

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

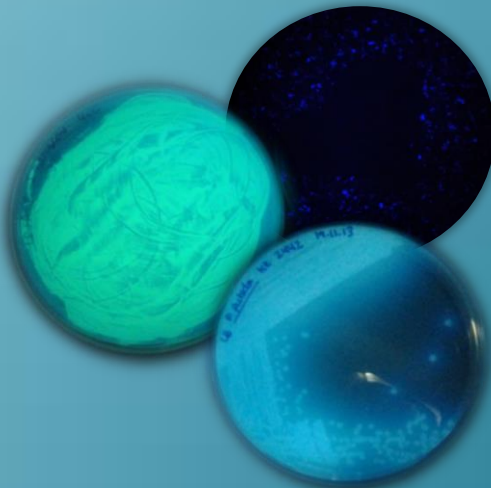
Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco    Euskal Herriko Unibertsitatea

# Identificación de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés en *Escherichia coli* y *Vibrio harveyi*



**Claudia Parada Morais**  
**TESIS DOCTORAL**  
**Leioa, 2016**



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



eman ta zabal zazu  
Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

# Identificación de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés en *Escherichia coli* y *Vibrio harveyi*

Claudia Parada Morais

TESIS DOCTORAL

Leioa, 2016





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



Universidad del País Vasco  
Euskal Herriko Unibertsitatea

Dpto. Inmunología, Microbiología y Parasitología  
Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

# Identificación de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés en *Escherichia coli* y *Vibrio harveyi*

Memoria presentada por CLAUDIA PARADA MORAIS para optar al título de Doctora  
por la Universidad del País Vasco.

Trabajo dirigido por las Dras. Inés Arana Basabe y Maite Orruño Beltrán, del grupo de  
Respuesta Bacteriana al Estrés dentro del Programa de Doctorado en Inmunología,  
Microbiología y Parasitología.

Inés Arana Basabe  
Directora de Tesis

Maite Orruño Beltrán  
Codirectora de Tesis

Claudia Parada Morais  
Doctoranda



El trabajo presentado en esta Memoria ha sido financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia (proyectos CGL2011-26252 y BFU2011-25455) y el Gobierno Vasco (proyecto IT376-10).

Durante la realización de esta Tesis Doctoral he disfrutado de una Beca Predoctoral concedida por el Departamento de Educación, Política Lingüística y Cultura del Gobierno Vasco (BFI-2011-85).



Los resultados obtenidos durante esta Tesis Doctoral han sido objeto de las siguientes publicaciones y contribuciones a congresos:

#### **Publicaciones:**

Montánchez I, Arana I, **Parada C**, Garaizabal I, Orruño M, Barcina I, Kaberdin V. 2014. Reprogramming of *Vibrio harveyi* gene expression during adaptation in cold seawater. *FEMS Microbiology Ecology*. 87: 193-203.

Kaverdin VR, Montánchez I, **Parada C**, Orruño M, Arana I, Barcina I. 2015. Unveiling the metabolic pathways associated with the adaptive reduction of cell size during *Vibrio harveyi* persistence in seawater microcosmos. *Microbial Ecology*. 70(3): 689-700.

**Parada C**, Orruño M, Kaverdin VR, Bravo Z, Barcina I, Arana I. 2016. Changes in the *Vibrio harveyi* cell envelope subproteome during permanence in cold seawater. *Microbial Ecology*. En revisiones menores.

#### **Contribuciones a congresos:**

Arana I, Orruño M, Garaizabal I, **Parada C**, Montánchez I, Kaberdin V, Barcina I. 2012. Changes in the *Vibrio harveyi* outer membrane subproteome and transcriptome during adaptation to cold seawater. 14<sup>th</sup> International Symposium on Microbial Ecology, ISME 14. Copenhagen, Dinamarca. 19-24 agosto, 2012.

**Parada C**, Bravo Z, Garaizabal I, Orruño M, Arana I, Barcina I. Effects of temperature on *Vibrio harveyi*: entry into the viable but nonculturable state and resuscitation. 2013 SUMMER SCHOOL, bc3 Basque Centre for Climate Change – Klima Aldaketa Ikergai. Donostia-San Sebastián, España. 08-10 julio, 2013.

**Parada C**, Estivariz I, Aja I, Garaizabal I, Orruño M, Arana I, Barcina I. Estudio autoecológico de *Vibrio harveyi* en ambientes marinos. XXIV Congreso de Microbiología. L'Hospitalet, España. 10-13 julio, 2013.

Arana I, Orruño M, **Parada C**, Garaizabal I, Vladimir K, Barcina I. Effects of temperature on outer membrane proteins of starved *Vibrio harveyi* in seawater. SAME 13: First EMBO Conference on Aquatic Microbial Ecology. Stresa, Italia. 8-13 septiembre, 2013.

**Parada C**, Orruño M, Garaizabal I, Bravo Z, Barcina I, Arana I. Morphological, physiological and proteomic changes during *Vibrio harveyi* survival in seawater:



effect of temperature and visible light. *Vibrio* 2014. Edinburgh, Reino Unido. 01-04 abril, 2014.

**Parada C**, Bravo Z, Orruño M, Arana I. Effects of temperature and predation on permanence of *Vibrio harveyi* in seawater. 2015 ASLO Aquatic Sciences Meeting. Granada, España. 22-27 febrero, 2015.

**Parada C**, Bravo Z, Kaberdin VR, Barcina I, Orruño M, Arana I. Changes in membrane subproteome in *Vibrio harveyi* during the adoption of viable but nonculturable state by effect of starvation and visible light. 6<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists. Maastricht, Países Bajos. 07-11 junio, 2015.

**Parada C**, Argos P, Bravo Z, Kaberdin VR, Orruño M, Arana I. Changes in the membrane proteome associated to the entry into the viable but nonculturable state. *Escherichia coli* vs. *Vibrio harveyi*. Second EMBO Conference on Aquatic Microbial Ecology: SAME-14. Uppsala, Suecia. 23-28 agosto, 2015.

*«La paciencia es un árbol de raíz amarga, pero de frutos muy dulces.»*

*Proverbio persa*

*A Sara y Alfonso.*



## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer mediante estas líneas a todas las personas que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral, empezando por mis directoras de Tesis, Inés Arana y Maite Orruño, por brindarme la oportunidad de colaborar en el laboratorio y formarme como investigadora, así como por la gran dedicación mostrada durante la realización de este trabajo. Igualmente, agradecerle a Isabel Barcina por ofrecerme la oportunidad de iniciarme en un laboratorio de Microbiología cuando apenas daba mis primeros pasos en la carrera universitaria.

A Vladimir Kaberdin, colaborador Ikerbasque del laboratorio, por las recomendaciones y aportaciones efectuadas durante la realización de este trabajo. También a Eric V Stabb, profesor de la Universidad de Georgia (Athens, EEUU), y su equipo de trabajo por la amabilidad y disponibilidad que mostraron ante la petición de dos cepas bacterianas, gracias a las cuales pude realizar uno de los ensayos presentados en este trabajo.

A todos los compañeros que han ido pasando por el laboratorio y el departamento, Idoia, que fue mi “maestra” nada más empezar, Zaloa y Mónica, con las que he tenido la suerte de recorrer este camino tras haber compartido, también con ellas, los últimos años de carrera. Cristina, Virginia, Itxaso, Olatz, Mikel, Jimena, Leyre, Iratxe, Sofía, Iris, Paula, David,... Por toda la ayuda que me han brindado y por los buenos momentos que hemos compartido.

A mi cuadrilla. Los días de desconexión con ellas siempre son un verdadero soplo de aire fresco. Me han hecho volver con las pilas cargadas, sobre todo de optimismo, ¡porque nada se nos resiste a Txotx-eas!

Especialmente a mi familia. A mis padres, por todas las veces que han pagado los platos rotos sin merecérselo y aun así, siempre están dispuestos a seguir ayudándome. A mis hermanos, por su confianza, infinita paciencia y apoyo. A mis cuñados, por el interés y preocupación que han mostrado por mi trabajo. A mi sobrina, por su cariño y amor incondicionales. Y sobre todo, por el respeto que mostraba cuando yo estaba concentrada con “mis estudios”.

Y a todas las personas que de una forma inesperada han ido entrando en mi vida a largo de esta etapa y que han sabido sacarme una sonrisa incluso en los días más complicadillos. Gracias por estar a la hora de siempre donde siempre.

A todos/as ellos/as MIL GRACIAS de todo corazón.



# Índice





Índice de Figuras .....	6
Índice de Tablas .....	7
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>11</b>
<b>1. Supervivencia bacteriana .....</b>	<b>11</b>
1.1. Estrategias de supervivencia frente a factores abióticos .....	11
1.1.1. <i>Bust and Boom</i> .....	12
1.1.2. Formación de estructuras de resistencia .....	12
1.1.3. Quiescencia celular .....	13
1.1.3.1. <i>Estado VNC y sus implicaciones</i> .....	13
1.2. Estrategias de supervivencia frente a factores bióticos: depredación por protistas .....	18
<b>2. Respuesta microbiana a condiciones adversas: bacterias autóctonas vs. alóctonas .....</b>	<b>19</b>
2.1. <i>Vibrio harveyi</i> .....	20
2.2. <i>Escherichia coli</i> .....	22
<b>3. Análisis proteómico .....</b>	<b>24</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>29</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
<b>1. Cepas bacterianas .....</b>	<b>33</b>
1.1. Susceptibilidad de <i>V. harveyi</i> a antimicrobianos .....	33
1.2. Curvas de crecimiento .....	34
<b>2. Efecto de los factores ambientales en la supervivencia bacteriana .....</b>	<b>35</b>
2.1. Influencia de factores abióticos en la supervivencia de <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i> .....	35
2.2. Influencia de las comunidades de protozoos del agua de mar natural en la supervivencia de <i>V. harveyi gfp</i> .....	36



## 4 | Índice

2.3. Estudio de la resucitación de poblaciones viables no cultivables de <i>V. harveyi</i> . . . . .	37
<b>3. Variación del medio circundante obtenido a lo largo de la supervivencia de <i>V. harveyi</i> en agua de mar . . . . .</b>	<b>38</b>
3.1. pH . . . . .	39
3.2. Determinación de la concentración de proteínas y ADN . . . . .	39
<b>4. Determinación de los parámetros celulares . . . . .</b>	<b>40</b>
4.1. Cuantificación del número total de bacterias (Total Direct Count, TDC) . .	40
4.2. Cuantificación del número de bacterias que presentan membrana citoplasmática íntegra (MEMB <sup>+</sup> ) . . . . .	41
4.3. Cuantificación del número de bacterias cultivables (Unidades Formadoras de Colonias, UFC) . . . . .	42
4.4. Cálculo del porcentaje de células en estado VNC . . . . .	42
4.5. Cuantificación de las poblaciones de protozoos . . . . .	43
4.6. Determinación del tamaño celular . . . . .	43
4.7. Análisis de la morfología bacteriana mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) . . . . .	44
4.8. Análisis estadístico . . . . .	44
<b>5. Análisis proteómico de las envueltas celulares de <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i> . . . . .</b>	<b>45</b>
5.1. Obtención de extractos proteicos durante los ensayos de supervivencia .	45
5.2. Aislamiento de proteínas de la envuelta celular . . . . .	46
5.3. Cuantificación proteica . . . . .	47
5.4. Análisis de las proteínas mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE) . . . . .	47
5.4.1. Primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) . . . . .	47
5.4.2. Segunda dimensión o SDS-PAGE . . . . .	48
5.4.3. Visualización y análisis de las proteínas en los geles . . . . .	48
5.4.3.1. <i>Tinción de plata</i> . . . . .	48
5.5. Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas . . . . .	49
5.5.1. Análisis de resultados . . . . .	51

<b>RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
<b>1. Efecto de los factores ambientales en la supervivencia bacteriana</b> .....	<b>55</b>
1.1. Influencia de factores abióticos en la supervivencia de <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i> .....	55
1.2. Influencia de factores bióticos en la supervivencia de <i>V. harveyi gfp</i> .....	56
<b>2. Estudio de la resucitación de poblaciones de <i>V. harveyi</i> en estado VNC</b> .....	<b>57</b>
<b>3. Variación del medio circundante obtenido durante la supervivencia de <i>V. harveyi</i> en agua de mar</b> .....	<b>62</b>
<b>4. Análisis de la variación del tamaño y de la morfología celular durante la supervivencia de <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i></b> .....	<b>64</b>
<b>5. Análisis proteómico de las envueltas celulares de <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i></b> .....	<b>68</b>
5.1. Análisis de las proteínas mediante electroforesis bidimensional .....	69
5.2. Análisis de las proteínas analizadas mediante espectrometría de masas .	72
5.2.1. Estudio del subproteoma de <i>V. harveyi</i> bajo condiciones de estrés ..	72
5.2.2. Estudio del subproteoma de <i>E. coli</i> bajo condiciones de estrés .....	76
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>87</b>
<b>1. Efecto de los factores ambientales en la supervivencia de <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i></b> .....	<b>87</b>
<b>2. Análisis proteómico de las envueltas celulares de <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i></b> .....	<b>98</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>115</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>119</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>149</b>
Anexo 1: Abreviaturas .....	149
Anexo 2: Medios de cultivo y Soluciones .....	151
Anexo 3: Tablas de proteínas adicionales .....	157

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Principales propiedades fenotípicas de las bacterias de medios acuáticos que pueden ofrecer protección frente a la predación por protistas heterotróficos . . . . .	19
<b>Figura 2.</b> Supervivencia de poblaciones de <i>V. harveyi</i> , de <i>V. harveyi gfp</i> , mantenidas ambas en agua de mar estéril y de <i>E. coli</i> en solución salina estéril e incubadas a 4°C y a 20°C . . . . .	58
<b>Figura 3.</b> Supervivencia de poblaciones de <i>V. harveyi</i> mantenidas en agua de mar a 20°C durante 230 días . . . . .	59
<b>Figura 4.</b> Supervivencia de poblaciones de <i>V. harveyi</i> mantenida en agua de mar a 20°C bajo radiación visible continua y radiación visible discontinua . . . . .	59
<b>Figura 5.</b> Supervivencia de poblaciones de <i>V. harveyi gfp</i> mantenida en agua de mar no tratada a 4°C y a 20°C . . . . .	59
<b>Figura 6.</b> Crecimiento de <i>V. harveyi</i> en agua de mar natural estéril y en sobrenadantes recogidos tras permanecer poblaciones de <i>V. harveyi</i> durante 21 días en agua de mar a 26°C . . . . .	63
<b>Figura 7.</b> Supervivencia de poblaciones de <i>V. harveyi</i> mantenidas en sobrenadantes obtenidos en experiencias previas e incubados a 4°C . . . . .	64
<b>Figura 8.</b> Variación en la distribución de subpoblaciones de <i>V. harveyi</i> , establecidas en función de la longitud celular, obtenida para poblaciones mantenidas en agua de mar natural estéril en condiciones de oscuridad a 4°C y 20°C y durante la exposición a radiación visible continua a 20°C . . . . .	65
<b>Figura 9.</b> Fotografías de microscopía electrónica de barrido de células de <i>V. harveyi</i> recogidas de poblaciones mantenidas en agua de mar natural estéril en condiciones de oscuridad a 4°C y 20°C durante 0 horas, 3 días y 21 días . . . . .	66
<b>Figura 10.</b> Variación en la distribución de subpoblaciones de <i>E. coli</i> , establecidas en función de la longitud celular, obtenida para poblaciones mantenidas en solución salina estéril en condiciones de oscuridad a 4°C y 20°C . . . . .	67
<b>Figura 11.</b> Proteínas de las envueltas celulares de <i>V. harveyi</i> correspondientes al control y tras 21 días en condiciones de ayuno a 4°C . . . . .	70
<b>Figura 12.</b> Proteínas de las envueltas celulares de <i>E. coli</i> correspondientes al control y tras 21 días en condiciones de ayuno a 20°C . . . . .	71

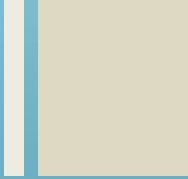
## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Bacterias que adoptan el estado VNC .....	14
<b>Tabla 2.</b> Valores de CMI y CMB para los antimicrobianos testados con <i>V. harveyi</i> .....	34
<b>Tabla 3.</b> Duración de la fase lag, constante específica de velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y densidad celular en fase estacionaria para las bacterias <i>V. harveyi</i> , <i>V. harveyi gfp</i> y <i>E. coli</i> .....	34
<b>Tabla 4.</b> Condiciones y tiempos en los que se recogieron alícuotas destinados a la obtención de extractos proteicos .....	46
<b>Tabla 5.</b> Condiciones electroforéticas para la primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) .....	47
<b>Tabla 6.</b> Condiciones electroforéticas para la segunda dimensión .....	48
<b>Tabla 7.</b> Incrementos en los valores de UFC de <i>V. harveyi</i> /ml obtenidos para poblaciones recogidas tras permanecer 21 días a 4°C en condiciones de ayuno en agua de mar natural estéril .....	61
<b>Tabla 8.</b> Concentración de ADN y de proteínas y pH del agua de mar natural estéril y de los sobrenadantes obtenidos durante la supervivencia de <i>V. harveyi</i> a 4°C .....	62
<b>Tabla 9.</b> Concentración de proteínas de envueltas celulares/célula obtenidos durante la supervivencia de <i>V. harveyi</i> y <i>E. coli</i> .....	68
<b>Tabla 10.</b> Proteínas de las envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> mantenidas en agua de mar a 4°C y 20°C en condiciones de oscuridad y radiación visible a 20°C .....	79
<b>Tabla 11.</b> Proteínas de las envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>E. coli</i> mantenidas en solución salina a 4°C y 20°C en condiciones de oscuridad .....	83
<b>Tabla A1.</b> Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> mantenidas en agua de mar a 4°C en condiciones de oscuridad .....	157
<b>Tabla A2.</b> Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> mantenidas en agua de mar a 20°C en condiciones de oscuridad .....	164
<b>Tabla A3.</b> Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> mantenidas en agua de mar a 20°C bajo radiación visible .....	168

**Tabla A4.** Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de *E. coli* mantenidas en solución salina a 4°C en condiciones de oscuridad . . . . . 178

**Tabla A5.** Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de *E. coli* mantenidas en solución salina a 20°C en condiciones de oscuridad . . . . . 181

# Introducción





## 1. Supervivencia bacteriana

La ubiquidad de los microorganismos procariotas se asocia a su extraordinaria capacidad para adaptarse y prosperar en ambientes adversos y cambiantes, aunque cada especie se desarrolla de forma óptima en unas condiciones abióticas y bióticas determinadas. Sin embargo, las condiciones ambientales en las que viven los procariotas sufren, en general, grandes cambios tanto estacionales como circadianos. Así, los cambios en la temperatura, la radiación solar, la disponibilidad de nutrientes, en la que se alternan situaciones de abundancia y hambruna (*feast and famine*), etc, son especialmente acusados en los medios acuáticos.

