

# **BACTERIAS VIABLES PERO NO CULTIVABLES (VBNC). IMPLICACIONES PARA LA SALUD**

Alumno: **David Ortega López**

Tutor: José Manuel de la Rosa Reyes

Trabajo de Fin de Grado

Área de Microbiología

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Curso 2021/2022

## ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT .....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. OBJETIVOS.....	7
3. METODOLOGÍA.....	7
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	8
4.1. Características generales del estado VBNC.....	8
4.2. Inducción de formas VBNC .....	9
4.3. Resucitación de formas VBNC.....	10
4.4. VBNC y resistencia antibiótica.....	11
4.5. VBNC y virulencia .....	12
4.6. VBNC en la industria y el medio ambiente .....	15
5. CONCLUSIONES.....	16
6. BIBLIOGRAFÍA .....	17
ANEXO .....	21

## RESUMEN

El estado viable pero no cultivable (VBNC, del inglés *viable but not culturable*) es una estrategia singular empleada por algunos microorganismos para sobrevivir a condiciones ambientales desfavorables. En este estado, se producen distintos cambios moleculares y morfológicos en las células, siendo incapaces, por lo general, de multiplicarse, pero reteniendo parte de su actividad metabólica para mantener su viabilidad, y, en determinadas circunstancias, poder retornar a su estado previo de actividad. Al no ser cultivables, no son detectados por los métodos convencionales y, por otra parte, la antibioterapia, normalmente empleada para eliminarlos, puede resultar ineficaz debido a las alteraciones en su biología. Por estas razones preocupan las consecuencias que la transición hacia el estado VBNC de los microorganismos patógenos puede tener para la salud de la población. ¿Hasta qué punto son capaces de retener su virulencia y, por tanto, su capacidad de producir patologías en el ser humano? En este trabajo, se discutirá cuánto se conoce sobre este fenómeno y cuáles pueden ser sus repercusiones sobre la salud o la industria, a través de la información obtenida mediante una revisión bibliográfica para una selección de microorganismos de trascendencia médica.

**Palabras clave:** VBNC, microorganismos, virulencia, inducción, resucitación, supervivencia, salud humana, resistencia.

## **ABSTRACT**

The viable but not culturable (VBNC) state is a unique strategy used by some microorganisms to survive adverse environmental conditions. In this state, various molecular and morphological changes occur in the cells, which are generally unable to multiply, but retain some of their metabolic activity to maintain their viability and, under certain circumstances, being able to return to their previous state of activity. As they cannot be cultivated, they are not detected by conventional methods and, moreover, antibiotic therapy, normally used to eliminate them, can be ineffective due to alterations in their biology. For these reasons, there is concern about the consequences that the transition of pathogenic microorganisms to the VBNC state may have for the population's health: to what extent are they capable of retaining their virulence and, therefore, their capacity to produce pathologies in humans? In this paper, it will be discussed how much is known about this phenomenon and what its repercussions on health or industry may be, through information obtained from a literature review for a selection of medically relevant microorganisms.

**Keywords:** VBNC, microorganisms, virulence, induction, resuscitation, survival, human health, resistance.

# 1. INTRODUCCIÓN

Desde su descubrimiento por Xu *et al.* (1) en 1982, y hasta el momento, se han descrito más de 100 especies de microorganismos que pueden entrar en un estado conocido como viable pero no cultivable (VBNC, siglas en inglés de *viable but not culturable*) (ver Anexo). Se trata de una estrategia de supervivencia que tiene lugar cuando éstos se exponen a condiciones ambientales desfavorables. La Figura 1 muestra, resumidamente, los principales descubrimientos llevados a cabo en torno al estado VBNC desde su descubrimiento en *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* (1).

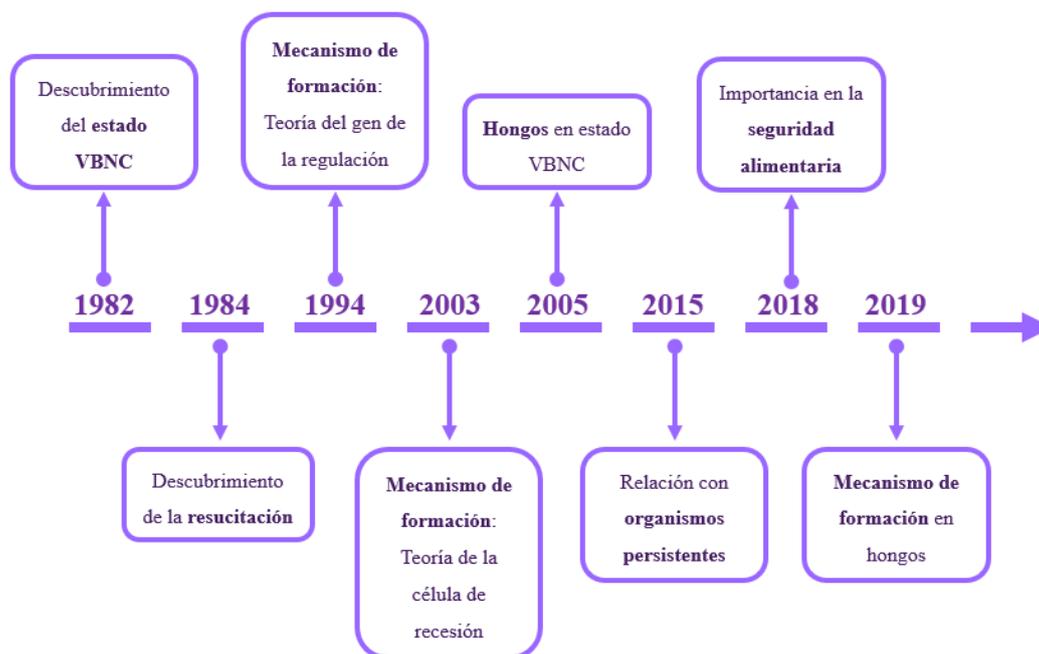


Figura 1. Cronología del progreso de la investigación sobre las formas VBNC [adaptada de (2)].

