



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGIA

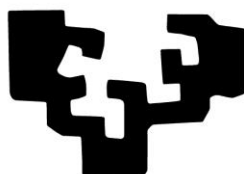
TRABAJO DE FIN DE GRADO

**LIBERACIÓN DE COMPUESTOS AL
MEDIO CIRCUNDANTE DURANTE LA
SUPERVIVENCIA A BAJAS
TEMPERATURAS EN *Vibrio harveyi***

IRIS AJA PÉREZ

Leioa, Julio 2013

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ÍNDICE

RESÚMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Aspectos generales de <i>Vibrio</i> spp. y de <i>V. harveyi</i>	4
Importancia del género <i>Vibrio</i>	5
Estado viable no cultivable	5
Objetivo	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Cepa bacteriana, medios y condiciones de cultivo	7
Obtención de sobrenadantes/Experiencias de supervivencia	7
Recogida y tratamiento de sobrenadantes	7
Experiencias de supervivencia con sobrenadantes	9
Técnicas de enumeración.....	9
RESULTADOS	11
Obtención de sobrenadantes. Revisión del método.....	11
Supervivencia de <i>V. harveyi</i> en agua de mar a 4°C	12
Supervivencia con sobrenadantes incubados a 4°C.....	13
DISCUSIÓN	15
CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFÍA	18

RESÚMEN

Vibrio harveyi es considerado como una de las especies más relevantes del género *Vibrio* debido a su capacidad para infectar peces marinos e invertebrados. Estudios previos han demostrado que la respuesta de *V. harveyi* ante condiciones ambientales adversas (p.e. disminución de la temperatura) es su entrada en el denominado estado Viable No Cultivable (VNC), representando este estado una estrategia de supervivencia para algunas bacterias no diferenciadas. Se ha estudiado la respuesta de este microorganismo durante su incubación a bajas temperaturas (4°C) utilizando como soporte tanto agua de mar como sobrenadantes recogidos en experiencias de supervivencia previas. *V. harveyi* presenta un patrón similar durante su incubación en agua de mar como en fases tempranas de estudio en sobrenadantes. Sin embargo, en fases tardías de estudio se ha comprobado que se retrasa su entrada en el estado VNC. Estos resultados sugieren que estas poblaciones podrían liberar compuestos al medio para favorecer su supervivencia bajo condiciones ambientales adversas.

ABSTRACT

Vibrio harveyi is considered as one of the most important species of the genus *Vibrio* because of its ability to infect marine fish and invertebrates. Previous studies have demonstrated that the response of *V. harveyi* to adverse environmental conditions (e.g. temperature decrease) is its entry into the state viable but nonculturable state (VBNC), representing this state a survival strategy for some undifferentiated bacteria. We have studied the response of this microorganism during its incubation at low temperatures (4 °C) using as support both seawater as supernatants collected in previous experiences survival. *V. harveyi* shows a similar pattern during incubation in seawater as in early stages of study in supernatants. However, in late stages of study has shown that delays its input in the state VBNC. These results suggest that these populations may release compounds to the medium to promote their survival under adverse environmental conditions

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales de *Vibrio* spp. y de *V. harveyi*

Los vibrios fueron uno de los primeros grupos bacterianos en ser reconocidos y descritos taxonómicamente en la naturaleza (Pacini, 1854). Según el Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey (Hensyl, 2000), son gammaproteobacterias pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* abarcando diversos grupos de bacterias marinas quimioorganotrofas. Son gram negativas, oxidasa positivos, mesófilos o psicrófilos, y con un metabolismo anaerobio facultativo. Además, suelen ser bacilos móviles por medio de un simple flagelo polar y con un tamaño comprendido entre 0,5 y 0,8 μm de ancho y entre 1,4 y 2,6 μm de largo (Cañigral, 2011).

Naturalmente habitan ambientes marinos y de agua dulce tanto en formas de vida planctónica, en la columna de agua (Worden *et al.*, 2006), como en formas bentónicas, desarrollando biopelículas en sedimentos, zooplancton (Heidelberg *et al.*, 2002) y en el tracto gastrointestinal de organismos marinos (Watnick *et al.*, 2001).

Son por tanto, bacterias capaces de tolerar un amplio rango de salinidades, existiendo especies halófilas (requieren al menos una concentración del 0,5% de NaCl en el medio para crecer) y especies no halófilas (pueden crecer con concentraciones mínimas de sal), pero cuyo requerimiento óptimo de NaCl es de alrededor de 2,0 a 2,5% (peso/volumen) (Gómez-Gil *et al.*, 2004).

Vibrio harveyi es considerado como una de las especies más relevantes del género *Vibrio* (Dorsch *et al.*, 1992). Además de todas las características anteriores, *V. harveyi* es una bacteria bioluminiscente. Debido a esta característica, en un principio fue llamada *Achromobacter harveyi*, en honor a E.N. Harvey, pionero en el estudio sistemático de la bioluminiscencia (Johnson and Shunk., 1936). Después varios fueron los nombres que se le atribuyeron, como *Lucibacterium harveyi* y *Beneckea harveyi*, hasta su denominación actual (Farmer *et al.*, 2005).

