



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

**GRADO EN
BIOLOGÍA**

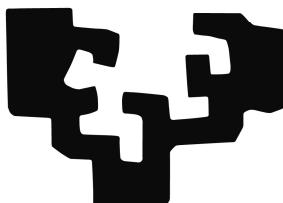
PROYECTO DE FIN DE GRADO

**Efecto de la radiación visible sobre la
supervivencia de *Acinetobacter baumannii*
sobre soportes inertes**

Sofía Fernández de Retana Alda

Leioa, Julio 2013

eman ta zabal zazu



**Universidad
del País Vasco**

**Euskal Herriko
Unibertsitatea**

INDICE

RESUMEN-ABSTRACT	2-3
INTRODUCCIÓN	4-7
Características generales de <i>Acinetobacter baumannii</i>	4
Importancia clínica.....	4-5
Supervivencia en ambientes hostiles.....	5-6
Objetivos.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8-10
<u>Preparación de inóculos</u>	8
<u>Ensayos de supervivencia</u>	8-9
Medio líquido.....	8
Soportes sólidos.....	8-9
<u>Enumeración de microorganismos</u>	9-10
Cálculo de fracciones poblacionales.....	9
Capacidad de formación de biofilms.....	10
RESULTADOS	11-15
DISCUSIÓN	16-18
BIBLIOGRAFÍA	19-22

RESUMEN

Acinetobacter baumannii es una bacteria de gran importancia clínica debido a las infecciones nosocomiales a las que se asocia. La amenaza que supone en el ámbito hospitalario está directamente relacionada con su capacidad para sobrevivir a condiciones hostiles tales como cambios de temperatura, estrés lumínico y sequedad. En este contexto, se ha estudiado el efecto de la radiación visible sobre poblaciones de *A. baumannii* (ATCC 19606) mantenidas a temperatura ambiente en medio líquido (condiciones de ayuno) y sobre soporte sólido (condiciones de ayuno y sequedad).

Para determinar la posible pérdida de cultivabilidad y la entrada en estado viable no cultivable (VNC), las poblaciones de *A. baumannii* se inocularon en solución salina estéril o se fijaron a filtros de acetato de celulosa estériles y se incubaron a 20°C en condiciones de oscuridad (control) o exposición a luz visible. A lo largo de la supervivencia, utilizando microscopía de epifluorescencia, se cuantificaron las células totales, viables y cultivables. Además, se determinó la capacidad de formar biofilms de estas poblaciones.

Bajo condiciones de oscuridad, tanto en soportes sólidos como en medio líquido, no se detectó pérdida de cultivabilidad, actividad o integridad celular durante al menos 7 días. Sin embargo, la luz visible tuvo un efecto negativo sobre las poblaciones de *A. baumannii* expuestas tanto en medio líquido como sobre soporte sólidos. En medio líquido, si bien la radiación luminosa no afectó a la integridad celular, al finalizar el periodo de exposición (7 días) el número de células cultivables descendió 1,5 log y el 27% de la población se encontraba en estado VNC. En condiciones de sequedad, la pérdida de cultivabilidad se detectó ya desde el primer día de exposición, situándose por debajo del límite de detección tras 5 días; la densidad de células viable también disminuyó, de modo que tras 7 días de exposición el 4% de la población era VNC. Además, la capacidad de formar biofilms se vio negativamente afectada a lo largo de la permanencia tanto en luz como en oscuridad. El efecto negativo de la luz fue especialmente relevante en poblaciones mantenidas en soportes sólidos.

Bajo condiciones de ayuno, *A. baumannii* es capaz de persistir durante periodos de tiempo de al menos una semana incluso en ausencia de humedad. Sin embargo, la exposición de radiación luminosa induce la entrada en estado VNC en estas mismas condiciones, siendo este efecto negativo más acusado en condiciones de ayuno y sequedad.

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a bacterium with great clinical relevance due to the nosocomial infections which is associated with. The threat which is related to depends directly on its ability to survive in hostile conditions such as temperature variations, luminous stress and desiccation. In this context, it has been studied the effect of visible radiation upon populations of *A. baumannii* (ATCC19606) maintained in liquid medium (starvation conditions) and over dry surfaces (starvation and desiccation conditions) at room temperature.

To determinate the possible loss of culturability and the entry in Vible But Nonculturable state (VNC), populations of *A. baumannii* were inoculated in sterile saline solution or they were fixed to cellulose acetate filters and they were incubated at 20°C in darkness (control) or under luminous conditions. Along de survival experience, the total, viable and culturable cells were quantified.

The ability of those populations to form biofilms was also tested.

Under darkness conditions, in both liquid medium and solid surfaces, there was not detected loss of culturability, activity or cellular integrity during at least 7 days. However, the visible light had a negative effect over the populations of *A. baumannii* exposed to both liquid medium and solid surfaces. In the liquid medium, even if the luminous radiation did not affect the cellular integrity, at the end of the exposition period (7 days) the number of culturable cells fell 1.5 log and the 27% of the population had been entered in the VNC state. In the populations exposed to desiccation conditions, loss of culturavility was detected since the first day of the experience, this reduction continued until the fifth day when the culturability was under the detection limit. The density of viable cells also showed a decrease, in such a way that after 7 days of exposition, the 4% of the population was in VNC state. Additionally, the ability to form biofilms was negatively affected along the permanence time in both darkness and luminous conditions. The negative effect of light was especially relevant in those populations which were maintained over dry surfaces.

Under starvation conditions, *A. baumannii* is able to persist during almost a week even in dry conditions. Nevertheless, the exposition to luminous radiation induces the entry in VNC state, being this negative effect stronger under starvation and dry conditions.