La mayoría de las bacterias que poseen la capacidad de pasar al estado VBNC pertenecen al grupo de las gramnegativas (3), aunque también se han descrito formas VBNC en algunos hongos (2, 4) y bacterias grampositivas, por lo general, no formadoras de esporas (2).

Aunque en el pasado fue considerado un estado de inactividad, hoy se sabe que en esta fase los microorganismos absorben nutrientes (4), son metabólicamente y fisiológicamente activos y, en algunos casos, pueden incluso producir infecciones (3,5). Como puede observarse en la Figura 2, las bacterias VBNC cambian sus características morfológicas, fisiológicas y moleculares (4).

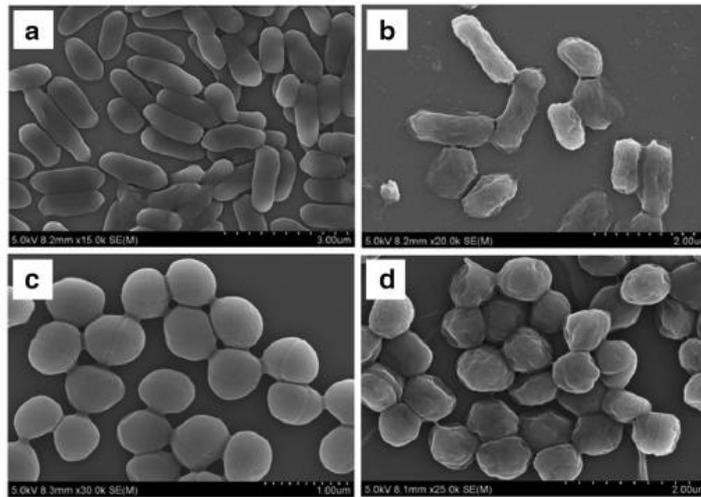


Figura 2. Micrografías de barrido de *E. coli* O157 y *Staphylococcus aureus* (a, c) y de sus correspondientes células VBNC (b, d, respectivamente) [adaptada de (6)].

Por otra parte, las células VBNC son incapaces de crecer en medios de cultivo convencionales y, por consiguiente, no son detectadas por los métodos habituales (5). Esto supone un verdadero problema si se tiene en cuenta que muchas especies potencialmente peligrosas pueden “pasar desapercibidas” en el agua potable, en los alimentos o en el ambiente en general, pero, posteriormente, pueden recuperar su estado normal (3).

Por tanto, teniendo en cuenta que muchos de estos microorganismos son importantes patógenos para el ser humano, estas formas VBNC pueden constituir una seria amenaza para la salud pública y un verdadero reto para la seguridad alimentaria ya que es ésta, la vía de los alimentos, una de sus principales formas de adquisición (3).

La Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE), sin ir más lejos, notificó en España, entre 2017 y 2018, 38909 casos de campilobacteriosis y 18629 de salmonelosis (688 y 454, respectivamente, en Canarias) (7), las dos toxiinfecciones alimentarias más frecuentes, producidas por *Campylobacter* y *Salmonella*, respectivamente. Esto da una idea de la incidencia de las enfermedades infecciosas transmitidas por alimentos y, al mismo tiempo, una poderosa razón para llevar a cabo investigaciones que permitan comprender cuáles son los mecanismos implicados en el proceso de transformación de los microorganismos en VBNC y cuáles son sus vías de reanimación o “resucitación”, para así poder valorar adecuadamente los riesgos para la salud (8).

## **2. OBJETIVOS**

Los objetivos planteados en este trabajo son los siguientes:

- Contribuir a la comprensión del estado VBNC y los principales mecanismos de inducción y resucitación,
- valorar el mantenimiento de la capacidad infecciosa y la resistencia antibiótica de las formas VBNC; y,
- en la medida de lo posible, evaluar las implicaciones que todo ello puede tener para la salud humana, especialmente en el ámbito de la industria alimentaria.

## **3. METODOLOGÍA**

Para localizar las fuentes de información se empleó la base de datos PubMed perteneciente al NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), incluyendo su buscador avanzado y las combinaciones de palabras señaladas en la Tabla 1.

Para la selección final de las publicaciones se utilizaron los siguientes filtros: artículos en lengua española o inglesa y posibilidad de acceso al texto completo, preferentemente publicados en los últimos diez años. Posteriormente, a esta selección inicial, se sumó la idoneidad del documento, atendiendo a los objetivos planteados en este trabajo, descartándose aquellos que se consideraron poco relevantes o redundantes.

En general, el número de artículos fue alto, incluso restringiendo o afinando los límites de búsqueda, lo que se podría considerar como un indicador del interés que este tema ha suscitado entre la comunidad científica, especialmente en los últimos años.

