



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea  
Facultad de Ciencia y Tecnología



GRADO EN BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

“Efecto de la radiación visible sobre la supervivencia de *Vibrio harveyi* en el medio marino”

Iratxe Estivariz López de Guereñu

Leioa, Julio 2013

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

## ÍNDICE:

❖ Abstract / Resumen .....	Páginas 2 y 3
❖ Introducción	
1. <i>Vibrio spp</i> y <i>Vibrio harveyi</i> .....	Página 3 y 4
2. Estado Viable No Cultivable .....	Páginas 4, 5 y 6
3. Efecto de la luz en las poblaciones microbianas .....	Páginas 6 y 7
4. Objetivo .....	Página 7
❖ Material y Métodos	
1. Origen de <i>Vibrio harveyi</i> , condiciones de mantenimiento en el laboratorio y obtención de inóculos .....	Página 8
2. Experiencias de supervivencia .....	Página 8
3. Técnicas de enumeración .....	Página 9
❖ Resultados .....	Páginas 10,11 y 12
❖ Discusión .....	Páginas 12 y 13
❖ Conclusiones .....	Páginas 13 y 14
❖ Bibliografía .....	Páginas 14, 15, 16 y 17

## **ABSTRACT:**

*Vibrio harveyi* is a marine microorganism which belongs to the family *Vibrionaceae*, pathogen of numerous marine animals, both invertebrate and vertebrate; it can produce economic losses in countries which obtains benefits from aquaculture. This microorganism lives in a nutrient poor environment, due to it is an oligotrophic microorganism. Furthermore, seawater contains a great deal of salts, so *V. harveyi* is a halophilic microorganism.

*V. harveyi* is able to enter in what is known as Viable But Nonculturable state (VBNC), in that state is able to survive stressful situations while maintaining low levels of activity and losing culturability. The visible light radiation produces a beneficial effect in living organisms, but it can also cause adverse effects in marine microbial populations.

In this work it has been investigated the entry into the VBNC state under 20°C in the control samples maintained in darkness and in samples remained under illumination. Results showed that cells maintained in darkness did not enter VBNC state, although there was a loss of cultivability related with cellular injury, caused by nutrients from the culture media. In contrast, cells that were exposed to visible light suffered a loss of culturability along exposure days. Thus, at the end of the experimental work, the 93% of the population remained in VBNC state. Therefore, visible light has a negative effect on the population of *V. harveyi* that is able to stay in a VBNC state to survive adverse conditions.

## **RESUMEN:**

*Vibrio harveyi* es un microorganismo marino perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, patógeno de numerosos animales marinos; tanto invertebrados como vertebrados, pudiendo producir pérdidas económicas en países que se benefician de la acuicultura. Se trata de un microorganismo que vive en un medio natural con escasa cantidad de nutrientes, por ello es un microorganismo oligotrofo. Además el medio marino es un medio con una gran cantidad de sales, con lo cual *V. harveyi* es una bacteria halófila.

*V. harveyi* es capaz de entrar en lo que se conoce como estado Viable No Cultivable (VNC), en dicho estado es capaz de sobrevivir a situaciones de estrés manteniendo niveles bajos de actividad y perdiendo la cultivabilidad. La radiación luminosa visible, a pesar de tener efectos beneficiosos en los seres vivos, puede provocar efectos negativos en las poblaciones microbianas marinas.

En este trabajo se determinó la entrada en estado VNC en sus condiciones de temperatura ambiente (20°C) tanto en un control en oscuridad así como bajo estrés lumínico. Los resultados mostraron como las células mantenidas en oscuridad no entraron en estado VNC, aunque sí se produjo una pérdida de cultivabilidad relacionada con lesiones celulares provocadas por los nutrientes de determinados medios de cultivo. En cambio, las células que fueron expuestas a la luz visible indicaron una pérdida de cultivabilidad a lo largo de los días de exposición, manteniéndose al finalizar el trabajo experimental el 93% de la población en estado VNC. Por lo tanto, la luz visible provoca un efecto negativo en la población de *V. harveyi* que es capaz de mantenerse en un estado VNC para sobrevivir a las condiciones adversas.

