

## Estudio crítico de la viabilidad *in vitro* de bacterias depredadoras del grupo BALOs: una necesidad para su uso en el control de patógenos.

R. Solana-Guillén<sup>1</sup>, F. Torrella<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Dpto. Genética y Microbiología; Facultad de Biología, Universidad de Murcia, [rafael.solana@um.es](mailto:rafael.solana@um.es); [torrella@um.es](mailto:torrella@um.es)

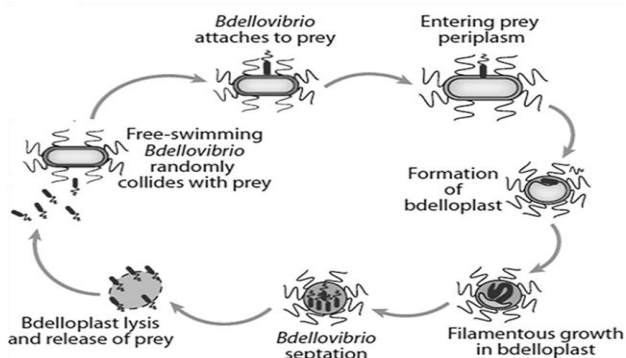
### Introducción:

Las bacterias depredadoras género *Bdellovibrio* fueron descubiertas por H. Stolp y H. Petzold en 1962 [1]. Son pequeños vibrios (0.2–0.5µm x 0.5–2.5µm) gram-negativos, quimioorganótrofos, aerobios, mesófilos y depredadores de bacterias gram-negativas. Poseen un sólo flagelo polar envainado y se desplazan a gran velocidad, hasta 100 veces su tamaño celular por segundo [2].

Este género pertenece a las *Proteobacterias*, clase  $\delta$ -*proteobacteria*, orden *Bdellovibrionales* y familia *Bdellovibrionaceae*. Su amplio espectro de presas y diversidad de ecosistemas, han provocado la incorporación al grupo de otras especies similares depredadoras de bacterias gram-negativas [3]. Esta “progenie taxonómica” del original *Bdellovibrio*, recibe el nombre de BALOs (*Bdellovibrio* And Like Organisms) [4] que se distribuyen en tres familias de  $\delta$ -*proteobacteria*: *Bdellovibrionaceae*, *Bacteriovoraceae* y *Peridibacteraceae*; y una  $\alpha$ -*proteobacteria* (*Micavibrio aeruginosavorus*) [5].

Los BALOs poseen un ciclo de vida de dos fases: de ataque y de crecimiento y división (Fig.1). En fase de ataque, los BALOs son móviles, no se dividen y atacan fijándose a la presa por colisiones aleatorias [6] o, como sugieren algunos autores, por quimiotaxis [7].

En la fase de crecimiento, los BALOs típicos penetran la pared y crecen en el periplasma en forma de filamento. En esta etapa, la célula se transforma en un bdelloplasto del que emergen células de ataque cuando el filamento ha completado una división múltiple en pequeños vibrios móviles por septación [8].



**Fig.1.** Ciclo de vida de los BALOs según los conocimientos actuales; compuesto por una fase de ataque y otra de crecimiento y división en el periplasma de la presa [8].

Ante el problema del incremento de las multirresistencias a los antimicrobianos de las bacterias responsables de enfermedades infecciosas, la capacidad depredadora de los BALOs, ha suscitado interés como agentes de control de bacterias patógenas en humanos. Prueba de ello es el actual Programa de Depredadores de Patógenos (Agencia DARPA, USA) [9] dotado de un importante presupuesto [10].

Debido a la rápida pérdida de viabilidad de los BALOs en los cultivos bimembres activos (“lisados”), hasta la fecha se han probado diferentes metodologías para conservar su viabilidad con éxito diverso [5,12]. En este trabajo se presentan resultados de la línea de investigación sobre la conservación de BALOs a largo plazo, usando como modelo la cepa MuRa1 aislada en aguas dulces de Murcia.

**Objetivos:**

El objetivo de este trabajo es la obtención de un método fiable y rápido de conservación a largo plazo de cepas de BALOs de reciente aislamiento, así como la reactivación de cepas de BALOs congeladas a  $<-70^{\circ}\text{C}$  en presencia de glicerol.

**Metodología:**

Microorganismos: Para este trabajo, se ha usado la cepa de BALO MuRa1 aislada sobre *E. coli* K-12 a partir de la laguna de tratamiento de agua residual de la E.D.A.R. del Campus Universitario de Espinardo. *E. coli* K-12 se ha mantenido en agar NB (ANB) (Oxoid™) a  $37^{\circ}\text{C}$  y se cultivó en caldo NB-10 ( $37^{\circ}\text{C}$ , 70 rpm) en baño termostático (Mettler™) como fuente de presa para cultivos líquidos bimembres. MuRa1 se ha mantenido en cultivo mixto con su presa en caldo NB-10 a  $30^{\circ}\text{C}$  en incubadora orbital a 70rpm (Gallenkamp™) así como en cultivo estático.