<b>Tabla 1. Estrategia de búsqueda en PubMed.</b>		
<b>Filtro</b>	<b>Palabras</b>	<b>Número de artículos</b>
Palabras incluidas en Título/Abstract	VBNC + <i>importance</i>	49
Palabras incluidas en Título/Abstract Años: 2016 – 2022	VBNC + <i>importance</i>	35
Palabras incluidas en Título/Abstract	VBNC + <i>resuscitacion</i>	163
Palabras incluidas en Título/Abstract Años: 2016 – 2022	VBNC + <i>resuscitacion</i>	82
Palabras incluidas en Título/Abstract	VBNC + <i>induction</i>	17
Palabras incluidas en Título/Abstract	VBNC + <i>pathogenicity</i>	38
Palabras incluidas en Título/Abstract Años: 2017 – 2022	VBNC + <i>pathogenicity</i>	16
Palabras incluidas en Título/Abstract	VBNC + <i>pathogenic</i>	6
Palabras incluidas en Título/Abstract Años: 2012 – 2022	VBNC + <i>virulence</i>	52
Palabras incluidas en Título/Abstract Años: 2017 – 2022	VBNC + <i>virulence</i>	33

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Características generales del estado VBNC

Algunos de los atributos más relevantes que poseen los microorganismos VBNC se muestran en la Tabla 2.

<b>Tabla 2. Características de los microorganismos VBNC*.</b>	
Mantenimiento de la integridad celular	Actividad celular medible
Cambios morfológicos	Recuperación de la capacidad de cultivo <i>in vivo</i>
Actividad metabólica reducida	Respuesta a estímulos externos (cambios en la expresión génica)
Transporte de nutrientes limitado	Altos niveles de ATP

Alteraciones en la pared celular (peptidoglicano)	Modificaciones en la composición de la membrana (ácidos grasos, proteínas)
Capacidad autolítica aumentada	Enanismo
Expresión de genes continua	Mayor resistencia a los antibióticos

\*Nota: Adaptada de Fakruddin *et al.* (3).

Debido a la dificultad de detectar a las bacterias VBNC, deben emplearse técnicas alternativas para detectarlas o ponerlas de manifiesto (2). A largo de los últimos años se han desarrollado diferentes métodos de detección como el recuento directo de las células al microscopio (DVC), combinado con la hibridación fluorescente *in situ* (FISH-DVC) o con la incubación directa con anticuerpos fluorescentes (DFA-DVC); el uso de sondas redox fluorescentes, como el 5-ciano-2,3-ditolil cloruro de tetrazolio (CTC), para poner de manifiesto el funcionamiento de la cadena respiratoria, u otras más recientes como el ensayo LIVE/DEAD *Bac*, basado en poner de manifiesto la integridad de la membrana citoplasmática mediante el uso combinado de dos tinciones fluorescentes (SYTO 9 e yoduro de propidio) y un microscopio de fluorescencia o un citómetro de flujo (2).

En la actualidad, gracias al progreso de la biología molecular, se han añadido otros sistemas de valoración de la viabilidad celular y su cuantificación que implican la utilización, por ejemplo, de la reacción en cadena de la polimerasa (PMA-qPCR, ddPCR, RT-qPCR), bacteriófagos, sensores biológicos, espectroscopía de masas MALDI-ToF-MS, mediciones del ATP celular, etc. (2).

#### 4.2. Inducción de formas VBNC

Las condiciones de inducción al estado VBNC son numerosas y distintas según los microorganismos o estirpes implicadas (9) y de las condiciones de experimentación (10).

En algunos casos, se ha puesto de manifiesto que el detonante puede ser una deficiencia de nutrientes, de oxígeno, una variación en el pH, la presión osmótica o la temperatura de incubación (2,5,11), así como, la presencia de determinadas sustancias químicas como cloro, iones de cobre (II), dióxido de azufre, entre otros (11), los cuales pueden estar presentes en productos de limpieza del hogar y cosméticos (12).

El patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis* es capaz de entrar, a través del estrés oxidativo, en fase VBNC, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*, lo cual puede

suponer una dificultad añadida a la hora de tratar las patologías que causa este microorganismo, puesto que un aumento de su supervivencia entre la microbiota oral incrementa sus posibilidades de cronificación (13).

Por otra parte, este estado puede inducirse cuando las bacterias forman biopelículas para resistir a las condiciones adversas (5,8,14). Por ejemplo, Wilks *et al.* (15) pusieron de manifiesto que la composición de los catéteres urinarios influye sobre la formación de *biofilms* y formas VBNC de algunas enterobacterias productoras de infecciones del tracto urinario como *E. coli*, *Proteus mirabilis* o *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **4.3. Resucitación de formas VBNC**

Cuando las condiciones ambientales son las idóneas, las formas VBNC pueden recuperar su actividad metabólica normal y ser cultivables en los medios convencionales (5,16). La reanimación o “resucitación” es un fenómeno complejo cuyos responsables moleculares varían según los microorganismos implicados y las condiciones de inducción, siendo, en ocasiones, desconocidos (17).

En términos generales, existen tres estrategias principales de resucitación (11): (a) cambiar las condiciones nutricionales o agregar orgánicos; (b) eliminar los inductores del medio; o, (c) usar mediadores biológicos, tales como, sustancias de organismos superiores.