Importancia del género *Vibrio*

Las especies de *Vibrio* han sido extensamente estudiadas en los sistemas costeros por su importancia medioambiental e incidencia en la extracción de moluscos debido a su capacidad para infectar organismos marinos como peces, corales, moluscos, algas, esponjas, camarones y zooplacton (Thompson *et al.*, 2004). Además se ha observado que la distribución y dinámica de estas poblaciones están influenciadas por gradientes medioambientales como temperatura, salinidad, disponibilidad de nutrientes y factores biológicos (Thompson and Polz, 2006).

Estado viable no cultivable

Diversos trabajos han revelado que ciertas bacterias, en respuesta a condiciones ambientales adversas como radiación luminosa, ayuno, concentraciones osmóticas elevadas etc., entran en el llamado Estado Viable No Cultivable (VNC). En este estado VNC las células no son capaces de crecer en medios de cultivo convencionales pero presentan signos de actividad o ciertas funciones fisiológicas (Oliver, 2010).

Las células durante el estado VNC sufren cambios metabólicos tales como reducción en el transporte de nutrientes, variación en las tasas de respiración y cambios en la síntesis de macromoléculas (Porter *et al.*, 1995).

Tanto el significado biológico como las implicaciones de este estado celular han sido objeto de polémica entre los microbiólogos. Por una parte están aquellos que sostienen que el estado VNC es una estrategia de adaptación a condiciones ambientales adversas de ciertos procariontes; y por otro lado aquellos que apoyan que este estado es el resultado de un proceso degenerativo que conduce a la muerte celular (Seco, 2005).

Tal y como se ha demostrado que ocurre con *Pseudomonas fluorescens* (Bunker *et al.*, 2004), *Vibrio* spp., es capaz de revertir el estado VNC recuperando las condiciones fisiológicas y fenotípicas anteriores al estrés. Esta capacidad de “resucitación” indica que, la pérdida de cultivabilidad de *Vibrio* es un proceso temporal, una parte de su ciclo de vida, y por tanto, un proceso reversible (Margariños *et al.*, 1997; Gupte *et al.*, 2003; Wong *et al.*, 2004).

Por otra parte, diversos estudios han demostrado que la entrada al estado VNC puede tener lugar con la participación de señales moleculares célula-célula (McDougald *et al.*, 1999) y que estas señales están presentes en los sobrenadantes provenientes de experiencias de supervivencia.

Objetivo

El objetivo de este estudio es comprobar que bajo condiciones de estrés (4°C, oscuridad) *V. harveyi* entra en el estado VNC así como estudiar la posible liberación de compuestos al medio circundante a lo largo de un proceso de supervivencia que pudieran afectar a la entrada en dicho estado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana, medios y condiciones de cultivo

La cepa de *Vibrio* usada en el presente estudio fue *V. harveyi* CECT525. Se la hizo crecer en caldo marino (CM) durante 24 h a 28°C y con agitación continua (100 r.p.m). Tras el tiempo de incubación (fase estacionaria de crecimiento) los cultivos se centrifugaron (5.200g, 20 minutos, 4°C) y las células se lavaron tres veces con solución salina estéril (NaCl 1,94% [p/v]). Esa misma solución salina fue usada para resuspender la pastilla obtenida. Para estimar la concentración final de bacterias en la suspensión, se usó microscopia de epifluorescencia (Ver apartado técnicas de enumeración). Estas suspensiones celulares fueron usadas como inóculos en el presente estudio.

Obtención de sobrenadantes/Experiencias de supervivencia

Para la obtención de los sobrenadantes, se llenaron con 500 ml de agua de mar natural estéril tres matraces Erlenmeyer. El agua de mar fue recogida en Armintza (Bizkaia), filtrada (filtros de nitrocelulosa de 8; 0,8; 0,45 y 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore®)) y esterilizada en autoclave (121°C, 15 minutos). Previamente los matraces Erlenmeyer se lavaron con H₂SO₄ (97% [v/v]), se aclararon con agua desionizada repetidas veces y se sometieron a 250°C durante 24 horas para eliminar la materia orgánica que pudiesen contener. Estos matraces fueron inoculados con una densidad final de 10⁸ *Vibrio*/ml y se incubaron a 4°C con agitación continua (100 r.p.m). En los tiempos 0, 3 y 31 días se procedió a la recogida de los sobrenadantes.

Recogida y tratamiento de sobrenadantes

El contenido de los matraces fue vertido en tubos de centrifuga y centrifugados dos veces (5200 g, 20 minutos, 4°C). Tras cada centrifugación se recogió el sobrenadante y se desechó la pastilla celular.

En un principio la recogida de sobrenadantes se hizo siguiendo el protocolo descrito por Arana *et al.*, (2004) para *Escherichia coli*. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore®) empleando una torre de filtrado (Millipore®). Los filtros fueron previamente

tratados en autoclave (115°C, 20 min) y los componentes de metal de la torre fueron sumergidos en HCl (95% [v/v]) durante 24 h para eliminar cualquier resto de materia orgánica y posteriormente aclarados con agua desionizada. De igual manera, los componentes de plástico fueron sumergidos en HCl (5% [v/v]) durante 1 h y aclarados también con agua desionizada. El matraz kitasato de cristal fue lavado con H₂SO₄ (97% [v/v]), aclarado con agua desionizada y sometido a calor (250°C, 24 h).