## **INTRODUCCIÓN:**

### **1. *Vibrio* spp y *V. harveyi*:**

La familia *Vibrionaceae* comprende organismos Gram negativos (Gram -), anaerobios facultativos y en su mayoría mesófilos; su morfología se caracteriza por ser bastones ligeramente curvos y rígidos, presentan una gran actividad móvil, ya que poseen un solo flagelo polar. Son oxidasa positivos y todas usan D-glucosa como principal fuente de carbono (Prescott *et al*, 1999).

La distribución y dinámica de las poblaciones de la familia *Vibrionaceae* están influenciadas por gradientes medioambientales como temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y otra serie de factores biológicos como puede ser la disponibilidad de hospedadores de los que son patógenos (Thompson & Polz 2006).

*Vibrio harveyi* es un microorganismo oligotrofo y halófilo marino. Microorganismos oligotrofos son aquellos cuya capacidad de competir en su hábitat natural se basa en su capacidad para vivir con escasez de nutrientes. *V. harveyi* ha sido incluido en esta clasificación, debido a que en el medio marino la cantidad de nutrientes de los que dispone es escasa. Los microorganismos halófilos son los que viven en medios que presentan una gran cantidad de sales, como para el caso de *V. harveyi* es el agua de mar. A pesar de que la mayoría de vibrios son mesófilos, *V.harveyi* mantiene un carácter psicrófilo/psicrotrofo y por tanto sobrevive mejor a temperaturas intermedias (15 – 20 °C). Su hábitat natural se localiza de forma libre en la columna de agua marina, así como en el tracto intestinal de algunos animales marinos (Bassler *et al.*, 1997).

Con el rápido desarrollo de la acuicultura, el microorganismo ha sido reconocido como una causa grave de enfermedad, sobre todo de invertebrados marinos, pudiendo provocar pérdidas económicas como ha sucedido con la pesca de gambas en zonas de Asia y Sudamérica. *Vibrio harveyi* es responsable de enfermedades infecciosas en algunos vertebrados como el lenguado o el tiburón amarillo. (Austin & Xhang, 2006), a los que causa vibriosis luminosa.

Los mecanismos causantes de la patogenicidad de *Vibrio harveyi* aún no han sido del todo aclarados, pero se considera que su virulencia se debe en parte a productos extracelulares (Austin & Xhang, 2006).

## **2. Estado Viable No Cultivable:**

Cuando a ciertas bacterias no diferenciadas se les expone a estrés ambiental, son capaces de entrar en lo que se conoce como estado Viable No Cultivable (VNC). Durante este estado las células mantienen niveles bajos de actividad metabólica, siendo incapaces de dividirse y por tanto no son cultivables.

Se considera una insuficiencia de las células para formar colonias en un medio sólido. No se trata de un estado permanente, sino que se trata de un proceso temporal y reversible del cual se puede *resucitar* a las células (Ramaiah *et al.*, 2002).

Numerosos autores han estudiado y descrito dicho estado (Bogosian & Bourneuf, 2001; Ramaiah *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2008; Barcina & Arana, 2009; Oliver, 2010). Típicamente el estado VNC es inducido en muchas bacterias por una combinación de factores ambientales que le producen estrés, como puede ser un mantenimiento en un medio escaso de nutrientes, por efectos de temperatura, salinidad o radiación luminosa (Wong & Wang, 2004).

El estado VNC genera una serie de cambios que afectan a la estructura y morfología de las células, siendo uno de los cambios más típicos una reducción del tamaño celular; así por ejemplo *V. harveyi* adquiere una forma cocoide y un claro empequeñecimiento de su tamaño (Sun *et al.*, 2008). Además, las células en este estado generalmente presentan disminuciones en la síntesis de macromoléculas, así como en sus tasas de respiración (Oliver, 2010).

Existen numerosas evidencias de bacterias tanto Gram+ como Gram-, así como de microorganismos patógenos o no patógenos capaces de entrar en estado VNC (Oliver, 2010). A continuación se muestra una figura en la cual se describen una serie de microorganismos patógenos capaces de entrar en estado VNC (Tabla 1).