Aparte de estas condiciones medioambientales cambiantes, en los sistemas acuáticos naturales las bacterias también tienen que hacer frente a factores bióticos que condicionan su supervivencia. Entre estos factores podemos incluir la competición, la acción de los bacteriófagos y, especialmente, la depredación por parte de protozoos. Además, grandes masas de procariotas son transportados desde sus hábitats naturales a otros hábitats, pasando de un estatus de bacterias autóctonas, en ocasiones de especies dominantes, al de bacterias alóctonas, con frecuencia minoritarias numéricamente.

### 1.1. Estrategias de supervivencia frente a factores abióticos

Bajo condiciones óptimas de crecimiento, es decir, con aporte continuo de nutrientes, eliminación de productos metabólicos y en ausencia de factores de estrés, cada bacteria podría dividirse para producir dos nuevas células continuamente (Koksharova, 2013). Además, bacterias como *Escherichia coli*, cuya fisiología está adaptada para crecer en este tipo de ambientes, lo hacen a una tasa máxima de crecimiento (Neidhardt, 1999). En caso de agotamiento de los nutrientes, situación habitual en ambientes acuáticos naturales, o aparición de otros factores de estrés (cambios de temperatura, radiación solar, etc.), la habilidad de cada organismo para



adaptarse a las condiciones adversas determinará la capacidad de la población para sobrevivir y colonizar nuevas áreas (Kramer y cols., 2006).

Las bacterias adoptan distintas estrategias para adaptarse a situaciones adversas, estas estrategias de supervivencia, con sus variaciones, pueden englobarse en 3 categorías no excluyentes: la estrategia *bust and boom*, la quiescencia celular y la formación de estructuras de resistencia (Ritterhaus y cols., 2013).

### 1.1.1. *Bust and boom*

Cuando las bacterias que adoptan este tipo de estrategia se encuentran en situaciones de escasez de nutrientes, la mayoría de las bacterias de la población mueren, quedando unos pocos microorganismos viables que sobreviven a expensas de los nutrientes que aportan las células muertas. Cuando las condiciones ambientales se vuelven de nuevo favorables, los escasos supervivientes reanudan el crecimiento. Es posible que la capacidad de replicarse rápidamente sea un factor importante en este tipo de estrategia, ya que los microorganismos que la adoptan deben ser más competitivos que el resto de poblaciones bacterianas a la hora de consumir los nutrientes introducidos en el sistema (Rittershaus y cols., 2013).

### 1.1.2. Formación de estructuras de resistencia

Bajo condiciones adversas las bacterias diferenciadas como *Bacillus*, *Myxococcus*, *Chlamydia*, *Azotobacter*, cianobacterias o *Streptomyces* experimentan una marcada alteración de la ultraestructura de las células vegetativas, con la formación de endosporas, mixosporas, quistes, clamidiesporas, aquinetos y esporas. Estas estructuras de resistencia se forman mediante procesos de transformación de las células vegetativas entre los que destaca, por su complejidad, la formación de la endospora, auténtico proceso de diferenciación y quizá el mejor conocido (Freese, 1981; Freese y Heinze, 1984; Stephens, 1998; Barák y cols., 2005).

### 1.1.3. Quiescencia celular

La quiescencia bacteriana se caracteriza por el cese en el crecimiento de la mayor parte de la población, pudiendo mantenerse en este estado durante meses, incluso años (Corper y Cohn, 1933; Rittershaus y cols., 2013). Las bacterias que adoptan esta estrategia muestran una capacidad metabólica, mantienen el potencial de membrana y no manifiestan una diferenciación celular (Rao y cols., 2008; Gengenbacher y cols., 2010; Rittershaus y cols., 2013), características que diferencian las células quiescentes de otro tipo de estructuras de resistencia como, por ejemplo, las esporas. Dentro de esta categoría quedarían incluidas las bacterias que adoptan el estado viable no cultivable (VNC) (Roszak y Colwell, 1987).

#### 1.1.3.1. Estado VNC y sus implicaciones

Numerosos estudios han revelado la capacidad, tanto de bacterias gram negativas como gram positivas, de adoptar el denominado estado viable no cultivable (VNC) (Colwell y Gray, 2000; Barcina y Arana, 2009; Oliver, 2010). Este fenotipo se corresponde con el estado fisiológico de las células en el que pierden la cultivabilidad en medios de cultivo convencionales utilizados generalmente para su crecimiento en el laboratorio, si bien mantienen un metabolismo activo, la respiración, la integridad de la membrana, la transcripción génica y la síntesis proteica (Pinto y cols., 2013).

En los últimos años, diversas revisiones han recopilado la información de distintos estudios sobre bacterias que pueden adoptar el estado VNC, referidos a bacterias que se transmiten a través del agua y alimentos (Rowan, 2004), patógenos de humanos, animales y plantas (Oliver, 2010) y, más recientemente, Pinto y cols. (2013) han publicado un listado que incluye tanto bacterias patógenas como no patógenas. Actualmente, se han descrito hasta 85 especies bacterianas que adoptan el estado VNC en diferentes ambientes o condiciones experimentales (Li y cols., 2014). En la Tabla 1 se muestra el listado de las especies en las que se ha demostrado la

adopción de este fenotipo, destacándose aquellas especies para las que se ha demostrado capacidad de resucitación.

**Tabla 1.** Bacterias que adoptan el estado VNC (Li y cols., 2014).

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
<b><i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b><i>Ralstonia solanacearum</i></b>
<i>Alcaligenes eutrophus</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i>
<b><i>Aquaspirillum spp.</i></b>	<i>Rhizobium meliloti</i>
<i>Arcobacter butzleri</i>	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
<b><i>Bacillus cereus</i></b>	<b><i>Salmonella enteritidis</i></b>
<b><i>Burkholderia cepacia</i></b>	<i>Salmonella flexneri</i>
<b><i>Burkholderia pseudomallei</i></b>	<b><i>Salmonella oranienburg</i></b>
<i>Campylobacter coli</i>	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
<b><i>Campylobacter lari</i></b>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>
<b><i>Cytophaga allerginae</i></b>	<i>Shigella flexneri</i>
<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Shigella sonnei</i>
<b><i>Enterobacter aerogenes</i></b>	<b><i>Sinorhizobium meliloti</i></b>
<i>Enterobacter agglomerans</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b><i>Enterobacter cloacae</i></b>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Enterococcus faecalis (Streptococcus faecalis)</i>	<b><i>Streptococcus parauberis</i></b>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
<i>Enterococcus hirae</i>	<b><i>Tenacibaculum spp.</i></b>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Vibrio anguillarum</i>
<b><i>Francisella tularensis</i></b>	<i>Vibrio campbellii</i>
<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>	<i>Vibrio alginolyticus</i>
<i>Helicobacter pylori</i>	<b><i>Vibrio cholerae</i></b>
<b><i>Klebsiella aerogenes</i></b>	<b><i>Vibrio fischeri</i></b>
<b><i>Klebsiella planticola</i></b>	<b><i>Vibrio fluvialis</i></b>
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<b><i>Vibrio harveyi</i></b>
<b><i>Lactobacillus plantarum</i></b>	<i>Vibrio mimicus</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Vibrio natriegens</i>
<i>Legionella pneumophila</i>	<b><i>Vibrio parahaemolyticus</i></b>
<b><i>Listeria monocytogenes</i></b>	<i>Vibrio proteolyticus</i>
<i>Micrococcus flavus</i>	<i>Vibrio salmonicida</i>
<b><i>Micrococcus luteus</i></b>	<b><i>Vibrio shiloi</i></b>
<i>Micrococcus varians (Kocuria varians)</i>	<b><i>Vibrio vulnificus (tipo 1 y 2)</i></b>
<b><i>Mycobacterium smegmatis</i></b>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<b><i>Mycobacterium tuberculosis</i></b>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Pasteurella piscida</i>	<b><i>Yersinia pestis</i></b>
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	<b><i>Yersinia ruckeri</i></b>

Desde la descripción del estado VNC (Xu y cols., 1982), el significado y las implicaciones de este estado celular han sido objeto de polémica y desacuerdo entre los microbiólogos. A lo largo de los años, se han ido estableciendo dos teorías contrapuestas. Una de ellas afirma que las células expuestas a ambientes hostiles se vuelven no cultivables debido al deterioro celular, que puede ser un fenómeno estocástico (Bogosian y Bourneuf, 2001) o genéticamente programado (Nyström, 2003; Aertsen y Michiels, 2004), pero que igualmente se trataría de un estado fisiológico transitorio antes de la muerte celular. Mientras que la otra teoría mantiene la hipótesis de que la no cultivabilidad es la culminación de una ruta alternativa para generar formas durmientes de supervivencia, similar a la formación de esporas que se produce en bacterias diferenciadas (McDougald y cols., 1999; Kell y Young, 2000).

Teniendo en cuenta esta segunda hipótesis, el estado VNC podría representar una estrategia de supervivencia significativo si las células en estado VNC fueran capaces de recuperar de nuevo la cultivabilidad, o lo que es lo mismo, si las células experimentaran un proceso de resucitación (McDougald y cols., 1999; Oliver, 2005; Keep y cols., 2006; Panutdaporn y cols., 2006; Coutard y cols., 2007). Si el paso de VNC a cultivable es posible, el fenotipo VNC puede ser considerado parte del ciclo de vida de bacterias no diferenciadas. El ciclo daría comienzo con el cambio de las condiciones ambientales, de idóneas para el crecimiento a adversas, tornándose las células cultivables en viables no cultivables, fenotipo propio de situaciones no idóneas para el crecimiento, que retornaría a su vez al fenotipo cultivable tras desaparecer el estrés ambiental.

En cualquier caso, esta capacidad para recuperar nuevamente la cultivabilidad o resucitar no parece un fenómeno universal aplicable a todas las bacterias que adoptan el estado VNC. En bacterias como *Vibrio* spp., si bien no se han demostrado los mecanismos moleculares involucrados, está bien establecida la reversión tras el cambio de las condiciones ambientales (Nilsson y cols., 1991; Oliver y cols., 1995; Whitesides y Oliver, 1997; Bates y Oliver, 2004; Wong y cols., 2004) o la exposición a determinados estímulos (Magariños y cols., 1997; Lleó y cols., 2001; Gupte y cols.,

2003), y para *Micrococcus luteus* esta capacidad de reversión del estado VNC se ha relacionado con la presencia de la citocina Rpf (*resuscitation-promoting factor*) (Mukamolova y cols., 1999, 2002, 2006; Kell y Young, 2000).

Sin embargo, esta posible resucitación se pone en duda en bacterias como *Salmonella typhimurium* (Joux y cols., 1997) o *Escherichia coli* (Desnues y cols., 2003; Arana y cols., 2007), para las que se han descrito una sucesión de acontecimientos que, tras una pérdida irreversible de la cultivabilidad, parecen conducir a la muerte celular.

La falta de conocimiento sobre los mecanismos moleculares que permitan la reversión del estado VNC supone una dificultad añadida a la hora de diseñar un protocolo de éxito o de encontrar las condiciones adecuadas que hacen revertir este estado. Por ello, existe un debate sobre si las células cultivables que se recuperan tras restablecer las condiciones previas a la inducción de la entrada en estado VNC son el resultado de la resucitación de células en estado VNC o del crecimiento de unas pocas células cultivables no detectadas. Pese a la dificultad de establecer un protocolo de resucitación estandarizado, se ha propuesto que el momento ideal para el estudio de la resucitación se da cuando no se detectan células cultivables en la muestra. La ausencia total de células cultivables no se puede garantizar. No obstante, los experimentos de resucitación se realizan, por lo general, cuando el número de células cultivables cae hasta un nivel indetectable, mientras que el número de células en estado VNC sigue siendo elevado (Biosca y cols., 1996; Cappelier y cols., 1999; Chaveerach y cols., 2003; Downing y cols., 2005; Li y cols., 2014). En diversos estudios se han realizado diluciones seriadas de las muestras, previamente al inicio del ensayo de resucitación, con el fin de minimizar el número de células cultivables presente en las mismas (Whitesides y Oliver, 1997; Arana y cols., 2007). Asimismo, otra alternativa es combinar estos métodos de dilución con el empleo de antimicrobianos a concentraciones mínimas inhibitorias para inhibir el crecimiento de células cultivables que pudieran quedar en las muestras (Magariños y cols., 1997; Llèo y cols., 1998; Basaglia y cols., 2006; Arana y cols., 2007).

El interés que suscita el estado VNC no se restringe al mero conocimiento científico, la posibilidad de que constituya una estrategia de supervivencia de los microorganismos en ambientes hostiles tiene implicaciones tanto ecológicas como sanitarias. La recuperación de la capacidad de colonizar e invadir por parte de un patógeno o de cualquier bacteria, tiene consecuencias obvias e importantes, pero no debemos ceñirnos únicamente a esta opción. Las poblaciones bacterianas en el estado VNC tienen importancia por sí mismas dado que poseen una función biológica clara e independiente de su capacidad de resucitación, en primer lugar, porque mantienen su actividad y, por consiguiente, participan en el funcionamiento de los ecosistemas en el ciclo del carbono y en la producción energética; y en segundo lugar, por la posibilidad de revertir al estado cultivable.

Si se tiene en cuenta la evaluación de riesgos para la salud pública, el estado VNC también es una estrategia de supervivencia importante a considerar ya que muchas bacterias patógenas como *M. tuberculosis*, *C. jejuni*, *Helicobacter pylori*, *V. cholerae* y *V. vulnificus* pueden recuperar la capacidad de infección tras pasar por el estado VNC en huéspedes animales (Colwell y cols., 1996; Rivers y Steck, 2001; Shleeva y cols., 2002). Además, diversos estudios han indicado que las células en estado VNC mantienen la capacidad para causar enfermedad (Barer y Harwood, 1999) y algunos patógenos producen toxinas y mantienen su capacidad de adhesión (Pommeuy y cols., 1996; Pruzzo y cols., 2003), influyendo negativamente en sus hospedadores. No debemos olvidar que, aunque las bacterias en este estado disminuyen drásticamente su actividad, su densidad puede hacer que el resultado global de su actividad sea cuantitativamente importante.

Además, la imposibilidad de detectar patógenos en el estado VNC mediante los métodos tradicionales de cultivo, reglamentados por la legislación para su detección y recuento, plantea serias dudas, por ejemplo, sobre la interpretación de los análisis rutinarios de aguas o alimentos, en los que se asume que las bacterias infecciosas pueden ser detectadas por su capacidad de crecer en un medio de cultivo. Por ello, se precisa una detección más rápida y fiable de microorganismos infecciosos en estado

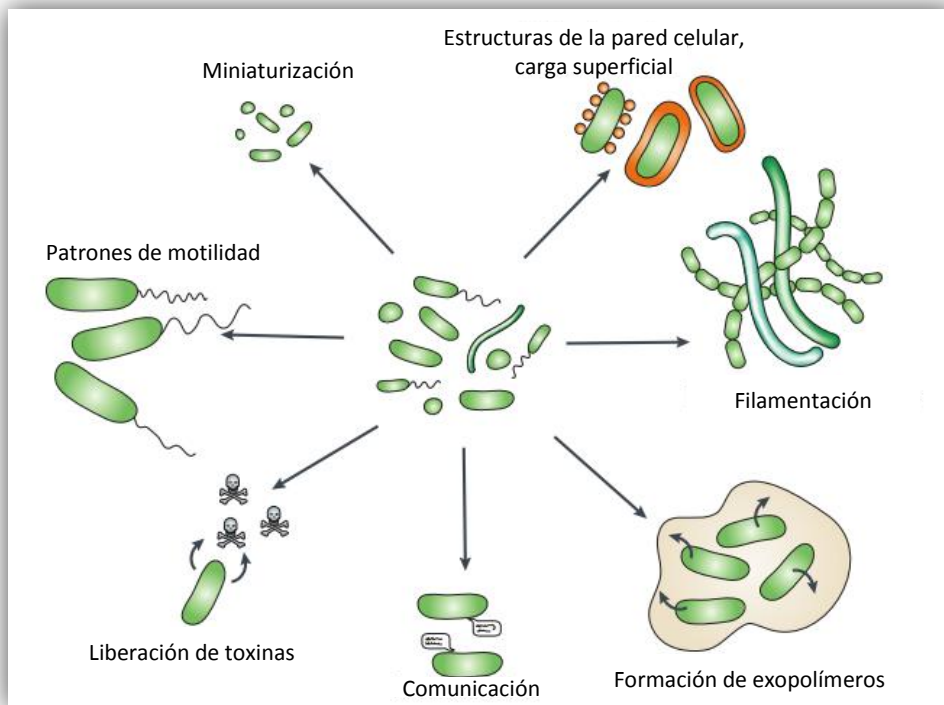
VNC, con lo que se alcanzará un mayor grado de efectividad en la prevención, el control y el tratamiento de las enfermedades. Además, estos logros podrían aplicarse tanto en sanidad humana como en el sector de la acuicultura, donde, por ejemplo, *V. harveyi* genera pérdidas económicas en los cultivos de camarón (Austin y Zhang, 2006).

## 1.2. Estrategias de supervivencia frente a factores bióticos: depredación por protistas

Tradicionalmente los microbiólogos se han centrado en las condiciones abióticas físico-químicas y la disponibilidad de sustrato, el denominado control *bottom-up*, como factores que determinan el crecimiento bacteriano y la supervivencia en el medio ambiente (Roszak y Colwell, 1987). Sin embargo, en los ambientes acuáticos, las propias bacterias pueden constituir el alimento esencial de otros organismos marinos. Por ello, la depredación (control *top-down*) se ha identificado como un factor de mortalidad importante, además de selectivo para las bacterias en muchos sistemas acuáticos, afectando a su abundancia, composición y actividad (Jürgens, 2006).