Para comprobar que se habían eliminado todas las células, se sembraron, mediante la técnica de microgota, diluciones seriadas de los sobrenadantes obtenidos en placas de Agar Marino (AM) y Agar Triptona Soja (TSA). Estas placas fueron incubadas durante 24 h a 28°C, periodo tras el cual se procedió a la observación de las mismas. Pudimos comprobar que este método no fue efectivo, por lo que se llevó a cabo una puesta a punto del método de filtrado de sobrenadantes.

Se decidió cambiar los filtros de poro 0,22 µm por filtros de 0,1 µm diámetro de poro (Millipore®). El procedimiento de limpieza y filtrado fue el mismo que el descrito anteriormente. El filtrado fue guardado en botellas de cristal previamente lavadas con H₂SO₄, aclaradas con agua desionizada y tratadas a 250 °C durante 24 horas para eliminar la materia orgánica. Con el mismo fin los tapones de plástico de las botellas fueron tratados con HCl 5% durante 1 hora. Tras el periodo de incubación de las placas se observó que tampoco se eliminaron todas las células.

Tras la observación de las condiciones de filtrado y el análisis de los posibles puntos de contaminación de la torre de filtrado, se decidió utilizar filtros Millex®VV de 0,22 µm de diámetro de poro y jeringuillas BRAUN Injekt®. Con el uso de jeringuillas se pretendió minimizar al máximo los riesgos de contaminación a la hora de filtrar los sobrenadantes. Los pasos anteriores y posteriores al filtrado de los sobrenadantes fueron los mismos que los descritos en los casos anteriores. Tras el periodo de incubación de las placas, se pudo comprobar que se habían eliminado la totalidad de las células y por lo tanto este fue el procedimiento usado para el filtrado de los sobrenadantes en este estudio.

Con el fin de obtener dos réplicas de cada punto, se filtraron 200 ml a dos botellas. Se filtraron 100 ml a otra botella para su futuro análisis. Una vez filtrado el

sobrenadante, las botellas fueron selladas con parafilm, tapadas con papel de aluminio para evitar la luz y almacenadas a 4°C para su posterior uso (Figura 1).

Experiencias de supervivencia con sobrenadantes

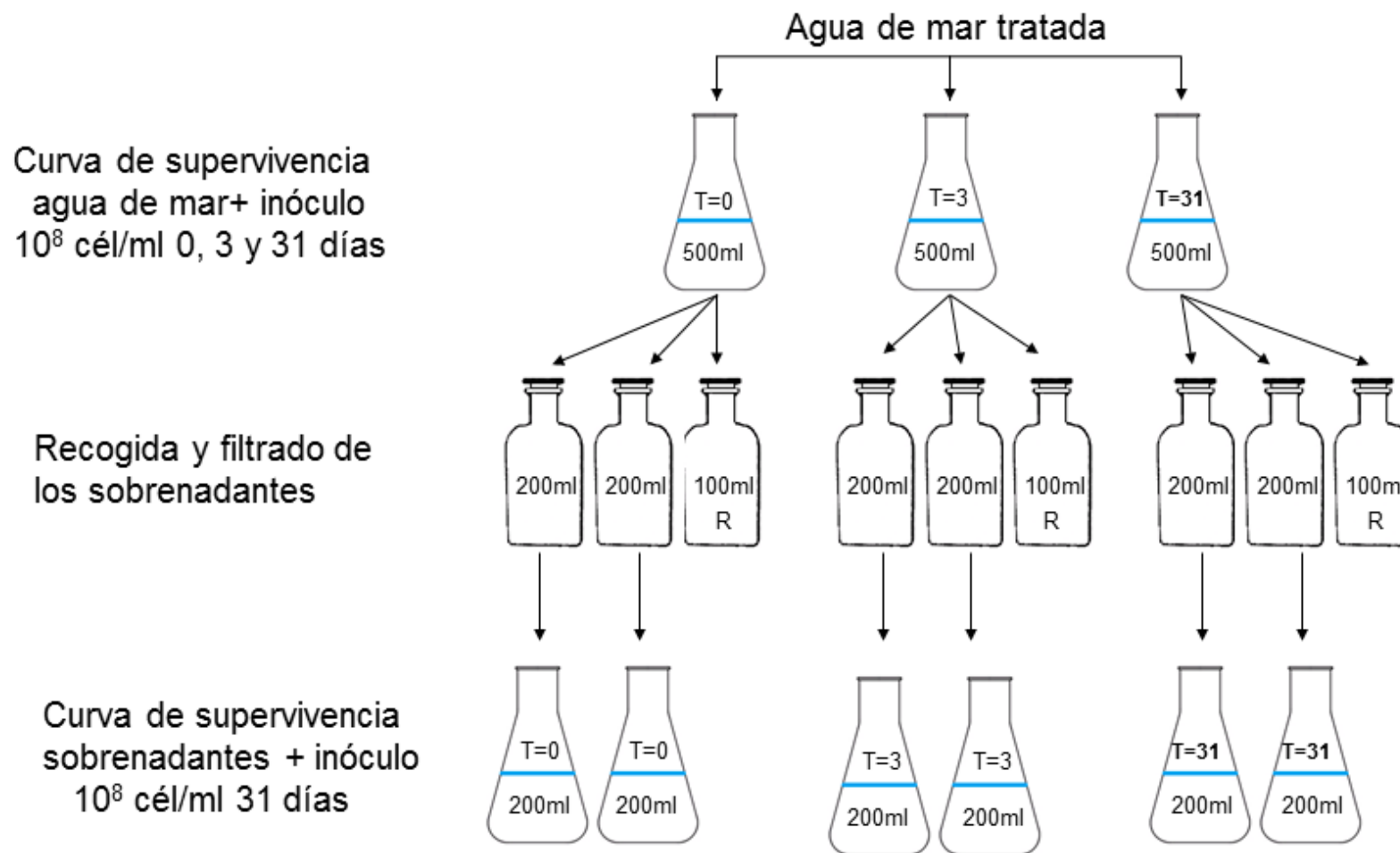
Los sobrenadantes recogidos de las experiencias de supervivencia tras 0, 3 y 31 días bajo condiciones de estrés (4°C) fueron usados como soporte para los nuevos experimentos de supervivencia (Figura 1).