Algunos factores concretos relacionados con la resucitación de formas VBNC incluyen variaciones de temperatura, adición de aminoácidos, piruvato sódico, nutrientes, oxígeno (O<sub>2</sub>), enriquecimiento del medio, etc. (2,5). Pinto *et al.* (18), por ejemplo, determinan el efecto positivo de los sobrenadantes de células en crecimiento y la adición de aminoácidos para la resucitación de formas VBNC de *E. coli*.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que las bacterias emplean mecanismos de comunicación o *quorum sensing*, a través de la producción y detección de moléculas autoinductoras, para responder y adaptarse a las condiciones del entorno. Estos mecanismos, que funcionan poniendo en marcha la expresión de múltiples genes, controlan la formación de biopelículas y la reanimación de las células VBNC (11,17). A modo de ejemplo, formas VBNC de *Vibrio vulnificus* pueden ser resucitadas con moléculas autoinductoras producidas por las células de una población inactiva en

respuesta a condiciones favorables (17). En el caso de *Salmonella* Typhimurium ocurren sucesos similares (19).

Estas células, además de recuperar su capacidad de crecer en el laboratorio, pueden recobrar su carácter infeccioso. Por tanto, una estrategia que limite la resucitación del estado VBNC implicaría la interrupción de la detección del *quorum sensing*. Esto puede ayudar decisivamente a controlar la formación de biopelículas y a la reanimación de células VBNC, lo que supondría un gran avance al ampliar el abanico de dianas posibles para el diseño de nuevos fármacos antimicrobianos (11).

#### **4.4. VBNC y resistencia antibiótica**

El fenómeno de la resistencia antibiótica se ha ido incrementado de forma progresiva durante las últimas décadas. Se ha demostrado que las formas VBNC presentan una mayor resistencia a las moléculas antimicrobianas comparado con las células cultivables (20,21). Los cambios fenotípicos y moleculares que acontecen contribuyen a la persistencia de las estirpes resistentes en el ambiente y suponen, por tanto, un nuevo desafío científico para encontrar estrategias eficientes y seguras que conduzcan a la eliminación de las VBNC patógenas y una amenaza potencial para la seguridad y la salud de la población (16).

No obstante, el estudio de la resistencia en bacterias VBNC está influenciado por la dificultad de evaluar correctamente la eficacia antimicrobiana contra las bacterias VBNC, ya que, hasta ahora, el enfoque metodológico usado se basaba predominantemente en el crecimiento. De ahí que se estén desarrollando diferentes enfoques metodológicos, como la determinación de la integridad de la membrana celular o la actividad metabólica, entre otros, para valorar la viabilidad de las formas VBNC frente a antibióticos; sin embargo, aún son pocos y se carecen de estudios comparativos (16). Algunos de estos métodos se han comentado en el apartado 4.1.

Sikri *et al.* (22), en un estudio sobre *Mycobacterium tuberculosis*, evidencian que la vitamina C es capaz de desencadenar la formación de células VBNC, las cuales muestran una mayor tolerancia a los medicamentos tuberculosos de primera línea. La reversión al estado normal, suprimiendo el inductor, conlleva la reactivación del microorganismo y la reaparición de la enfermedad tuberculosa, pero también la resensibilización del patógeno a los fármacos.

Un tipo de antimicrobianos en los que se tiene gran esperanza son los péptidos antimicrobianos (AMP), pequeños péptidos catiónicos y anfipáticos producidos prácticamente por todos los animales y plantas. Tienen la ventaja de ser activos frente a una amplia gama de microorganismos. Además, se ven atraídos electrostáticamente por las membranas bacterianas cargadas negativamente desestabilizando su estructura y posiblemente interfiriendo con los procesos metabólicos desempeñados por distintas dianas citoplasmáticas. Recientemente, Hu *et al.* (6) demostraron que las piscidinas, obtenidas de peces, muestran una actividad bactericida eficaz para varias VBNC resistentes a ampicilina y kanamicina de *E. coli*, *S. aureus* y *V. parahaemolyticus*.

#### 4.5. VBNC y virulencia

Este aspecto es particularmente relevante. Por ejemplo, en productos relacionados con la industria alimentaria la presencia de formas VBNC puede suponer un riesgo para la salud de los consumidores.

Existen casos de bacterias patógenas que pierden su patogenicidad al entrar en el estado VBNC (23), pero la recuperan una vez son resucitadas, de ahí su potencial peligro. En otros, por el contrario, se ha demostrado que las formas VBNC retienen su virulencia (5).

Liu *et al.* (2010) (24) demostraron, en particular, que células VBNC de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7, inducidas mediante diferentes mecanismos, retienen su patogenicidad al continuar siendo capaces de producir la toxina Shiga, su principal factor de virulencia. La presencia de células VBNC de patógenos en el agua (y alimentos), como es el caso de *E. coli*, hace que pueda llegar a cuestionarse su utilización como indicador de contaminación fecal y la existencia de un riesgo potencial para la salud (5).

En un estudio proteómico, llevado a cabo por Brenzinger *et al.* (25), con células VBNC de aguas ambientales pertenecientes a *V. cholerae* O1 biovar El Tor, se analizaron las modificaciones producidas. Entre otros factores, se constató el mantenimiento de algunos de sus factores de virulencia como las adhesinas, implicadas en la unión al epitelio intestinal, las hemolisinas y la toxina del cólera, aunque ésta última en menor cantidad (25).

