (Guo et al., 2012).

Aunque se encuentra en la flora normal de la boca, la piel y los intestinos, puede provocar cambios destructivos en los pulmones humanos y animales (especialmente en los alvéolos) si se aspira, produciendo esputo con sangre. En los últimos años, las especies de *Klebsiella* se han convertido en importantes patógenos en infecciones nosocomiales, de modo que *Klebsiella* spp. se encuentra entre los patógenos más comunes aislados en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI). El aumento de la resistencia a los medicamentos antimicrobianos, incluido la cepa de *K. pneumoniae* resistente a los antibióticos carbapenémicos, representa un aumento sustancial de las tasas de enfermedad y muerte (Won et al., 2011). *Klebsiella* spp. ocupa el segundo lugar tras *E. coli* spp. como causante de infecciones del tracto urinario en personas con edad avanzada, siendo también un patógeno oportunista para pacientes con una enfermedad pulmonar crónica, patogenicidad entérica, atrofia de la mucosa nasal y rinoscleroma (Ryan, Ray, & Sherris, 2004).

La afección más común causada por la bacteria *Klebsiella* fuera del hospital es la neumonía, generalmente en forma de bronconeumonía y bronquitis. Estos pacientes tienen una mayor tendencia a desarrollar abscesos pulmonares, cavitación, empiema (acumulación de pus) y adherencias pleurales. Tiene una tasa de mortalidad de alrededor del 50%, incluso con terapia antimicrobiana (Sanchez et al., 2013).

#### IV-1.3.2.3. *Salmonella typhimurium*

*Salmonella entérica* es una especie bacteriana perteneciente al género *Salmonella* constituido por bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos y con flagelos peritricos. Tienen un tamaño de 0,5 - 1,5µm de ancho x 2 - 5µm de largo y constituyen un grupo importante de patógenos para animales y humanos (Andino & Hanning, 2015).

El género *Salmonella* representa comúnmente a patógenos transmitidos por los alimentos y es responsable de las infecciones zoonóticas en humanos y especies animales, incluidas las aves. Por lo tanto, las infecciones por *Salmonella* representan una preocupación importante para la salud pública, los animales y la industria alimentaria en todo el mundo. *Salmonella entérica* representa la especie más patógena y puede transmitirse a los seres humanos a lo largo de toda la cadena alimenticia, comúnmente a través de alimentos

contaminados de origen animal, como son las aves de corral y los productos relacionados (huevos), carne de cerdo, pescado, etc (Jajere, 2019).

*Salmonella enterica* subespecie I, serovar *Typhimurium* (*S. typhimurium*), es una de las principales causas de gastroenteritis humana y se utiliza para el estudio de la fiebre tifoidea. La incidencia de salmonelosis no tifoidea está aumentando en todo el mundo, causando millones de infecciones y muchas muertes cada año. Por otro lado, la transferencia lateral de genes es frecuente, con un 11% de los genes *S. typhimurium* LT2 ausentes de *S. enterica* serovar *Typhi* (*S. typhi*), y un 29% faltante de *Escherichia coli* K12. Los 352 homólogos del gen de *S. typhimurium* LT2 subespecie I de la mayoría de patógenos de mamíferos y aves que contienen *S. enterica*, son útiles para estudios de epidemiología, especificidad de hospedadores y patogénesis (McClelland et al., 2001).

#### IV-1.3.2.4. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria gramnegativa, aeróbica y con motilidad unipolar. Es un género de bacilos rectos o ligeramente curvados que miden de 0,5 a 0,8µm x 1,5 a 3,0µm, son oxidasa positivos y aeróbicos estrictos, aunque en algunos casos pueden utilizar el nitrato como aceptor de electrones. Las distintas especies de *Pseudomonas* normalmente habitan el suelo, el agua y la vegetación y pueden ser aisladas de la piel, la garganta y las heces de personas sanas. A menudo también colonizan alimentos y superficies como fregaderos, grifos y equipos respiratorios del hospital, de modo que la propagación se produce de persona a persona por contacto o por ingestión de alimentos y agua contaminados (Iglewski, 1996).

Debido a la variedad de mecanismos de adaptación, supervivencia y resistencia a múltiples clases de antibióticos, las infecciones por cepas de *P. aeruginosa* pueden ser potencialmente mortales y también están surgiendo en todo el mundo como una amenaza para la salud pública. Esto es debido a procesos conocidos como “radiación adaptativa” mediante los cuales *P. aeruginosa* ajusta sus procesos fisiológicos para favorecer la adaptación y la supervivencia en respuesta a las señales y tensiones ambientales (Moradali, Ghods, & Rehm, 2017).

*P. aeruginosa* infecta a los pulmones y vías respiratorias, a las vías urinarias, a los tejidos por medio de heridas y también causa otras sepsis (infecciones generalizadas en el organismo). Además, *Pseudomonas* spp. puede causar neumonías, por lo que, en ocasiones, precisa de ayuda mecánica para superar dichas afecciones, resultando ser uno de los microorganismos aislados más frecuentemente en hospitales (Ryan et al., 2004).



## **IV-2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO**

- ▣ Cuantificar la capacidad depredadora de distintas cepas de BALOs de tipo salvaje, en función de diferentes condiciones de aislamiento.
- ▣ Estudiar la presencia de BALOs y de virus bacteriófagos en los diversos biotopos del E.D.A.R. del Campus de Espinardo (Murcia).
- ▣ Constatar la existencia de formas de persistencia de BALOs.

## **IV-3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **IV-3.1. MANTENIMIENTO DE BACTERIAS PRESA**

Las bacterias presa utilizadas en todo el estudio fueron mantenidas y cultivadas en los mismos medios de cultivo y bajo las mismas condiciones mostradas en la sección correspondiente del apartado “Material y Métodos” del capítulo III.

### **IV-3.2. DETECCIÓN DE BALOs**

#### **IV-3.2.1. Detección en medio sólido**

Para el revelado BALOs realizado en los estudios de este capítulo, la técnica empleada estuvo basada, en la llamada técnica de la “doble capa de agar” (DCA) (Seidler & Starr, 1969; Stolp, 1981), detallada en la sección correspondiente del apartado “Material y Métodos” del capítulo III.

#### **IV-3.2.2. Seguimiento de lisis bacteriana en medio líquido**

Tanto la comprobación de la lisis de BALOs en medio líquido como la determinación del pH de los cultivos (en medios sólido y líquido), fueron realizadas de la misma forma que se ha explicado en la sección correspondiente del apartado “Material y Métodos” del capítulo III.

### IV-3.2.3. Detección de virus bacteriófagos

La aparición de virus bacteriófagos se consideró como tal tras la aparición, previa realización de la técnica DCA para la detección de BALOs, de zonas líticas extensas en las placas de cultivo con menos de 24h de incubación.

### IV-3.3. DETERMINACIÓN DE LA C.D.R. DE BALOs

#### IV-3.3.1. Nomenclatura de BALOs para el experimento

La denominación de las cepas de BALOs como MuRa1, MuRa2, MuRa3, MuRa4, MuRa5 y MuRa6, empleado en el ensayo de las cepas de BALOs detectadas en las distintas fases de depuración de la E.D.A.R (n=3), es la misma descrita en el apartado “Material y Métodos” del capítulo III.

Por otro lado, las cepas de BALOs utilizadas en el estudio de su Capacidad Depredadora Relativa (CDR) (n=3) son las resultantes tras dos “bloom” (proliferación masiva de BALOs tras la lisis de las bacterias presa) sucesivos de las cepas de BALOs MuRa1a, MuRa5a y MuRa6a. Dichos “blooms” se han generado empleando la misma bacteria presa utilizada para su aislamiento, a 30°C y tras una filtración por 0,45µm de tamaño de poro entre cada lisis (para eliminar a la bacteria presa anterior). De modo que cada población de los (ahora denominados) BALO-K12, BALO-S, BALO-K y BALO-P utilizada en el experimento, correspondió a la tercera generación de las cepas de BALOs MuRa1a, MuRa5a y MuRa6a respectivamente, tal y como se muestra en la Tabla 21.

<b>Formación de la nueva nomenclatura de BALOs para CDR</b>		
<b>Denominación anterior</b>	<b>Bacteria presa del bloom</b>	<b>Denominación actual</b>
MuRa1a	<i>E. coli</i> K-12	<b>BALO-K12</b>
MuRa5a	<i>S. thyphimurium</i> LT2	<b>BALO-S</b>
MuRa6a	<i>K. pneumoniae</i> AA100	<b>BALO-K</b>
MuRa7a	<i>P. aeruginosa</i>	<b>BALO-P</b>

**Tabla 21.** Denominación en el capítulo anterior, bacteria presa utilizada en la lisis y nueva denominación de las cepas de BALOs de las que se determinó su CDR.

### IV-3.3.2. Preparación del medio WWM

Con el objetivo de obtener un sistema donde la detección de BALOs pudiera ser extrapolada más fielmente a lo que ocurre en el medio donde se recogieron las muestras, se ideó un medio con la propia agua cruda de la fase de pretratamiento de la E.D.A.R. del Campus de Espinardo (Murcia) filtrada sucesivamente por un tamaño de poro menor para evitar colmataciones. Este medio resultante se le denominó como medio WWM (Wastewater Medium). El proceso completo para la preparación de este medio es el siguiente:

El agua cruda de la E.D.A.R. fue filtrada primeramente con un filtro comercial (papel de celulosa) cuya porosidad suele oscilar entre 5-11  $\mu\text{m}$ ; seguidamente, esa agua fue filtrada una segunda vez por una membrana con un tamaño de poro de 2,7  $\mu\text{m}$  (Milipore™). Posteriormente, el agua resultante volvió a ser filtrada por un tamaño de poro de 1,2  $\mu\text{m}$  (Milipore™) antes ser filtrada por última vez por un tamaño de poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Milipore™).

El agua de pretratamiento filtrada múltiples ocasiones no fue esterilizada, sino que fue tindalizada (fue llevada a ebullición y enfriada posteriormente) 3 veces consecutivas para evitar así la degradación excesiva de cualquier componente presente en la muestra que pudiera inducir a la proliferación de BALOs. Cuando el medio WWM se hubo atemperado a temperatura ambiente, se encontró apto para ser usado comparativamente al medio NB-10 (la comparación y el procedimiento del experimento se detalla en el apartado de “diseño de experimentos” del presente capítulo).

### IV-3.3.3. Cultivos de bacterias presa

#### IV-3.3.3.1. Mantenimiento de los cultivos bacterianos

Las bacterias empleadas como hospedadoras (*E. coli* K-12, *K. pneumoniae* AA100 y *S. typhimurium* LT2) utilizadas en el estudio de la CDR, fueron mantenidas durante 1 día a 30°C y a 70 r.p.m (SANYO Gallenkamp™) en medio de cultivo NB-10, en medio WWM o en NB-50 (Nutrient Broth diluido 50 veces, OXOID™), según se fuera a determinar la CDR en medios pobres (utilizando los medios WWM y/o NB-50) o en medios más ricos (utilizando entonces el medio NB-10).

En cuanto a los controles independientes de bacterias presa, éstos se realizaron en medio WWM sin la presencia de ninguna otra bacteria para eliminar cualquier presión sobre estas. De esta manera, la tendencia de las bacterias presa fue analizada en un medio con componentes del su propio hábitat y el aumento o disminución de sus poblaciones puede resultar más fácilmente extrapolable a lo que pudiera ocurrir en el medio natural.

#### IV-3.3.3.2. Cultivos en medio líquido

Tras el mantenimiento de las bacterias presa en los medios NB-10, WWM y NB-50, su cultivo en medio líquido se realizó tomando 0,1ml de la suspensión bacteriana de mantenimiento y ajustándola a una densidad óptica (D.O.) a 600nm por medio del espectrofotómetro (Spectronic 20<sup>TM</sup>). Esa suspensión ya ajustada se adicionó a 4ml de NB-10, NB-50 o de medio WWM según fuere el caso. Posteriormente, esos 4ml fueron añadidos a 50ml de los diferentes medios de cultivo para medir la multiplicación de BALOs con el paso de los días.

#### IV-3.3.3.3. Cultivos en placa

Independientemente del medio donde fuesen mantenidas para determinar la CDR de cada cepa de BALOs, las bacterias presa *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* AA100 y *S. typhimurium* LT2 fueron incubadas en placas de agar NA-10 a 30°C.

#### **IV-3.3.4. Diseño de experimentos: C.D.R. en medio NB-10 y medio WWM**

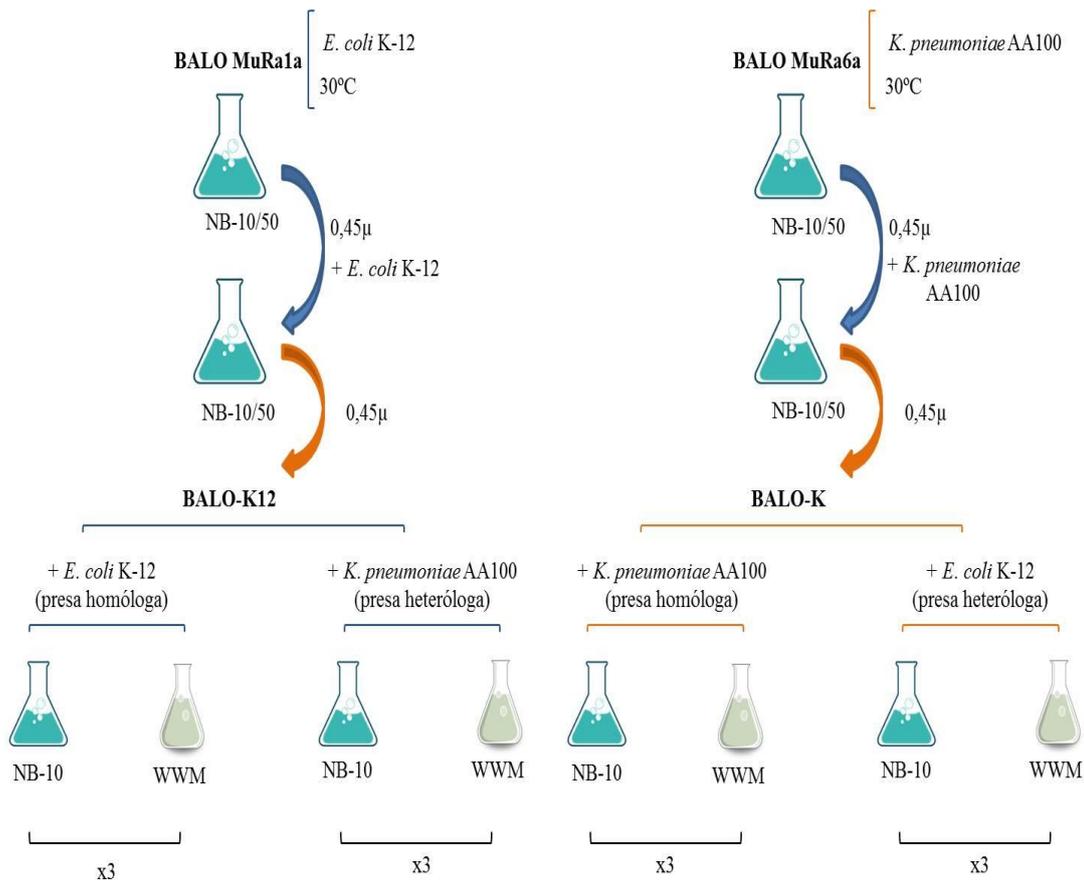
La denominada Capacidad Depredadora Relativa (CDR), se refiere a la capacidad de las cepas de BALOs para depredar a un tipo de bacteria presa con la cual han experimentado varias proliferaciones sucesivas, o “blooms” (denominada “bacteria homóloga”) con respecto a la capacidad de depredación de ese BALO a una bacteria presa a la que nunca han depredado (“denominada bacteria heteróloga”).

La determinación de la CDR de cada cepa tuvo como objetivo el comprobar la especificidad de las cepas de BALOs hacia su presa de origen. Los experimentos efectuados en la determinación de la CDR se han diseñado y fundamentado como sigue.

##### **IV-3.3.4.1. Comparativa entre BALO-K12 - BALO-K**

Como se ha comentado en el apartado correspondiente y como se puede observar en la Figura 121, las cepas BALO-K12 y BALO-K fueron reactivadas empleando medio NB-10 o NB-50 cuando el estudio fue efectuado en medio NB-10 o WWM respectivamente. Dichas cepas (BALOs-K12 y BALOs-K) fueron las cepas de partida para determinar la CDR añadiendo su presa homóloga (la misma bacteria presa de las generaciones anteriores) o añadiendo su presa heteróloga (presa distinta a la que había estado lisando y a la vez homóloga de la cepa de BALO de la comparativa).

Lo anterior descrito se realizó, de manera paralela, en tres cultivos de cada cepa de BALOs con su bacteria homóloga y otros tres para cada cepa BALOs con su bacteria heteróloga, tal y como muestra la Figura 121. De esta manera, se detectaron BALOs diariamente en placa con objeto de determinar el aumento o disminución de BALOs con respecto a tiempo 0.

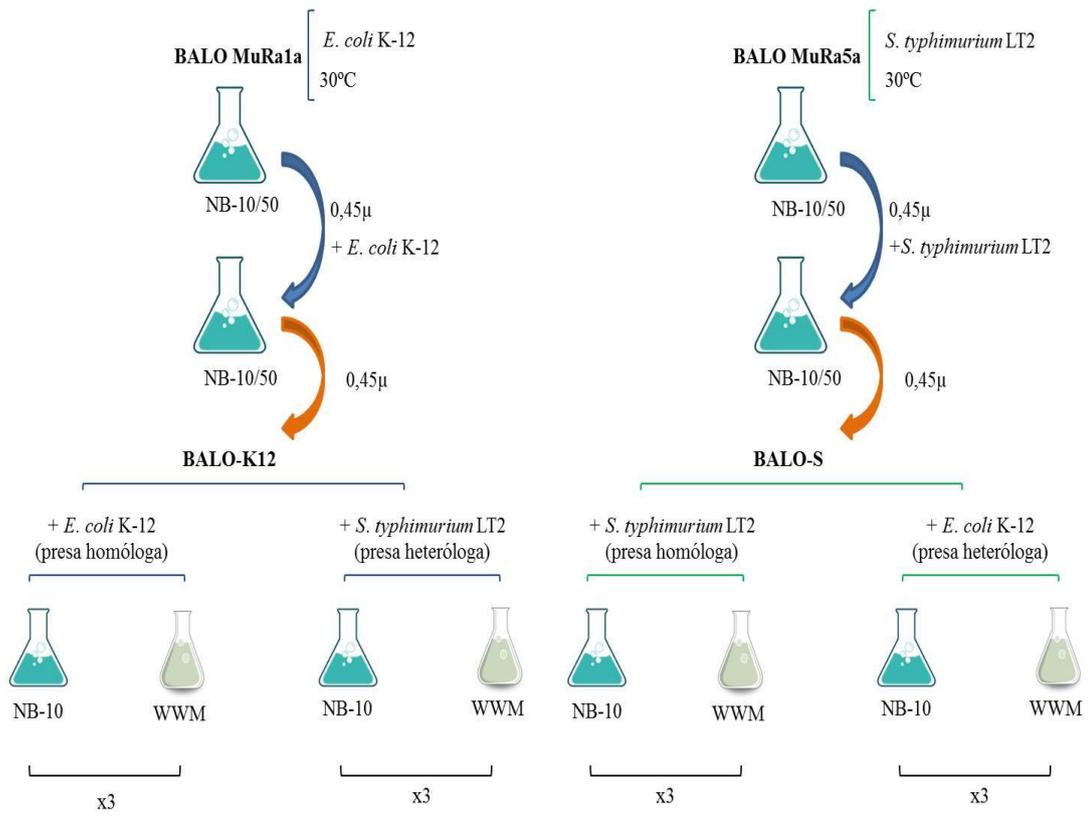


**Fig. 121.** Diseño del experimento de la Capacidad Depredadora Relativa (CDR) para las cepas BALO-K12 y BALO-K en medio NB-10 y medio WWM.

#### IV-3.3.4.2. Comparativa entre BALO-K12 - BALO-S

Como se observa en la Figura 122, las cepas de BALO-K12 y BALO-S fueron reactivadas, de igual manera, en medio NB-10 o NB-50 si la determinación de la CDR fue efectuada en medio NB-10 o WWM respectivamente. Igualmente, en esta comparación, la CDR se determinó comparando la detección de las cepas de BALOs con su presa homóloga (la misma bacteria presa de las generaciones anteriores) y con la heteróloga (distinta presa que la de las anteriores lisis y, a la vez, homóloga de la cepa de BALOs a comparar), de la misma manera que la comparación anterior y como también muestra la Figura 122.

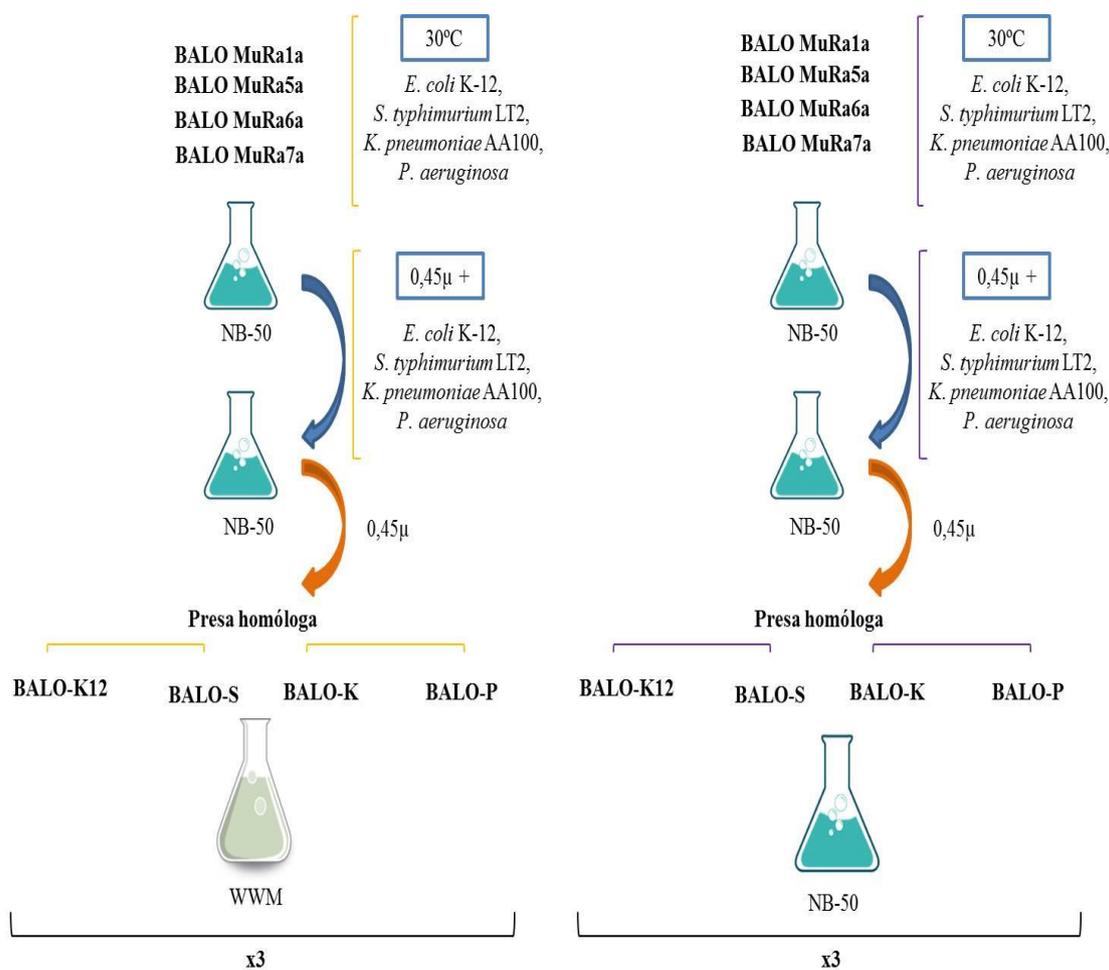
La determinación de la CDR para estas cepas de BALOs también fue realizada de manera paralela en tres cultivos para que, posteriormente, fueran comparados con su bacteria homóloga y otros tres para cada cepa de BALOs con su bacteria heteróloga. De esta manera, al igual que la comparación con las cepas anteriores, se fueron detectando diariamente en placa para determinar un aumento en la población de BALOs (Figura 122).



**Fig. 122.** Diseño del experimento de la Capacidad Depredadora Relativa (CDR) para las cepas BALO-K12 y BALO-S en medio NB-10 y medio WWM.

IV-3.3.5. Diseño de experimentos: C.D.R. en medio NB-50 y medio WWM

Para el estudio comparativo de la riqueza entre los medios NB-50 y WWM, la CDR fue cuantificada empleando a las cepas BALO-K12, BALO-S, BALO-K y, esta vez, además, la cepa BALO-P (Figura 123). Todas ellas analizadas con sus bacterias presa homóloga exclusivamente. Con este estudio se determinó la riqueza de ambos medios por medio de la CDR en aquellas condiciones más propicias para la proliferación de cada cepa.

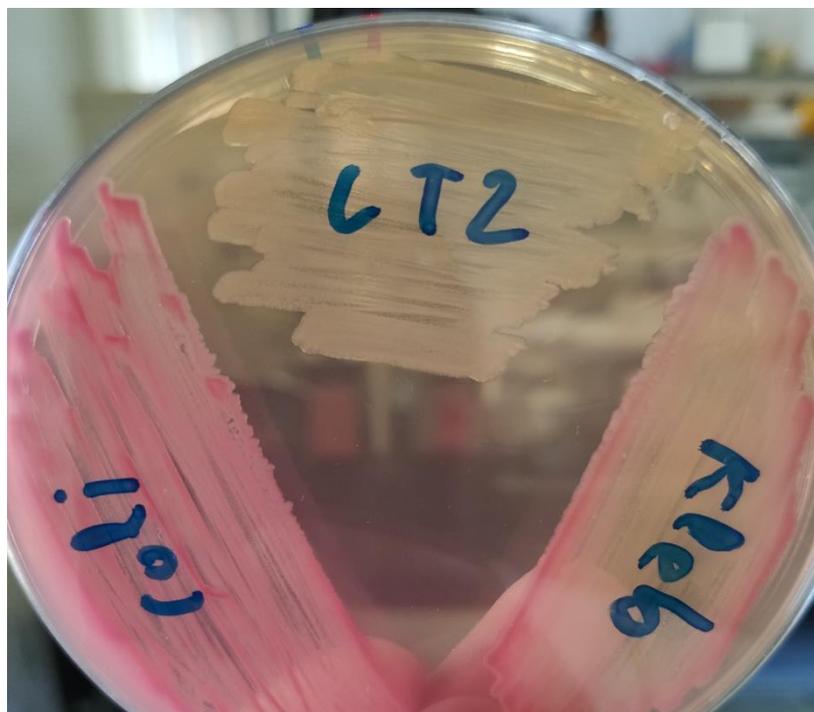


**Fig. 123.** Procedencia de las cepas BALO-K12, BALO-S, BALO-K y BALO-P y diseño del experimento de las distintas cepas de BALOs en medio WWM y en medio NB-50.

#### IV-3.3.6. La C.D.R. determinada en sistemas trimembres

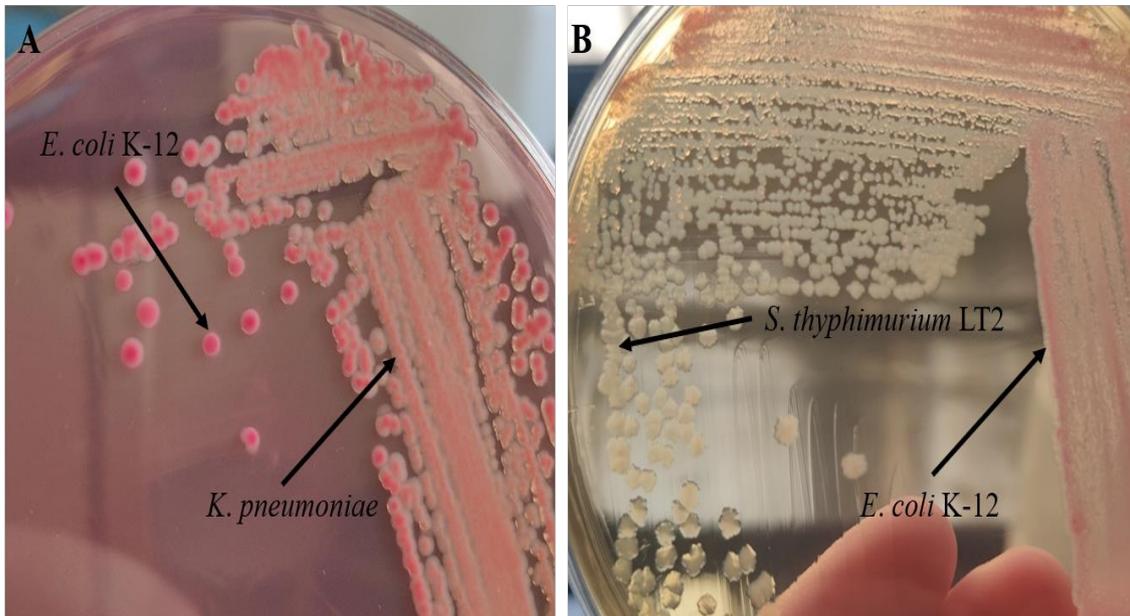
En los mismos estudios de determinación de la CDR sobre cepas BALOs-K12, de BALOs-K y BALO-S, cada cepa de BALOs fue cultivada en medio NB-10 o medio WWM con las dos bacterias presa disponibles, la homóloga y la heteróloga (constituyendo cultivos con sistemas trimembres). La cantidad de presa administrada al cultivo líquido fue ajustada en base a la densidad óptica (proceso explicado anteriormente).

Debido a las características del experimento, la predisposición de cada cepa de BALOs a depredar una presa en concreto se estableció atendiendo a un eventual descenso de la población de cualquiera de los dos tipos de bacteria presa que coexistieran en el sistema trimembre. El recuento en placa del descenso de población de *E. coli* K-12, *S. typhimurium* LT2 y *K. pneumoniae* AA100 se realizó mediante placas de agar McConkey con Cristal Violeta (Oxoid™), sembrado directamente desde el cultivo trimembre (o desde una dilución de éste) y diferenciando las colonias visualmente. Como se puede observar en la Figura 124, para la diferenciación de las colonias se eligió agar McConkey con Cristal Violeta debido a que *E. coli* K12 aparece en colonias rojizas, *S. typhimurium* LT2 aparece de color blanco (al no fermentar la lactosa) y *K. pneumoniae* aparece como colonias rosadas y con aspecto mucoso.



**Fig. 124.** Aspecto de *E. coli* K-12 (rosa intenso), *S. typhimurium* LT2 (blanquecino) y *K. pneumoniae* AA100 (rosáceo) en placas de McConkey con Cristal Violeta (Oxoid™).

El recuento del descenso de población de enterobacterias fue posible debido a la facilidad para diferenciar las tres bacterias presa en placa (Figura 125).



**Fig. 125.** Diferenciación a simple vista, en placa McConkey Cristal Violeta (Oxoid™), de las colonias de enterobacterias utilizadas en sistemas trimembres. **A)** Diferencia entre las colonias de *E. coli* K-12 y *K. pneumoniae* AA100. **B)** Diferencia entre *E. coli* K-12 y *S. typhimurium* LT2.

#### IV-3.3.7. Consideración de tiempo 0

En todos los estudios relacionados con la CDR, el tiempo 0 de cada cepa de BALOs empleada se consideró tras el primer día de haber sido añadida, junto con su bacteria hospedadora, a cualquier medio de cultivo con el que se fuera a ir midiendo posteriormente su CDR día a día.

#### **IV-3.4. PRESENCIA DE BALOs EN DIFERENTES FASES DEL E.D.A.R.**

##### **IV-3.4.1. Recolección de muestras**

En el estudio para cuantificar las cepas BALOs detectadas en las distintas fases de depuración de la E.D.A.R (n=3), las muestras de agua procedieron tanto de fases iniciales como de fases avanzadas de depuración que tienen lugar en dicha E.D.A.R. del Campus de Espinardo (Murcia) para, posteriormente, proceder a las detecciones de BALOs y de virus bacteriófagos.

##### **IV-3.4.2. Detección y recuento de BALOs de la E.D.A.R.**

Para la detección de BALOs en fases iniciales de depuración, se utilizó, como en el resto de detecciones de toda la investigación realizada, la técnica DCA de manera habitual (descrita en el apartado correspondiente del capítulo III). En las sucesivas fases de depuración, se empleó la técnica DCA introduciendo una variante en el medio de revelado; el medio usado fue AN-50 tanto para el “agar de base” como para el “agar de cobertera”. Este medio de revelado más pobre se realizó con el fin de “asemejar” la riqueza de las placas a la riqueza teórica existente en la muestra.

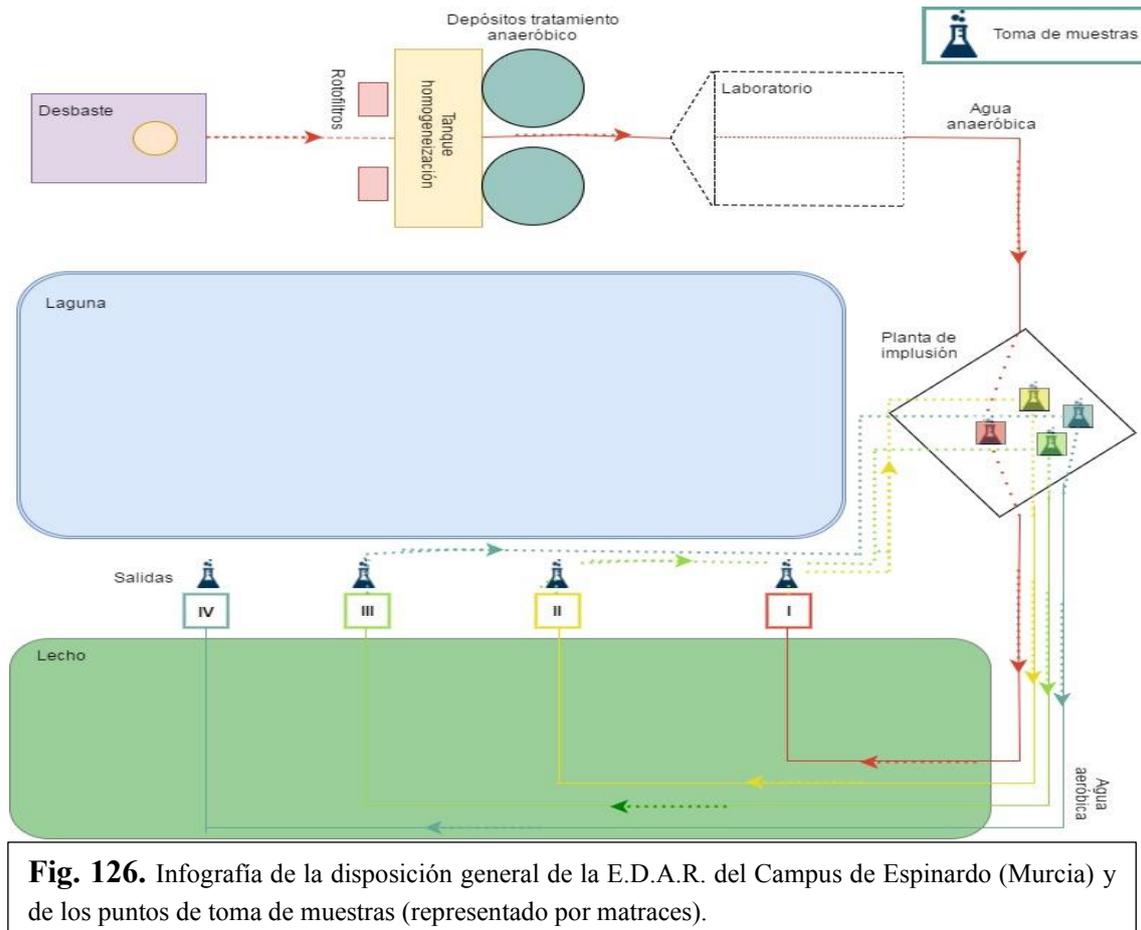
##### **IV-3.4.3. Medición de los parámetros físico-químicos del agua de muestra**

Como se explicó en el capítulo anterior, la medida de la DBO<sub>5</sub> del agua de muestra fue realizada por medio de los manómetros de las botellas donde se mantuvo la muestra (VELP®). La medida del pH se realizó por medio de pH-metro (XS pc52 series™). En cambio, las medidas de la conductividad a 25°C, el oxígeno disuelto y el potencial red-ox del agua de muestra se realizaron con el conductímetro, el oxígeno y el medidor de potencial red-ox respectivamente (Hanna Instruments®).

##### **IV-3.4.4. Características de las fases del E.D.A.R. del Campus de Espinardo**

En términos generales, el E.D.A.R. del Campus Espinardo en Murcia está compuesto por un área de desbaste donde llega el agua residual de los diferentes edificios, de una fase de pretratamiento y una de depuración a base de lechos de percolación situados cerca unos de otros, como se puede observar en la Figura 126.

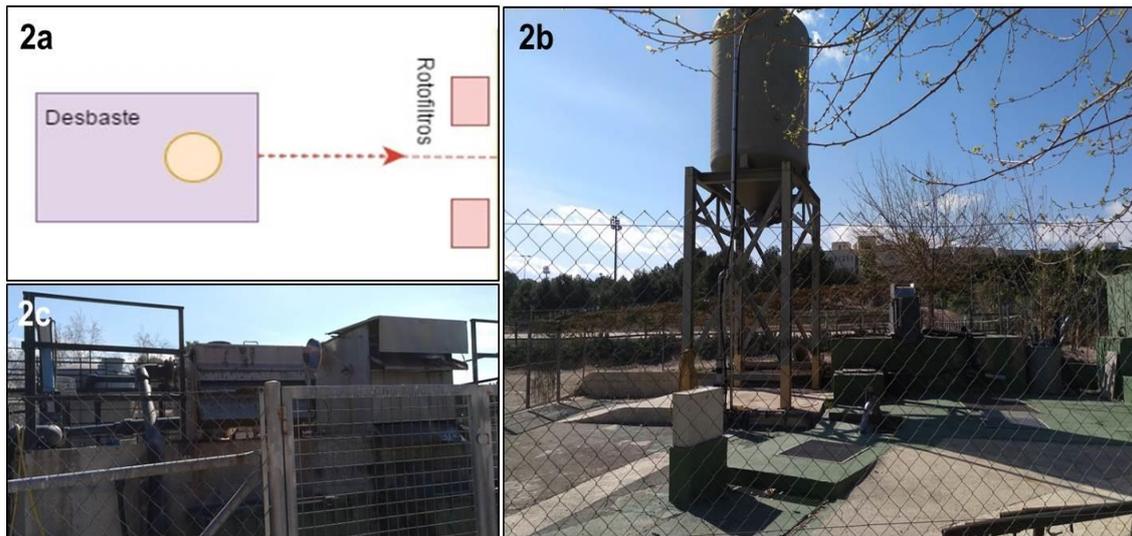
Primeramente, tras el desbaste, el agua cruda es sometida a un pretratamiento en los rotofiltros y en el tanque de homogenización, mediante los cuales el agua queda descargada de los materiales más gruesos y densos. Posteriormente, tras entrar en la planta de impulsión, el agua va realizando un circuito por el que va siendo filtrada sucesivamente en los sistemas de filtros de anillas, obteniéndose así, progresivamente, un agua cada vez más depurada en cada una de las 4 fases de dicho circuito (Figura 126).



**Fig. 126.** Infografía de la disposición general de la E.D.A.R. del Campus de Espinardo (Murcia) y de los puntos de toma de muestras (representado por matraces).

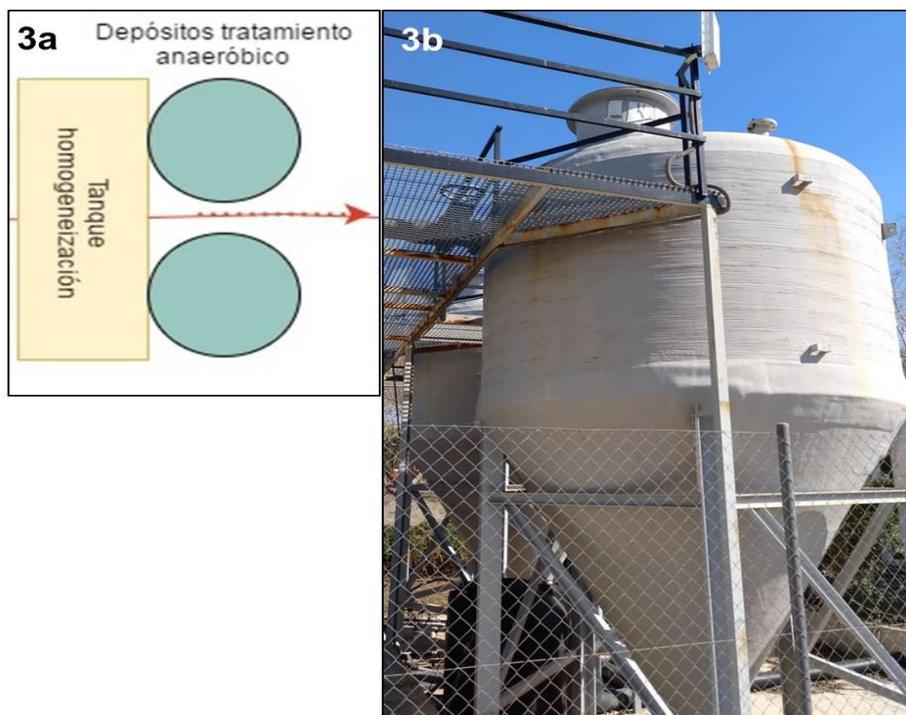
#### IV-3.4.4.1. Fases iniciales de depuración

Concretamente, en la fase de pretratamiento, el agua queda libre de gruesos y de materiales más grandes como plásticos y/o papeles por mediación del sistema de desbaste. Como se ha indicado, esta fase inicial de depuración tiene lugar cuando el efluente llega a los rotofiltros (Figura 127). De dichos rotofiltros se recolectaron las muestras de agua para determinar la capacidad depredadora de BALOs en estas fases iniciales de depuración.



**Fig. 127.** Fase inicial de depuración del E.D.A.R. del Campus de Espinardo **2a)** Detalle del plano de la fase de pretratamiento de la E.D.A.R. **2b)** Detalle del área de desbaste y **2c)** detalle de los rotofiltros.

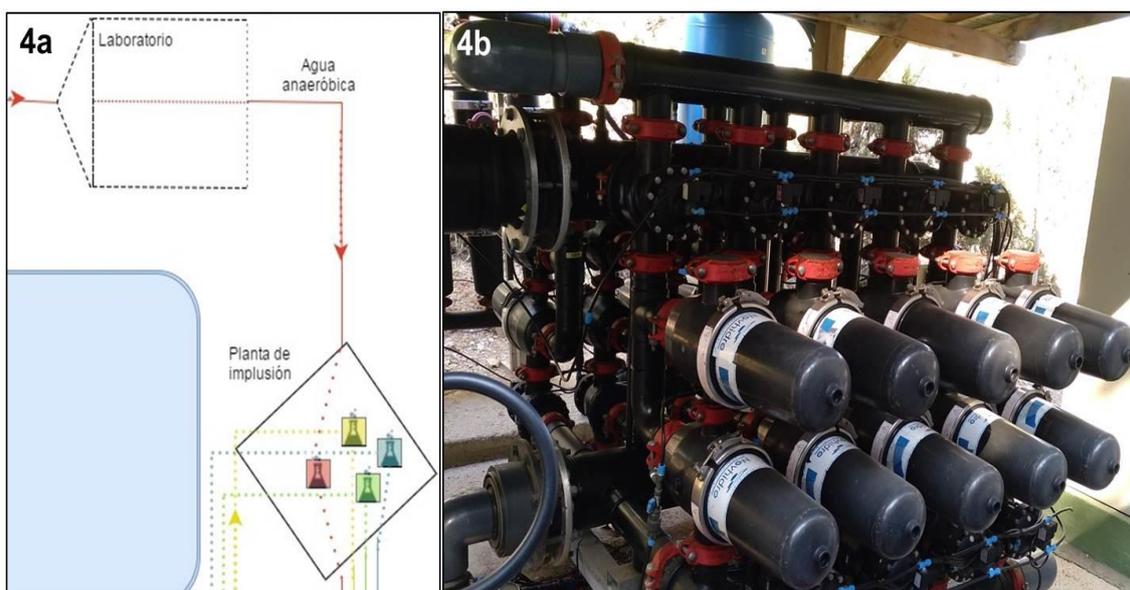
El agua, tras haber llegado a los rotofiltros y ser estabilizada en el tanque de homogeneización adyacente, es sometida a una decantación primaria realizada por medio de los dos tanques Imhoff que se pueden observar en la Figura 128.



**Fig. 128.** Fase I de depuración del E.D.A.R. del Campus de Espinardo. **3a)** Detalle del plano del tratamiento primario de la E.D.A.R. **3b)** Detalle de la decantación primaria por medio de tanques Imhoff.

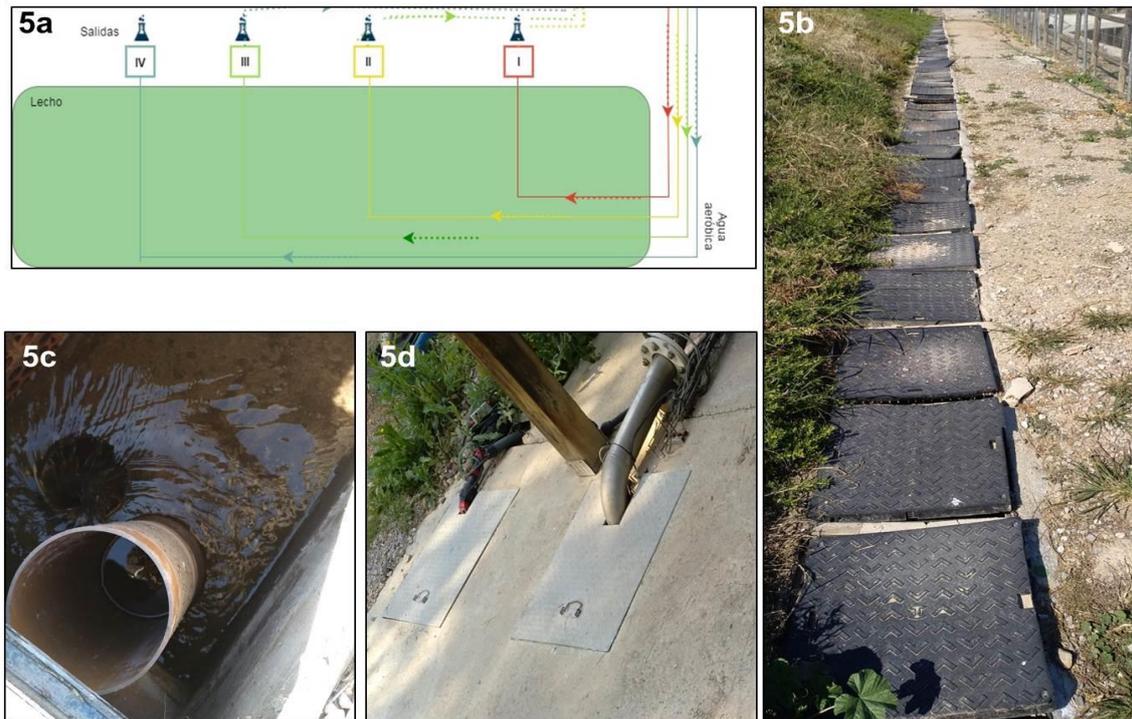
IV-3.4.4.2. Fases avanzadas de depuración

Tras la decantación, el agua llega a la planta de impulsión (la cual está provista de un sistema con filtros de anillas y de bombas de impulsión que actúa como un circuito) donde, de manera sucesiva, el efluente vuelve más depurado en cada retorno desde cada uno de los cuatro lechos de percolación del circuito. El esquema de la planta de impulsión y los sistemas de filtros de anillas se pueden observar en la Figura 129.