Los sobrenadantes contenidos en las botellas almacenadas a 4°C fueron vertidos en matraces tratados con H₂SO₄ (97% [v v]), aclarados con agua desionizada y sometidos a 250°C durante 24 horas para eliminar la materia orgánica.

En cada matraz se inocularon aproximadamente 10⁸ cel/ml (densidad final) de *V. harveyi* en fase estacionaria y se incubaron con agitación continua (100 r.p.m) a 4°C. Se realizaron dos réplicas de las experiencias de supervivencia y diariamente se recogieron muestras donde se llevó a cabo la enumeración de células totales (Total Direct Count, TDC/ml), viables (MEMB+/ml) y cultivables (UFC/ml) (Ver apartado técnicas de enumeración).

Técnicas de enumeración

Para la cuantificación del número de bacterias totales se siguió el protocolo descrito por Hobbie *et al.*, (1977), usando naranja de acridina y microscopía de fluorescencia. El número de células viables fue determinado con la ayuda del Kit Live/Dead®BacLight™ siguiendo el protocolo descrito por Joux *et al.*, (1997). Utilizando este kit de acuerdo con las instrucciones del productor podemos diferenciar aquellas células con la membrana citoplasmática intacta de aquellas con la membrana dañada. La cuantificación de las células cultivables se estimó mediante la siembra por microgota en placa, en Agar Marino (AM) y en Agar-Triptona-Soja (TSA). Tras la siembra las placas fueron incubadas durante 24 h a 28°C para su posterior recuento.



R= utilizado para posterior análisis de composición del medio

Figura 1. Esquema de obtención y uso de sobrenadantes.

RESULTADOS

Obtención de sobrenadantes. Revisión del método.

Tras el filtrado de los sobrenadantes, con cada una de las técnicas explicadas en el apartado de materiales y métodos, y su posterior siembra en placas de TSA y AM se obtuvieron los resultados presentados en la Tabla 1.

Tabla 1. UFC/ml obtenidas tras la siembra en placa de los sobrenadantes filtrados por los distintos métodos.

Método de filtración	Tamaño de poro del filtro	
	0,22 μm diámetro de poro	0,1 μm diámetro de poro
Torre de filtrado	10 ⁶ UFC/ml	10 ⁶ UFC/ml
Jeringuilla	<3,3 UFC/ml	<3,3 UFC/ml

Usando la torre de filtrado, con indiferencia del diámetro de poro del filtro utilizado, no se consiguió eliminar la totalidad de las células presentes en el sobrenadante, obteniéndose unos valores alrededor de 10⁶ UFC/ml con ambos filtros (0,22 μm y 0,1 μm de diámetro de poro). Esto significa que aunque con este método se eliminaron 99% de las células, en el sobrenadante filtrado aún quedaba una fracción de células que podría influir en los resultados de nuestras experiencias de supervivencia.

Con el uso de la jeringuilla las UFC/ml obtenidas en las placas, estaban por debajo del límite de detección; por lo tanto nuestro sobrenadante estaba filtrado correctamente y no contenía células que pudieran influir en las experiencias de supervivencia. Cabe destacar, que con ambos filtros (0,22 μm y 0,1 μm de diámetro de poro) se consiguió un filtrado correcto.

Aunque en un principio se pudiera pensar que era el tamaño del poro del filtro lo que pudiese estar impidiendo el correcto filtrado de los sobrenadantes, con los resultados obtenidos con la jeringuilla se puede comprobar que no. Por lo tanto estamos ante una contaminación del filtrado debido a posibles puntos de contaminación existentes en la torre de filtrado, tal y como se muestra en la Figura2.