Por su parte, Amel *et al.* (26) demostraron, en un estudio similar, que las formas VBNC de *V. fluvialis* conservan, durante varios años, su capacidad para ser resucitadas, regresando al estado cultivable y recuperando la expresión de sus factores de virulencia

(26). Esta gran capacidad de supervivencia en ambientes marinos ya había sido puesta de manifiesto en el caso de VBNC de *V. vulnificus* biotipo 2, las cuales conservan su potencial patógeno, pasados dos años de su inducción, siendo capaces de infectar a ratones y anguilas (27).

Recientemente, Liao *et al.* (21) indujeron el estado VBNC en *S. aureus*, al tratarla con plasma atmosférico no térmico, una nueva técnica de conservación y mejora de la calidad microbiológica de los alimentos. *S. aureus* mantuvo la expresión de ciertas proteínas relacionadas con su virulencia tales como el factor de aglutinación, las adhesinas, los sistemas de traslocación de proteínas, o la biosíntesis capsular, junto a otros factores, que permitirían a la bacteria evadir la respuesta inmune del hospedador. Así mismo, estas células retuvieron su capacidad infectiva en la línea celular HeLa (21).

Jayeola *et al.* (28) identificaron células VBNC de distintas cepas de *Salmonella* en frutas desecadas, ricas en azúcares, aunque se desconocen los factores ambientales clave que desencadenan tanto la inducción como la reanimación y, si en el estado VBNC, son capaces de retener su virulencia. Los autores concluyen que los métodos microbiológicos actuales basados en cultivos podrían conducir a una subestimación de las células viables de *Salmonella* (28). Este hecho no descarta que en otros alimentos o condiciones sí puedan seguir disponiendo de su capacidad patógena.

Las formas VBNC de *Listeria monocytogenes*, otro patógeno humano muy relevante, inducidas por medio de la falta de nutrientes, y consideradas inicialmente como avirulentas, resucitaron y recuperaron su virulencia en cultivos de huevos embrionados de pollo, pero no lo lograron en cultivos de huevos no embrionados, como demostraron Cappelier *et al.* (23). Aunque se desconoce el papel desempeñado por el embrión en el proceso de recuperación, los autores evidencian la capacidad patógena de las células recuperadas para infectar la línea celular HT-29. Más recientemente, Kortebi *et al.* (29), muestran que *L. monocytogenes* pueden entrar en fase VBNC dentro de las vacuolas de las células epiteliales y propagarse pasivamente durante la mitosis celular.

Highmore *et al.* (8) también analizan los casos de los patógenos *Salmonella* y *L. monocytogenes*. Estos investigadores corroboran que ambos conservan su virulencia en el estado VBNC empleando el modelo animal del nemátodo *Caenorhabditis elegans*, muy utilizado en investigación. La inducción de VBNC se produce mediante la cloración, en un proceso similar al utilizado actualmente para eliminar a estos patógenos en la industria agrícola y alimentaria. El indicador de virulencia es la reducción en la esperanza de vida del nemátodo tras ser infectado por el microorganismo. Las células VBNC mantuvieron su capacidad de infectar el tracto gastrointestinal del nematodo (Figura 3), aunque el efecto infeccioso fue menor en el caso de *Salmonella* (8).

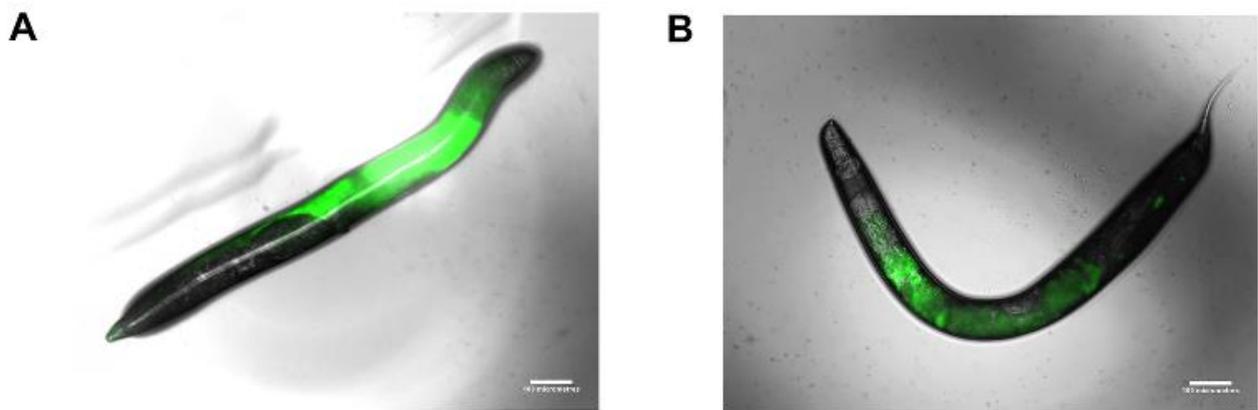


Figura 3. Micrografías superpuestas de *C. elegans* conteniendo en su interior *L. monocytogenes* VBNC (A) y *Salmonella* Thompson VBNC (B) fluorescentes obtenidas por microscopio de epifluorescencia (EDIC-EF) [adaptada de (8)].

La determinación del potencial infectivo de las formas VBNC de *Campylobacter jejuni*, inducidas por el mantenimiento en agua de mar artificial a baja temperatura, fue investigado por Baffone *et al.* (10). El estado cultivable se recuperó tras su paso por el intestino en un modelo de ratón y la resucitación de las células fue mayor cuanto mayor fue el número de VBNC respiradoras. Otro tipo de condiciones, como el estrés osmótico, también ha demostrado ser un inductor de las formas VBNC en este microorganismo (30).

