

# ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión bibliográfica)

Lucía M. Tamagnini, María G. Paraje

*Departamento de Fisiología, Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Universidad Nacional de Córdoba,*

Fecha de recepción del manuscrito: 01/04/2015

Fecha de aceptación del manuscrito: 14/07/2015

Fecha de publicación: 15/09/2015

**Resumen**— La viabilidad de las células bacterianas ha sido determinada, tradicionalmente, por su habilidad para crecer y formar colonias en medios de cultivo en el laboratorio o por estudios en animales. Sin embargo, un número importante de microorganismos presentes en el ambiente aún no han podido ser cultivados. Estudios recientes han demostrado la habilidad de algunas bacterias para subsistir en un estado llamado viable no cultivable (BVNC). La exposición a diferentes tipos de estrés puede inducir la formación de este estado; no obstante las células pueden retornar a un estado cultivable (“resucitar”) bajo estímulos adecuados. En esta revisión se describen las causas y regulación del estado viable no cultivable, los métodos de detección, la “resucitación” de estas células, la repercusión en comunidades microbianas (biopelículas o biofilms) y su importancia en el ambiente, la industria alimenticia y la salud pública.

**Palabras clave**— bacterias viables no cultivables, ambiente, salud.

**Abstract**—The viability of bacteria cells has been traditionally determined through studies on animals, or by their ability to grow and form colonies in laboratory culture means. However, it has not yet been possible to grow in a laboratory environment a significant number of microorganisms typically found in the wild. Recent studies have proved the ability of certain bacteria to subsist in a so called viable non-culturable state (VNCB). The exposure of the cell to different kinds of stress can induce this state; nevertheless affected cells can go back to the culturable state (“resuscitate”) when properly stimulated. This review describes the causes and regulation of the VNCB, its detection methods, the “resuscitation” of affected cells, the impact of VNCB on microbial communities (biofilms) and the way in which all this affects the environment, the food industry and the public health.

**Keywords**— viable non-culturable bacteria, environment, health.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias viables no cultivables (BVNC) representan un estado celular adaptativo, de supervivencia a largo término bajo condiciones ambientales desfavorables (Ducret et al., 2014). Estas bacterias están vivas, con actividad metabólica, pero no pueden desarrollar colonias en condiciones de cultivo en que habitualmente podrían crecer. Células de diferentes especies bacterianas pueden subsistir como BVNC. El concepto fue propuesto unas décadas atrás y aunque inicialmente se lo consideró un estado de inactividad, actualmente se considera un estado de supervivencia de las bacterias (Oliver, 2005, Oliver, 2010, Pinto et al., 2014). En el estado no cultivable la célula vegetativa normal no sólo cambia morfológicamente, sino también metabólicamente; se modifica la expresión de sus genes y su potencial de virulencia (Li et al., 2014). Bajo determinadas condiciones las bacterias pueden “resucitar” y

abandonar este estado. Debido a su falta de desarrollo en los medios de cultivo, muchas veces se subestima la densidad real de sus poblaciones (Ramamurthy et al., 2014).

### *Importancia de las BVNC*

Las BVNC son de gran importancia para la seguridad alimenticia y la salud pública. Muchas especies potencialmente peligrosas sobreviven y persisten en alimentos procesados, leche pasteurizada, agua potable y en el ambiente en general (Sardesai, 2005). Bacterias patógenas causantes de gastroenteritis (*Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*), tuberculosis (*Mycobacterium tuberculosis*) y otras enfermedades pueden entrar en dicho estado y recuperar posteriormente su virulencia. Se ha comprobado que algunas bacterias patógenas pueden ser avirulentas en el estado BVNC recobrándola después de su “resucitación”, bajo condiciones favorables (Du et al., 2007). Por otra parte, estos microorganismos están siendo actualmente estudiados en relación a la potencial transformación y degradación de contaminantes en el ambiente (Su et al., 2013).