INTRODUCCIÓN

Características generales de *Acinetobacter baumannii*

El nombre de *Acinetobacter* fue acuñado por Brisou and Prevot en 1954 y deriva del griego “Akinetos” que significa “sin movimiento” debido a su carencia de flagelo (Doughari *et al.*, 2011). Sin embargo, especies de este género ya fueron observadas con anterioridad por Beijerinck en 1911 (Towner *et al.*, 2009). Hoy en día este género engloba 34 genoespecies descritas gracias a técnicas de hibridación de DNA. (Roca *et al.*, 2012).

Las bacterias del género *Acinetobacter* se caracterizan por ser bacterias Gram negativas, aerobias estrictas, inmóviles, catalasa positivas, oxidasa negativas y no fermentativas. (Bergnone-Bérézein & Towner, 1996; Doughari *et al.*, 2011). Respecto a su morfología son coccobacilos cortos y gruesos en su mayoría; pudiendo aparecer también con forma alargada durante la fase exponencial con tamaños de 1 a 2,5 µm. Debido a su hidrofobicidad es común que aparezcan formando agregados o dispuestos en parejas (Bergnone-Bérézein & Towner, 1996; Doughari *et al.*, 2011).

Su temperatura óptima de crecimiento ronda los 33-35°C y es capaz de crecer y formar colonias en medio estándar de laboratorio. El género *Acinetobacter* forma colonias suaves o mucoides (dependiendo de si han generado cápsula), de 1-2 mm de diámetro y de color amarillo pálido o blanco-grisáceas (Bergnone-Bérézein & Towner, 1996; Doughari *et al.*, 2011).

Importancia clínica

Las especies del género *Acinetobacter* son ubicuas y se han aislado tanto en el medio ambiente (suelo, agua dulce...) como en alimentos en malas condiciones (leche, huevos...). Además también forman parte de la microbiota normal de la piel apareciendo en mayores densidades en ingles y axilas (Jawad *et al.*, 1997; Beggs *et al.*, 2006; Towner *et al.*, 2009).

Dentro del género *Acinetobacter* se pueden encontrar especies de gran interés sanitario debido a su capacidad para provocar infecciones nosocomiales. Dentro de estas, *A. baumannii* es la que mayor atención recibe, puesto que tiene una gran persistencia en ambientes hospitalarios gracias a sus sencillos requerimientos energéticos, su extraordinaria tolerancia en forma de biofilms a la desecación y a los desinfectantes, y su facilidad para

adquirir resistencias a antibióticos. Debido a esta gran persistencia, *A. baumannii* es capaz de infectar a seres humanos desde reservorios inertes (sábanas, catéteres, guantes...) o animados (el propio personal sanitario que es portador sin desarrollar la infección) (Went *et al.*, 1997; Espinal *et al.*, 2012; Roca *et al.*, 2012).

Supervivencia en ambientes hostiles

Son muchos los factores a los que *A. baumannii* debe responder para asegurar su supervivencia. Por un lado, pese a que su temperatura óptima de crecimiento es entorno a los 33-35°C, tiene que soportar temperaturas ambientales que rondan los 20°C. Además tiene que sobrevivir en superficies inertes expuesto a ausencia de nutrientes y desecación. Por último, debe hacer frente a estrés lumínico ya que es un factor al que están expuestos de forma continua.

Podemos dividir la luz en función de su longitud de onda y de su efecto biológico en tres bandas. Por una parte está la luz infrarroja (> 700 nm), que no tiene efecto biológico. Por otra parte está la luz ultravioleta (UV) (<400 nm) y la luz visible (400-700 nm); ambas con efectos deletéreos en los microorganismos. Estos efectos negativos causados por la luz se deben a la fotooxidación. La radiaciones electromagnéticas que componen la luz pueden actuar directamente sobre el DNA generando mutaciones como dímeros de timina (efecto fotobiológico) o actuar sobre una molécula fotosensibilizadora que se excita y reacciona con el oxígeno generando radicales libre de oxígeno (efecto fotodinámico). Estos radicales libres (radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo (OH^\bullet), y oxígeno singlete (1O_2)) son los que causan daños celulares al actuar sobre el DNA generando mutaciones, provocando disfunciones en las membranas biológicas o inactivando enzimas. (Al-Nabusi & Gutiérrez, 1992; Sommaruga *et al.*, 1997; Losi & Gärtner, 2008).

El estado viable no cultivable (VNC) es un estado fisiológico en el que las células mantienen actividad metabólica detectable pero no son capaces de multiplicarse y por tanto pierden cultivabilidad.

Cada vez son más los microorganismos para los que se ha descrito la entrada en este estado (Barcina & Arana, 2009; Oliver, 2010). Dentro de esa extensa lista podemos encontrar especies del género *Acinetobacter* como *A. calcoaceticus*, típico de ambientes acuáticos (Lemke & Leff, 2006).

La adquisición de este estado fisiológico parece estar inducido por diferentes estreses ambientales como variaciones en temperatura, cambios en la osmolaridad del medio, exposición a la luz visible, peróxido de hidrógeno, desecación etc. (Mizunoe *et al.*, 1999; Barcina & Arana, 2009; Oliver, 2010; Vriezen, 2012).

El rol del estado VNC han sido arduamente discutido; por una parte podría ser una estrategia de supervivencia que permitiría sobrevivir a las poblaciones expuestas a condiciones desfavorables; en este caso, al llegar condiciones propicias para su crecimiento las células serían capaces de revertir este estado y recuperar sus capacidades metabólicas iniciales (Oliver, 2004). Por otra parte, también se ha observado que existen tipos bacterianos que no son capaces de revertir este estado; de esta forma, la entrada en estado VNC se convertiría en un paso intermedio de una muerte altruista, como parte de una estrategia de supervivencia (Barcina & Arana, 2009). No obstante, el papel de la adquisición de este estado parecen depender fuertemente del tipo bacteriano que se estudie y las condiciones a las que se le expongan (Oliver, 2010). Siguiendo en esta línea, la conservación de virulencia en bacterias patógenas que adoptan el estado VNC aún debe ser demostrado (Pruzzo *et al.*, 2003). Sin embargo, sí que se han observado indicios de mantenimiento de la adhesión a superficies y cultivos celulares, lo cual se define como el primer paso para el proceso infeccioso (Barer *et al.*, 2000; Pruzzo *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2012).