Detección en medio sólido y recuento de BALOs en placa: Para el revelado de calvas (zonas de lisis) de BALOs, se ha usado la técnica de la doble capa de agar (DCA) [13] con medio ANB-10 para la base y agar blando NB-10 para el "agar de cobertera".

Detección y seguimiento de lisis en medio líquido: La comprobación de la lisis en medio líquido se realizó en caldo NB-10 mediante la medida de  $\text{DO}_{600}$  en espectrofotómetro (Spectronic 20) y controles periódicos mediante contraste de fase.

Conservación a largo plazo de cepas de BALOs y reactivación: La conservación a largo plazo de la cepa MuRa1 se ha realizado por congelación (SANYO™ MDF-192) a  $<-70^{\circ}\text{C}$  de lisados en medio NB-10 con glicerol al 20%. Se congelaron tanto lisados terminales (dominancia de MuRa1 infectivo) como intermedios (mezcla de *E. coli* K-12, bdelloplastos y células libres de MuRa1).

Microscopía: Para microscopía óptica (contraste de fase, campo claro y campo oscuro), se usaron instrumentos Olympus™ BH2 o BX53 provistos de cámara de vídeo y captación de imagen (Olympus™ DP72).

Para microscopía electrónica (JEOL-JEM-1011), las células se fijaron con formaldehído al 3% (12h,  $4-8^{\circ}\text{C}$ ), se lavaron dos veces centrifugando a 7500xg en una centrífuga SORVALL™ RC5B plus refrigerada y se resuspendieron en agua destilada. La preparación de tinciones negativas (Acetato de Uranilo al 0,5%), se hizo sobre rejillas de 200 mesh (VECO) con película de formvar®.

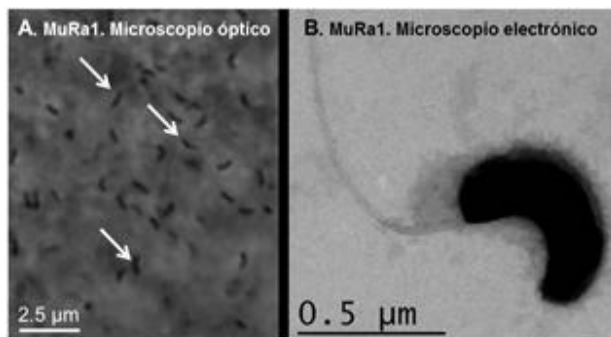
**Resultados y discusión:**

Recuperación de MuRa1 mantenidos con glicerol a  $<70^{\circ}\text{C}$ : Tras descongelar a temperatura ambiente los viales de lisados de la cepa MuRa1 crecida sobre *E. coli* K12, se prepararon cultivos bimembres en proporción 1:20 (Lisado descongelado: medio NB-10) que se mantuvieron en agitación a  $30^{\circ}\text{C}$  y 70 rpm hasta 25 días con controles periódicos. La congelación y posterior recuperación se ensayó tanto con lisados activos con la mayoría de células de MuRa1 en fase de ataque (Fig.2), como a partir de lisados incompletos en los que la fase bdelloplasto dominaba; pues se ha descrito que la congelación de BALOs en esta fase es mejor que en fase de ataque [5]. En ninguno de los dos casos se obtuvieron lisados activos ni los controles microscópicos mostraron células de MuRa1 en fase de ataque en todo el periodo. Sólo proliferó *E.coli* K-12 a partir de células supervivientes en los inóculos del congelado.