Boenigk y Arndt (2000) han propuesto que la interacción depredador-presa se puede dividir en la consecución de una serie de etapas: encuentro o contacto depredador-presa, procesamiento de la captura, ingestión y digestión de la presa. No obstante, las bacterias autóctonas de ambientes acuáticos adoptan ciertos cambios fenotípicos con el fin de minimizar la tasa de mortalidad por depredación (Figura 1).

La depredación por protistas es un proceso importante a considerar en todos los modelos de la red trófica acuática que incluyan a los microorganismos (Gasol, 1994; Thingstad, 2000). La depredación por parte de protistas a menudo equilibra la producción bacteriana, manteniendo así el número de bacterias constante dentro de un determinado sistema (Sherr y cols., 1989; Sanders y cols., 1992); además, tiene un impacto funcional en la regeneración de nutrientes microbianos y la descomposición de detritos (Fenchel y Harrison, 1976; Caron y cols., 1988; Jürgens y Sala, 2000), que al mismo tiempo estimulan la producción bacteriana (Posch y cols., 1999).



**Figura 1.** Principales propiedades fenotípicas de las bacterias de medios acuáticos que pueden ofrecer protección frente a la depredación por protistas heterotrófos (modificado de Perntaler, 2005).

## 2. Respuesta microbiana a condiciones adversas: bacterias autóctonas vs. alóctonas

Pequeños cambios en las condiciones ambientales del medio no deberían constituir un estrés letal para un microorganismo autóctono, que ha de tener un mecanismo que asegure su perdurabilidad cuando las condiciones ambientales se tornan adversas, y un sistema que permita recuperar la capacidad de crecer y colonizar el medio nuevamente cuando desaparece el estrés ambiental. De este modo aseguran la perdurabilidad en su hábitat natural. Sin embargo, los mismos factores ambientales pueden llegar a ser letales para las bacterias alóctonas a estos sistemas. En este trabajo se estudiará el comportamiento de dos microorganismos modelo bajo condiciones de ayuno y mantenimiento a temperaturas subóptimas de crecimiento: *V.*



*harveyi*, bacteria autóctona del agua de mar y *E. coli*, bacteria que forma parte de la microbiota intestinal y por tanto, alóctona a los sistemas acuáticos.

## 2.1. *Vibrio harveyi*

*V. harveyi* fue descrito inicialmente como *Achromobacter harveyi* (Johnson y Shunk, 1936) en honor a Edmund Newton Harvey, pionero en el estudio sistemático de la bioluminiscencia. *V. harveyi* se asignó posteriormente a los géneros *Lucibacterium* (Hendrie y cols., 1970) y *Beneckea* (Reichelt y Baumann, 1973), para incluirse finalmente en el género *Vibrio* (Baumann y cols., 1981). Las especies *V. carchariae* (Grimes y cols., 1985) y *V. trachuri* (Iwamoto y cols., 1996), descritas posteriormente, se han catalogado como *V. harveyi* basándose en estudios moleculares (Pedersen y cols., 1998; Gauger y Gomez-Chiarri, 2002; Thompson y cols., 2002).

Se trata de un bacilo gram negativo perteneciente a la familia *Vibrionaceae*. Las cepas de *V. harveyi* producen un flagelo lateral en medio sólido pero son móviles por flagelos monotricos o lofotricos polares en medio líquido. Es una bacteria anaerobia facultativa con un metabolismo fermentativo y respiratorio. Depende de compuestos químicos orgánicos para la obtención de carbono y energía, así como de iones sodio para su crecimiento. Algunas cepas de *V. harveyi* emiten bioluminiscencia azul verdosa catalizada por la enzima luciferasa (Baumann y cols., 1984).

*V. harveyi* es un componente habitual de la comunidad bacteriana marina, así como de hábitats de agua salobre, de regiones templadas y tropicales, donde parámetros como la temperatura, la salinidad y los niveles de oxígeno disuelto controlan su distribución y abundancia (Cavallo y Stab, 2004; Balcázar y cols., 2006), si bien es cierto que los recuentos celulares de *V. harveyi* en medios de cultivo son más elevados durante los meses de verano (Baumann y cols., 1984; Pujalte y cols., 1999). Esta es una característica común a las bacterias del género *Vibrio*, prácticamente indetectables durante el invierno, pero cuando aumenta la temperatura, en la época

cálida, nuevamente se detectan poblaciones cultivables más o menos abundantes de estas bacterias (Li y cols., 2014).

A pesar de que normalmente se consideran bacterias de vida libre, también se pueden encontrar adheridas a superficies de organismos marinos y/o en el tracto intestinal de dichos organismos (O'Brien y Sizemore, 1979).

La mayoría de cepas de *V. harveyi* no son patógenas. Sin embargo, desde principios de 1980 se han identificado algunas cepas patógenas de *V. harveyi* en cultivos de camarón (*Penaeus monodon*, *P. japonicus* y *P. merguensis*) en países como Filipinas, Indonesia, Tailandia, India, Taiwan y Australia (Lavilla-Pitogo y cols., 1998; Robertson y cols., 1998; Thaitongnum y cols., 2006). La enfermedad que causan se denomina vibriosis luminiscente, ya que las larvas infectadas se vuelven luminiscentes en la oscuridad. Los brotes de la enfermedad ocurren durante todo el año y la epizootia causa grandes pérdidas económicas por la mortalidad y el retraso en el crecimiento del stock afectado dando lugar, en ocasiones, al cierre de piscifactorías.

En los últimos años, se han detectado numerosas infecciones producidas por *V. harveyi* y especies relacionadas, se cree que como consecuencia del aumento global de la temperatura (Travers y cols., 2009). Las altas temperaturas pueden causar un aumento de las tasas de crecimiento bacterianas y aumentar el potencial de virulencia de los vibrios marinos, que a su vez puede alterar las relaciones huésped-patógeno e incrementar la susceptibilidad de los animales a enfermedades epidémicas (Paillard y cols., 2004; Gagnaire y cols., 2006). El calentamiento oceánico también puede facilitar el potencial de dispersión de estos vibrios fuera del rango de distribución conocido, por lo que se ha relacionado con algunas infecciones humanas fuera de temporada (Sganga y cols., 2009). Concretamente, se han encontrado dos casos de infecciones por *V. harveyi* en humanos: una chica infectada tras el ataque de un tiburón en la costa sudeste de Estados Unidos (Pavia y cols., 1989) y un niño con cáncer infectado tras nadar en la costa francesa del mar Mediterráneo (Wilkins y cols., 2007).

En cuanto a la ecología de los vibrios, han sido numerosas las especies de *Vibrio* objeto de estudio en relación a la capacidad de supervivencia y mantenimiento de la actividad fisiológica bajo condiciones que simulan cambios de temperatura estacionales y ayuno (Wolf y Oliver, 1992; Oliver y cols., 1995; Biosca y cols., 1996; Jiang y Chai, 1996; Stretton y cols., 1997; Johnston y Brown, 2002; Ramaiah y cols., 2002; Wong y Wang, 2004; Amel y cols., 2008; Sun y cols., 2008; Lutz y cols., 2013), así como variaciones en la salinidad (Singleton y cols., 1982; Kaspar y Tamplin, 1993; Marco-Noales y cols., 1999; Armada y cols., 2003; Jones y cols., 2008). En estos estudios se han descrito cambios morfológicos y en la composición celular, en algunos casos relacionados directamente con la transición al fenotipo VNC (Smith y Oliver, 2006; Vattakaven y cols., 2009; Chen y Chen, 2014).

### 2.2. *Escherichia coli*

*E. coli* fue descrita por primera vez en 1885 por Theodore von Escherich, bacteriólogo alemán, quien la denominó *Bacterium coli*. Posteriormente se le adjudicó el nombre de *Escherichia coli* en honor a su descubridor. Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Es móvil por flagelos peritricos, no forma esporas y es capaz de fermentar glucosa y lactosa. Debido, entre otras características, a su rápida tasa de crecimiento y a sus requerimientos nutricionales simples, *E. coli* se ha convertido en un organismo modelo para el estudio de muchos de los procesos esenciales de la vida.

El hábitat natural de *E. coli* es el intestino humano y de los animales de sangre caliente. Por ello, su incorporación a los medios acuáticos, a través de las aguas residuales, implica la entrada en un ambiente hostil en el que inicia un proceso de supervivencia (Roszak y Colwell, 1987). *E. coli* es la bacteria intestinal universalmente aceptada como indicador de contaminación fecal por lo que su detección, cuantificación, comportamiento y destino en los ambientes acuáticos es objeto de estudio continuo tanto por las administraciones públicas como por la comunidad científica.

Varios estudios y revisiones han presentado datos sobre el proceso de desaparición, conocido como *die off*, de esta bacteria en los sistemas acuáticos, donde su supervivencia depende de factores ambientales tanto abióticos como bióticos (McCambridge y McMeekin, 1980, 1981; Borrego y cols., 1983; Barcina y cols., 1986a, 1986b, 1997; Crane y Moore, 1986; Davies y cols., 1995; Burkhardt III y cols., 2000; Menon y cols., 2003; Noble y cols., 2004; Easton y cols., 2005; John y Rose, 2005).

Entre los factores abióticos que tienen un efecto negativo sobre la supervivencia de *E. coli* destacan la ausencia de nutrientes (Sjøgren y Gibson, 1981; Sinclair y Alexander, 1984; Henis y Alexander, 1990; Baleux y cols., 1998; Ramos y cols., 2001), la salinidad (Barcina y cols., 1990; García-Lara y cols., 1991; Davies y cols., 1995; Joux y cols., 1997; Baleux y cols., 1998; Marco-Noales y cols., 1999; Trousellier y cols., 1999; Rozen y Belkin, 2001) y la radiación solar (McCambridge y McMeekin, 1981; Fujioka y Narikawa, 1982; Barcina y cols., 1986b, 1989, 1990; Baleux y cols., 1998; Muela y cols., 2000; Sinton y cols., 2002; Yukselen y cols., 2003; Whitman y cols., 2004; Chandran y Hatha, 2005). Además, estos factores interactúan entre sí, produciendo un efecto negativo, a veces sinérgico, sobre la supervivencia.

Entre los factores bióticos que tienen un mayor efecto sobre la supervivencia de *E. coli* destacan las relaciones de competencia con el bacterioplancton (Scheuerman y cols., 1988; Henis y Alexander, 1990; Marco-Noales y cols., 2004; Long y cols., 2005), de parasitismo con los bacteriófagos y bacterias líticas (McCambridge y McMeekin, 1980; Guerrero y cols., 1986; Flint, 1987; Chandran y Hatha, 2005), y de depredación con el protozooplancton (Barcina y cols., 1986a, 1986b, 1991, 1997; González y cols., 1990, 1992; Iriberry y cols., 1994a, 1994b; Davies y cols., 1995; Muela y cols., 1998; Rozen y Belkin, 2001; Arana y cols., 2003); siendo este último factor el que contribuye más eficazmente a la eliminación tanto de *E. coli* como de otras bacterias alóctonas, incluidas las patógenas.

### 3. Análisis proteómico

En las últimas décadas abundan los estudios en los que se aborda la descripción molecular de los procesos que subyacen en las estrategias que habilitan a las bacterias para sobrevivir bajo condiciones medioambientales variables. Estos estudios han sido posibles gracias al desarrollo y avance de herramientas que permiten análisis proteómicos de poblaciones diversas.

La proteómica, término que fue acuñado por primera vez por Wilkins y cols. (1997), es la caracterización a gran escala del conjunto de proteínas de una célula, tejido u organismo. El objetivo final de la proteómica radica en obtener una visión globalizada de la totalidad de las proteínas de una célula (Graves y Haystead, 2002). Así, los estudios proteómicos ofrecen la imagen de las proteínas expresadas por un organismo en un momento dado y bajo condiciones precisas, constituyendo el mapa de expresión proteica de dicho organismo denominado proteoma o perfil proteico.

El auge de la proteómica es fruto de los avances producidos en la secuenciación del genoma; por ejemplo, el genoma completo de *E. coli* está disponible desde el año 1997 (Blattner y cols., 1997) y la secuencia de los cromosomas de *V. cholerae* se obtuvieron tres años más tarde (Heidelberg y cols., 2000). Aun así, existe información que no puede ser obtenida del estudio exclusivo de genes. El genoma no define las modificaciones postraduccionales de las proteínas, ni la actividad, ni la localización y tampoco las interacciones con otras proteínas y metabolitos, de modo que son las proteínas, y no los genes, las responsables últimas del fenotipo de la célula.

A la hora de caracterizar el proteoma de una célula no hay que olvidar que éste es dinámico y que refleja el medio ambiente en el que la célula está siendo estudiada. En respuesta a señales tanto internas como externas, las proteínas pueden ser sintetizadas o degradadas o bien modificadas postraduccionalmente; es decir, que para un genoma dado, según las condiciones ambientales, podemos encontrar múltiples proteomas (Graves y Haystead, 2002).

La proteómica permite determinar las herramientas que utilizan los organismos para sobrevivir y proliferar en un ambiente dado (Nyström, 2001). Esta aproximación molecular ha revelado la síntesis de nuevas proteínas cuando las condiciones medioambientales no son adecuadas para el crecimiento. La presencia de estas nuevas proteínas, ausentes en las células en crecimiento, está asociada con el mantenimiento de la cultivabilidad en condiciones de estrés (Srinivasan y cols., 1998; Heim y cols., 2002; Kvint y cols., 2003). Se ha descrito la síntesis de nuevas proteínas en respuesta al estrés térmico u oxidativo, al ayuno, a cambios de pH, etc. (Groat y cols., 1986; Jaan y cols., 1986; Jones y cols., 1987; Perrot y cols., 2000). Algunas de estas proteínas son específicas, se sintetizan exclusivamente en función del estrés; mientras que otras se sintetizan independientemente del tipo de estrés (Jenkins y cols., 1988). También se han descrito descensos significativos en la síntesis de proteínas en células sometidas a estrés osmótico y ayuno de diferentes bacterias (Roth y cols., 1988; Abdallah y cols., 2009; 2012).

El estudio del proteoma total de un microorganismo puede aportar mucha información sobre la expresión proteica en una condición determinada, pero puede resultar muy complejo. Por ello, es habitual extraer y analizar proteínas de estructuras subcelulares como las envueltas celulares con el objetivo de reducir dicha complejidad (Pasquali y cols., 1999; Andersen y cols., 2003; Josic y cols., 2008). Además, la membrana externa es el componente estructural en contacto con el medio circundante y, por tanto, la primera barrera defensiva de la célula frente a las condiciones medioambientales cambiantes.

En la bibliografía se encuentran numerosos estudios orientados a la identificación de los cambios en la expresión de proteínas bajo condiciones de estrés para diferentes microorganismos sometidos a diversas condiciones adversas. Así, Citterio y cols. (2004), en el caso *Helicobacter pylori*, relacionaron la transición de formas bacilares a cocoides con los cambios en los patrones de proteínas de la membrana externa (OMPs) que ocurren durante la adopción del estado VNC por

efecto del envejecimiento del cultivo. Gayoso y cols. (2014) encontraron que diversas proteínas, tanto de membrana como de espacio periplásmico, se sobreexpresaban en poblaciones de *Acinetobacter baumannii* sometidas a desecación. Para *E. coli* se han descrito variaciones en la cantidad de OMPs como consecuencia de la exposición al estrés ambiental (Nikaido y Vaara, 1985; Özkanca y Flint, 2002; Darcan y cols., 2009) y Muela y cols. (2008) describieron la expresión diferencial de tres OMPs (la subunidad beta del antígeno 43, TolC y OmpT) tras la exposición de las células a condiciones de ayuno. Lai y cols. (2009) identificaron proteínas relacionadas con las membranas (por ejemplo ATP sintasa, subunidad alpha 1) que varían durante la inducción del estado VNC en el caso de *V. parahaemolyticus* y Abdallah y cols. (2009, 2012) encontraron cambios en diversas proteínas de membrana (OmpW, OmpA, maltoporina y otras) por efecto de radiaciones y el ayuno prolongado tanto en *V. parahaemolyticus* como en *V. alginolyticus*. Además, Kao y cols. (2009) en *V. anguillarum* y Xu y cols. (2005) para *V. alginolyticus* describieron variaciones de diversas proteínas de membrana (maltoporina, OmpW, etc.) por efecto de las variaciones de la salinidad.

Todos estos trabajos sugieren que el estudio de las variaciones en el subproteoma de las envueltas celulares puede ser una herramienta útil que aporta información acerca de los cambios moleculares que se inducen en bacterias sometidas a estrés.

# Objetivos





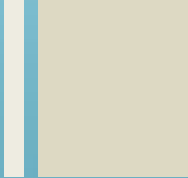


El objetivo principal planteado en este trabajo fue el estudio comparativo de las estrategias de supervivencia adoptadas por *Vibrio harveyi* CECT 525 y *Escherichia coli* CECT 416 bajo condiciones ambientales adversas prestando especial interés a los cambios moleculares que tienen lugar a nivel del subproteoma de las envueltas celulares. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- i. Caracterización de los cambios poblacionales, morfológicos y fenotípicos que experimenta *V. harveyi* CECT 525 durante la adaptación a condiciones ambientales adversas y comparación con los cambios detectados en este trabajo y trabajos previos para *E. coli* CECT 416.
- ii. Establecimiento de la capacidad de reversión al estado cultivable (resucitación) de *V. harveyi* CECT 525.
- iii. Caracterización de los cambios moleculares que, a nivel del subproteoma de las envueltas celulares, experimentan *V. harveyi* CECT 525 y *E. coli* CECT 416 durante la adaptación a condiciones adversas.



# Material y Métodos





## 1. Cepas bacterianas

En este trabajo se emplearon las cepas *Vibrio harveyi* CECT 525 (*V. harveyi* ATCC 14126), que se conservó a 4°C en agar marino (AM, AppliChem); *V. harveyi gfp*, mantenida a 4°C en AM suplementado con kanamicina (100 µg/ml), y *Escherichia coli* CECT 416 (*E. coli* ATCC 27325), que se mantuvo a 4°C en agar nutritivo (AN, Oxoid). Para la conservación durante periodos de tiempo más largos se utilizaron los crioviales para el almacenamiento de bacterias Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics), que se mantuvieron a -80°C.