*Clostridium perfringens* y *Bacillus cereus* son otros dos enteropatógenos que pueden entrar en el estado VBNC durante el procesamiento de las carnes por las condiciones de almacenamiento, los tratamientos de descontaminación, la adición de conservantes o la naturaleza de los envases empleados; sin embargo, aún no está claro si las bacterias conservan su potencial patogénico (31).

Las formas VBNC también son importantes para otros microorganismos que no se transmiten por el consumo de alimentos, como es el caso de *Legionella pneumophila*. Este patógeno, que se adquiere mediante aerosoles procedentes de los sistemas de conducción de agua, puede entrar en el estado VBNC cuando estas instalaciones se tratan con cloro. Alleron *et al.* (32), mediante un estudio proteómico, demostraron que las células VBNC mantienen la producción de cuatro proteínas relacionadas con su virulencia y con su capacidad de eludir la respuesta inmunitaria.

Mediante la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) se pudo medir la expresión de genes en *Corynebacterium diphtheriae* toxigénica. Hamabata *et al.* (33) observaron que hay un nivel similar de expresión del gen de la toxina diftérica y del represor del mismo en células cultivables y VBNC, lo que hace sospechar que ambas formas son igualmente patógenas.

#### **4.6. VBNC en la industria y el medio ambiente**

Los microorganismos VBNC pueden suponer un serio problema para la seguridad alimentaria, como ha quedado indicado anteriormente, pero también pueden serlo para la calidad del alimento, causando un perjuicio económico para la industria.

Se ha reportado que algunas bacterias, como *Lactobacillus habinensis*, perteneciente al grupo de las bacterias lácticas, pueden originar el deterioro de la cerveza cuando ésta se almacena a bajas temperaturas. Las responsables del deterioro, como demuestran Liu *et al.* (2018) (34), son células VBNC que permanecen en la cerveza hasta que se producen las condiciones idóneas para su resucitación. Los autores evidencian que la adición de catalasa induce la resucitación y estas células resucitadas son capaces de deteriorar el producto de forma comparable a las bacterias procedentes de un cultivo puro en fase exponencial.

En un estudio reciente, de similares características, se puso de manifiesto el potencial deterioro de la cerveza producido por células resucitadas de *Pediococcus damnosus* (35).

Por otra parte, también se ha reportado que los hongos pueden entrar en fase de VBNC, aunque con mucha menos frecuencia. El caso más conocido es el de *Brettanomyces bruxellensis*, principal levadura relacionada con el deterioro del vino. Esta levadura puede producir sustancias fenólicas volátiles que proporcionan al vino un olor desagradable. Suele aparecer cuando el vino permanece durante mucho tiempo en el barril

para su fermentación o crianza. El estado VBNC es inducido por el dióxido de azufre, un agente antimicrobiano usado en la conservación de alimentos; no obstante, la levadura puede resucitar cuando se aumenta el pH para eliminar el agente estresante del medio. La entrada en el estado VBNC es, por consiguiente, un evento indeseable ya que afecta a la estabilidad y la seguridad del proceso de fermentación (36).

Aunque no se discute en este trabajo, al no encontrarse entre los objetivos planteados, las formas VBNC también son frecuentes e importantes maneras de supervivencia entre los microorganismos ambientales. Aunque, por el momento, son pocos los estudios que investigan cuáles pueden ser sus implicaciones biológicas o ecológicas, uno de los campos donde se cree que el conocimiento de los mecanismos implicados en la transición a VBNC puede ser importante es en el de la biorremediación (4), es decir, la utilización de los microorganismos para degradar contaminantes en ambientes alterados y devolverlos a su condición natural.

## **5. CONCLUSIONES**

El estado VBNC es una estrategia de supervivencia por la que algunos microorganismos consiguen subsistir en ambientes desfavorables ante la presencia de algún factor estresante. Es un fenómeno complejo, aún no del todo comprendido, que implica una serie de mecanismos subyacentes para su inducción (entrada) y reactivación o resucitación (salida), que parecen ser variados y distintos, según el microorganismo. Algunos de ellos son patógenos para el ser humano y son adquiridos por éstos mediante el consumo de alimentos o agua. En otros casos, estas formas VBNC pueden encontrarse sobre distintos materiales (catéteres, por ejemplo) que serán luego introducidos en pacientes. Teniendo en cuenta la dificultad técnica para su detección, mediante cultivo, su presencia puede ser subestimada y, puesto que se ha demostrado que algunos de ellos conservan cierto grado de virulencia en el estado VBNC, pueden comprometer la calidad y la seguridad microbiológica suponiendo un riesgo serio para la salud. También, pueden dificultar o interferir con el diagnóstico o el pronóstico de las patologías infecciosas, pudiendo ser responsables de recaídas o recidivas de infecciones, máxime cuando, como se ha demostrado en algunos casos, en fase VBNC, asociados o no con biopelículas, estos patógenos pueden resultar insensibles a los fármacos a los que en fase normal eran sensibles.