Esta entrada en estado VNC genera errores en los métodos clásicos de detección de microorganismos ya que se basan en métodos de cultivo y posterior análisis y son muchos los autores que optan por una sustitución o complementación de estos métodos con técnicas moleculares tales como PCR (Pruzzo *et al.*, 2003; Oliver, 2010).

Por otra parte la formación de biofilms ha sido descrito como un factor de virulencia que aporta gran capacidad de resistencia a diferentes estreses (desecación, desinfectantes...) (Davey & O'Toole, 2000; Roca *et al.*, 2012). Un biofilm es una población microbiana, encerrada en una matriz polisacáridica altamente hidratada, en parte de producción propia, que funciona como una comunidad integrada desde un punto de vista fisiológico (Brock, 2012). En base a bibliografía revisada se puede afirmar que *A. baumannii* cuenta con esta capacidad de formación de biofilms (Roca *et al.*, 2012).

Objetivos

Por todo lo mencionado previamente, la aparente resistencia de *A. baumannii* a los estreses ambientales (temperatura, desecación, luz, falta de nutrientes...) es uno de los aspectos más importantes que la convierten en una amenaza. Sin embargo, las estrategias que permiten a esta bacteria sobrevivir a estos estreses son desconocidas.

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto de la luz sobre poblaciones de *A. baumannii*. Para ello se llevarán a cabo experiencias con poblaciones sometidas a estrés lumínico para estudiar la posible entrada en el estado VNC. Además, se determinará la evolución de la capacidad de formación de biofilms a lo largo de la supervivencia. Todo ello se realizará tanto en medio líquido como en condiciones de sequedad.

MATERIALES Y METODOS

***Acinetobacter baumannii* y preparación de inóculos**

Los inóculos para la realización de las experiencias de supervivencia se obtuvieron creciendo la cepa *A. baumannii* ATCC 19606 en medio Mueller-Hinton (MH) durante 24 h a 37°C en agitación. Las bacterias se separaron del medio mediante centrifugación (5.200 r.p.m. durante 20 minutos) y, posteriormente se realizaron tres lavados en solución salina estéril (NaCl 0,9% (p/v)). Por último, se calculó la concentración final de bacterias mediante microscopía de epifluorescencia.

Ensayos de supervivencia

Las condiciones de realización de los ensayos a *A. baumannii* fueron ausencia de nutrientes, 20°C, agitación (120 rpm) y luz fotosintéticamente activa (PAR), la cual se corresponde con el espectro visible de la luz. La luz PAR se simuló mediante 5 lámparas SYLVANIA STANDARD F25W/30"/133 Cool White. La intensidad de luz que generaban estas lámparas se midió con ayuda de un fotómetro (Modelo LI-250 LIGHT EMETER de LI-COR) (15,93 w/m²). Como controles negativos se realizaron ensayos de supervivencia a los que se trató de manera idéntica pero bajo condiciones de oscuridad.

Medio líquido

Los matraces en los que se llevaron a cabo las experiencias fueron previamente lavados con H₂SO₄ (97% (v/v)) y aclarados con agua desionizada. Además fueron quemados a 250°C durante 24 h para eliminar la materia orgánica presente. Estos matraces se llenaron con 300 ml de solución salina estéril (NaCl 0,9% (p/v)) y se inocularon 10⁸ células/ml de células en fase estacionaria.

Se tomaron muestras diarias para la estimación de células totales (TDC), células viables (MEMB+) y cultivables (UFC).

Soportes inertes

Los ensayos en soportes inertes se realizaron en filtros de acetato de celulosa de 0,2 µm (Whatman) esterilizados con UV-C. Sobre estos filtros se filtraron suspensiones de *A. baumannii* de modo que en cada filtro se fijaron 9x10⁵ células/mm².

Para la toma diaria de muestra, los filtros se resuspendieron en 10 ml de solución salina estéril (NaCl 0,9% (p/v)) y se midieron células totales (TDC), células viables (MEMB+) y cultivables (UFC).

Enumeración de microorganismos

Los recuentos de TDC se realizaron mediante microscopía de epifluorescencia siguiendo el protocolo descrito por Hobbie *et al.* (1977). Para el recuento de MEMB+, es decir, con la membrana intacta, se utilizó el Kit Life & Dead® BacLight™ (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por Joux *et al.* (1997). Por último, los contajes de células cultivables se realizaron mediante siembra en microgota en Agar Mueller-Hinton (MHA). Las placas de dejaron incubar durante 24h a 37°C.

Cálculo de fracciones poblacionales de células viables, cultivables y VNC

Para el cálculo de la fracción poblacional que mantenía viabilidad (%CV) se empleó la siguiente fórmula:

$$\%CV = \frac{MEMB^+}{TDC} \times 100$$

Para el cálculo de la fracción de la población que conservaba cultivabilidad (%CC) se empleó la siguiente fórmula:

$$\%CC = \frac{UFC}{TDC} \times 100$$

Para cuantificar la fracción de la población que adquiría el estado fisiológico VNC (%VNC) se empleó la siguiente fórmula:

$$\%VNC = \frac{MEMB^+ - UFC}{TDC} \times 100$$

Capacidad de formación de biofilms a lo largo de las experiencias de supervivencia

A lo largo de las experiencias se evaluó la capacidad de formar biofilms de *A. baumannii*. Para ello se siguió el protocolo descrito por O'Toole *et al.* (1999) con alguna modificación. Se añadieron alícuotas de 1 ml de las experiencias de supervivencia en placas de 24 pocillos de poliestireno. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C sin agitación. Después de lavar tres veces con agua desionizada, el biofilm formado en las paredes del pocillo se tiñó con 200µm de cristal violeta (0,5% (p/v)). Se volvió a lavar tres veces con agua desionizada y se solubilizó con 500 µl de etanol al 95%. La cuantificación de la formación de biofilms se realizó mediante la medición de absorbancias a 595 nm. Se empleó solución salina estéril (NaCl 0,9% (p/v)) como control negativo.