Dirección de contacto:

María G. Paraje., Avenida Vélez Sarsfield 299, X5000. Tel: 4332100  
interno 225, paraje@efn.uncor.edu

### **Causas y regulación del estado viable no cultivable**

Condiciones nutricionales adversas, fluctuaciones en la temperatura, cambios en el pH, salinidad, estrés oxidativo, exposición a metales pesados, tratamientos con antibióticos, etc. pueden inducir el estado viable no cultivable (Cook y Bolster, 2007, Cunningham *et al.*, 2009, del Campo *et al.*, 2009, Kana *et al.*, 2008, Polifroni *et al.*, 2009). Tratamientos de desinfección como la cloración de aguas o la pasteurización de la leche pueden inducir el estado BVNC en determinadas subpoblaciones. Si bien existen diversos mecanismos de regulación del estado BVNC, los factores de regulación genéticos RpoS y OxyR parecen ser importantes para inducir dicho estado. El factor RpoS es el regulador esencial de la expresión del gen al estrés, esencial para la supervivencia; la depleción produce una rápida inducción del estado BVNC en *E. coli* y *Salmonella* spp (Kusumoto *et al.*, 2012). La falta del RpoS produce una muerte rápida de las células que se encuentran en el estado no cultivable (Boaretti *et al.*, 2003). Li *et al.*, 2014 sugieren que OxyR podría estar implicado en las vías reguladoras relacionadas con la inducción del BVNC.

### **Métodos de detección de BVNC**

Si bien las BVNC son difíciles de estudiar, algunas de las técnicas apropiadas para su detección utilizan marcadores fluorescentes como coloración con naranja de acridina y recuento de viables con anticuerpos fluorescentes (DFA-DVC) (Mishra *et al.*, 2011). Se utiliza también la medición de la actividad respiratoria, medición de cambios en el ARN, ADN y ARNm (DVC-FISH), biosensores, bacteriófagos, etc. (Oliver, 2005). La implementación de métodos no adecuados para su detección y en consecuencia la no observación (“ausencia”) de este grupo de bacterias aumentaría el riesgo de la exposición humana a alimentos y agua contaminados.

### **“Resucitación” de células del estado viable no cultivable**

La “resucitación” es la inversión de los cambios fisiológicos y metabólicos que caracterizan dicho estado (Baffone *et al.*, 2006). En un proceso infeccioso algunos factores como agentes antibacterianos u otras sustancias producidas por el hospedador pueden generar la entrada del patógeno en este estado celular; cuando “resucitan” pueden expresar su virulencia. Recientemente se ha descubierto un factor genético promotor de la “resucitación”: Rpf. La presencia de este factor ha sido demostrado en varias especies bacterianas (Gupta y Srivastava, 2012, Puspita *et al.*, 2013). En las bacterias Gram positivas actúa como una hidrolasa del peptidoglicano (Mukamolova *et al.*, 2006). En las bacterias Gram negativas pertenece a distintas clases de proteínas con funciones bioquímicas desconocidas. La “resucitación” sólo ocurre en un período limitado de tiempo después de entrar al estado BVNC; es por lo tanto dependiente de la fase de crecimiento de las células. La “resucitación” puede estimularse por agentes físicos como cambios bruscos de temperatura (Maalej *et al.*, 2004) o diferentes tipos de agentes químicos: mezclas de gases, aminoácidos, compuestos secretados por células en crecimiento, etc. (Amel *et al.*, 2008, Reisbrodt *et al.*, 2002). Los mecanismos que subyacen a la “resucitación” de BVNC

no son totalmente conocidos; especialmente en aquellos relacionados con el hospedador debido a la complicada interacción patógeno-hospedador. Para que la “resucitación” ocurra debe eliminarse el estrés externo y deben estar presentes compuestos señales específicos, estos incluyen aminoácidos, el factor RpfS y autoinductores (Wong y Wang, 2004). Los autoinductores son producidos tanto por bacterias Gram negativas como Gram positivas. A veces los autoinductores de una especie pueden estimular la “resucitación” de otras especies bacterianas (Reisbrodt *et al.*, 2002).