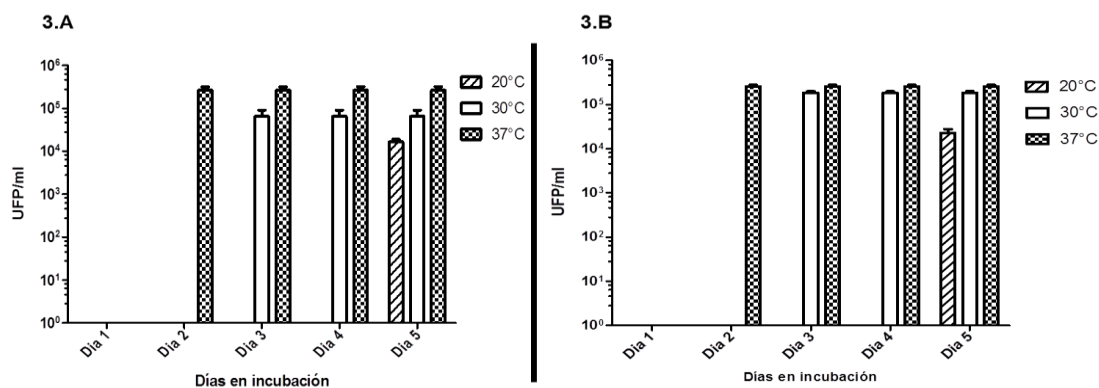
En otro ensayo de recuperación, los cultivos bimembres se pulsaron con proteosa-peptona al 0,5% final con objeto de comprobar si la “reactivación metabólica del sistema” conducía a lisados activos. Tampoco se consiguió lisado alguno con esta modificación.

Recuperación de BALOs a distintas temperaturas: Tras el fracaso de la recuperación de bdellovibrios activos en medio líquido, se ensayó la siembra en medio sólido con la técnica de la

DCA. A partir de una dilución 1:20 del congelado en glicerol de MuRa1-*E.coli* K-12, se prepararon diluciones decimales y placas DCA de la forma habitual con *E.coli* K12 como presa. Se prepararon tres réplicas de cada placa que se incubaron durante 5 días a 20, 30 y 37°C respectivamente. Asimismo, se preparó otra serie de placas con el mismo medio NB-10 enriquecido con un 0,5% de extracto de levadura. El resultado de la secuencia temporal de la aparición de calvas de BALOs, se muestra en la Fig.3.



**Fig.2.** Morfología al microscopio óptico (A) y electrónico (B) del BALO MuRa1.



**Fig.3.** Cronología de aparición de calvas y cantidad de BALOs detectados a diferentes temperaturas en DCA, tanto en caldo NB-10 (3.A) como en NB-10+0,5% de extracto de levadura (3.B), desde un lisado mantenido en congelación a <70°C v 20% de glicerol.

Los resultados demuestran que en medio sólido se produjo reactivación y recuperación de BALOs infecciosos a diferencia de lo observado en cultivo líquido. La aparición de calvas de lisis se produce ya al segundo día de siembra a 37°C ( $2 \times 10^5$  -  $3 \times 10^5$  UFP/ml del congelado original) mientras que las calvas no aparecen hasta el tercer día a 30°C y el quinto día a 20°C. La cantidad de ufp de BALOs a 37°C ha sido siempre mayor que a las otras temperaturas en un periodo de 5 días de control de las DCA.

Puesto que el extracto de levadura potenció la recuperación de bdellovibrios infecciosos en placa (Fig.3), se repitió el ensayo de recuperación en medio líquido NB-10 a 20, 30 y 37°C enriqueciendo este medio con extracto de levadura al 0,5% final en lugar de proteosa peptona como se había hecho anteriormente. Tampoco en este caso se consiguió obtener cultivos bimembres activos a ninguna de las tres temperaturas, a pesar de que la incubación de los cultivos en agitación se prolongó 14 días. La literatura propone esta metodología para reactivar BALOs congelados en presencia de glicerol [5].

A partir de los cultivos negativos de la experiencia anterior (NB-10+extracto de levadura), a los dos días de incubación en medio líquido, se sembraron placas DCA para investigar la presencia de BALOs viables. La Tabla 1, muestra la positividad de BALOs en el medio sólido (formación de calvas de lisis), igual que ocurrió en el ensayo resumido en la Fig.3 aunque en este último caso la recuperación había disminuido a  $3 \times 10^4$  UFP/ml.

Dilución	En líquido	Temperatura	Lisis	En placa	UFP/ml
1:20	3 días, 70rpm	20°C	-	DCA	$2 \times 10^3$
1:20	3 días, 70rpm	30°C	-	DCA	$3 \times 10^4$
1:20	3 días, 70rpm	37°C	-	DCA	$5 \times 10^3$

**Tabla 1.** Reactivación a distintas temperaturas, en NB-10 líquido y posteriormente en placas NB-10 (método DCA) del BALO MuRa1 en fase de ataque y congelado en presencia de glicerol.

Las causas que determinan que la reactivación de BALOs a partir de congelados con glicerol se haya conseguido en medio sólido y no en líquido están en estudio. Entre los factores que pueden explicar el fenómeno, está el que la capa superior de una DCA crea un ambiente semejante a un biofilm natural en el que se ha descrito que los BALOs proliferan activamente [5,12]. Por otra parte, la presencia de glicerol residual en cultivos líquidos podría ser un factor negativo a tener en cuenta [14].