Para finalizar, se podría justificar que se intensifique la investigación en este campo para simplificar y encontrar mejores métodos de detección, descubrir nuevos antimicrobianos eficaces para formas VBNC, profundizar en el conocimiento de los mecanismos implicados y poder influir en la entrada y/o salida de los microorganismos de este estado, y que todo ello pueda repercutir favorablemente en el bienestar de la población.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

1. Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwelp RR. Survival and Viability of Nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the Estuarine and Marine Environment. *Microb Ecol.* 1982;8(4):313–23.
2. Dong K, Pan H, Yang D, Rao L, Zhao L, Wang Y, et al. Induction, detection, formation, and resuscitation of viable but non-culturable state microorganisms. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2020;19(1):149–83.
3. Fakruddin M, Mannan KS, Andrews S. Viable but Nonculturable Bacteria: Food Safety and Public Health Perspective Academic. *ISRN Microbiol.* 2013;2013:703813.
4. Xie M, Xu L, Zhang R, Zhou Y, Xiao Y, Su X, et al. Viable but Nonculturable State of Yeast *Candida sp.* Strain LN1 Induced by High Phenol Concentrations. *Appl Environ Microbiol.* 2021;87(18):1–15.
5. Ding T, Suo Y, Xiang Q, Zhao X, Chen S, Ye X, et al. Significance of viable but nonculturable *Escherichia coli*: Induction, detection, and control. *J Microbiol Biotechnol.* 2017;27(3):417–28.
6. Hu B, Pan Y, Li Z, Yuan W, Deng L. EmPis-1L, an Effective Antimicrobial Peptide Against the Antibiotic-Resistant VBNC State Cells of Pathogenic Bacteria. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2019;11:667–675.
7. Instituto de Salud Carlos III. Resultados de la Vigilancia Epidemiológica de las enfermedades transmisibles. Informe anual. Años 2017-2018 [Sede Web]. 2018 [consultado 13 de abril de 2022]. Disponible en: [https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES%20RENAVE/RENAVE\\_Informe\\_anual\\_\\_2017-2018.pdf](https://www.isciii.es/QueHacemos/Servicios/VigilanciaSaludPublicaRENAVE/EnfermedadesTransmisibles/Documents/INFORMES/INFORMES%20RENAVE/RENAVE_Informe_anual__2017-2018.pdf)

8. Highmore CJ, Warner JC, Rothwell SD, Wilks SA, Keevil CW. Viable-but-Nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Thompson Induced by Chlorine Stress Remain Infectious. *mBio*. 2018;9(2):e00540-18.
9. Nia Gaio V, Lopes N, Cerca N, Franç A. *codY* and *pdhA* Expression Is Induced in *Staphylococcus epidermidis* Biofilm and Planktonic Populations With Higher Proportions of Viable but Non-Culturable Cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:771666.
10. Baffone W, Casaroli A, Citterio B, Pierfelici L, Campana R, Vittoria E, et al. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *Int J Food Microbiol*. 2006;107(1):83–91.
11. Li J, Zhao X. Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but non-culturable state. *Food Res Int*. 2020;137:109742.
12. Robben C, Fister S, Witte AK, Schoder D, Rossmannith P, Mester P. Induction of the viable but non-culturable state in bacterial pathogens by household cleaners and inorganic salts. *Sci Rep*. 2018;8(1):15132.
13. Progulsk-Fox A, Chukkapalli SS, Getachew H, Dunn WA, Oliver JD. VBNC, previously unrecognized in the life cycle of *Porphyromonas gingivalis*? *J Oral Microbiol*. 2022;14(1):1952838.
14. Wingender J, Flemming HC. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health*. 2011;214(6):417–23.
15. Wilks SA, Koerfer VV, Prieto JA, Fader M, Keevil CW. Biofilm Development on Urinary Catheters Promotes the Appearance of Viable but Nonculturable Bacteria. *mBio*. 2021;12(2):e03584-20.
16. Fleischmann S, Robben C, Alter T, Rossmannith P, Mester P. How to evaluate non-growing cells-current strategies for determining antimicrobial resistance of VBNC bacteria. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(2):1–24.
17. Ayrapetyan M, Williams TC, Oliver JD. Interspecific quorum sensing mediates the resuscitation of viable but nonculturable vibrios. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(8):2478–83.

18. Pinto D, Almeida V, Almeida Santos M, Chambel L. Resuscitation of *Escherichia coli* VBNC cells depends on a variety of environmental or chemical stimuli. *J Appl Microbiol.* 2011;110(6):1601–11.
19. Liao H, Zhong X, Xu L, Ma Q, Wang Y, Cai Y, et al. Quorum-sensing systems trigger catalase expression to reverse the *oxyR* deletion-mediated VBNC state in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol.* 2019;170(2):65–73.
20. Lin H, Ye C, Chen S, Zhang S, Yu X. Viable but non-culturable *E. coli* induced by low level chlorination have higher persistence to antibiotics than their culturable counterparts. *Environ Pollut.* 2017;230:242–9.
21. Liao X, Hu W, Liu D, Ding T. Stress Resistance and Pathogenicity of Nonthermal-Plasma- Induced Viable-but-Nonculturable *Staphylococcus aureus* through Energy Suppression, Oxidative Stress Defense, and Immune-Escape Mechanisms. *Appl Environ Microbiol.* 2021;87(2):e02380-20.
22. Sikri K, Duggal P, Kumar C, Batra SD, Vashist A, Bhaskar A, et al. Multifaceted remodeling by vitamin C boosts sensitivity of *Mycobacterium tuberculosis* subpopulations to combination treatment by anti-tubercular drugs. *Redox Biol.* 2018;15:452–66.
23. Cappelletti JM, Besnard V, Roche SM, Velge P, Federighi M. Avirulent Viable but Non Culturable cells of *Listeria monocytogenes* need the presence of an embryo to be recovered in egg yolk and regain virulence after recovery. *Vet Res.* 2007;38(4):573–83.
24. Liu Y, Wang C, Tyrrell G, Li XF. Production of Shiga-like toxins in viable but nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Water Res.* 2010;44(3):711–8.
25. Brenzinger S, van der Aart LT, van Wezel GP, Lacroix JM, Glatter T, Briegel A. Structural and Proteomic Changes in Viable but Non-culturable *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol.* 2019;10:793.
26. Amel BKN, Amine B, Amina B. Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiol Res.* 2008;163(3):323–8.
27. Marco-Noales E, Biosca EG, Amaro C. Effects of Salinity and Temperature on Long-Term Survival of the Eel Pathogen *Vibrio vulnificus* Biotype 2 (Serovar E). *Appl Environ Microbiol.* 1999;65(3):1117–26.