### **Problemática en la industria y la salud pública**

La incapacidad de cultivar los microorganismos representa un serio problema para el estudio de la contaminación de fuentes de agua y alimentos así como para la detección de patógenos en humanos. El conocimiento de los secretos del estado viable no cultivable podría ayudar, en un futuro, a mejorar los métodos de detección de los grupos de bacterias ambientales, ya sean metabólicamente activas o inactivas. Un bajo porcentaje de bacterias patógenas han podido ser cultivadas en laboratorio. Hasta los años 80 la presencia de patógenos se relacionó directamente con la capacidad de multiplicarse y formar colonias en medios de cultivo regularmente utilizados en laboratorio. El diagnóstico de infecciones y la identificación del agente etiológico es y será altamente dependiente de las técnicas de cultivo (Li *et al.*, 2014). Está muy bien documentado que *Mycobacterium tuberculosis*, un importante patógeno humano, puede entrar en el estado no cultivable y “resucitar” durante la infección del huésped, contribuyendo, de esta forma, a la existencia mundial de más de dos millones de portadores (Gengenbacher y Kaufmann, 2012). La recurrencia de infecciones por *M. tuberculosis* prueba que las células en estado no viable retienen su potencial de virulencia después de “resucitar”. *Escherichia coli* O157:H7 es un importante patógeno humano relacionado con el Síndrome Urémico Hemolítico. Este serotipo, productor de verotoxinas, tiene la capacidad de entrar en estado viable no cultivable bajo condiciones de estrés. La producción de toxinas puede continuar varios días después de que una población entra en estado viable no cultivable; esto representa un serio riesgo para la salud debido a que no son detectables con técnicas comunes de cultivo (Dinu y Bach, 2011, Polifroni *et al.*, 2009). Se ha demostrado que otras especies patógenas como las pertenecientes a los géneros *Legionella* y *Vibrio* han mantenido su virulencia después de entrar en el estado no cultivable (Li *et al.*, 2014).

### **BVNC y células persistentes en Biofilms**

Los biofilms son comunidades bacterianas sésiles, unidas a una superficie y encerradas en una matriz extracelular (O’Toole *et al.*, 2000). El microambiente dentro de la estructura de un biofilm es diferente a la superficie, las células están sujetas a estrés oxidativo, pH y nutricional, la estarcación confiere, también, resistencia a antibióticos (Arce Miranda *et al.*, 2011, Paraje, 2011). Bacterias de importancia médica formadoras de biofilm pueden entrar en estado no cultivable cuando se exponen a antibióticos (Pasquaroli *et al.*, 2013). Giao y Kevil (2014) han mostrado

la producción de BVNC en biofilms formados por *Listeria monocytogenes*, un importante patógeno transmitido por alimentos. *Pseudomonas aeruginosa* es un microorganismo ubicuo, patógeno oportunista, importante agente infeccioso en heridas y otras enfermedades respiratorias crónicas como fibrosis quística. Posee la habilidad de formar biofilms y protegerse de las defensas del hospedador y la quimioterapia; bacterias no cultivables pueden desarrollar dentro del biofilm (Mulcahy et al., 2013). El conocimiento de los factores que determinan la “resucitación” de las BVNC dentro del biofilm en el hospedador humano ayudaría a sensibilizar estas bacterias a la acción de los antibióticos (Li et al., 2014).

Una característica importante en bacterias formadoras de biofilm es la presencia de células persistentes, estas subpoblaciones celulares son tolerantes a agentes químicos como los antibióticos. Ayrapetyan et al., (2015) definen estos dos estados (BVNC y células persistentes) como estrechamente relacionados formando parte de un estado continuo de inactividad (“dormancy continuum”). En ambos casos se considera que las células son genéticamente idénticas al resto de la población, exhiben un fenotipo de tolerancia al estrés y permanecen en un estado de no-crecimiento. Se considera que ambos estados son dos fenómenos íntimamente relacionados que necesitan ser estudiados en conjunto.