**Fig. 129.** Fase avanzada de depuración del E.D.A.R. del Campus de Espinardo. **4a)** Detalle del plano de la planta de impulsión de la E.D.A.R. **4b)** Detalle de los sistemas de filtros de anillas de la planta de impulsión.

El proceso de filtración sucesiva que tiene lugar en la planta de impulsión es el siguiente: el sistema filtra e impulsa el agua de la fase anterior hacia el lecho de percolación y retorna a la planta de impulsión donde se vuelve a filtrar antes de volver a ser impulsada al lecho siguiente por un circuito distinto. El sistema completo consta de cuatro circuitos o, lo que es lo mismo, de cuatro procesos de depuración sucesivos. La Figura 130 muestra el sistema de lechos percoladores en los que el agua es impulsada y por los que retorna al siguiente filtro de anillas. Cuando el efluente termina los 4 circuitos, el agua se somete a una cloración para alcanzar la desinfección.



**Fig. 130.** Circuitos de filtración del E.D.A.R. del Campus de Espinardo. **5a)** Detalle del plano de los lechos percoladores. **5b)** Detalle de las arquetas de salida de cada una de las fases. **5c)** Detalle de la salida del agua procedente de los lechos de percolación y **5d)** zonas de entrada del agua antes de ser impulsada a la siguiente fase.

Además de los procesos descritos, el sistema de depuración del Campus de Espinardo, está provisto de una gran laguna de estabilización que actúa como sistema de tratamiento secundario alternativo o de maduración, como se puede observar en la Figura 131.



**Fig. 131.** Laguna de estabilización del E.D.A.R. del Campus de Espinardo (Murcia).

### IV-3.5. TINCIÓN Y ADECUACIÓN DE MUESTRAS

#### IV-3.5.1. Protocolo para la visualización en microscopia confocal y de fluorescencia

Aquellas cepas de BALOs detectadas del E.D.A.R. fueron incubadas hasta la aparición de formas cocoides (denominándolas bdellocofos) y fueron posteriormente teñidas tanto con DAPI (4'-6 diamidino-2-fenilindol) como con naranja de acridina (N,N,N',N'-tetrametilacridina). El uso de dichas tinciones se debió a la capacidad para la unión a las regiones con grupos adenina-timina bacteriano (en el caso del DAPI) y por ser selectiva para los ácidos nucleicos, pudiéndose diferenciar estructuras ricas DNA y RNA (en el caso de la naranja de acridina). Para la tinción efectiva de muestras de bdellocofos se siguió el siguiente protocolo:

- 1- A un corte fino y superficial de una sección de agar con presencia de bdellocofos, le fueron adicionados 5µl de agua destilada y agua corriente estéril (proporción 1:1).
- 2- La muestra fue posteriormente teñida añadiendo, según procediera, 5µl de DAPI (diluido 5 veces desde un stock de 20µg/ml) directamente sobre la propia sección de agar, o añadiendo (también directamente) 5µl de naranja de acridina a una concentración de 0,01%. En ambos casos posteriormente se añadieron 10µl de p-fenilendiamina (PPD) (desde un stock de 1 mg/ml) para la protección de la muestra ante la luz excitadora del microscopio de fluorescencia.
- 3- A la muestra de agar cubierta con el cubreobjetos, se le perfundieron 5µl más de DAPI o naranja de acridina y 5µl adicionales de agua destilada y agua corriente estéril (proporción 1:1). A continuación, la muestra se dejó secar durante 5min antes de visualizarla al microscopio de fluorescencia.

#### IV-3.5.2. Adecuación de la muestra para su visualización al microscopio electrónico

Para el correcto visionado de la muestra de agar en el microscopio electrónico, las células fueron fijadas con formaldehído (CH<sub>2</sub>O) al 3% (12h, 4-8°C), fueron lavadas, centrifugadas dos veces a 7500g y 4°C (SORVALL™ RC5B plus refrigerada) y resuspendidas en agua destilada.

La preparación de tinciones negativas empleando Acetato de Uranilo (UO<sub>2</sub>(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) al 0,5% (proceso explicado a continuación. Pasos 1-6) tuvo lugar sobre rejillas de 200 mesh (VECO) con película de formvar®.

### IV-3.5.3. Protocolo para la realización de la sección ultrafina de la muestra

1- Como paso previo a la fijación, 25ml de suspensión bacteriana fueron centrifugados durante 30 minutos a 7000g y a 4°C (SORVALL™ RC5B plus refrigerada). Luego, tras haber eliminado el sobrenadante, la fijación propiamente dicha de las células se consiguió añadiendo 5ml de glutaraldehído al 2% de concentración final en tampón cacodilato 0,1M. Posteriormente, la suspensión volvió a ser centrifugada durante media hora a 7000g a 4°C y permaneció fijándose durante una hora a temperatura ambiente.

2- La suspensión anterior fue lavada y centrifugada tres veces (de la forma anteriormente descrita) en 5ml de tampón cacodilato a 0,1M, permaneciendo en reposo durante 5 minutos entre cada centrifugado.

3- El sobrenadante fue retirado completamente antes de añadir una solución de tetraóxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) desde un stock al 2% (Electron Microscopy Sciences, cat #19152) diluida al 1% añadiendo tampón cacodilato al 0,2M. Dicha muestra fue mantenida durante 50 min-1h a temperatura ambiente y en oscuridad. Seguidamente, se volvió a centrifugar de manera habitual.

El paso anterior, crítico en el protocolo, sufrió variaciones en cuanto al tiempo de fijación (desde 1h a 12h) y la temperatura (desde 4°C a 20°C), permaneciendo el  $\text{OsO}_4$  a concentración final del 1% o, excepcionalmente, al 2%. Esto fue debido a las dificultades para que el  $\text{OsO}_4$  perfundiera completamente en el agar de la muestra.

4- Tras la centrifugación, el  $\text{OsO}_4$  fue eliminado mediante dos lavados en abundante tampón cacodilato 0,1M, centrifugando durante 45min a 10000 rpm y a 4°C entre cada lavado.

5- Tras la última centrifugación, el sobrenadante fue eliminado completamente y fue post-fijado con acetato de uranilo ( $\text{UO}_2(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) al 2% agitando manualmente la muestra suavemente. Tras la adición de acetato de uranilo a la muestra (ya de color parduzco) hasta cubrirla, ésta fue mantenida en el refrigerador durante 2h. Posteriormente, se le adicionaron 10 ml de agua destilada y filtrada (para eliminar el acetato de uranilo) y se centrifugó de nuevo durante media hora a 7000g a 4°C (SORVALL™ RC5B plus refrigerada).

6- Tras esta nueva centrifugación, el sobrenadante volvió a ser eliminado de la muestra dejando sólo la parte compacta. Cuando el agar fue fundido y enfriado a una temperatura de 45°C se adicionaron 2 o 3 gotas de agar Oxoid nº 3 al 2% (preparado en tampón cacodilato al 0,2M) al sedimento de la muestra y fue mezclándose con una pipeta pasteur caliente.

7- Con la misma pipeta empleada en el paso anterior, el material fue depositado sobre un portaobjetos y, una vez solidificado, se seccionó en cubos de, aproximadamente, 1-2mm de lado para ser mantenidos, posteriormente, en tampón cacodilato 0,1M.

8- Los cubos de agar fueron deshidratados progresivamente en una serie de concentraciones crecientes de etanol o incluidos en resina epoxi (Epon<sup>TM</sup>), utilizando el óxido de propileno (1,2-epoxipropano; metiloxirano) como paso intermedio.

9- Las muestras fueron dispuestas en una cápsula de gelatina y la resina fue polimerizada a 70°C durante dos días. Las secciones ultrafinas se obtuvieron con un ultramicrotomo Ultracut Reichet-Yung y se recogieron en rejillas de cobre (400 mesh).

10- Para terminar, las secciones se contrastaron en rejillas con acetato de uranilo al 5% durante 5min y con citrato de plomo (C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>Pb<sub>3</sub>O<sub>14</sub>) al 4% durante 3min. Tras este último paso, la muestra de la suspensión bacteriana presentó un color pardo oscuro.

#### **IV-3.6. CONSERVACIÓN DE BALOs A LARGO PLAZO**

De igual forma que en capítulo III, la conservación a largo plazo de las cepas de BALOs fue realizada por ultracongelación (SANYO<sup>TM</sup> MDF-192) a < -70°C, en medio NB-10, con la adición de un 20% de glicerol y mantenidos en crioviales. En este caso, las muestras fueron congeladas en lisados terminales (dominancia de BALOs infectivos).

#### **IV-3.7. MICROSCOPIA**

Las imágenes de las cepas de BALOs fueron tomadas en microscopio óptico, electrónico, de fluorescencia y confocal.

##### **IV-3.7.1. Microscopía óptica**

Para la microscopía óptica empleada en el seguimiento y fotografía de la lisis de BALOs, se empleó el mismo microscopio óptico que se indica en la sección correspondiente en “Material y Métodos” del capítulo III.

##### **IV-3.7.2. Microscopía electrónica**

La microscopía electrónica se realizó a cargo de un microscopio JEOL-JEM-1011.

#### **IV-3.7.3. Microscopía de epifluorescencia**

Para las imágenes tomadas en epifluorescencia se utilizó un microscopio LEICA Z6 APO con un sistema de captación de imagen LEICA DC 500.

#### **IV-3.7.4. Microscopía confocal**

En microscopía confocal se empleó el sistema espectral confocal y multifotónico LEICA TCS SP2.

#### **IV-3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Igual que ocurriera en el capítulo anterior, los resultados de este trabajo se encuentran expresados como media +/- desviación estándar. El análisis estadístico de los datos obtenidos fue realizado con el programa informático GraphPad Prism 5<sup>®</sup>, realizando el análisis *t de Student* para la comparación entre dos grupos y ANOVA de una vía para la comparación entre tres o más grupos de datos. Igualmente, en todos los casos, el resultado se consideró como significativo a partir de un valor de  $p < 0,05$ .



## **IV-4. RESULTADOS**

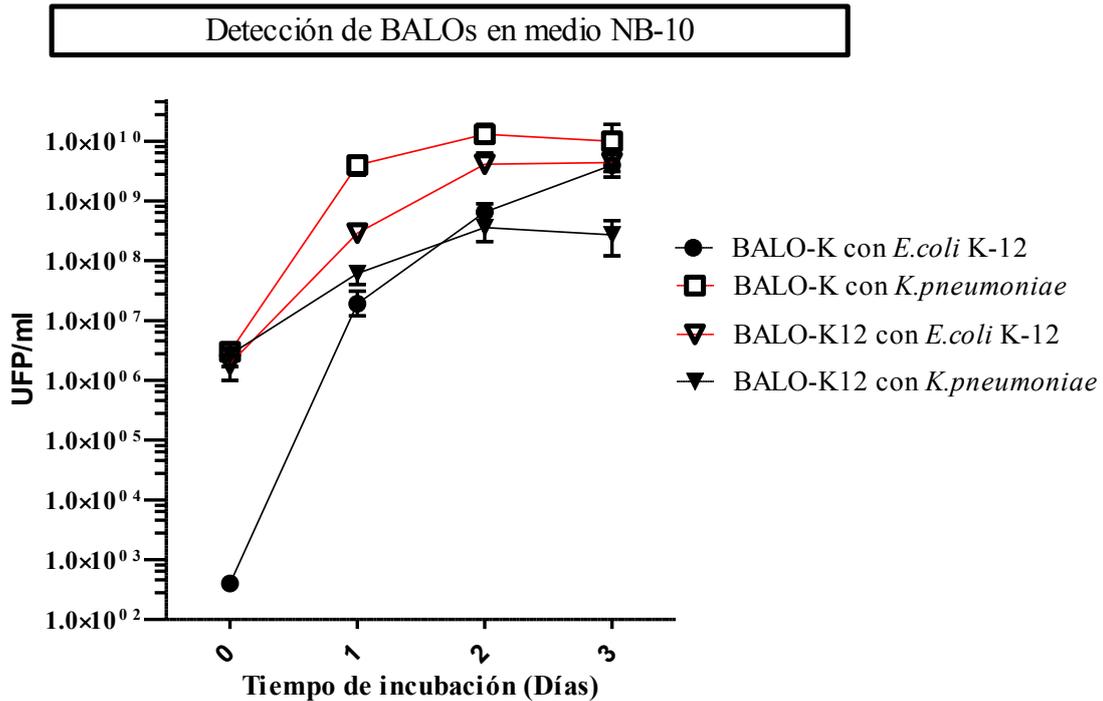
### **IV-4.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DEPREDADORA RELATIVA (C.D.R.) DE BALOs CON DISTINTO HOSPEDADOR**

#### **IV-4.1.1. Estudio de la C.D.R. de BALO-K12 y BALO-K**

##### **IV-4.1.1.1. C.D.R. en sistemas bimembres y medio NB-10**

Como se ha indicado en el diseño de experimentos del apartado “Material y métodos” de este capítulo, para determinar la CDR de BALOs se comparó la cantidad de BALO-K12 detectado tanto al depredar a su misma bacteria hospedadora de “origen” (es decir, presa homóloga) como con una bacteria presa diferente, en este caso *K. pneumoniae* (a la que se denominó presa heteróloga). De forma paralela, en BALO-K también se comparó su capacidad de lisis tanto con su cepa original (presa homóloga) como con *E. coli* K-12 (que, en este caso, le correspondió ser la bacteria presa heteróloga). Tras lo descrito anteriormente se observaron los siguientes resultados:

En el estudio comparativo se observó una cantidad significativamente mayor de BALO-K12 detectado con su cepa homóloga que con la heteróloga. Igualmente, en la cepa BALO-K se observó la misma tendencia como se puede observar en la Figura 132. Concretamente, la mayor cantidad de la cepa BALO-K detectada fue, de media,  $1,29 \times 10^{10}$  UFP/ml al tercer día de incubación revelada usando su presa homóloga y la mayor cantidad de BALOs-K12 fue de  $4,83 \times 10^9$  UFP/ml de media al tercer día de incubación, revelada también con su presa homóloga. Con sus presas heterólogas, se detectó una menor cantidad de BALO-K y de BALO-K12 (Figura 132).



**Fig. 132.** CDR de BALOs en sistemas bimembres y en medio NB-10;  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALO-K-12 detectada en su presa homóloga fue significativamente superior a la de su presa heteróloga;  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALO-K detectada en su presa homóloga (líneas rojas) fue significativamente superior a la de su presa heteróloga. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### IV-4.1.1.2. C.D.R. en sistemas trimembres y medio NB-10

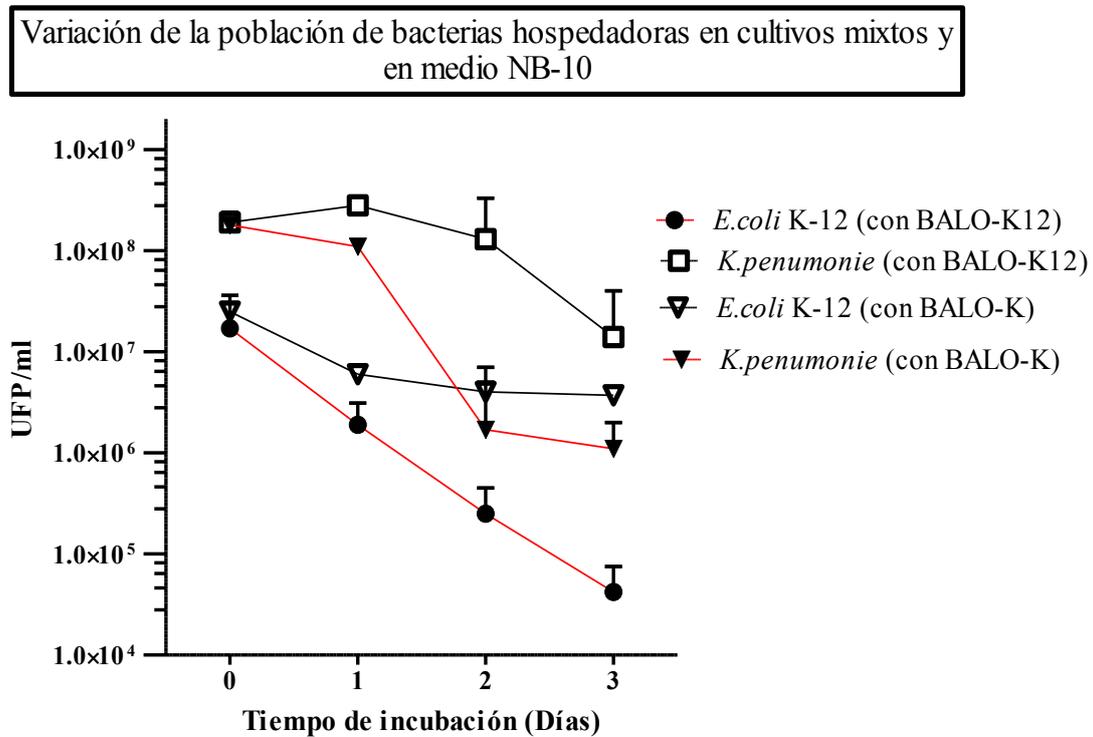
Tras haber realizado el seguimiento y la detección de BALOs-K12 y BALOs-K en medio NB-10 con ambas presas disponibles, se observaron los siguientes resultados:

La población de *E. coli* K-12 descendió de manera más acusada cuando fue depredada por el BALO-K12 (de  $1,90 \times 10^7$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $4,96 \times 10^4$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que cuando fue depredada por el BALO-K (de  $2,73 \times 10^7$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $2,90 \times 10^6$  UFP/ml de media al tercer día de incubación).

Del mismo modo, la población de *K. pneumoniae* AA100 sufrió un mayor descenso cuando fue depredada por el BALO-K (de  $1,60 \times 10^8$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $1,38 \times 10^6$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que cuando la cepa que lisaba fue BALO-K12 (de  $2,63 \times 10^8$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $2,13 \times 10^7$  UFP/ml de media al tercer día de incubación).

En consonancia con lo anterior, atendiendo a los descensos de población de las bacterias presa utilizadas, se encontró que la población de *E. coli* K-12 sufrió un mayor descenso

que el que se produjo con la población de *K. pneumoniae* AA100 aun siendo depredadas ambas por sus depredadores homólogos, como muestra la Figura 133.



**Fig. 133.** Variación de la población de bacterias presa (*E. coli* K-12 y *K. pneumoniae* AA100) en sistemas trimembres y en medio NB-10;  $p < 0,05^*$ : el descenso de las bacterias presas fue significativo cuando fueron depredadas por BALOs homólogos (líneas rojas) con respecto a cuando fueron depredadas con BALOs heterólogos (líneas negras). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

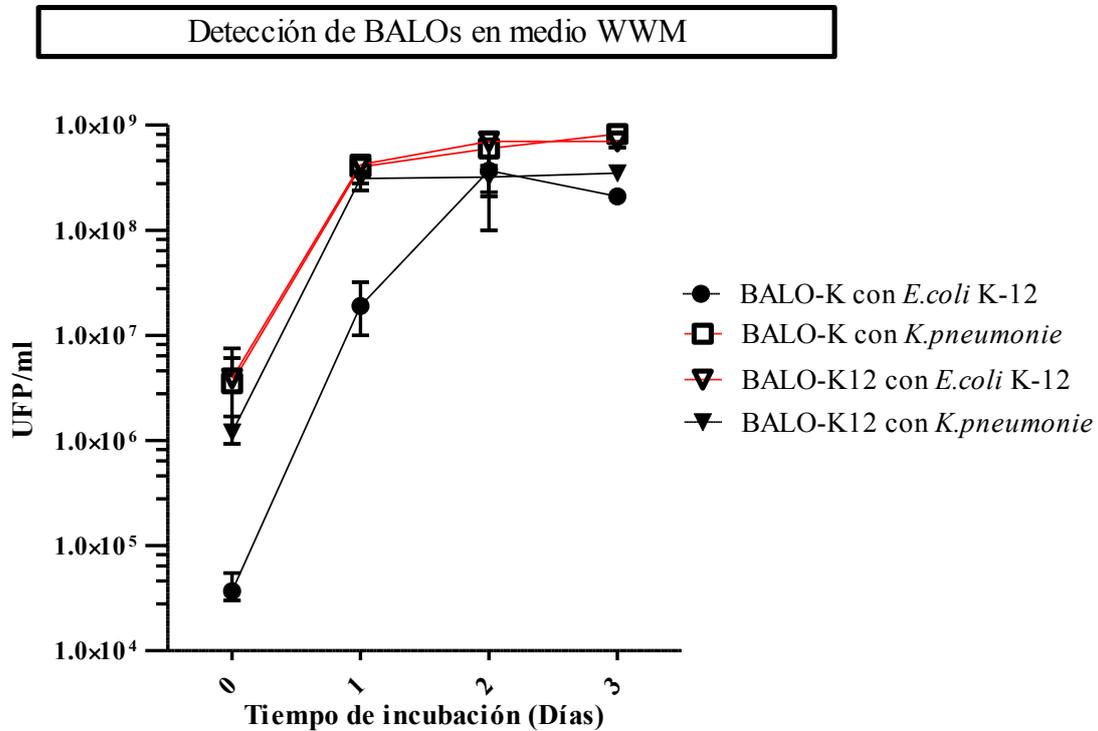
#### IV-4.1.1.3. C.D.R. en sistemas bimembres y medio WWM

En medio WWM se realizaron las mismas comparaciones y con las mismas cepas de BALOs que las realizadas anteriormente en el medio NB-10. En dicha comparativa, también se determinó la CDR de BALOs-K12 y BALOs-K detectados tanto con sus mismas bacterias hospedadoras primigenias (presas homólogas) como con sus presas heterólogas, obteniendo los siguientes resultados:

En el estudio observó de nuevo una detección significativamente mayor de BALO-K12 surgido de su cepa homóloga ( $6,93 \times 10^8$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que de la heteróloga ( $3,48 \times 10^8$  UFP/ml de media al tercer día de incubación).

En cuanto a la cepa BALO-K, se produjeron resultados similares: se detectaron  $7,83 \times 10^8$  UFP/ml de media al tercer día de incubación cuando su bacteria presa fue homóloga en

comparación con la heteróloga ( $2,13 \times 10^8$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) (Figura 134).



**Fig. 134.** Capacidad de lisis de BALOs en sistemas bimembres y en medio WWM;  $p < 0,01^{**}$ : la cantidad de BALO-K12 detectada en su presa homóloga (línea roja) fue significativamente superior a la de su presa heteróloga;  $p < 0,01^{**}$ : la cantidad de BALO-K detectada en su presa homóloga (línea roja) fue significativamente superior a la de su presa heteróloga. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

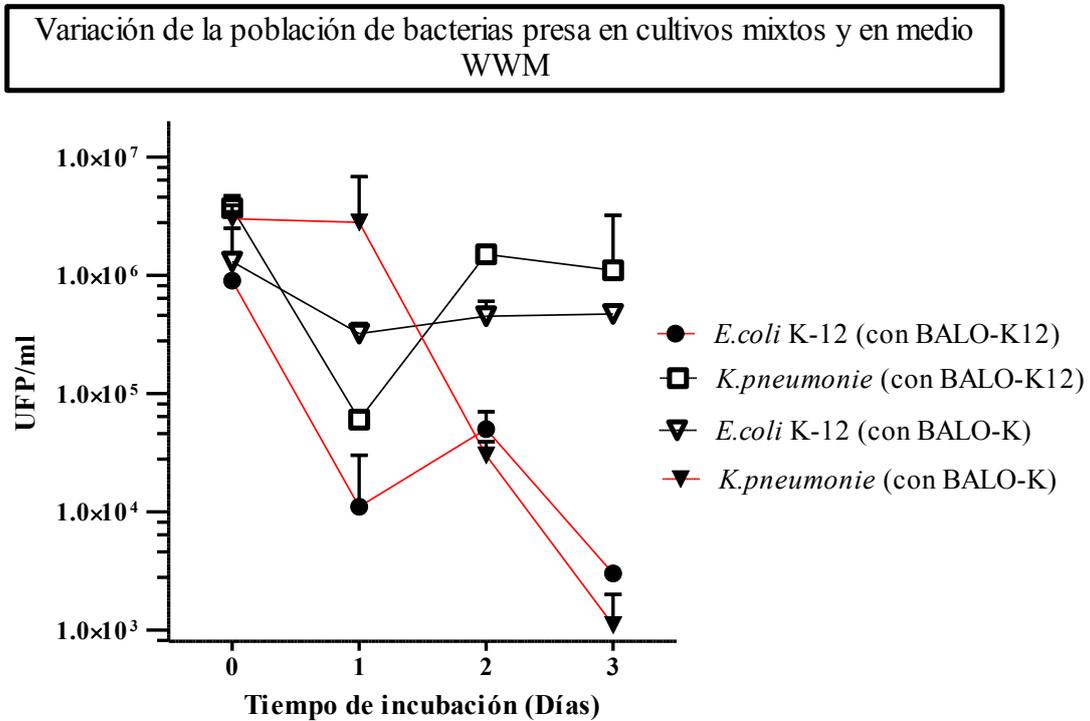
#### IV-4.1.1.4. C.D.R. en sistemas trimembres y medio WWM

En el seguimiento y la detección de BALOs-K12 y BALOs-K en medio WWM con las dos bacterias presa disponibles para su lisado, se observaron los siguientes resultados:

La población de *E. coli* K-12 descendió de manera más acusada cuando fue depredada por el BALO-K12 (de  $9,00 \times 10^5$  UFP/ml de media en el primer día de incubación hasta  $2,78 \times 10^3$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que cuando fue depredada por el BALO-K (de  $1,51 \times 10^6$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $4,67 \times 10^5$  UFP/ml de media al tercer día de incubación).

Del mismo modo, la población de *K. pneumoniae* AA100 sufrió un mayor descenso cuando fue depredada por el BALO-K (de  $2,63 \times 10^6$  UFP/ml de media en el primer día de

incubación a  $1,33 \times 10^3$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que cuando lo hizo el BALO-K12 (de  $3,83 \times 10^6$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $1,77 \times 10^6$  UFP/ml de media al tercer día de incubación), como se puede observar en la Figura 135.



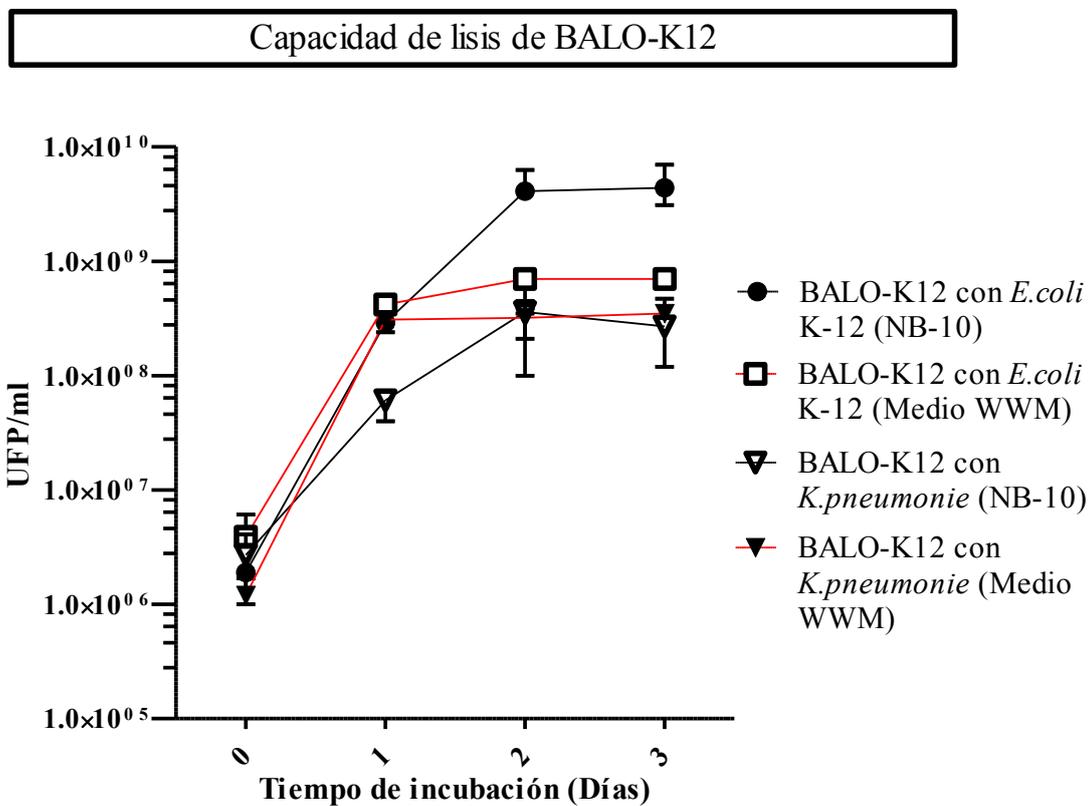
**Fig. 135.** Variación de la población de bacterias presa (*E. coli* K-12 y *K. pneumoniae* AA100) en sistemas trimembres y en medio WWM;  $p < 0,001$ \*\*\*: el descenso de las bacterias presa fue significativo cuando fueron depredadas por BALOs homólogos (líneas rojas) con respecto a cuando fueron depredadas con BALOs heterólogos. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.1.1.5. Comparación entre la C.D.R en medio WWM y NB-10

IV-4.1.1.5.1. Lisis de BALO-K12 y BALO-K en los distintos medios

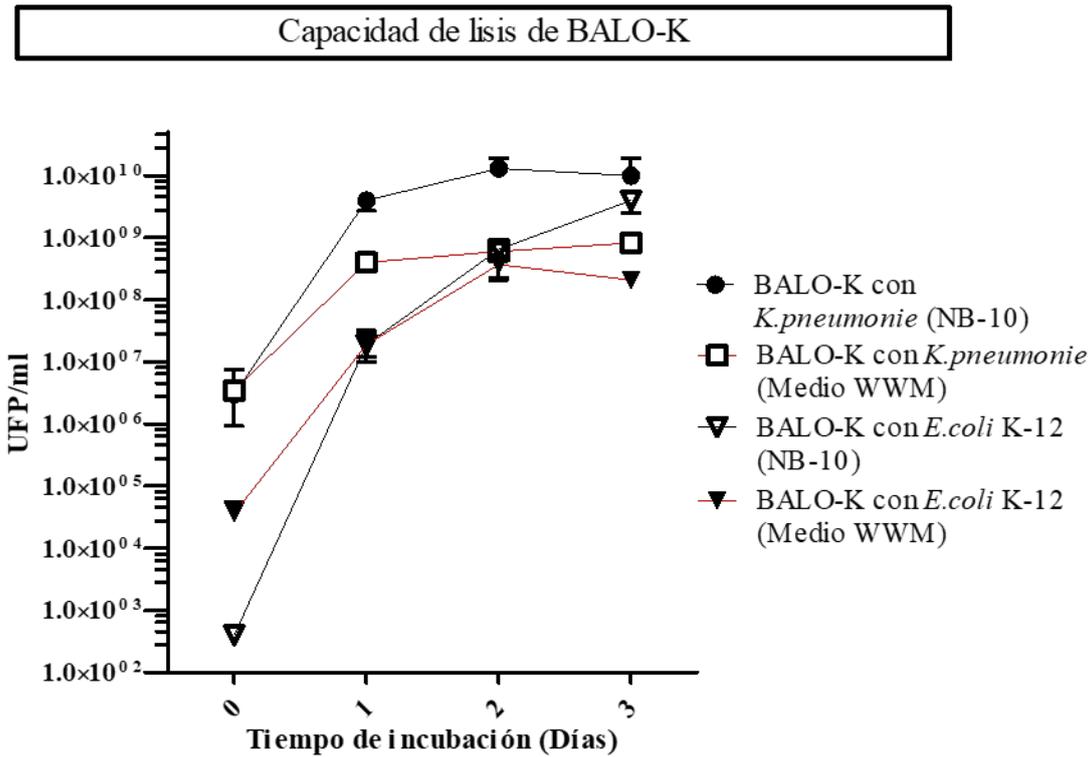
Centrándose en el BALO-K12, la CDR de dicha cepa resultó ser mayor al ser detectada desde su cepa homóloga, tanto en el medio WWM como en el medio NB-10.

Por otro lado, en términos absolutos, se observó más cantidad de BALO-K12 revelados en medio NB-10 que en WWM, tanto depredando a sus presas homólogas como a sus heterólogas (como refleja la Figura 136).



**Fig. 136.** Capacidad de depredación de BALO-K12 en NB-10 y en WWM revelados con su bacteria presa homóloga y heteróloga. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

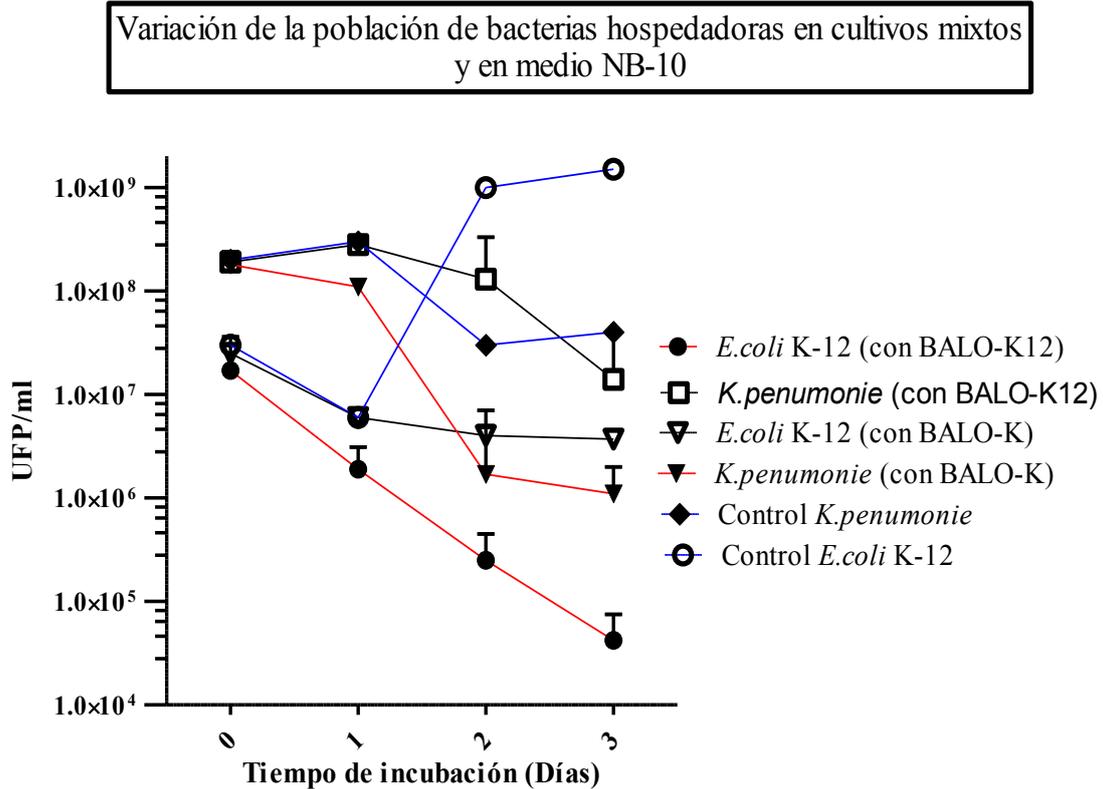
De igual manera, con el estudio de la CDR del BALO-K, como se ha mostrado, se observó una mayor cantidad del BALO-K desde su cepa homóloga, fuera cual fuera el medio de cultivo. Además, también se detectó más cantidad de esta cepa en medio NB-10 que en WWM tanto siendo revelado con bacterias presa homólogas como heterólogas (Figura 137).



**Fig. 137.** Capacidad de depredación de BALO-K en NB-10 y en WWM revelados con su bacteria presa homóloga y heteróloga. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

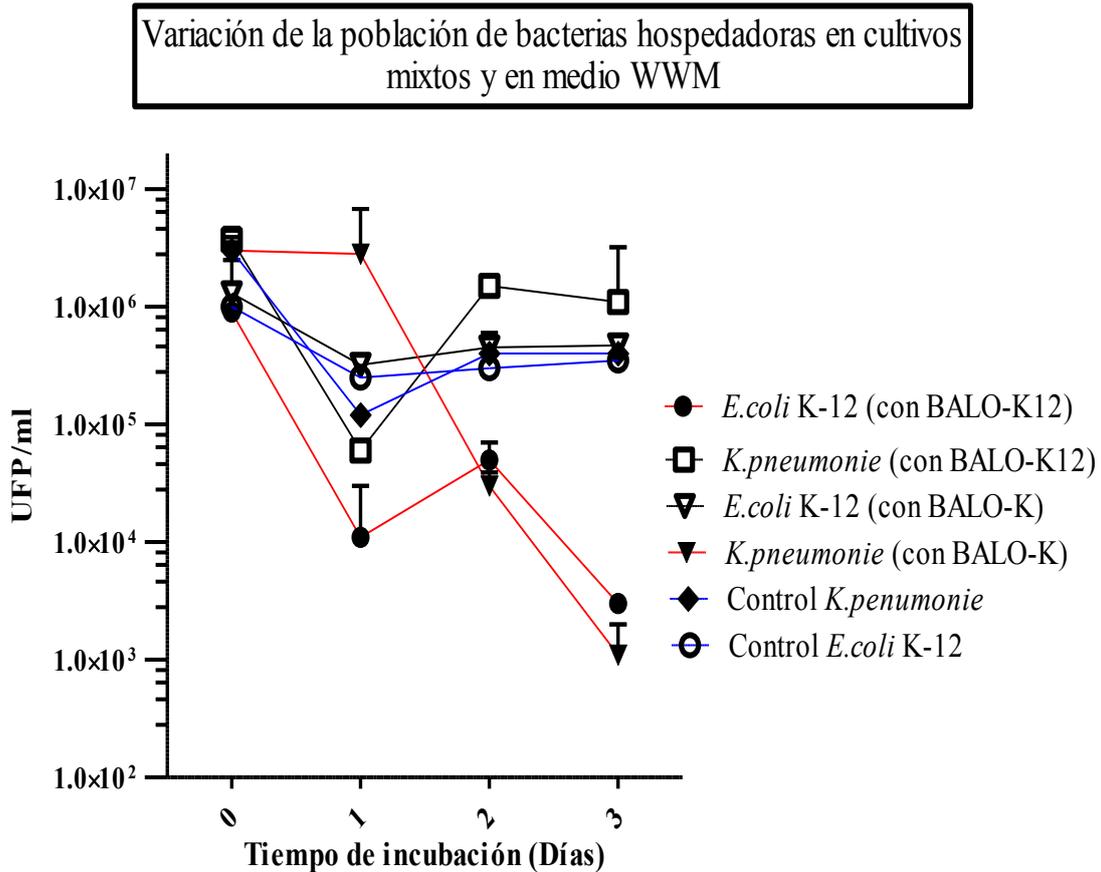
#### IV-4.1.1.5.2. Comparativa de lisis de presas homólogas y heterólogas

Atendiendo a la población de bacterias presa, siendo tanto presas heterólogas como homólogas, se observó que, en medio NB-10, tanto *E. coli* K-12 como *K. pneumoniae* AA100 aumentaron cuando no hubo presencia de otra bacteria en el mismo cultivo, como se puede observar en las líneas azules reflejadas en la Figura 138 (control). Igualmente, en la misma figura se puede observar cómo la población de bacterias presa decreció de manera más acusada cuando se encontraron junto a un depredador homólogo que cuando lo estuvieron con un heterólogo (Figura 138, líneas rojas y negras).



**Fig. 138.** Variación de la población de bacterias presa (*E. coli* K-12 y *K. pneumoniae* AA100) en sistemas trimembres y en medio NB-10. La población creció sin la presencia de bacteria depredadora alguna (líneas azules);  $p < 0,05^*$ : el descenso de las bacterias presas fue significativo cuando fueron depredadas por BALOs homólogos (líneas rojas) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos (líneas negras). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En cambio, en medio WWM, ni *E. coli* K-12 ni *K. pneumoniae* AA100 aumentaron su población cuando no hubo otra bacteria presa en el mismo cultivo, como se observan en las líneas azules correspondientes al control de la Figura 139. Por el contrario, y como ya ocurriera en la comparación anterior usando medio NB-10, se observó que la población de bacterias presa sufrió un descenso más acusado cuando se encontraron junto a un depredador homólogo que con un heterólogo (Figura 139, líneas rojas y negras).



**Fig. 139.** Variación de la población de bacterias presa (*E. coli* K-12 y *K. pneumoniae* AA100) en sistemas trimembres y en medio WWM. La población no creció significativamente sin la presencia de bacteria depredadora alguna (líneas azules);  $p < 0,001^{***}$ : el descenso de las bacterias presas fue significativo cuando fueron depredadas por BALOs homólogos (líneas rojas) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos (líneas negras). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En definitiva, la Tabla 22 resume los resultados de los estudios efectuados en BALO-K12 y BALO-K realizados en medio WWM y en NB-10. En dicha tabla se puede observar como cualquier cepa de BALOs revelada usando presa homóloga, fue detectada en mayor medida que usando la heteróloga, fuera cual fuera el medio de cultivo. Concretamente, se observó un 94,06% menos de detección de BALO-K12 usando bacterias presas homologas que heterologas en medio NB-10.

CDR de BALO-K12 y BALO-K según el medio de cultivo								
Medio	WWM				NB-10			
BALOs Adaptados	BALO-K12		BALO-K		BALO-K12		BALO-K	
Cepa presa	EC K12	KP	KP	EC K12	EC K12	KP	KP	EC K12
UFP/ml	6,93x10 <sup>8</sup>	3,47x10 <sup>8</sup>	7,83x10 <sup>8</sup>	2,13x10 <sup>8</sup>	4,83x10 <sup>9</sup>	2,87x10 <sup>8</sup>	1,30x10 <sup>10</sup>	3,83x10 <sup>9</sup>
<b>CDR (%)</b>	<b>100</b>	<b>50,07</b>	<b>100</b>	<b>27,20</b>	<b>100</b>	<b>5,94</b>	<b>100</b>	<b>29,46</b>

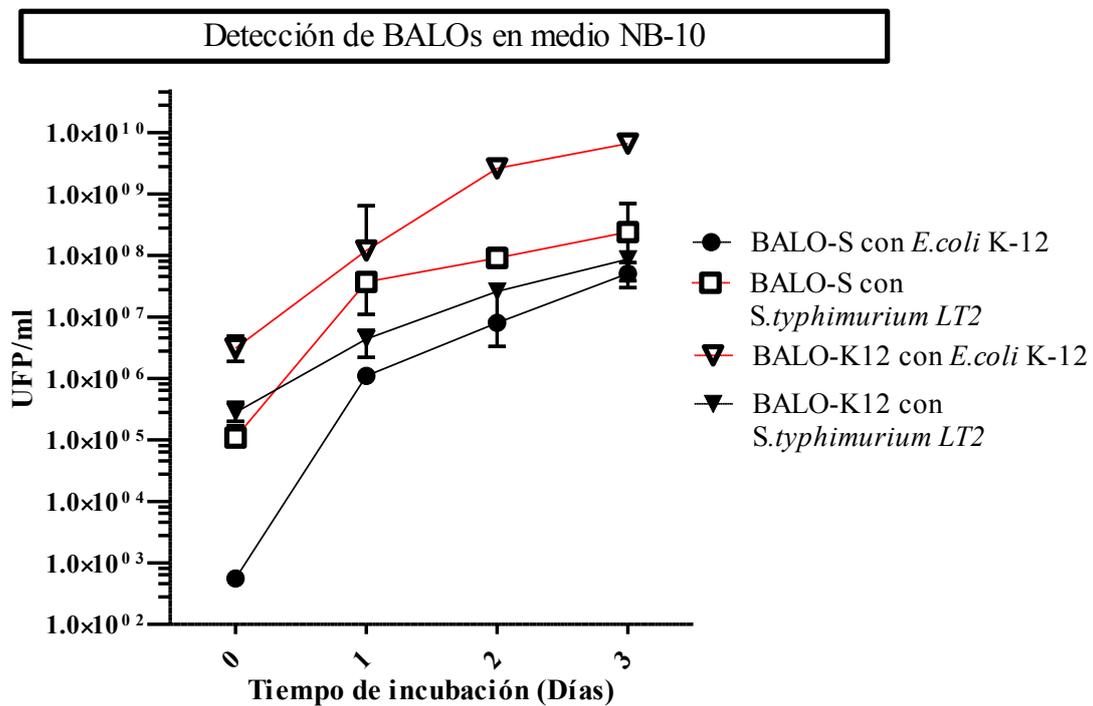
**Tabla 22.** Resultados de las pruebas de adaptación de las cepas de BALO-K12 y BALO-K a sus dos cepas presa y capacidad de lisis de las mismas tras la adaptación; EC K12= *E. coli* K12; KP= *K. pneumoniae* AA100; WWM= Wastewater medium; UFP/ml= unidades formadoras de placa por mililitro; CDR= capacidad de depredación relativa.

IV-4.1.2. Estudio de la C.D.R. de BALO-K12 y BALO-S

IV-4.1.2.1. C.D.R. en sistemas bimembres y medio NB-10

Como ya se hiciera anteriormente con BALOs-K-12 y BALOs-K, para determinar la CDR de estas nuevas cepas de BALOs, se comparó la cantidad de BALO-K12 tanto con su misma bacteria presa (homóloga), como con su presa heteróloga (*S. typhimurium* LT2, en este caso). Asimismo, en BALO-S también se comparó su capacidad de lisis tanto con su cepa original (homóloga) como con *E. coli* K-12 (que, en este caso, le correspondió ser la bacteria presa heteróloga). Los resultados referentes a este estudio fueron los siguientes:

Como se puede observar en la Figura 140, también detectó una cantidad significativamente mayor de BALO-K12 y de BALO-S cuando fueron revelados desde su cepa homóloga que con la heteróloga. La mayor cantidad se obtuvo con la cepa BALO-K12 (6,83x10<sup>9</sup> UFP/ml de media al tercer día de incubación) detectada con su presa homóloga. La cantidad obtenida de BALO-S fue de 3,26x10<sup>8</sup> UFP/ml de media al tercer día de incubación con su presa homóloga.