**Tabla 1.** Algunos microorganismos patógenos capaces de entrar en el estado VNC.

<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>A. salmonicida</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. flexneri</i>
<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>K. planticola</i>	<i>S. sonnei</i>
<i>B. pseudomallei</i>	<i>Legionella pneumophila</i>	<i>Streptococcus faecalis</i>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>C. jejuni</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>V. anguillarum</i>
<i>C. lari</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>Cytophaga allerginae</i>	<i>Pasteurella piscicida</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>V. harveyi</i>
<i>E. cloacae</i>	<i>P. syringae</i>	<i>V. mimicus</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>E. hirae</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>	<i>V. shiloi</i>
<i>E. faecium</i>	<i>R. meliloti</i>	<i>V. vulnificus</i> (types 1 & 2)
<i>Erwinia amylovora</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Escherichia coli</i> (including EHEC)	<i>S. typhi</i>	<i>X. axonopodis</i> pv. <i>citri</i>
<i>Francisella tularensis</i>	<i>S. typhimurium</i>	

Diferentes estudios como el de Cappelier *et al.*, (2007) muestran como microorganismos como *Listeria monocytogenes*, son capaces de mantener su patogenicidad tras la entrada en estado VNC.

Wong & Wang (2004) detectaron como *V. parahemolyticus* es capaz de entrar en estado VNC y ser extremadamente resistente a elevadas temperaturas (42 - 47 °C) y a bajas salinidades (0% NaCl). Tal resistencia hace que aumente el riesgo en alimentos infectados con esta bacteria. Igualmente, Israely *et al.* (2001) observaron como *V. shiloi* mantiene su capacidad de infectar corales en estado VNC. Otros autores como Sun *et al.*, (2008), indican que *V. harveyi* presenta una incapacidad temporal para mostrar su virulencia, pero que su resucitación permite la expresión de los genes que actúan en su capacidad patógena. *V. harveyi* por tanto es capaz de mantener su patogenia potencial y provocar enfermedades.

Por otro lado, el estado VNC no ha de ser confundido con células lesionadas. Lesión en bacterias consiste en un aumento en la sensibilidad a los componentes del medio de crecimiento, que normalmente no son inhibitorios (Mackey, 2000). Este estado de lesión en bacterias consiste en un estado transitorio que surge como resultado del daño celular que producen los componentes del medio; y bajo condiciones adecuadas puede ser revertido permitiendo de nuevo que haya crecimiento celular (Bogosian & Bourneuf, 2001).

### **3. Efecto de la Luz en las poblaciones microbianas:**

La radiación electromagnética solar se puede dividir en tres bandas en función de su longitud de onda: radiación infrarroja (>700 nm), radiación visible (400 – 700 nm) y radiación ultravioleta (UV) (<400 nm). Son las dos últimas las que producen un efecto en los seres vivos.

La capa de ozono está compuesta en su mayoría por nitrógeno (78%) y oxígeno (26%). El porcentaje restante corresponde a otros elementos gaseosos en los que se encuentra el ozono. A pesar de que la proporción de ozono es muy pequeña en la atmósfera (0,01%) cumple una función imprescindible en el planeta, protegiéndonos de la radiación luminosa y en especial de la radiación UV (Sánchez, 2006).

Los efectos provocados por la radiación UV han sido ampliamente estudiados en poblaciones microbianas, conociéndose su efecto bactericida sobre los microorganismos. Por tanto, numerosos autores describen la aplicación de la luz UV como un método de desinfección alternativo (Beltrán & Jiménez, 2000, Pérez-Uz, 2010).

En cambio, el efecto que provoca la luz visible sobre las poblaciones microbianas marinas autóctonas, cobra importancia bajo una situación en la cual existe un problema ambiental global como es la disminución de la capa de ozono.

La luz visible o fotosintéticamente activa, es aquella que es aprovechada por los organismos fotosintéticos y transformada en energía metabólicamente aprovechable.

A pesar del efecto beneficioso de la luz solar para la vida, también puede generar efectos nocivos en las células. Tales efectos nocivos se manifiestan sobre todo en modificaciones que se producen en los ácidos nucleicos y en la generación de radicales libres de oxígeno que pueden provocar daños celulares de diversos tipos como deleciones o mutaciones en el DNA.

Estudios previos muestran como una exposición a la luz visible a enterobacterias como *Escherichia coli* en ambientes acuáticos supone un efecto deletéreo, lo que se manifiesta en la capacidad de las bacterias para formar colonias (Muela *et al.*, 2000). Otros estudios como el de Besnard *et al* (2002) muestra como *L. monocytogenes* es capaz de entrar en el estado VNC, viéndose dicha entrada afectada por diferentes causas, siendo una de ellas el efecto de la luz visible.