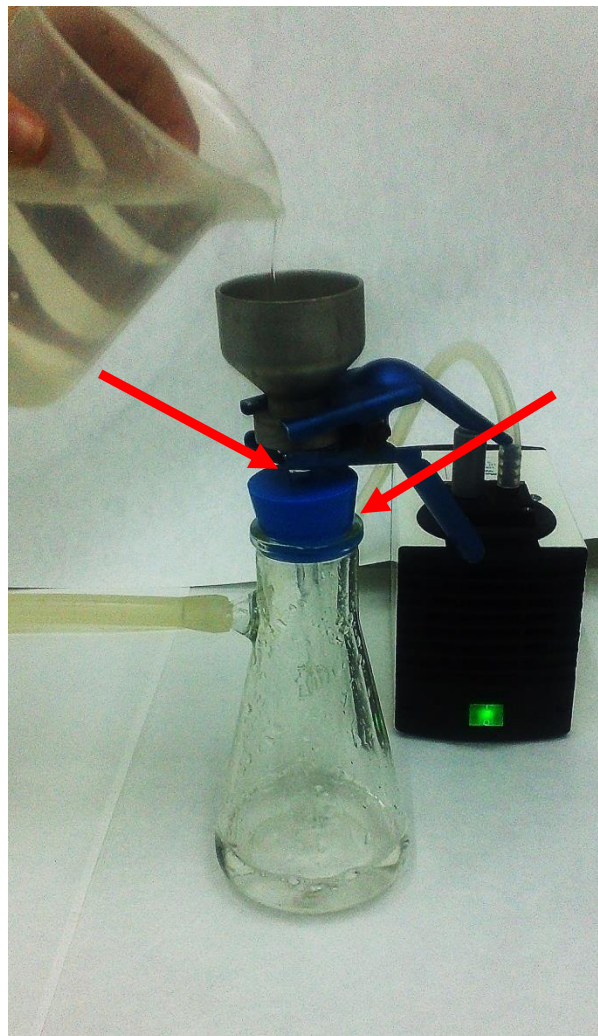


Figura 2. Torre de filtrado utilizada para el filtrado de sobrenadantes de *V.harveyi*. Las flechas indican los posibles puntos de contaminación del filtrado.

Supervivencia de *V. harveyi* en agua de mar a 4°C

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3. En las experiencias de supervivencia en agua de mar (4°C), tanto las células totales como las viables se

mantuvieron constantes a lo largo del estudio. En cambio, el número de células cultivables experimentó un descenso, siendo más acusado a partir del día 9.

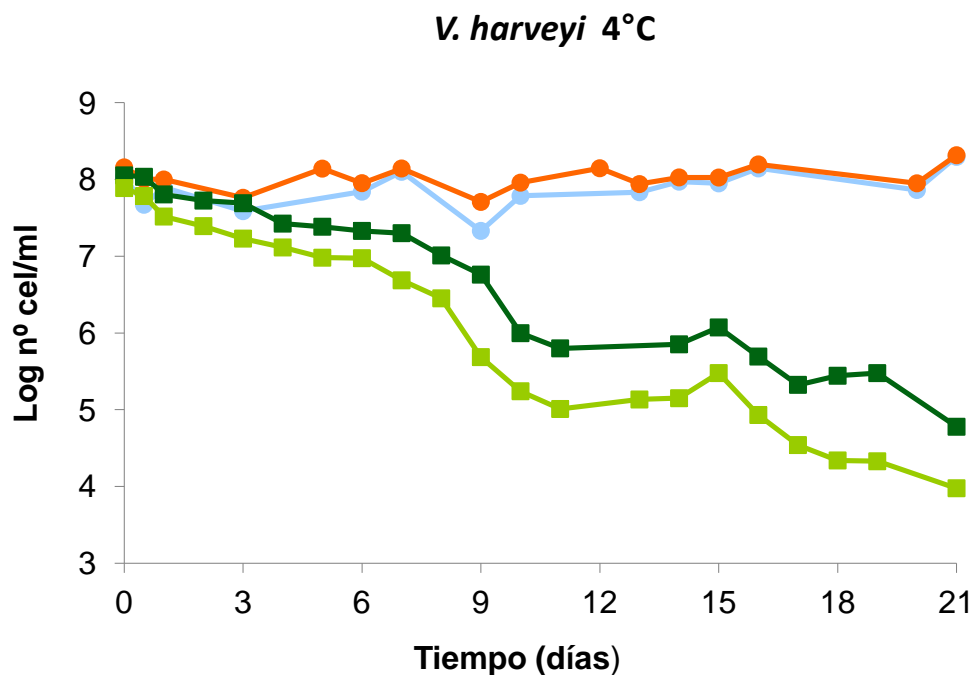


Figura 3. Variación de la densidad de *V. harveyi* a lo largo de la permanencia en agua de mar a 4°C. ● nº total de células /TDC/ml); ● nº de células viables (MEMB+/ml); ■ Nº de células cultivables (UFC/ml): ■ AM; ■ TSA.

Supervivencia con sobrenadantes incubados a 4°C

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4. En las experiencias de supervivencia realizadas con los sobrenadantes obtenidos de los días 0, 3 y 31 días (4°C), las poblaciones inoculadas mostraron un mantenimiento en el número de células totales y viables. Sin embargo, el número de células cultivables, tanto en AM como en TSA, disminuyó a lo largo del tiempo. Durante los primeros días este descenso fue paulatino en los tres casos. Se produjo un descenso brusco en la cultivabilidad el día 9 en las experiencias de supervivencia realizadas con sobrenadantes obtenidos en fases tempranas de estudio (0 y 3 días) y el día 12 en el caso de las realizadas con el sobrenadante obtenido en fases más avanzadas (día 31). Este descenso continuó hasta estabilizarse en unos valores cercanos a 10^5 células/ml.