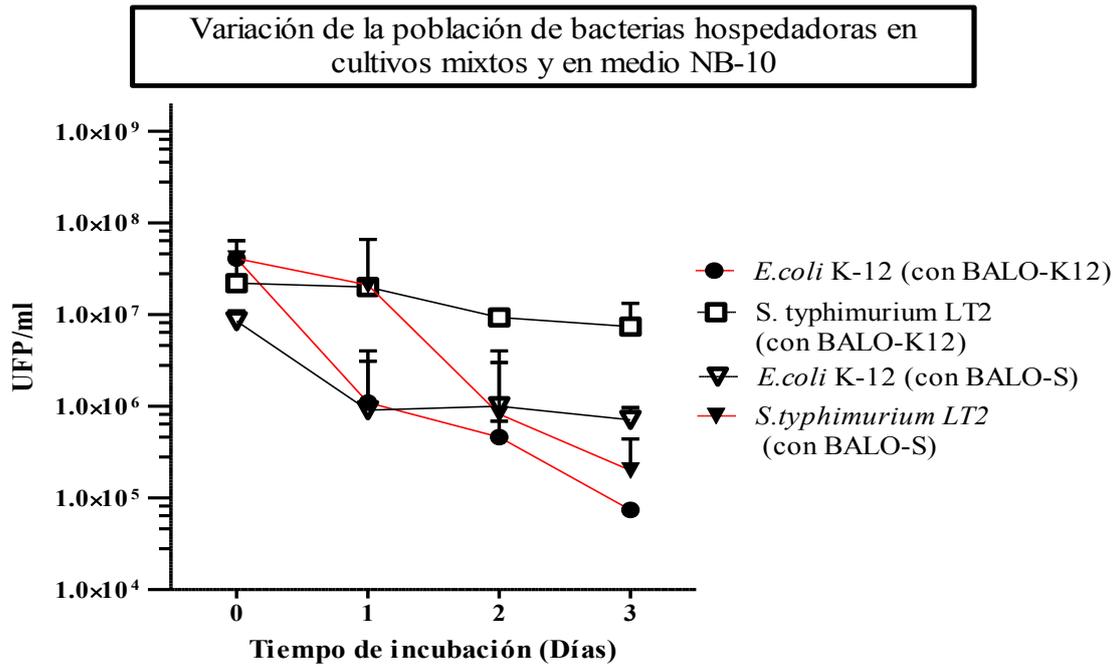


**Fig. 140.** Capacidad de lisis de BALOs en sistemas bimembres y en medio NB-10; p<0,001\*\*\*: la cantidad de BALO-K-12 detectada en su presa homóloga (línea roja) fue significativamente superior a la de su presa heteróloga; p<0,05\*: la cantidad de BALO-S detectada en su presa homóloga (línea roja) fue significativamente superior a la de su presa heteróloga. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### IV-4.1.2.2. C.D.R. en sistemas trimembres y en medio NB-10

Con respecto al seguimiento y la detección de cepas de BALO-K12 y de BALO-S realizados en medio NB-10 (Figura 141) donde las dos especies de bacterias presa estuvieron disponibles, se observaron los siguientes resultados:

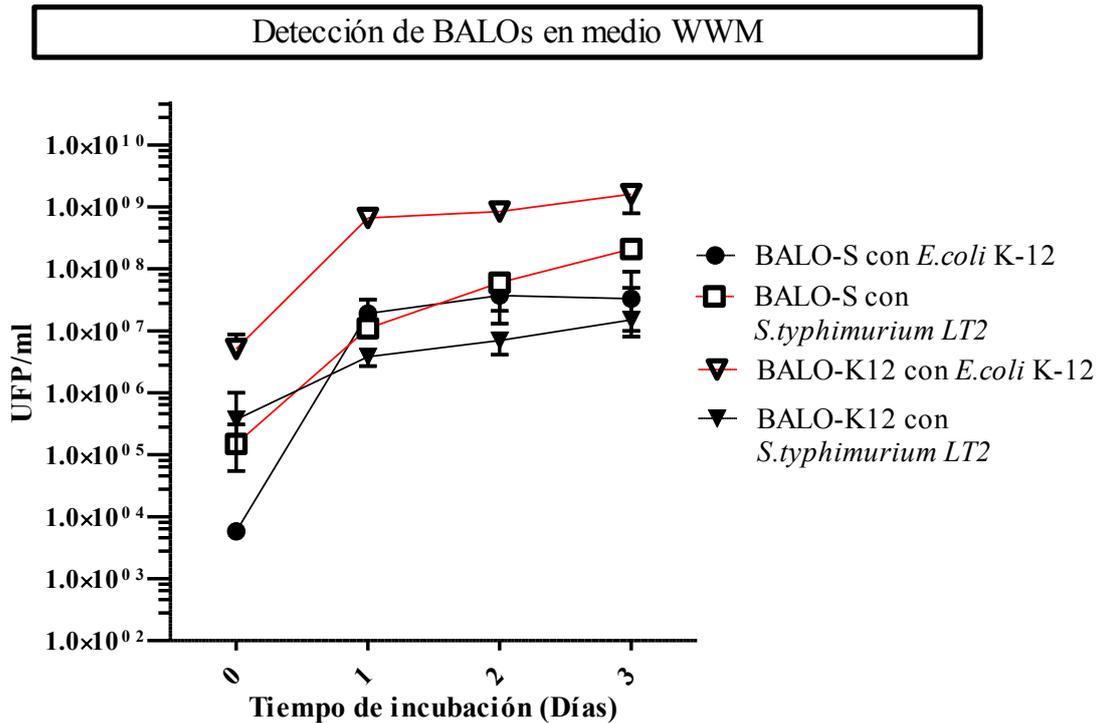
Como ocurriera en las comparaciones del apartado anterior, se observó que la población de *E. coli* K-12 descendió de manera más acusada cuando fue depredada por el BALO-K12 (de  $3,56 \times 10^7$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $6,23 \times 10^4$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que cuando fue depredada por BALO-S (de  $9,03 \times 10^6$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $7,27 \times 10^5$  UFP/ml de media al tercer día de incubación). Del mismo modo, la población de *S. typhimurium* LT2 descendió en mayor medida cuando fue depredada por la cepa BALO-S (de  $4,10 \times 10^7$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $2,50 \times 10^5$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que cuando lo hizo el BALO-K12 (de  $3,13 \times 10^7$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $8,57 \times 10^6$  UFP/ml de media al tercer día de incubación). Además, se encontró que la población de *E. coli* K-12 sufrió un mayor descenso que el experimentado por la población de *S. typhimurium* LT2, aun siendo depredadas ambas por sus depredadores homólogos, como también se puede ver en la Figura 141.



**Fig. 141.** Variación de la población de bacterias presa (*E. coli* K-12 y *S. typhimurium* LT2) en sistemas trimembres y en medio NB-10;  $p < 0,01^{**}$ : el descenso de *E. coli* K-12 fue significativo cuando fue depredada por BALOs homólogos (línea roja) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos;  $p < 0,05^*$  el descenso de *S. typhimurium* LT2 fue significativo cuando fue depredada por BALOs homólogos (línea roja) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

#### IV-4.1.2.3. C.D.R. en sistemas bimembres y medio WWM

Al igual que ocurriera con los experimentos realizados con la anterior pareja de cepas de BALOs, usando medio WWM se observó que la CDR de la cepa de BALO-K12 fue mayor en contacto con su cepa homóloga ( $1,46 \times 10^9$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que con la heteróloga ( $2,40 \times 10^7$  UFP/ml de media al tercer día de incubación). Igualmente, con respecto a la cepa de BALO-S, la observación resultó similar; se detectaron  $2,13 \times 10^8$  UFP/ml de media al tercer día de incubación cuando su bacteria presa fue la homóloga que cuando fue la heteróloga ( $4,43 \times 10^7$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) (Figura 142).



**Fig. 142.** Capacidad de lisis de BALOs en sistemas bimembres y en medio WWM;  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALO-K-12 detectada en su presa homóloga (línea roja) fue significativamente superior a la de su presa heteróloga;  $p < 0,01^{**}$ : la cantidad de BALO-S detectada en su presa homóloga (línea roja) fue significativamente superior a la de su presa heteróloga. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

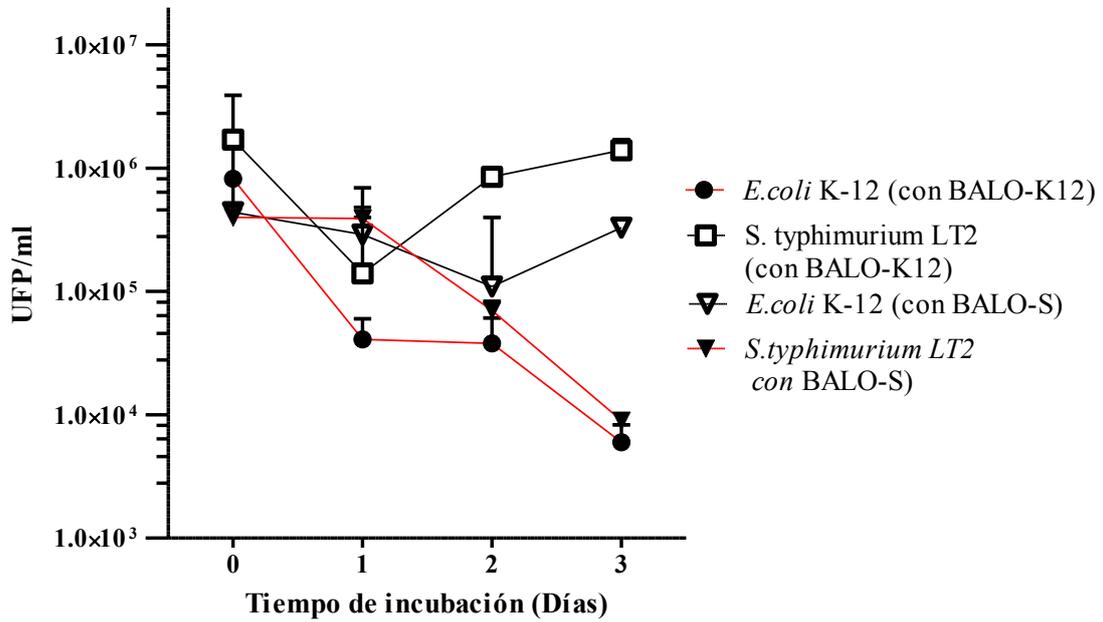
#### IV-4.1.2.4. C.D.R. en sistemas trimembres y medio WWM

Tras realizar el seguimiento y la detección de BALOs-K12 y BALOs-S en medio WWM y las dos presas disponibles para su lisis, se observaron los siguientes resultados:

La población de *E. coli* K-12 descendió más cuando fue depredada por el BALO-K12 (de  $8,13 \times 10^5$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $5,98 \times 10^3$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que cuando fue depredada por el BALO-S (de  $6,76 \times 10^5$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $3,03 \times 10^5$  UFP/ml de media al tercer día de incubación), tal y como se puede observar en la Figura 143.

De la misma forma, la población de *S. typhimurium* LT2 sufrió un mayor descenso cuando fue depredada por el BALO-S (de  $4,20 \times 10^5$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $9,07 \times 10^3$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) que cuando lo hizo el BALO-K12 (de  $2,17 \times 10^6$  UFP/ml de media en el primer día de incubación a  $1,13 \times 10^6$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) (Figura 143).

Variación de la población de bacterias hospedadoras en cultivos mixtos y en medio WWM

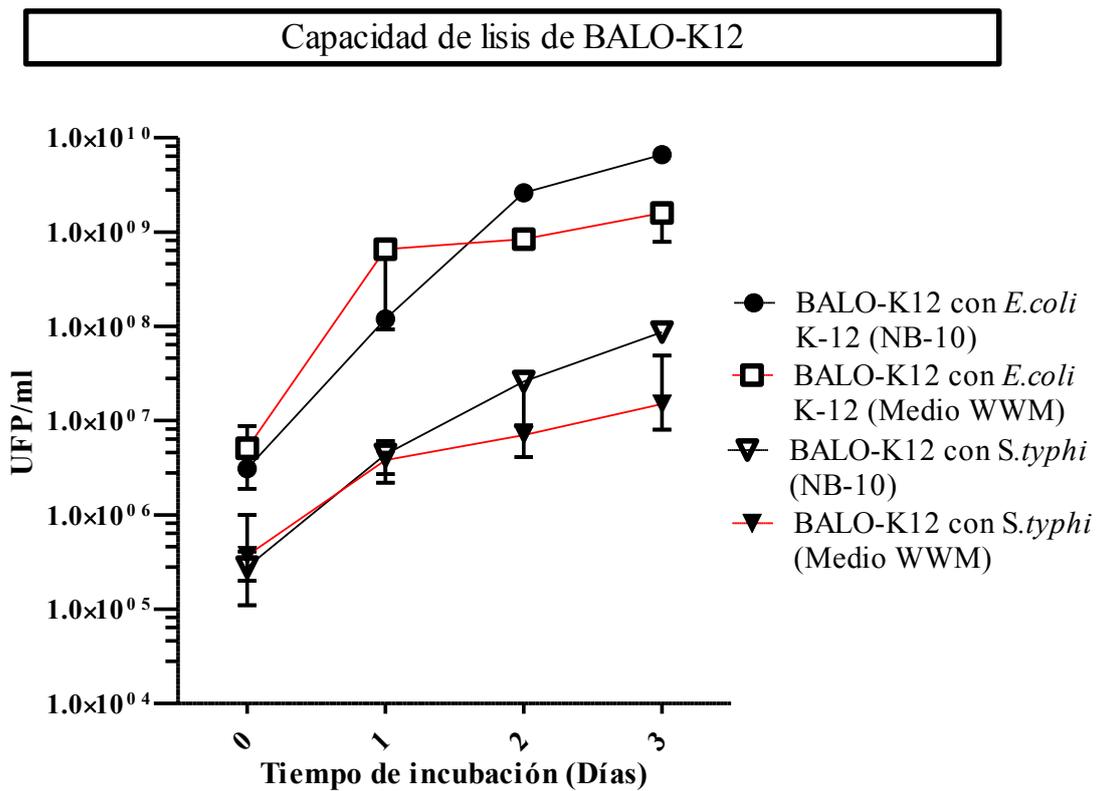


**Fig. 143.** Variación de la población de bacterias presa (*E. coli* K-12 y *S. typhimurium* LT2) en sistemas trimembres y en medio WWM;  $p < 0,01^{**}$ : el descenso de *E. coli* K-12 fue significativo cuando fue depredada por BALOs homólogos (línea roja) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos;  $p < 0,05^*$ : el descenso de *S. typhimurium* LT2 fue significativo cuando fue depredada por BALOs homólogos (línea roja) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.1.2.5. Comparación entre la C.D.R. en medio WWM y NB-10

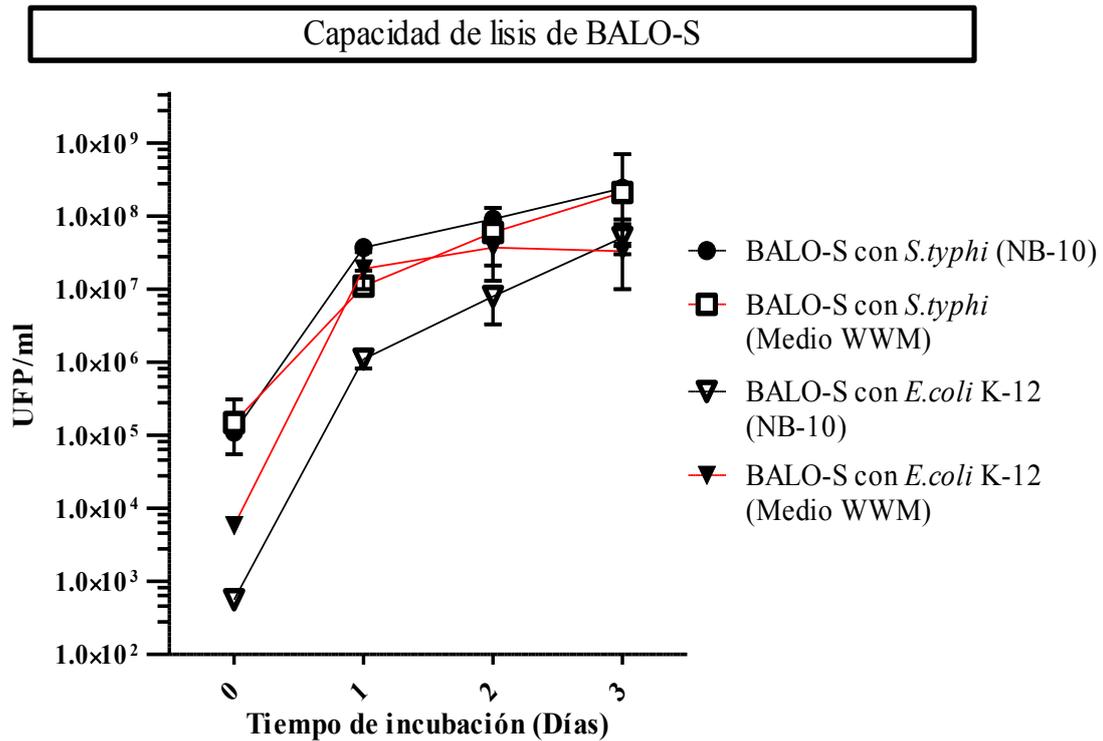
IV-4.1.2.5.1. Lisis de BALO-K12 y BALO-S en los distintos medios

La Figura 144 muestra, con respecto a la CDR del BALO-K12, que existió una mayor cantidad del BALO-K12 al ser revelados con su cepa homóloga, fuera cual fuera el medio de cultivo. Además, en términos absolutos, el medio NB-10, como ocurriera en el apartado anterior, provocó una mayor proliferación de esta cepa de BALOs (tanto desde bacterias presa homólogas como heterólogas) que la provocada por el medio WWM.



**Fig. 144.** Capacidad de depredación de BALO-K12 en NB-10 y en WWM revelados con su bacteria presa homóloga (líneas rojas) y heteróloga. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

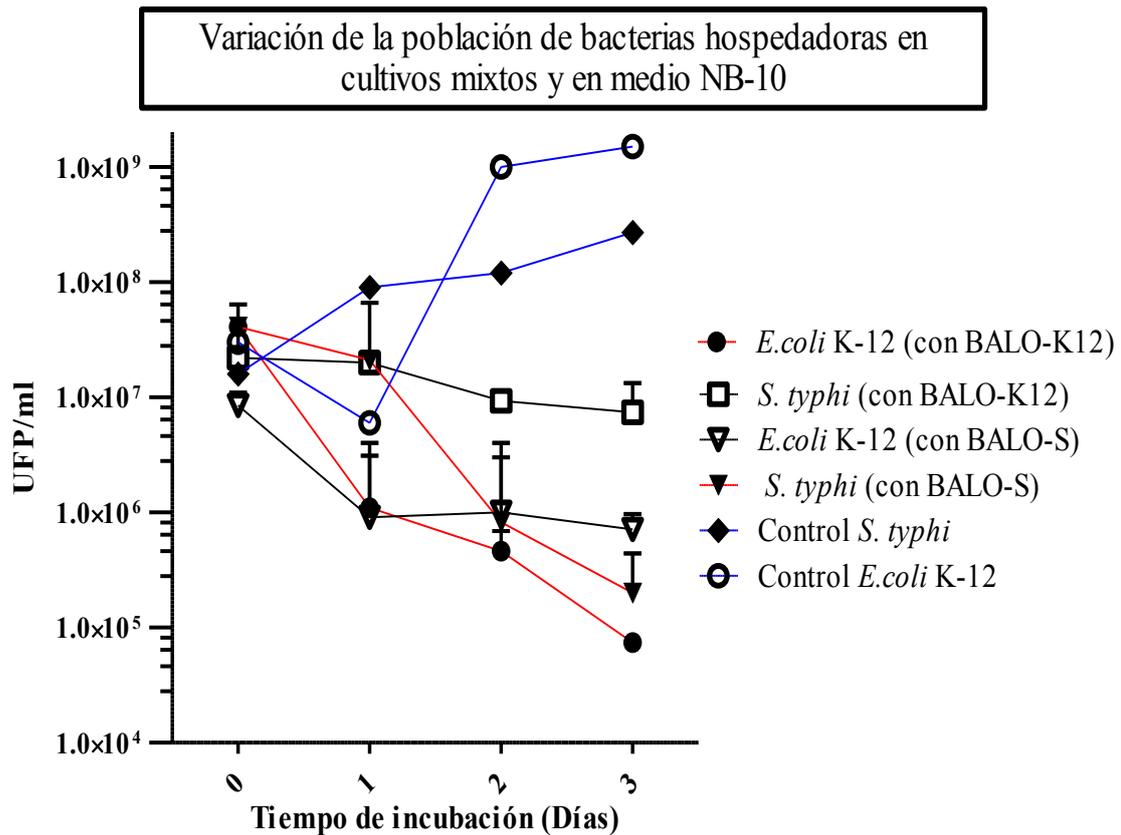
De igual manera, en la Figura 145 queda reflejada una mayor cantidad del BALO-S desde su cepa homóloga, fuera cual fuera el medio de cultivo y también fue observada más cantidad de esta cepa en medio NB-10 que en WWM, tanto revelada desde bacterias presa homólogas como desde heterólogas.



**Fig. 145.** Capacidad de depredación de BALO-S en NB-10 y en WWM revelados con su bacteria presa homóloga (líneas rojas) y heteróloga. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

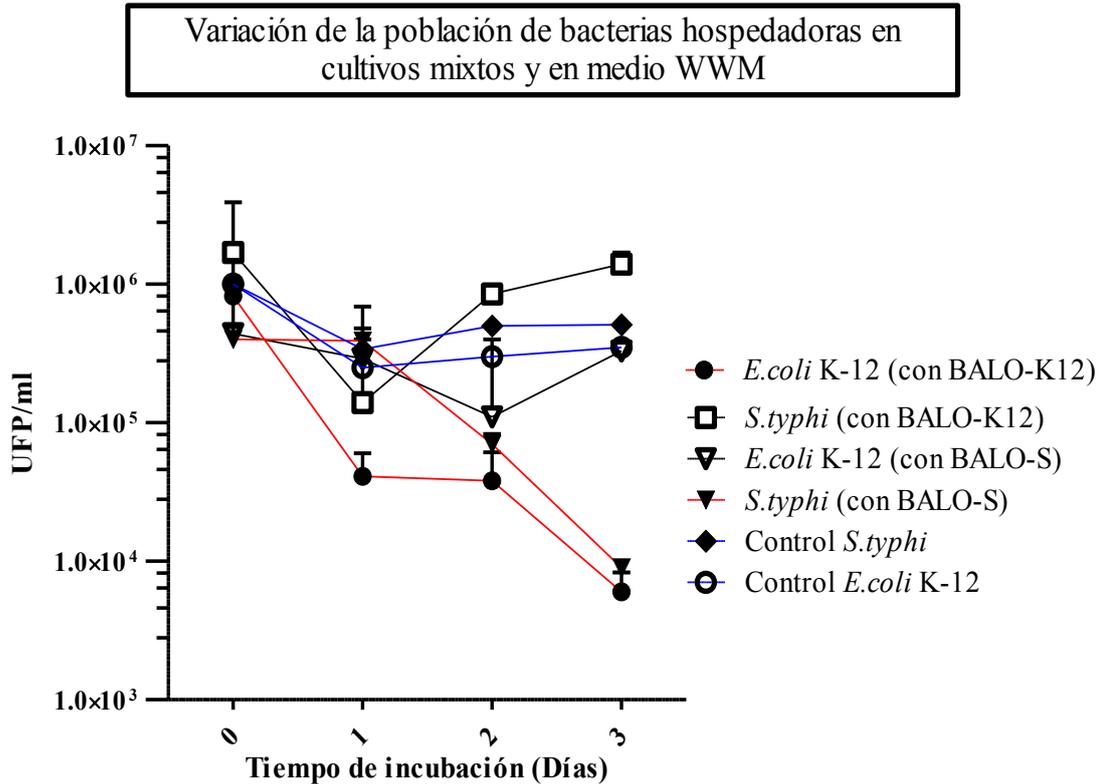
#### IV-4.1.2.5.2. Comparativa de lisis de presas homólogas y heterólogas

Tras agrupar los datos existentes de la cantidad de bacterias presa en función del tipo de medio utilizado, se observó que, en medio NB-10, tanto las poblaciones de *E. coli* K-12 como de *S. typhimurium* LT2 crecieron cuando no hubo presencia de otra cepa bacteriana en el mismo cultivo (Figura 146, líneas azules, control). Cuando las bacterias presa fueron cultivadas con cepas de BALOs homólogos, el descenso de su población fue mucho más acusado que con las heterólogas, como también se puede observar en el resto de líneas del gráfico (Figura 146).



**Fig. 146.** Variación de la población de bacterias presa (*E. coli* K-12 y *S. typhimurium* LT2) en sistemas trimembres y en medio NB-10. La población de bacterias presa creció sin presencia de bacteria depredadora (líneas azules);  $p < 0,01^{**}$ : el descenso de *E. coli* K-12 fue significativo cuando fue depredada por BALOs homólogos (línea roja) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos (línea negra);  $p < 0,05^*$ : el descenso de *S. typhimurium* LT2 fue significativo cuando fue depredada por BALOs homólogos (línea roja) con respecto a cuando fueron depredadas con BALOs heterólogos (línea negra). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En cambio, la Figura 147 muestra como, en medio WWM, ni *E. coli* K-12 ni *S. typhimurium* LT2 crecieron sin la presencia de bacterias depredadoras, sino que mantuvieron su población cuando no hubo otra bacteria presa en el mismo cultivo, tal y como se observó en la anterior comparación de BALOs. De la misma forma, cuando las bacterias presa estuvieron en contacto con bacterias depredadoras homólogas, la población decreció de manera más acusada que con las heterólogas.



**Fig. 147.** Variación de la población de bacterias presa (*E. coli* K-12 y *S. typhimurium* LT2) en sistemas trimembres y en medio WWM. La población de bacterias presa no creció significativamente sin la presencia de bacterias depredadoras (líneas azules);  $p < 0,01^{**}$ : el descenso de *E. coli* K-12 fue significativo cuando fue depredada por BALOs homólogos (línea roja) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos (línea negra);  $p < 0,05^*$ : el descenso de *S. typhimurium* LT2 fue significativo cuando fue depredada por BALOs homólogos (línea roja) con respecto a cuando fueron depredadas por BALOs heterólogos (línea negra). Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En definitiva, la Tabla 23 compara los resultados de la CDR entre las cepas BALO-K12 y BALO-S en los medios NB-10 y WWM.

En dicha tabla se observa como cualquier cepa de BALOs revelada en presa homóloga, se detectó en mayor cantidad que en la heteróloga, fuera cual fuera el medio de cultivo. De hecho, se observaron un 98,70% menos de detección de BALOs-K12 usando bacterias presas homologas que heterologas en medio NB-10.

CDR de BALO-K12 y BALO-S según el medio de cultivo								
Medio	WWM				NB-10			
BALOs Adaptados	BALO-K12		BALO-S		BALO-K12		BALO-S	
Cepa presa	EC K12	ST LT2	ST LT2	EC K12	EC K12	ST LT2	ST LT2	EC K12
UFP/ml	1,46x10 <sup>9</sup>	2,40x10 <sup>7</sup>	2,13x10 <sup>8</sup>	4,43x10 <sup>7</sup>	6,83x10 <sup>9</sup>	8,90x10 <sup>7</sup>	3,26x10 <sup>8</sup>	5,27x10 <sup>7</sup>
<b>CDR (%)</b>	<b>100</b>	<b>1,64</b>	<b>100</b>	<b>20,80</b>	<b>100</b>	<b>1,30</b>	<b>100</b>	<b>16,16</b>

**Tabla 23.** Resultados de las pruebas de adaptación de las cepas de BALO-K12 y de BALO-S a dos cepas presa y la capacidad de lisis de las mismas tras la adaptación. EC K12= *E. coli* K12; ST LT2= *S. typhimurium* LT2; WWM= Wastewater medium; UFP/ml= unidades formadoras de placa por mililitro; CDR= capacidad de depredación relativa.

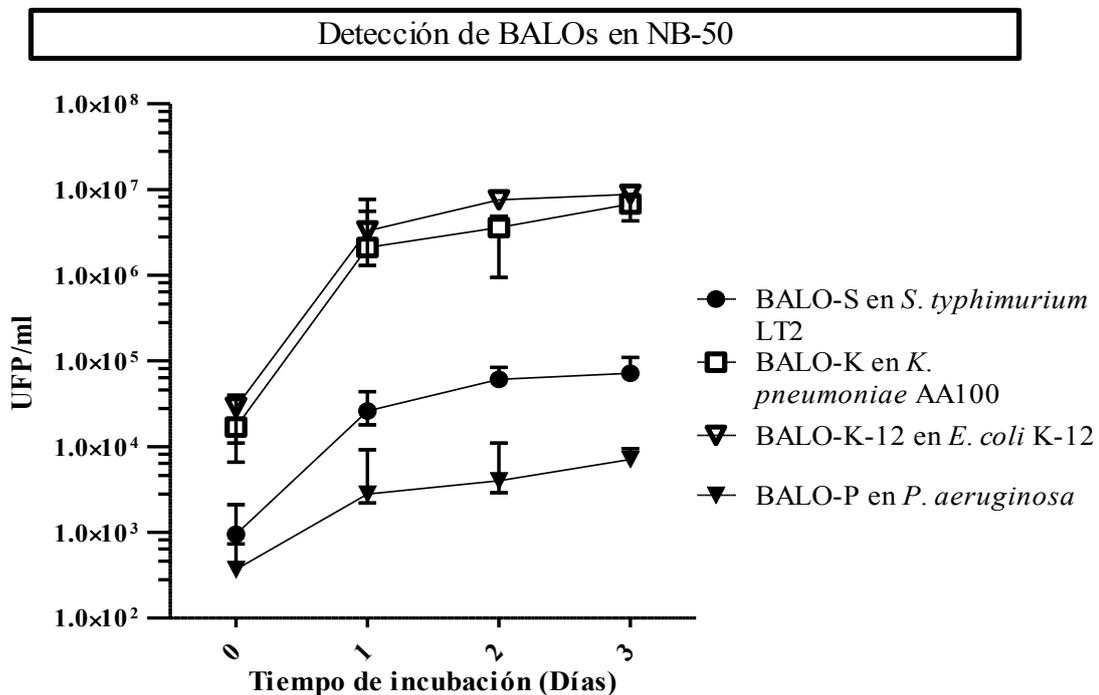
**IV-4.1.3. Estudio de la C.D.R. de BALO-K12, BALO-K, BALO-S y BALO-P en medios pobres en nutrientes**

**IV-4.1.3.1. C.D.R. en sistemas bimembres y medio NB-50**

Para determinar la CDR de los BALOs en NB-50, se comparó la detección de BALO-K12, BALO-K, BALO-S y BALO-P revelados solamente con su presa homóloga.

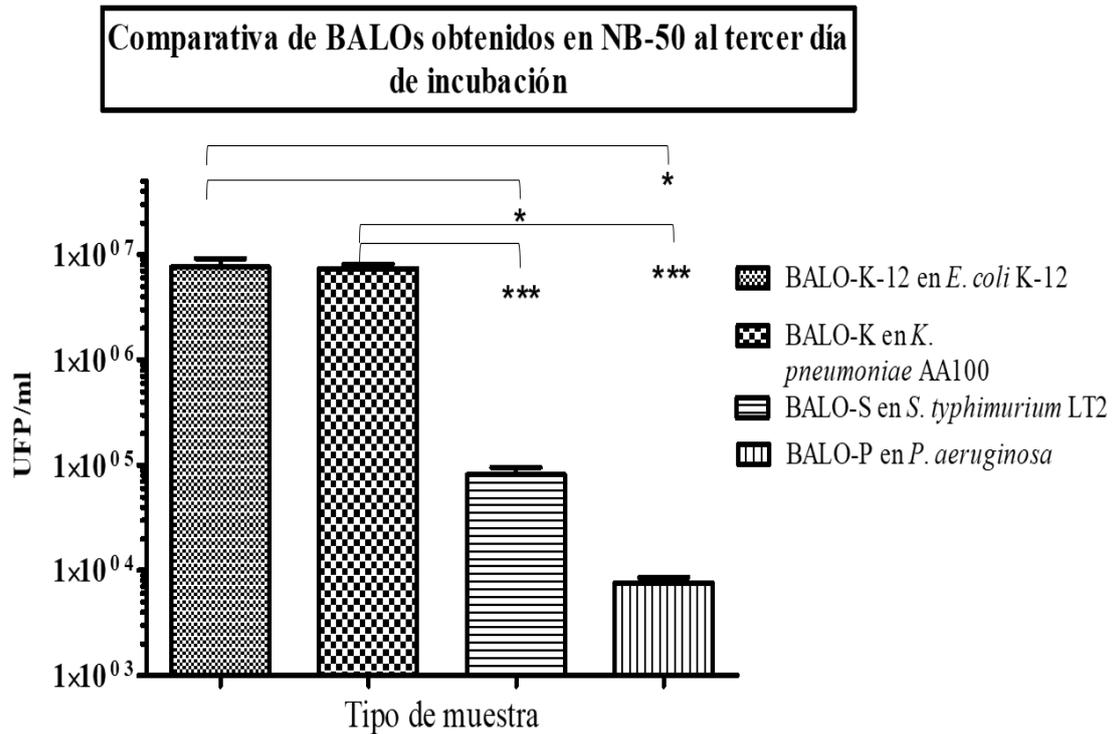
La mayor cantidad revelada de BALO-K12 fue de  $7,57 \times 10^6$  UFP/ml de media al tercer día de incubación y de BALOs-K fue de  $7,40 \times 10^6$  UFP/ml de media al tercer día de incubación. La cepa de BALO-S fue revelada en mayor cantidad al tercer día ( $8,06 \times 10^4$  UFP/ml de media), al igual que la cepa BALO-P que, en su tercer día de incubación, la cantidad revelada resultó de media  $7,60 \times 10^3$  UFP/ml (Figura 148).

La Figura 148 también muestra que hubo una cantidad significativamente mayor de BALO-K12 y de BALO-K que el resto de cepas. Concretamente, la cantidad de la cepa de BALO-K12 fue significativamente mayor que la cantidad detectada de BALO-S y que BALO-P e, igualmente, la CDR de BALO-K fue significativamente mayor con respecto a la cantidad de BALO-S y BALO-P.



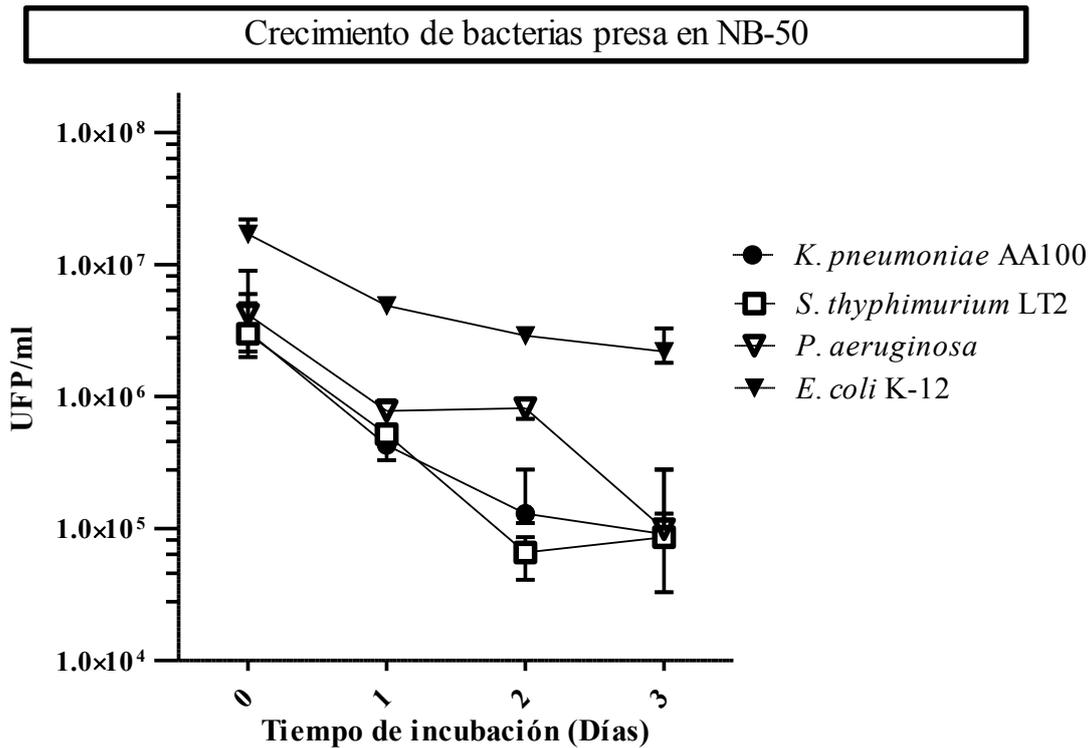
**Fig. 148.** Capacidad de lisis de BALOs en sistemas bimembres y en medio NB-50;  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALO-K12 detectada fue significativamente superior a la detectada con BALO-S;  $p < 0,05^*$ : la cantidad de BALO-K12 detectada fue significativamente superior a la detectada en BALO-P;  $p < 0,001^{***}$ : la cantidad de BALO-K detectada fue significativamente superior a la detectada en BALO-S;  $p < 0,001^{***}$ : la cantidad de BALO-K detectada fue significativamente superior a la detectada en BALO-P. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Con respecto a las cantidades de BALOs detectadas solamente al tercer día de incubación (día en que la CDR fue máxima) las cuales se muestran en la Figura 149, se pudo observar mejor que la CDR de la cepa BALO-K12 y de BALO-K resultó superior a la capacidad de lisis de las otras dos cepas de BALOs estudiadas.



**Fig. 149.** Detección de BALO-K-12, BALO-K, BALO-S y BALO-P en medio NB-50 al tercer día de incubación;  $p < 0,05^*$ : la detección de BALO-K12 fue significativamente mayor a la detectada en BALO-S y BALO-P;  $p < 0,001^{***}$ : la detección de BALO-K fue significativamente mayor a la detectada en BALO-S y BALO-P. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Debido a que la CDR de las distintas cepas de BALOs está estrechamente relacionada con la cantidad de presa que se encuentra disponible en el medio, se estudió la capacidad de proliferación de las bacterias presa en el medio NB-50 sin la presión de ningún depredador. La población de bacterias presa tendió a un descenso como se puede observar en la Figura 150 y como ya ocurriera en los medios WWM y NB-10.



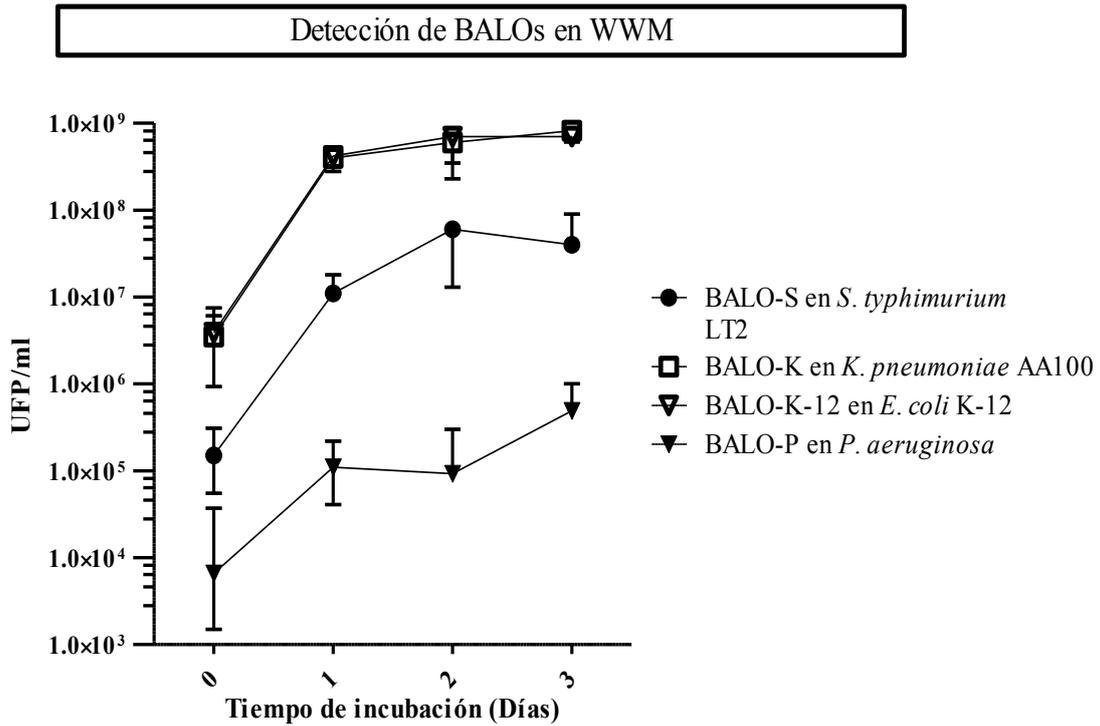
**Fig. 150.** Capacidad de proliferación de *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* AA100, *S. typhimurium* LT2 y *P. aeruginosa* como bacterias presa en medio NB-50 de forma individual y sin la presencia de otra bacteria. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.1.3.2. C.D.R. en sistemas bimembres y medio WWM

Para determinar, de igual manera, la CDR de las cepas de BALOs estudiadas en medio WWM, también se comparó la cantidad de BALO-K12, BALO-K, BALO-S y BALO-P detectada solo con su presa homóloga. Los resultados del estudio fueron los siguientes:

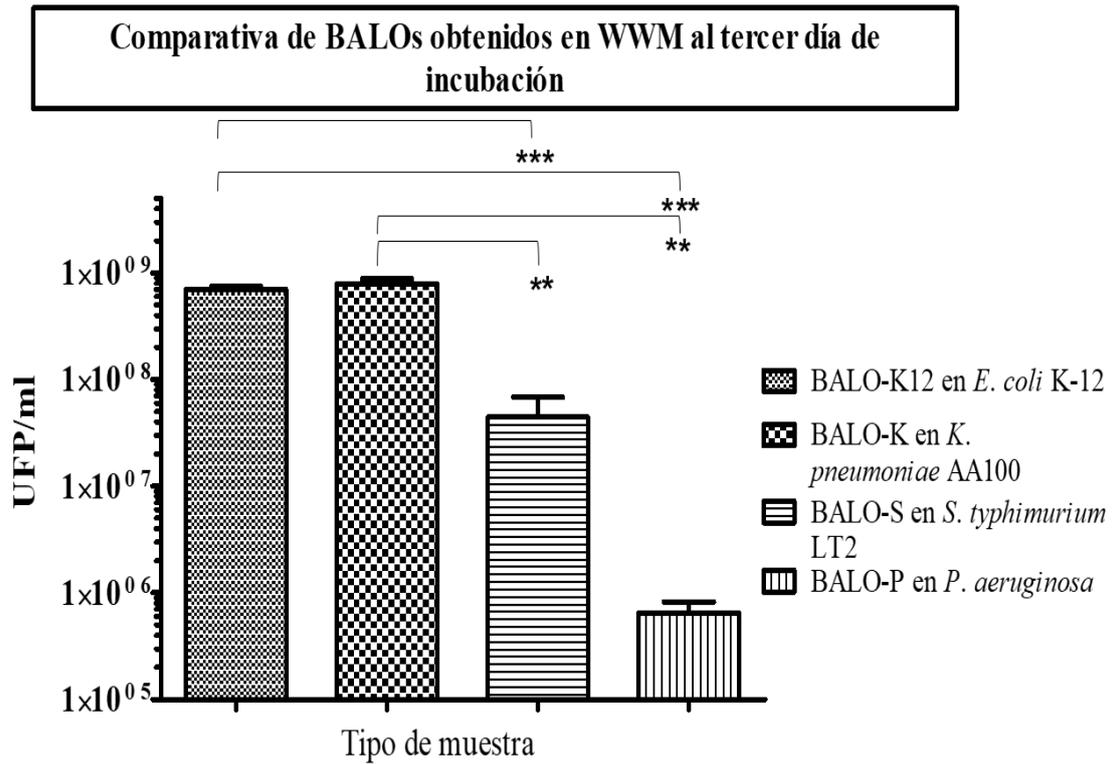
La mayor cantidad se detectó en BALO-K ( $7,83 \times 10^8$  UFP/ml de media al tercer día de incubación) y la cantidad de BALOs-K12 fue de  $6,93 \times 10^8$  UFP/ml de media al tercer día de incubación. Igualmente, la mayor cantidad revelada de la cepa BALO-S resultó ser al tercer día de incubación y con una media de  $5,43 \times 10^7$  UFP/ml. Por último, la cantidad revelada de la cepa de BALO-P fue sensiblemente inferior al detectarse, de media,  $6,50 \times 10^5$  UFP/ml como se muestra en la Figura 151.

La misma Figura 151 muestra como existió, de igual forma que en NB-50, una cantidad significativamente mayor de BALO-K12 y del BALO-K que la detectada con el resto de cepas. Concretamente, la cantidad de la cepa BALO-K12 fue significativamente mayor que la cantidad detectada de BALO-S y que BALO-P. Igualmente, la CDR de BALO-K fue significativamente mayor con respecto a la cantidad de BALO-S y BALO-P.