A pesar de que existen estudios sobre el efecto de la radiación luminosa visible sobre microorganismos (sobre todo en enterobacterias), son menos los estudios que hacen referencia al efecto de la luz visible sobre los microorganismos marinos.

#### **4. Objetivo:**

El estudio de la dinámica de *V. harveyi* en los sistemas acuáticos es de interés tanto socioeconómico como ecológico. El hecho de que *V.harveyi* adopte el estado VNC se relaciona con su capacidad para sobrevivir cuando las condiciones no son favorables.

En este trabajo se pretende comprender mejor la entrada de este microorganismo en estado VNC cuando es expuesto a la luz visible a 20°C.

## **MATERIALES Y MÉTODOS:**

### **1. Origen de *Vibrio harveyi*, condiciones de mantenimiento en el laboratorio y obtención de inóculos:**

La cepa *Vibrio harveyi* CECT 525 se obtuvo de la Colección española de Cultivos Tipo (Valencia) y se conservó en el laboratorio mediante el sistema Microbank.

La cepa se inoculó en 50 ml de caldo marino (CM) que se mantuvo a 28°C y en agitación durante 24 horas hasta que el cultivo alcanzase la fase estacionaria. Los cultivos se centrifugaron (5000 g, 20 minutos, 4° C) y se realizaron tres lavados en cloruro sódico estéril (NaCl 1,94 % [p/v]). La pastilla celular obtenida fue resuspendida en cloruro sódico estéril a la misma concentración.

### **2. Experiencia de supervivencia:**

Muestras de agua de mar se recogieron en Arminza (Bizkaia). Posteriormente este agua fue filtrada mediante filtros de nitrocelulosa de 8; 0,8; 0,45 y 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore) y tratada en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

El trabajo experimental se realizó en matraces Erlenmeyer lavados con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (97% [v/v]), aclarados con agua desionizada y sometidos a 250 °C durante 24 horas; de forma que así quedó eliminado cualquier resto de materia orgánica que pudiese haber en los matraces. Después los matraces Erlenmeyer se rellenaron con 300 ml del agua de mar filtrada previamente.

Los matraces se inocularon hasta alcanzar una densidad de 10<sup>8</sup> células/ml y se incubaron a 20 °C con agitación (100 r.p.m.) y expuestos a la luz (15,93 W/m<sup>2</sup>) mediante cinco lámparas SYLVANIA STANDARD F25 W/30''/133. Se utilizaron como control, matraces inoculados con la misma densidad de células, pero que se mantuvieron en oscuridad. Diariamente se recogieron alícuotas para la enumeración de

células totales (Total Direct Count, TDC/ml), células viables (MEMB+/ml) y cultivables (UFC/ml).

### 3. Técnicas de enumeración:

Para estimar la concentración final de bacterias en la suspensión se realizó una cuantificación mediante microscopía de epifluorescencia según el protocolo descrito por Hobbie *et al.* (1977).

El número total de bacterias se cuantificó mediante microscopía de epifluorescencia mediante el procedimiento descrito anteriormente. Para determinar el número de células viables se utilizó el Kit Dead Cell Discriminator (Invitrogen™) siguiendo el protocolo descrito por Banning *et al.* (2002). Este Kit utiliza yoduro de propidio (IP) que penetra en células que presentan la membrana dañada (MEMB -/ml), con lo cual el número de células viables (MEMB +/ml) se obtuvo mediante la diferencia de las células totales y el número de células con la membrana dañada.

Para determinar el número de células cultivables se realizó siembra en placa en agar marino (AM) y agar triptona-soja (TSA) mediante la técnica de microgota; las placas fueron incubadas a 28°C durante 24 horas. El Medio AM sirve para el aislamiento y enumeración de bacterias heterótrofas marinas como es *V. harveyi*. En su composición destaca una gran cantidad de sales como Cloruro Sódico o Cloruro Magnésico, mientras que la cantidad de nutrientes de los que consta es escasa, simulando un medio oligotrofo natural. Por otro lado, el Agar TSA presenta una gran cantidad de nutrientes orgánicos. Debido a esto es un Agar ampliamente utilizado para el aislamiento de microorganismos poco exigentes o moderadamente exigentes.