De manera más acusada que durante la supervivencia en agua de mar, en los tres casos la pérdida de la cultivabilidad en el medio TSA fue mayor que en el medio

AM. Aun así, cabe destacar que en las tres experiencias de supervivencia con sobrenadantes, la fracción de células cultivables en ambos medios fue mayor que en las experiencias realizadas directamente en agua de mar.

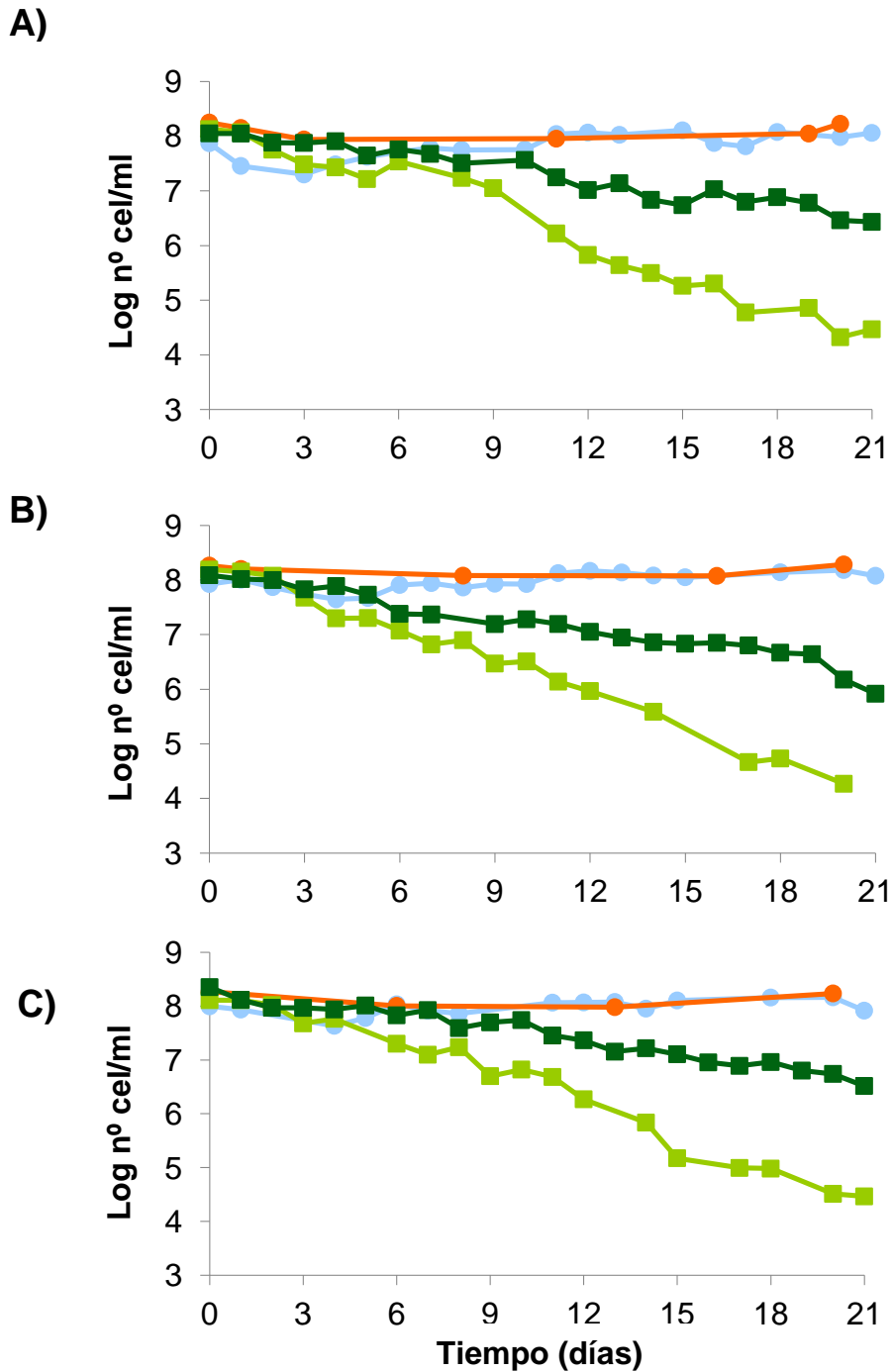


Figura 4. Variación de la densidad de *V. harveyi* a lo largo de la permanencia en sobrenadantes a 4°C. a) En sobrenadantes recogidos en el tiempo 0 días. b) Recogidos a los 3 días. c) Recogidos a los 31 días. ● nº total de células /TDC/ml); ● nº de células viables (MEMB+/ml); N° de células cultivables (UFC/ml): ■ AM; ■ TSA.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en la tabla 1 muestran que el método de filtrado de sobrenadantes propuesto por Arana *et al.*, (2004) para *E. coli* no resulta un método adecuado para el filtrado de sobrenadantes en *V. harveyi*.