Los resultados se clasificaron estableciendo intervalos de acuerdo a Stepanović *et al.* (2000). El cut-off de OD (OD_c) se determinó mediante la siguiente fórmula:

$$OD_c = \bar{x}(3 \times DS)$$

Siendo DS la desviación estándar y \bar{x} la media del control negativo.

A partir de ese cut-off se establecieron intervalos de la siguiente manera:

No-adherente: $OD \leq OD_c$

Ligeramente adherente: $OD_c < OD < 2 \times OD_c$.

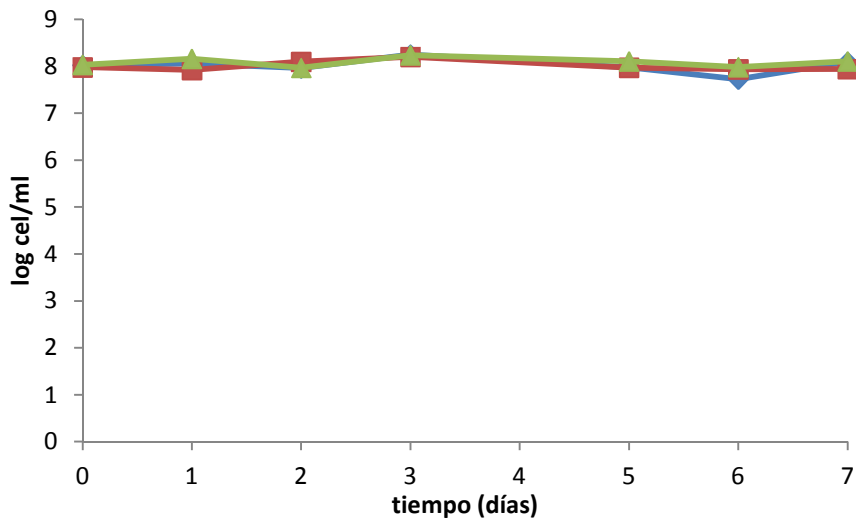
Moderadamente adherente: $2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$.

RESULTADOS

Ensayos de supervivencia

En la **Figura 1** se muestran los resultados obtenidos en las experiencias realizadas con células mantenidas en solución salina estéril (NaCl 0,9% (p/v)) a 20°C. Tanto en oscuridad (control negativo) como bajo el efecto de la luz.

A)



B)

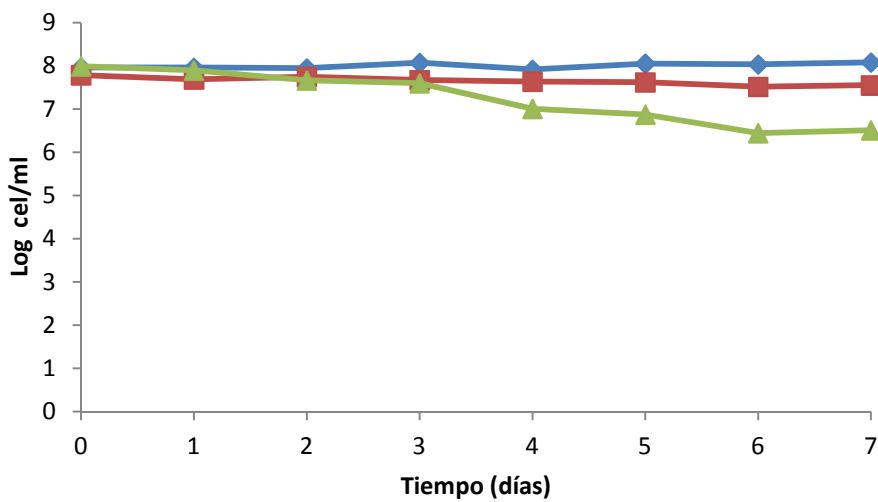


Figura 1: Ensayos de supervivencia en solución salina a 20°C (A) Control en oscuridad (B) Bajo condiciones de iluminación

—◆—, Número de células totales (TDC/ml); —■—, Número de células viables (MEMB+/ml); —▲—, Número de células cultivables (UFC/ml).

En las experiencias control, no se observaron diferencias en las densidades de células totales, viables y cultivables a lo largo del tiempo de exposición (Figura 1A).

Sin embargo, la exposición a estrés lumínico tuvo un efecto negativo en la densidad de células cultivables a partir del cuarto día. Esta caída comenzó siendo de un orden y continuó en el tiempo hasta alcanzar un valor de 10^6 UFC/ml al sexto día. Este valor se conservó hasta el final de las experiencias. De esta forma, tras 7 días de exposición, solo el 3% de la población era cultivable.

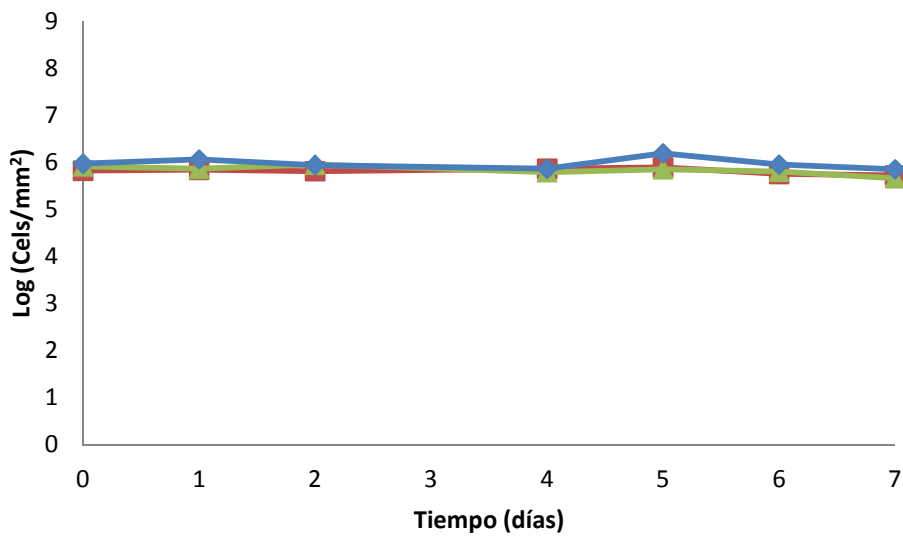
Por otra parte, la densidad de células viables no se vio afectada por el efecto de la luz. Debido a esta diferencia entre las densidades de células viables y cultivables se puede afirmar que una fracción de la población entró en estado VNC; concretamente el 27% de la población estudiada adquirió dicho estado fisiológico.