## CONCLUSIONES

El estado viable no cultivable es un complejo proceso que necesita futuras investigaciones. Si bien representa una forma de supervivencia de las bacterias es, al mismo tiempo, un aspecto importante de la patología bacteriana. Los mecanismos específicos implicados en la transición bacteriana al estado no cultivable y su “resucitación” aún no han sido completamente dilucidados. Por esta razón, futuros avances técnicos en los métodos de detección de bacterias en este estado y su retorno a viabilidad son una necesidad y un desafío para la ciencia; especialmente para tratar de encontrar soluciones a infecciones bacterianas crónicas.

## REFERENCIAS

- [1] Amel B. K-N., Amine B.y Amina B. (2008), “Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions”, *Microbiological Research*, 163: 323-328.
- [2] Arce Miranda J.E., Sotomayor C.E., Albasa I.y Paraje M.G. (2011), “Oxidative and nitrosative stress in *Staphylococcus aureus* biofilm”, *FEMS Microbiology Letters*, 315: 23–29.
- [3] Ayrapetyan M., Williams T.C.y Oliver J.D. (2015), “Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria”, *Trends in Microbiology*, 23: 7-13.
- [4] Baffone W., Casaroli A., Citterio B., Pierfelici L., Campana R. Vittoria E., Guaglianone E.y Donellib G. (2006), “*Campylobacter jejuni* loss culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model”, *International Journal of Food Microbiology*, 107: 83-91.
- [5] Boaretti M., Lleó M., Bonato B., Signoretto C.y Canepari P. (2003), “Involvement of *rpoS* in the survival of *Escherichia coli* in the viable but non-culturable state”, *Environmental Microbiology*, 5: 986-996.
- [6] Cook K. L.y Bolster C. H. (2007), “Survival of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* in groundwater during prolonged starvation at low temperature”, *Journal of Applied Microbiology*, 103: 573-583.
- [7] Cunningham E., O’Byrne C.y Oliver J.D. (2009), “Effect of weak acids on *Listeria monocytogenes* survival: evidence for a viable but nonculturable state in response to low pH”, *Food Control*, 20: 1141-1144.
- [8] del Campo R., Russi P., Mara P., Mara H., Peyrou M. de León I.P. y Gaggero C. (2009), “*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* enters the VBNC state after copper treatment and retains its virulence”, *FEMS Microbiology Letters*, 298: 143-148.
- [9] Dinu L.D.y Bach S. (2011). “Induction of viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 in the phyllosphere of lettuce: a food safety risk factor”. *Applied and Environment Microbiology*, 77: 8295-8302.
- [10] Du M., Chen J., Zhang X., Li A., Li Y.y Wang Y. (2007), “Retention of virulence in a viable but nonculturable *Edwardsiella tarda* isolate”, *Applied and Environment Microbiology*, 73: 1349-1354.
- [11] Ducret A., Chabaliier M.y Duncan S. (2014), “Characterization and resuscitation of “non-culturable” cells of *Legionella pneumophila*”, *BMC Microbiology*, 14: 3.
- [12] Gengenbacher M. y Kaufmann S.H.E. (2012), “*Mycobacterium tuberculosis*: success through dormancy”, *FEMS Microbiology Reviews*, 36: 514-532.
- [13] Giao M.S. y Keevil C.W. (2014), “*Listeria monocytogenes* can form biofilms in tap water and enter into the viable but non cultivable state”, *Microbial Ecology*, 67: 603-611.
- [14] Gupta R.K.y Srivastava R. (2012), “Resuscitation promoting factors: a family of microbial proteins in survival and resuscitation of dormant *Mycobacteria*”, *Indian Journal of Microbiology*, 52: 114-121.
- [15] Kana B.D., Gordhan B.G., Downing K.J., Sung N. Vostroktunova G., Machowski E.E. Asano K., Nakatsu C.H.y Tanaka M. (2008), “The resuscitation promoting factors of *Mycobacterium tuberculosis* are required for virulence and resuscitation from dormancy but are collectively dispensable for growth in vitro”, *Molecular Microbiology*, 67: 672-684.
- [16] Kusumoto A., Asakura H.y Kawamoto K. (2012), “General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable form”, *Microbiology and Immunology*, 56: 228-237.
- [17] Li L., Mendis N., Trigui H., Oliver J.D.y Faucher S.P. (2014), “The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens”, *Frontiers in Microbiology*, Doi: 10.3389/fmicb.2014.00258.
- [18] Maalej S.D., Denis M.y Dulsan S. (2004), “Temperature and growth-phase effects on *Aeromonas hydrophila* survival in natural seawater microcosms: role of protein synthesis and nucleic acid content on viable but temporarily nonculturable response”, *Microbiology*, 150: 181187.
- [19] Mishra A., Taneja N.y Sharma M. (2011), “Demonstration of viable but nonculturable *Vibrio cholera* O1 in fresh water environment of India using ciprofloxacin DFA-DVC method”, *Letters in Applied Microbiology*, 53: 124-126.
- [20] Mukamolova G.V., Murzin A.G., Salina E.G., Demina G.R., Kell D.B., Kaprelyants A.S.y Young M. (2006), “Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation”, *Molecular Microbiology*, 59: 84-98.
- [21] Mulcahy L.R., Isabella V.M.y Lewis K. (2013), “*Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease”, *Microbial Ecology*, 68: 1-12.
- [22] O’Toole G., Kaplan H.B.y Kolter R. (2000), “Biofilm formation as microbial development”, *Annual Review of Microbiology*, 54: 49-70.
- [23] Oliver J. D. (2005), “The viable but nonculturable state in bacteria”, *Journal of Microbiology*, 43: 93-100.
- [24] Oliver J.D. (2010), “Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria”, *FEMS Microbiology Review*, 34: 415-425.
- [25] Paraje M.G. (2011), “Antimicrobial resistance in biofilms”, En: *Science against microbial pathogens: communicating current*