La cepa fluorescente *V. harveyi gfp* se obtuvo mediante conjugación triparental. Para ello, se emplearon las cepas *E. coli* DH5α *λpir* y *E. coli* CC118 *λpir*, portadoras de los plásmidos pVSV102 y pEVS104, respectivamente (ambas cepas de *E. coli* suministradas por el profesor Eric V. Stabb de la Universidad de Georgia, EEUU), y *V. harveyi* CECT 525. Las dos cepas de *E. coli* utilizadas en este proceso se mantuvieron en agar Luria-Bertani (LB, Merck) suplementado con 100 µg de kanamicina (Sigma-Aldrich) por ml.

### 1.1. Susceptibilidad de *V. harveyi* a antimicrobianos

Se testó la susceptibilidad de *V. harveyi* a diferentes antimicrobianos (ácido nalidíxico, cloranfenicol, estreptomina, kanamicina y rifampicina) mediante la determinación de las concentraciones mínima inhibitoria (CMI) y mínima bactericida (CMB) siguiendo el protocolo descrito por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012). En la Tabla 2 se muestran los valores de CMI y CMB obtenidos.

**Tabla 2.** Valores de CMI y CMB para los antimicrobianos testados con *V. harveyi*.

Antimicrobiano	Concentración mínima inhibitoria (CMI, µg/ml)	Concentración mínima bactericida (CMB, µg/ml)
Ácido nalidíxico	4	> 16
Cloranfenicol	0,8	1,6
Estreptomicina	Variable	Variable
Kanamicina	100	100
Rifampicina	3,2 - 6,4	12,8

## 1.2. Curvas de crecimiento

Matraces de 1 L conteniendo 300 ml de caldo marino (CM, AppliChem) en el caso de *V. harveyi*, CM suplementado con kanamicina (100 µg/ml) para *V. harveyi gfp* y medio de cultivo LB para *E. coli*, se inocularon hasta alcanzar una densidad inicial de  $10^5$  células/ml. La incubación se realizó en oscuridad y con agitación (120 r.p.m.), a 26°C para las cepas de *V. harveyi* y a 37°C para *E. coli*. Periódicamente se extrajeron alícuotas para el recuento de las bacterias, se fijaron con glutaraldehído (concentración final, 1 % [v/v]) (AppliChem) y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. El recuento de bacterias se realizó directamente mediante microscopía de epifluorescencia tras tinción con naranja de acridina (Apartado 4.1.).

A partir de los datos obtenidos se calcularon la duración de la fase de latencia (lag), la constante específica de velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y la densidad celular en fase estacionaria de cada una de las cepas bacterianas a estudio (Madigan y cols., 2003). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Duración de la fase lag, constante específica de velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y densidad celular en fase estacionaria para las bacterias *V. harveyi*, *V. harveyi gfp* y *E. coli*.

Microorganismo	Fase lag (h)	Constante específica de velocidad de crecimiento ( $\mu$ , 1/h)	Densidad celular en fase estacionaria ( $\times 10^9$ células/ml)
<i>V. harveyi</i>	2	0,622 ( $\pm$ 0,009)	4,10 ( $\pm$ 0,356)
<i>V. harveyi gfp</i>	2	0,648 ( $\pm$ 0,011)	2,85 ( $\pm$ 0,162)
<i>E. coli</i>	3	0,616 ( $\pm$ 0,008)	1,05 ( $\pm$ 0,117)

## 2. Efecto de los factores ambientales en la supervivencia bacteriana

Las bacterias empleadas como inóculo en las experiencias de supervivencia procedían de poblaciones en fase estacionaria. Las cepas de *V. harveyi* se cultivaron en CM, a 26°C y con agitación (120 r.p.m.), durante 24 horas. En el caso de *V. harveyi gfp* el medio CM se suplementó con kanamicina (100 µg/ml). La cepa de *E. coli* se cultivó en caldo LB a 37°C con agitación (120 r.p.m.) durante 24 horas.

Las bacterias se recogieron por centrifugación (4.000 g, 20 minutos, 4°C), realizándose 3 lavados sucesivos con solución salina (NaCl 1,94 % [p/v] para las cepas de *V. harveyi* y NaCl 0,9 % [p/v] para *E. coli*) estéril (121°C, 15 minutos en autoclave). Finalmente, las pastillas celulares se resuspendieron en solución salina estéril apropiada para cada cepa, y las suspensiones bacterianas resultantes se emplearon como inóculos en las distintas experiencias.

Todo el material de vidrio utilizado en este trabajo se lavó con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 96 % [v/v]) para eliminar los restos de materia orgánica. Posteriormente se aclaró 10 veces con agua desionizada y, finalmente, se secó en estufa a 250°C durante 24 horas.

### 2.1. Influencia de factores abióticos en la supervivencia de *V. harveyi* y *E. coli*

Los experimentos se llevaron a cabo en condiciones de escasez de nutrientes, en matraces con 2 L de agua de mar natural estéril (121°C, 15 minutos en autoclave), para *V. harveyi* y *V. harveyi gfp*, y 2 L de solución salina (NaCl 0,9 % [p/v]) estéril (121°C, 15 minutos en autoclave) para la cepa de *E. coli*. El agua de mar, recogida en el puerto de Armintza (Bizkaia, 43° 26' 24" N y 2° 54' 24" O), se sometió a filtraciones secuenciadas (filtros con un diámetro de poro de 8; 0,8; 0,45 y 0,22 µm; membranas de mezcla de ésteres, Merck Millipore) antes de esterilizarse. Finalmente, ambos medios de supervivencia se inocularon por separado hasta una densidad final de 10<sup>8</sup> células/ml y se incubaron en oscuridad a 4°C y 20°C con agitación (120 r.p.m.) durante al menos 21 días.



Además, se realizaron experiencias en las que suspensiones de *V. harveyi* en agua de mar se expusieron a radiación visible. Los matraces inoculados se incubaron a 20°C con agitación (120 r.p.m.) durante 21 días. La iluminación la proporcionaron cinco lámparas (Sylvania Standard F25W/30", 15,93 W/m<sup>2</sup>) que emiten radiación visible en un rango de 400-700 nm y con picos de emisión a 410, 440 y 550 nm. Estas experiencias se realizaron bajo iluminación continua o alternando periodos de luz y oscuridad de 12 horas.

Con el fin de determinar el número total de bacterias, los números de bacterias con membrana citoplasmática íntegra y de bacterias cultivables, la distribución de tamaños celulares y la morfología bacteriana a lo largo de las experiencias de supervivencia, periódicamente se recogieron alícuotas que se procesaron como se indica en el Apartado 4. Además, se recogieron alícuotas destinadas al análisis del subproteoma de las envueltas celulares (Apartado 5.).

Adicionalmente, con el objetivo de realizar ensayos de resucitación (Apartado 2.3.) y el estudio de las características del medio circundante (Apartado 3.), se utilizaron suspensiones celulares de las experiencias realizadas con *V. harveyi* en oscuridad a 4°C. Para los ensayos de resucitación se recogieron muestras a los 21 días, cuando más del 95 % de las bacterias se encontraban en estado viable no cultivable (Arana y cols., 2007) (Apartado 4.4.). Finalmente, las alícuotas para la determinación de la liberación de compuestos orgánicos al medio circundante se tomaron tras 3 y 21 días de incubación.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## **2.2. Influencia de las comunidades de protozoos del agua de mar natural en la supervivencia de *V. harveyi gfp***

Los experimentos se llevaron a cabo en matraces con 2 L de agua de mar natural sin esterilizar. El agua se inoculó con una suspensión de *V. harveyi gfp* hasta una densidad celular de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml, equiparable al número total de bacterias autóctonas presentes en el agua de mar utilizada. Los matraces se

incubaron en oscuridad a 4°C y 20°C con agitación (120 r.p.m.) durante 21 días. Estas experiencias se realizaron por triplicado.

Con el objetivo de determinar el número de bacterias totales y de *V. harveyi gfp*, el número total de bacterias cultivables y de *V. harveyi gfp* y el número total de protozoos ciliados y flagelados, periódicamente se tomaron alícuotas por triplicado a lo largo de la experiencia de supervivencia, que se procesaron como se indica en el Apartado 4.

### **2.3. Estudio de la resucitación de poblaciones viables no cultivables de *V. harveyi***

Se determinó la capacidad de recuperación de la cultivabilidad de bacterias en estado VNC (resucitación), restaurando las condiciones óptimas previas a la pérdida de cultivabilidad: aumento de la temperatura e incubación en un medio de cultivo fresco. Estos ensayos se llevaron a cabo en series de 5 tubos que contenían 9,9 ml de agua de mar estéril natural (AMN) (Apartado 2.1.) o agua de mar artificial (AMA) (Anexo 2), suplementadas o no con ácido nalidíxico (4 µg/ml) o rifampicina (6,4 µg/ml) en concentración no bactericida. La adición de antimicrobianos se realizó para evitar el crecimiento de aquellas bacterias cultivables que podrían estar presentes en las muestras utilizadas. Se seleccionaron el ácido nalidíxico (inhibidor de la replicación del ADN) y la rifampicina (inhibidor de la síntesis proteica) por su mecanismo de acción y por los resultados de CMI obtenidos (Apartado 1.1.). El ácido nalidíxico, al inhibir la división celular, impide el crecimiento de las bacterias cultivables (que requieren replicación del ADN) pero no la recuperación de la cultivabilidad células VNC (no requiere replicación de ADN). Sin embargo, el aumento del número de bacterias en los ensayos con rifampicina depende del requerimiento o no de síntesis de proteínas durante el crecimiento y/o la resucitación. Los tubos se inocularon con 0,1 ml de la dilución 1:100 de suspensiones de bacterias recogidas tras 21 días en condiciones de escasez de nutrientes y temperatura subóptima, momento en el que más del 95 % de la población se encontraba en estado VNC (Apartado 4.4.). Los tubos se incubaron a

20°C y 26°C en oscuridad y con agitación (120 r.p.m.) durante al menos 7 días. Diariamente, se tomaron alícuotas para enumerar las bacterias totales (el incremento en la densidad bacteriana total se considera indicativo de crecimiento) y cultivables.

Además, algunas muestras se incubaron a 20°C y 26°C sin tratamiento (sin dilución ni adición de antimicrobianos). Periódicamente, se tomaron alícuotas para estimar el número de bacterias totales y cultivables.

A partir de los resultados obtenidos se calcularon las variaciones, incrementos o descensos, de las fracciones cultivables de un día con respecto del día anterior. Se consideraron incrementos significativos aquellos ratios con valores superiores a 5 y se verificó para cada uno de estos puntos significativos el mantenimiento de la densidad bacteriana.

### **3. Variación del medio circundante obtenido a largo de la supervivencia de *V. harveyi* en agua de mar**

La metodología utilizada para la obtención de sobrenadantes fue la descrita por Srinivasan y cols. (1998) con ligeras modificaciones. Las bacterias de las muestras recogidas se retiraron por centrifugación (4.000 r.p.m., 20 minutos) y filtración (filtros de membrana PVDF con un tamaño de poro de 0,1 µm, Millex®VV). Los sobrenadantes se transfirieron a botellas de vidrio estériles libres de materia orgánica y se almacenaron en oscuridad a -20°C hasta su utilización.

Para verificar la esterilidad de los sobrenadantes, 100 ml de cada uno de ellos se incubaron sin inocular a 26°C con agitación (120 r.p.m.) durante 21 días y se determinó al cabo de dicho tiempo la presencia/ausencia de bacterias en preparaciones para microscopia de epifluorescencia (Apartado 4.1.) (experiencias control). Aquellos sobrenadantes para los que, en las experiencias control, se detectó crecimiento bacteriano se desecharon.

Se determinaron el pH, la concentración de proteínas y la concentración de ADN presentes en los sobrenadantes. Además, para comprobar la liberación de

nutrientes, a lo largo del proceso de supervivencia, capaces de sustentar el crecimiento de *V. harveyi*, bacterias provenientes de fase estacionaria (Apartado 2.) se inocularon en matraces con 100 ml de sobrenadantes hasta alcanzar una concentración inicial de  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  células/ml. Estos matraces se incubaron a 26°C en oscuridad y con agitación (120 r.p.m.) durante 24 horas. Periódicamente se recogieron muestras para la enumeración de bacterias cultivables (Apartado 4.3.).

Por último, con el fin de establecer el efecto de los compuestos liberados al medio sobre el proceso de supervivencia, una fracción de los sobrenadantes se reinoculó con células de *V. harveyi* en fase estacionaria (Apartado 2.) hasta una densidad de  $10^8$  células/ml. Estos sobrenadantes se incubaron a 4°C en oscuridad y con agitación (120 r.p.m.) durante 21 días. Periódicamente, se tomaron alícuotas por triplicado, con el fin de determinar el número total de bacterias, número de bacterias con membrana citoplasmática íntegra y número de bacterias cultivables (Apartado 4.).

### 3.1. pH

El pH se estimó utilizando el pH-metro S20 SevenEasy™ pH (Mettler Toledo).

### 3.2. Determinación de la concentración de proteínas y ADN

Los sobrenadantes se concentraron 30 veces mediante la utilización de los filtros *Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices* (Merck Millipore) y se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

La concentración de proteínas se determinó empleando el kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) basado en el método colorimétrico descrito por Lowry y cols. (1951) y utilizando seroalbúmina bovina como estándar proteico (Thermo Scientific). Brevemente, se añadieron 25 µl de cada muestra a 200 µl de reactivo BCA (ácido bicínico) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. A continuación, se determinó la absorbancia a 562 nm

utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2100. Para transformar la absorbancia a concentración de proteína, se construyó una recta patrón con seroalbúmina bovina. El límite de detección del método es de 5 µg/ml.

La concentración de ADN se determinó directamente con el espectrofotómetro NanoPhotometer™ (Implen).

## 4. Determinación de los parámetros celulares

### 4.1. Cuantificación del número total de bacterias (Total Direct Count, TDC)

La determinación del número total de bacterias (TDC) se llevó a cabo por recuento directo mediante microscopía de epifluorescencia, siguiendo la técnica descrita por Hobbie y cols. (1977).

Para ello, de las muestras conservadas con glutaraldehído (concentración final 1 % [v/v]) se realizaron diluciones decimales seriadas que posteriormente se tiñeron con una solución de naranja de acridina (concentración final 0,01 % [p/v]) (Molecular Probes) durante 2 minutos. Una vez pasado este tiempo, las submuestras teñidas se filtraron a través de filtros de membrana de policarbonato de color negro con un diámetro de poro de 0,22 µm (GE Osmonics™). Los filtros se montaron sobre portaobjetos con aceite de inmersión de baja fluorescencia (Nikon tipo A). Las preparaciones se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400, equipado con un bloque de filtros B-2A (filtro de excitación EX450-490, espejo dicróico DM505 y filtro barrera BA520). Se contaron un mínimo de 20 campos para cada alícuota.

En el caso de *V. harveyi gfp* se llevó a cabo un recuento directo de las bacterias fluorescentes mediante microscopía de epifluorescencia en muestras no teñidas.

En las experiencias realizadas para determinar la influencia de las comunidades de protozoos del agua de mar natural en la supervivencia de *V. harveyi*, el número de bacterias totales se estimó sustrayendo el número total de *V. harveyi gfp* (obtenido en

muestras no teñidas) del número total de bacterias (determinado a partir de muestras teñidas con naranja de acridina).

#### 4.2. Cuantificación del número de bacterias que presentan membrana citoplasmática íntegra (MEMB<sup>+</sup>)

El número de bacterias que presentaban membrana citoplasmática íntegra se cuantificó mediante microscopía de epifluorescencia utilizando el kit *Live/Dead<sup>®</sup> BacLight<sup>™</sup>* (Molecular Probes) tal y como describen Joux y cols. (1997). El kit está compuesto por dos fluorocromos, ioduro de propidio y SYTO 9. Ambos fluorocromos se intercalan en los ácidos nucleicos, pero difieren en sus características espectrales y en su capacidad para penetrar la membrana citoplasmática. El fluorocromo SYTO 9 puede penetrar en todas las bacterias, proporcionando a las células una fluorescencia verde (MEMB<sup>+</sup>). El ioduro de propidio, por el contrario, sólo penetra en aquellas bacterias con las membranas dañadas, por lo tanto, no viables, proporcionando una fluorescencia de color rojo (MEMB<sup>-</sup>). Cuando ambos fluorocromos están presentes en una bacteria la fluorescencia producida por el ioduro de propidio se impone sobre la del SYTO 9, de forma que las bacterias con las membranas citoplasmáticas dañadas presentarán fluorescencia roja.

Para determinar las bacterias (*V. harveyi* y *E. coli*) con la membrana citoplasmática íntegra, se mezclaron volúmenes iguales de ambos reactivos, y se añadieron 3 µl de la solución resultante a 1 ml de la dilución adecuada de muestra. La mezcla se agitó y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, las muestras se filtraron sobre filtros de membrana de policarbonato negros (GE Osmonics<sup>™</sup>) de 0,22 µm de diámetro de poro.

Las preparaciones se observaron utilizando un microscopio de epifluorescencia, tal y como se ha descrito en el apartado anterior. Ambos tipos de células, MEMB<sup>+</sup> y MEMB<sup>-</sup>, se enumeraron por separado.

Dada la imposibilidad de diferenciar la fluorescencia verde atribuible a la expresión del gen *gfp* y la emitida por el fluorocromo SYTO 9, no se determinaron las bacterias con membrana citoplasmática íntegra para poblaciones de *V. harveyi gfp*.

#### 4.3. Cuantificación del número de bacterias cultivables (Unidades Formadoras de Colonias, UFCs)

El número de bacterias cultivables (Unidades Formadoras de Colonias, UFCs) se estimó mediante siembra en superficie empleando diferentes medios de cultivo: AM y agar de Triptona-Soja (TSA, Oxoid) en el caso de *V. harveyi*, AM suplementado con kanamicina (100 µg/ml) para *V. harveyi gfp* y agar TSA, en el caso de *E. coli*. Las placas se incubaron durante 24 horas a 26°C (*V. harveyi* y *V. harveyi gfp*) ó 37°C (*E. coli*). En el caso de *V. harveyi gfp*, la emisión de fluorescencia de las colonias se verificó iluminando las placas con una lámpara de radiación UV-A (UVGL-58).