En la **Figura 2** se muestran los resultados de las experiencias de supervivencia que se realizaron con células incubadas sobre filtros de acetato de celulosa expuestos a 20°C. Tanto en oscuridad (control negativo) como bajo condiciones de iluminación.

En las experiencias realizadas en oscuridad no se observaron diferencias en la densidad de células totales, viables y cultivables a lo largo del tiempo de exposición. Sin embargo, bajo condiciones de iluminación se observó una disminución en las densidades de células viables y cultivables. La pérdida de cultivabilidad comenzó en las primeras 24 h de exposición. Esta disminución en la densidad de células cultivables prosiguió en función del tiempo hasta que al quinto día se encontraban por debajo del límite de detección ($< 0,18$ UFC/mm²). Por otra parte, la pérdida de viabilidad se retrasó hasta el tercer día. Transcurridos estos tres primeros días el 37% de la población conservaba viabilidad. Esta caída continuó de forma progresiva hasta que tras 7 días de exposición el 4% de la población era viable.

Se observó que la disminución de la densidad de células cultivables fue mayor que la de viables. Por ende, una fracción de la población adopta el estado fisiológico VNC. Esta fracción se corresponde con el 4% de la población tras 7 días.

A)



B)

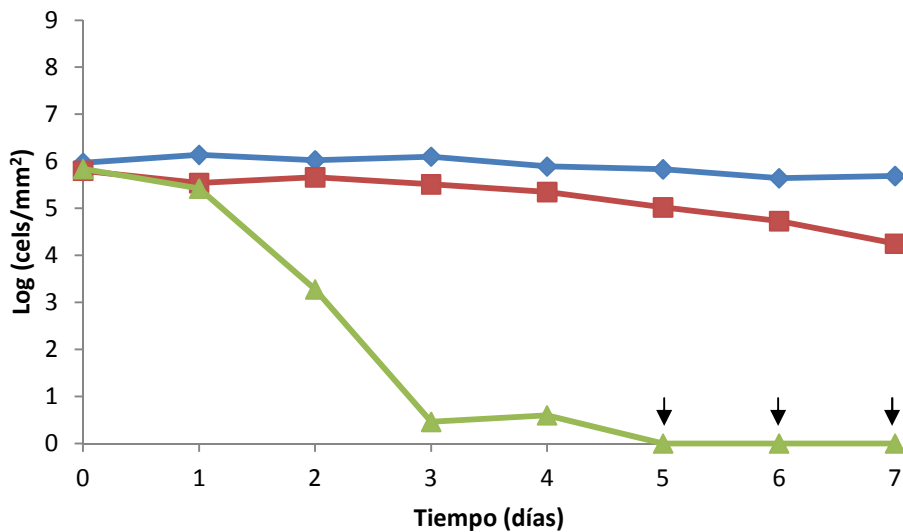


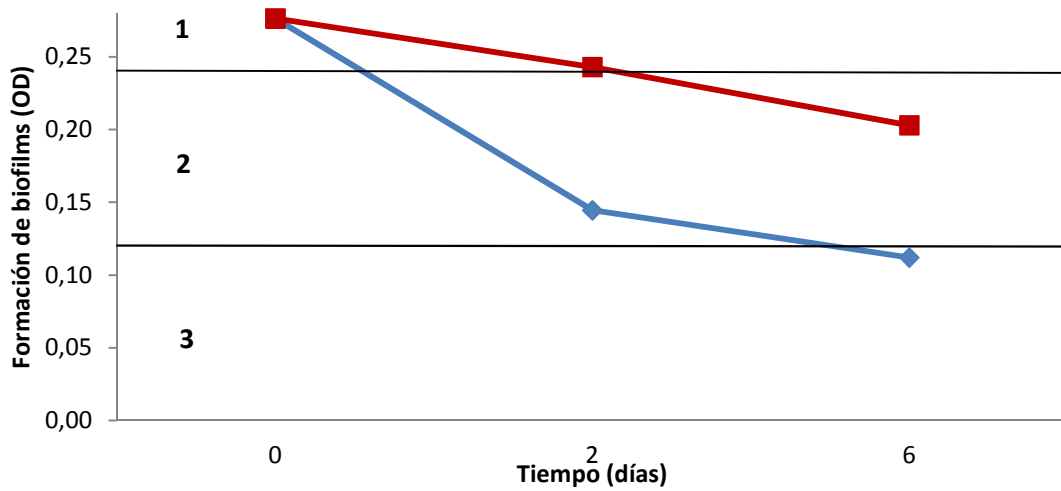
Figura 2: Ensayos de supervivencia de células sobre filtros de acetato de celulosa a 20°C (A) Control en oscuridad (B) Bajo condiciones de iluminación.

◆, Número de células totales (TDC/mm²); ■, Número de células viables (MEMB+/mm²); ▲, Número de células cultivables (UFC/mm²); (↓), Concentración por debajo del límite de detección (< 0,18 UFC/mm²).