El cálculo de la proporción de células en estado VNC se obtuvo mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{(\text{Células Viables} - \text{Células Cultivables})}{\text{Células Totales}} \times 100$$

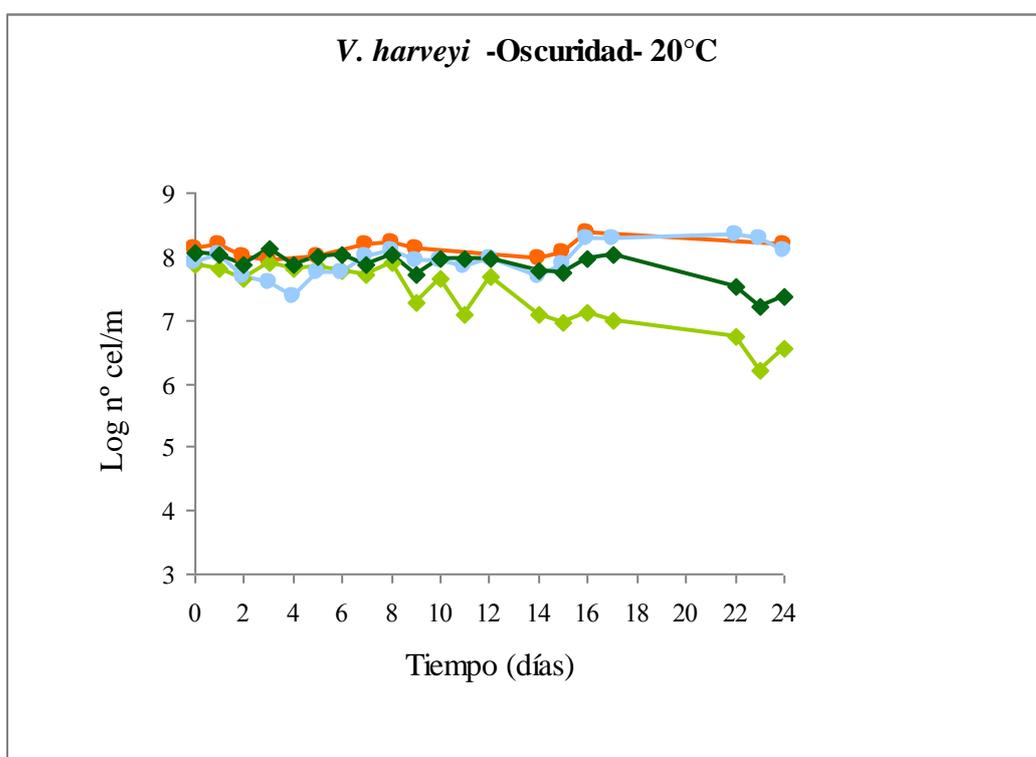
## RESULTADOS:

Los resultados obtenidos en las experiencias control mantenidas a 20°C en oscuridad (Figura 1) mostraron un mantenimiento de la densidad de células totales a lo largo de los 24 días que duró el experimento. El mismo patrón siguieron las células viables, que se mantuvieron en una densidad de aproximadamente  $10^8$  células/ml.

Por otro lado, se observaron diferencias significativas entre el número de células cultivables en los distintos medios de cultivo (AM y TSA) utilizados para la enumeración de células cultivables a lo largo de las experiencias de supervivencia.

El número de células cultivables en Medio AM se mantuvo constante hasta el día 17, a partir del cual se pudo apreciar un ligero descenso. Al finalizar el periodo de incubación se obtuvieron valores de entre  $10^7 - 10^8$  UFC/ml.

En cambio, la cultivabilidad en Agar TSA se vio comprometida varios días antes (día 12). Los valores que se llegaron a alcanzar estaban muy por debajo de los obtenidos en AM, siendo cercanos a  $10^7$  UFC/ml.