En las experiencias realizadas para determinar la influencia de las comunidades de protozoos del agua de mar natural en la supervivencia de *V. harveyi*, el número de bacterias quimioorganotrofas cultivables se estimó sobre TSA a partir de la enumeración de las colonias que no emitían fluorescencia bajo irradiación con UV-A.

#### 4.4. Cálculo del porcentaje de células en estado VNC

Para el cálculo del porcentaje de células que se encontraban en estado VNC durante la supervivencia se aplicó la siguiente fórmula:

$$\% VNC = \frac{(MEMB^+) - UFC}{TDC} \times 100$$

#### 4.5. Cuantificación de las poblaciones de protozoos

Para determinar la densidad de protozoos ciliados y flagelados se utilizó el método descrito por Sherr y cols. (1988). Las alícuotas se fijaron con lugol (concentración final 0,5 % [v/v]) y formalina tamponada (concentración final 3 % [v/v]). A continuación, las submuestras se tiñeron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol [concentración final 0,2 µg/ml]) (Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos en oscuridad. Las muestras teñidas se filtraron a través de filtros de membrana de policarbonato (Whatman®) con un tamaño de poro de 0,8 µm (para la enumeración de protozoos flagelados) y 3 µm (en el caso de protozoos ciliados). Posteriormente se observaron con un microscopio de epifluorescencia (Apartado 4.1.) equipado con un bloque de filtros DAPI (filtro de excitación EX340-380, espejo dicróico DM400 y filtro barrera BA435-485). La superficie completa de los filtros fue examinada y los protozoos presentes enumerados.

#### 4.6. Determinación del tamaño celular

Se tomaron submuestras de los experimentos de supervivencia de *V. harveyi* y *E. coli* llevados a cabo en oscuridad y en condiciones de iluminación continua, se fijaron con glutaraldehído (concentración final 1 % [v/v]) y se almacenaron a 4°C. Estas submuestras se utilizaron para el estudio del tamaño de *V. harveyi* y *E. coli* vía análisis de imagen de preparaciones de microscopía de epifluorescencia (Massana y cols., 1997), para lo que se utilizaron muestras teñidas con naranja de acridina filtradas a través de filtros de policarbonato negros con un diámetro de poro de 0,22 µm (GE Osmonics™). El sistema de análisis incluye una cámara de alta resolución Hamamatsu 2400 (Hamamatsu Photonics). Se seleccionaron imágenes de aquellos campos del filtro con suficientes bacterias y carentes de partículas demasiado fluorescentes que posteriormente, se digitalizaron y analizaron con el software Scion Image 1.62<sup>a</sup>. En cada muestra se determinó la longitud de 200 bacterias y se establecieron 4 rangos de tamaño:  $\leq 1 \mu\text{m}$ ,  $> 1 - \leq 1,5 \mu\text{m}$ ,  $> 1,5 - \leq 2 \mu\text{m}$  y  $> 2 \mu\text{m}$ .



#### 4.7. Análisis de la morfología bacteriana mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

A partir de los ensayos de supervivencia en oscuridad de *V. harveyi*, se recogieron submuestras que se fijaron con glutaraldehído (concentración final 2 % [v/v]) y almacenaron a 4°C. Estas submuestras se utilizaron para el estudio morfológico de las células de *V. harveyi* mediante microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM). Para ello, las suspensiones de bacterias fijadas se filtraron a través de filtros de policarbonato blancos con un tamaño de poro de 0,22 µm (Merck Millipore) y se lavaron con tampón Sorensen (0,1 M) (Anexo 2) durante 5 minutos. A continuación, los filtros se expusieron por periodos de 5 minutos a una serie creciente de soluciones de etanol (30, 50, 70, 90, 97 %) con el fin de deshidratar las muestras. En el último paso de deshidratación las muestras se expusieron a hexametildisilazano (HMDS) (Sigma-Aldrich) durante 5 minutos. Los filtros se dejaron secar al aire y se mantuvieron en un desecador hasta su procesamiento.

Los filtros se analizaron en la unidad de Microscopía Analítica y de Alta Resolución en Biomedicina de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Para ello, las muestras se recubrieron con oro y se observaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi S4800, mediante el cual se obtuvieron las fotografías correspondientes.

#### 4.8. Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa Microsoft Excel, y las densidades microbianas se transformaron a logaritmos decimales. Los valores dados son la media de tres experimentos y los coeficientes de variación entre réplica fueron < 12 %. Las diferencias entre las medias se detectaron mediante análisis de la varianza ANOVA. Probabilidades menores o iguales a 0,05 se consideraron significativas.

## 5. Análisis proteómico de las envueltas celulares de *V. harveyi* y *E. coli*

Se caracterizaron las variaciones producidas en la composición proteica de la envuelta celular de *V. harveyi* y *E. coli* en condiciones de escasez de nutrientes o ayuno y temperaturas subóptimas de crecimiento. Posteriormente, se compararon los perfiles proteómicos de estas dos cepas bacterianas.

### 5.1. Obtención de extractos proteicos durante los ensayos de supervivencia

Durante los ensayos de supervivencia (Apartado 2.1.) se procesaron muestras (Tabla 4) con el fin de obtener extractos proteicos de las envueltas celulares. Las bacterias se recogieron por centrifugación (8.000 g, 4°C, durante 40 minutos *V. harveyi* y 50 minutos *E. coli*) en una centrífuga Beckman Coulter Avanti™ J-20 XPI (equipada con un rotor JLA 9.1000). Las pastillas bacterianas obtenidas para cada tiempo se resuspendieron en 10 ml de tampón salino Tris-HCl (TBS, Anexo 2) y se realizó un lavado por centrifugación (8.000 g, 20 minutos, 4°C), volviendo a resuspender las pastillas obtenidas en 10 ml de TBS. Además, se añadieron los inhibidores de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich), 250 µl por gramo de pastilla celular, y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, AppliChem) a una concentración final de 2 mM.

La extracción de las proteínas de la envuelta celular se realizó mediante el método de extracción descrito por Molloy y cols. (2000) con algunas modificaciones. Las suspensiones celulares obtenidas para cada tiempo se sometieron a sonicación (SONICS VibraCell™ VCX130 Ultrasonic Cell Disrupter, USA) utilizando una sonda de 6 mm de diámetro. Las condiciones de sonicación fueron ciclos de 3 minutos (de pulsos de 30 y 15 segundos para *V. harveyi* y *E. coli*, respectivamente) a una amplitud del 65 %. Las células íntegras y otros restos celulares se eliminaron por centrifugación (6.000 g, 20 minutos, 4°C). Los sobrenadantes obtenidos se mantuvieron en hielo mientras que las pastillas celulares se resuspendieron en 10 ml de TBS y se volvieron a sonicar en las mismas condiciones descritas anteriormente. En total, este proceso se repitió

tres veces y los sobrenadantes se unificaron en un mismo recipiente. Finalmente, se diluyeron (1:1) con carbonato sódico 0,2 M y se mantuvieron en hielo con agitación (60 r.p.m.) durante 1 hora para evitar la agregación de las proteínas y posible formación de micelas.

**Tabla 4.** Condiciones y tiempos en los que se recogieron alícuotas destinados a la obtención de extractos proteicos. P1: inóculo; P2: adaptación de las bacterias a las condiciones expuestas; P3: población en estado VNC.

Microorganismo	Condiciones de supervivencia		Tiempos de recogida de las bacterias		
		Temperatura	P1	P2	P3
<i>V. harveyi</i>	Oscuridad	4°C	30 minutos	3 días	21 días
		20°C	30 minutos	6 días	230 días
	Radiación visible continua	20°C	30 minutos	6 días	21 días
<i>E. coli</i>	Oscuridad	4°C	30 minutos	6 días	21 días
		20°C	30 minutos	6 días	21 días

## 5.2. Aislamiento de proteínas de la envuelta celular

Tras la incubación de los extractos obtenidos, las muestras se centrifugaron a 115.000 g durante 1 h a 4°C (Beckman Coulter, Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge, equipada con el rotor TFT 50.38). Los sobrenadantes se desecharon mientras que las pastillas de proteínas se resuspendieron en 1 ml de TBS o tampón de isoelectroenfoque (Anexo 2). Las muestras resuspendidas en TBS se utilizaron posteriormente para la identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas, mientras que las proteínas en tampón de isoelectroenfoque se separaron mediante electroforesis bidimensional.

### 5.3. Cuantificación proteica

La concentración de proteínas se estimó con el kit *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) basado en el método colorimétrico descrito por Lowry y cols. (1951), utilizando como estándar proteico seroalbúmina bovina (Thermo Scientific) (Apartado 3.2.).

### 5.4. Análisis de las proteínas mediante electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

La separación de proteínas por electroforesis bidimensional se realizó íntegramente con un sistema electroforético Multiphor II (Amersham Biosciences) a partir de los extractos proteicos resuspendidos en tampón de isoelectroenfoque.

#### 5.4.1. Primera dimensión o Isoelectroenfoque (IEF)

La separación electroforética de las proteínas según su punto isoeléctrico (pI) se realizó mediante isoelectroenfoque (IEF) en tiras de gel de gradiente de pH lineal inmovilizado (IPGs, Immobiline Dry Strip, Amersham Biosciences). Se utilizaron tiras con un gradiente de pH de 4 a 7 de 7 cm de longitud. Las tiras (IPGs) se rehidrataron durante 12 horas en 10 ml de tampón de rehidratación (Anexo 2) y, posteriormente, se montaron en la cubeta correspondiente siguiendo las instrucciones del fabricante (Amersham Biosciences). El volumen de suspensión proteica cargado por pocillo fue de 100 µl para cada muestra. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en dos fases y las condiciones seleccionadas para su realización se detallan en la Tabla 5. Una vez finalizado el isoelectroenfoque, las tiras se guardaron a -20°C hasta su posterior utilización.

**Tabla 5.** Condiciones electroforéticas para la primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF).

Fase	Voltaje (V)	Amperaje (mA)	W	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	200	0,5 mA / tira	5	1	20
2	3.500	0,5 mA / tira	5	90	20
3	3.500	0,5 mA / tira	5	150	20

### 5.4.2. Segunda dimensión o SDS-PAGE

Las proteínas retenidas en las tiras de isoelectroenfoque se separaron en función de su peso molecular utilizando geles prefabricados que presentaban un gradiente de poliacrilamida del 12-14 % (p/v) (ExcelGel XL SDS 12-14, Amersham BioSciences), y apropiados para separar proteínas comprendidas en un rango de 5 a 210 kDa. El equilibrado previo de la tira de isoelectroenfoque se realizó en dos pasos. En primer lugar, las tiras se embebieron durante 10 minutos en 10 ml de tampón de equilibrado (Anexo 2) al que se añadió 1 g de ditioneitol (DTT, Sigma-Aldrich). En segundo lugar, las tiras se mantuvieron otros 10 minutos en 10 ml de tampón de equilibrado al que se añadieron 0,4 g de iodoacetamida (IAA, Sigma-Aldrich). Finalmente, las tiras se colocaron sobre los geles de poliacrilamida. A ambos lados de las tiras se cargaron 5 µl de una solución que contenía estándares de proteínas (BioRad) con pesos moleculares comprendidos entre 10 y 220 kDa. La segunda dimensión se llevó a cabo en dos fases y las condiciones seleccionadas para su realización se detallan en la Tabla 6.

Posteriormente, se procedió a la tinción de las proteínas del gel.

**Tabla 6.** Condiciones electroforéticas para la segunda dimensión.

Fase	Voltaje (V)	Amperaje (mA)	W	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
1	1.000	20	40	45	10
2	1.000	40	40	160	10

### 5.4.3. Visualización y análisis de las proteínas en los geles

#### 5.4.3.1. Tinción de plata

La visualización de las manchas proteica en los geles de poliacrilamida se realizó la tinción de plata. Utilizando el kit *Plus One™ Silver Staining* (Amersham Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este tipo de tinción se basa en el método fotoquímico descrito por Merril y cols. (1981). Tras la electroforesis, las proteínas atrapadas en el gel se fijaron con solución II (Anexo 2) durante 30 minutos.

A continuación, los geles se impregnaron durante 30 minutos con solución III (Anexo 2). Tras lavar los geles tres veces durante 5 minutos con agua ultrapura, se añadió reactivo de plata (Anexo 2) y se agitaron (60 r.p.m) durante 20 minutos. Posteriormente, los geles se lavaron dos veces con agua ultrapura durante 1 minuto e inmediatamente se le añadió solución IV (Anexo 2). Los geles se dejaron en contacto con esta solución IV hasta conseguir la tinción de los puntos de proteína, momento en el cual se procedió a parar la reacción con solución V (Anexo 2).

Una vez teñidos, los geles se digitalizaron mediante un escáner ImageScanner III Lab Scan 6.0 (GE Healthcare). Con el fin de comprobar la reproducibilidad del método, para cada suspensión proteica se realizaron tres geles diferentes.

## 5.5. Identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas

El análisis de las muestras resuspendidas en TBS se llevó a cabo en la Unidad de Proteómica de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) para su identificación mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Para ello 50 µg de proteínas totales se precipitaron utilizando el kit *2-D Clean-Up* (GE Healthcare). El pellet se resuspendió en *RapidGest* (0,2 %) (Waters Corporation), se incubó durante 15 minutos a 85°C, se redujo con DTT 5 mM, se alquiló con iodocetamida 15 mM y se digirió con tripsina (1:25) durante toda la noche a 37°C (Roche Diagnostics). El reactivo *RapidGest* se inactivó mediante la adición de HCl hasta una concentración final 0,5 % y la incubación a 37°C durante 40 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 16,000 g durante 10 minutos, se recogieron los sobrenadantes y se les añadió el estándar de digestión con enolasa *MassPREP* (Waters Corporation) como estándar para la cuantificación absoluta de proteínas.

El análisis por espectrometría de masas se realizó en el espectrómetro de masas SYNAPT HDMS (Waters Corporation) interconectado a un sistema de cromatografía líquida NanoAcquity UPLC (Waters Corporation). Una cantidad final de 0,5 µg (que contenía los péptidos trípticos y 100 fmol del estándar de digestión *MassPREP*) se

cargaron en precolumnas Symmetry 300 C18, 180  $\mu\text{m}$  x 20 mm (Waters Corporation). Las precolumnas se conectaron a BEH130 C18, 75  $\mu\text{m}$  x 200 mm, 1,7  $\mu\text{m}$  (Waters Corporation) y los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 120 minutos del 3 al 40 % (v/v) de acetonitrilo seguido de un gradiente lineal de 15 minutos del 40 al 60 %.

Los espectros de masas se obtuvieron usando el modo de adquisición independiente de datos (*MS<sup>E</sup>-Data Independent Acquisition*) descrito por Silva y cols. (2005). Brevemente, se realizaron captaciones de masa alternas de 1 s a baja (6 eV) y alta (12-35 eV) energía de colisión y el *offset* de radio frecuencia (RF) se ajustó de modo que los espectros se encontraban en un rango de  $m/z$  de 350 a 1990. El péptido [*Glu1*]-fibrinopeptide B (Sigma-Aldrich) se inyectó como referencia a una concentración de 100 fmol/l a través de la fuente NanoLockSpray y se tomaron muestras cada 30 s. El espectro obtenido se procesó mediante el software *ProteinLynx Global Server v2.4 Build RC7* (Waters Corporation) usando un ion doblemente protonado del péptido [*Glu1*]-fibrinopeptide B para la corrección de masas. La identificación de proteínas se obtuvo con el algoritmo de búsqueda en bases de datos incorporado en el programa (Li y cols., 2009) y se utilizó una base de datos *UniProtKB* de *V. harveyi* (versión 2011\_07) y de *E. coli* (versión 2011\_07) donde se añadieron las secuencias de ENO1\_YEAST y TRYP\_PIG.

Para la identificación de proteínas se adoptaron los siguientes parámetros: carbamidometilación de C como modificación fija; acetilación N-terminal, desamidación de N y Q y oxidación de M, como modificaciones variables; 1 omisión de secuencia de corte de tripsina y los errores de masa de los precursores y fragmentos fueron automáticamente asignados por el programa. Se permitió una tasa de falsos positivos máxima del 5 %.

Finalmente, la cuantificación absoluta de proteínas se calculó automáticamente mediante el programa *ProteinLynx Global Server* usando los péptidos de enolasa como estándar (Silva y cols., 2006). Para la cuantificación absoluta únicamente se utilizaron

aquellas proteínas identificadas con al menos 3 péptidos y presentes en al menos dos réplicas biológicas. Los valores de cuantificación absoluta individuales se normalizaron frente a la cantidad total de proteínas cuantificada en la muestra. Para ello, se tuvieron en cuenta el número de secuencias aminoacídicas correspondientes a una proteína por cada 1000 secuencias aminoacídicas caracterizadas. Los resultados obtenidos se exportaron a un archivo *Excel*.

Con el fin de verificar la identificación y posible función de cada proteína, se realizó una búsqueda en las bases de datos *UniProt* (<http://www.uniprot.org/>) y *KEGG* (<http://www.genome.jp/kegg/>). La localización subcelular de las proteínas se anotó utilizando el programa predictivo *PSORTb v 3.0.2* (Yu y cols., 2010), de modo que se analizaron preferiblemente proteínas de las envueltas celulares o asociadas a las mismas según los datos obtenidos con dicha herramienta.

### 5.5.1. Análisis de resultados

El análisis de los datos se llevó a cabo con el programa *Microsoft Excel* donde se obtuvieron las medias de los valores de cuantificación proteica y su correspondiente desviación estándar. A continuación, se calcularon los ratios de expresión dividiendo los valores medios de cuantificación de cada punto con respecto del punto anterior. Para calcular el nivel de significación de cada ratio se realizó el test-T.