Formación de biofilms

En la **Figura 3** se muestra como varía la capacidad de formación de biofilms en función del tiempo de exposición en medio líquido y en soportes sólidos, tanto oscuridad (control negativo) como bajo condiciones de iluminación.

A)



B)

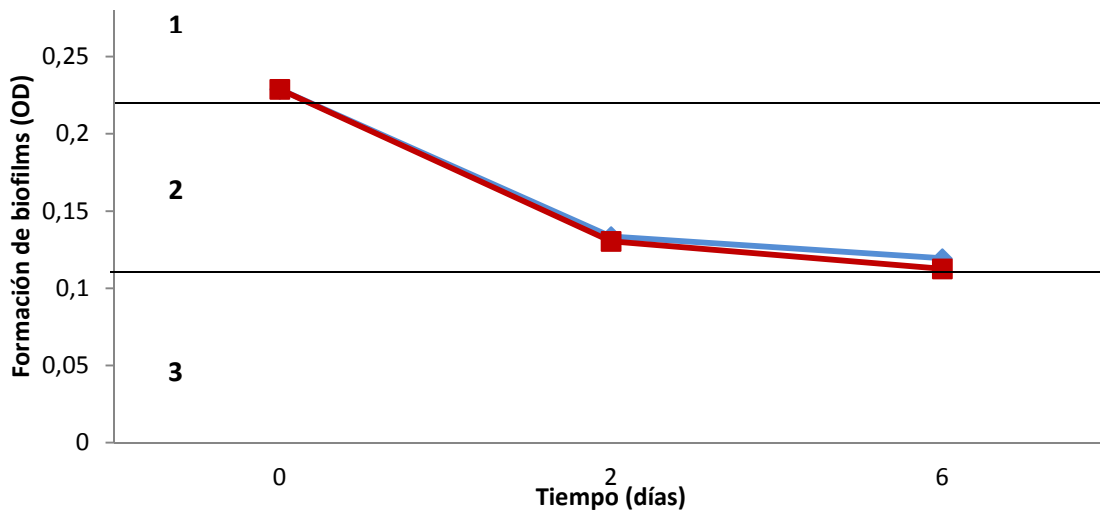


Figura 3. Variaciones en la capacidad de formación de biofilms en función del tiempo de permanencia a 20°C. A) Control negativo en oscuridad. B) Bajo iluminación.

—◆—, Experiencias con células en solución salina; —■—, Experiencias en células sobre filtros de acetato de celulosa.

Intervalos de capacidad de formación de biofilms: **1**, Moderadamente formadoras de biofilms; **2**, Ligeramente formadoras de biofilms; **3**, No formadoras de biofilms.

En el control en condiciones de oscuridad se observa una disminución en la capacidad de formación de biofilms. Esta reducción se observa tanto en soportes líquidos como sólidos, aunque el efecto es mayor en medio líquido.

En las experiencias realizadas bajo oscuridad y en medio líquido, la población pasó de ser “Moderadamente formadora de biofilms” a ser “Ligeramente formadora de biofilms” tras 48 h de exposición. Esta caída continuó en los días siguientes, aunque se ralentizó. Al final de los experimentales, se conservó la mitad de la adherencia inicial.

En las experiencias realizadas sobre soportes sólidos en condiciones de oscuridad, la disminución en la capacidad de formación de biofilms fue mucho más suave respecto al medio líquido. En las 48 primeras horas de exposición, pese a observarse una disminución, mantuvo una capacidad “moderada” de formación de biofilms. La caída continuó en el tiempo, manteniendo a lo largo de toda la experiencia una capacidad de adherencia superior a los observados en las experiencias en medio líquido. Al final de las experiencias, la población mantuvo una “ligera” capacidad de formación de biofilms.

En las experiencias bajo el efecto de la luz, el soporte no tuvo influencia en los resultados observados puesto que se observaron resultados similares tanto en perfil como en valores absolutos.

En los estudios realizados en medio líquido, el perfil obtenido fue similar respecto al control en oscuridad, tanto en tendencia como en valores absolutos obtenidos. En las primeras 48 h de exposición, la población pasó de ser “Moderadamente formadora de biofilms” a ser “Ligeramente formadora de biofilms”. La caída continuó con el tiempo, pero se fue ralentizando. Al final de las experiencias se conservó la mitad de la capacidad inicial.

En condiciones de sequedad y bajo el efecto de la luz se observaron diferencias muy marcadas respecto al control negativo. Tras 48 horas de exposición la población mantuvo una “ligera” capacidad de formación de biofilms. Aunque en los siguientes días, la pérdida de adherencia continuó, la población mantuvo esta “ligera” capacidad de formación de biofilms. De esta forma, tras 6 días de exposición, se conservó la mitad de la capacidad inicial.

DISCUSIÓN

Tal y como se observa en la Fig. 1A, la exposición a 20°C y la ausencia de nutrientes no generan un efecto negativo en las poblaciones de *A. baumannii*. Sin embargo, otras bacterias también mesófilas como *Escherichia coli*, bajo condiciones idénticas sufren una disminución de la cultivabilidad y se induce su entrada en estado VNC (Arana *et al.*, 2010). Esta entrada en estado VNC ya había sido descrita para otros filotipos del género *Acinetobacter*, como *A. calcoaceticus*, indicándose que solo el 0,29% de la población conservaba cultivabilidad en sistemas acuáticos (Lamke & Leff, 2006).

Si a las temperaturas subóptimas y la ausencia de nutrientes se le añaden condiciones de desecación, se observa que las poblaciones de *A. baumannii* responden de forma idéntica (Fig. 2A); es decir, no se observan variaciones en la cultivabilidad, actividad e integridad celular. Esta característica de soportar la ausencia de humedad ha sido descrita como una de las claves que convierten a *A. baumannii* en una amenaza en los ambientes hospitalarios porque facilita su transmisión y aumenta la probabilidad de infección. (Wendt *et al.*, 1997; Jawad *et al.*, 1998; Roca *et al.*, 2012).