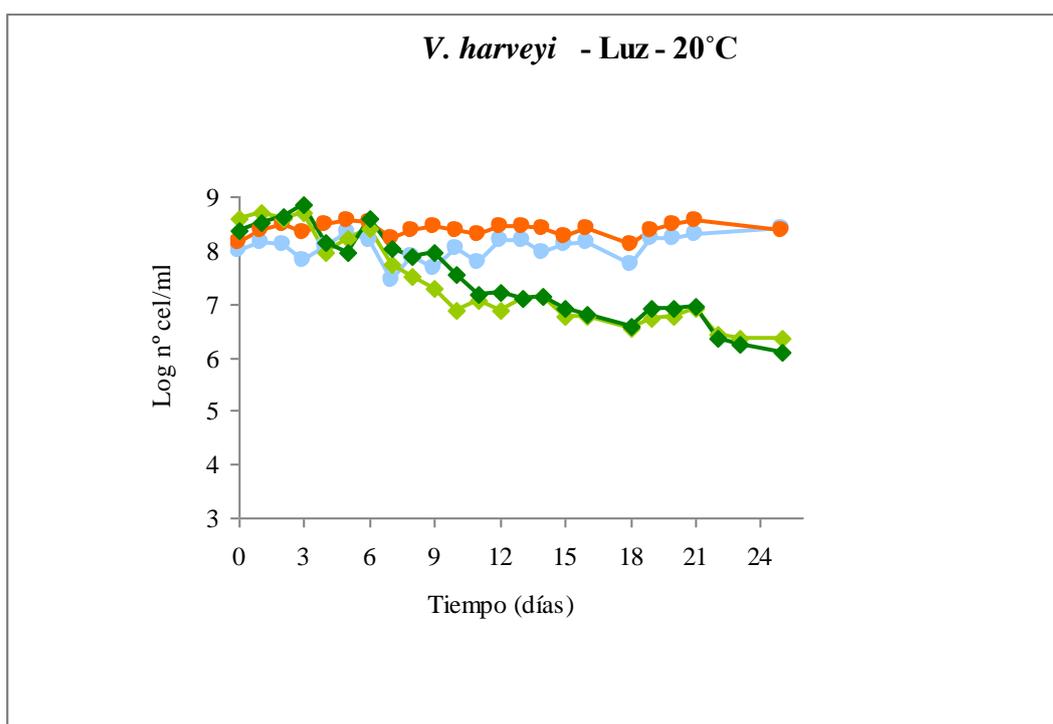


**Figura 1.** Variación en la densidad (células/ml) de *Vibrio harveyi* sin exposición a la luz y a 20°C en agua de mar. Número total de células ● (TDC/ml), número de células viables ● (MEMB+/ml). Número de células cultivables en agar marino ◆ (AM), número de células cultivables en agar triptona-soja ◆ (TSA).

Por otro lado, los resultados obtenidos para la experiencia de supervivencia a 20°C en condiciones de iluminación (Figura 2), mostraron un mantenimiento de células totales y viables a lo largo de los días de exposición, permaneciendo sus valores entorno a las 10<sup>8</sup> células/ml.

En contraste con los resultados obtenidos en el control en oscuridad, se advirtió una pérdida de cultivabilidad tanto en AM como en TSA. El declive se hizo más evidente a partir del día 6 de exposición, llegando a alcanzarse valores de 10<sup>7</sup> UFC/ml que disminuyó paulatinamente hasta alcanzar valores de 10<sup>6</sup> UFC/ml.

Se estableció por lo tanto una diferencia entre células viables y células cultivables de hasta dos órdenes de diferencia, indicativo de que el 93% de la población microbiana entró en estado VNC.



**Figura 2.** Variación en la densidad (células/ml) de *Vibrio harveyi* mantenidas en agua de mar bajo condiciones de iluminación a 20°C en agua de mar. Número total de células • (TDC/ml), número de células viables • (MEMB+/ml). Número de células cultivables en agar marino ♦ (AM), número de células cultivables en agar triptona-soja ♦ (TSA).

A continuación, se muestra una representación esquemática a modo de resumen, de las diferencias entre el control negativo en oscuridad a 20°C y el experimento realizado con

radiación luminosa y a la misma temperatura. Se trata de una comparación al finalizar el experimento con respecto a su comienzo (Tabla 2).

**Tabla 2.** Diferencias entre el control negativo en oscuridad a 20°C y el experimento con luz a 20°C. Mantenimiento a lo largo de los días de la experiencia de supervivencia (→), descenso a lo largo de los días (↓= 1 orden).

