

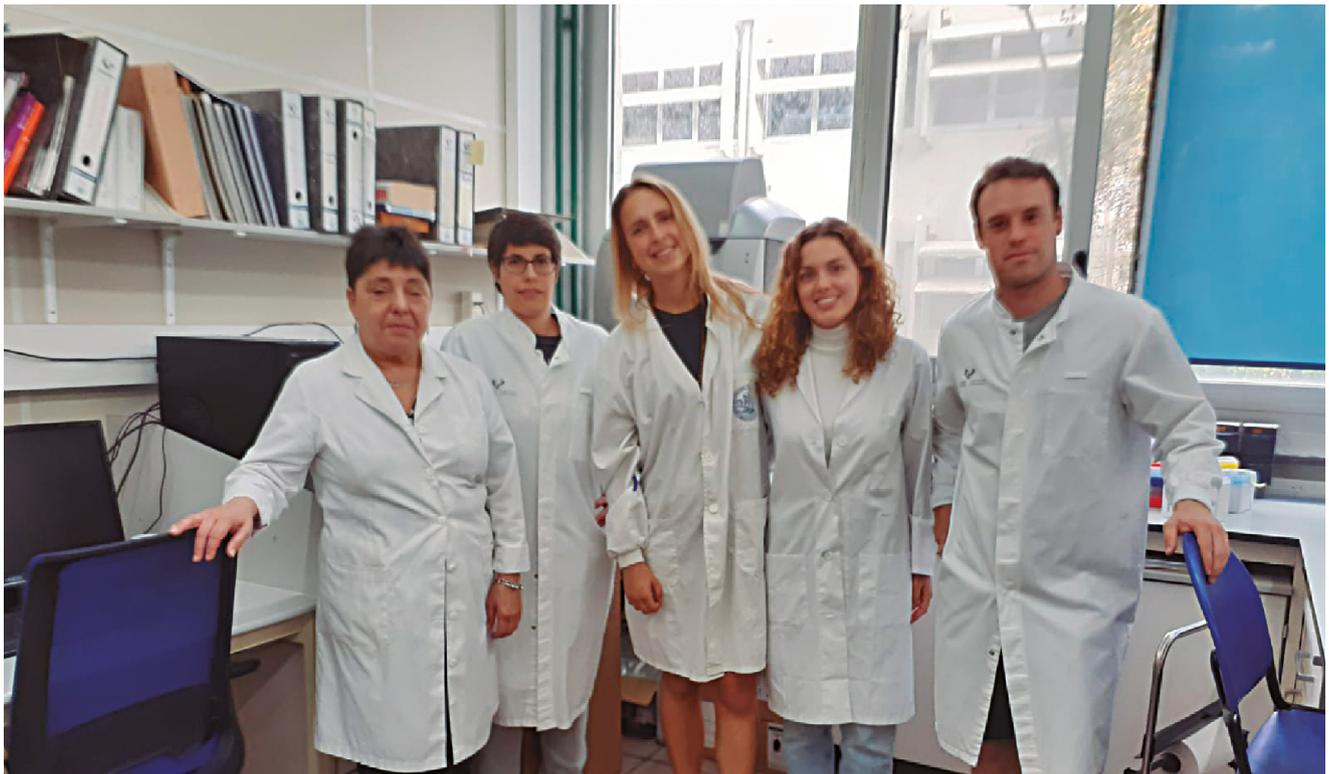
Respuesta bacteriana al estrés

INÉS ARANA^{1,2}, ARKAITZ ALMARAZ¹, ELIXABET OGAYAR¹, MAITE ORRUÑO^{1,2}

¹Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU).

²Plentziako Itsas Estazioa - Estación Marina de Plentzia (PIE-UPV/EHU).

✉ ines.arana@ehu.eus | maite.orrño@ehu.eus



Miembros del grupo: de izquierda a derecha: Inés Arana, Maite Ortuño, Lia Buenechea, Sofía Miranda y Arkaitz Almaraz.

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. 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. Nues-

tro grupo comenzó estudiando la respuesta de *Escherichia coli* a factores abióticos estresantes y su estrategia de supervivencia en diferentes sistemas acuáticos, que incluyeron los ambientes marino y lótico y 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 mantiene su actividad. 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, o lipoproteína 28, entre otras. Sin embargo, a pesar que se ha indicado la importancia de la capacidad de resucitación (recuperación de la cultivabilidad) cuando revierten las condiciones estresantes, lo que permitiría la recolonización del sistema; *E. coli* no revertió el estado VNC, aunque una fracción de la subpoblación cultivable remanente fue

capaz de crecer. 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.