Por otra parte, el efecto de la luz visible sí tuvo un efecto negativo sobre las poblaciones de *A. baumannii*. La dimensión de este efecto dependió fuertemente del soporte en el que se realizaron las experiencias. Tal y como se observa en la Fig. 1B, en medio líquido la luz visible provoca la pérdida de cultivabilidad y se induce la entrada en estado VNC; esta misma tendencia se ha observado en experiencias realizadas con *E. coli* (Canteras *et al.*, 1999; Muela *et al.*, 2000; Ídil *et al.*, 2010). En esta línea, se ha demostrado que el H₂O₂, uno de los radicales libres de oxígeno que participa en el daño fotooxidativo, es responsable de la pérdida de cultivabilidad en *E. coli* bajo estrés lumínico (Arana *et al.*, 1992; Muela *et al.*, 2002).

El efecto negativo de la luz visible se acentúa en las experiencias realizadas en soportes sólidos (Fig. 2B), en ellas se indujo la entrada en estado VNC desde las primeras 24 horas. Estas diferencias pueden ser debidas a la diferente incidencia de la luz en función del soporte. En las experiencias realizadas en soportes sólidos, la incidencia de la luz es mucho más directa que en el medio líquido, así se facilitarían la excitación de los fotosensibilizadores y se incrementaría el daño celular.

La entrada en estado VNC, incrementa la amenaza que supone *A. baumannii*, puesto que en este estado podría burlar los métodos clásicos de detección basados en siembra.

La formación de biofilms, como ya se ha mencionado, es uno de los factores de virulencia más importantes de *A. baumannii*. La capacidad de la población para formar biofilms muestra diferencias en función de las condiciones a las que se exponga.

En condiciones de oscuridad, la disminución en la formación de biofilms es mucho más marcada en las experiencias realizadas en medio líquido. La formación de biofilms se realiza mediante la secreción de una matriz de exopolisacáridos que recubre las células. Esta matriz está altamente hidratada y previene a la célula de una desecación que las llevaría a la muerte (Espinal *et al.*, 2012). Una posible interpretación de los resultados obtenidos podría ser que las células mantenidas en medio líquido habrían perdido la capacidad para excretar esos exopolisacáridos altamente hidratados. Los resultados obtenidos por Wendt *et al.* (1997) apoyan esta idea puesto que se observó que las cepas de *A. baumannii* extraídas de muestras de orina, y que no excretaban exopolisacáridos, tenían menos capacidad de adherencia que aquellas recogidas de catéteres.

No obstante, para todos los soportes y condiciones estudiadas se sigue conservando una ligera capacidad de formación de biofilms al final de los experimentales, incluso en aquellos en los que la cultivabilidad se encontraba bajo el límite de detección. Esto podría indicar que las células VNC conservan la capacidad de formar biofilms. La conservación de la adherencia de las células en estado VNC ya ha sido observada con anterioridad en otras bacterias patógenas como *Vibrio cholera*, *Shigella dysenteriae* y *Staphylococcus aureus* (Rahman *et al.*, 1996; Pruzzo *et al.*, 2003; Zandri *et al.*, 2012). Si esto fuera así, supondría una gran amenaza en ambientes hospitalarios, puesto que no solo le permitiría burlar los métodos de detección clásicos, sino que podría mantenerse adherido a superficies hasta llegar a un hospedador, en el que se reunirían las condiciones propicias para su crecimiento; así se generaría un brote de *A. baumannii*.

De cara a investigaciones futuras, sería muy interesante comprobar la posible recuperación de la cultivabilidad de las poblaciones en estado VNC. De esta forma se podría determinar si es un paso intermedio de una muerte altruista de parte de la población (Barcina & Arana, 2009) o si es una estrategia de supervivencia que permite a *A. baumannii* sobrevivir a condiciones ambientales nocivas como defiende Oliver (2004). Si se demostrara esta

recuperación de la cultivabilidad, las poblaciones que adquirieran el estado VNC, serían capaces de burlar los métodos clásicos de detección y generar brotes infecciosos una vez llegaran las condiciones propicias.

A modo de conclusión, indicar que:

- ✓ La temperaturas ambientales, ausencia de nutrientes y ausencia de humedad no generan cambios en la cultivabilidad, actividad e integridad celular de las poblaciones de *A. baumannii* tras 7 días de exposición.
- ✓ La radiación visible induce la entrada en estado VNC en poblaciones de *A. baumannii*. Siendo esta la primera referencia de adquisición de este estado para *A. baumannii*.
- ✓ El efecto de la luz afecta negativamente a la formación de biofilms en condiciones de sequedad.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Nabusi, I. and Gutierrez, P.L. 1992. Photosensitization of MCF-7 cells with diaziquone using visible light: correlation with DNA strands breaks and free radical production. *Photochem.Photobiol.* Vol.56, pp. 201-209.

Arana, I., Muela M., Iriberry, J., Egea, L. and Barcina, I. 1992. Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a freshwater ecosystem. *Appl Environ Microb.* Vol. 58, pp. 3903-3907.

Arana, I., Orruño, M., Pérez-Pascual, D., Seco, C., Muela, A. and Barcina, I. 2007. Inability of *Escherichia coli* to resuscitate from the viable but nonculturable state. *FEMS Microb. Ecol.* Vol. 62, pp. 1-11.

Arana, I., Muela, A., Orruño, M., Seco, C., Garaizabal, I. and Barcina, I. 2010. Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Ecol.* Vol. 74, pp. 500-509.

Barcina, I., Arana, I. 2009. The viable but nonculturable phenotype: A crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Rev Environ Sci Biotechnol.* Vol. 8, pp. 245-255.

Barer, M.R., Smith, R.J., Cooney, R.P. and Kimmitt, P.T. 2000. Relationships between culturability, activity and virulence in pathogenic bacteria. *J Infect. Chemother.* Vol.6, pp. 108-111.