Se consideraron proteínas presentes en cada punto analizado aquellas proteínas que se detectaron en dos o más réplicas de la tres existentes. Además, se consideró un aumento significativo en la cantidad de proteína la obtención de ratios de expresión  $> 1,5$  y  $p < 0,05$ , mientras que para ratios de expresión  $< 0,66$  y  $p < 0,05$  se consideró un descenso significativo.

Siguiendo estos criterios, se determinaron las proteínas a analizar que se agruparon en diversos grupos funcionales (GF) en base a su función biológica principal.





# Resultados





## 1. Efecto de los factores ambientales en la supervivencia bacteriana

### 1.1. Influencia de factores abióticos en la supervivencia de *V. harveyi* y *E. coli*

El efecto de los factores abióticos en la supervivencia de *V. harveyi* y *E. coli* se determinó en poblaciones mantenidas bajo condiciones de escasez de nutrientes o ayuno, temperatura subóptima y/o exposición a radiación visible (Figuras 2, 3 y 4). En estas condiciones, los números de células totales (TDC) y viables (MEMB+) de *V. harveyi* y *E. coli* se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo de experimentación, por tanto, la permanencia bajo condiciones adversas no afectó a la integridad ni a la actividad de las bacterias estudiadas. Sin embargo, la cultivabilidad varió en función de la bacteria analizada y las condiciones de estrés aplicadas (Figuras 2, 3 y 4). Además, el medio de cultivo empleado para la cuantificación del número de bacterias cultivables (UFCs) afectó a los valores obtenidos.

En la Figura 2 se muestran los patrones de supervivencia obtenidos en condiciones de escasez de nutrientes o ayuno para poblaciones mantenidas en oscuridad. Las dos poblaciones de *Vibrio* estudiadas, *V. harveyi* y *V. harveyi gfp*, mostraron un comportamiento muy similar (Figuras 2A-D) siendo el descenso de la cultivabilidad dependiente de la temperatura de incubación. Así, por ejemplo, a bajas temperaturas (4°C) la supervivencia de ambas poblaciones de *V. harveyi* disminuyó de forma progresiva a partir del tercer día. El descenso en la cultivabilidad varió en función del medio de cultivo utilizado en la cuantificación de UFCs, obteniéndose una disminución de aproximadamente 3 y 4 órdenes en las enumeraciones en AM y TSA, respectivamente, tras 21 días de incubación (Figuras 2A y 2C). El mantenimiento de la densidad de células viables y el descenso del número de células cultivables indicó la presencia de una elevada fracción (> 99 %) de células de *V. harveyi* en estado viable no cultivable (VNC). En los ensayos realizados a 20°C (Figuras 2B y 2D), el efecto de la temperatura fue menos acusado, de manera que la pérdida de cultivabilidad, tras 21 días en supervivencia, fue de 1 y 0,5 órdenes en AM para *V. harveyi* y *V. harveyi gfp*,

respectivamente, y en torno a 1,5 órdenes en TSA para ambas bacterias. Cuando las experiencias con *V. harveyi* se prolongaron hasta alcanzar los 230 días (Figura 3), la cultivabilidad en AM se redujo hasta 3 órdenes, permaneciendo la mayoría de las células viables, por lo que nuevamente una parte importante de la población adoptó el estado VNC (> 99 %).

Adicionalmente, se realizaron ensayos en los que poblaciones de *V. harveyi* se expusieron a radiación visible constante o discontinua (ciclos de 12 horas), a 20°C. El efecto conjunto de ayuno y exposición a radiación visible continua (Figura 4A) adelantó en el tiempo el proceso de pérdida de cultivabilidad. El descenso de la densidad de células cultivables, tras 21 días, fue de aproximadamente 1 orden en ambas condiciones (Figura 4), no obteniéndose diferencias en las enumeraciones realizadas en AM y TSA. Esta pérdida de cultivabilidad es indicativa de la adopción del estado VNC por una fracción de la población (aprox. 95 %), tras 21 días en supervivencia.

A diferencia de lo ocurrido con *V. harveyi*, la supervivencia de *E. coli* no se vio afectada por la permanencia a 4°C en oscuridad, manteniéndose constantes la integridad, la viabilidad y la cultivabilidad de las poblaciones expuestas (Figura 2E). Sin embargo, en poblaciones mantenidas a 20°C, se detectó una pérdida en la cultivabilidad iniciada al cabo de 12 días de incubación y que, tras 21 días, fue de aproximadamente 1 orden de magnitud (Figura 2F).

## 1.2. Influencia de factores bióticos en la supervivencia de *V. harveyi gfp*

El efecto de las poblaciones de bacterias autóctonas y protozoos del agua de mar, a 4°C y 20°C, en la supervivencia de *V. harveyi* se muestra en la Figura 5. Con el fin de enumerar de forma diferenciada la población de *V. harveyi* (población inoculada) de las poblaciones bacterianas autóctonas, en este estudio se utilizó la cepa *V. harveyi gfp*.

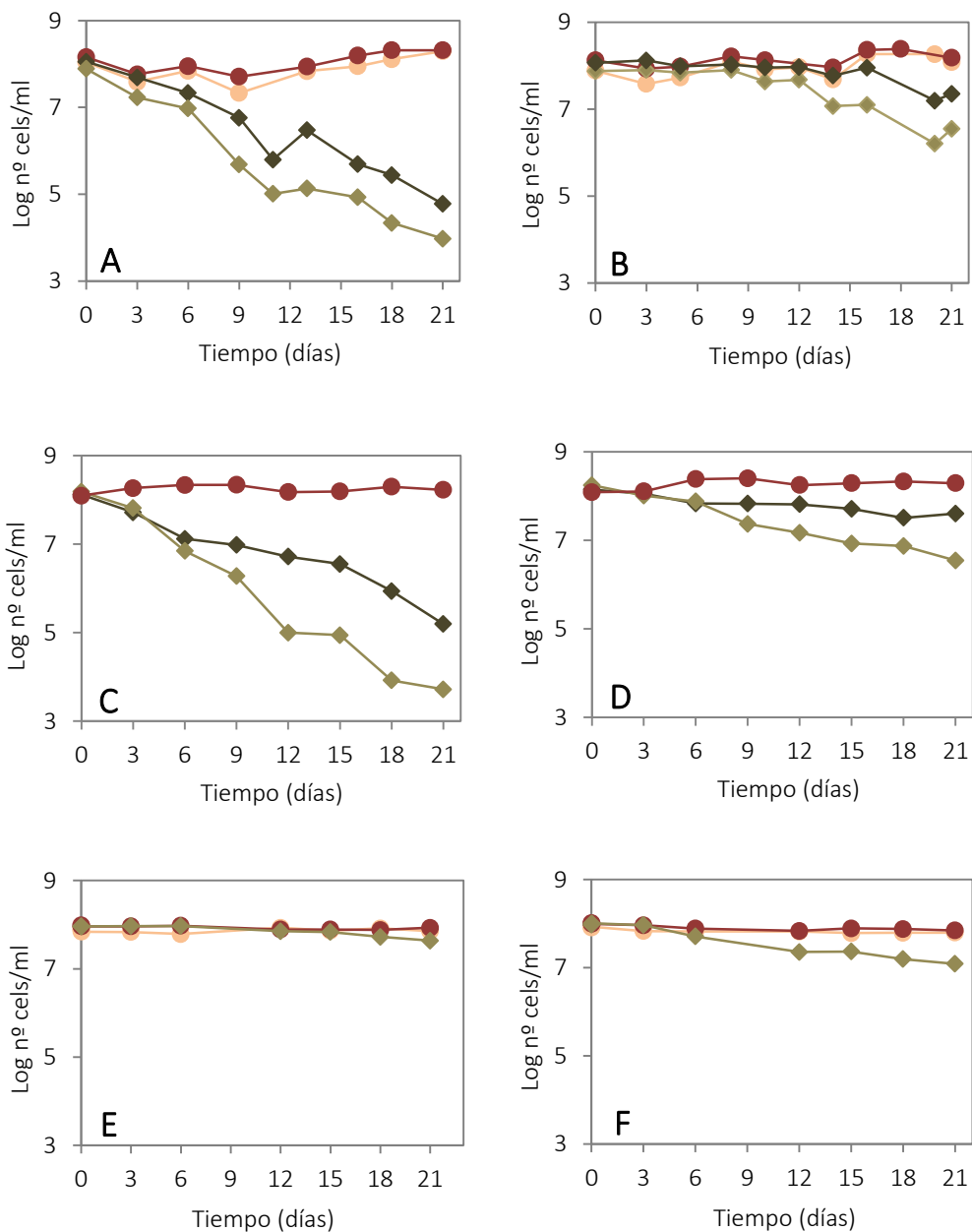
Al inicio del ensayo se detectaron diferencias significativas entre las densidades de bacterias autóctonas totales y quimioorganotrofas cultivables (estimadas sobre AM). A lo largo del periodo de estudio, e independientemente de la temperatura de incubación, la densidad de bacterias autóctonas totales se mantuvo prácticamente constante; mientras que la subpoblación de bacterias quimioorganotrofas cultivables decayó, tras un aumento inicial de un orden, hasta estabilizarse en aproximadamente  $10^3$  UFC/ml. Asimismo, se produjo una disminución en las poblaciones de *V. harveyi gfp* totales y cultivables (en torno a 4 y 5 órdenes, respectivamente), alcanzando densidades finales similares para ambas temperaturas de estudio. En los ensayos realizados a 4°C (Figura 5A), el inicio de la disminución de *V. harveyi gfp* totales y cultivables se retrasó hasta los 8 días de incubación en comparación con los 2 días necesarios a 20°C (Figura 5B). En los últimos días de experimentación, tanto las enumeraciones de TDC como de UFCs se estabilizaron.

La disminución de la población total de *V. harveyi gfp* y de la fracción cultivable coincidió en el tiempo con el aumento de las poblaciones de protozoos, tanto flagelados como ciliados (Figura 5A y 5B). Tras alcanzar un valor máximo, las densidades de ambos tipos de protozoos disminuyeron hasta valores aproximados a los iniciales.

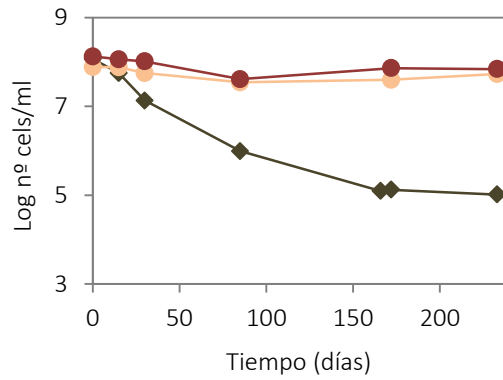
## 2. Estudio de la resucitación de poblaciones de *V. harveyi* en estado VNC

Tras establecer la dinámica de entrada en estado VNC para *V. harveyi*, se procedió a determinar su capacidad de resucitación. Para ello, alícuotas recogidas a partir de los ensayos de supervivencia a 4°C se diluyeron en agua de mar natural y agua de mar artificial, suplementadas o no con ácido nalidíxico o rifampicina. Las experiencias se realizaron por duplicado, incubando a 20°C ó 26°C.

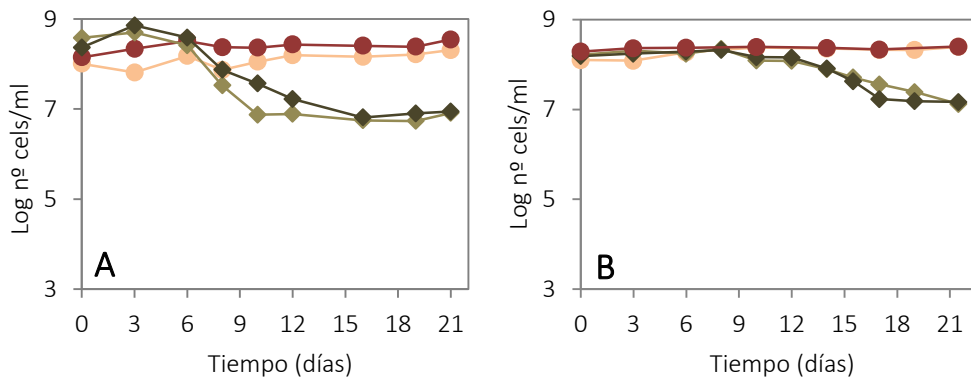
Los resultados, expresados como incrementos de la fracción cultivable en un tiempo determinado respecto al tiempo anterior, se muestran en la Tabla 7. En el caso



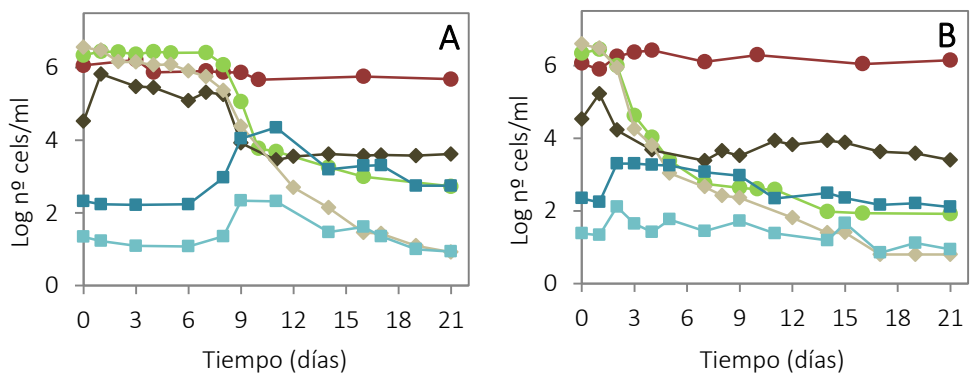
**Figura 2.** Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* (A, B), de *V. harveyi gfp* (C, D), mantenidas ambas en agua de mar estéril y de *E. coli* (E, F) en solución salina estéril e incubadas a 4°C (A, C, E) y a 20°C (B, D, F). Número de bacterias totales (●), bacterias viables (○) y bacterias cultivables en AM (◆) y TSA (◆).



**Figura 3.** Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* mantenidas en agua de mar a 20°C durante 230 días. Número de bacterias totales (●), bacterias viables (○) y bacterias cultivables en AM (◆).



**Figura 4.** Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* mantenidas en agua de mar a 20°C bajo radiación visible continua (A) y radiación visible discontinua (B). Número de bacterias totales (●), bacterias viables (○) y bacterias cultivables en AM (◆) y TSA (◆).



**Figura 5.** Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi gfp* mantenidas en agua de mar no tratada a 4°C (A) y a 20°C (B). Número total de bacterias autóctonas del agua de mar (●) y de *V. harveyi gfp* (●), bacterias cultivables quimiorganotrofas (◆), *V. harveyi gfp* cultivables (◆) y número total de protozoos flagelados (■) y ciliados (■).



de las muestras no diluidas ni suplementadas, incubadas a 20°C ó 26°C, se detectó un incremento significativo ( $p \leq 0,05$ ) en la densidad de bacterias cultivables, mientras que el número total de bacterias no experimentó cambios significativos. Sin embargo, en las series de muestras diluidas no suplementadas con antimicrobianos se observó un aumento significativo del número de bacterias cultivables, así como del número de bacterias totales ( $p \leq 0,05$ ).

Los incrementos de UFCs fueron, en general, más elevados cuando las poblaciones se diluyeron en agua de mar natural respecto a los resultados obtenidos en agua de mar artificial y en las experiencias realizadas a 26°C respecto a los obtenidos a 20°C.

Los resultados obtenidos en presencia de antimicrobianos difirieron de los ya comentados en ausencia de antimicrobianos. Cuando las experiencias se realizaron con alícuotas suplementadas con ácido nalidíxico (inhibidor de la replicación del ADN), durante los dos primeros días de incubación se observó un incremento significativo en la cultivabilidad ( $p \leq 0,05$ ) sin que se produjeran cambios en los recuentos de bacterias totales. Este incremento, ratio de 27,1 en las primeras 24 h de incubación en presencia de ácido nalidíxico en muestras diluidas en agua de mar natural incubadas a 26°C fue significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ) que el obtenido en ausencia de antimicrobianos, ratio de 654,8 debido a que en las muestras sin suplementar no se inhibe el crecimiento de las células cultivables que pudieran aparecer. Por el contrario, en los ensayos realizados en presencia de rifampicina (inhibidor de la síntesis proteica) no se obtuvieron incrementos significativos en el número de bacterias totales o cultivables hasta el quinto día de incubación. Estos resultados podrían asociarse a la degradación del antibiótico, dada la pérdida del color rojizo característico de las soluciones de rifampicina.

**Tabla 7.** Incrementos en los valores de UFCs de *V. harveyi*/ml obtenidos para poblaciones recogidas tras permanecer 21 días a 4°C en condiciones de ayuno en agua de mar natural estéril. Los resultados se expresan como ratio de las fracciones cultivables obtenidas en un tiempo determinado con respecto a los valores del tiempo anterior.

		Muestras diluidas												
		Dilución en agua de mar natural						Dilución en agua de mar artificial						
Tiempo (días)	Muestras sin diluir	Sin suplementar			Suplementada con antimicrobianos			Sin suplementar			Suplementada con antimicrobianos			
		20°C	26°C	20°C	26°C	20°C	26°C	20°C	26°C	20°C	26°C	20°C	26°C	
		Sin suplementar			Ácido nalidíxico			Rifampicina			Ácido nalidíxico			
1	33,9	8,1	271,4*	654,8*	11,7	27,1	-	-	94,3*	391,5*	14,4	20,0	-	-
2	-	-	6,8*	-	15,6	10,5	-	-	17,5*	-	15,7	10,7	-	-
5	-	-	-	-	-	-	823,4*	8720,5*	-	-	-	-	287,9*	4539,4*

Sólo se muestran los resultados estadísticamente significativos. Resultados de 3 y 4 días no significativos.

\* Muestras para las que se obtuvo un aumento significativo del número total de bacterias/ml ( $p \leq 0,05$ ).

### 3. Variación del medio circundante obtenido durante la supervivencia de *V. harveyi* en agua de mar

Para comprobar la posible liberación de compuestos al medio circundante durante la supervivencia de *V. harveyi* en agua de mar, se recogieron, a partir de las experiencias de supervivencia realizadas a 4°C, sobrenadantes libres de células. En la Tabla 8 se muestra la cantidad total de ADN y proteínas obtenidas para sobrenadantes correspondientes a los días 3 y 21 de estudio.