Viabilidad de MuRa1 a concentraciones crecientes de glicerol: Para valorar la capacidad de lisis de MuRa 1 en presencia de glicerol y tras comprobar que el hospedador elegido (*E. coli* K-12) podía utilizar el glicerol para su crecimiento en solitario, se preparó una serie de lisados activos de MuRa1 incubados en matraces con NB-10, a 30°C, 70 r.p.m. y distintas concentraciones de glicerol (desde el 0,001% hasta el 20 %).

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	- / 0,15	+ / 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.

**Tabla 2.** Control de la lisis en cultivos bimembres de BALO MuRa1 y *E. coli* K12 en presencia de distintas concentraciones de glicerol a lo largo del tiempo (días).

La Tabla 2 muestra que a bajas concentraciones de glicerol, la lisis ocurre al segundo día de incubación (la absorbancia disminuye por la lisis) y que a medida que la concentración de glicerol aumenta, la lisis se retrasa. A partir del 1% de glicerol, no se detectó lisis. El aumento de la absorbancia se debió a la proliferación de “presas”. Al 20% de glicerol, no se observó crecimiento de *E. coli* K-12.

Para corroborar lo anterior, se tomó un inóculo de un cultivo en NB-10 y 5% de glicerol en el cual no había lisis y se diluyó en NB-10 con la concentración de glicerol <0,5%. Se observó lisis a las 24 horas y 30°C lo cual pone de manifiesto la acción inhibitoria del glicerol en la reactivación de MuRa1, a pesar de ser el protector de elección para su congelación, sin que los autores especifiquen nada respecto al efecto del glicerol y las diluciones necesarias para la reactivación [12].

**Conclusiones:**

- Ni la adición de nutrientes extra, ni la incubación a 20, 30 y 37°C, son válidos para la reactivación efectiva de la cepa de BALO MuRa1 si se diluye 1/20 en caldo NB-10.
- La técnica más fiable para recuperar BALOs después de su congelación con glicerol, ha sido mediante siembra en DCA NB-10 a 37°C a partir de la dilución 1/20 del vial.
- Para que se produzca la reactivación de MuRa1 mantenida en congelación, la concentración de glicerol debe ser inferior al 0,5% en el medio de recuperación.

**Referencias bibliográficas:**

- [1] Stolp, H., Petzold, H. (1962). Untersuchungen uber einen obligat parasitischen Mikroorganismus mit lytischer Aktivitiit fur Pseudomonas Bakterien. *Phytopathol Z*, 45, 364–370.
- [2] Rittenberg, S. C. (1983). *Bdellovibrio*: attack, penetration, and growth on its prey. *ASM News*, 49, 435–439.
- [3] Sockett, R. E. (2009). Predatory Lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annu Rev Microbiol*, 63, 523–39.
- [4] 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. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52, 2089–94.
- [5] Rotem, O., Pasternak, Z., Jurkevitch, E. (2014). The Genus *Bdellovibrio* and Like Organisms. In Rosenberg E et al (eds). *The Prokaryotes – Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria* (pp. 3-18). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- [6] Varon, M. Shilo, M. (1980). Ecology of aquatic bdellovibrios. *Academic Press*, New York, USA.
- [7] Lambert, C., Smith, M. C., Sockett, R. E. (2003). A novel assay to monitor predator-prey interactions for *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J reveals a role for methyl-accepting chemotaxis proteins in predation. *Environ Microbiol*, 5, 127–132.
- [8] Sockett, R.E. (2009). Predatory Lifestyle of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Annu Rev Microbiol*, 63, 523–39.
- [9] DARPA (2015). Pathogen Predators. Recuperado de <http://www.darpa.mil/program/pathogen-predators>
- [10] Reardon, S. (2015). Antibiotic alternatives rev up bacterial arms race. *Nature*, 521, 402-403.
- [11] Hespell, R. B., Rosson, R. A., Thomashow, M. F., & Rittenberg, S. C. (1973). Respiration of *Bdellovibrio bacteriovorus* strain 109J and its energy substrates for intraperiplasmic growth. *J Bacteriol*, 113(3), 1280-1288.
- [12] Jurkevitch, E. (2006). The Genus *Bdellovibrio*. In Dworking M et al (eds). *The Prokaryotes – Proteobacteria: Delta and Epsilon subclasses. Deeply Rooting Bacteria* (pp. 12-30). Berlin, Germany: Springer-Verlag.
- [13] Seidler, R. J., Starr, M.P. (1969). Isolation and characterization of host-independent bdellovibrios. *J Bacteriol*, 100, 769-785.
- [14] 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. *Appl Environ Microbiol*, 77(7), 2224–2231.