Esto podría deberse al tamaño de las células, ya que *E. coli* posee un tamaño mayor que las células de *V. haveyi*. Pero el hecho de que con el uso de la jeringuilla y los filtros Millex®VV se consiguiera eliminar la totalidad de las células del sobrenadante, con ambos tamaños de diámetro de poro, indica que no se trata de un problema de tamaño celular. De hecho, estudios anteriores (Cañigral, 2011) indican que el tamaño de las células de *Vibrio* oscila entre 1,4 y 2,6 µm de largo, y por lo tanto poseen un tamaño suficientemente grande como para no pasar a través del filtro.

Para asegurarnos de que no era un problema de tamaño, se procedió a realizar un análisis de imagen digital (Bjørnsen, 1986) y así se pudo comprobar que efectivamente, las células de *V. harveyi* poseen un tamaño mayor que el diámetro de poro de los filtros (Resultados no mostrados).

Todo ello indica que el problema de filtrado de los sobrenadantes reside en el material usado para el filtrado con kitsatos y torre de filtrado. Con este método, son muchos los materiales que hay que esterilizar para su uso (como se indica en el apartado de materiales y métodos) y que son susceptibles de fácil contaminación. En cambio, con el uso de la jeringuilla los riesgos de contaminación son reducidos al mínimo al estar todo el material perfectamente esterilizado en sus envases originales. No se ha llegado a comprobar, pero la contaminación con el uso de torre de filtrado podría deberse también a una excesiva presión que ejerce la bomba, y que podría causar micro roturas en los filtros, a través de las cuales pasarían células al sobrenadante.

Otro hecho a destacar es que, en ciertas especies de *Vibrio* se ha observado que tras la entrada en el estado VNC, la presencia de una subpoblación de células cultivables puede ser la responsable de la “resucitación” de la población inicial debido a la capacidad de crecimiento de esta subpoblación (Bogosian *et al.*, 2000).

Sin embargo, estudios con *E. coli* han demostrado que estas bacterias no poseen dicha cualidad (Arana *et al.*, 2007). Esto nos lleva a pensar que, al igual que ocurre con *V. harveyi*, quizá las células de *E. coli* también sean capaces de atravesar el filtro cuando se usa la torre de filtrado, pero que su incapacidad de resucitar del estado VNC, enmascare un posible error en el filtrado.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la supervivencia de *V. harveyi*, en agua de mar se ve afectada por la baja temperatura y que este efecto queda reflejado en la pérdida de cultivabilidad. Nuestros resultados coinciden así con los obtenidos por diversos grupos que estudian la supervivencia de *Vibrio* spp. en los sistemas acuáticos naturales (Magariños *et al.*, 1997; Mizunoe *et al.*, 2000; Armada *et al.*, 2003).

Sin embargo, nuestros resultados difieren de los obtenidos para *E. coli*, ya que las bajas temperaturas permiten a esta bacteria una prolongada supervivencia tanto en solución salina como en agua de río (Arana *et al.*, 2007). Estas diferencias entre *E. coli* y *Vibrio* spp. ya han sido estudiadas por Arana *et al.* (2010) quienes sostienen que estas se deben al carácter psicofilo/psicrotrofo de las bacterias como *Vibrio*, que sobreviven mejor a temperaturas intermedias (15-20°C) mientras que las bacterias mesófilas, como *E. coli*, experimentan una ralentización de su metabolismo a bajas temperaturas lo que permite su permanencia bajo dicho estrés.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que la permanencia de *V. harveyi* en agua de mar a bajas temperaturas induce la entrada en el estado VNC y que durante este estado, las células continúan siendo viables aunque hayan perdido su cultivabilidad.

Por otra parte, cuando se utilizaron sobrenadantes de las experiencias de supervivencia a 4°C como soportes de incubación, los resultados variaron con el tipo de sobrenadante utilizado (tiempo de recogida). Los sobrenadantes obtenidos en fases tempranas de estudio no modificaron el patrón de supervivencia obtenido en agua de mar. Sin embargo, las experiencias realizadas con sobrenadantes de tiempos de incubación largos (31 días) retrasaron la pérdida de cultivabilidad de las poblaciones inoculadas. Estos resultados sugieren que *V. harveyi* bajo

condiciones ambientales adversas (4°C) podría liberar al medio un compuesto que favorecería la supervivencia.

Algo parecido ocurre en estudios llevados a cabo en *E. coli* por Arana *et al.*, (2004). En su caso se producía liberación de compuestos durante toda la exposición al estrés y no sólo en fases tardías como ocurre con *V. harveyi*. Además el análisis de los sobrenadantes reflejó que las sustancias liberadas al medio eran nutrientes los cuales actuarían manteniendo el equilibrio osmótico ante condiciones adversas.

Por otra parte, la enumeración de *V. harveyi* en medio AM rindió valores significativamente superiores respecto a los obtenidos en el medio TSA. *V. harveyi* es un microorganismo oligotrofo y halófilo y estas diferencias podrían atribuirse al exceso de nutrientes y/o menor concentración de sales del medio TSA respecto al medio AM (Leyton y Riquelme, 2008).

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos, la respuesta natural que adopta *V. harveyi* ante condiciones ambientales adversas (disminución de la temperatura) es su entrada en el estado VNC, representando una posible estrategia de supervivencia para bacterias acuáticas.

