

Respuesta bacteriana al estrés

Maite Orruño¹, Vladimir R. Kaberdin^{1,2} e Inés Arana¹



Universidad de Oviedo-Facultad de Medicina-Dpto. Biología Funcional-Microbiología. C/ Julián Clavería, 6, 33006 Oviedo



Foto de grupo.

Inés Arana (Profesora Titular), Maite Orruño (Profesora Adjunta), Vladimir R. Kaberdin (Investigador Ikerbasque), Zaloa Bravo y Claudia Parada (Investigadoras Postdoctorales), Ander Hernández, Itxaso Montánchez, Elixabet Ogayar y Olatz Ruiz-Larrabeiti (Investigadores Predoctorales), Angela Arabiotorre y Aitor González-Uriarte (Alumnos de Máster), Raquel Catediano, Asier Escobero, Beatriz Gallego, Leire Ramos (Alumnos de Grado).

En los ecosistemas naturales las bacterias se enfrentan a cambios continuos en las condiciones ambientales que inducen el despliegue de diferentes estrategias de supervivencia que aseguren su éxito. En el caso de las bacterias alóctonas, el desarrollo de mecanismos de adaptación condiciona su capacidad de sobrevivir en ambientes hostiles. En los sistemas acuáticos, los factores abióticos más estresantes incluyen variaciones de la temperatura, limitación en la disponibilidad de nutrientes o exposición a la radiación solar. La presencia de la microbiota natural de dichos sistemas, que también está sujeta al efecto de los factores abióticos, es otro factor determinante del éxito de las poblaciones bacterianas.

Nuestro grupo comenzó su andadura bajo el nombre «Supervivencia bacteriana en los sistemas acuáticos» con la dirección de la Dra. Barcina y, en los últimos años, hemos cambiado de dirección, denominación e, incluso, objeto de

estudio. Los trabajos realizados en los inicios se centraron fundamentalmente en el estudio de la respuesta de *Escherichia coli* a factores abióticos estresantes y de la estrategia de supervivencia subyacente en diferentes sistemas acuáticos, que incluyeron los ambientes marino y lótico y un ambiente artificial, las plantas de tratamiento de aguas residuales.

Los resultados obtenidos mostraron que *E. coli*, bajo condiciones de estrés, adopta el estado Viable No Cultivable (VNC). En este estado, parte de la población pierde su cultivabilidad, si bien mantiene la integridad de la membrana citoplasmática y es capaz de reducir sales de tetrazolio (indicativo del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones), entre otras actividades constatables. Uno de los principales, y más estudiados, factores inductores del estado VNC es la temperatura. Para *E. coli* encontramos una relación indirecta entre la temperatura y la pérdida de cultivabilidad. Así, a temperaturas

inferiores a 10°C, ocurre una ralentización del metabolismo, lo que retrasa la degeneración celular. Por otra parte, establecimos que los componentes de la radiación solar (luz visible, UV-A, UV-B) ejercen un efecto negativo mediante la generación de formas reactivas del oxígeno y/o la acción fotobiológica directa que deriva en la inducción del estado VNC en función de la radiación estudiada. Además, el estudio del subproteoma de la membrana externa indicó que la exposición de poblaciones de *E. coli* a condiciones ambientales adversas se acompaña del cambio en la expresión de proteínas tales como OmpA, TolC, la lipoproteína 28, entre otras.

Durante el proceso de supervivencia de *E. coli* en los sistemas acuáticos, las células VNC liberan al medio circundante proteínas, aminoácidos y carbohidratos, que son utilizados por las células cultivables supervivientes con el fin de asegurar su persistencia en el sistema.

Se ha indicado que la importancia del estado VNC como estrategia de supervivencia de las bacterias no diferenciadas radica en la capacidad de resucitación (recuperación de la cultivabilidad) de una fracción de estas células cuando revierten las condiciones estresantes, lo que permitiría la recolonización del sistema. En el caso de *E. coli*, tras el diseño de un complejo protocolo de resucitación, no se observó reversión de la cultivabilidad de la fracción VNC y sí crecimiento de la subpoblación cultivable remanente. Estos resultados confirman que, para *E. coli*, la inducción del estado VNC supone una estrategia de supervivencia orientada a asegurar la permanencia de la fracción cultivable.