Actualmente, el género *Vibrio* constituye nuestro objeto de interés. 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, hemos realizado campañas anuales orientadas a la detección de bacterias de este género con la colaboración de AZTI. Para ello hemos puesto a punto la técnica de CARD-FISH utilizando la sonda VIB572a (Ogayar *et al.* 2021), encontrando diferencias en las densidades de *Vibrio* totales atribuibles a la actividad antropogénica en zonas estuarinas. Además, utilizando una cepa modelo (*V. harveyi* CECT 525) y cepas ambientales hemos verificado la inducción del fenotipo VNC por efecto de la temperatura, la salinidad y/o la luz visible. 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 patrón de inducción de este estado de las cepas ambientales respecto a la cepa patrón. Todas las cepas estudiadas experimentaron una reducción del tamaño celular, pasando de una morfología bacilar a cocoide. Esta respuesta es independiente de la adopción del estado VNC y está inducida por la escasez de nutrientes; si bien, otros factores abióticos como temperatura o radiación visible, tienen un efecto acumulativo en el aumento de la fracción de la población correspondiente a las células de menor tamaño. Por otra parte, los análisis comparados de la variación del subproteoma de las membranas externas de *V. harveyi* mostraron que, tanto la cepa modelo como una cepa de la misma especie aislada a partir de agua de mar, conservan proteínas relacionadas con el mantenimiento de la estructura celular, el transporte y la conservación de la energía, aunque experimentan extensos cambios que afectan, por ejemplo, a la respuesta a estímulos químicos y la movilidad.

Además, *V. harveyi* es capaz de colonizar organismos filtradores como *Mytilus galloprovincialis* que podrían actuar como reservorios. Utilizando una cepa modificada para expresar la proteína GFP (Orruño

et al. 2019) estudiamos la colonización de diferentes órganos en mejillones expuestos a *V. harveyi*. Para ello se utilizan mesocosmos con agua de mar o una simulación de agua estuarina, inoculados con *V. harveyi*, y mantenidos a temperaturas similares a los del entorno de la Bahía de Plentzia durante las épocas fría y cálida (12°C y 20°C, respectivamente). Periódicamente se recogen mejillones para su disección y los órganos son analizados tanto por nuestro grupo como por el del profesor Beñat Zaldivar (Biología Celular Animal). Nuestros resultados muestran que *M. galloprovincialis* acumulan *V. harveyi* GFP en sus tejidos, registrándose los valores más altos en las glándulas digestivas. Esta bioacumulación sucede de forma rápida, ya en los primeros minutos tras el inicio del experimento, y decae a medida que transcurre el tiempo (hasta 144 h). En respuesta a la ingestión y acumulación de microorganismos en sus órganos, los mejillones activan un sistema inmunológico eficiente, que suele relacionarse con la actividad bactericida de los componentes de la hemolinfa, hemocitos y granulocitos, y de algunos tejidos blandos como la glándula digestiva y el manto-gónada. Aunque tras 24 h, se detectan muy pocas bacterias intactas en los órganos y la emisión de fluorescencia incrementa indicando lisis bacteriana, las cuantificaciones de *V. harveyi* indican que parte de la población escapa al sistema inmune de los mejillones pudiendo persistir en los diferentes órganos. Por otra parte, las densidades de *V. harveyi* GFP que se alcanzan en las branquias, gónadas y glándulas digestivas y en el agua circundante no están afectadas por la temperatura y/o la salinidad.

Dado que, en el entorno de la Bahía de Plentzia, *M. galloprovincialis* está siendo desplazado por *Crassostrea angulata*, hemos iniciado estudios comparativos del comportamiento de ambos bivalvos respecto a la capacidad de bioacumular *Vibrio* spp.

En el marco de nuestra colaboración con el PIE-UPV/EHU nos hemos integrado en un equipo multidisciplinar (proyectos HORIZON-HLTH-2021-ENVHLTH-02: BlueAdapt y TED2021-132109B-C21) para el estudio de un ecosistema marino, la Bahía de Plentzia, determinando diferentes parámetros y agentes contaminantes y patógenos, así como su influencia en seres vivos y en la sociedad.

Publicaciones relacionadas

Kaberdin VR, I Montánchez, C Parada, M Orruño, I Arana e I Barcina (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.

Kaberdin VR e I Arana (2022) Recent insights into *Escherichia coli* and *Vibrio* spp. pathogenicity and responses to stress. *Microorganisms* 10:38.

Montánchez I, E Ogayar, A Hernández-Plágaro, A Esteve-Codina, J Gómez-Garrido, M Orruño, I Arana y VR Kaberdin (2019) Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming. *Sci Rep* 9:289.

Ogayar E, I Larrañaga, A Lomba, VR Kaberdin, I Arana y M Orruño (2021) Efficiency and specificity of CARD-FISH probes in detection of marine vibrios. *Environ Microbiol Rep* 13:928-33.

Orruño M, C Parada, VR Kaberdin e I Arana (2021) The effect of visible light on cell envelope subproteome during *Vibrio harveyi* survival at 20°C in seawater. *Microorganisms* 9:594.

Orruño M, VR Kaberdin e I. Arana (2017) Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments. *World J Microbiol Biotechnol* 33:1-7.

Parada C, M Orruño, VR Kaberdin, Z Bravo, I Barcina e I Arana (2016) Changes in the *Vibrio harveyi* cell envelope subproteome during permanence in cold seawater. *Microb Ecol* 72:549-58.