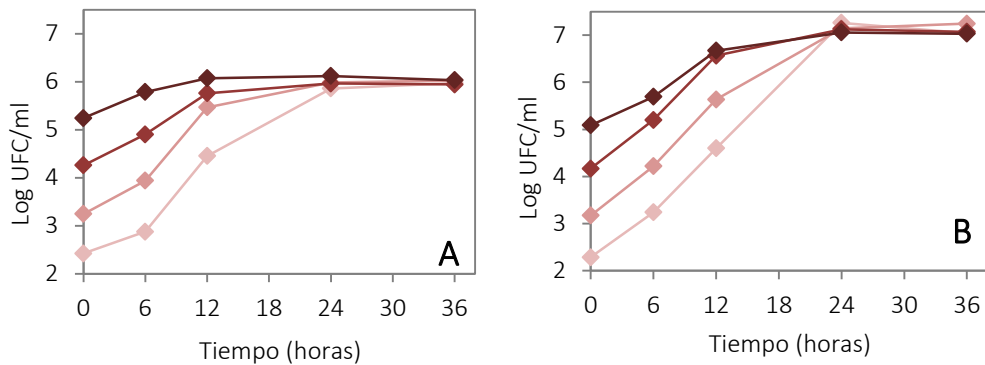
La concentración de ADN libre en el medio aumentó con el tiempo, desde una concentración aproximada de 5 µg/ml, detectada en las muestras de agua de mar natural no inoculadas, hasta alcanzar una concentración en torno a 26 µg/ml en los sobrenadantes recogidos tras 21 días de permanencia de las poblaciones de *V. harveyi*. En cuanto a la concentración de proteínas, hasta al menos el tercer día de supervivencia, los valores obtenidos se situaron por debajo del límite de detección del método de cuantificación (límite de detección, < 5 µg/ml). Sin embargo, al cabo de 21 días la concentración de proteínas fue de aproximadamente 15 µg/ml. Adicionalmente, se determinó el pH del agua de mar y los sobrenadantes (Tabla 8), observándose una ligera alcalinización del medio a lo largo del periodo de estudio.

**Tabla 8.** Concentración ( $\pm$  desviación estándar) de ADN y de proteínas y pH del agua de mar natural estéril y de los sobrenadantes obtenidos durante la supervivencia de *V. harveyi* a 4°C.

Tipo de medio	ADN total (µg/ml)	Proteína total (µg/ml)	pH
Agua de mar natural estéril	4,673 ( $\pm$ 0,952)	< 5	7,61
Sobrenadantes de 3 días	17,710 ( $\pm$ 7,722)	< 5	8,24
Sobrenadantes de 21 días	26,210 ( $\pm$ 1,358)	14,853 ( $\pm$ 5,897)	8,21

Una vez comprobada la variación en la composición del medio circundante durante la supervivencia de *V. harveyi*, se procedió a comprobar si los compuestos liberados pueden servir como nutrientes para el crecimiento de *V. harveyi*. Para ello, se comparó el crecimiento de *V. harveyi* en los sobrenadantes de 21 días respecto al

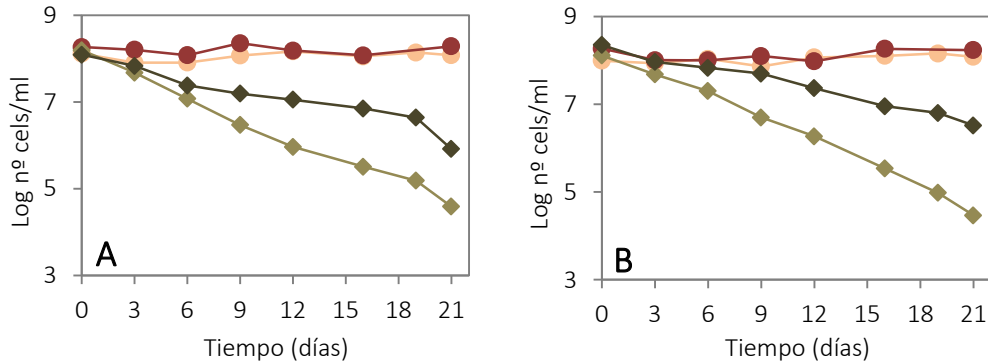
crecimiento en agua de mar natural. Tanto el agua de mar como los sobrenadantes soportaron el crecimiento de poblaciones de *V. harveyi* (Figura 6). Sin embargo, en el caso de los sobrenadantes de 21 días (Figura 6B) las cosechas máximas obtenidas fueron un orden superior ( $p \leq 0,05$ ) a las obtenidas para poblaciones crecidas en agua de mar natural (Figura 6A).



**Figura 6.** Crecimiento de *V. harveyi* en agua de mar natural estéril (A) y en sobrenadantes recogidos tras permanecer poblaciones de *V. harveyi* durante 21 días en agua de mar a 26°C (B). Densidad bacteriana inicial:  $10^2$  bacterias/ml (◆),  $10^3$  bacterias/ml (◆),  $10^4$  bacterias/ml (◆)  $10^5$  bacterias/ml (◆).

Asimismo, se estudió la influencia de los compuestos liberados en la supervivencia de *V. harveyi*. Para ello, sobrenadantes de 3 y 21 días se inocularon con *V. harveyi* y se mantuvieron a 4°C durante 21 días (Figura 7). Como se puede observar en la figura, *V. harveyi* siguió un patrón de supervivencia en sobrenadantes similar al obtenido en los ensayos de supervivencia previos ya comentados (Figura 7 vs. Figura 2A). Las densidades de bacterias totales y viables se mantuvieron constantes durante todo el periodo de estudio, mientras que la cultivabilidad fue descendiendo progresivamente hasta finalizar el ensayo. Sin embargo, la pérdida de cultivabilidad de las poblaciones mantenidas en sobrenadantes, y determinada en AM, no fue tan acusada tras 21 días de incubación. Este descenso fue ligeramente superior a 2 órdenes y de aproximadamente 1,5 órdenes para poblaciones mantenidas en sobrenadantes de 3 días, (Figura 7A) y 21 días (Figura 7B), respectivamente. Las

reducciones obtenidas en las experiencias de supervivencia realizadas en agua de mar se situaron en torno a 3,5 órdenes (Figura 2A).



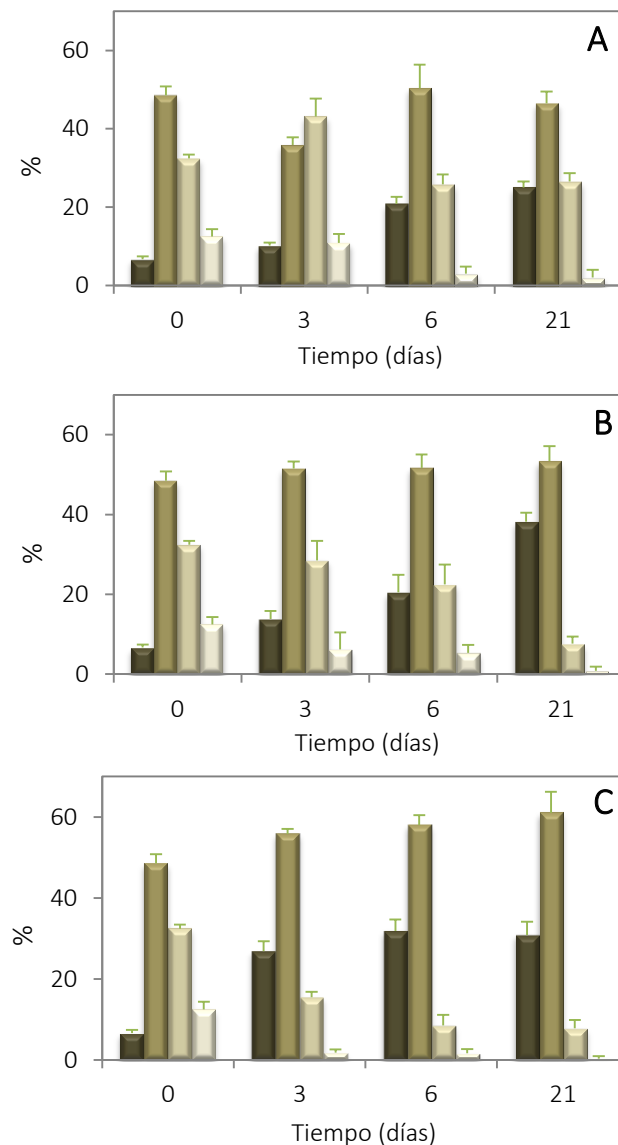
**Figura 7.** Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* mantenidas en sobrenadantes obtenidos en experiencias previas e incubados a 4°C. Sobrenadantes de 3 días (A) y sobrenadantes de 21 días (B). Número de bacterias totales (●), bacterias viables (○) y bacterias cultivables en AM (◆) y TSA (◆).

#### 4. Análisis de la variación del tamaño y de la morfología celular durante la supervivencia de *V. harveyi* y *E. coli*

La longitud celular media de las poblaciones de *V. harveyi*, 1,519  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,364 \mu\text{m}$ ) al inicio de las experiencias, experimentó una reducción al cabo de 21 días de permanencia bajo condiciones de estrés. Así, al finalizar el periodo de estudio, la longitud media obtenida para poblaciones mantenidas en oscuridad a 4°C y a 20°C fueron de 1,308  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,400 \mu\text{m}$ ), y 1,108  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,288 \mu\text{m}$ ), respectivamente; y en el caso de poblaciones expuestas a radiación visible continua, de 1,130  $\mu\text{m}$  ( $\pm 0,307 \mu\text{m}$ ).

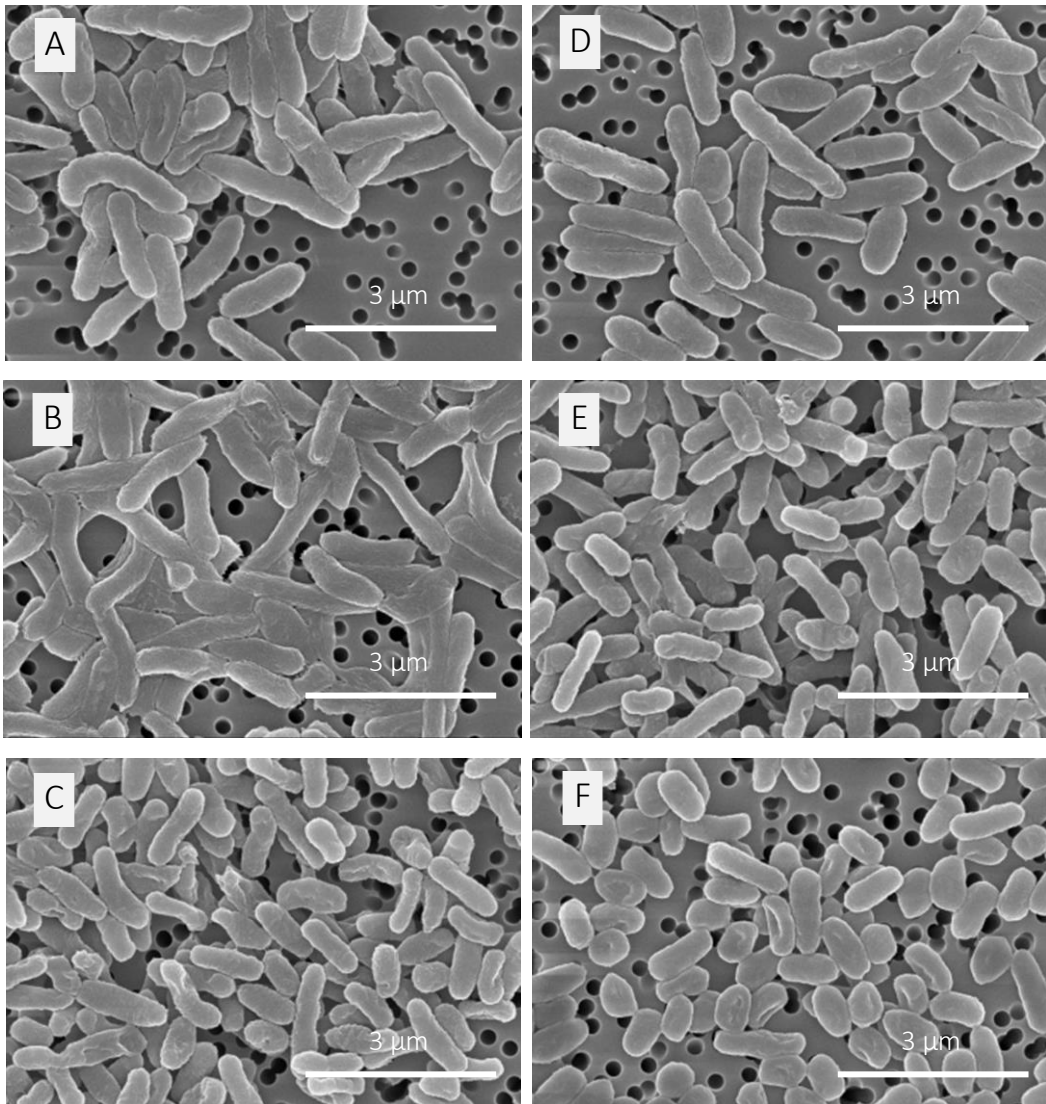
Al inicio de las experiencias de supervivencia, aproximadamente el 55 % de las células de *V. harveyi* medían menos de 1,5  $\mu\text{m}$  de longitud (Figura 8). Este porcentaje fue variando a lo largo del tiempo en función de las condiciones de estrés. En el caso de poblaciones mantenidas en agua de mar (escasez de nutrientes) a 4°C en oscuridad (Figura 8A), el porcentaje de células con una longitud inferior a 1  $\mu\text{m}$  aumentó a lo largo de la exposición, de un 6,7 % hasta un 25 %, mientras que a 20°C, el aumento se produjo hasta aproximadamente un 38 % y un 30 % en condiciones de oscuridad

(Figura 8B) y radiación (Figura 8C), respectivamente. Esta variación se produjo a expensas de las fracciones de tamaño superior a 1,5  $\mu\text{m}$  en todos los casos. Así, tras 21 días de incubación en los ensayos realizados a 4°C y 20°C, las bacterias que presentaban una longitud inferior a 1,5  $\mu\text{m}$  supusieron más del 70 % y el 90 % de las bacterias, respectivamente.



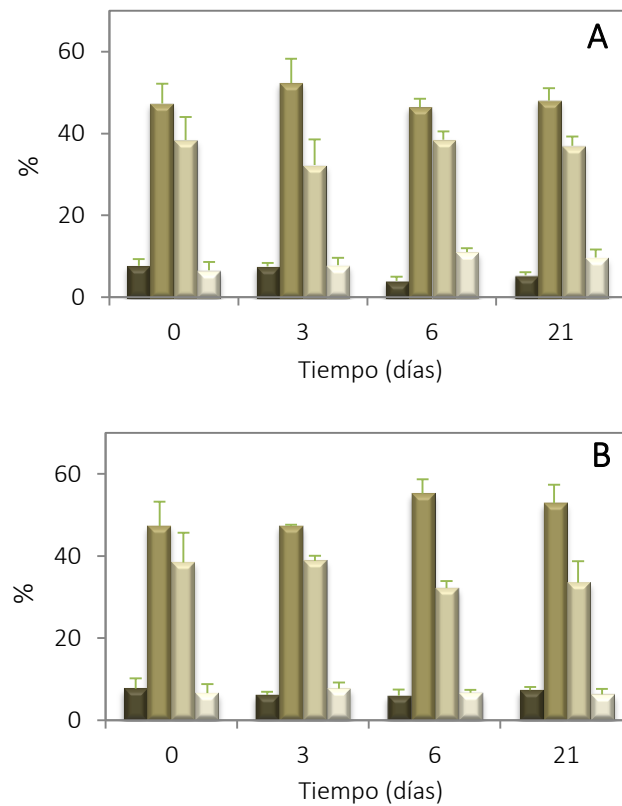
**Figura 8.** Variación en la distribución de subpoblaciones de *V. harveyi*, establecidas en función de la longitud celular, obtenida para poblaciones mantenidas en agua de mar natural estéril en condiciones de oscuridad a 4°C (A) y 20°C (B) y durante la exposición a radiación visible continua a 20°C (C). Rangos de longitud celular establecidos:  $\leq 1 \mu\text{m}$  (■),  $> 1 - \leq 1,5 \mu\text{m}$  (■),  $> 1,5 - \leq 2 \mu\text{m}$  (■) y  $> 2 \mu\text{m}$  (■).

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido (SEM) confirmaron la variación de tamaño experimentada por *V. harveyi*, y mostraron cambios de la morfología celular a lo largo de la supervivencia en agua de mar (Figura 9), entre los que destaca un aumento de la rugosidad superficial de las bacterias tras 21 días en supervivencia, tanto a 4°C como a 20°C



**Figura 9.** Fotografías de microscopía electrónica de barrido de células de *V. harveyi* recogidas de poblaciones mantenidas en agua de mar natural estéril en condiciones de oscuridad a 4°C (A-C) y 20°C (D-F) durante 0 horas (A, D), 3 días (B, E) y 21 días (C, F).

A diferencia del comportamiento observado para *V. harveyi*, *E. coli*, a lo largo de la permanencia en solución salina, no varió significativamente de tamaño (Figura 10). Así, la longitud media inicial fue de 1,491  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0,323  $\mu\text{m}$ ) y los valores determinados para las poblaciones mantenidas 21 días a 4°C y 20°C, fueron de 1,439  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0,344  $\mu\text{m}$ ) y de 1,415  $\mu\text{m}$  ( $\pm$  0,355  $\mu\text{m}$ ), respectivamente.



**Figura 10.** Variación en la distribución de subpoblaciones de *E. coli*, establecidas en función de la longitud celular, obtenida para poblaciones mantenidas en solución salina estéril en condiciones de oscuridad a 4°C (A) y 20°C (B). Rangos de longitud celular establecidos:  $\leq 1 \mu\text{m}$  (■),  $> 1 - \leq 1,5 \mu\text{m}$  (■),  $> 1,5 - \leq 2 \mu\text{m}$  (■) y  $> 2 \mu\text{m}$  (■).