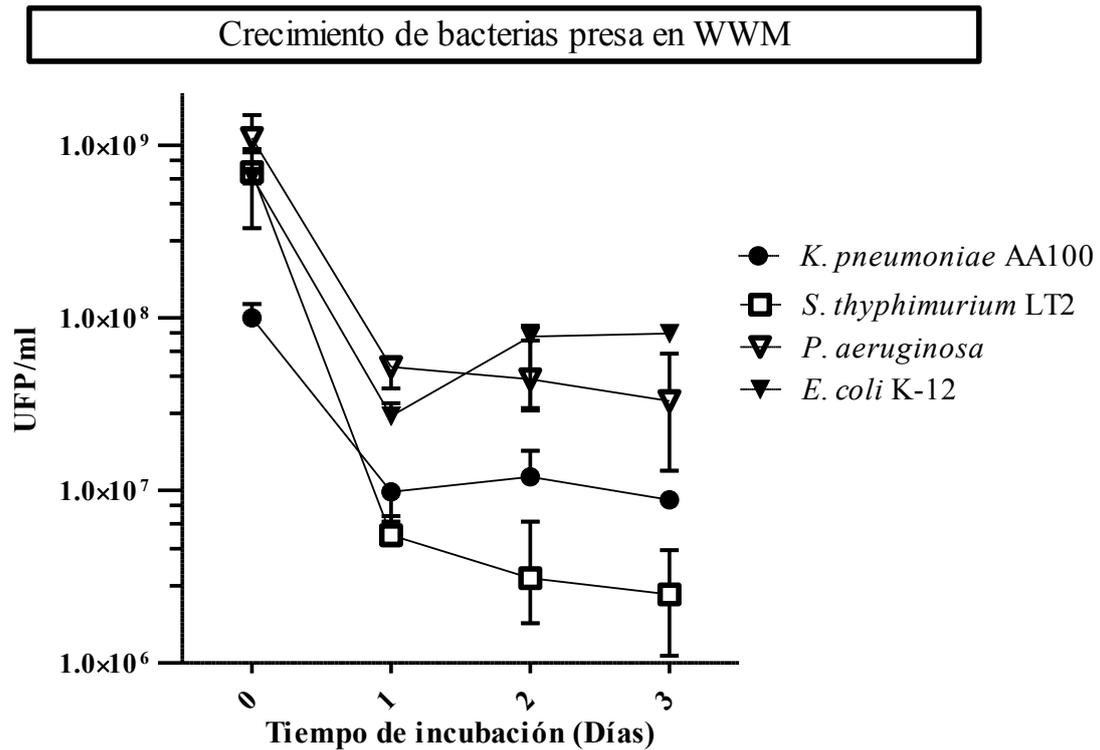
**Fig. 151.** Capacidad de lisis de BALOs en sistemas bimembres y en medio WWM;  $p < 0,001^{***}$ : cantidad de BALO-K12 detectada fue significativamente superior a la detectada en BALO-S;  $p < 0,001^{***}$ : la cantidad de BALO-K12 detectada fue significativamente superior a la detectada en BALO-P;  $p < 0,01^{**}$ : la cantidad de BALO-K detectada fue significativamente superior a la detectada en BALO-S;  $p < 0,01^{**}$ : la cantidad de BALO-K detectada fue significativamente superior a la detectada en BALO-P. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Atendiendo solo a las cantidades detectadas al tercer día de incubación (durante sus periodos máximos de proliferación), la Figura 152 refleja que la CDR detectada en medio WWM para el BALO-K12 y para BALOs-K fue superior a la capacidad de lisis de las otras dos cepas de BALOs que fueron objeto de estudio.



**Fig. 152.** Detección de BALO-K-12, BALO-K, BALO-S y BALO-P en “medio natural” al tercer día de incubación; \*\* $p < 0,01$ : la detección de BALO-K12 fue significativamente mayor a la detectada en BALO-S y BALO-P;  $p < 0,001$ \*\*\*: la detección de BALO-K fue significativamente mayor a la detectada en BALO-S y BALO-P. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

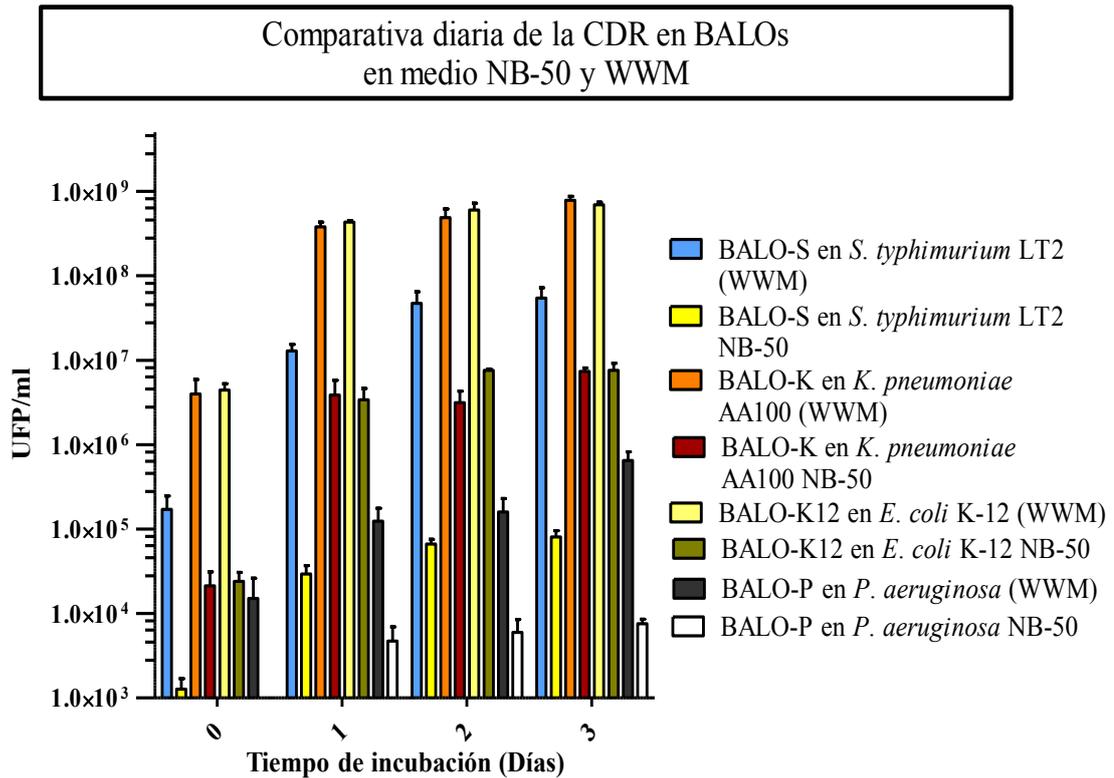
Igual que sucediera en el medio NB-50, también se determinó la cantidad de presa disponible en el medio de manera independiente, de modo que la cantidad de bacterias presa que proliferaron en medio WWM (sin la presión de ningún depredador) experimentó un descenso (Figura 153).



**Fig. 153.** Capacidad de proliferación de *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* AA100, *S. typhimurium* LT2 y *P. aeruginosa* como bacterias presa en medio WWM de forma individual y sin la presencia de otra bacteria. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.1.3.3. Comparativa de la C.D.R. en medio NB-50 y WWM

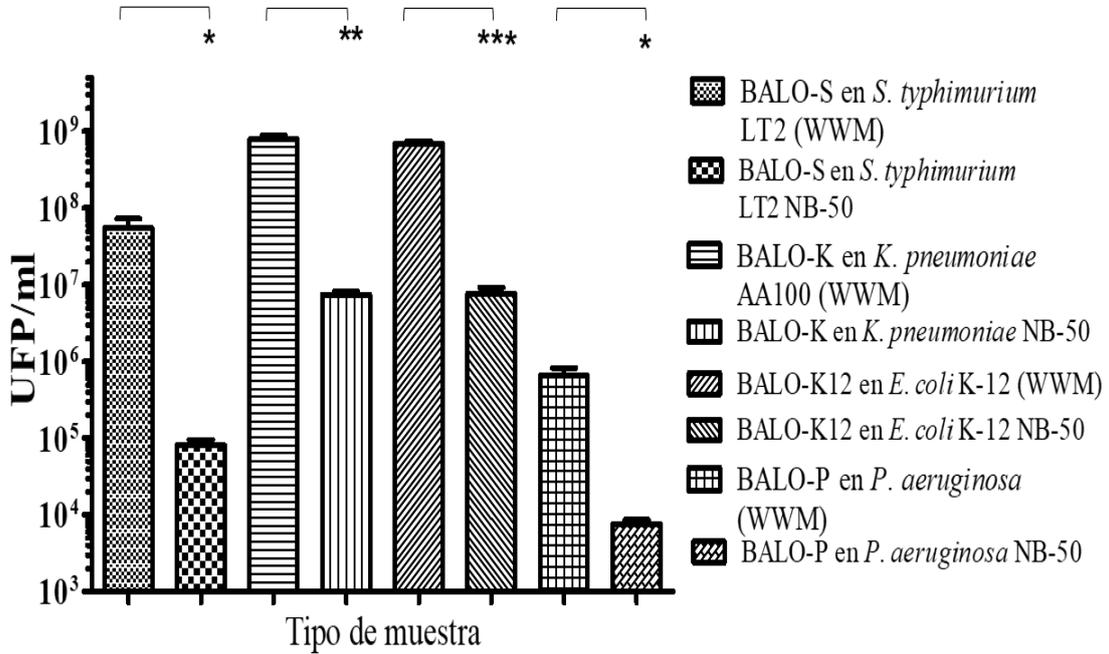
Al realizar el estudio de la CDR de las distintas cepas de BALOs comparadas en el medio NB-50 y WWM, se observó una mayor cantidad de cualquier cepa de BALOs cultivada en WWM que la observada con la misma cepa cultivada en NB-50 (Figura 154).



**Fig. 154.** Comparativa de la CDR de cada cepa de BALOs en ambos medios estudiados (NB-50 y medio WWM), en cada uno de los días en incubación;  $p < 0,001$ \*\*\*: la CDR de BALO-K12 detectada en medio WWM fue superior a las detectadas en medio NB-50;  $p < 0,01$ \*\* : la CDR de BALO-K detectada en medio WWM fue superior a las detectadas en medio NB-50;  $p < 0,05$ \*: la CDR de BALO-S detectada en medio WWM fue superior a las detectadas en medio NB-50;  $p < 0,05$ \*: la CDR de BALO-P detectada en medio WWM fue superior a las detectadas en medio NB-50. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Al agrupar los datos de la CDR de cada cepa de BALO en su tercer día de incubación (día de la CDR máxima), se pudo observar mejor que la detección de cualquier cepa de BALOs cultivada en WWM fue superior a la detectada en NB-50 (Figura 155). Por lo que, en términos absolutos, se consiguió revelar más cantidad de cualquier cepa de BALOs en medio en medio WWM que en NB-50.

Comparativa de la CDR de BALOs  
en medio NB-50 y WWM al tercer día



**Fig. 155.** Comparativa de la CDR de cada cepa de BALOs en ambos medios estudiados (NB-50 y medio WWM), y al tercer día en incubación.  $p < 0,001$ \*\*\*: la CDR de BALO-K12 detectada en medio WWM fue superior a las detectadas en medio NB-50;  $p < 0,01$ \*\* : la CDR de BALO-K detectada en medio WWM fue superior a las detectadas en medio NB-50;  $p < 0,05$ \*: la CDR de BALO-S detectada en medio WWM fue superior a las detectadas en medio NB-50;  $p < 0,05$ \*: la CDR de BALO-P detectada en medio WWM fue superior a las detectadas en medio NB-50. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

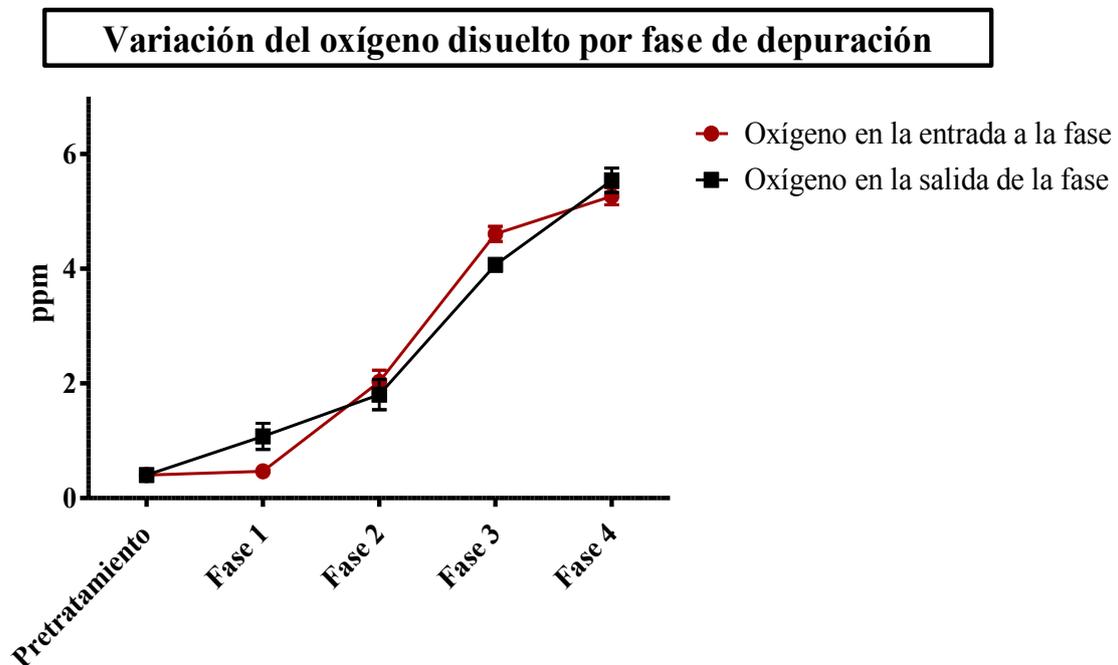
**IV-4.2. CUANTIFICACIÓN DE BALOs Y BACTERIOFAGOS EN LAS DISTINTAS FASES DE LA E.D.A.R.**

**IV-4.2.1. Parámetros físico-químicos del agua en cada fase de depuración**

En cada fase de depuración del E.D.A.R. del Campus de Espinardo se procedió a la medición de los parámetros físico-químicos del agua donde posteriormente se detectaron BALOs. Dichas mediciones arrojaron los siguientes resultados:

**IV-4.2.1.1. Oxígeno disuelto**

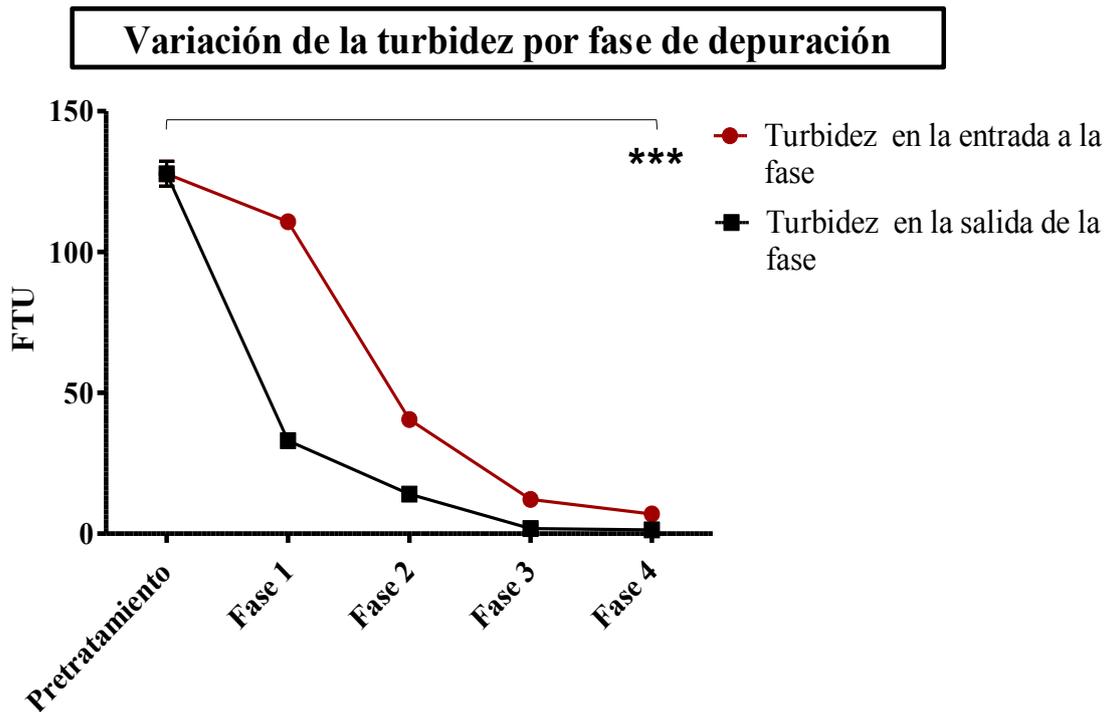
Con respecto a la medición de oxígeno disuelto a 25°C en el agua, se observó un aumento paulatino tanto a la entrada como a la salida de los lechos percoladores (Figura 156). De la misma forma, la Figura 156 también muestra como el agua presente en el pretratamiento y en la entrada del primer lecho percolador (Fase 1), resultó tener valores cercanos a 0 ppm y, a medida que se realizaron medidas en fases más avanzadas de depuración, el agua mostró valores cercanos a 6 ppm.



**Fig. 156.** Variación del oxígeno disuelto en el agua de cada una de las diferentes fases de depuración; \*\*\* $p < 0,001$ : los valores detectados en la Fase 4 resultaron ser significativamente superiores a los del pretratamiento. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.2.1.2. Turbidez

En lo referente a la turbidez, el agua de las fases iniciales mostró unos valores mucho más altos (sobre 140 FTU) que en fases intermedias y, sobre todo, que en las fases finales de la depuración (llegando hasta valores muy cercanos al 0, tal y como se observa en la Figura 157).



**Fig.157.** Variación de la turbidez del agua de cada una de las diferentes fases de depuración; \*\*\* $p < 0,001$ : los valores detectados en el pretratamiento fueron significativamente superiores a los de la Fase IV. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

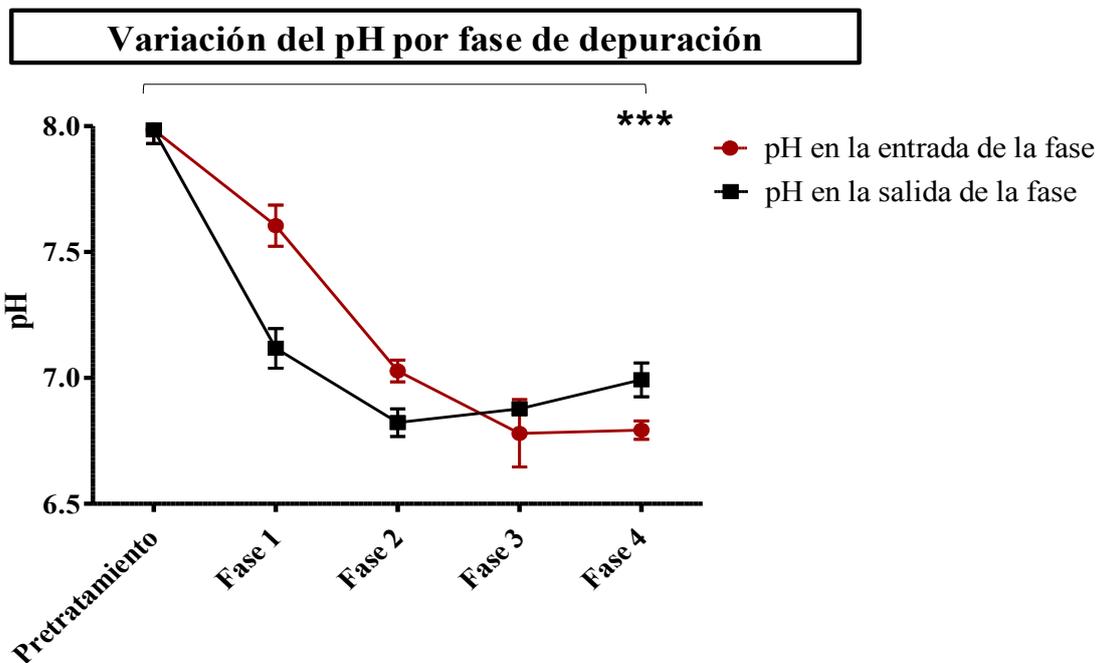
El descenso de la turbidez según se avanza en la fase de depuración mencionada anteriormente, se pudo comprobar a simple vista (Figura 158), pues el color del agua de las fases iniciales fue mucho más oscuro que el resto.



**Fig. 158.** Detalle de la turbidez del agua de entrada de cada una de las fases de depuración.

IV-4.2.1.3. pH

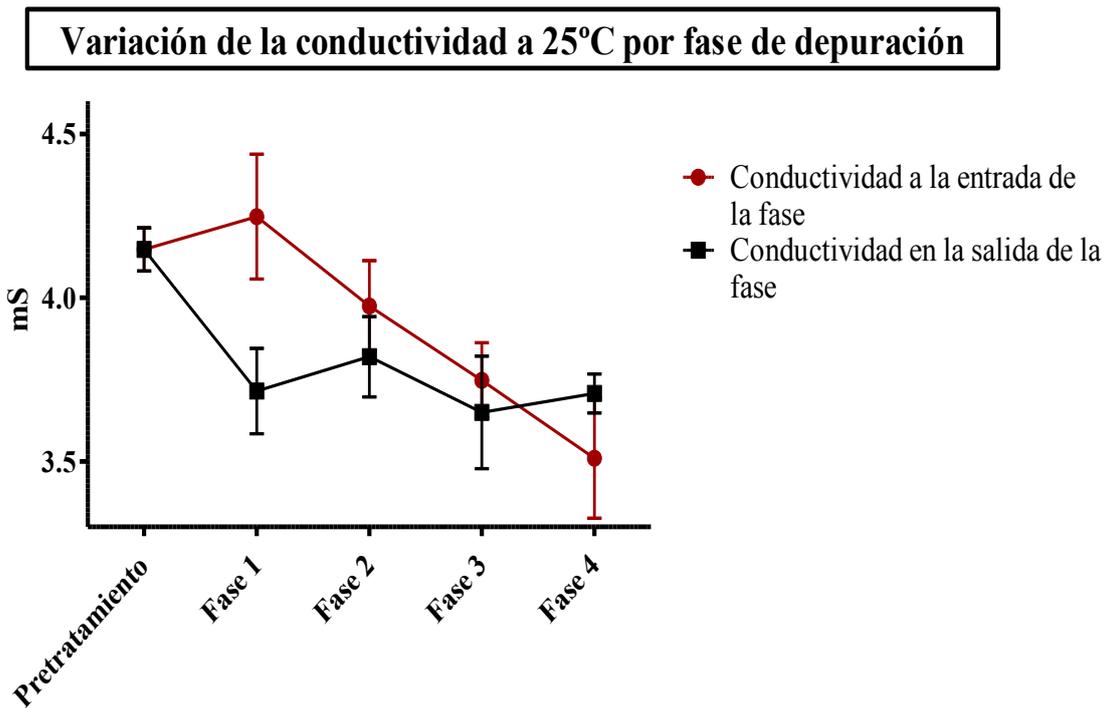
Tras la medición del pH del agua presente en cada una de las fases depuración, se observó un pH medio de 8 en la fase de pretratamiento y unos valores de 6,8-7 en la fase III y la fase IV (Figura 159).



**Fig. 159.** Variación del pH del agua de cada una de las diferentes fases de depuración; \*\*\* $p < 0,001$ : los valores medios de pH detectados en el pretratamiento de la E.D.A.R. resultaron ser significativamente superiores a los de la Fase IV. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.2.1.4. Conductividad eléctrica

Las medidas de conductividad eléctrica a 25°C mostraron un descenso desde la fase de pretratamiento, partiendo desde valores medios de 4,1mS hasta unos 3,5mS medidos en la fase final de depuración (Figura 160).



**Fig. 160.** Variación de la conductividad a 25°C del agua de cada una de las diferentes fases de depuración; \* $p < 0,05$ : los valores detectados en el pretratamiento de la E.D.A.R. fueron significativamente superiores a los de la Fase IV. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

En la Tabla 24 se muestra un resumen de todos los parámetros físico-químicos medidos en muestras de agua obtenidas tanto en la fase de pretratamiento como a la entrada a cada fase.

Fase/Parámetros	Pretratamiento	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV
Oxígeno disuelto (ppm)	<0,40	<0,40	2,03	4,61	5,27
Turbidez (NTU)	127,75	110,75	40,52	12,2	6,96
pH	7,99	7,61	7,03	6,78	6,79
Conductividad 25° (mS)	4,15	4,25	3,98	3,75	3,51
Temperatura (°C)	18,7	19,4	20,6	20,7	21,1

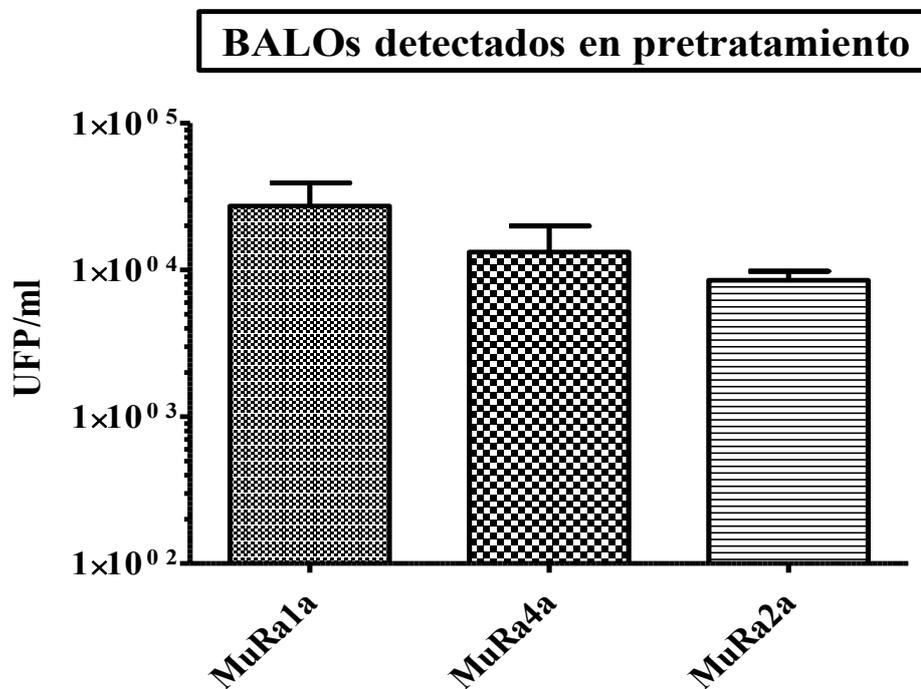
**Tabla 24.** Resumen comparativo de los parámetros físico-químicos medidos en el agua de cada una de las fases de depuración de la E.D.A.R.

**IV-4.2.2. BALOs detectados en cada fase de depuración**

**IV-4.2.2.1. Tratamiento primario**

**IV-4.2.2.1.1. Recuento de BALOs en el pretratamiento**

Tras la detección de BALOs en muestras de agua de la fase de pretratamiento, se obtuvieron unos valores medios de  $2,72 \times 10^4$  UFP/ml para MuRa1a,  $1,32 \times 10^4$  UFP/ml para MuRa4a y  $8,51 \times 10^3$  UFP/ml en la cepa MuRa2a (Figura 161). En cambio, la detección de BALOs utilizando *E. coli* C (MuRa3a) resultó imposible que la cantidad de virus detectados en placa fue tal que impidió observar zonas de lisis propias de BALOs.

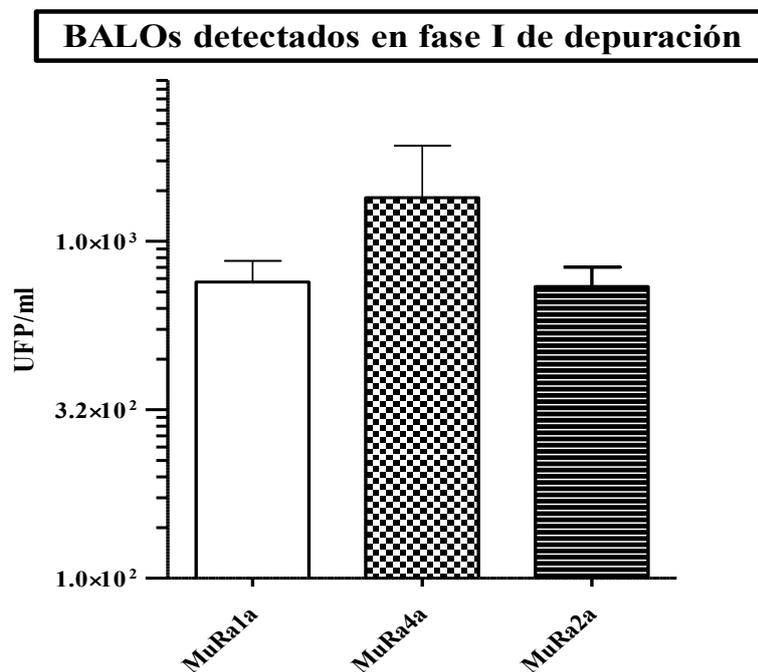


**Fig. 161.** Cantidad detectada de las diferentes cepas de BALOs en la fase de pretratamiento de depuración de la E.D.A.R. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.2.2.2. Tratamiento secundario

IV-4.2.2.2.1. Recuento de BALOs en la Fase I

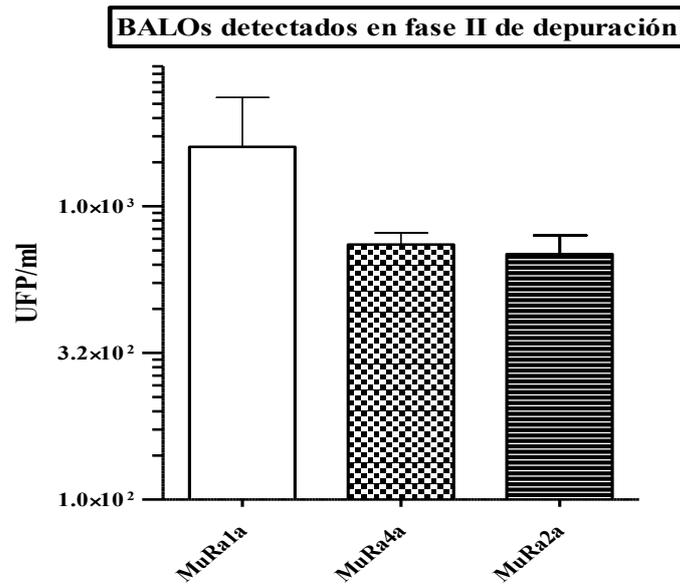
En la Fase I de depuración, las cantidades de BALOs detectadas fueron, de media:  $7,56 \times 10^2$  UFP/ml para la cepa MuRa1a,  $1,34 \times 10^3$  UFP/ml para MuRa4a y  $7,33 \times 10^2$  UFP/ml en la cepa MuRa2a. Lo que resultaron ser inferiores a la fase anterior como muestra la Figura 162. De igual manera, la detección de BALOs utilizando *E. coli* C (MuRa3a) resultó imposible debido a la cantidad de virus bacteriófagos detectados.



**Fig. 162.** Cantidad de las diferentes cepas de BALOs detectadas en la fase I de depuración de la E.D.A.R. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.2.2.2.2. Recuento de BALOs en la Fase II

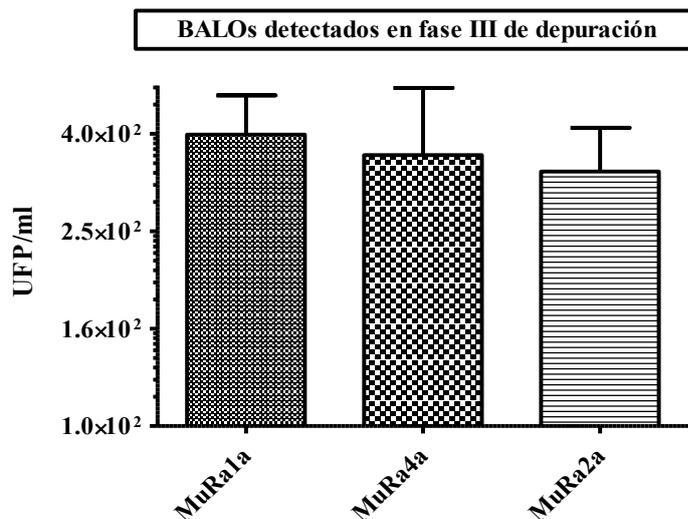
Tras la detección de BALOs en la fase II de depuración, se observó una menor cantidad de éstos con respecto a las anteriores fases. Se detectaron unos valores medios de  $1,59 \times 10^3$  UFP/ml para MuRa1a,  $7,44 \times 10^2$  UFP/ml para MuRa4a y  $6,86 \times 10^2$  UFP/ml en la cepa MuRa2a (Figura 163). La detección de BALOs MuRa3a, debido a los virus, continuó resultando imposible.



**Fig. 163.** Cantidad detectada de las diferentes cepas de BALOs en la fase II de depuración de la E.D.A.R. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

IV-4.2.2.2.3. Recuento de BALOs en la Fase III

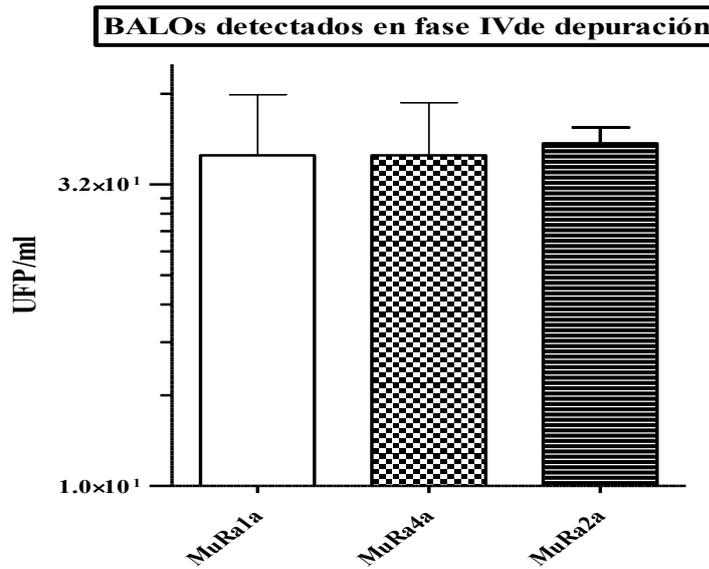
En la fase III del circuito de la E.D.A.R., se detectó también una cantidad menor de las distintas cepas de BALOs. De modo que se detectaron unos valores medios de  $3,96 \times 10^2$  UFP/ml para MuRa1a,  $3,61 \times 10^2$  UFP/ml para MuRa4a y  $3,33 \times 10^2$  UFP/ml en la cepa MuRa2a (Figura 164). El recuento de la cepa MuRa3a continuó siendo imposible.



**Fig. 164.** Cantidad detectada de las diferentes cepas de BALOs en la fase III de depuración de la E.D.A.R. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

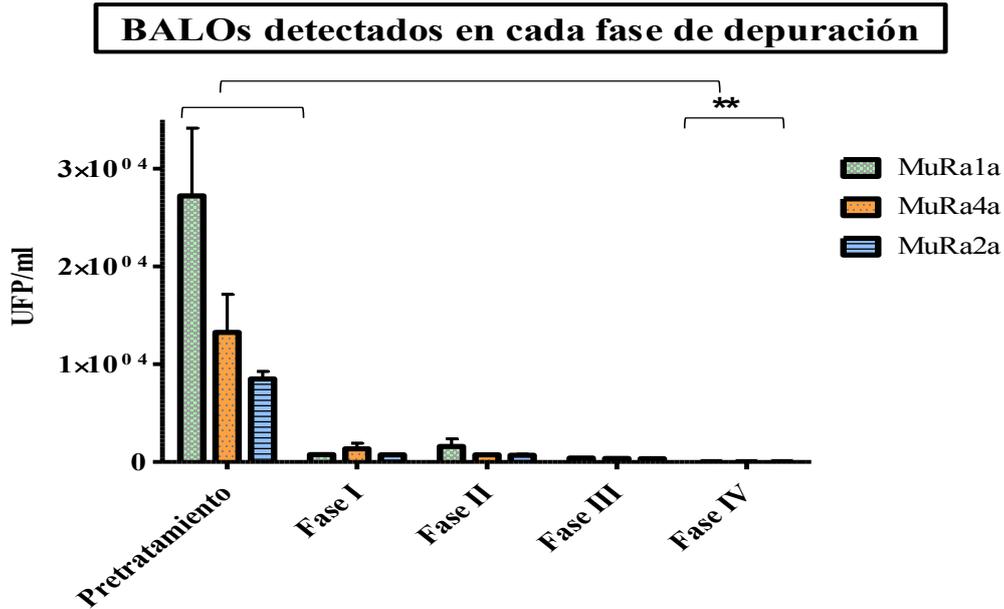
IV-4.2.2.2.4. Recuento de BALOs en la Fase IV

Por último, en la fase IV del sistema de depuración, la tendencia continuó y se detectaron menos cantidad BALOs que en cualquiera de las fases predecesoras, con unos valores medios de  $3,56 \times 10^1$  UFP/ml para MuRa1a,  $3,51 \times 10^1$  UFP/ml para MuRa4a y  $3,73 \times 10^1$  UFP/ml en la cepa MuRa2a (Figura 165). La cepa MuRa3a tampoco se pudo detectar correctamente en esta fase.



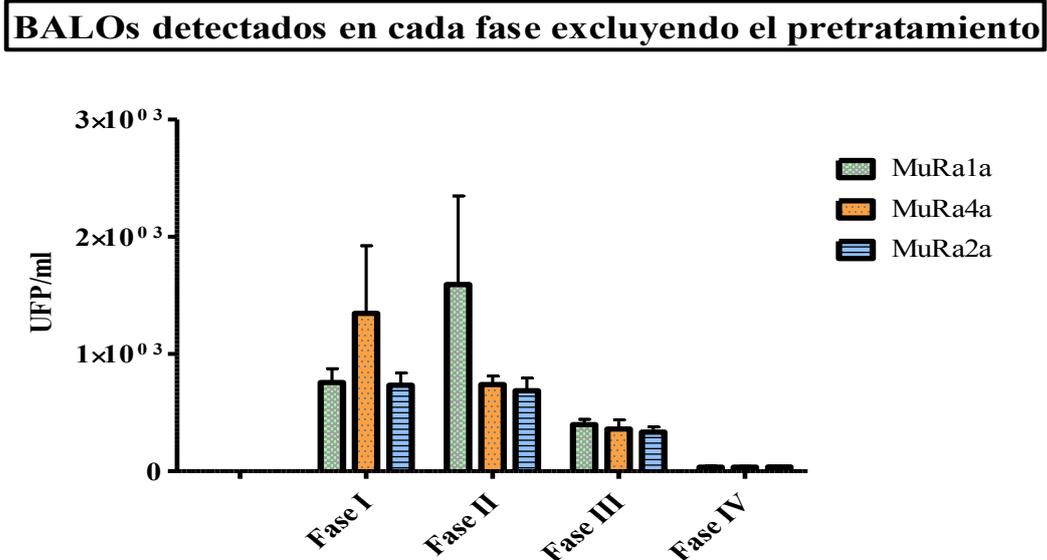
**Fig. 165.** Cantidad detectada de las diferentes cepas de BALOs en la fase IV de depuración de la E.D.A.R. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

La visión comparativa de la cantidad de BALOs MuRa1a, MuRa2a y MuRa4a detectados en cada fase de depuración (Figura 166), muestra una cantidad menor a medida que los aislamientos de BALOs fueron realizados en aguas de un estadio más avanzado de depuración.



**Fig. 166.** Cantidad de BALOs detectados con cada una de las cepas hospedadoras en todas las fases implicadas en la depuración del agua del E.D.A.R.; \*\* $p < 0,01$ : la cantidad de BALOs detectados en el pretratamiento fue significativamente mayor que en la última fase. Datos representados: medias  $\pm$  desviación estándar.

Si se excluye la fase de pretratamiento, en las fases sucesivas de depuración la cantidad de BALOS resultó más moderada y no hubo demasiada diferencia en cuanto a las detecciones entre cada fase (Figura 167).



**Fig. 167.** Cantidad de BALOs detectados con cada una de las cepas hospedadoras en las fases implicadas en la depuración del agua del E.D.A.R. excluyendo la fase de pretratamiento. Datos representados: medias  $\pm$  desviación estándar.

#### IV-4.2.3. Fagos detectados en las distintas fases de depuración

Con respecto a la detección de virus bacteriófagos, estos fueron observados en las mismas placas donde fueron reveladas las distintas cepas BALOs en cada fase de depuración (Figura 168) impidiendo en algunos casos, el recuento de éstas tal y como sucedió con la ya mencionada detección de la cepa de BALO MuRa3a.

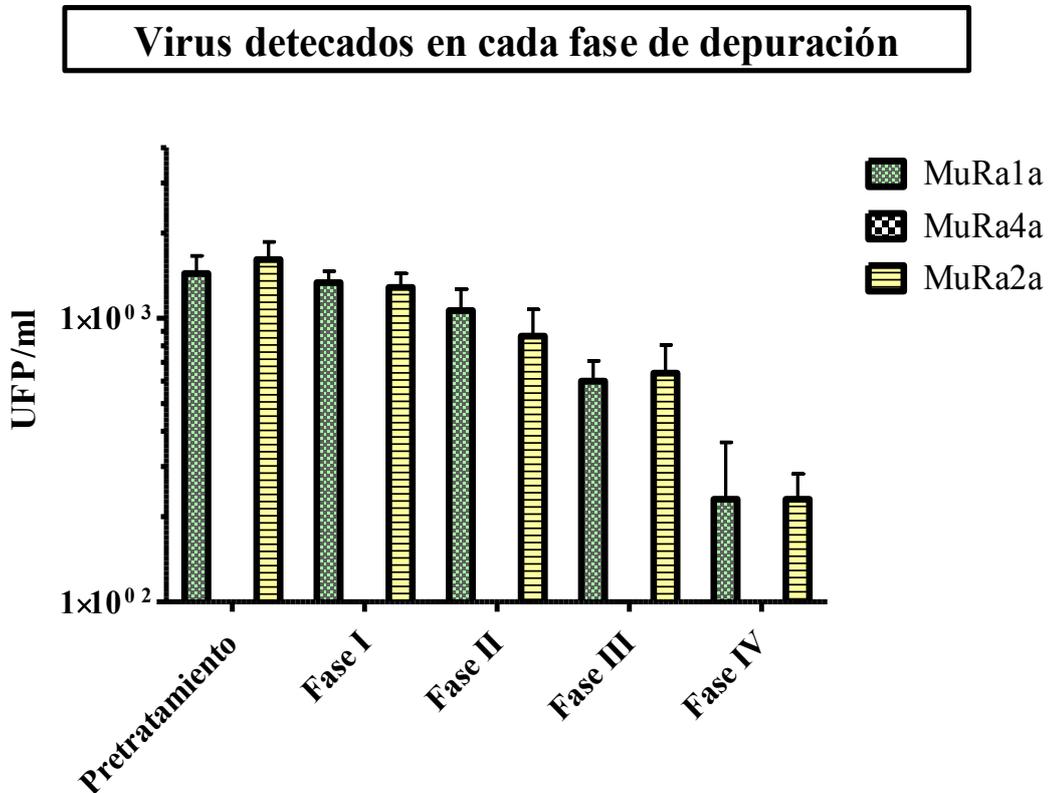


**Fig. 168.** Zonas de lisis producidas por virus bacteriófagos en una placa de revelado de BALOs empleando *E. coli* C como hospedador (MuRa3a).

En concreto, los virus bacteriófagos aparecieron en cada una de las fases y para todas las cepas presa salvo cuando fue utilizada *E. coli* Q-13 en la detección (es decir, en la cepa MuRa4a). Con dicha bacteria presa, no se observó presencia alguna de fagos en ninguna fase.

Atendiendo a la cantidad de bacteriófagos detectados, en la fase de pretratamiento se observaron unos valores medios de  $1,44 \times 10^3$  UFP/ml en el revelado de MuRa1a y  $1,61 \times 10^3$  UFP/ml en la cepa MuRa2a. En la primera fase de depuración se detectaron  $1,33 \times 10^3$  UFP/ml al revelar la cepa MuRa1a y  $1,29 \times 10^3$  UFP/ml en la cepa MuRa2a. En la segunda fase se detectaron  $1,06 \times 10^3$  UFP/ml para MuRa1a y  $8,65 \times 10^2$  UFP/ml en la cepa MuRa2a. En la tercera fase se detectaron  $6,00 \times 10^2$  UFP/ml en la detección de MuRa1a y  $6,41 \times 10^2$  UFP/ml en la cepa MuRa2a y en la última fase se detectaron  $2,34 \times 10^2$  UFP/ml para MuRa1a y  $2,30 \times 10^2$  UFP/ml en el revelado de la cepa MuRa2a. Como se

ha mencionado y como se puede observar en la Figura 169, no se detectaron virus para MuRa4a.



**Fig. 169.** Cantidad detectada de virus bacteriófagos en las placas de revelado de BALOs (MuRa1a, MuRa2a y MuRa4a) para todas las fases implicadas en la depuración del agua del E.D.A.R.; \*\*\* $p < 0,001$ : las diferencias entre poblaciones fueron significativas con respecto a MuRa4a. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

### IV-4.3. EVOLUCIÓN DE BALOs EN FASE DE ATAQUE A FORMAS COCOIDES: VISUALIZACIÓN Y ULTRAESTRUCTURA

#### IV-4.3.1. Transición de cepas de BALOs infectivos a bdellocochos

En cualquier experimento de esta investigación, tras la detección de BALOs en fase infectiva se observó que, con el paso del tiempo, dichos BALOs fueron adquiriendo una morfología más ovoidal o esférica, hasta convertirse en formas cocoides. A este tipo de estructuras pequeñas y compactas se les denominó como “bdellocochos”.

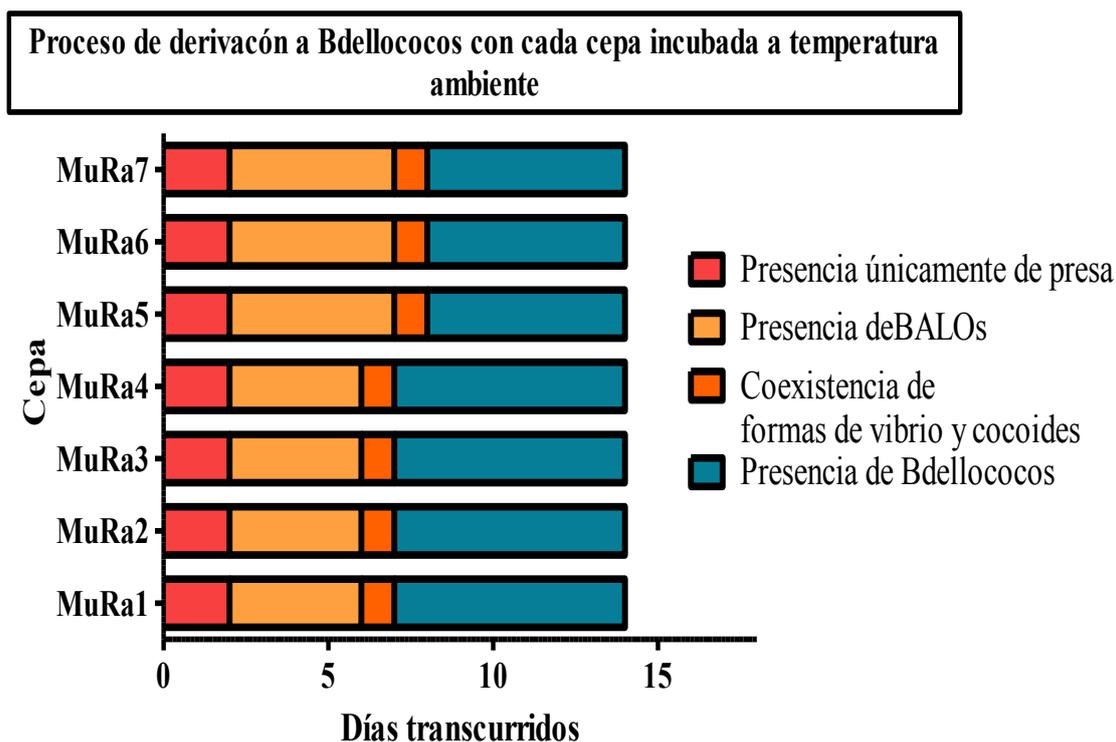
Los mencionados bdellocochos fueron detectados tanto a partir de BALOs procedentes del agua cruda de la E.D.A.R. como de BALOs previamente ultracongelados durante meses. En ambos casos, tras el revelado de BALOs se pudieron observar los siguientes resultados:

##### IV-4.3.1.1. Transición tras incubación a temperatura ambiente

Tras ser incubadas a temperatura ambiente, las cepas de BALOs MuRa1, MuRa2, MuRa3, MuRa4, MuRa5, MuRa6 y MuRa7 no produjeron zonas de lisis en placa hasta el 2º día de incubación, observándose, únicamente, sus respectivas bacterias presa durante ese periodo (Figura 170).