	Oscuridad, 20°C	Luz, 20°C
TDC/ml	→	→
MEMB+/ml	→	→
AM (UFC/ml)	→	↓↓
TSA (UFC/ml)	↓	↓↓

## **DISCUSIÓN:**

Los resultados obtenidos en el control en oscuridad, no son indicativos de que se produzca una entrada en estado VNC a pesar de que haya una pérdida de cultivabilidad y un mantenimiento del número de células viables y totales. A lo largo del tiempo que duró el trabajo experimental, se produce un mantenimiento de las células cultivables en Medio AM. Tal mantenimiento es atribuible al hecho de que *V. harveyi* es un microorganismo oligotrofo y halófilo y los componentes que le aporta el Medio AM son concordantes con los nutrientes disponibles en su medio natural. En cambio, los resultados para el Agar TSA indican cómo se produce una pérdida de cultivabilidad. Este Agar contiene una gran cantidad de nutrientes, más de los que dispone en su medio natural. Además contiene menos sales que el Medio AM. Con lo cual, la pérdida de cultivabilidad se puede relacionar con una lesión en las células que es inducida por los componentes del medio de cultivo.

Otros estudios contrastan con los resultados obtenidos, Mascher et al (2000) mostraron como *Pseudomonas fluorescens* entraba en estado VNC tras una exposición a concentraciones elevadas de sales. En cambio, *V. harveyi* según los resultados obtenidos en este trabajo, pierde cultivabilidad en medios con una concentración de sales no muy elevada como es el Agar TSA. Leyton y Riquelme (2008) atribuyen las

diferencias entre el Agar TSA y en Medio AM al exceso de nutrientes y/o menor concentración de sales del medio TSA respecto al medio AM.

A partir de estos resultados no se puede concluir que un mantenimiento de la población a 20°C provoque una pérdida de cultivabilidad que haga entrar a la población en estado VNC. Estudios previos (Arana *et al.*, 2010) corroboran que las bacterias autóctonas oligotrofas psicotrofas sobreviven mejor a temperaturas intermedias (15-20°C) que a bajas temperaturas (4°C).

Para las células expuestas a radiación luminosa y a 20°C, se advierte una pérdida de cultivabilidad tanto en Agar TSA como en Medio AM a lo largo de los días de exposición. Finalmente el 93% de la población se encuentra en estado VNC. Por lo tanto, los resultados muestran como bajo una exposición continuada a la luz visible *V. harveyi* adquiere la entrada en dicho estado.

Estudios previos apoyan estos resultados. Fujioka *et al* (1981), mostraron como la radiación luminosa tenía un efecto bactericida para las poblaciones bacterianas de aguas marinas, pero no llegaron a identificar si esas poblaciones eran capaces de sobrevivir en un estado de resistencia. Muela *et al* (2000) demostraron como *E. coli* es capaz de entrar en estado VNC tras una exposición a radiación luminosa. Además, Gin & Goh (2013) indican que la radiación luminosa juega un papel importante en la entrada de enterococos como *E. faecalis* en estado VNC.

## **CONCLUSIONES:**

- ❖ La aparente pérdida de cultivabilidad en *V. harveyi* en condiciones de oscuridad y a 20°C es atribuible a una lesión en las células provocada por las diferencias en composición y sales entre los medios de cultivo utilizados para el trabajo experimental (AM y TSA). Además, un mantenimiento de *V. harveyi* a una temperatura 20°C, no provoca una entrada en estado VNC por sí sola.
- ❖ *V. harveyi* adquiere el estado VNC a 20°C tras una exposición continuada a estrés lumínico, manteniéndose casi el total de la población en tal estado de resistencia.

Las conclusiones obtenidas en este trabajo amplían el conocimiento sobre *V. harveyi* y la adopción del estado VNC bajo condiciones de estrés. Consideramos que sería conveniente continuar el presente trabajo empleando técnicas de análisis molecular. Estas técnicas permitirían conocer el funcionamiento y establecer las modificaciones de sus proteínas cuando *V. harveyi* adopta dicho estado. Además, teniendo en cuenta que, en el caso de *Vibrio*, el estado VNC parece ser un estado reversible, debiera ampliarse esta información estudiando la posible reversión del proceso de entrada en estado VNC.