*research and technological advances*, 736-744, FORMATEX RESEARCH CENTER, Spain.

- [26] Pasquaroli S., Zandri G. Vignaroli C., Vuotto C. Donelli G. y Biavasco, F. (2013), "Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68: 1812-1817.
- [27] Pinto D., Santos M.A.y Chambel L. (2013), "Thirty years of viable but nonculturable state research: unsolved molecular mechanisms", *Critical Reviews in Microbiology* doi:10.3109/1040841X.2013.794127.
- [28] Polifroni R., Etcheverría A.I., Padola N.L.y Parma A.E. (2009), "*Escherichia coli* verotoxigénico (VTEC). Características de virulencia y persistencia en el medio ambiente", *InVet*, 11: 65-70
- [29] Puspita I.D., Uehara M., Katayama T., Kikuchi Y., Kitagawa W., Kamagata Y., Asano K., Nakatsu CH. y Tanaka M. (2013), "Resuscitation promoting factor (Rpf) from *Tomitella biformata* AHU 1821(T) promotes growth and resuscitates non-dividing cells", *Microbes and Environment*, 28: 58-64.
- [30] Ramamurthy T., Ghosh A., Pazhani G.P. y Shinoda S. (2014), "Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria", *Frontiers in Microbiology*, Doi: 10.3389/fpubh.2014.00103.
- [31] Reisbrodt R., Rienecker I., Romanova J.M., Freestone P.P.E., Haoigh R.D., Lyte M., Tschäpe H. y Williams P.H. (2002), "Resuscitation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer", *Applied and Environment Microbiology*, 68: 4788-4794.
- [32] Sardessai Y. N. (2005), "Viable but non-culturable bacteria: their impact on public health", *Current Science*, 89: 1650.
- [33] Su X., Chen X., Hu J., Shen C.y Ding L. (2013), "Exploring the potential environmental functions of viable but non-culturable bacteria", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29: 2213-2218.
- [34] Wong H.C.y Wang P. (2004), "Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses", *Journal of Applied Microbiology*, 96: 359-366.