A partir del 2º día, pudieron ser observadas zonas de lisis cuyo crecimiento finalizó entre los días 7 y 8 de incubación, por lo que la forma típica de BALOs en fase de ataque fue observada durante un total 4 días para las cepas de BALOs MuRa1, MuRa2, MuRa3 y MuRa4 y durante 5 días en el caso de las cepas MuRa5, MuRa6 y MuRa7, como queda reflejado en la Figura 170.

A partir del 7º-8º día de incubación, en esas mismas placas se observaron las mencionadas formas retraídas y cocoides donde antes existieron bacterias del grupo BALOs en forma infectiva. Dichas formas cocoides (bdellocochos) se observaron, en días posteriores, de manera generalizada en la placa en incubación (Figura 170).



**Fig. 170.** Cronología del proceso de transición, a temperatura ambiente, desde BALOs MuRa() con forma de vibrio a bdellococos según la cepa hospedadora utilizada.

IV-4.3.1.2. Transición tras incubación a 30°C

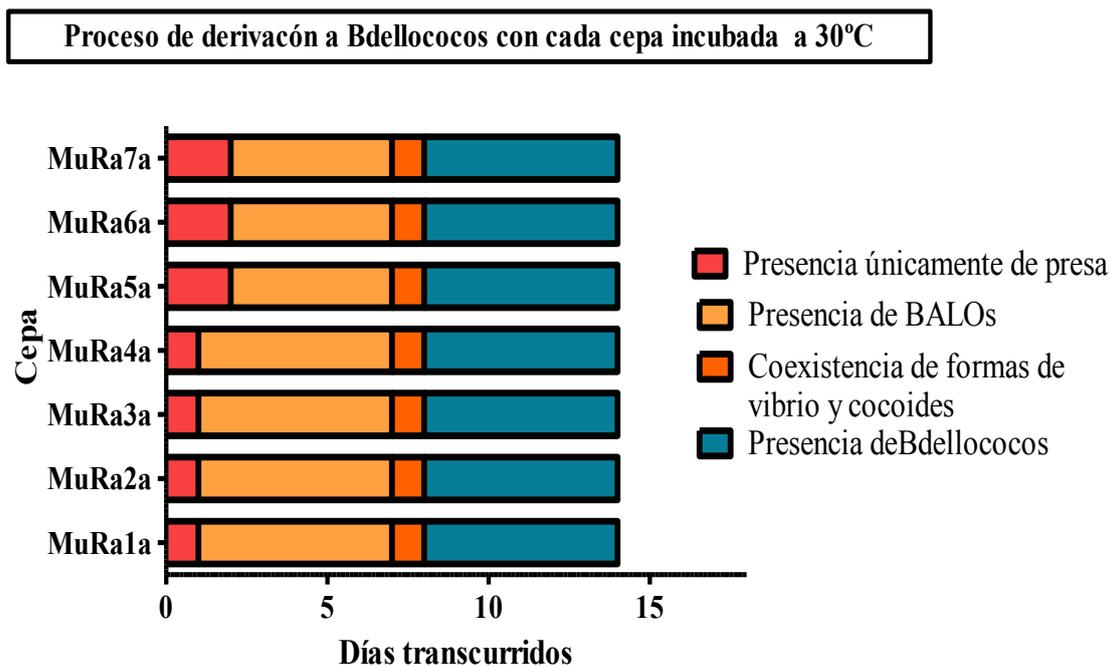
Durante su incubación a 30°C, las cepas de BALOs con forma de vibrio experimentaron una transición a bdellococos al igual que ocurriera a temperatura ambiente. Sin embargo, para en esta temperatura, se observaron variaciones en los días de aparición de las formas cocoides.

Las cepas MuRa1a, MuRa2a, MuRa3a y MuRa4a, como se ha observado en experimentos anteriores, aparecieron en su forma infectiva un día antes que el resto; al primer día ya pudieron ser observadas en las zonas de lisis (Figura 171). En cambio, en las cepas MuRa5a, MuRa6a y MuRa7a, la aparición de BALOs en forma típica fue detectada en los mismos plazos que a temperatura ambiente (a partir del 2º día de incubación).



**Fig. 171.** Zonas de lisis, al 4° día de incubación, producidas por BALOs detectados en agar con *E. coli* K-12 como bacteria presa a 30°C (MuRa1a).

Además de las diferencias observadas con respecto al tiempo de aparición de BALOs en forma infectiva, se observó que, para todas las cepas de BALOs estudiadas, sus primeras derivaciones a bdellocoos comenzaron al 7° día, como muestra la Figura 172.



**Fig. 172.** Cronología del proceso de transición, a 30°C, desde BALOs MuRa()a con forma de vibrio a bdellococos según la cepa utilizada para el revelado en placa.

#### IV-4.3.1.3. Transición tras incubación a 37°C

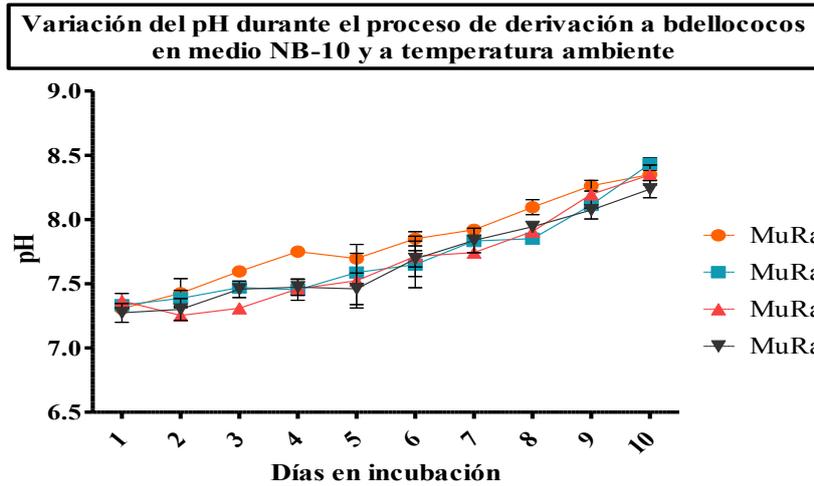
Cuando las placas de revelado fueron incubadas a 37°C, no se observó la presencia de bacterias presa en MuRa1b, MuRa2b, MuRa3b y MuRa4b, sino que aparecieron zonas líticas directamente al primer día. Sin embargo, las cepas de BALOs MuRa5b, MuRa6b y MuRa7b sí que presentaron bacterias presa durante un día antes de empezar a lisar, tal y como muestra la Figura 173.

Posteriormente, tanto la transición a bdellococos como su posterior presencia generalizada se produjo a la misma vez para todas las cepas de BALOs estudiadas a esta temperatura (Figura 173).



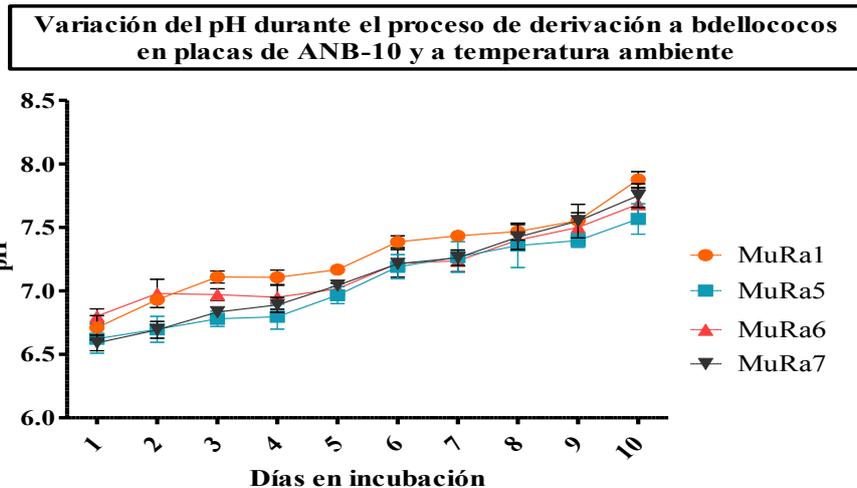
IV-4.3.2. Variación del pH en la transición

Durante el proceso de transición de BALOs a bdellocochos, el pH de los sistemas bimembres (BALOs MuRa-bacteria presa) en medio líquido, varió, de media, desde el 7,3 del primer día de incubación, hasta el 8,5 al 10º día, como indica la Figura 174.



**Fig. 174.** Variación de pH en cultivos líquidos bimembres con las distintas cepas de BALOs incubadas a temperatura ambiente. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

Tras las mediciones de pH realizadas en placa, se obtuvieron unos valores medios de 6,5-7 en los primeros días hasta el 7,8 de los últimos días (Figura 175).



**Fig. 175.** Variación de pH en cultivos sólidos bimembres con las distintas cepas de BALOs detectadas a temperatura ambiente. Datos representados: medias +/- desviación estándar.

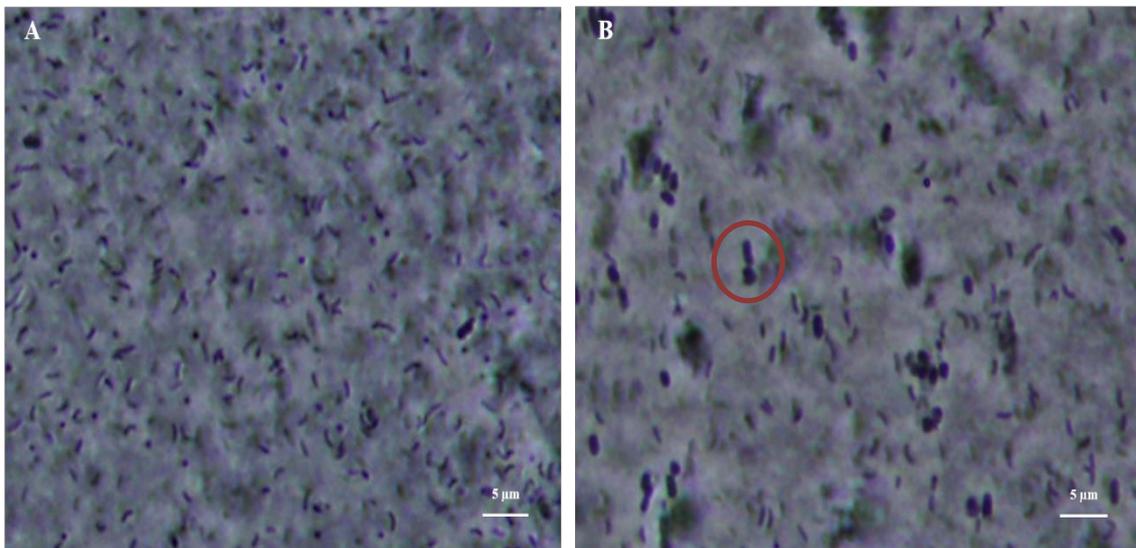
### IV-4.3.3. Estudio de bdellocofos en distintos sistemas de microscopía

Tras estudiar la cronología a la que los bdellocofos de cada una de las cepas de BALOs tuvieron lugar, se procedió a caracterizar la ultraestructura de dichas formas, obteniendo los siguientes resultados:

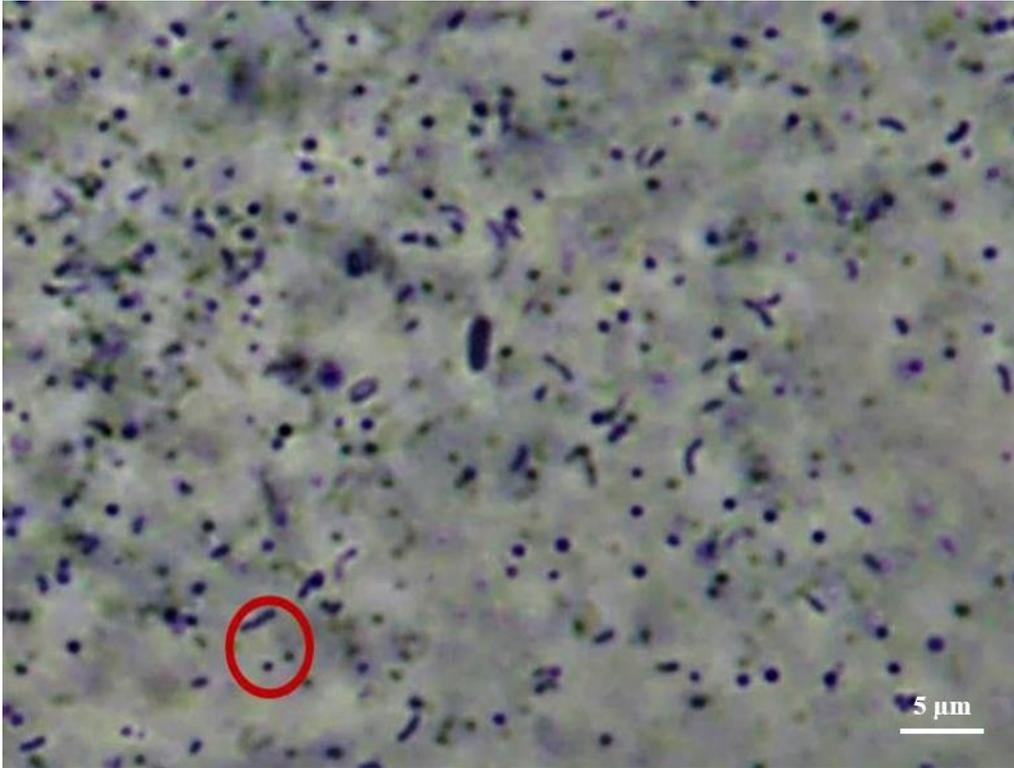
#### IV-4.3.3.1. Estudio en microscopía óptica

La derivación de cepas de BALOs a las ya mencionadas formas compactas y cocoides (bdellocofos) que fueron mostrándose de forma paulatina en placa, pudo ser observada por medio de microscopía óptica.

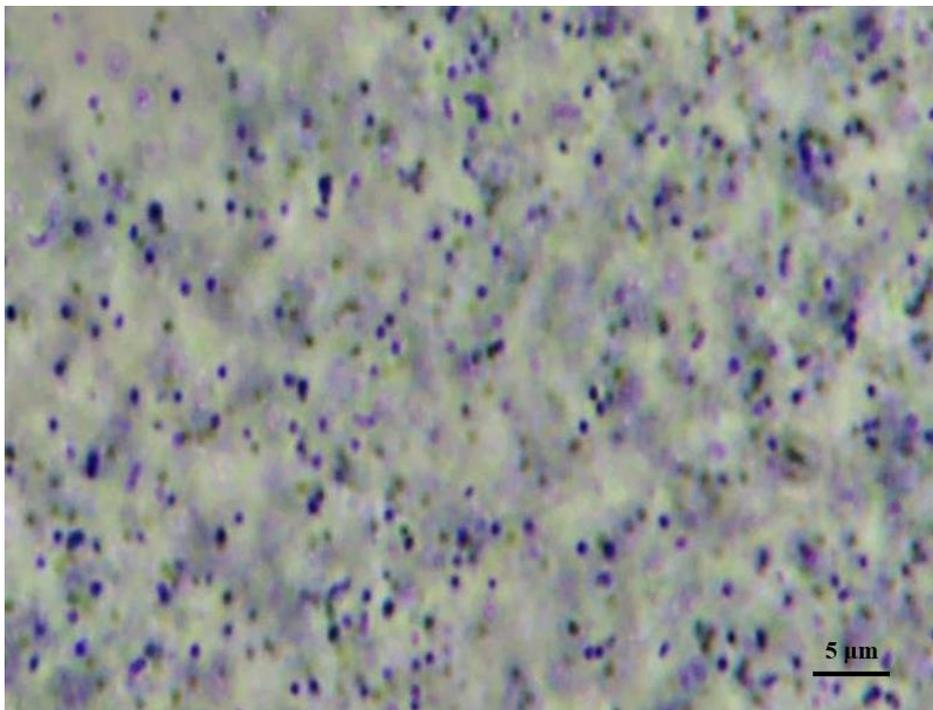
Primeramente, los BALOs aparecieron en formas típicas como las que se muestran en la Figura 176. Tras unos días, la misma placa empezó a presentar formas más retraídas como se puede ver en la Figura 177 y, unos días más tarde, en la detección en placa solamente se observaron bdellocofos; tanto en parte central de zonas de lisis aparecidas en el “agar de cobertera” de la placa (Figura 178), como en su parte exterior (Figura 179).



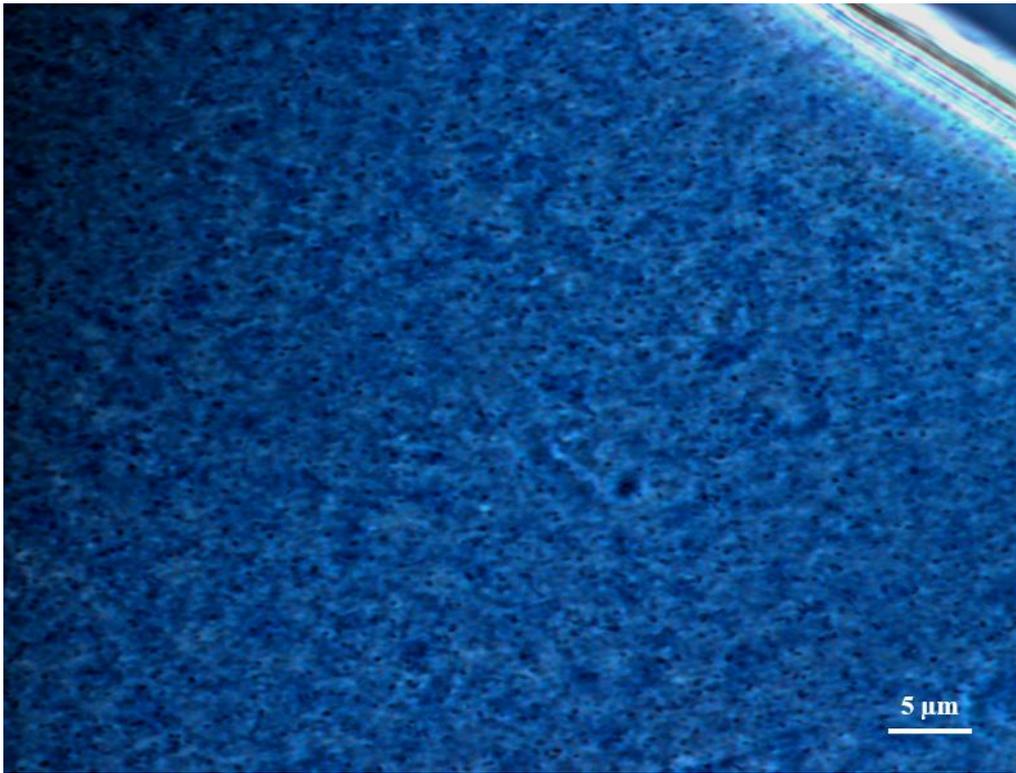
**Fig. 176.** Fragmento de una “calva” observado al microscopio de contraste de fase por medio de inmersión en aceite (objetivo de 100x). **A)** BALOs MuRa1a en su forma típica detectado en placa de NA-10 a los 3 días de incubación. **B)** Presencia de *E. coli* K-12 en esa misma placa (círculo rojo).



**Fig. 177.** Transición a formas cocoides (rodeadas en rojo) de la cepa de BALO MuRa1a a los 7 días de incubación y a 30°C. Fragmento de una calva del “agar de cobertera” observado al microscopio de contraste de fase por medio de inmersión en aceite (objetivo de 100x).

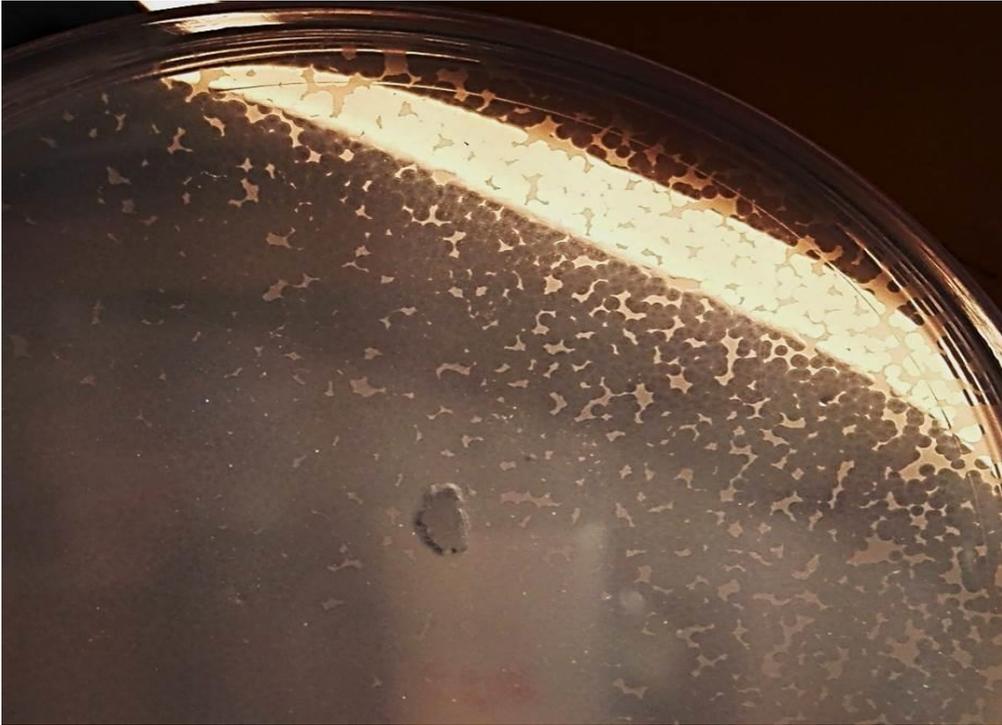


**Fig. 178.** Formas cocoides en zonas de lisis del “agar de cobertera”. Revelado de BALOs MuRa1a a los 11 días de incubación y a 30°C. Fragmento observado al microscopio de contraste de fase por medio de inmersión en aceite (objetivo de 100x).



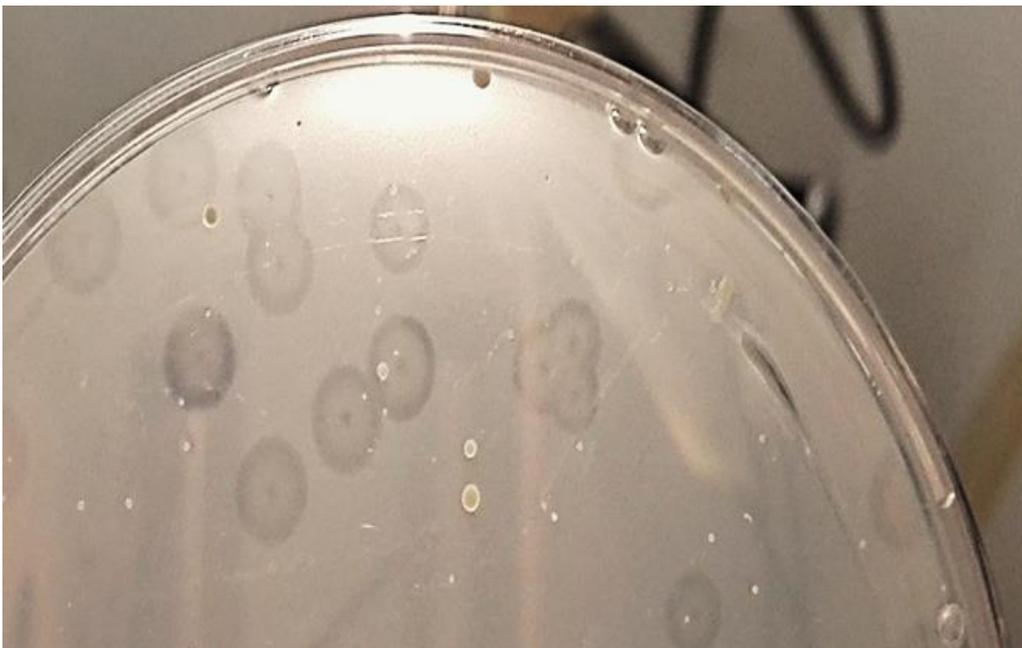
**Fig. 179.** Bdellocoques presentes en la parte externa del NA-10 de muestra. Revelado de BALOs MuRa1a a los 11 días de incubación y a 30°C. Fragmento del agar de “cobertera” teñido con DAPI, pero observado al microscopio de contraste de fase a menor aumento (objetivo de 10x).

La aparición de estos bdellocoques se produjo tanto en placas con calvas más pequeñas que acabaron siendo lisadas completamente (proceso denominado como “lisis confluyente”, mostrada en la Figura 180), como en placas donde todavía hubo presencia de bacteria presa.



**Fig. 180.** Lisis confluyente presente en placa de NA-10 de la cepa de BALO MuRa1a.

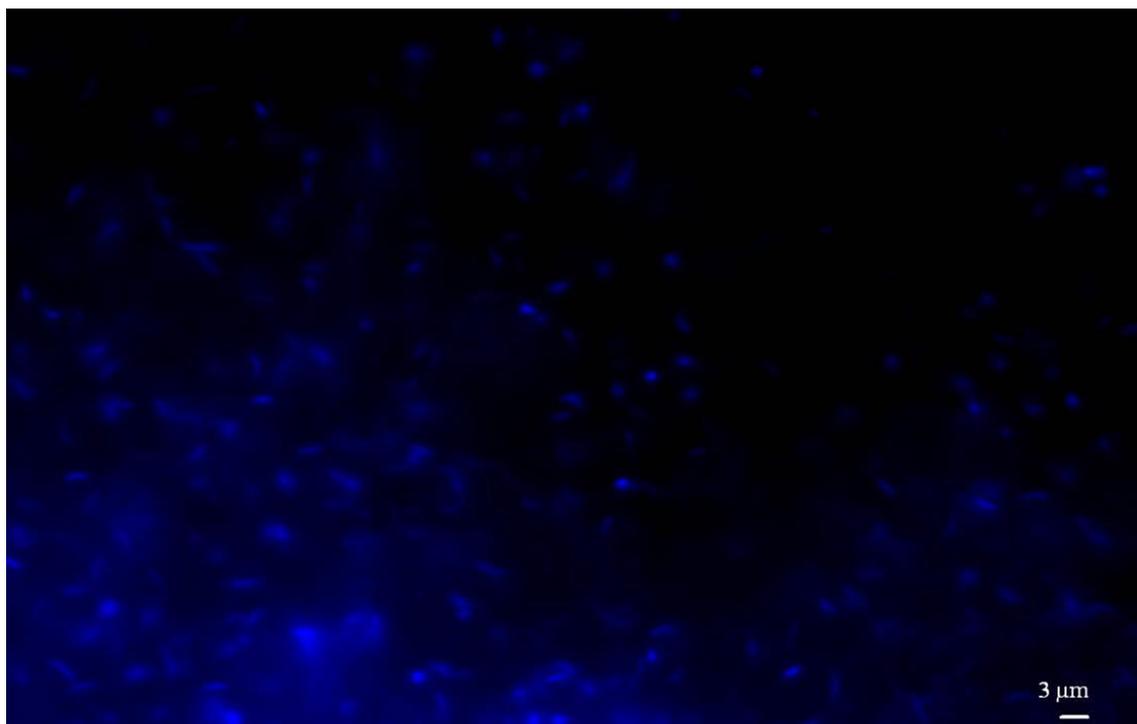
En cepas de BALOs MuRa6a, las zonas de lisis observadas presentaron una forma concéntrica, como se muestra en la Figura 181. La aparición de bdellocochos fue observada en la parte central de la zona de lisis.



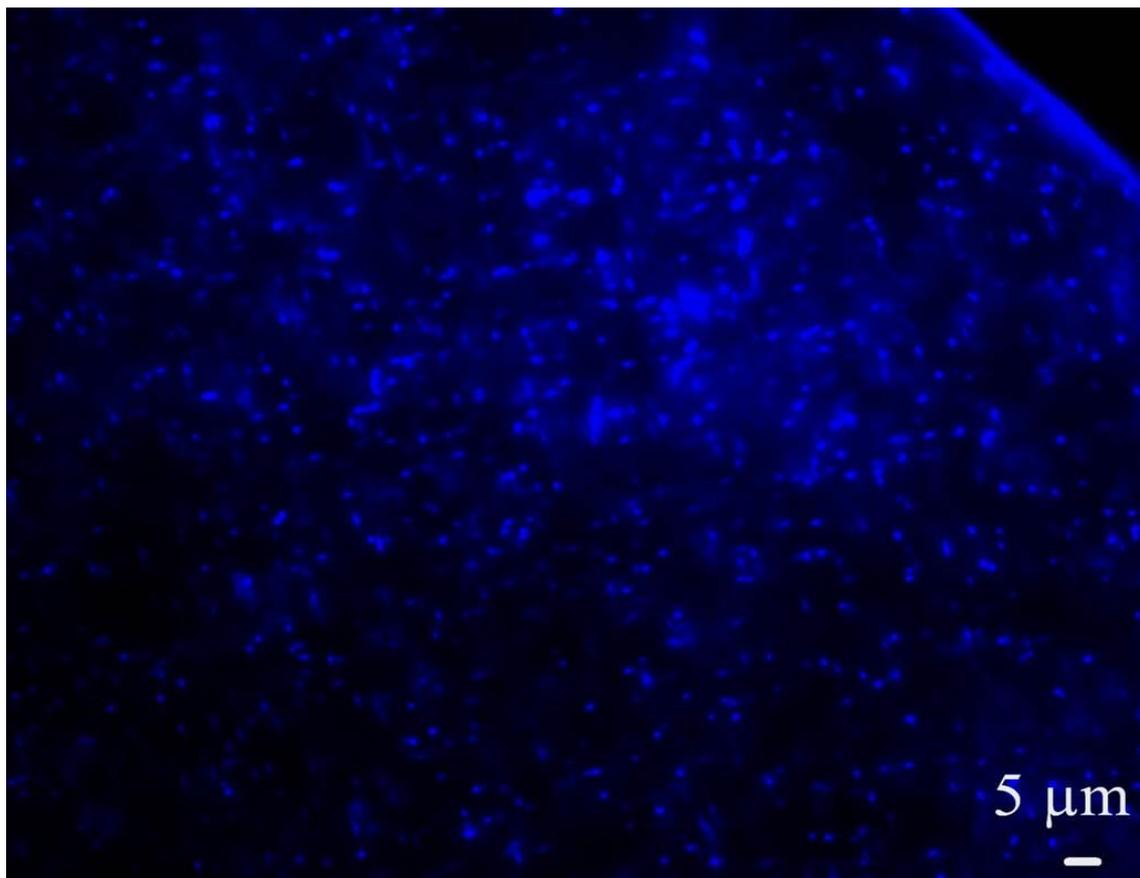
**Fig. 181.** Zonas grandes y concéntricas de lisis, detectadas en NA-10 y producidas por la cepa de BALO MuRa6a.

#### IV-4.3.3.2. Estudio en microscopía de epifluorescencia

Tras ser teñidas con DAPI, las formas típicas de BALOs (Figura 182) y los bdellocochos obtenidos posteriormente (Figura 183), pudieron ser observados por medio del microscopio de epifluorescencia.

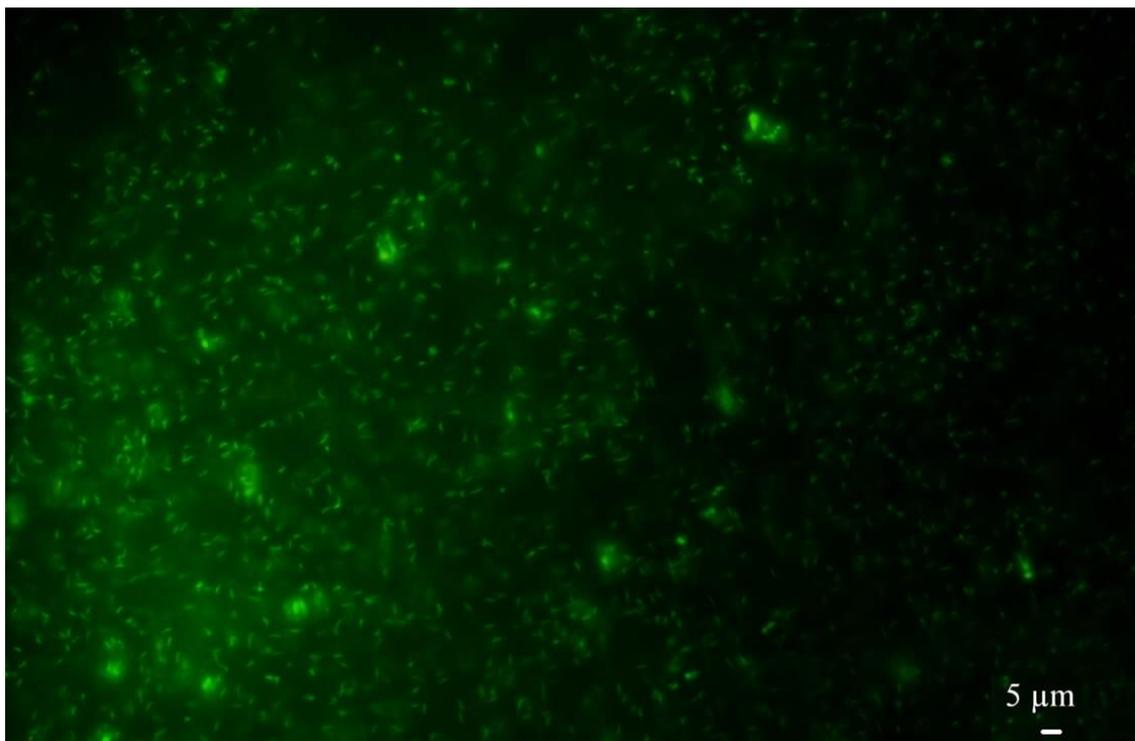


**Fig. 182.** BALOs MuRa1a en fase de ataque a los 3 días de incubación a 30°C, teñidos con DAPI y visualizados al microscopio de epifluorescencia.

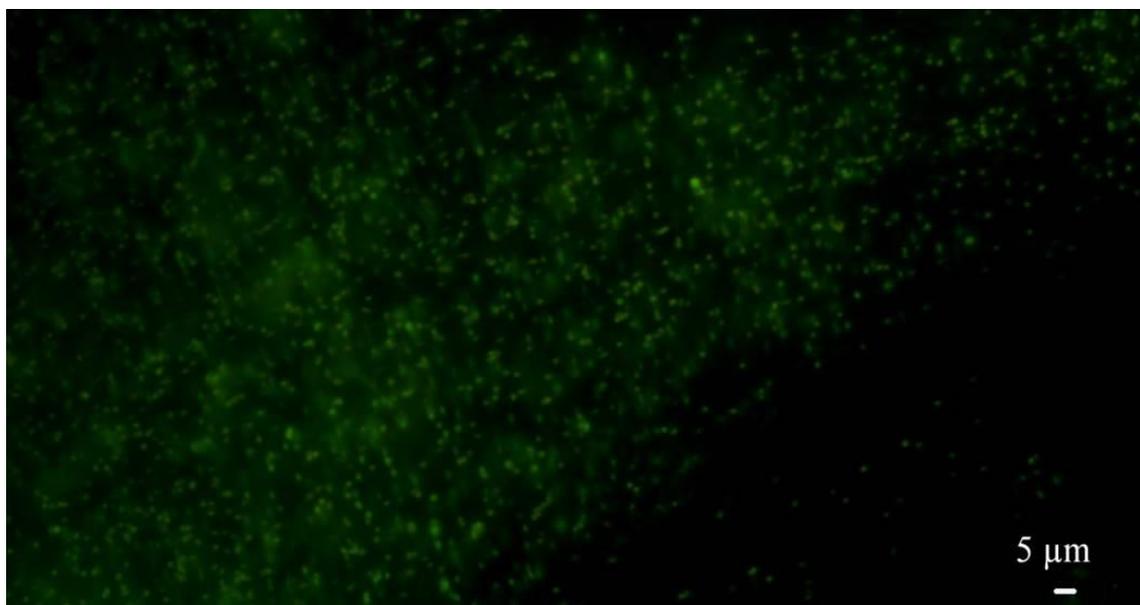


**Fig. 183.** BALOs MuRa1a en forma trofozoite a los 8 días de incubación a 30°C, teñidos con DAPI y visualizados al microscopio de epifluorescencia.

Igualmente, la tinción de formas infectivas y formas trofozoites con naranja de acridina (Figura 184 y 185 respectivamente) sirvió también para poder observarlas al microscopio de epifluorescencia.



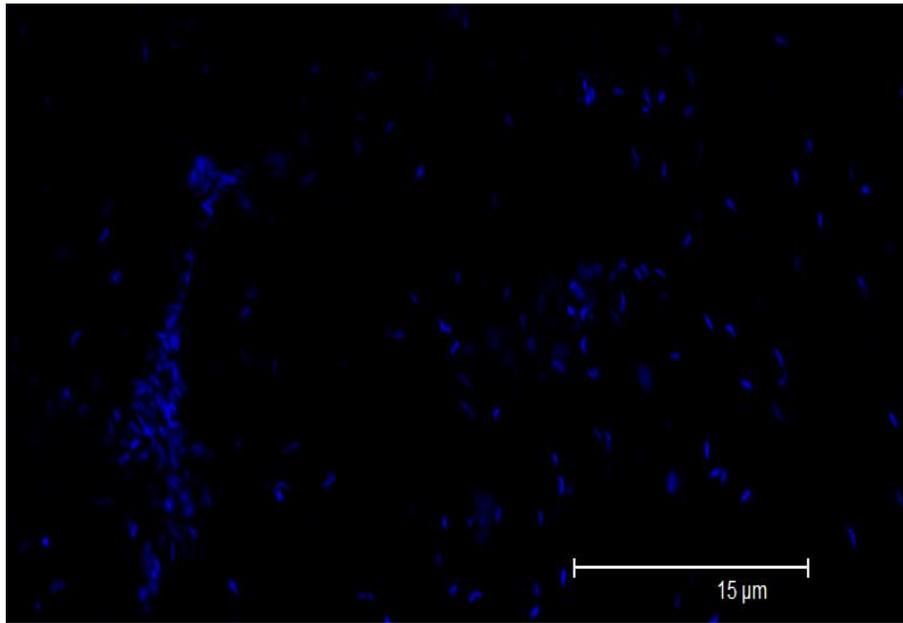
**Fig. 184.** BALOs MuRa1a en fase de ataque a los 3 días de incubación a 30°C, teñidos con naranja de acridina y visualizados al microscopio de epifluorescencia.



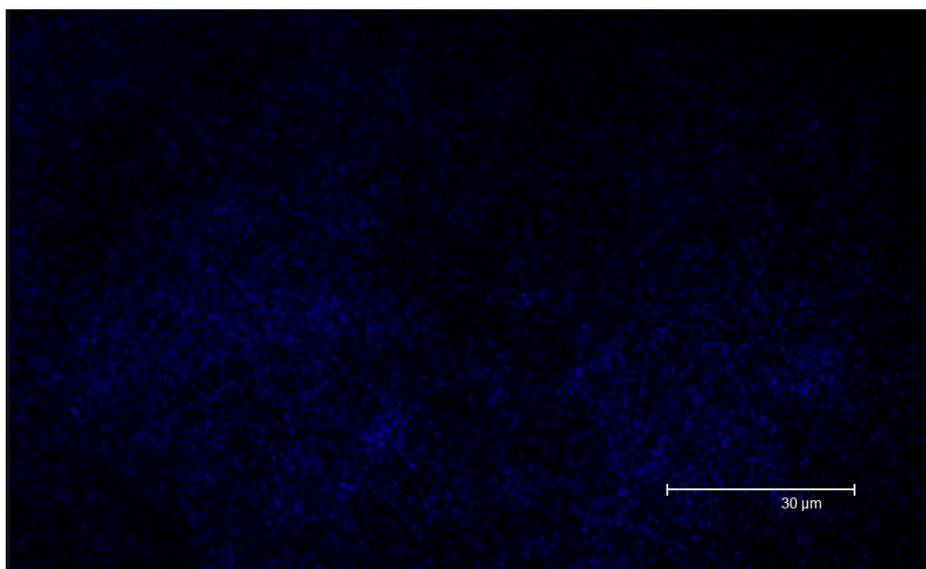
**Fig.185.** BALOs MuRa1a en forma cocoide a los 8 días de incubación a 30°C, teñidos con naranja de acridina y visualizados al microscopio de epifluorescencia.

IV-4.3.3.3. Estudio en microscopía confocal

De igual manera y tras la preparación de la muestra para su observación al microscopio confocal, se observaron bacterias de grupo BALOs en fase de ataque (Figura 186) y en forma de bdelloco (Figura 187) teñidas previamente con DAPI.

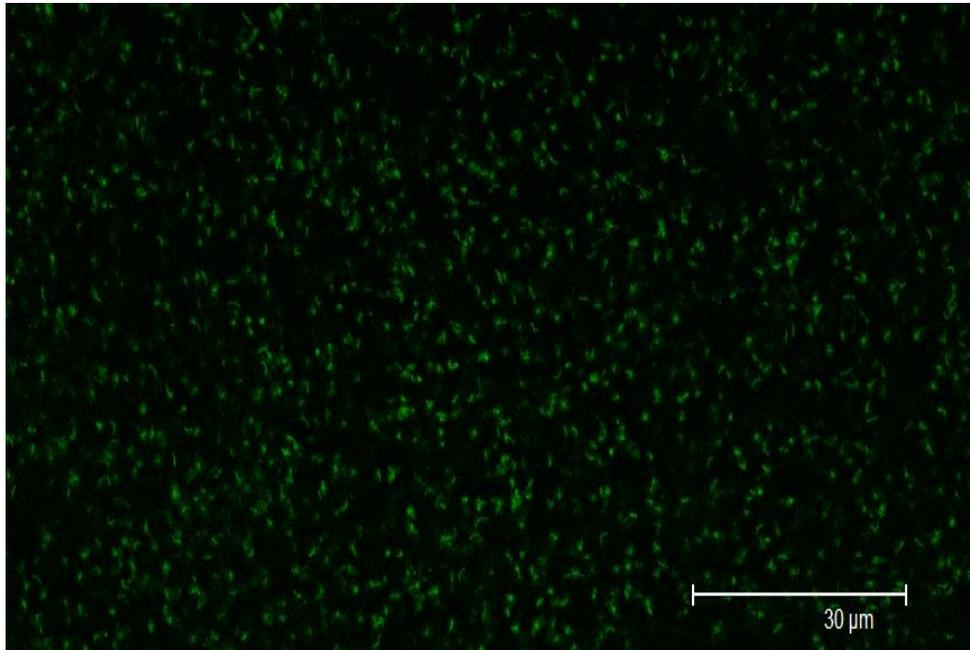


**Fig. 186.** BALOs MuRa1a en fase de ataque a los 3 días de incubación a 30°C, teñidos con DAPI y observados al microscopio confocal.

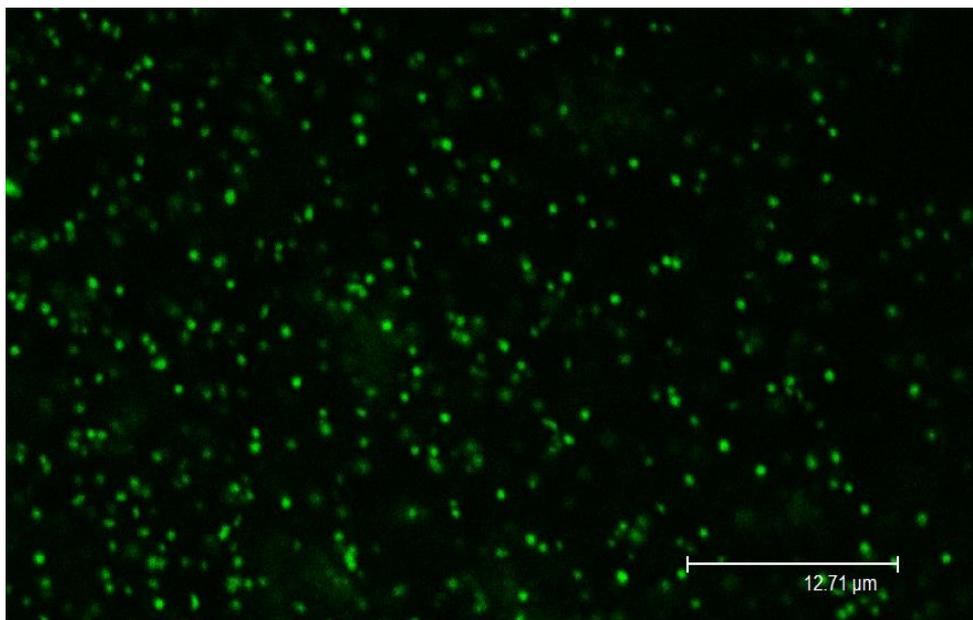


**Fig. 187.** BALOs MuRa1a en forma cocoide (bdelloco) a los 8 días de incubación a 30°C, teñidos con DAPI y observados al microscopio confocal.

Dichos BALOs MuRa1a fueron teñidos, igualmente, con naranja de acridina lo que habilitó su observación tanto en formas infectivas (Figura 188) como en forma de bdellocofos (Figura 189).



**Fig. 188.** BALOs MuRa1a en fase de ataque a los 3 días de incubación a 30°C, teñidos con naranja de acridina y observados al microscopio confocal.