### **BIBLIOGRAFÍA:**

- ❖ Arana I., Muela A., Orruno M., Seco C., Garaizabal I., Barcina I., 2010. Temperature and starvation provoke different survival strategies and changes in outer membrane subproteome in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Ecol.* 74: 500-509
- ❖ Austin B., Zhang X-H., 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Appl Microbiol Lett.* 43: 119 – 124
- ❖ Banning N., Toze S., Mee B.J., 2002. *Escherichia coli* survival in groundwater and effluent measured using a combination of propidium iodide and the green fluorescent protein. *J Appl Microbiol.* 93: 69-76
- ❖ Barcina I., Arana I., 2009. The viable but nonculturable phenotype, a crossroad in the live cycle of non differentiating bacteria? *Rev Environ Sci Biotechnol.* 8: 245-255
- ❖ Bassler B.L., Greenberg E.P., Stevens A.M., 1997. Cross-species induction of luminescence in the quorum-sensing bacterium *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* 79(12):4043
- ❖ Beltrán N.A., Jiménez B.E., 2000. Eficiencia de la luz ultravioleta para la desinfección de agua residual con alto contenido de patógenos. Instituto de

Ingeniería. Grupo de Tratamiento y Reúso. Universidad Nacional Autónoma de México.

- ❖ Besnard V., Federighi M., Declerq E., Jugiau F., Cappelier J.M., 2002. Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *INRA, EDP Sciences*. 33: 359–370
- ❖ Bogosian G., Bourneuff E.V., 2001. A matter of bacterial life and dead. *EMBO reports*. 2(9)
- ❖ Cappelier J.M., Besnard V., Roche S.M., Velge P., Federighi M., 2007. Avirulent Viable But Non Culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *INRA, EDP Sciences*. 38: 573–583
- ❖ Fujikoa R.S., Hashimoto H.H., Siwak E.B., Young R.H., 1981. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl Environ Microbiol*. 41(3): 690
- ❖ Gin Y-H. K., Goh G. S., 2013. Modeling the effect of light and salinity on viable but non-culturable (VBNC) Enterococcus. *Water Research. Elsevier*. 47: 3315 – 3328
- ❖ Hobbie J.E., Caley R.J., Jasper S., 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 33: 1225-1228
- ❖ Israely T., Bannin E., Rosenberg E., 2001. Growth, differentiation and death of *Vibrio shiloi* in coral tissue as a function of seawater temperature. *Aquat Microb Ecol*. 24: 1–8
- ❖ Leyton Y., Riquelme C., 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev Biol Marina y Oceanografía*. 43(3): 441-456

- ❖ Mackey B.M., 2000. Injured Bacteria. En Lund B.M., Baird-Parker A., Gould G.M., (eds). *The Microbiological Safety and Quality of Food. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, M.* pp: 315-341.
  
- ❖ Mascher F., Hase C., Moëgne-Loccoz Y., Défago G., 2000. The Viable-but-Nonculturable state induced by abiotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 does not promote strain persistence in soil. *Appl and Environ Microbiol.* 66(4): 1662 – 1667
  
- ❖ Muela A., García-Bringas J.M., Arana I., Barcina I., 2000. The Effect of Simulated Solar Radiation on *Escherichia coli*: The Relative Roles of UV-B, UV-A, and Photosynthetically Active Radiation. *Microb Ecol.* 39:65–71
  
- ❖ Oliver J.D., 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 34: 415 – 425
  
- ❖ Pérez-UZ B., De Silóniz M.I., Torralba M., Vázquez C., 2010. Metodología de esterilización en el laboratorio microbiológico. *Reduca (Biología). Serie Microbiología.* 3 (5): 1-14
  
- ❖ Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 1999. Microbiology. 4<sup>a</sup> ed. *WCB McGraw-Hill. N.Y.*
  
- ❖ Ramaiah N., Ravel J., Straube W.L., Hill R.T., Colwell R.R, 2002. Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but nonculturable state. *J. App Microbiol.* 93: 108–116
  
- ❖ Sánchez C. F., 2006. The relationship between the ozone layer and skin cancer. *Rev Méd Chile.* 134: 1185-1190
  
- ❖ Sun F., Chen J., Zhong L., Zhang, X-H., Wang R., Guo Q., Dong Y., 2008. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol Ecol.* 64: 37–44

- ❖ Thompson J.R., Polz M.F., 2006. Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*. 13: 190-203.
  
- ❖ Wong H.C., Wang P., 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J. App Microbiol.* 96: 359–366