Beggs, C.B., Kerr, K.G., Snelling, A.M., Sleight, P.A. 2006. *Acinetobacter* spp. And the clinical environment. *Indoor Built Environment* Vol.15, pp. 19-24.

Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J. 1996. *Acinetobacter* spp. As nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. *Clinical Microbiology Reviews.* Vol.9, pp.148-165.

Canteras, J.C., Pérez, L., León, P. and Lorda, T. 1999. Efecto de la radiación luminosa en la desaparición de *Escherichia coli* (T90) en medio acuático. Estudio experimental. *Ingeniería del agua.* Vol. 6, pp. 269-274.

Davey, M.E., and O'Toole G.A. 2000. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol and Mol Biol Reviews.* Vol. 62, pp. 847-867.

Doughari, H.J., Ndakidemi. P.A., Human, I.S., Benade, S. 2011. The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An overview. *Microbes Environ.* Vol.26, pp. 101-112.

- Espinal,P., Martí,S., Vila, J., 2012. Effect of biofilms formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J of Hosp Inf.* Vol.80, pp. 56-60.
- Hobbie, J.E., Caley, R.J. and Jasper, S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol* Vol.33, pp. 12225-12228.
- Hu, Y. and Coates, A. 2012. *Antibiotic Resistance, Handboool of Experimental Pharmacology*. Ed. Springer-Verlag. Berlin.
- İdil, Ö., Özkanca, R., Darcan, C. and Flint, K.P. 2010. *Escherichia coli*: Dominance of red light over other visible light sources in establishing viable but nonculturable state. *Photochem & Photobiol.* Vol. 86, pp. 104-109.
- Jawad,A., Seifert, H., Snelling, A.M., Heritage, J., Hawkey, P.M. 1998. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of outbreak and sporadic isolates. *J of Clin Microbiol.* Vol. 36, pp. 1938-1941.
- Joux, F., Lebaron P. and Troussellier, M. 1997. Succession os cellular states in *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiol Ecol.* Vol. 22, pp. 65-76.
- Lemke, M., Leff, L. 2006. Culturability of stream bacteria: Assamblage and population level responses. *Microbiol. Ecol.* Vol. 51, pp. 365-374.
- Losi, A. and Gärtner, W. 2008. Bacterial bilin-and flavin-binding photoreceptors. *Photochem & Photobiol.* Vol.7, pp. 1168-1178.
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. and Clark, D.P. 2004. *Brock Biología de los Microorganismos*. Ed.10ª. Pearson Educación, S.A. Madrid.
- Mizunoe,Y., Wai., SN., Takade, A., Yoshida, D. 1999. Restoration of culturability of starvation-stressed and low-temperature-stressed *Escherichia coli* O157 cells by using H₂O₂ degrading compounds. *Arch Microbiol .* Vol.172, pp. 63-67
- Muela, A., García-Bringas, J.M., Arana, I. and Barcina, I. 2000. The effect of simulated solar radiation on *Escherichia coli*: The relative roles of UV.B, UV-A and photosynthetically active radiation. *Microbial Ecol.* Vol. 39, pp. 65-71.
- Muela, A., García-Bringas, J.M., Seco, C., Arana, I. and Barcina, I. 2002. Participation of oxygen and role of exogenous and endogenous sensitizers in the photoinactivation of

Escherichia coli by photosynthetically active radiation, UV-A and UV-B. *Microbial Ecol.* Vol. 44, pp. 354-364.

Mussi, M.A., Gaddy, J.A., Cabruja, M., Ariverr, B.A., Viale, A.M., Rasia, R. and Actis, L.A. 2010. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J. bacteriol.* Vol. 192, pp. 6336-6345.

O'Toole, G.A., Pratt, L.A., Watnick, P.I., Newman, D.K., Weaver, V.B. and Kolter, R. 1999. Genetic approaches to the study of biofilms. *Method Enzymol.* Vol. 310, pp. 91-109.

Oliver, J.D. 2004. Viable but nonculturable bacteria in bacteria. *J.Microbiol.* Vol.34, pp. 93-100.

Oliver, J.D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol.* Vol. 34, pp. 415-425.

Pruzzo, C., Tarse, R., Lleó M., Signoretto, C., Zampini, M., Pane, L., Colwell, R., Canepari, P. 2003. Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water. *Environ Microbiol.* Vol.5, pp. 850-858.

Rahman, I., Shahamat, M., Chowdhury, M.A.R. and Colwell, R.R. 1996. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type 1. *Appl Environ Microbiol.* Vol.62, pp. 115-120.

Roca, I., Espinal, P., Vila-Farrés and Vila, J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oximoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Frontiers in microbiology.* Vol.3, Art. 148.

Sommaruga, R., Obernosterer, I., Herndl, G.J. and Psenner, R. 1997. Inhibitory effect of solar radiation on thymidine and leucine incorporation by freshwater and marine bacterioplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol.63, pp. 4178-4184.

Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. of Microbiol Methods* Vol.40, pp. 175–179.

Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X-H., Wang, R., Guo, Q. and Dong, Y. 2008. Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol. Ecol.* Vol.64, pp. 37-44.

Towner, K.J. 2009. *Acinetobacter*: An old friend, but a new enemy. *J. of Hosp Inf.* Vol. 73, pp. 355-363.

Vriezen, J. AC., De Bruijin, F.J., Nüsslein, K. 2012. Desiccation induces viable but nonculturable cells in *Sinorhizobium meliloto* 1021. University of Massachussetts.

Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., Rüden, H., 1997. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J. of Clin MicrobioL.* Vol.35, pp. 1394-1397.

Zandri, G., Pasquaroli, S., Vignaroli, C., Talevi, S., Manso, E., Donelli, G. and Biavasco, F. 2012. Detection of viable but non-culturable staphylococci in biofilms from central venous catheters negative on standard microbiological assays. *Clin Mibrobiol and Infect.* Vol.18, pp. 259-261.