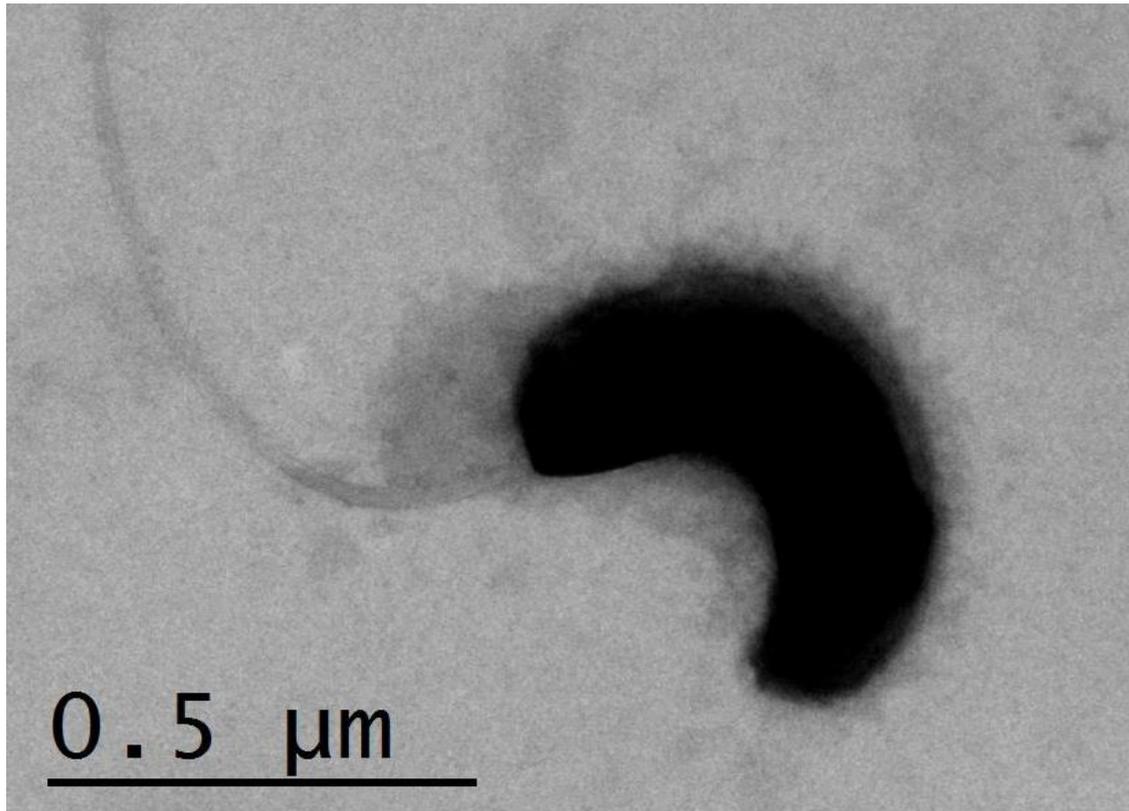


**Fig. 189.** BALOs MuRa1a en forma cocoide (bdellocofos) a los 8 días de incubación a 30°C, teñidos con naranja de acridina y observados al microscopio confocal.

#### IV-4.3.4. Ultraestructura de bdellocochos

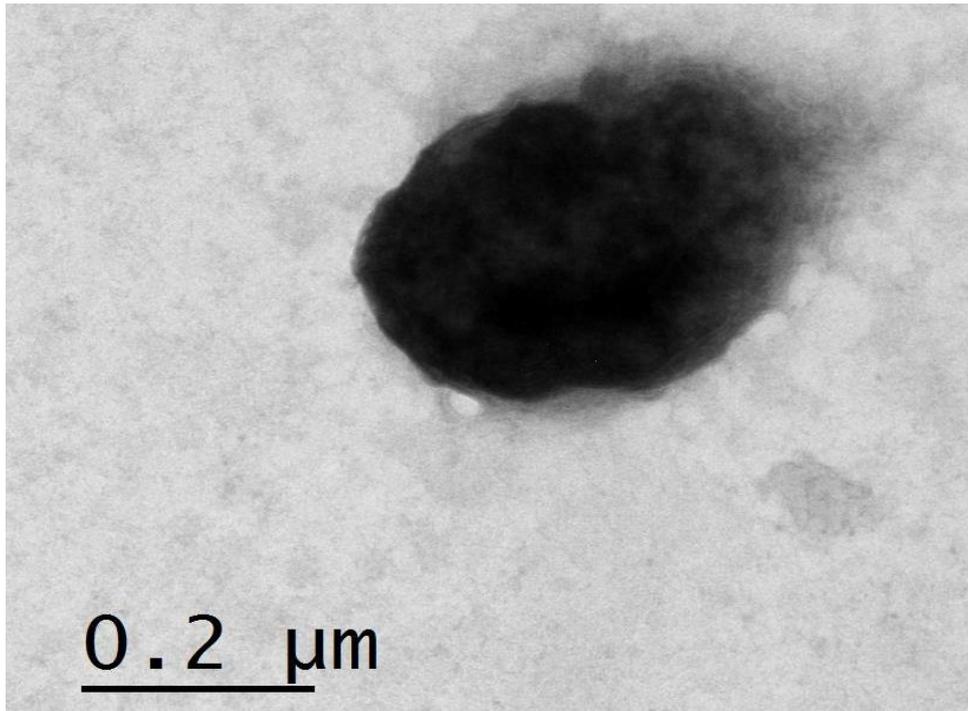
##### IV-4.3.4.1. Ultraestructura vista al microscopio electrónico

Por medio del microscopio electrónico, se pudo observar en detalle la morfología de la cepa de BALOs MuRa1a en fase de ataque (Figura 190).



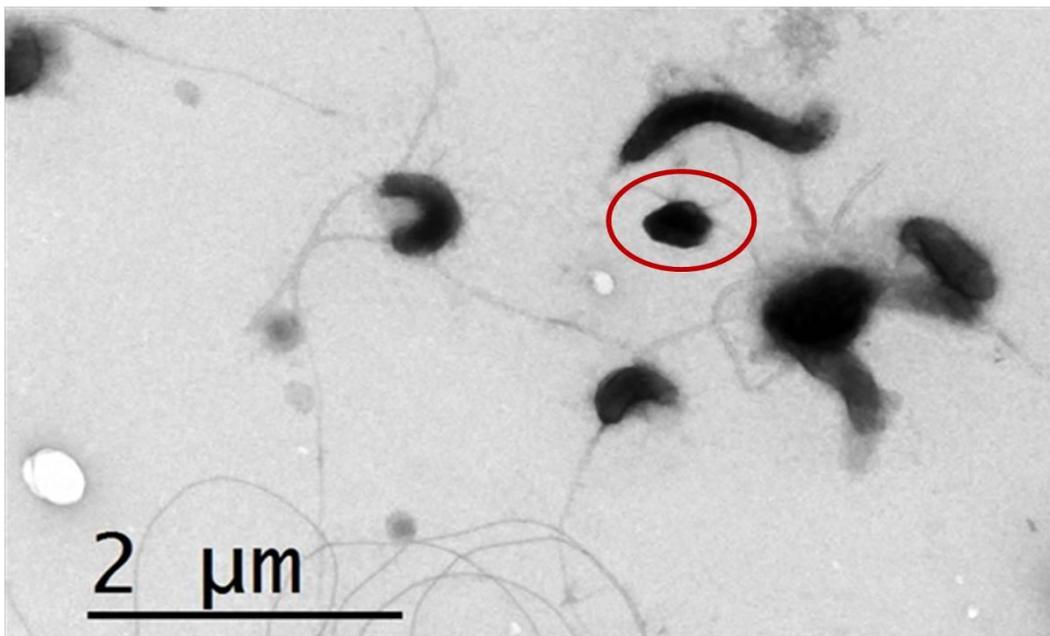
**Fig. 190.** BALO MuRa1a en su forma infectiva observado al microscopio electrónico.

Tras la transformación a bdellococo, se observó, además de su aspecto compacto, la pérdida de su flagelo polar (Figura 191).



**Fig. 191.** BALO MuRa1a derivado, al décimo día de incubación a 30°C, a su forma cocoide (bdelloco) y sin la presencia de su flagelo polar. Observado al microscopio electrónico.

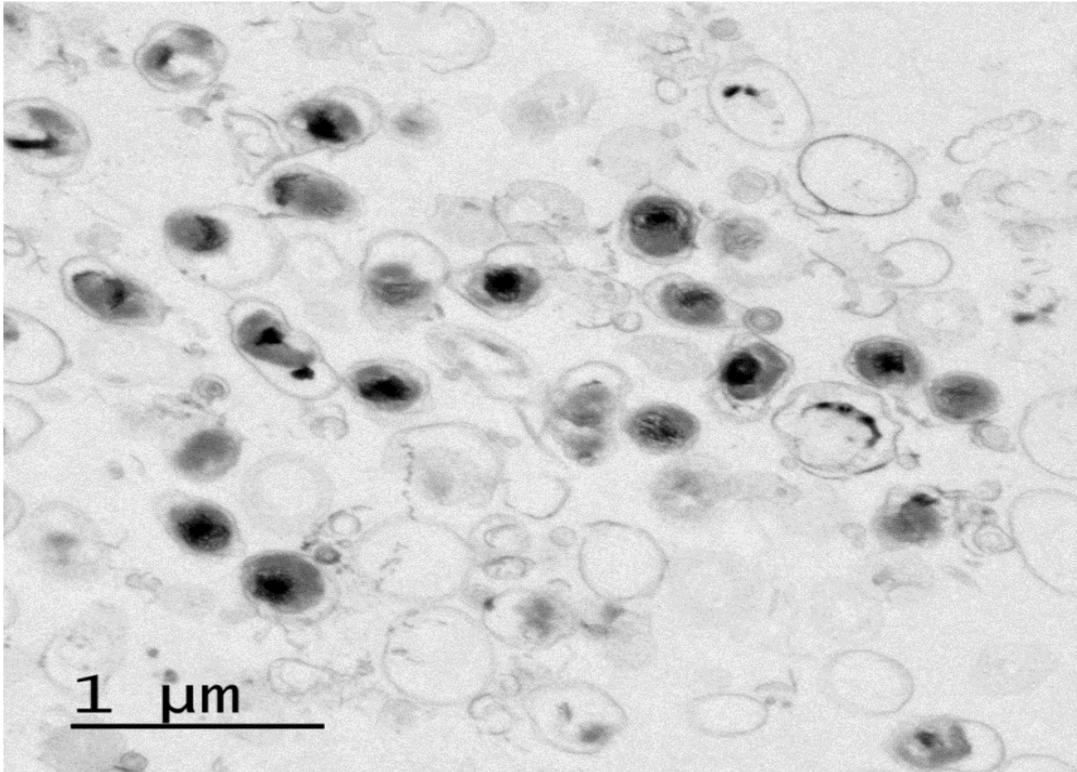
Las formas cocoides alcanzaron un tamaño de entre 0,2μm y 0,4μm, como se puede observar de manera comparada en la Figura 192.



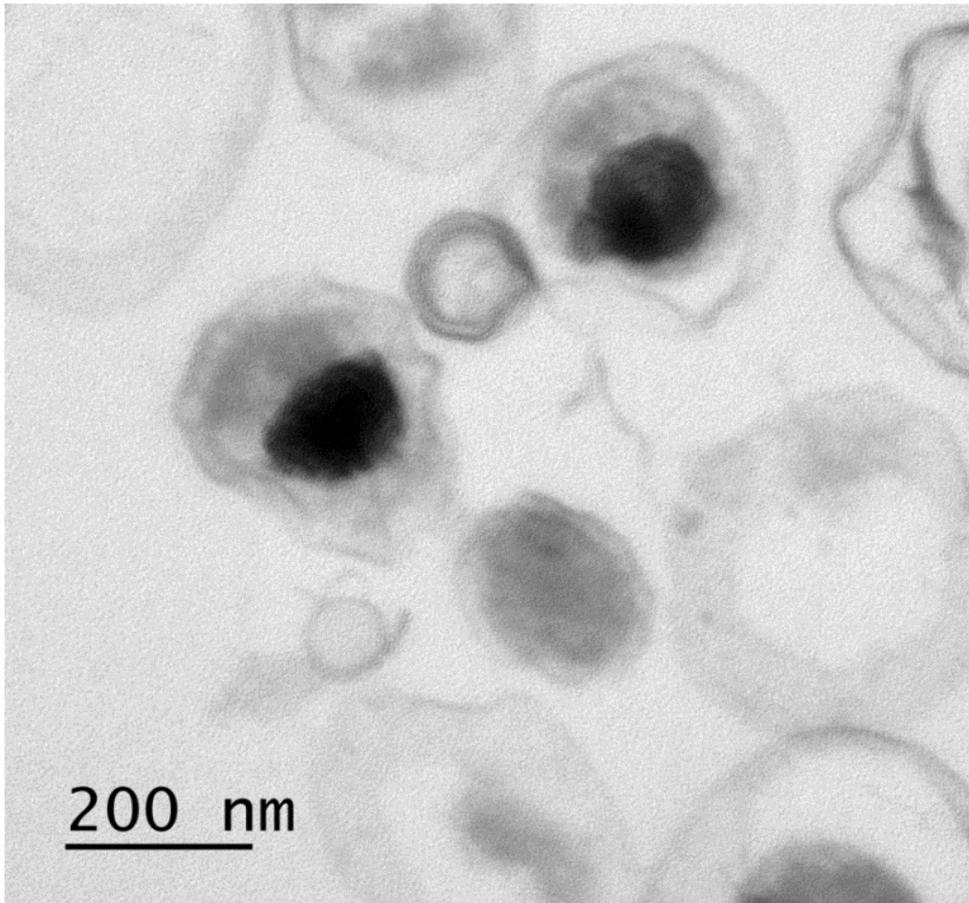
**Fig. 192.** BALOs MuRa1a en su forma típica y en su forma cocoide (rodeado en rojo) al séptimo día de incubación a 30°C. Observado al microscopio electrónico.

IV-4.3.4.2. Sección fina de bdellocofos

Tras la sección ultrafina realizada a muestras de bdellocofos, se observó un desprendimiento de la membrana, además de la ya observada pérdida de flagelo característico de la forma activa de BALOs (Figura 193). Igualmente, se observó una zona intermedia menos teñida y un aspecto compacto en su zona más interior (Figura 194).



**Fig. 193.** Aspecto general de bdellocofos de BALOs MuRa1a. Visualización al microscopio electrónico de una sección ultrafina.



**Fig. 194.** Detalle de la zona compacta interior de bdellocoos de BALOs MuRa1a. Visualización al microscopio electrónico de una sección ultrafina.



# DISCUSIÓN



*Discusión del capítulo I:*

En base a la revisión bibliográfica realizada sobre las bacterias del grupo BALOs, el primer capítulo del presente trabajo constata la existencia de numerosos aspectos que todavía son desconocidos de este grupo bacteriano. En concreto, como muestran los numerosos artículos científicos, se observa como estas bacterias han sufrido numerosos cambios taxonómicos desde de que se definiera el primer *Bdellovibrio* (Stolp & Petzold, 1962) hasta la última clase donde dicho grupo quedó encuadrado: la clase *Oligoflexia* (Hahn et al., 2017). Lo anterior sugiere que ha existido una dificultad notable en realizar una clasificación taxonómica que se adecúe a su variedad genética, de hábitats y de comportamiento que ofrecen las bacterias del grupo BALOs.

La revisión de la literatura científica realizada en este capítulo también muestra como las bacterias del grupo BALO se han convertido en los últimos años en una potencial alternativa contra la resistencia bacteriana a antibióticos, a pesar de que todavía existe un desconocimiento en muchos de sus aspectos básicos incrementado por la amplitud y variedad de este grupo bacteriano. Las principales investigaciones en este campo ponen el foco en entender los procesos por lo que la bacteria se une y depreda a su presa y, más recientemente, en explorar su potencial como agente antimicrobiano.

Por lo tanto y a pesar de las numerosas propiedades potencialmente útiles de estas bacterias, se han observado algunas limitaciones, puntos conflictivos o, simplemente, desconocidos que dificultarían una posible implementación como agente de biocontrol bacteriano:

A mitad de los años 90, se pensaba que las bacterias del grupo BALOs podrían tener un efecto negativo en la microbiota natural del cuerpo (Schoeffield et al., 1996), sin embargo, tras los estudios de Iebba y su equipo bastantes años más tarde, se comprobó que los niños presentan indicios de DNA de bacterias depredadoras en su microbiota intestinal, posiblemente ingeridos accidentalmente, lo cual sugiere que no son dañinos en una microbiota normal (Iebba et al., 2013). Por otro lado, también existen estudios que sugieren que la existencia de bacterias grampositivas en el mismo ambiente donde existen BALOs puede reducir la eficacia depredadora de estos (Kadouri, To, Shanks, & Doi, 2013). Sin embargo, recientemente, se ha mostrado como *B. bacteriovorus* también puede incluso aprovechar algunas especies grampositivas; en ese caso, el comportamiento de *B. bacteriovorus* en presencia de *Staphylococcus aureus* es relevante para su posible uso terapéutico en varias patologías, como la fibrosis quística en la que ambas bacterias coexisten con frecuencia como agentes infecciosos (Iebba et al., 2014; Pantanella et al., 2018). En esta línea, existe un estudio que sugiere que *B. bacteriovorus* HD100 puede salir beneficiado de sus interacciones con biofilms de *S. aureus*, incluido el aumento de sus reservas de ATP y la mejora de sus actividades depredadoras (Im, Dwidar, & Mitchell, 2018).

En definitiva, son numerosos los aspectos básicos de las bacterias del grupo BALOs que todavía resultan desconocidos. Aspectos que, por otro lado, deberán de obtener respuesta si se pretende utilizar a este grupo bacteriano como agente de biocontrol bacteriano.

*Discusión del capítulo II:*

Dada la variedad de comportamientos pobremente definidos, así como el amplio rango de hábitats donde las bacterias del grupo BALOs son capaces de subsistir, en primer lugar, nos propusimos el objetivo de analizar la variedad genética de este grupo bacteriano. Si bien están documentados los cambios que el grupo BALOs ha ido experimentando en su definición, en sus bacterias integrantes y en la clasificación de estas con el paso de los años, no se ha profundizado lo suficiente en lo referente a sus características genéticas, salvo algún artículo que estudiaba la genética implicada en la depredación de las bacterias del grupo BALOs (Pasternak et al., 2013).

En el análisis genético de cepas de BALOs escogidas en base a la importancia que les da literatura especializada (Baer et al., 2000, 2004; Davidov & Jurkevitch, 2004; Koval et al., 2013; Koval et al., 2015; McCauley et al., 2015; Piñeiro et al., 2008), se observó que las cepas del género *Bdellovibrio* analizadas fueron aisladas de ambientes muy diversos, pero aquellas aisladas en un ambiente similar parecían estar cerca en el árbol filogenético resultante. De modo que podría existir relación entre filogenia y hábitats en las bacterias de grupo BALOs incluso dentro del mismo género donde ya se observó que muchas cepas del género *Peredibacter* se desarrollan en agua dulce y en el suelo (Davidov & Jurkevitch, 2004) o cepas el género *Bacteriovorax*, que aun habiéndose localizado en multitud de ambientes (sobre todo en aguas saladas), se ha conformado una división interna para agrupar a aquellas asiladas en ambientes de estuarios (Pineiro et al., 2007).

La relación entre filogenia y hábitat observada en nuestro estudio no es la única relación que se puede establecer con respecto a la filogenia de BALOs; existen estudios que muestran como los distintos taxones que conforman el grupo BALOs parecen estar asociados también dependiendo de su bacteria presa, a pesar de que estos depredadores provengan de hábitat distintos. En experimentos con muestras acuáticas, se demostró que las bacterias del grupo IX del género *Bacteriovorax* son depredadores versátiles, capaces de cazar de manera eficiente varias presas en las que se han especializado otros grupos (Chen, Athar, Zheng, & Williams, 2011). Por otro lado, se descubrió que el grupo IV de éste mismo género, el cual comprende a BALOs aislados principalmente de aguas de baja salinidad, se puede seleccionar mediante la depredación de bacterias presas originadas en agua dulce (Chen, Young, Berhane, & Williams, 2012). Igualmente, la familia *Bdellovibrionaceae* también ha formado grupos separados atendiendo a las bacterias obtenidas de la rizosfera del tomate, de suelos en Israel o de suelos en Alemania e India. Estos diferentes grupos utilizan diversas especies de enterobacterias y pseudomonas como presa (Davidov & Jurkevitch, 2004).

Toda la diversidad observada en la investigación y en los estudios relacionados, va en consonancia con la disparidad de valores obtenidos en la matriz de disimilitud genética realizada con las cepas de BALOs escogidas para el estudio. Esto sugiere que, aunque las cepas elegidas queden encuadradas dentro del grupo BALOs, su heterogeneidad dificultaría el establecer una definición permanente dicho grupo. Por otro lado, la secuenciación de las cepas de BALO MuRa1a y MuRa6a permitió comprobar que MuRa1a corresponde, muy probablemente, a *Bdellovibrio bacteriovorus* y MuRa6a a *Bdellovibrio* sp. De modo que se podría sugerir que se han aislado dos especies distintas del género *Bdellovibrio* procedentes de la E.D.A.R. del Campus de Espinardo, atendiendo a que las dos cepas quedaron filogenéticamente distanciadas entre sí y atendiendo a los criterios en el porcentaje de similitud que la literatura sugiere para su clasificación como especies nuevas (Tindall, Rosselló-Móra, Busse, Ludwig, & Kämpfer, 2010). El hecho de que, presumiblemente, se hayan conseguido aislar dos cepas de dos especies distintas de *Bdellovibrio* en una misma muestra, indica, de nuevo, que existe una gran versatilidad y heterogeneidad del grupo BALO y que cada una de las cepas aisladas podría tener preferencia por bacterias presa específicas.

#### *Discusión del capítulo III:*

Tras constatar la diversidad del grupo BALOs, el siguiente estudio fue realizado con el objetivo de optimizar la técnica de detección de BALOs directamente del medio. Este estudio mostró como, tras emplear un medio alto en nutrientes como el medio NB en el revelado de BALOs y sin una filtración previa de la muestra, toda la carga bacteriana presente en el agua a depurar se vio reflejada en las placas: en esa primera parte del estudio, el agua de muestra no recibió ningún tipo de cribado antes de realización de la detección de BALOs a partir de ella, de modo que en las placas incubadas a las distintas temperaturas se detectó una gran cantidad de colonias bacterianas que no resultaron objeto de estudio y que, seguramente, impidió la correcta proliferación de los BALOs en dichas placas. Seguidamente, se procedió a la detección de BALOs (de una muestra también sin filtrar) en placas compuestas por un medio más diluido (NB-10) y, por lo tanto, más restrictivo en nutrientes que el inicialmente empleado. Se observaron, igualmente, colonias bacterianas procedentes del agua de muestra coexistiendo en placa con regiones líticas propias de bacterias del grupo BALO. Estas regiones líticas resultaron ser muy pequeñas y poco nítidas. Como ocurriera con la detección obtenida en el medio más rico, el hecho de que hubiera una cantidad y variedad bacteriana tan grande en las placas de revelado, debido a no haber realizado filtración alguna del agua de muestra, interfirió presumiblemente en la aparición de cepas de BALOs.

En el mismo estudio, tras realizar una filtración mediante un filtro de 1,2 $\mu$ m a las muestras de agua obtenidas de la fase de pretratamiento de la E.D.A.R., las placas presentaron un aspecto más “limpio” de colonias bacterianas y se pudieron observar zonas de lisis correspondientes a la depredación de la presa por parte de los BALOs presentes, lo que

permitió realizar correctamente los recuentos. No obstante, las placas presentaron aún un aspecto turbio debido a la presencia de aquellas bacterias que pudieron atravesar el tamaño de poro aplicado en esta filtración. Por otro lado, zonas de lisis obtenidas no fueron demasiado grandes ni demasiado nítidas, lo que sugiere que aun existió interacción con las colonias bacterianas que se desarrollaron en las placas. En estas condiciones, ya se comenzó a detectar una mayor cantidad general de BALOs MuRa1 a 30°C, aunque éstos no presentaron ningún patrón de crecimiento. En las muestras incubadas a temperatura ambiente y a 37°C, tampoco existieron diferencias significativas entre las cantidades detectadas cada día.

Tras comprobar que tanto BALOs como presas atravesaron un tamaño de poro de 0,45µm, pero no uno menor, el estudio continuó con la filtración de la muestra por ese filtro de 0,45µm. Con ello, se consiguió retener a la mayor parte de la carga bacteriana presente en el agua (salvo en incubación a 37°C, en la cual se observaron más bacterias en placa que a temperaturas anteriores) y, en todos los casos, se consiguió detectar una mayor cantidad de BALOs y de una forma más nítida. El estudio mostró que tras una filtración de la muestra por tamaño de poro de 0,45µm y una incubación posterior a temperatura ambiente, se detectó una gran cantidad de BALOs cuando fueron empleadas diferentes cepas de *E. coli* en el revelado (denominando a las cepas de BALOs detectadas como MuRa1, MuRa2, MuRa3 y MuRa4) en comparación con los BALOs detectados con el resto de bacterias presa empleadas (cepas MuRa5, MuRa6 y MuRa7).

En ese mismo estudio, mediante la incubación de las placas de revelado a una temperatura superior (30°C), todas las cepas de BALO empleadas en el estudio mostraron una mayor detección, además de seguir existiendo grandes diferencias entre los BALOs obtenidos con *E. coli* como bacteria presa y el resto de bacterias gramnegativas. Además, a esta temperatura, las diferencias entre bacterias del grupo BALOs reveladas con *E. coli* resultaron aún más significativas que las observadas a temperatura ambiente, resultando notoriamente superior, de nuevo, la cantidad de BALOs MuRa1a detectada con respecto a las detectadas con MuRa2a, MuRa3a y MuRa4a. A 30°C, la mayor cantidad de BALOs que pudo ser detectada con cada cepa presa utilizada fue al tercer día de incubación.

Mediante la incubación de las placas de revelado a 37°C, se observó, de nuevo, una mayor cantidad de BALOs MuRa1b, MuRa2b, MuRa3b y MuRa4b que con las otras tres cepas hospedadoras. En cambio, la cantidad general de BALOs detectados fue sensiblemente menor que a las otras dos temperaturas estudiadas y la diferencia entre la cantidad de BALOs detectados por medio del uso de *E. coli* como bacterias presa resultó poco significativa a favor de *E. coli* K-12, a diferencia de lo producido en el resto de temperaturas de incubación efectuadas en el estudio. En esta incubación a 37°C, la mayor cantidad de BALOs no se detectó al tercer día de incubación sino al primero, lo que sugiere que el máximo de BALOs se detecta antes a medida que se aumenta la temperatura de incubación.

En general, en todas las diferentes temperaturas estudiadas, tras efectuar la filtración por 0,45µm de tamaño de poro, se consiguieron placas de revelado muy nítidas y casi

desprovistas de colonias bacterianas no objeto de estudio. Además, la detección de BALOs fue muy variable en función de la cepa sustrato con la que fue revelada, a pesar de ser todas bacterias gramnegativas y, por tanto, susceptibles de ser lisadas. Concretamente, hubo diferencias significativas entre las cantidades de BALOs detectadas usando *E. coli* K-12 (MuRa1) y las detectadas usando las demás cepas de *E. coli*. Estas grandes diferencias en cuanto a la detección de BALOs según su presa (a pesar de, como ya se ha mencionado, ser todas las bacterias presa bacterias gramnegativas) no se especifican en las definiciones generales del grupo bacteriano (Dworkin, Falkow, Rosenberg, Schleifer, & Stackebrandt, 2006; Edouard Jurkevitch, 2006; Rotem et al., 2014). Además, atendiendo a que la cepa de BALOs que lisó *Escherichia coli* K-12 (MuRa1a) y la que lisó *Klebsiella pneumoniae* (MuRa6a) correspondieron a dos cepas distintas, el hecho de que exista tanta diferencia en cuanto a detección de BALOs en función de una u otra cepa presa (espectro de parasitismo), sugiere que podrían tratarse de cepas distintas de BALOs no descritas anteriormente.

Por otro lado, además de las grandes diferencias en la detección de BALOs, también existieron diferencias morfológicas, a nivel macroscópico, de las regiones líticas producidas por BALOs en *E. coli* K-12 y en *K. pneumoniae* sobre todo. Estas regiones líticas difirieron en nitidez, tamaño y morfología según la bacteria que actuara como presa. De igual manera, este estudio ofreció diferencias en su coloración, tras la aplicación de TTC en placas donde estuvieron presentes tanto la bacteria presa (*E. coli* K-12) como MuRa1a. Dichas diferencias sugieren que la actividad respiratoria de *E. coli* K-12 se vio comprometida probablemente por la presión de la bacteria depredadora y por la propia depauperación del medio. La prueba tuvo como fundamento que la actividad metabólica de las bacterias produce una reducción del TTC convirtiéndolo en un precipitado insoluble y coloreado. Atendiendo a lo anterior, en placas donde sólo estuvo presente la bacteria hospedadora, la coloración por TTC fue mucho más acusada, lo que sugiere que el metabolismo bacteriano funcionó a niveles más altos y, por lo tanto, la “disponibilidad” de la bacteria presa empleada en la detección de BALOs directamente del medio, fue menor ante la propia presión bacteriana y la depauperación.

En definitiva, esta serie de sucesivas optimizaciones en el procedimiento de obtención y detección de cepas de BALOs directamente del medio, permitió establecer como “optimo” al método que incluyó una incubación de las placas de revelado a 30°C, durante tres días, con una filtración previa de la muestra por un tamaño de poro de 0,45µm y usando *E. coli* K-12 como hospedador (BALO denominado como MuRa1a). Sin embargo, muchas veces se observaron zonas de lisis muy nítidas durante las primeras horas de incubación que no mostraban BALOs tras su visualización al microscopio óptico. En esos casos se asumió que se trataba de virus bacteriófagos propios el agua cruda de la E.D.A.R., los cuales entorpecieron el recuento, sobre todo al detectar el BALO MuRa3 (usando *E. coli* C como bacteria presa). Por lo tanto, aunque esta optimización pueda ser extrapolada para estimar el grado de presencia de BALOs en el medio, aún resulta difícil una estimación de la cantidad real de dichos BALOs pues, gran parte del ecosistema e interacciones bacterianas existentes resultan, todavía, desconocidas; las

cantidades detectadas fueron obtenidas eliminando o restringiendo unos factores de interacción bacteriana y añadiendo otros a nivel de disponibilidad de nutrientes (Chen et al., 2018; Van Essche et al., 2009), por lo que su extrapolación con lo que sucede en la naturaleza es difícil.

El método para la detección de BALOs directamente de la E.D.A.R. anterior, se vio aún más optimizado con el diseño de un sistema basado en los componentes propios para la medida de la DBO<sub>5</sub> como paso previo a la detección de BALOs. Con esta técnica (denominada AMS) se pudo monitorizar también tanto la carga bacteriana presente en la muestra, como sus parámetros físico-químicos en cada uno de los días de incubación.

Con dicho método, la detección de BALOs MuRa1 a temperatura ambiente tendió a aumentar desde el tiempo 0 hasta el 2º o 3º día de incubación, en el cual alcanzó su máximo. El estudio y el revelado diario con la técnica AMS a temperatura ambiente, mostró que la cantidad de BALOs detectados después de su máximo fue bastante similar, lo que sugiere que los BALOs a esta temperatura no pierden demasiada viabilidad. Los BALOs detectados tras una incubación de 30°C (MuRa1a) presentaron una tendencia y cantidades similares a los de temperatura ambiente, pero con la particularidad de que el máximo se produjo siempre al 3º día de incubación, al igual que en el método anterior basado en la filtración previa y en medio poco ricos en nutrientes. Las cantidades detectadas después de su máximo, sí que resultaron ser sensiblemente inferiores a 30°C.

A 37°C, los BALOs MuRa1 (MuRa1b) fueron detectados en menor medida que en las dos temperaturas anteriores y su máximo se detectó, claramente, durante el primer día de incubación antes de presentar el descenso poblacional más acusado observado en el estudio. Esto sugiere, igual que en la metodología anterior, que el aumento en la temperatura de incubación provocaría que la actividad de la cepa de BALO se viera incrementada y acabara lisando antes, reproduciéndose antes y, en consecuencia, perdiendo antes su viabilidad. Por otro lado, comparativamente, en sus días de máxima detección con la técnica AMS, las cantidades de BALOs detectadas a temperatura ambiente y a 30°C fueron significativamente superiores a las obtenidas a 37°C. Como se puede observar, el factor de la temperatura resulta importante en la dinámica poblacional de BALOs, y, según otras investigaciones, el responsable de la variación en la comunidad bacteriana de aguas superficiales (Aguirre et al., 2017).

Igualmente, en el estudio existió una gran abundancia de enterobacterias en el agua cruda de donde se detectaban BALOs a pesar de ser bacterias susceptibles de ser depredadas por BALOs, tal y como muestran numerosas definiciones del grupo bacteriano (Rosenberg et al., 2013). Los recuentos de enterobacterias llevados a cabo en el agua de muestra donde se fuera a producir el revelado de BALOs a diferentes temperaturas, mostraron un aumento paulatino a la vez que se produjeron menores detecciones de BALOs. Estos resultados sugieren que las enterobacterias son objeto de depredación de BALOs hasta que éstos muestran una presencia menor (o resistencia) con el paso de los días y permiten aumentar de nuevo la cantidad de enterobacterias (modelo depredador-presa). Además, aun no resultando ser significativa la diferencia de enterobacterias

detectadas entre cada temperatura estudiada, sí que lo fue la diferencia detectada entre el primer día de incubación y el último, lo que indica una proliferación de enterobacterias cuando la presión depredadora fue menor.

En relación a ese mismo estudio, las mediciones de los parámetros físico-químicos del agua de muestra pusieron de manifiesto la capacidad de amortiguación de la misma. Los valores de pH se mantuvieron entre un margen similar en cada uno de los días de incubación y para cada una de las temperaturas estudiadas; solo a temperatura ambiente se observó un ligero descenso continuado. Los valores de conductividad a 25°C obtenidos, fueron siempre más bajos a 37°C que a 30°C y a temperatura ambiente. De igual manera, estos valores tampoco variaron demasiado con el tiempo. El oxígeno disuelto también se mantuvo relativamente bajo debido a su gran carga bacteriana, pero, en los siguientes días, siempre se fueron obteniendo valores más altos, lo que sugiere que esa carga bacteriana se vio reducida con el paso del tiempo. El potencial red-ox resultó ser bastante variable en cualquiera de las tres temperaturas propuestas. No obstante, se observó una tendencia a valores más altos en los primeros días coincidiendo con los máximos de BALOs obtenidos. Al tercer día, los valores se fueron asemejando en las tres temperaturas objeto de estudio. Por último, la medida de la DBO<sub>5</sub> mostró unos valores más altos día a día, lo que sugiere un sucesivo aumento en la cantidad de bacterias (y, por consiguiente, de presas), no concordando con la mayor cantidad de oxígeno disuelto observado. Al tercer día de incubación, los valores obtenidos de DBO<sub>5</sub> fueron similares en las tres temperaturas estudiadas.

En definitiva, la técnica AMS resultó apta para la monitorización de diversos parámetros físico-químicos del agua además resultar efectiva para la detección de BALOs directamente del medio. Además, utilizando la técnica AMS, se pudieron detectar BALOs en ambientes donde no habían sido estudiados: tras la depauperación de matraces a 37°C, se consiguió obtener un lisado activo pasados dos meses a pesar de que existen investigaciones que indican la pérdida de viabilidad con un tiempo menor (Aliza Dashiff, Keeling, & Kadouri, 2011). Asimismo, también se produjo la detección de BALOs MuRa1 a 40°C con esta misma técnica, temperatura que resulta alejada de los procedimientos habituales de detección de este tipo de microorganismos y que pone de manifiesto la versatilidad de este grupo bacteriano, el cual se ha localizado recientemente incluso en ambientes acuáticos alpinos (Paix et al., 2019). Además, tras el aislamiento a 40°C, se consiguió aislar un tipo de BALO, al menos, distinto en tamaño y con una velocidad menor al BALO “típico”.

En las comparaciones entre la cantidad detectada de BALOs MuRa1 utilizando solo la metodología de una filtración previa y la detectada añadiéndole la técnica AMS, se observó cómo, con esta última metodología, la cantidad de BALOs MuRa1 detectada fue sustancialmente mayor en cada una de las temperaturas del estudio. Además, el hecho de que, a todas las temperaturas estudiadas, se obtuvieran más BALOs tras la incubación que a tiempo 0 sugiere que la técnica AMS induce a la multiplicación de este grupo bacteriano. Sin embargo, también se pudieron observar agrupaciones de *E. coli* K-12 que no fueron lisadas por BALOs en placas donde hubo una lisis generalizada de la misma,

lo que sugiere que esta presa puede establecer algún tipo de resistencia a la depredación que le permita no ser depredada, lo cual iría en consonancia con el aumento de enterobacterias observado en la muestra. Por otro lado, la técnica AMS usada en aguas residuales permitió un autoenriquecimiento de la muestra, pues no necesitó aporte externo de nutrientes ni de presas. Este aspecto de la técnica AMS podría permitir una mejor estimación de BALOs en la naturaleza pues la manipulación de la muestra con esta técnica es menor que en otras. De igual forma, tanto las nuevas temperaturas de aislamiento de BALOs, como las diferencias en su detección utilizando una presa u otra observadas, sugiere la existencia de una diversidad en el grupo BALOs mayor que la descrita hasta la fecha, lo que es básico para conocer aspectos de la biología y ecología del grupo con el fin de su uso aplicado en el control microbiano (Patini et al., 2019). En definitiva, a pesar que la técnica AMS puede actuar como un método directo de monitorización y detección de BALOs, todavía resulta difícil una interpretación adecuada de dichos parámetros en conjunto, pues todavía no existe suficiente conocimiento sobre qué microorganismos, comunidades bacterianas, qué relaciones y qué factores físico-químicos o de otra índole intervienen *in vivo* en una muestra de agua de estas características.

Si bien el estudio anterior tuvo como objeto optimizar la detección de BALOs en la naturaleza, el siguiente estudio se basó en desarrollar una técnica para la reactivación de las cepas de BALOs MuRa1, MuRa5 y MuRa6 desde la ultracongelación, al no existir especificaciones a tal efecto (Rotem et al., 2014) y, en muchos casos, haber optado por la liofilización (Boileau, Mani, & Clinkenbeard, 2017). Dicho estudio comenzó con buscar la reactivación tanto en medio líquido como en placa de las cepas de BALOs previamente aisladas, vertiendo para ello el contenido del criovial directamente en el medio líquido y procediendo a detectar BALOs en placa a partir de este. Con este procedimiento, sólo se consiguió una reactivación efectiva de BALOs en placa, no en el medio líquido que le precedía. En dichas placas se observaron zonas de lisis muy difusas y pequeñas, las cuales dejaron de crecer muy pronto; esto sugiere que las condiciones de reactivación no fueron las idóneas para una correcta proliferación de BALOs. De igual forma, no se encontraron diferencias significativas entre las cantidades de BALOs MuRa1, MuRa5 y MuRa6 detectadas, pero sí que se observó, una menor detección de BALOs obtenidos a temperatura ambiente. Estas detecciones de BALOs en placa se vieron incrementadas tras la adición de extracto de levadura al cultivo líquido antes de proceder a dicha detección en placa, pero, en cualquier caso, este incremento no fue significativo. Por lo tanto, lo más destacable de esta parte del estudio fue la imposibilidad de detectar BALOs directamente en medio líquido, consiguiendo solamente detectar (débilmente) BALOs en placas a partir de éste. Esto sugiere que la no activación en medio líquido de BALOs previamente ultracongelados no afecta críticamente a su viabilidad.

Para averiguar la causa de la no reactivación en medio líquido de BALOs ultracongelados, se pretendió comprobar si las cepas hospedadoras eran capaces de utilizar el glicerol, usado como anticongelante en el proceso de ultracongelación, como fuente de carbono, es decir, si era apto para su crecimiento. De modo que, tras el estudio de las diferentes

bacterias presa (*E. coli* K-12, *K. pneumoniae* AA100 & *S. typhimurium* LT2) en medios de cultivo con y sin fuente de carbono, se observó que los medios a los que se le adicionó glucosa presentaron proliferación de presas desde el primer día; en cambio, en cultivos con la adición de glicerol, el crecimiento se retrasó al segundo día de incubación. Lo anterior sugiere que el glicerol, aunque un día más tarde que la glucosa, es utilizado finalmente como fuente de carbono para el crecimiento, del que se está estudiando el mecanismo de captura por parte de las bacterias (Matassa, Verstraete, Pikaar, & Boon, 2016). Por lo tanto, la no presencia de lisis de BALOs en medio líquido tampoco se debió a la falta de bacterias presa.

Tras comprobar que la célula hospedadora puede asimilar el glicerol, se estudió a las cepas de BALOs MuRa1a, MuRa5a y MuRa6a en medio líquido y en concentraciones decrecientes de glicerol. En absolutamente todos los casos, en los medios con una concentración de glicerol superior al 20% no observó presencia bacteriana de ningún tipo, lo que sugiere que, a partir de esta concentración, el medio resultaría tóxico tanto para la cepa hospedadora como para la cepa de BALO. A una concentración del 10%, 5% y 1% de glicerol, la turbidez se mantuvo alta debido a que a estas concentraciones sí que se observó la proliferación de células hospedadoras, pero no de BALOs. En cambio, en medio líquido con menores concentraciones de glicerol, que fueron desde el 0,5% al 0,001%, se logró obtener lisis en líquido de cada una de las cepas de BALOs estudiadas. Aun así, la lisis de BALOs tuvo lugar un día más tarde en caldos de cultivo con una concentración cercana al 0,5% que cuando la concentración fue del 0,1% y 0,05% (ocurriendo al 3<sup>er</sup> día de incubación, considerado como estándar para el crecimiento de BALOs, atendiendo a los estudios metodológicos anteriores) y éstos a su vez, proliferaron un día más tarde que a 0,01% y 0,001% coincidiendo con el retraso que se observó en la utilización del glicerol por parte de la cepa hospedadora. Los resultados anteriores sugieren que el que no se pudieran recuperar BALOs en medio líquido inicialmente se debió a que, desde el criovial, el sistema depredador-presa quedó diluido hasta una concentración final de 1% de glicerol, siendo ésta insuficiente (como se comprobó posteriormente) para la reactivación efectiva de las cepas de BALOs. En cambio, al obtener una alícuota de este matraz al 1% y proceder a su detección en placa, el glicerol volvió a ser diluido, alcanzando una concentración del 0,1%, concentración a la cual se corroboró que MuRa1a, MuRa5a y MuRa6a fue capaz de reactivarse. Aun así también se observó cómo, en medio líquido y a concentraciones altas de glicerol, la cepa de BALO sobrevive permitiendo su detección en placa, lo que vuelve a demostrar la gran resiliencia de este grupo bacteriano ante condiciones adversas, considerándolos, recientemente, incluso como predictores de diversidad microbiana (Johnke et al., 2019). En cambio, a concentraciones de glicerol de 0,6% (concentración inmediatamente superior a la que se ha establecido como “crítica” para la reactivación efectiva), ni la cepa MuRa1a, ni la MuRa5a y ni la MuRa6a se reactivaron ni habiendo estado ultracongeladas en fase de ataque, ni en fase de bdelloplasto y ni tras administrarle proteasa peptona como “catalizador”. De modo que, a medida que la concentración de glicerol es mayor, la reactivación de BALOs se retrasa un día hasta llegar al 0,6%, concentración a la cual no llega a ser efectiva.

Este proceso de reactivación de BALOs se pudo optimizar comparando la capacidad de recuperación de BALOs ultracongelados en fase de ataque con los ultracongelados en fase de bdelloplasto: a concentraciones de glicerol de 0,5% hasta el 0,001%, se observó que, en el caso de la cepa de BALO ultracongelada previamente en fase de bdelloplasto, la reactivación siempre tuvo lugar un día más tarde que los mantenidos en fase de ataque a la misma concentración. Esto sugiere que el bdelloplasto podría actuar como estructura de preservación ante la toxicidad potencial del glicerol, al igual que se mostró que lo hace bajo condiciones de nutrientes adversas (Sanchez-Amat & Torrella, 1990). Además, en la reactivación de BALOs ultracongelados en fase de bdelloplasto se observaron diferencias significativas con respecto a aquellos previamente ultracongelados en fase de ataque. Por lo que la metodología más efectiva para la reactivación de BALOs desde una ultracongelación a largo plazo resultó aquella que reactivó BALOs ultracongelados en fase de bdelloplasto llevándolos a una concentración final de glicerol menor de 0,5%. Por último, tras realizar un estudio comparativo de la cantidad de BALOs detectados tanto en viales que permanecieron unos días en ultracongelación como los que estuvieron durante meses, se observó que, a medida que el tiempo previo de ultracongelación fue más largo, la diferencia en la detección entre BALOs ultracongelados en fase de ataque y las de bdelloplasto fue mayor en favor de ésta última, lo que aporta solidez al hecho de que el bdelloplasto pueda servir de protección.

#### *Discusión del capítulo IV:*

Tras haber realizado los estudios metodológicos de detección de BALOs directamente del medio y de reactivación tras ultracongelación, el siguiente capítulo de esta investigación abordó cuestiones ecológicas relacionadas con este grupo bacteriano.

En cuanto al estudio con objeto de determinar la Capacidad Depredadora Relativa (CDR) según su presa de origen de las cepas de BALO-K-12 y de BALO-K en diferentes medios, se encontró que su detección siempre ofreció ratios más altos cuando éstas fueron cultivadas en medio NB-10 que cultivadas en medio WWM. Esta mayor detección ocurrió independientemente de que dichas cepas de BALOs fueran detectadas tras lisis a su misma bacteria presa de origen (presa homóloga) o a una presa distinta (presa heteróloga). A esta mayor detección en el medio NB-10 se sumó el hecho de que las poblaciones de bacterias presa experimentaron un crecimiento en ese medio cuando no hubo presencia de bacteria depredadora alguna, mientras que, en medio WWM, la población de presas se mantuvo constante. Esto podría reforzar la hipótesis de que el medio NB-10, aun estando diluido, podría poseer una mayor riqueza de nutrientes que el medio WWM, lo cual habría provocado una menor proliferación de bacterias presa y, por consiguiente, de BALOs. A pesar de esto, tanto en un medio como en otro, se observó la misma tendencia: las cepas de BALO-K12 y de BALO-K que proliferaron como resultado de una lisis a su presa homóloga, fueron detectadas en mayor cantidad que cuando la proliferación se dio tras la lisis de su presa heteróloga. Esto sugiere que podría existir una especificidad bacteriana

muy concreta (además de la especificidad en las diferentes presas ya mostrada en estudios anteriores) de las bacterias de grupo BALOs en función de qué bacteria les haya servido de presa anteriormente.

La observación anterior se vio reforzada tras agrupar los datos en función de las detecciones de las cepas BALO-K12 y BALO-K de manera independiente, donde se observó que, aun estando disponibles las dos bacterias presa en el mismo medio (formando un sistema trimembre), la bacteria presa que actuara como homóloga de la cepa de BALO en cuestión fue lisada en mayor medida, fruto de la especificidad adquirida por el BALO. A pesar de esta especificidad, se observó, igualmente, como la cepa BALO-K12 lisó más tanto a su bacteria homóloga como a su heteróloga de lo que lo hizo la cepa BALO-K. Esto podría indicar que, aun existiendo una gran especificidad por parte de ambas cepas de BALOs a la hora de depredar, un BALO que haya proliferado desde *E. coli* K-12 tiende a realizar una depredación más efectiva con cualquier otro tipo de presa.