28. Jayeola V, Farber JM, Kathariou S. Induction of the Viable-but-Nonculturable State in *Salmonella* Contaminating Dried Fruit. *Appl Environ Microbiol.* 2022;88(2):e0173321.
29. Kortebi M, Milohanic E, Mitchell G, P  choux C, Prevost MC, Cossart P, et al. *Listeria monocytogenes* switches from dissemination to persistence by adopting a vacuolar lifestyle in epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2017;13(11):e1006734.
30. Lv R, Wang K, Feng J, Heeney DD, Liu D, Lu X. Detection and Quantification of Viable but Non-culturable *Campylobacter jejuni*. *Front Microbiol.* 2020;10:2920.
31. El-Aziz NKA, Tartor YH, El-Aziz Gharib AA, Ammar AM. Propidium Monoazide Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction for Enumeration of Some Viable but Nonculturable Foodborne Bacteria in Meat and Meat Products. *Foodborne Pathog Dis.* 2018;15(4):226–34.
32. Alleron L, Khemiri A, Koubar M, Lacombe C, Coquet L, Cosette P, et al. VBNC *Legionella pneumophila* cells are still able to produce virulence proteins. *Water Res.* 2013;47(17):6606–17.
33. Hamabata T, Senoh M, Iwaki M, Nishiyama A, Yamamoto A, Shibayama K. Induction and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Corynebacterium diphtheriae*. *Microorganisms.* 2021;9(5):927.
34. Liu J, Deng Y, Li L, Li B, Li Y, Zhou S, et al. Discovery and control of culturable and viable but non-culturable cells of a distinctive *Lactobacillus harbinensis* strain from spoiled beer. *Sci Rep.* 2018;8(1):11446.
35. Xu Z, Wang K, Liu Z, Soteyome T, Deng Y, Chen L, et al. A novel procedure in combination of genomic sequencing, flow cytometry and routine culturing for confirmation of beer spoilage caused by *Pediococcus damnosus* in viable but nonculturable state. *LWT.* 2022;154:112623.
36. Capozzi V, di Toro MR, Grieco F, Michelotti V, Salma M, Lamontanara A, et al. Viable But Not Culturable (VBNC) state of *Brettanomyces bruxellensis* in wine: New insights on molecular basis of VBNC behaviour using a transcriptomic approach. *Food Microbiol.* 2016;59:196–204.

## ANEXO

Anexo 1. Algunas bacterias de interés formadoras de VBNC		
Microorganismo	Tinción de Gram	Patología más frecuente
<i>Vibrio vulnificus</i>	Gramnegativo	Infecciones en la piel
<i>Vibrio cholerae</i>	Gramnegativo	Cólera
<i>Vibrio fluvialis</i>	Gramnegativo	Gastroenteritis
<i>Escherichia coli O157:H7</i>	Gramnegativo	Diarrea hemorrágica
<i>Staphylococcus aureus</i>	Grampositivo	Infecciones en la piel
<i>Salmonella spp</i>	Gramnegativo	Diarreas
<i>Legionella pneumophila</i>	Gramnegativo	Enfermedad del legionario
<i>Listeria monocytogenes</i>	Grampositivo	Listeriosis
<i>Clostridium perfringens</i>	Grampositivo	Infecciones intestinales
<i>Bacillus cereus</i>	Grampositivo	Infecciones intestinales
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Grampositivo	Tuberculosis
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Grampositivo	Difteria
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Gramnegativo	Enfermedades sistémicas
<i>Lactobacillus harbinensis</i>	Grampositivo	Deterioro de la cerveza
<i>Pediococcus damnosus</i>	Grampositivo	Deterioro de la cerveza
<i>Campylobacter jejuni</i>	Gramnegativo	Gastroenteritis
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gramnegativo	Infecciones oportunistas
<i>Proteus mirabilis</i>	Gramnegativo	Infecciones en el tracto urinario
<i>Helicobacter pylori</i>	Gramnegativo	Úlcera péptica y gastritis
<i>Enterococcus faecalis</i>	Grampositivo	Endocarditis, infecciones múltiples
<i>Shigella spp</i>	Gramnegativo	Disentería
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Grampositivo	Infecciones múltiples
<i>Burkholderia cepacia</i>	Gramnegativo	Infecciones respiratorias
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gramnegativo	Infecciones respiratorias y oportunistas
<i>Treponema pallidum</i>	Gramnegativo	Sífilis
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Gramnegativo	Enfermedad de Lyme