En los últimos años, hemos integrado el género *Vibrio* en nuestro trabajo desde varias vertientes. Así, en el contexto de los previsibles cambios originados por el calentamiento global y, considerando la escasez de estudios sobre la distribución del género *Vibrio* en la costa vasca, comenzamos a realizar campañas anuales orientadas al aislamiento e identificación mediante secuenciación del 16SRNA y tipificación multilocus de secuencias (MLST) de bacterias de este género. En una primera etapa nos hemos centrado en la costa vizcaína, pero con la colaboración de AZTI se recogerán muestras a lo largo de toda la costa vasca. Además, utilizando una cepa modelo (*V. harveyi* CECT 525) hemos verificado la inducción del fenotipo VNC por efecto de las bajas temperaturas y su capacidad de revertir nuevamente al estado cultivable. Estos resultados confirman que, a pesar de que tanto *V. harveyi* como *E. coli* adoptan el estado VNC, esta estrategia de supervivencia tiene un significado biológico diferente en ambos microorganismos. Para *V. harveyi*, el estado VNC en sí mismo es un mecanismo de perdurabilidad de la especie en situaciones adversas, aunque hemos encontrado diferencias en el comportamiento de cepas ambientales respecto a la cepa patrón.

Por otra parte, los análisis comparados de la variación del subproteoma de las membranas externas de estos microorganismos muestran que, si bien ambas bacterias conservan proteínas relacionadas con el mantenimiento de la estructura celular, el transporte y la conservación de la energía, *V. harveyi* experimenta extensos cambios que afectan, por ejemplo, a la respuesta a estímulos químicos y la movilidad. En el caso de *E. coli*, sin embargo, los cambios son más limitados.

El estudio de la expresión génica de *V. harveyi* muestra que, cuando aún no se detectan cambios morfológicos y fenotípicos por efecto del estrés ambiental, esta bacteria responde variando la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo central del carbono, en la biosíntesis de nucleótidos y aminoácidos, en la reparación del DNA, la homeostasis del hierro y la respuesta al estrés oxidativo.

Otra línea de investigación incluye el *screening* de alto rendimiento y análisis funcional de RNAs antisentido con nuevas funciones en las respuestas frente al stress en *E. coli* y *V. harveyi*. Dadas la importancia de los sRNAs en la adaptación y virulencia bacterianas, el principal objetivo de esta línea es, mediante una combinación de metodologías bioquímicas, genéticas y de biología molecular de alto rendimiento, caracterizar sRNAs identificados experimentalmente y predichos por análisis *in silico* que no han sido estudiados previamente, establecer su papel en las respuestas bacterianas al estrés y determinar sus funciones reguladoras usando *E. coli* y *V. harveyi* como organismos modelos. Además, también se plantea investigar cómo la formación de complejos de sRNA/mRNA afectan al destino de los sRNAs seleccionados y sus dianas, y determinar la contribución de la chaperona Hfq y de ribonucleasas celulares a los pasos subsiguientes de desensamblaje y procesamiento de esos complejos *in vivo*.

PUBLICACIONES RECIENTES

- Barcina I, Orruño M y Arana I.** (2013) Benefits and risks of a wastewater treatment process. In: Handbook of Wastewater Treatment: Biological Methods, Technology and Environmental Impact. Nova Science Publishers, NY.
- Bravo Z, Orruño M, Parada C, Kaberdin VR, Barcina I y Arana I.** (2016) The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state. Arch Microbiol. DOI 10.1007/s00203-016-1200-1.
- Kaberdin VR y Blasi U.** (2013) Bacterial helicases in post-transcriptional control. Biochim Biophys Acta 1829: 878-83.
- Kaberdin VR y Blasi U.** (2014) mRNA stability. In: Encyclopedia of Life Science. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Kaberdin VR., Montánchez I, Parada C, Orruño M, Arana I y Barcina I.** (2015) Unveiling the metabolic pathways associated with the adaptive reduction of cell size during *Vibrio harveyi* persistence in seawater microcosms. Microb Ecol 70: 689-700.
- Montánchez I, Arana I, Parada C, Garaizabal I, Orruño M, Barcina I y Kaberdin VR.** (2014) Reprogramming of *Vibrio harveyi* gene expression during adaptation in cold seawater. FEMS Microbiol Ecol 87:193-203.
- Murashko ON, Kaberdin VR y Lin-Chao S.** (2012) Membrane binding of *Escherichia coli* RNase E catalytic domain stabilizes protein structure and increases RNA substrate affinity. Proc Natl Acad Sci USA 109: 7019-24.
- Orruño M, Garaizabal I, Arana I y Barcina I.** (2013) Persistence and dissemination of antimicrobial resistances in aquatic systems. In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Microbiology Book Series – 2013. Formatex Research Center. Spain.
- Orruño M, Garaizabal I, Bravo Z, Parada C, Barcina I y Arana I.** (2014) Mechanisms involved in *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* removal during activated sludge wastewater treatment. MicrobiologyOpen 3: 657-67.
- Romero AD, Hasan AH, Lin YF, Kime L, Ruiz-Larrabeiti O, Urem M, Bucca G, Mamanova L, Laing EE, van Wezel GP, Smith CP, Kaberdin VR y McDowall KJ.** (2014) A comparison and analysis of key aspects of gene regulation in *Streptomyces coelicolor* and *Escherichia coli* using equivalent nucleotide-resolution transcription maps produced by global and differential RNA-sequencing. Mol Microbiol 94: 963-87.