En paralelo con el estudio anterior, se realizó, de igual forma, el estudio de comparación de la cepa BALO-K12 con la cepa BALO-S y bajo los mismos parámetros descritos para el anterior estudio. En este caso se observó que, al igual que ocurrió en el ensayo paralelo, la cantidad de cualquier cepa de BALOs detectada en medio NB-10 fue mayor que la detectada en WWM. Igualmente, la cepa BALO-K12 y la cepa BALO-S proliferaron en mayor cantidad cuando la presa a lisar fue su homóloga. Además, los datos obtenidos de la detección, de forma independiente, del BALO-K12 y BALO-S permitieron observar, de nuevo, la especificidad en la depredación de sus bacterias homólogas. Concretamente, dicha especificidad se puso de manifiesto en los análisis realizados en sistemas trimembres en los que también se observó un “descenso” más acusado la presa correspondiente ante la acción del BALO homólogo. Por otro lado, y como sucediera con la anterior pareja de cepas de BALOs del otro estudio, se encontró que la cepa de BALO-K12 ofreció una mayor CDR, tanto a su presa homóloga como a la heteróloga, que la ofrecida por la cepa BALO-S. Además, también se observó que el BALO-S proliferó en menor número que lo hicieron, en cualquier medio estudiado, tanto el BALO-K12 como el BALO-K, lo que pondría de manifiesto que la virulencia de esta cepa podría ser menor que la de las otras dos.

Por otro lado, tras el estudio realizado usando un medio más diluido (NB-50) y el medio WWM, cuando las diferentes cepas de BALOs estudiadas aquí (BALO-K12 y BALO-K, BALO-S y BALO-P) fueron detectadas en medio NB-50, la CDR siempre resultó menor que la obtenida en medio WWM (y ésta ya había resultado menor que la CDR en medio NB-10). En el medio NB-50, las cepas de BALO-K12 y BALO-K fueron detectadas en mayores cantidades que BALO-S y BALO-P aun depredando todas a sus bacterias homólogas. Esto parece ir en la línea de que la bacteria de origen es determinante a la hora de analizar la CDR de una cepa de BALOs. Aun así y como se ha mencionado, en medio NB-50, la CDR de las distintas cepas de BALOs fueron sensiblemente menores a la CDR observada en el medio WWM. En medio NB-50, las bacterias presa mostraron, al primer día, un descenso en su población, posiblemente como resultado de una adaptación a condiciones menos propicias para su proliferación, antes de estabilizarse.

Estos mismos ensayos permitieron el estudio de la población y crecimiento de las diversas bacterias presa en medio WWM. Al ser este un medio con una base de componentes naturales, el comportamiento de estas bacterias podría ser extrapolado más fácilmente a lo que ocurriera, de forma libre, en la naturaleza. De modo que el descenso sufrido por las bacterias presa en el medio WWM al primer día resultó mucho más acusado que el sufrido en medio NB-50, por lo que la adaptación a este medio también pudo tener influencia en la proliferación de bacterias presa. A partir de ese primer día de incubación, las poblaciones bacterianas se mantuvieron o incluso aumentaron levemente, salvo el caso de *E. coli* K-12 la cual mostró un aumento significativo. Esto sugiere que la mayor capacidad de proliferación de *E. coli* K-12 y, en menor medida de *Klebsiella pneumoniae* AA100 en medios pobres en nutrientes, podría ser una de las causas por las que se detectaran una mayor cantidad de BALO-K12 y BALO-K que de BALO-S. Además, se detectaron más BALOs en medio WWM que en NB-50 aun existiendo una cantidad similar de presas disponibles en ambos medios. Esto sugiere que podría existir algún elemento o factor en el medio WWM que provoque que, a partir de un número de bacterias presa, la multiplicidad de BALOs sea mayor. Esto se pone de manifiesto al tercer día de incubación, en el cual la diferencia en la CDR de las cepas BALO-S y BALO-P con respecto a las cepas BALO-K12 y BALO-K observada tanto en medio NB-50 como en medio WWM fue menor. Igualmente, centrándose en el tercer día de incubación (día en la que su proliferación fue máxima), se observó como la detección de BALOs fue significativamente mayor en el medio WWM que en NB-50 para todos y cada uno de los casos.

Además de estudiar la capacidad depredadora de este grupo bacteriano, se realizaron investigaciones para conocer más sobre la ecología de BALOs en distintos hábitats. Por lo tanto, ese estudio se realizó en las distintas fases de depuración del E.D.A.R. del Campus de Espinardo (Murcia) que ofrecen diferentes biotopos. Este estudio mostró que, en las fases iniciales de depuración, el agua presentó una muy baja cantidad de oxígeno disuelto, por lo que se pueden considerar aguas casi anóxicas. Esto se observó en la fase de pretratamiento (agua cruda) y en la fase I (agua con carácter sulfhídrico) de la depuración, ya efectuada por medio de lechos de percolación. Dichos bajos valores de oxígeno disuelto obtenido sugieren que, debido a la gran carga bacteriana que todavía presenta esa agua en esas fases de depuración, el poco oxígeno disponible es consumido rápidamente por los microorganismos existentes. Al igual que en experimentos anteriores, el escaso oxígeno disuelto puede guardar relación con la acidificación del agua observada a lo largo del proceso de depuración, la cual puede ser debida a los productos resultantes de la fermentación de la glucosa principalmente, como son el ácido láctico ( $C_3H_6O_3$ ), el ácido acético ( $CH_3COOH$ ) y otros gases como el dióxido de carbono ( $CO_2$ ). Además, el  $CO_2$  también contribuye a la acidificación de esas aguas debido su paso a ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ) y luego a ion bicarbonato ( $HCO_3^-$ ). Según la literatura existente, estos ambientes (aguas sulfhídricas, casi anóxicas y ricas en nutrientes), no son los mejores para la detección de BALOs (Johnke, Boenigk, Harms, & Chatzinotas, 2017). De modo que el hecho de poder detectar y aislar BALOs de este tipo de muestras sugiere que puede tratarse de diversidad de BALOs, como también se ha

demostrado con la diferenciación de dos cepas distintas de BALOs por medio de la secuenciación genética y de su especificidad de presa.

Tras permanecer básica en la fase de pretratamiento (fase anaerobia), lo que puede ser resultado del efecto de la respiración bacteriana junto con los excedentes propios de la fermentación, en las fases más avanzadas de depuración, el pH de estas aguas se fue acidificando. Dicha acidificación del pH observada sugiere que, además de la presencia de productos de fermentación bacteriana mencionados anteriormente, el proceso de nitrificación del agua también juega un papel relevante: el agua a depurar contiene amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) en sus fases iniciales, la cual las bacterias van nitrificando. En la nitrificación, el amonio es convertido primero en nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) y éste, a su vez, en nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), mediante la acción de bacterias nitrificantes. Este proceso es estrictamente aeróbico y, además, el ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) resultante va acidificando el agua, aunque no debería de ser una acidificación muy acusada, pues el ácido nítrico estaría muy diluido. Aun así, podría situarse como una de las posibles causas para que, a pesar de que en esas aguas también estén presentes bicarbonatos que alcalinizan el agua, ésta permaneciera establemente ácida. A medida que el agua se encontró más depurada en las fases II, III y IV de los lechos de percolación, esta presentó una turbidez drásticamente menor, además de una cantidad de oxígeno disuelto mayor al ir eliminándose parte de la carga bacteriana. Por otro lado, las medidas de conductividad a 25°C resultaron mayores al principio debido a una mayor presencia de minerales en el agua. Antes de experimentar un descenso leve.

En cuanto a la cantidad de BALOs detectados en las distintas fases de depuración de la E.D.A.R., en fases tempranas de depuración se detectaron y aislaron (para todos los estudios de esta investigación) BALOs usando distintas cepas hospedadoras, a pesar de ser biotopos, en teoría, desfavorables para la proliferación de estas bacterias depredadoras (Williams, Turng, & Kelley, 2009). Este estudio mostró que, en términos generales, las diferencias de BALOs detectados utilizando *E. coli* K-12, *E. coli* 101 o *E. coli* Q-13 fue muy poco significativa (en consonancia con lo observado en anteriores estudios centrados en el espectro de parasitismo de BALOs) salvo en el caso de *E. coli* C, que, debido a la gran cantidad de virus observados al revelar en placa, fue muy difícil el contabilizar calvas de BALOs de manera fiable.

Como se ha comentado, en la Fase I de depuración, las cantidades de BALOs detectadas fueron muy similares entre sí, pero menores en general a las detectadas en la fase de pretratamiento. En fases más avanzadas de la depuración del agua, a pesar de existir, en teoría, las mejores condiciones para el desarrollo de BALOs (Rotem et al., 2014), fueron aquellas en las que se detectó una menor cantidad de BALOs: en el segundo circuito de depuración del agua en los lechos de percolación (fase II), ya se comenzó a observar cantidades menores de BALOs revelados con cualquiera de sus cepas hospedadoras, tendencia que se acentuó en la última fase del circuito de depuración de la E.D.A.R. Esto sugiere que la posible implicación de los BALOs en la depuración del agua podría tener lugar a la inversa: en lugar de considerar que el agua en fases de depuración más avanzadas podría presentar más BALOs, debido a que estos podrían haber depredado más

presa en anteriores estadios de depuración y a que las condiciones de esos biotopos serían más aptas, dichos BALOs podrían estar proliferando mayoritariamente en las primeras fases, donde habría mucha más cantidad de presas a pesar de existir peores condiciones ambientales para la supervivencia. Esta mayor depredación bacteriana al principio del ciclo de depuración podría contribuir, como se ha mencionado, a la depuración del agua en fases posteriores así como contribuir a una mayor diversidad bacteriana como indica un reciente estudio realizado en cultivos de arroz (Qian et al., 2020).

Todo lo observado en este estudio podría indicar que tendría más importancia para la supervivencia de los BALOs la presencia o no de presas que la “idoneidad” de las condiciones físico-químicas del medio donde se encuentren, existiendo estudios recientes que apuntarían en la misma dirección (Karakoç et al., 2018). La prevalencia de presas aptas en favor de la existencia de unas buenas condiciones naturales iría en consonancia con lo observado en los experimentos, discutidos anteriormente, de la Capacidad Depredadora Relativa (CDR), donde una mayor presencia de presas disponible, provocó una mayor detección de BALOs, independientemente de la riqueza del medio. Además, estos resultados muestran, de nuevo, la versatilidad de este tipo de bacterias pues siempre han sido descritas como aerobias (Chanyi, Ward, Pechey, & Koval, 2013) y se ha observado cómo, en circunstancias mucho más cercanas a la anoxia, fueron capaces de proliferar en mayor número. Esta tendencia observada a lo largo de varios experimentos de este trabajo puede resultar crucial a la hora de un presumible uso de BALOs como agentes de control bacteriano, aumentando las posibilidades de poder utilizarlos en ambientes difíciles. Este uso de BALOs como agentes de eliminación bacteriana en aguas residuales ya está siendo utilizado conjuntamente con bacteriófagos cuya acción dual permitió erradicar a *E. coli* de dichas aguas (Hobley et al., 2020).

Por último, en este estudio también se observó una cantidad significativa de virus bacteriófagos detectados en las distintas etapas de depuración del E.D.A.R. cuando la bacteria presa utilizada fue *E. coli* K-12 y *E. coli* 101. Mediante el uso de estas presas en el revelado, se observaron virus en cada una de las fases de depuración cuya cantidad descendió ligeramente conforme el agua estuvo más depurada. Lo más destacado fue la ausencia total de virus en placa al utilizar como cepa hospedadora a *E. coli* Q-13. Esto se observó en todas y cada una de las fases en las que fueron detectados BALOs por lo que sugiere que, a nivel metodológico, este aspecto puede resultar una vía para detectar este tipo de bacterias directamente en estos biotopos sin que la acción de los virus suponga impedimento en su posterior recuento. En cuanto a la detección de BALOs, empleando *E. coli* C y, como se ha mencionado anteriormente, metodológicamente sería la bacteria menos indicada debido a la gran cantidad de virus detectados en placa en el revelado.

En cualquier estudio de este trabajo donde se precisara el aislamiento de BALOs de agua dulce e incubación a temperatura ambiente, 30°C y 37°C durante, al menos, 8 días, se produjo la aparición de células cocoides de pequeño tamaño, que fueron denominadas como “bdellocochos”, donde antes había BALOs en forma infectiva. La formación de bdellocochos tuvo lugar en todas las cepas de BALOs empleadas en los estudios: MuRa1, MuRa2, MuRa3 y MuRa4. MuRa5, MuRa6 y MuRa7, lo cual sugiere

que estas formas podría ser consecuencia de una respuesta a la depauperación del medio o a la ausencia de presas aptas para su lisis (posiblemente debida también a la depauperación del medio). En estos casos, los experimentos para la determinación del pH en cultivos bimembres depauperados tanto en medio líquido como en medio sólido mostraron una alcalinización desde el primer día de incubación. Debido a que en aguas crudas (de donde se extrae la muestra) se obtuvieron valores de pH similares, sugiere que la variación de pH indicada no resultaría suficiente para influir en la aparición de las formas cocoides. Si bien se conocen formas de latencia o persistencia de BALOs marinos (Sanchez-Amat & Torrella, 1990), estas formas cocoides no han sido descritas anteriormente en BALOs de agua dulce, lo cual constituye otra muestra más de la versatilidad de este grupo bacteriano (Kandel, Pasternak, van Rijn, Nahum, & Jurkevitch, 2014; Pérez, Moraleda-Muñoz, Marcos-Torres, & Muñoz-Dorado, 2016).

Estas formas cocoides consiguieron ser visualizadas tanto al microscopio de contraste de fase, como en el de epifluorescencia y el microscopio confocal. Para ello, tras realizar una tinción que se adhiere a material genético como es el DAPI y el naranja de acridina y comprobar que, efectivamente, esta tinción tuvo lugar, se puede sugerir que los BALOs aún presentan material genético cuando adquieren esas hipotéticas formas de persistencia. Las dos tinciones empleadas resaltaron perfectamente la estructura tanto de BALOs infectivos como de los bdellocochos derivados de ellos; de modo que el DAPI, que es un marcador fluorescente que se une fuertemente a regiones enriquecidas en adenina y timina, y el naranja de acridina que tiñe de verde a las células en fase de división activa (con una fuerte presencia DNA) y de naranja a aquellas que se encuentren en reposo multiplicativo (con una presencia mayoritaria de RNA y proteínas), fueron visualizados perfectamente al microscopio. Además, tras el estudio con microscopía electrónica se observó que el tamaño de estas formas cocoides de BALOs era más pequeño que el BALO en su forma infectiva y que estaban desprovistas del flagelo propio de la fase de ataque, lo cual impide su desplazamiento activo en busca de presa tanto de forma libre en el medio acuático (Sockett, 2009; Strauch, Schwudke, & Linscheid, 2007) como en ambientes de biofilms (Medina et al., 2008). Debido a su pequeño tamaño, no se consiguió obtener eficientemente estos bdellocochos de manera exclusiva, pues no hubo filtro capaz de retener eficientemente a los bdellocochos y que, a la vez, las formas infectivas (más grandes) pudieran atravesarlo. Tampoco fue viable la opción contraria: retener a las formas grandes y dejar pasar a las pequeñas, para poder tener, igualmente, la certeza de estar tratando solamente con esas formas cocoides. Además de lo anterior, el hecho de que en las imágenes obtenidas de sección ultrafina se distinguieran una zona compacta y un desprendimiento de membrana, podría sugerir, en contraposición a lo observado en las tinciones, que la bacteria no es viable y que podría no tener lugar una reversión a una cepa de BALOs funcional como sucede con otras bacterias (Oliver, 2005).

En definitiva, aspectos como la presencia de material genético, permiten suponer que estas formas cocoides corresponden a un estado latente de *Bdellovibrio*, constituyendo una gran muestra de adaptabilidad al medio. Por otro lado, existen otros indicios como que no se consiguieran revertir estas formas a un estado “activo” y el desprendimiento de

membrana, que indicarían que los bdellocochos observados no son viables. Lo que parece cierto es que, si se pretende emplear bacterias predadoras del grupo BALOs como herramienta de control de la población de bacterias patógenas, la aparición de un estado latente o estacionario en su ciclo de vida sería determinante a la hora de plantearse su uso para tales fines. Lo cual necesita, indudablemente, de investigaciones en ese ámbito (Brüssow, 2017; Martínez, Herencias, Jurkevitch, & Prieto, 2016; Silva et al., 2019; Sun et al., 2017).

# **CONCLUSIONES**



De la interpretación de los resultados obtenidos sobre las bacterias del grupo BALO, se puede concluir que:

- ▣ El grupo BALOs constituye un grupo muy diverso desde el punto de vista filogenético, pues la cepa MuRa1a, tras haber sido secuenciada, queda situada más cerca de cepas definidas como *Bdellovibrio bacteriovorus* y relativamente lejos de MuRa6a, que se posiciona cerca de cepas de BALOs como *Bdellovibrio exovorus*.
- ▣ Se ha detectado una mayor cantidad de BALOs directamente de distintos puntos de muestreo de la E.D.A.R. empleando *Escherichia coli* K-12 como bacteria presa respecto a los recuentos obtenidos con otras enterobacteriáceas e incubando a 30°C, tras una filtración de la muestra por 0,45µm.
- ▣ En temperaturas de hasta 30°C, el método basado en el autoenriquecimiento de la muestra (AMS), da lugar a una mayor detección de BALOs, permitiendo tanto la monitorización de parámetros físico-químicos de la muestra, como la aparición de una cepa de BALOs morfológicamente distinta a lo anteriormente descrito.
- ▣ A diferencia de lo que se puede leer en la literatura clásica sobre el tema, los BALOs pueden ser conservados por congelación a entre -70°C y -75°C con glicerol. Sin embargo, la recuperación de BALOs de lisados conservados con glicerol al 20% precisa, como mínimo, diluir 1/40 (< 0,5%) de glicerol.
- ▣ Se propone como una alternativa a la liofilización para la conservación fiable de BALOs la ultracongelación (-70 a -80°C) de los lisados cuando en el cultivo bimembre domina la fase celular de bdelloplasto. La recuperación inmediatamente después de la descongelación, se obtiene diluyendo en NB-10 hasta una concentración final de glicerol no superior 0,1% seguida de 3 días o más de incubación a 30°C.
- ▣ *E. coli* K-12, *K. pneumoniae* AA100 y *S. typhimurium* LT2 hacen uso del glicerol como fuente de carbono un día más tarde que desde la glucosa, lo cual afecta a la reactivación de BALOs tras ultracongelación.
- ▣ Los BALOs lisan de manera más eficaz (mayor porcentaje de recuperación de calvas en los recuentos con la doble capa de agar) una determinada presa si ésta coincide con la presa con la que se obtuvo el lisado de procedencia, siendo la cepa de BALO que procede de *E. coli* K-12 la más eficiente.
- ▣ El medio WWM (Wastewater Medium) utilizado en este trabajo permite una mayor capacidad depredadora de BALOs con respecto a la mostrada en medios de cultivo complejos.

- ▣ En muestras de distintos puntos de la E.D.A.R del Campus de Espinardo (Murcia), se detectan BALOs y virus bacteriófagos en sus diferentes biotopos usando cepas distintas de *E. coli*, salvo al usar como presa a *E. coli* Q-13, que da lugar a una ausencia de bacteriófagos en el revelado en placa.
- ▣ La multiplicidad de los BALOs está supeditada a la disponibilidad de presas más que a la “idoneidad” fisico-química del medio donde se encuentra.
- ▣ Como respuesta a la depauperación del medio, especialmente en las dobles capas de agar a partir de aproximadamente 7 días de incubación, pero también en medio líquido, las cepas de BALOs aisladas de la E.D.A.R. se transforman en pequeñas células cocoides, sin capacidad motora, no descritas anteriormente. En este trabajo se propone para ellas el nombre “bdellocofos”.
- ▣ La observación de los “bdellocofos” al microscopio óptico de contraste de fase y de epifluorescencia, pone de manifiesto, la presencia de un citoplasma denso en el primer caso, y la tinción con DAPI y naranja de acridina, en el segundo caso, abre la posibilidad de que su estado de posible célula en fase de “dormancia” pueda ser reversible en condiciones apropiadas.
- ▣ La microscopía electrónica revela que estas formas cocoides presentan un desprendimiento de membrana que apuntaría a que los “bdellocofos” no son viables.

# **BIBLIOGRAFÍA**



- Abram, D., Castro e Melo, J., & Chou, D. (1974). Penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into host cells. *Journal of Bacteriology*, 118(2), 663–680.
- Aguirre, M., Abad, D., Albaina, A., Cralle, L., Goñi-Urriza, M. S., Estonba, A., & Zarraonaindia, I. (2017). Unraveling the environmental and anthropogenic drivers of bacterial community changes in the Estuary of Bilbao and its tributaries. *PLoS One*, 12(6), e0178755. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178755>
- Almuktar, S. A. A. N., Abed, S. N., & Scholz, M. (2018). Wetlands for wastewater treatment and subsequent recycling of treated effluent: a review. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(24), 23595. <https://doi.org/10.1007/S11356-018-2629-3>
- Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: survival, colonization, and virulence differences among serovars. *TheScientificWorldJournal*, 2015, 520179. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>
- Andreozzi, R., Caprio, V., Insola, A., & Marotta, R. (1999). Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery. *Catalysis Today*, 53(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0920-5861\(99\)00102-9](https://doi.org/10.1016/S0920-5861(99)00102-9)
- Atterbury, R. J., Hopley, L., Till, R., Lambert, C., Capeness, M. J., Lerner, T. R., ... Sockett, R. E. (2011). Effects of orally administered *Bdellovibrio bacteriovorus* on the well-being and *Salmonella* colonization of young chicks. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(16), 5794–5803. <https://doi.org/10.1128/AEM.00426-11>
- Ayaz, S. Ç., Aktaş, Ö., Akça, L., y Fındık, N. (2015). Effluent quality and reuse potential of domestic wastewater treated in a pilot-scale hybrid constructed wetland system. *Journal of Environmental Management*, 156, 115–120. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.03.042>
- Baer, M. L., Ravel, J., Chun, J., Hill, R. T., & Williams, H. N. (2000). A proposal for the reclassification of *Bdellovibrio stolpii* and *Bdellovibrio starrii* into a new genus, *Bacteriovorax* gen. nov. as *Bacteriovorax stolpii* comb. nov. and *Bacteriovorax starrii* comb. nov., respectively. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(1), 219–224. <https://doi.org/10.1099/00207713-50-1-219>
- Baer, M. L., Ravel, J., Piñeiro, S. A., Guether-Borg, D., & Williams, H. N. (2004). Reclassification of salt-water *Bdellovibrio* sp. as *Bacteriovorax marinus* sp. nov. and *Bacteriovorax litoralis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(4), 1011–1016. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02458-0>
- Bennett, G. F., & Shamma, N. K. (2010). Separation of Oil from Wastewater by Air Flotation. En *Flotation Technology* (pp. 85–119). [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-133-2\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-133-2_3)
- Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Wheeler, D. L. (2005). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 33(DATABASE ISS.), D16–D20. <https://doi.org/10.1093/nar/gki063>

- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ... Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1453–1462. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9278503>
- Boileau, M. J., Clinkenbeard, K. D., & Iandolo, J. J. (2011). Assessment of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J killing of *Moraxella bovis* in an in vitro model of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75(4), 285–291.
- Boileau, M. J., Mani, R., & Clinkenbeard, K. D. (2017). Lyophilization of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J for long-term storage. *Current Protocols in Microbiology*, 2017, 7B.3.1-7B.3.15. <https://doi.org/10.1002/cpmc.29>
- Borgnia, M. J., Subramaniam, S., & Milne, J. L. S. (2008). Three-dimensional imaging of the highly bent architecture of *Bdellovibrio bacteriovorus* by using cryo-electron tomography. *Journal of Bacteriology*, 190(7), 2588–2596. <https://doi.org/10.1128/JB.01538-07>
- Bratanis, E., Andersson, T., Lood, R., & Bukowska-Faniband, E. (2020). Biotechnological Potential of *Bdellovibrio* and Like Organisms and Their Secreted Enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 11, 662. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00662>
- Brüssow, H. (2017). Infection therapy: the problem of drug resistance - and possible solutions. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1041–1046. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12777>
- Burnham, J. C., Hashimoto, T., & Conti, S. F. (1968). Electron microscopic observations on the penetration of *Bdellovibrio bacteriovorus* into gram-negative bacterial hosts. *Journal of Bacteriology*, 96(4), 1366–1381.
- Cao, H., Wang, H., Yu, J., An, J., & Chen, J. (2019). Encapsulated bdellovibrio powder as a potential bio-disinfectant against whiteleg shrimp-pathogenic vibrios. *Microorganisms*, 7(8), 244. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7080244>
- Chanyi, R. M., Ward, C., Pechey, A., & Koval, S. F. (2013). To invade or not to invade: two approaches to a prokaryotic predatory life cycle. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(4), 273–279. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0041>
- Chen, H., Athar, R., Zheng, G., & Williams, H. N. (2011). Prey bacteria shape the community structure of their predators. *ISME Journal*, 5(8), 1314–1322. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.4>
- Chen, H., Laws, E. A., Martin, J. L., Berhane, T. K., Gulig, P. A., & Williams, H. N. (2018). Relative contributions of Halobacteriovorax and bacteriophage to bacterial cell death under various environmental conditions. *MBio*, 9(4), 1202–1220. <https://doi.org/10.1128/mBio.01202-18>
- Chen, H., Young, S., Berhane, T. K., & Williams, H. N. (2012). Predatory bacteriovorax communities ordered by various prey species. *PLoS ONE*, 7(3), e34174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034174>
- Chu, W. H., & Zhu, W. (2010). Isolation of bdellovibrio as biological therapeutic agents

- used for the treatment of aeromonas hydrophila infection in fish. *Zoonoses and Public Health*, 57(4), 258–264. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01224.x>
- College Technical Learning. (2018). *Wastewater treatment professional development hour continuing education course* (E. Pearce y P. Greer, Eds.). Retrieved from <https://www.abctlc.com/downloads/courses/WWTREATMENTSYSYSTEMOPERA TOR.pdf>
- Cotter, T. W., & Thomashow, M. F. (1992a). A conjugation procedure for *Bdellovibrio bacteriovorus* and its use to identify DNA sequences that enhance the plaque-forming ability of a spontaneous host-independent mutant. *Journal of Bacteriology*, 174(19), 6011–6017. <https://doi.org/10.1128/jb.174.19.6011-6017.1992>
- Cotter, T. W., & Thomashow, M. F. (1992b). Identification of a *Bdellovibrio bacteriovorus* genetic locus, hit, associated with the host-independent phenotype. *Journal of Bacteriology*, 174(19), 6018–6024. <https://doi.org/10.1128/jb.174.19.6018-6024.1992>
- Dashiff, A., Junka, R. A., Libera, M., & Kadouri, D. E. (2011). Predation of human pathogens by the predatory bacteria *Micavibrio aeruginosavorus* and *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Applied Microbiology*, 110(2), 431–444. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04900.x>
- Dashiff, A., Keeling, T. G., & Kadouri, D. E. (2011). Inhibition of predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* via host cell metabolic activity in the presence of carbohydrates. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(7), 2224–2231. <https://doi.org/10.1128/AEM.02565-10>
- Davidov, Y., Huchon, D., Koval, S. F., & Jurkevitch, E. (2006). A new  $\alpha$ -proteobacterial clade of Bdellovibrio-like predators: Implications for the mitochondrial endosymbiotic theory. *Environmental Microbiology*, 8(12), 2179–2188. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01101.x>
- Davidov, Y., & Jurkevitch, E. (2004). Diversity and evolution of Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs), reclassification of *Bacteriovorax starrii* as *Peredibacter starrii* gen. nov., comb. nov., and description of the Bacteriovorax-Peredibacter clade as Bacteriovoracaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1439–1452. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02978-0>
- Dharani, S., Kim, D. H., Shanks, R. M. Q., Doi, Y., & Kadouri, D. E. (2018). Susceptibility of colistin-resistant pathogens to predatory bacteria. *Research in Microbiology*, 169(1), 52–55. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.09.001>
- Diedrich, D. L., Denny, C. F., Hashimoto, T., & Conti, S. F. (1970). Facultatively parasitic strain of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 101(3), 989–996. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4908792>
- Doskina, T. V. (1973). Isolation of parasitic and saprophytic strains of *Bdellovibrio bacteriovorus* from natural waters. *Gigiiena i Sanitariia*, 38(12), 84–85. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4593002>
- Dwidar, M., Monnappa, A. K., & Mitchell, R. J. (2012). The dual probiotic and antibiotic nature of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *BMB Reports*, 45(2), 71–78.

<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.2.71>

- Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., & Stackebrandt, E. (2006). *The Prokaryotes - Delta and Epsilon Subclasses. Deeply Rooting Bacteria* (3rd ed.). <https://doi.org/10.1007/0-387-30747-8>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Evans, K. J., Lambert, C., & Sockett, R. E. (2007). Predation by *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 requires type IV pili. *Journal of Bacteriology*, 189(13), 4850–4859. <https://doi.org/10.1128/JB.01942-06>
- Fenton, A. K., Kanna, M., Woods, R. D., Aizawa, S. I., & Sockett, R. E. (2010). Shadowing the actions of a predator: Backlit fluorescent microscopy reveals synchronous nonbinary septation of predatory *Bdellovibrio* inside prey and exit through discrete bdelloplast pores. *Journal of Bacteriology*, 192(24), 6329–6335. <https://doi.org/10.1128/JB.00914-10>
- Fratamico, P. M., & Cooke, P. H. (1996). Isolation of *Bdellovibrios* that prey on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* species and application for removal of prey from stainless steel surfaces. *Journal of Food Safety*, 16(2), 161–173. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1996.tb00157.x>
- Friedberg, D. (1977). Effect of light on *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 131(2), 399–404. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/885837>
- Frigon, D., Biswal, B. K., Mazza, A., Masson, L., & Gehr, R. (2013). Biological and physicochemical wastewater treatment processes reduce the prevalence of virulent *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 835–844. <https://doi.org/10.1128/AEM.02789-12>
- Fry, J. C., & Staples, D. G. (1976). Distribution of *Bdellovibrio bacteriovorus* in sewage works, river water, and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(4), 469–474.
- Garrity, G. M., Bell, J. A., Lilburn, T. G., Lilburn, T. G., & Lansing, E. (2004). *Taxonomic Outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (2nd ed., Vol. 33; G. M. Garrity, Ed.). <https://doi.org/10.1007/bergeysoutline>
- Ghuysen, J. M., & Hakenbeck, R. (Regine). (1994). *Bacterial cell wall* (1st ed.; J. M. Ghuysen y R. (Regine) Hakenbeck, Eds.). Elsevier.
- Gram, H. C. (1884). Ueber die isolirte Färbung der Schizomyceten in Schnitt- und Trockenpräparaten. *Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 10(15), 234–235. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1209285>
- Gray, K. M., & Ruby, E. G. (1990). Prey-derived signals regulating duration of the developmental growth phase of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 172(7), 4002–4007. <https://doi.org/10.1128/jb.172.7.4002-4007.1990>
- Guo, Y., Cen, Z., Zou, Y., Fang, X., Li, T., Wang, J., ... Liu, C. (2012). Whole-Genome

- sequence of *Klebsiella pneumoniae* strain LCT-KP214. *Journal of Bacteriology*, 194(12), 3281–3289. <https://doi.org/10.1128/JB.00531-12>
- Gupta, S., Tang, C., Tran, M., & Kadouri, D. E. (2016). Effect of predatory bacteria on human cell lines. *PLoS ONE*, 11(8), e016124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161242>
- Hagar, C. B., & Elder, D. B. (1981). Filtration Processes. *Proceedings - AWWA Annual Conference*, 1205–1213. Retrieved from <https://www.iwapublishing.com/news/filtration-processes>
- Hahn, M. W., Schmidt, J., Koll, U., Rohde, M., Verburg, S., Pitt, A., ... Lang, E. (2017). *Silvanigrella aquatica* gen. nov., sp. nov., isolated from a freshwater lake, description of silvanigrellaceae fam. nov. and silvanigrellales ord. nov., reclassification of the order bdellovibrionales in the class oligoflexia, reclassification of the families bacteriovoraceae and halobacteriovoraceae in the new order bacteriovorales ord. nov., and reclassification of the family pseudobacteriovoraceae in the order oligoflexales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2555–2568. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001965>
- Hespell, R. B., Paster, B. J., Macke, T. J., & Woese, C. R. (1984). The Origin and Phylogeny of the Bdellovibrions. *Systematic and Applied Microbiology*, 5(2), 196–203. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(84\)80020-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(84)80020-X)
- Hoare, A., Marsh, P. D., & Diaz, P. I. (2017). Ecological Therapeutic Opportunities for Oral Diseases. *Microbiology Spectrum*, 5(4), 235–265. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAD-0006-2016>
- Hobley, L., Fung, R. K. Y., Lambert, C., Harris, M. A. T. S., Dabhi, J. M., King, S. S., ... Sockett, R. E. (2012). Discrete cyclic di-GMP-dependent control of bacterial predation versus axenic growth in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *PLoS Pathogens*, 8(2), e1002493. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002493>
- Hobley, L., Lerner, T. R., Williams, L. E., Lambert, C., Till, R., Milner, D. S., ... Sockett, R. E. (2012). Genome analysis of a simultaneously predatory and prey-independent, novel *Bdellovibrio bacteriovorus* from the River Tiber, supports in silico predictions of both ancient and recent lateral gene transfer from diverse bacteria. *BMC Genomics*, 13(1), 670. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-670>
- Hobley, L., Summers, J. K., Till, R., Milner, D. S., Atterbury, R. J., Stroud, A., ... Sockett, R. E. (2020). Dual predation by bacteriophage and *Bdellovibrio bacteriovorus* can eradicate *escherichia coli* prey in situations where single predation cannot. *Journal of Bacteriology*, 202(6), e00629-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00629-19>
- Iebba, V., Santangelo, F., Totino, V., Nicoletti, M., Gagliardi, A., De Biase, R. V., ... Schippa, S. (2013). Higher prevalence and abundance of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the human gut of healthy subjects. *PloS One*, 8(4), e61608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061608>
- Iebba, V., Totino, V., Santangelo, F., Gagliardi, A., Ciotoli, L., Virga, A., ... Schippa, S. (2014). *Bdellovibrio bacteriovorus* directly attacks *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Cystic fibrosis isolates. *Frontiers in Microbiology*, 5, 280.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00280>

- Iglewski, B. H. (1996). Pseudomonas. En *Medical Microbiology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413324>
- Iida, Y., Hogley, L., Lambert, C., Fenton, A. K., Sockett, R. E., & Aizawa, S. I. (2009). Roles of Multiple Flagellins in Flagellar Formation and Flagellar Growth Post Bdelloplast Lysis in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Molecular Biology*, 394(5), 1011–1021. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.10.003>
- Im, H., Choi, S. Y., Son, S., & Mitchell, R. J. (2017). Combined Application of Bacterial Predation and Violacein to Kill Polymicrobial Pathogenic Communities. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14567-7>
- Im, H., Dwidar, M., & Mitchell, R. J. (2018). Bdellovibrio bacteriovorus HD100, a predator of Gram-negative bacteria, benefits energetically from *Staphylococcus aureus* biofilms without predation. *ISME Journal*, 12(8), 2090–2095. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0154-5>
- Ishiguro, E. E. (1974). Minimum nutritional requirements for growth of host-independent derivatives of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109 Davis. *Canadian Journal of Microbiology*, 20(2), 263–264. <https://doi.org/10.1139/m74-041>
- Jajere, S. M. (2019). A review of *Salmonella enterica* with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World*, 12(4), 504–521. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>
- Johnke, J., Boenigk, J., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2017). Killing the killer: Predation between protists and predatory bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 364(9). <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx089>
- Johnke, J., Fraune, S., Bosch, T. C. G., Hentschel, U., & Schulenburg, H. (2019). Bdellovibrio and Like Organisms Are Predictors of Microbiome Diversity in Distinct Host Groups. *Microbial Ecology*, 79(1), 252–257. <https://doi.org/10.1007/s00248-019-01395-7>
- Jurgens, K. (2007). Predation on bacteria and bacterial resistance mechanisms: comparative aspects among different predator groups in aquatic systems. En Edouard Jurkevitch (Ed.), *Predatory Prokaryotes* (Vol. 4, pp. 58–92). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Jurkevitch, E., Minz, D., Ramati, B., & Barel, G. (2000). Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere *Bdellovibrio* spp. isolated on phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2365–2371. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.6.2365-2371.2000>
- Jurkevitch, E. (2006). The Genus *Bdellovibrio*. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes – Proteobacteria: Delta and Epsilon subclasses. Deeply Rooting Bacteria* (3rd ed., Vol. 3, pp. 12–30). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-33>
- Kadouri, D. E., To, K., Shanks, R. M. Q., & Doi, Y. (2013). Predatory Bacteria: A Potential Ally against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens. *PLoS ONE*,

- 8(5), e63397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063397>
- Kadouri, D., & O'Toole, G. A. (2005). Susceptibility of biofilms to *Bdellovibrio bacteriovorus* attack. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), 4044–4051. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.7.4044-4051.2005>
- Kadouri, D., Venzon, N. C., & O'Toole, G. A. (2007). Vulnerability of pathogenic biofilms to *Micavibrio aeruginosavorus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2), 605–614. <https://doi.org/10.1128/AEM.01893-06>
- Kandel, P. P., Pasternak, Z., van Rijn, J., Nahum, O., & Jurkevitch, E. (2014). Abundance, diversity and seasonal dynamics of predatory bacteria in aquaculture zero discharge systems. *FEMS Microbiology Ecology*, 89(1), 149–161. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12342>
- Karakoç, C., Radchuk, V., Harms, H., & Chatzinotas, A. (2018). Interactions between predation and disturbances shape prey communities. *Scientific Reports*, 8(1), 2968. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21219-x>
- Karamouz, M., Zahraie, B., Araghi-Nejhad, S., Shahsavari, M., & Torabi, S. (2001). An integrated approach to water resources development of the Tehran region in Iran. *Journal of the American Water Resources Association*, 37(5), 1301–1311. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2001.tb03640.x>
- Kelley, J. I., Turng, B., Williams, H. N., & Baer, M. L. (1997a). aquatic Bdellovibrios. on the colonization of surfaces in situ by effects of temperature, salinity, and substrate. En *Appl. Environ. Microbiol* (Vol. 63). Retrieved from <http://aem.asm.org/content/63/1/84>
- Kelley, J. I., Turng, B., Williams, H. N., & Baer, M. L. (1997b). Effects of temperature, salinity, and substrate on the colonization of surfaces in situ by aquatic Bdellovibrios. En *Appl. Environ. Microbiol*, 63(1), 84–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16535502>
- Kessel, M., & Shilo, M. (1976). Relationship of Bdellovibrio elongation and fission to host cell size. *Journal of Bacteriology*, 128(1), 477–480.
- Kikuchi, Y., Bomar, L., & Graf, J. (2009). Stratified bacterial community in the bladder of the medicinal leech, *Hirudo verbana*. *Environmental Microbiology*, 11(10), 2758–2770. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02004.x>
- Kongrueng, J., Pimonsri Mitraparp-arthorn, P., Bangpanwimon, K., Robins, W., Vuddhakul, V., & Mekalanos, J. (2017). Isolation of Bdellovibrio and like organisms and potential to reduce acute hepatopancreatic necrosis disease caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 124(3), 223–232. <https://doi.org/10.3354/dao03120>
- Koval, S. F., Hynes, S. H., Flannagan, R. S., Pasternak, Z., Davidov, Y., & Jurkevitch, E. (2013). *Bdellovibrio exovorus* sp. nov., a novel predator of *Caulobacter crescentus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(1), 146–151. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.039701-0>
- Koval, S. F., Williams, H. N., & Colin Stine, O. (2015). Reclassification of *Bacteriovorax marinus* as *Halobacteriovorax marinus* gen. Nov., comb. nov. and *Bacteriovorax*

- litoralis* as *Halobacteriovorax litoralis* comb. nov.; description of halobacteriovoraceae fam. nov. in the class Deltaproteobacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(2), 593–597. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.070201-0>
- Lamarre, A. G., Straley, S. C., & Conti, S. F. (1977). Chemotaxis Toward Amino Acids by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 131(1), 201–207. <https://doi.org/10.1128/JB.131.1.201-207.1977>
- Lambert, C., Chang, C.-Y., Capeness, M. J., & Sockett, R. E. (2010). The First Bite—Profiling the Predatosome in the Bacterial Pathogen *Bdellovibrio*. *PLoS ONE*, 5(1), e8599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008599>
- Lambert, C., Evans, K. J., Till, R., Hobley, L., Capeness, M., Rendulic, S., ... Sockett, R. E. (2006). Characterizing the flagellar filament and the role of motility in bacterial prey-penetration by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Molecular Microbiology*, 60(2), 274–286. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05081.x>
- Lambert, C., Hobley, L., Chang, C.-Y., Fenton, A., Capeness, M., & Sockett, L. (2008). A Predatory Patchwork: Membrane and Surface Structures of *Bdellovibrio bacteriovorus*. En *Advances in microbial physiology* (Vol. 54, pp. 313–361). [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)00005-2)
- Lambert, C., Ivanov, P., & Sockett, R. E. (2010). A transcriptional “scream” early response of *E. coli* prey to predatory invasion by *Bdellovibrio*. *Current Microbiology*, 60(6), 419–427. <https://doi.org/10.1007/s00284-009-9559-8>
- Lambert, C., Smith, M. C. M., & 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12558595>
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., Mcgettigan, P. A., McWilliam, H., ... Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>
- Lerner, T. R., Lovering, A. L., Bui, N. K., Uchida, K., Aizawa, S. I., Vollmer, W., & Sockett, R. E. (2012). Specialized peptidoglycan hydrolases sculpt the intra-bacterial niche of predatory *Bdellovibrio* and increase population fitness. *PLoS Pathogens*, 8(2), e1002524. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002524>
- Letunic, I., & Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 44(W1), W242–W245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>
- Lienert, J., Bürki, T., & Escher, B. I. (2007). Reducing micropollutants with source control: substance flow analysis of 212 pharmaceuticals in faeces and urine. *Water Science and Technology*, 56(5), 87–96. <https://doi.org/10.2166/wst.2007.560>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., & Gacto Fernández, M. (2004). *Brock biología de los microorganismos* (10th ed.). Prentice Hall Hispanoamericana.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Stahl, D. A., & Clark, D. P. (2018). *Brock, Biology of Microorganisms* (15th ed.). <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

- Mahmoud, K. K., & Koval, S. F. (2010). Characterization of type IV pili in the life cycle of the predator bacterium *Bdellovibrio*. *Microbiology*, *156*(4), 1040–1051. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036137-0>
- Marano, R. B. M., Zolti, A., Jurkevitch, E., & Cytryn, E. (2019). Antibiotic resistance and class 1 integron gene dynamics along effluent, reclaimed wastewater irrigated soil, crop continua: elucidating potential risks and ecological constraints. *Water Research*, *164*, 114906. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114906>
- Marbach, A., Varon, M., & Shilo, M. (1975). Properties of marine *Bdellovibrios*. *Microbial Ecology*, *2*(4), 284–295. <https://doi.org/10.1007/BF02011648>
- Markelova, N. O. (2015). The Potential of *Bdellovibrio* For the Biocontrol of the Infectious Agent *Vibrio cholerae*. *Avicenna Journal of Environmental Health Engineering*, *2*(2).
- Martin, M. O. (2002). Predatory prokaryotes: an emerging research opportunity. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *4*(5), 467–477. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12432957>
- Martínez, V., Herencias, C., Jurkevitch, E., & 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*, 24381. <https://doi.org/10.1038/srep24381>
- Matassa, S., Verstraete, W., Pikaar, I., & Boon, N. (2016). Autotrophic nitrogen assimilation and carbon capture for microbial protein production by a novel enrichment of hydrogen-oxidizing bacteria. *Water Research*, *101*, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.05.077>
- McCauley, E. P., Haltli, B., & Kerr, R. G. (2015). Description of *Pseudobacteriovorax antillogorgiicola* gen. nov., sp. nov., a bacterium isolated from the gorgonian octocoral *Antillogorgia elisabethae*, belonging to the family Pseudobacteriovoracaceae fam. nov., within the order Bdellovibrionales. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *65*(2), 522–530. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.066266-0>
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., ... Wilson, R. K. (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature*, *413*(6858), 852–856. <https://doi.org/10.1038/35101614>
- McGhee, T. J., & Steel, E. W. (1991). *Water supply and sewerage* (1st ed.). Asia: McGraw-Hill Education.
- Medina, A. A., & Kadouri, D. E. (2009). Biofilm formation of *Bdellovibrio bacteriovorus* host-independent derivatives. *Research in Microbiology*, *160*(3), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.02.001>
- Medina, A. A., Shanks, R. M., & Kadouri, D. E. (2008). Development of a novel system for isolating genes involved in predator-prey interactions using host independent derivatives of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *BMC Microbiology*, *8*(1), 33. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-33>
- Mishra, A. K. (2016). Natural Algal-Based Processes as Smart Approach for Wastewater

- Treatment. En *Smart Materials for Waste Water Applications* (pp. 379–398). <https://doi.org/10.1002/9781119041214>
- Monnappa, A. K., Bari, W., Choi, S. Y., & Mitchell, R. J. (2016). Investigating the Responses of Human Epithelial Cells to Predatory Bacteria. *Scientific Reports*, *6*, 33485. <https://doi.org/10.1038/srep33485>
- Moradali, M. F., Ghods, S., & Rehm, B. H. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *7*, 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>
- Morehouse, K. A., Hogley, L., Capeness, M., & Sockett, R. E. (2011). Three motAB stator gene products in *Bdellovibrio bacteriovorus* contribute to motility of a single flagellum during predatory and prey-independent growth. *Journal of Bacteriology*, *193*(4), 932–943. <https://doi.org/10.1128/JB.00941-10>
- Müller, F. D., Beck, S., Strauch, E., & Linscheid, M. W. (2011). Bacterial predators possess unique membrane lipid structures. *Lipids*, *46*(12), 1129–1140. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3614-5>
- Mun, W., Kwon, H., Im, H., Choi, S. Y., Monnappa, A. K., & Mitchell, R. J. (2017). Cyanide Production by *Chromobacterium piscinae* Shields It from *Bdellovibrio bacteriovorus* HD100 Predation. *MBio*, *8*(6), 1370–1387. <https://doi.org/10.1128/mBio.01370-17>
- Naidoo, S., & Olaniran, A. O. (2013, December 23). Treated wastewater effluent as a source of microbial pollution of surface water resources. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 11, pp. 249–270. <https://doi.org/10.3390/ijerph110100249>
- Nair, R. R., Vasse, M., Wielgoss, S., Sun, L., Yu, Y. T. N., & Velicer, G. J. (2019). Bacterial predator-prey coevolution accelerates genome evolution and selects on virulence-associated prey defences. *Nature Communications*, *10*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12140-6>
- Nakai, R., Nishijima, M., Tazato, N., Handa, Y., Karray, F., Sayadi, S., ... Naganuma, T. (2014). *Oligoflexus tunisiensis* gen. nov., sp. nov., a Gram-negative, aerobic, filamentous bacterium of a novel proteobacterial lineage, and description of Oligoflexaceae fam. nov., Oligoflexales ord. nov. and Oligoflexia classis nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*, 3353–3359. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.060798-0>
- Negus, D., Moore, C., Baker, M., Raghunathan, D., Tyson, J., & 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. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093618>
- Nguyen, N. A. T., Sallans, L., & Kaneshiro, E. S. (2008). The major glycerophospholipids of the predatory and parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus* HD5. *Lipids*, *43*(11), 1053–1063. <https://doi.org/10.1007/s11745-008-3235-9>

- Notredame, C., Higgins, D. G., & Heringa, J. (2000). T-coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology*, 302(1), 205–217. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4042>
- Oliver, J. D. (2005). The Viable but Nonculturable State in Bacteria. *The Journal of Microbiology*, 43 Spec No, 93–100. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/e661/934dca6bb0dbb31a8781f3193232b7b5a8a4.pdf>
- Ottaviani, D., Chierichetti, S., Angelico, G., Forte, C., Rocchegiani, E., Manuali, E., & Leoni, F. (2018). Halobacteriovorax isolated from marine water of the Adriatic sea, Italy, as an effective predator of *Vibrio parahaemolyticus*, non-O1/O139 *V. cholerae*, *V. vulnificus*. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 1199–1207. <https://doi.org/10.1111/jam.14027>
- Ottaviani, D., Perialisi, S., Angelico, G., Mosca, F., Tiscar, P. G., Rocchegiani, E., ... Haouet, N. (2020). *Bdellovibrio bacteriovorus* to control *Escherichia coli* on meat matrices. *International Journal of Food Science and Technology*, 55(3), 988–994. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14355>
- Oyaizu, H., & Woese, C. R. (1985). Phylogenetic Relationships Among the Sulfate Respiring Bacteria, Myxobacteria and Purple Bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 6(3), 257–263. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(85\)80028-X](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(85)80028-X)
- Özkan, M., Yılmaz, H., Çelik, M. A., Şengezer, C., Erhan, E., y Keskinler, B. (2018). Application of *Bdellovibrio bacteriovorus* for reducing fouling of membranes used for wastewater treatment. *Turkish Journal of Biochemistry*, 43(3), 296–305. <https://doi.org/10.1515/tjb-2016-0302>
- Paix, B., Ezzedine, J. A., & Jacquet, S. (2019). Diversity, dynamics, and distribution of *Bdellovibrio* and like organisms in perialpine lakes. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6). <https://doi.org/10.1128/AEM.02494-18>
- Pantarella, F., Iebba, V., Mura, F., Dini, L., Totino, V., Neroni, B., ... Schippa, S. (2018). Behaviour of *Bdellovibrio bacteriovorus* in the presence of Gram-positive *Staphylococcus aureus*. *The New Microbiologica*, 41(2), 145–152. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29498744>
- Pasternak, Z., Pietrokovski, S., Rotem, O., Gophna, U., Lurie-Weinberger, M. N., & Jurkevitch, E. (2013). By their genes ye shall know them: Genomic signatures of predatory bacteria. *ISME Journal*, 7(4), 756–769. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.149>
- Patini, R., Cattani, P., Marchetti, S., Isola, G., Quaranta, G., & Gallenzi, P. (2019). Evaluation of Predation Capability of Periodontopathogens Bacteria by *Bdellovibrio Bacteriovorus* HD100. An in Vitro Study. *Materials*, 12(12), 2008. <https://doi.org/10.3390/ma12122008>
- Pérez, J., Moraleda-Muñoz, A., Marcos-Torres, F. J., & Muñoz-Dorado, J. (2016). Bacterial predation: 75 years and counting! *Environmental Microbiology*, 18(3), 766–779. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13171>
- Petrenko, M., Friedman, S. P., Fluss, R., Pasternak, Z., Huppert, A., & Jurkevitch, E.