Además de su entrada en el estado VNC, los resultados obtenidos en este estudio parecen indicar que bajo condiciones ambientales adversas (4°C) *V. harveyi* liberaría al medio sustancias que en fases tardías de estudio, prolongan la cultivabilidad y retrasan el paso de estado cultivable a estado VNC.

En estudios posteriores sería interesante el análisis y caracterización de los sobrenadantes de *V. harveyi* reservados, con el fin de conocer la naturaleza e influencia de los compuestos liberados al medio.

En cuanto al filtrado de los sobrenadantes, para la comprobación de la liberación de compuestos al medio circundante, mediante este estudio se ha propuesto y descrito una metodología adecuada a las características de *V. harveyi*.

BIBLIOGRAFÍA

Arana I, Seco C, Epelde K, Muela A, Fernández-Astorga A, Barcina I. (2004). Relationship between *Escherichia coli* cells and the surrounding medium during survival processes. *A Van Leeuwenhoek*, 86:189-99.

Arana I, Muela A, 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.

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

Armada SP, Farto R, Pérez MJ, Nieto TP. (2003). Effect of temperature, salinity and nutrient content in the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. *Microbiology*. 149:369-375

Bjørnsen PK. (1986). Automatic determination of bacterioplankton biomass by image analysis. *Appl Environ Microbiol*. 51:1199-1204.

Bogosian G, Aardema ND, Bourneuf E, Morris PJJ, O'Neil JP. (2000). Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cell of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. *J Bacteriol*. 182:5050-5075

Bunker ST, Bates TC, Oliver JD. (2004). Effects of temperature on detection of plasmid and chromosomally encoded *gfp* and *lux*-labeled *Pseudomonas fluorescens* in soil. *Environ Biosafety Res*. 3, 1-8.

McDougald D, Rice SA, Kjelleberg S. (1999). New perspectives on the viable but nonculturable response. *Biologia, Bratislava* 54: 617-623

Dorsch M, Lane D, Stackebrandt E. (1992). Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S ribosomal RNA sequences. *Int J Syst Bacteriol*. 42, 58-63.

Farmer JJ III, Janda JM, Brenner FW, Cameron DN, Birkhead KM. (2005) Genus 1. *Vibrio* Pacini 1854, 411AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn, Vol. 2. The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria ed. Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. pp. 494-546. New York: Springer.

Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC, Garcia- Gasca A, Roque A, Swings J. (2004). *Vibrio hispanicus* sp. nov., isolated from *Artemia* sp. and sea water in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54: 261-265.

Gupte AR, de Rezende LE, Joseph SW. (2003). Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol.* 60:6669-6675

Heidelberg JF, Heidelberg KB, Colwell RR. (2002). Bacteria of the gamma subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay. *Appl Environ Microbiol.* 68: 5498-5507.

Hensyl WR. (2000). Bergey's Manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia.

Hobbie JE, Caley RJ, Jasper S. (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microcopy. *Appl Environ Microbiol.* 33:1225-1228

Johnson FH, Shunk IV. (1936). An interesting new species of luminous bacteria. *J Bacteriol.* 31: 585-593

Joux F, Lebaron P, Troussellier M. (1997). Succession of cellular states in *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiol Ecol.* 22:65-76

Leyton Y, Riquelme C. (2008). Vibrios in marine coastal systems. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 43:441-456

Magariños B, Romalde JL, Toranzo AE. (1997). Viability of starved *Pasteurella piscicida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation. *Lett Appl Microbiol.* 24:122-126

Mizunoe Y, Wai SN, Ishiwaka T, Takalde A, Yoshida SI. (2000). Resuscitation of viable but nonculturable cells of *Vibrio parahaemolyticus* induced at low temperature under starvation. *FEMS Microbiol Lett.* 186:115-120

Oliver JD. (2005). The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol.* 43:93-100.

Oliver JD. (2010). Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 34:415-425

Pacini F. (1854). Osservazioni microscopiche e deduzione patologiche sul cólera asiatico. *Gazette Medicale de Italiana Toscano Firenze* 6: 405-412.

Porter J, Edwards C, Pickup RW. (1995). Rapid assessment of physiological status in *Escherichia coli* using fluorescent probes. *J Appl Bacteriol.* 4: 399-408.

Seco C. (2005). El estado viable no cultivable: Interacciones con el medio circundante y caracterización molecular. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco.

Cañigral I. (2011). Desarrollo de métodos moleculares para la detección y caracterización de bacterias patógenas emergentes del género vibrio en aguas y alimentos. Tesis doctoral. Universitat Politècnica de València.

Thompson JR, Polz MF. (2006). Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling. *The biology of vibrios*, 13: 190-203.

Thompson JR, Randa MA, Marcelino LA, Tomita- Mitchell A, Lim E, Polz MF. (2004). Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community. *Appl Environ Microbiol.* 70: 4103-4110.

Watnick PL, Lauriano CM, Klose KE, Croal L, Kolter R. (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol.* 39: 223-235.

Wong HC, Wang P, Chen SY, Chiu SW. (2004). Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol Lett.* 233:269-275

Worden AZ, Seidel M, Smriga S, Wick A, Malfatti F, Bartlett D, Azam F. (2006). Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine waters. *Environ Microbiol.* 8: 21-29.