- (2019). Spatial heterogeneity stabilizes predator–prey interactions at the microscale while patch connectivity controls their outcome. *Environmental Microbiology*, 22(2), 694–704. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14887>
- Pignatelli, M., Moya, A., & Tamames, J. (2009). EnvDB, a database for describing the environmental distribution of prokaryotic taxa. *Environmental Microbiology Reports*, 1(3), 191–197. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00030.x>
- Pineiro, S. A., Stine, O. C., Chauhan, A., Steyert, S. R., Smith, R., & Williams, H. N. (2007). Global survey of diversity among environmental saltwater Bacteriovoracaceae. *Environmental Microbiology*, 9(10), 2441–2450. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01362.x>
- Piñeiro, S. A., Williams, H. N., & Stine, O. C. (2008). Phylogenetic relationships amongst the saltwater members of the genus *Bacteriovorax* using *rpoB* sequences and reclassification of *Bacteriovorax stolpii* as *Bacteriolyticum stolpii* gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(5), 1203–1209. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65710-0>
- Proteomes - *Escherichia coli* (strain 'clone D i2'). (2018, November 9). Retrieved September 4, 2019, from Uniprot website: <https://www.uniprot.org/proteomes/UP000005865>
- Qian, H., Hou, C., Liao, H., Wang, L., Han, S., Peng, S., ... Luo, X. (2020). The species evenness of “prey” bacteria correlated with *Bdellovibrio*-and-like-organisms (BALOs) in the microbial network supports the biomass of BALOs in a paddy soil. *FEMS Microbiology Ecology*. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiaa195>
- Raghunathan, D., Radford, P. M., Gell, C., Negus, D., Moore, C., Till, R., ... Tyson, J. (2019). Engulfment, persistence and fate of *Bdellovibrio bacteriovorus* predators inside human phagocytic cells informs their future therapeutic potential. *Scientific Reports*, 9(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40223-3>
- Ramseur, J. L. (2018). *Wastewater Infrastructure: Overview, Funding, and Legislative Developments*. Retrieved from [www.crs.gov](http://www.crs.gov)
- Reardon, S. (2015). Antibiotic alternatives rev up bacterial arms race. *Nature*, 521(7553), 402–403. <https://doi.org/10.1038/521402a>
- Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., ... Schuster, S. C. (2004). A Predator Unmasked: Life Cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a Genomic Perspective. *Science*, 303(5658), 689–692. <https://doi.org/10.1126/science.1093027>
- Rittenberg, S. C. (1983). *Bdellovibrio*: attack, penetration, and growth on its prey. *ASM News*, 49, 435–439. [https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)00005-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)00005-2)
- Rittenberg, S. C., & Shilo, M. (1970). Early host damage in the infection cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 102(1), 149–160.
- Rodicio, M.R., & Mendoza, M.C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 22(4), 238–245. [https://doi.org/10.1016/s0213-005x\(04\)73073-6](https://doi.org/10.1016/s0213-005x(04)73073-6)

- Romanowski, E. G., Stella, N. A., Brothers, K. M., Yates, K. A., Funderburgh, M. L., Funderburgh, J. L., ... Shanks, R. M. Q. (2016). Predatory bacteria are nontoxic to the rabbit ocular surface. *Scientific Reports*, 6, 30987. <https://doi.org/10.1038/srep30987>
- Rosenberg, E., DeLong, E. F., Lory, S., Stackebrandt, E., & Thompson, F. (2013). Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria. En *The Prokaryotes* (4th ed., Vol. 10). <https://doi.org/10.1007/0-387-30742-7>
- Rosson, R. A., & Rittenberg, S. C. (1979). Regulated breakdown of *Escherichia coli* deoxyribonucleic acid during intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Journal of Bacteriology*, 140(2), 620–633.
- Rotem, O., Pasternak, Z., & Jurkevitch, E. (2014). The Genus *Bdellovibrio* and Like Organisms. En E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, y F. Thompson (Eds.), *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* (pp. 3–17). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9\\_379](https://doi.org/10.1007/978-3-642-39044-9_379)
- Rotem, O., Pasternak, Z., Shimoni, E., Belausov, E., Porat, Z., Pietrokovski, S., & Jurkevitch, E. (2015). Cell-cycle progress in obligate predatory bacteria is dependent upon sequential sensing of prey recognition and prey quality cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44), E6028–37. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515749112>
- Ruby, E. G., & Rittenberg, S. C. (1983). Differentiation after premature release of intraperiplasmically growing *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 154(1), 32–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6403505>
- Russo, R., Kolesnikova, I., Kim, T., Gupta, S., Pericleous, A., Kadouri, D., & Connell, N. (2018). Susceptibility of Virulent *Yersinia pestis* Bacteria to Predator Bacteria in the Lungs of Mice. *Microorganisms*, 7(1), 2. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010002>
- Ryan, K. J. (Kenneth J., Ray, C. G., y Sherris, J. C. (2004). *Sherris medical microbiology : an introduction to infectious diseases* (4th ed.). New York: McGraw-Hill.
- Salton, M. R. J., & Kim, K.-S. (1996). Structure. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8477/>
- Sanchez-Amat, A., & Torrella, F. (1990). Formation of stable bdelloplasts as a starvation-survival strategy of marine bdellovibrios. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(9), 2717–2725.
- Sanchez, G. V, Master, R. N., Clark, R. B., Fyyaz, M., Duvvuri, P., Ekta, G., & Bordon, J. (2013). *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998–2010. *Emerging Infectious Diseases*, 19(1), 133–136. <https://doi.org/10.3201/eid1901.120310>
- Saxena, R., Bharti, V., Singh, A., Pradesh, U., & Pradesh, U. (2018). The Importance of Waste Management to Environmental Sanitation: A Review. *Adv.Biores.*, 9(March), 202–207. <https://doi.org/10.15515/abr.0976-4585.9.2.202207>

- Schelling, M., & Conti, S. (1986). Host receptor sites involved in the attachment of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Bdellovibrio stolpii*. *FEMS Microbiology Letters*, 36(2–3), 319–323. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01718.x>
- Schoeffield, A. J., & Williams, H. N. (1990). Efficiencies of recovery of bdellovibrios from brackish- water environments by using various bacterial species as prey. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 230–236. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348096>
- Schoeffield, A. J., Williams, H. N., Turng, B. F., & Falkler, W. A. (1996). A comparison of the survival of intraperiplasmic and attack phase bdellovibrios with reduced oxygen. *Microbial Ecology*, 32(1), 35–46. <https://doi.org/10.1007/BF00170105>
- Schwudke, D., Linscheid, M., Strauch, E., Appel, B., Zähringer, U., Moll, H., ... Lindner, B. (2003). The obligate predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* possesses a neutral lipid a containing  $\alpha$ -D-mannoses that replace phosphate residues. Similarities and differences between the lipid As and the lipopolysaccharides of the wild type strain B. bacteriovorus HD100 and its host-independent derivative HI100. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 27502–27512. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303012200>
- Schwudke, D., Strauch, E., Krueger, M., & Appel, B. (2001). Taxonomic Studies of Predatory Bdellovibrios Based on 16S rRNA Analysis, Ribotyping and the hit Locus and Characterization of Isolates from the Gut of Animals. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(3), 385–394. <https://doi.org/10.1078/0723-2020-00042>
- Seidler, R. J., Mandel, M., & Baptist, J. N. (1972). Molecular heterogeneity of the Bdellovibrios: evidence of two new species. *Journal of Bacteriology*, 109(1), 209–217.
- Seidler, R. J., & Starr, M. P. (1968). Structure of the flagellum of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 95(5), 1952–1955.
- Seidler, R. J., & Starr, M. P. (1969). Isolation and characterization of host-independent Bdellovibrios. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 769–785. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4901359>
- Seidler, R. J., Starr, M. P., & Mandel, M. (1969). Deoxyribonucleic acid characterization of Bdellovibrios. *Journal of Bacteriology*, 100(2), 786–790.
- Shatzkes, K., Chae, R., Tang, C., Ramirez, G. C., Mukherjee, S., Tsenova, L., ... Kadouri, D. E. (2015). Examining the safety of respiratory and intravenous inoculation of *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Micavibrio aeruginosavorus* in a mouse model. *Scientific Reports*, 5, 12889. <https://doi.org/10.1038/srep12899>
- Shatzkes, K., Connell, N. D., & Kadouri, D. E. (2017). Predatory bacteria: A new therapeutic approach for a post-antibiotic era. *Future Microbiology*, Vol. 12, pp. 469–472. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0021>
- Shatzkes, K., Singleton, E., Tang, C., Zuena, M., Shukla, S., Gupta, S., ... Connell, N. D. (2017). Examining the efficacy of intravenous administration of predatory bacteria in rats. *Scientific Reports*, 7(1), 1864. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02041-3>
- Shatzkes, K., Singleton, E., Tang, C., Zuena, M., Shukla, S., Gupta, S., ... Kadouri, D. E.

- (2016). Predatory Bacteria Attenuate *Klebsiella pneumoniae* Burden in Rat Lungs. *MBio*, 7(6), e01847-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01847-16>
- Shatzkes, K., Tang, C., Singleton, E., Shukla, S., Zuena, M., Gupta, S., ... Kadouri, D. E. (2017). Effect of predatory bacteria on the gut bacterial microbiota in rats. *Scientific Reports*, 7, 43483. <https://doi.org/10.1038/srep43483>
- Shilo, M., & Bruff, B. (1965). Lysis of Gram-Negative Bacteria by Host-Independent Ectoparasitic *Bdellovibrio bacteriovorus* Isolates. *Journal of General Microbiology*, 40(3), 317–328. <https://doi.org/10.1099/00221287-40-3-317>
- Silva, P. H. F., Oliveira, L. F. F., Cardoso, R. S., Ricoldi, M. S. T., Figueiredo, L. C., Salvador, S. L., ... Messoria, M. R. (2019). The impact of predatory bacteria on experimental periodontitis. *Journal of Periodontology*, 90(9), 1053–1063. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0485>
- Sinha, A., Hurakadli, M., Ravindra, S., & Agarwal, A. (2014). Bdellovibrio Like Organisms: The Predatory Assassin. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences*, 13(10), 32–36. <https://doi.org/10.9790/0853-131023236>
- Snyder, A. R., Williams, H. N., Baer, M. L., Walker, K. E., & 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. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.02261-0>
- Sockett, R. E., & Lambert, C. (2004). Bdellovibrio as therapeutic agents: A predatory renaissance? *Nature Reviews Microbiology*, 2(8), 669–675. <https://doi.org/10.1038/nrmicro959>
- Sockett, R. E. (2009). Predatory Lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annual Review of Microbiology*, 63(1), 523–539. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073346>
- Song, W.-Y. (2004). Identification and Characterization of *Bdellovibrio bacteriovorus*, a Predator of *Burkholderia glumae*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 14(1), 48–55.
- Soo, R. M., Woodcroft, B. J., Parks, D. H., Tyson, G. W., & Hugenholtz, P. (2015). Back from the dead; the curious tale of the predatory cyanobacterium *Vampirovibrio chlorellavorus*. *PeerJ*, 2015(5), e968. <https://doi.org/10.7717/peerj.968>
- Sophia A., C., & Lima, E. C. (2018). Removal of emerging contaminants from the environment by adsorption. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 150, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.026>
- Sourjik, V., & Wingreen, N. S. (2012, April). Responding to chemical gradients: Bacterial chemotaxis. *Current Opinion in Cell Biology*, Vol. 24, pp. 262–268. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2011.11.008>
- Starr, M. P., & Baigent, N. L. (1966). Parasitic interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* with other bacteria. *Journal of Bacteriology*, 91(5), 2006–2017. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5327913>
- Stolp, H., & Petzold, H. (1962). Untersuchungen über einen obligat parasitischen

- Mikroorganismus mit lytischer Aktivitiit fur Pseudomonas Bakterien. *Phytopathol Z*, 45(1), 364–370. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07245-3>
- Stolp, H., & Starr, M. P. (1963). *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic, and bacteriolytic microorganism. *Antonie van Leeuwenhoek*, 29(1), 217–248. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14068454>
- Stolp, H. (1981). The Genus *Bdellovibrio*. En M. P. Starr, H. Stolp, H. G. Truper, A. Balows, y H. G. Schlegel (Eds.), *The Prokaryotes* (2nd ed., pp. 618–629). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9\\_54](https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_54)
- Stolp, H., & Starr, M. P. (1981). Principles of Isolation, Cultivation, and Conservation of Bacteria. En *The Prokaryotes* (pp. 135–175). [https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-662-13187-9_5)
- Straley, S. C., & Conti, S. F. (1977). Chemotaxis by *Bdellovibrio bacteriovorus* toward prey. *Journal of Bacteriology*, 132(2), 628–640.
- Straley, S. C., LaMarre, A. G., Lawrence, L. J., & Conti, S. F. (1979). Chemotaxis of *Bdellovibrio bacteriovorus* toward pure compounds. *Journal of Bacteriology*, 140(2), 634–642.
- Strauch, E., Schwudke, D., & Linscheid, M. (2007). Predatory mechanisms of *Bdellovibrio* and like organisms. *Future Microbiology*, 2(1), 63–73. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.1.63>
- Sun, Y., Ye, J., Hou, Y., Chen, H., Cao, J., & Zhou, T. (2017). Predation Efficacy of *Bdellovibrio bacteriovorus* on Multidrug-Resistant Clinical Pathogens and Their Corresponding Biofilms. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 70(5), 485–489. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2016.405>
- Sutton, D. C., & Besant, P. J. (1994). Ecology and characteristics of bdellovibrios from three tropical marine habitats. *Marine Biology*, 119(2), 313–320. <https://doi.org/10.1007/BF00349571>
- Sutton, S. (2008). Multiple Sequence Alignment: A Critical Comparison of Four Popular Programs. In *Biochemistry 218 Final Project*.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>
- Taylor, V. I., Baumann, P., Reichelt, J. L., & Allen, R. D. (1974). Isolation, enumeration, and host range of marine *Bdellovibrios*. *Archives of Microbiology*, 98(2), 101–114. <https://doi.org/10.1007/bf00425273>
- Thomashow, L. S., & Rittenberg, S. C. (1985). Isolation and composition of sheathed flagella from *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Journal of Bacteriology*, 163(3), 1047–1054. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4030691>
- Thomashow, M. F., & Cotter, T. W. (1992). *Bdellovibrio* host dependence: The search for signal molecules and genes that regulate the intraperiplasmic growth cycle. *Journal of Bacteriology*, Vol. 174, pp. 5767–5771. <https://doi.org/10.1128/jb.174.18.5767-5771.1992>

- Thomashow, M. F., & Rittenberg, S. C. (1978). Intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J: N-deacetylation of *Escherichia coli* peptidoglycan amino sugars. *Journal of Bacteriology*, *135*(3), 1008–1014. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/357410>
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(1), 249–266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Torrella, F., Guerrero, R., & Seidler, R. J. (1978). Further taxonomic characterization of the genus *Bdellovibrio*. *Canadian Journal of Microbiology*, *24*(11), 1387–1394. <https://doi.org/10.1139/m78-222>
- Tyson, J., & Sockett, R. E. (2017a). Predatory Bacteria: Moving from Curiosity Towards Curative. *Trends in Microbiology*, *25*(2), 90–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.12.011>
- Tyson, J., & Sockett, R. E. (2017b). Nature knows best: employing whole microbial strategies to tackle antibiotic resistant pathogens. *Environmental Microbiology Reports*, *9*(1), 47–49. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12518>
- Uematsu, T. (1980). Ecology of *Bdellovibrio* parasitic to rice bacterial leaf blight pathogen, *Xanthomonas oryzae*. *Review of Plant Protection Research*, *13*, 12–26.
- USEPA. (2004). *Primer for Municipal Wastewater Treatment Systems*. Retrieved from <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/primer.pdf>
- Van Essche, M., Sliepen, I., Loozen, G., Van Eldere, J., Quiryne, M., Davidov, Y., ... Teughels, W. (2009). Development and performance of a quantitative PCR for the enumeration of *Bdellovibrionaceae*. *Environmental Microbiology Reports*, *1*(4), 228–233. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2009.00034.x>
- Varón, M. P. (2004). *Waste Stabilization Ponds* (p. 43). Retrieved from <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd27/ponds.pdf>
- Varon, M., & Seiffers, J. (1975). Symbiosis-independent and symbiosis-incompetent mutants of *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Journal of Bacteriology*, *124*(3), 1191–1197. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1104576>
- Varon, M., & Shilo, M. (1968). Interaction of *Bdellovibrio bacteriovorus* and host bacteria. I. Kinetic studies of attachment and invasion of *Escherichia coli* B by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, *95*(3), 744–753. <https://doi.org/10.1128/jb.95.3.744-753.1968>
- Varon, M., & Shilo, M. (1969). Attachment of *Bdellovibrio bacteriovorus* to cell wall mutants of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *97*(2), 977–979.
- Varon, M., & Shilo, M. (1980). Ecology of aquatic *Bdellovibrios*. En M. R. Droop y H. W. Jannasch (Eds.), *Advances in Aquatic Microbiology* (Vol. 2, pp. 1–48). <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.171>

- Verklova, Z. S. (1973). Study of the virulence, toxicity and immunogenicity of different strains of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Gigiena i Sanitariia*, 38(3), 10–13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4769749>
- Wang, Z., Kadouri, D. E., & Wu, M. (2011). Genomic insights into an obligate epibiotic bacterial predator: *Micavibrio aeruginosavorus* ARL-13. *BMC Genomics*, 12, 453. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-453>
- Ward, B. B. (2008). Nitrification. In S. E. Jørgensen y B. D. Fath (Eds.), *Encyclopedia of Ecology* (pp. 351–358). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.00697-7>
- Wasey, A., & Salen, P. (2018). *Escherichia Coli* (*E. coli* 0157 H7). En *StatPearls*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29939622>
- Waso, M., Khan, S., Singh, A., McMichael, S., Ahmed, W., Fernández-Ibáñez, P., ... Khan, W. (2020). Predatory bacteria in combination with solar disinfection and solar photocatalysis for the treatment of rainwater. *Water Research*, 169, 115281. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115281>
- WHO | Global action plan on AMR. (2016). *WHO*.
- Williams, H. N., Schoeffield, A. J., Guether, D., Kelley, J., Shah, D., & Falkler, W. A. (1995). Recovery of bdellovibrios from submerged surfaces and other aquatic habitats. *Microbial Ecology*, 29(1), 39–48. <https://doi.org/10.1007/BF00217421>
- Williams, Henry N., & Falkler Jr., W. A. (1984). Distribution of bdellovibrios in the water column of an estuary. *Canadian Journal of Microbiology*, 30(7), 971–974. <https://doi.org/10.1139/m84-152>
- Williams, Henry N, Turng, B.-F., & Kelley, J. I. (2009). Survival response of *Bacteriovorax* in surface biofilm versus suspension when stressed by extremes in environmental conditions. *Microbial Ecology*, 58(3), 474–484. <https://doi.org/10.1007/s00248-009-9499-7>
- Willis, A. R., Moore, C., Mazon-Moya, M., Krokowski, S., Lambert, C., Till, R., ... Sockett, R. E. (2016). Injections of Predatory Bacteria Work Alongside Host Immune Cells to Treat *Shigella* Infection in Zebrafish Larvae. *Current Biology*, 26(24), 3343–3351. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.09.067>
- Won, S. Y., Munoz-Price, L. S., Lolans, K., Hota, B., Weinstein, R. A., Hayden, M. K., & Centers for Disease Control and Prevention Epicenter Program. (2011). Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clinical Infectious Diseases*, 53(6), 532–540. <https://doi.org/10.1093/cid/cir482>
- Wong, W. F., & Santiago, M. (2017). Microbial approaches for targeting antibiotic-resistant bacteria. *Microbial Biotechnology*, 10(5), 1047–1053. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12783>
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. *World Health Organization*, 1–257. <https://doi.org/9789241564748>
- Wurtzel, O., Dori-Bachash, M., Pietrokovski, S., Jurkevitch, E., & Sorek, R. (2010).

- Mutation Detection with Next-Generation Resequencing through a Mediator Genome. *PLoS ONE*, 5(12), e15628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015628>
- Yair, S., Yaacov, D., Susan, K., & Jurkevitch, E. (2003). Small eats big: ecology and diversity of *Bdellovibrio* and like organisms, and their dynamics in predator-prey interactions. *Agronomie*, 23(5–6), 433–439. <https://doi.org/10.1051/agro:2003026>
- Youdkes, D., Helman, Y., Burdman, S., Matan, O., & Jurkevitch, E. (2020). Potential control of potato soft rot disease by the obligate predators *bdellovibrio* and like organisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6), 2020–2086. <https://doi.org/10.1128/AEM.02543-19>
- Zheng, G., Wang, C., Williams, H. N., & Pineiro, S. A. (2008). Development and evaluation of a quantitative real-time PCR assay for the detection of saltwater Bacteriovorax. *Environmental Microbiology*, 10(10), 2515–2526. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01676.x>



# **ANEXOS**



**ANEXO 1: Secuencias genéticas de los BALOs MuRa1a y MuRa6a****MuRa1a**

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGGGGAAAGCTTTCGGGT  
GAGTACTAGTGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTGCCTTAGAGT  
GGGGGATAACCAGTCGAAAGATTGGCTAATACCGCATAAGACCACAAGAA  
CTGCGGTTCAAGGGGTCAAAGGTTTTTCGCTCTAAGATGAGTCCGCGTAAG  
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCTTTAACTGGT  
CTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCACAATGGAGGAAACTCTGATGCAGC  
GACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTCGGGTTCGTAAGCTCTGTTCGAGGG  
GAATAACACAATGAAGGTACCCTGTAAGAAAGGATCGGCTAACTTCGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAAGACGAGGGATCCTAGCGTTGTTCCGAATTATTGGGCG  
TAAAGCGGATGTAGGTGGCTTTGTAAAGTCAGGTGTGAAAGCCTGGGGCTCA  
ACCCAGAAAGTGCATTTGATACTGCGAAGCTTGAGTGTCGGAGAGGTTACT  
AGAATTGTTGGTGTAGTGGTGAATACGTAGATATCAACAGGAATACCGGA  
GGCGAAGGCGGGTAACTGGCCGAACACTGACACTGAGATCCGAAAGCGTG  
GGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGGAT  
ACTTGTGTTAGAGGTATTGACCCCTTTAGTGACGAAGCTAACGCGTTAAGT  
ATCCCGCCTGGGGAGTACGGTTCGCAAGATTAAGAACTCAAAGAAATTGACGG  
GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA  
ACCTTACCTAGGCTTGACATGTACTGGAAGATTGGCGGAAAMGTCGTCGCC  
CGCAAGGGTTCGGTACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCTGTG  
AGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCATTTAGTTGCCA  
GCATTCAGTTGGGCACTCTAGATGGACTGCCGGTGTAAACCGGAGGAAGG  
TGGGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTATGCCTAGGGCTACACACGTGC  
TACAATGGTGGTCACAGAGTGAAGCTAAGCCGCAAGGTAGAGCAAATCACT  
TAAAAGCCATCTAAGTTCAGATTGGTCTCTGCAACTCGAGACCATGAAGTTG  
GAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGG

\* R=A/G; Y=C/T; S=G/C; W=A/T; K=G/T; M=A/C

MuRa6a

CTTTCGGGTGAGTACTAGTGGCGCAMGGGTGAGTAACGCGTGGATAATCTG  
CCTTAGAGTGGGGGATAACTAGTCGAAAGATTASCTAATACCGCMTAAGAC  
CACAAGAACTGCGGTTCAAGAGGTCAAAGGTTTTTCGCTCTAAGATGAGTC  
CGCGTAAGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCMAGGCGACSATYT  
TTAACTGGWCTGAGAGGATGATCAGTCACMCTGGAAGTARACACGGTCC  
AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCACAATGGASGAAACTC  
TGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTCGGGTCGTAAAGCTCT  
GTCGCARGGGAATAACACAWTGAAGGTACCCTGSAAGAAAGGATCGGCTA  
ACTTCRTGCCARCASCCSCGGTAAGACSAGGGATCCTASCSTTGTTCCKGAAT  
TATTGGGCGTAAAGCGGGTGTAGGTGGCTATGTAAGTCAGGTGTGAAAGCC  
TAGGGCTCAACCCTAGAAGTGCATCTGATACTGCGTAGCTGAGTGGTAGAG  
AGGATAGTAGAATTCTTGGTGTAGTGGTRAAATACGTAGATATCRAGAGGA  
AYACCGGTGGCGAAGGCGGCTATCTGGCTACACACTGACACTCAGACCCGA  
AAGTGCGGGGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCGCACCATAAAC  
GATGRATACTTGTTGTTGGAGGTATTGACCCCTTCAGTGACGAAGCTAACGC  
GTTAAGTATYCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTA AAACTCAAAGAAA  
TTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAAC  
GCGAAGAACCTTACCTAGKCTTGACATGTACTGGAATATTGGCGGAAACGC  
CGTAGCTCGCAAGAGTCGGTACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCG  
TGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGCATTTAG  
TTGCCAGCATTAGTTGGGCACTCTAGATGGACTGCCGGTGTAAACCGGA  
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCTCATGSCCCTTATGCCTAGGGCTACA  
CACGTGCTACAATGGTAGTCACAAASKGAAGCGAAGTCGCGAGAKGGAGC  
AAATCGGATAAAAASCTATCTAAGTTCAGATTGGTCTCTGCAACTCGAGACCA  
TGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGMATGCCGCGG

\* R=A/G; Y=C/T; S=G/C; W=A/T; K=G/T; M=A/C

## ANEXO 2: Información obtenida de *Genbank* de los BALOs seleccionados para el análisis filogenético

### Bdellovibrio sp. ETA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AY294225.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) 

LOCUS AY294225 678 bp DNA linear BCT 24-SEP-2004  
 DEFINITION Bdellovibrio sp. ETA 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AY294225  
 VERSION AY294225.1 GI:34604522  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio sp. ETA  
 ORGANISM [Bdellovibrio sp. ETA](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;  
 Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.

REFERENCE 1 (bases 1 to 678)  
 AUTHORS Davidov,Y. and Jurkevitch,E.  
 TITLE Diversity and evolution of Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs), reclassification of Bacteriovorax starrii as Peredibacter starrii gen. nov., comb. nov., and description of the Bacteriovorax-Peredibacter clade as Bacteriovoracaceae fam. nov  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (PT 5), 1439-1452 (2004)  
 PUBMED [15388693](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 678)  
 AUTHORS Davidov,Y. and Jurkevitch,E.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (08-MAY-2003) Plant Pathology and Microbiology, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel

### Bdellovibrio bacteriovorus strain 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AF084850.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) 

LOCUS AF084850 1436 bp DNA linear BCT 03-MAR-2000  
 DEFINITION Bdellovibrio bacteriovorus strain 100 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AF084850  
 VERSION AF084850.1 GI:7144667  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio bacteriovorus  
 ORGANISM [Bdellovibrio bacteriovorus](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;  
 Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1436)  
 AUTHORS Baer,M.L., Ravel,J., Chun,J., Hill,R.T. and Williams,H.N.  
 TITLE A proposal for the reclassification of Bdellovibrio stolpii and Bdellovibrio starrii into a new genus, Bacteriovorax gen. nov. as Bacteriovorax stolpii comb. nov. and Bacteriovorax starrii comb. nov., respectively  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 (Pt 1), 219-224 (2000)  
 PUBMED [10826807](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1436)  
 AUTHORS Baer,M.L., Ravel,J., Hill,R.T. and Williams,H.N.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (24-FEB-2000) Dept. of OCBS, University of Maryland at Baltimore, 666 West Baltimore Street, Baltimore, MD 21201, USA

## Bdellovibrio bacteriovorus strain TRA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AF148941.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) 

LOCUS AF148941 1380 bp DNA linear BCT 06-JUN-2000  
 DEFINITION Bdellovibrio bacteriovorus strain TRA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AF148941  
 VERSION AF148941.1 GI:8131956  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio bacteriovorus  
 ORGANISM [Bdellovibrio bacteriovorus](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales; Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1380)  
 AUTHORS Jurkevitch,E., Minz,D., Ramati,B. and Barel,G.  
 TITLE Prey range characterization, ribotyping, and diversity of soil and rhizosphere Bdellovibrio spp. isolated on phytopathogenic bacteria  
 JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 66 (6), 2365-2371 (2000)  
 PUBMED [10831412](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1380)  
 AUTHORS Jurkevitch,E. and Minz,D.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (07-MAY-1999) Plant Pathology and Microbiology, Hebrew University of Jerusalem, Faculty of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, P.O.Box 12, Rehovot 76100, Israel

## Bdellovibrio exovorus strain JSS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

NCBI Reference Sequence: NR\_116108.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) 

LOCUS NR\_116108 1432 bp DNA linear BCT 20-MAY-2014  
 DEFINITION Bdellovibrio exovorus strain JSS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION NR\_116108  
 VERSION NR\_116108.1 GI:636560048  
 DBLINK Project: [33175](#)  
 BioProject: [PRJNA33175](#)  
 KEYWORDS RefSeq.  
 SOURCE Bdellovibrio exovorus JSS  
 ORGANISM [Bdellovibrio exovorus JSS](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales; Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1432)  
 AUTHORS Koval,S.F., Hynes,S.H., Flannagan,R.S., Pasternak,Z., Davidov,Y. and Jurkevitch,E.  
 TITLE Bdellovibrio exovorus sp. nov., a novel predator of Caulobacter crescentus  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63 (PT 1), 146-151 (2013)  
 PUBMED [22368169](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1432)  
 CONSRM NCBI RefSeq Targeted Loci Project  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (23-APR-2014) National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, MD 20894, USA  
 REFERENCE 3 (bases 1 to 1432)  
 AUTHORS Davidov,Y., Koval,S. and Jurkevitch,E.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (18-JUN-2007) Biological Chemistry, The Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

## Bdellovibrio sp. Annapolis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AY094108.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)
Go to: 

LOCUS AY094108 684 bp DNA linear BCT 14-MAR-2005  
 DEFINITION Bdellovibrio sp. Annapolis 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AY094108  
 VERSION AY094108.1 GI:20278696  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio sp. Annapolis  
 ORGANISM [Bdellovibrio sp. Annapolis](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales; Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 684)  
 AUTHORS Snyder,A.R., Williams,H.N., Baer,M.L., Walker,K.E. and Stine,O.C.  
 TITLE 16S rDNA sequence analysis of environmental Bdellovibrio-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (PT 6), 2089-2094 (2002)  
 PUBMED [12508873](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 684)  
 AUTHORS Snyder,A.R., Williams,H.N., Baer,M.L., Walker,K.E. and Stine,O.C.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-APR-2002) Epidemiology and Prevention Medicine, University of Maryland School of Medicine, Howard Hall, 660 West Redwood Street, Baltimore, MD 21201, USA

## Bdellovibrio sp. Cancun7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AY094113.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)
Go to: 

LOCUS AY094113 1097 bp DNA linear BCT 14-MAR-2005  
 DEFINITION Bdellovibrio sp. Cancun7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AY094113  
 VERSION AY094113.1 GI:20278701  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio sp. Cancun7  
 ORGANISM [Bdellovibrio sp. Cancun7](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales; Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1097)  
 AUTHORS Snyder,A.R., Williams,H.N., Baer,M.L., Walker,K.E. and Stine,O.C.  
 TITLE 16S rDNA sequence analysis of environmental Bdellovibrio-and-like organisms (BALO) reveals extensive diversity  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (PT 6), 2089-2094 (2002)  
 PUBMED [12508873](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1097)  
 AUTHORS Snyder,A.R., Williams,H.N., Baer,M.L., Walker,K.E. and Stine,O.C.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-APR-2002) Epidemiology and Prevention Medicine, University of Maryland School of Medicine, Howard Hall, 660 West Redwood Street, Baltimore, MD 21201, USA

## Bdellovibrio sp. CHI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AY294207.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) 

LOCUS AY294207 690 bp DNA linear BCT 24-SEP-2004  
 DEFINITION Bdellovibrio sp. CHI 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AY294207  
 VERSION AY294207.1 GI:34604504  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio sp. CHI  
 ORGANISM [Bdellovibrio sp. CHI](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;  
 Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.

REFERENCE 1 (bases 1 to 690)  
 AUTHORS Davidov,Y. and Jurkevitch,E.  
 TITLE Diversity and evolution of Bdellovibrio-and-like organisms (BALOs),  
 reclassification of Bacteriovorax starrii as Peredibacter starrii  
 gen. nov., comb. nov., and description of the  
 Bacteriovorax-Peredibacter clade as Bacteriovoracaceae fam. nov  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54 (PT 5), 1439-1452 (2004)  
 PUBMED [15388693](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 690)  
 AUTHORS Davidov,Y. and Jurkevitch,E.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (08-MAY-2003) Plant Pathology and Microbiology, Faculty  
 of Agricultural, Food and Environmental Quality Sciences, The  
 Hebrew University of Jerusalem, Rehovot 76100, Israel

## Bdellovibrio sp. Gunpowder 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AF084853.1

[FASTA](#) [Graphics](#)[Go to:](#) 

LOCUS AF084853 1474 bp DNA linear BCT 27-FEB-2001  
 DEFINITION Bdellovibrio sp. Gunpowder 16S ribosomal RNA gene, partial  
 sequence.  
 ACCESSION AF084853  
 VERSION AF084853.1 GI:13128868  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio sp. Gunpowder  
 ORGANISM [Bdellovibrio sp. Gunpowder](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;  
 Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1474)  
 AUTHORS Baer,M.L., Ravel,J., Hill,R.T. and Williams,H.N.  
 TITLE Comparison of Bdellovibrio sp. by 16S rDNA analysis and DNA-DNA  
 homology  
 JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 1474)  
 AUTHORS Baer,M.L., Ravel,J., Hill,R.T. and Williams,H.N.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (20-AUG-1998) Dept. of OCBS, University of Maryland at  
 Baltimore, 666 West Baltimore Street, Baltimore, MD 21201, USA

## Bdellovibrio sp. Hefner 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AY094114.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)
Go to: 

LOCUS AY094114 1077 bp DNA linear BCT 14-MAR-2005  
 DEFINITION Bdellovibrio sp. Hefner 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AY094114  
 VERSION AY094114.1 GI:20278702  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio sp. Hefner  
 ORGANISM [Bdellovibrio sp. Hefner](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;  
 Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1077)  
 AUTHORS Snyder,A.R., Williams,H.N., Baer,M.L., Walker,K.E. and Stine,O.C.  
 TITLE 16S rDNA sequence analysis of environmental Bdellovibrio-and-like  
 organisms (BALO) reveals extensive diversity  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (PT 6), 2089-2094 (2002)  
 PUBMED [12508873](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1077)  
 AUTHORS Snyder,A.R., Williams,H.N., Baer,M.L., Walker,K.E. and Stine,O.C.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-APR-2002) Epidemiology and Prevention Medicine,  
 University of Maryland School of Medicine, Howard Hall, 660 West  
 Redwood Street, Baltimore, MD 21201, USA

## Bdellovibrio sp. Lanham 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AY094116.1

[FASTA](#) [Graphics](#) [PopSet](#)
Go to: 

LOCUS AY094116 1049 bp DNA linear BCT 14-MAR-2005  
 DEFINITION Bdellovibrio sp. Lanham 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AY094116  
 VERSION AY094116.1 GI:20278704  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Bdellovibrio sp. Lanham  
 ORGANISM [Bdellovibrio sp. Lanham](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;  
 Bdellovibrionaceae; Bdellovibrio.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1049)  
 AUTHORS Snyder,A.R., Williams,H.N., Baer,M.L., Walker,K.E. and Stine,O.C.  
 TITLE 16S rDNA sequence analysis of environmental Bdellovibrio-and-like  
 organisms (BALO) reveals extensive diversity  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52 (PT 6), 2089-2094 (2002)  
 PUBMED [12508873](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1049)  
 AUTHORS Snyder,A.R., Williams,H.N., Baer,M.L., Walker,K.E. and Stine,O.C.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (04-APR-2002) Epidemiology and Prevention Medicine,  
 University of Maryland School of Medicine, Howard Hall, 660 West  
 Redwood Street, Baltimore, MD 21201, USA

## Bdellovibrio starrii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

GenBank: AF084852.1

[FASTA](#) [Graphics](#)Go to: 

LOCUS AF084852 1457 bp DNA linear BCT 03-MAR-2000  
 DEFINITION Bdellovibrio starrii 16S ribosomal RNA gene, partial sequence.  
 ACCESSION AF084852  
 VERSION AF084852.1 GI:7144668  
 KEYWORDS .  
 SOURCE Peredibacter starrii  
 ORGANISM [Peredibacter starrii](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;  
 Bacteriovoracaceae; Peredibacter.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1457)  
 AUTHORS Baer,M.L., Ravel,J., Chun,J., Hill,R.T. and Williams,H.N.  
 TITLE A proposal for the reclassification of Bdellovibrio stolpii and  
 Bdellovibrio starrii into a new genus, Bacteriovorax gen. nov. as  
 Bacteriovorax stolpii comb. nov. and Bacteriovorax starrii comb.  
 nov., respectively  
 JOURNAL Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50 (Pt 1), 219-224 (2000)  
 PUBMED [10826807](#)  
 REFERENCE 2 (bases 1 to 1457)  
 AUTHORS Baer,M.L., Ravel,J., Hill,R.T. and Williams,H.N.  
 TITLE Direct Submission  
 JOURNAL Submitted (24-FEB-2000) Dept. of OCBS, University of Maryland at  
 Baltimore, 666 West Baltimore Street, Baltimore, MD 21201, USA

## Bdellovibrio stolpii 16S ribosomal RNA

GenBank: M34125.1

[FASTA](#) [Graphics](#)Go to: 

LOCUS BDLRRSAA 1553 bp rRNA linear BCT 27-APR-1993  
 DEFINITION Bdellovibrio stolpii 16S ribosomal RNA.  
 ACCESSION M34125  
 VERSION M34125.1 GI:173851  
 KEYWORDS 16S ribosomal RNA.  
 SOURCE Bacteriovorax stolpii  
 ORGANISM [Bacteriovorax stolpii](#)  
 Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Bdellovibrionales;  
 Bacteriovoracaceae; Bacteriovorax.  
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1553)  
 AUTHORS Woese,C.R.  
 JOURNAL Unpublished  
 COMMENT Original source text: Bdellovibrio stolpii (strain uki-2) rRNA.  
 Draft entry and computer-readable sequence for [1] kindly submitted  
 by C.R.Woese, 09-MAY-1990.  
 Author address: C.R.Woese  
 University of Illinois  
 Dept Microbiology, 131  
 131 Burrill Hall  
 407 S. Goodwin Ave.  
 Urbana, IL 61801  
 (217) 333-9369.

**ANEXO 3: Fórmula y características de los componentes utilizados en medios de cultivo**

- AGAR TÉCNICO N°3 (OXOID™): “Working strength”: 1,2%; Humedad: <12%; Claridad: moderada y contenido en minerales: alto.
  
- CALDO NUTRITIVO (OXOID™): Extracto de carne: 1g/l; extracto de levadura: 2g/l; peptona: 5g/l y cloruro sódico: 5g/l.
  
- PEPTONA BACTERIOLÓGICA (OXOID™): (%peso por peso). Nitrógeno total: 14; nitrógeno amino: 2,6 y cloruro sódico: 1,6. pH en el 2% de solución: 6,2+ - 0,2 a 25°C.
  
- EXTRACTO DE CARNE (OXOID™): (%peso por peso). Nitrógeno total 12,4; nitrógeno amino: 2,5 y cloruro sódico: 1,1. pH en el 2% de solución: 7,2 a 25°C.
  
- HIDROLIZADO (ÁCIDO) DE CASEINA (OXOID™): (%peso por peso). Nitrógeno total: 7,6; nitrógeno amino: 4,9 y cloruro sódico: 28,3; Triptófano: < 0,1, pH en el 1% de solución: 7 a 25°C.
  
- EXTRACTO DE LEVADURA (OXOID™): Nitrógeno total: 10-12,5; nitrógeno amino: 5,1 y cloruro sódico: 0,3. pH en el 0,5% de solución: 7+ - 0,2 a 25°C.
  
- HIDRÓXIDO DE SODIO EN PERLAS (SCHARLAU™): Perlas de NaOH.  
M=40,00
  
- RINGERS ¼ TABLETAS (MICROKIT™): Cloruro sódico: 2,250 g; cloruro potásico: 0,105 g; cloruro cálcico 6- H<sub>2</sub>O: 0,120 g; bicarbonato sódico: 0,050 g; pH final: 7,0 ± 0.2.

## ANEXO 4: Composición de los medios de cultivo para detección y análisis de BALOs

### Medios líquidos

#### Medio NB:

3 g de proteosa peptona (Oxoid™).

5 g de peptona bacteriológica (Oxoid™).

5 g de hidrolizado de caseína (Oxoid™).

1 g de extracto de levadura (Oxoid™).

Después de autoclavar:

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (2mM).

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (3mM).

#### Medio PYE (Peptone Yeast Extract):

10 g de peptona bacteriológica (Oxoid™).

3 g de extracto de levadura (Oxoid™).

Después de autoclavar:

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (2mM).

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (3mM).

#### Medio sintético M9:

6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

0,5 g de NaCl

1 g de NH<sub>4</sub>Cl

Después de autoclavar:

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (0,1M).

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (1M).

### Medios sólidos

#### Placas de NB (AN):

Medio NB más 12 g de agar técnico N°3 (Oxoid™).

#### Placas de PYE (APYE):

Medio PYE más 12 g de agar técnico N°3 (Oxoid™).

#### Placas de McConkey Cristal Violeta (Oxoid™):

20 g de peptona.

10 g de lactosa.

1,5 g de sales Biliares N° 3.

5 g de cloruro Sódico.

0,03 g de rojo Neutro.

0,01 g de cristal violeta.

15 g de agar

#### Placas de caldo McConkey (Oxoid™):

20 g de peptona.

10 g de lactosa.

5 g de sales biliares N° 3.

5 g de cloruro sódico.

0,075 g de rojo neutro.

12 g de agar

Placas de agar doble (“Técnica de la doble capa de agar”). Composición para el “agar de base” y el de “cobertera”:

0,3 g de extracto de carne

0,5 g de peptona bacteriológica

0,5 g de extracto de caseína

0,1 g de extracto de levadura

pH  $\pm$  7,2 ajustado con NaOH

-Después de autoclavar:

CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (2mM).

MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O (3mM).

Agar técnico N°3 al 0,85% para el “agar de base”

Agar técnico N°3 al 0,65% para el “agar de cobertera”

El “agar de cobertera” se llevó a una temperatura de 42°- 43° antes de mezclar el depredador con la presa en él. Posteriormente, se vertió todo el contenido sobre la placa de “agar base” antes de proceder a su incubación.