## 5. Análisis proteómico de las envueltas celulares de *V. harveyi* y *E. coli*

A partir de las experiencias de supervivencia se analizó la expresión de proteínas de las envueltas celulares de *V. harveyi* y de *E. coli* utilizando dos métodos complementarios, la separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional y la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

Los tiempos de estudio (periodos en los que se llevó a cabo la extracción de proteínas) se seleccionaron en base a los patrones de supervivencia obtenidos para ambas bacterias en las condiciones descritas anteriormente (Tabla 4, Apartado 5.1. de Material y Métodos).

En la Tabla 9 se muestran las concentraciones aproximadas de proteína de las envueltas celulares/célula determinados, para ambas bacterias, a partir de los extractos proteicos recogidos. En el caso de *V. harveyi*, la concentración de proteína/célula disminuyó entre un 70 % y un 60 %, siendo mayor este descenso para las poblaciones mantenidas en oscuridad a 20°C y, el menor, el determinado para células expuestas a 4°C. A diferencia de lo observado para *V. harveyi*, a medida que aumentó el tiempo de permanencia de *E. coli* en solución salina, la concentración de proteína/célula incrementó un 26 % en las poblaciones mantenidas a 4°C y más del 100 % en poblaciones expuestas a 20°C.

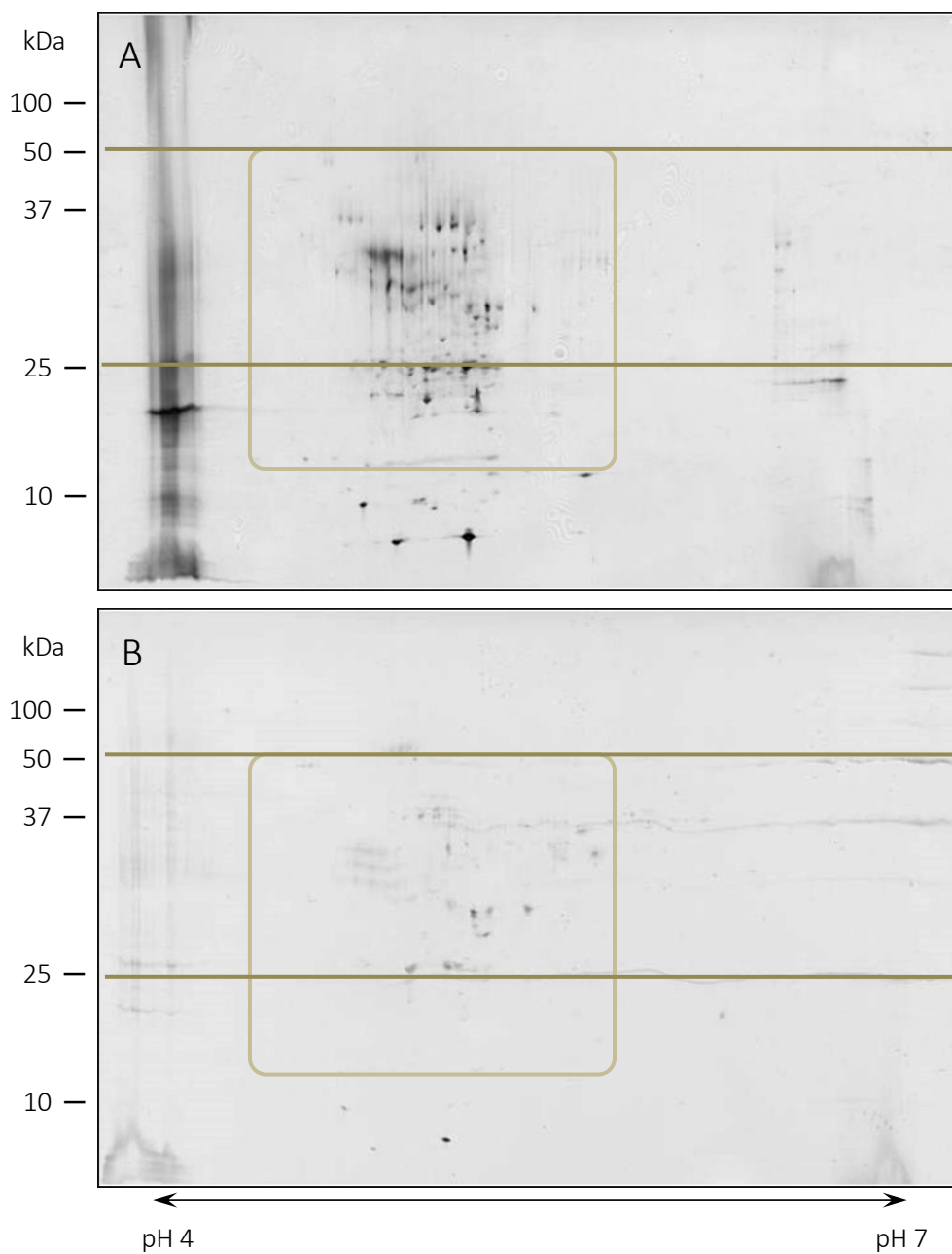
**Tabla 9.** Concentración ( $\pm$  desviación estándar) de proteínas de envueltas celulares/célula (fg/células) obtenidos durante la supervivencia de *V. harveyi* y *E. coli*.

Microorganismo	Tiempo de permanencia	Condiciones de incubación		
		Oscuridad		Radiación visible
		4°C	20°C	20°C
<i>V. harveyi</i>	0 días	3,86 ( $\pm$ 0,324)	3,95 ( $\pm$ 0,323)	4,62 ( $\pm$ 0,362)
	21 días	1,53 ( $\pm$ 0,253)	1,15 ( $\pm$ 0,118)	1,59 ( $\pm$ 0,180)
<i>E. coli</i>	0 días	9,89 ( $\pm$ 1,027)	9,90 ( $\pm$ 1,059)	-
	21 días	12,42 ( $\pm$ 4,351)	20,43 ( $\pm$ 5,975)	-

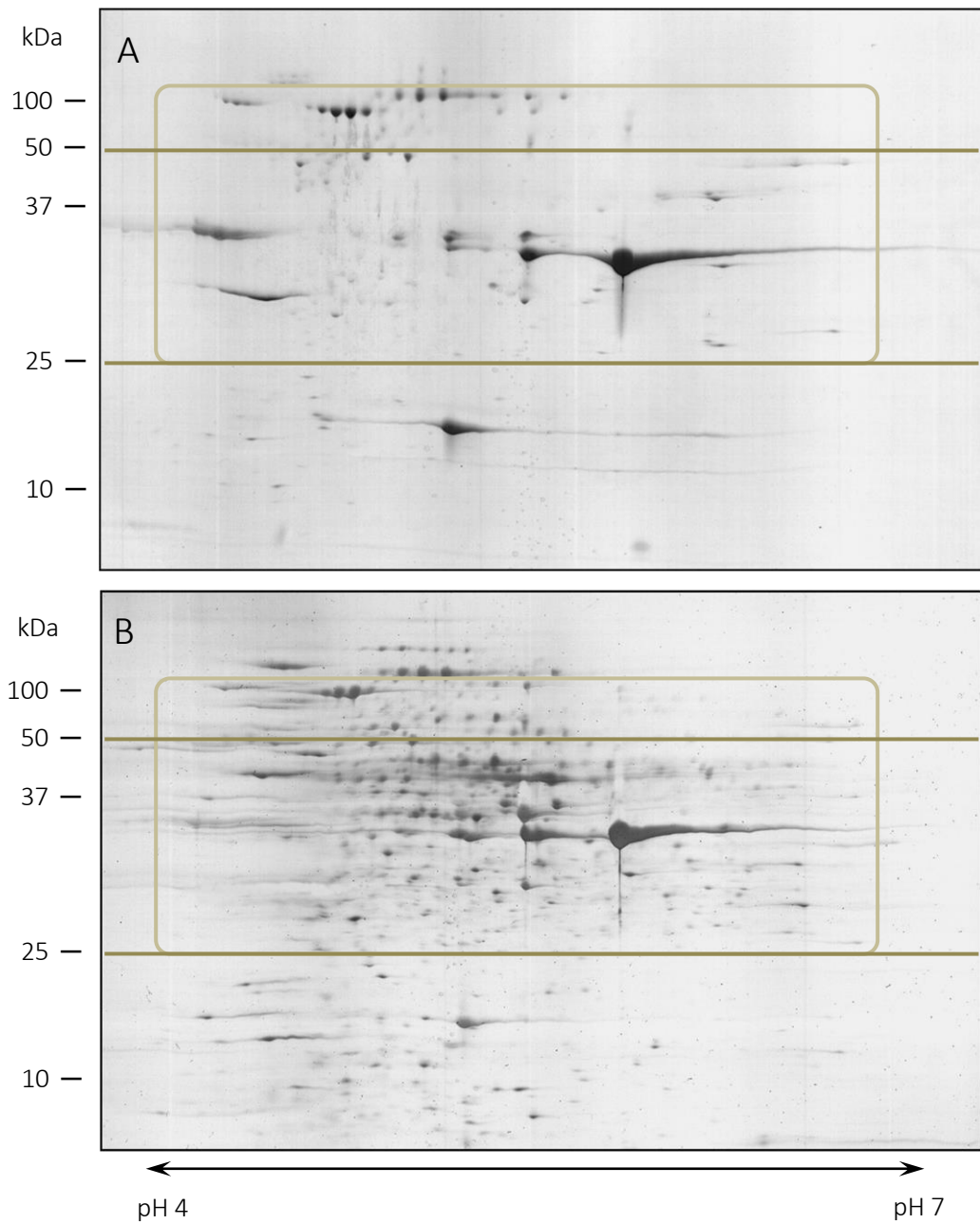
### 5.1. Análisis de las proteínas mediante electroforesis bidimensional

En los geles obtenidos a partir de los extractos proteicos de las envueltas celulares de *V. harveyi*, las proteínas mayoritarias se correspondieron a pesos moleculares (Pm) relativamente bajos (12-50 kDa), detectándose, incluso, diversos puntos de Pm inferior a 10 kDa y se situaron en un rango estrecho de pH (en torno a 4,5-5,5) (Figura 11). Además, los geles correspondientes a extractos obtenidos a partir de poblaciones mantenidas en agua de mar a 4°C (Figura 11B) reflejaron la disminución en la cantidad de proteína/célula detectada (Tabla 9). En el caso concreto de las muestras procesadas, las concentraciones de proteína obtenidas fueron de 1,283 mg/ml en los extractos celulares recogidos al inicio de las experiencias y de 0,634 mg/ml, al cabo de 21 días.

En los geles obtenidos a partir de extractos de células de *E. coli*, la mayoría de puntos se localizaron en un rango de Pm más elevado (25-100 kDa) y agrupados a lo largo de todo el rango de pH estudiado (4-7) (Figura 12). A diferencia de lo observado para *V. harveyi*, se detectaron una serie de puntos por encima de 50 kDa. Además, la cantidad de proteína detectada en las muestras de *E. coli* incrementó a lo largo del tiempo, obteniendo valores de 2,144 mg/ml en muestras del tiempo inicial y de 2,869 mg/ml tras 21 días en supervivencia.



**Figura 11.** Proteínas de las envoltas celulares de *V. harveyi* correspondientes al control (A) y tras 21 días en condiciones de ayuno a 4°C (B). El recuadro indica el rango de pH (entre 4,5-5,5) en el que se encontraron la mayoría de proteínas. Las líneas horizontales separan las diferentes fracciones de proteínas detectadas.



**Figura 12.** Proteínas de las envoltas celulares de *E. coli* correspondientes al control (A) y tras 21 días en condiciones de ayuno a 20°C (B). El recuadro indica el rango de pH en el que se distribuyeron las proteínas. Las líneas horizontales separan las diferentes fracciones de proteínas detectadas.

## 5.2. Análisis de las proteínas analizadas mediante espectrometría de masas

Durante el análisis del subproteoma de las envueltas celulares, junto con proteínas de membrana, se identificaron proteínas citoplasmáticas sin relación funcional o estructural con las envueltas celulares y, por tanto, no se consideraron (Anexo 3). Otras proteínas detectadas se descartaron al no poder caracterizarse en cuanto a nomenclatura y función dado que no se localizaron en las bases de datos consultadas (*UniProt* [<http://www.uniprot.org/>] y *KEGG* [<http://www.genome.jp/kegg/>]) (Anexo 3). En el caso de *V. harveyi*, es de destacar la ausencia de una base de datos proteica específica para este microorganismo, siendo la mayor parte de las anotaciones derivadas de estudios realizados con *V. campbellii* u otros vibrios; es decir, la mayor parte de las proteínas presentadas en este trabajo para *V. harveyi* corresponden a proteínas hipotéticas o putativas.

Las proteínas seleccionadas para un análisis más detallado se clasificaron en grupos funcionales (GF) con una cierta laxitud dado que una proteína puede adscribirse a más de un grupo. Finalmente, para cada microorganismo, *V. harveyi* y *E. coli*, se analizó la evolución de las proteínas seleccionadas para cada condición de supervivencia y se compararon las diferentes condiciones estudiadas (Tablas 10 y 11).

### 5.2.1. Estudio del subproteoma de *V. harveyi* bajo condiciones de estrés

Para *V. harveyi* se han analizado 72 proteínas que cumplieran los requisitos establecidos (Apartado 5.5.1. de Materiales y Métodos), de las cuales 19 se detectaron en todas las condiciones estudiadas, si bien sólo 6 de ellas no experimentaron cambios. 13 proteínas se detectaron en poblaciones sometidas a estrés en experiencias llevadas a cabo durante 21 días, pero fueron indetectables al cabo de 230 días de permanencia en condiciones de escasez de nutrientes, es decir, en experiencias de larga duración. Asimismo, la concentración de algunas de las proteínas entre las 72 analizadas, detectadas o no en todas las condiciones,

experimentó variaciones significativas a lo largo de la permanencia en agua de mar natural (Tabla 10).

Las proteínas más abundantes al inicio de las experiencias fueron la lipoproteína mureína (A7N6D3\_VIBHB), las porinas OmpW (A7N5J5\_VIBHB) y de membrana externa (A7N6H4\_VIBHB), la proteína formadora de canales específicos de nucleósidos (A7N1T8\_VIBHB) y el factor de elongación Tu (EFTU\_VIBHB). Todas ellas continuaron presentes en el resto de condiciones estudiadas, excepto la proteína formadora de canales específicos de nucleósidos (A7N1T8\_VIBHB), que no se detectó en los experimentos de larga duración (230 días en ayuno y oscuridad). Tras 21 días de incubación, en condiciones de oscuridad tanto la lipoproteína mureína como la porina OmpW y el factor de elongación Tu se mantuvieron como las proteínas mayoritarias. En cambio, bajo condiciones de radiación visible, la porina de membrana externa (A7N6H4\_VIBHB) y la lipoproteína mureína (A7N6D3\_VIBHB) fueron las proteínas con concentración más elevada.

Dentro de las proteínas detectadas en todas las muestras analizadas, se encontraron proteínas relacionadas con el mantenimiento de la estructura celular (lipoproteínas como A7N6D3\_VIBHB, A7MYB0\_VIBHB y A7N1S9\_VIBHB), así como proteínas que intervienen en el transporte, OmpW (A7N5J5\_VIBHB), diferentes porinas (A7MWN4\_VIBHB, A7N6H4\_VIBHB, A7N6I6\_VIBHB), maltoporina (LAMB\_VIBHB) y proteínas relacionadas con el transporte de maltosa (A7N5R0\_VIBHB), glucosa (A7MVF7\_VIBHB), vitamina B12 (BTUB\_VIBHB) y proteínas del sistema de transporte de adhesinas (A7MZM8\_VIBHB y A7MW50\_VIBHB), además del receptor TonB-dependiente (A7MSR9\_VIBHB). Sin embargo, solo dos proteínas pertenecientes al grupo funcional de bioenergética estuvieron presentes en todos los puntos estudiados, las subunidades alfa 1 (ATPA1\_VIBHB) y b 1 (ATPF1\_VIBHB) de la ATP sintasa. Entre las proteínas asignadas al grupo funcional de síntesis, degradación y recambio de proteínas cabe destacar dos proteasas, proteasa A7MT59\_VIBHB y HflK (A7MX88\_VIBHB). Por último, el factor de elongación EF-Tu (EFTU\_VIBHB) también se detectó en todos los tiempos estudiados.

Dentro del grupo de proteínas presentes en todos los puntos muestreados, únicamente las proteínas maltoporina (LAMB\_VIBHB), proteína periplásmica operón maltosa (A7N5R0\_VIBHB), subunidad IIBC del sistema PTS específico de glucosa (A7MVF7\_VIBHB), proteína relacionada con el transporte de adhesinas (A7MW50\_VIBHB), subunidad alfa 1 de la ATP sintasa (ATPA1\_VIBHB) y proteasa A7MT59\_VIBHB mantuvieron sus concentraciones constantes, no experimentando cambios significativos a lo largo de la supervivencia (Tabla 10).

El resto de las proteínas de este grupo, presentes en todos los puntos muestreados, experimentaron incrementos o disminuciones significativas dependientes de las condiciones de estrés: escasez de nutrientes, temperatura de incubación y/o exposición a radiación visible.

Así, la proteína de membrana externa del sistema de transporte de adhesinas (A7MZM8\_VIBHB) y la porina A7N6H4\_VIBHB se sobreexpresaron en poblaciones mantenidas en condiciones de escasez de nutrientes tanto en oscuridad a 4°C y 20°C como expuestas a radiación visible a 20°C. La sobreexpresión de la proteína de transporte de adhesinas se detectó ya en el tercer día de experimentación en las poblaciones sometidas a bajas temperaturas o exposición a luz visible y al cabo de 230 días en poblaciones mantenidas a 20°C en oscuridad.

Las lipoproteínas A7N6D3\_VIBHB y A7N1S9\_VIBHB se sobreexpresaron únicamente en poblaciones expuestas a luz visible durante la permanencia en agua de mar natural, al igual que el receptor TonB-dependiente (A7MSR9\_VIBHB) y la proteína BtuB transportadora de vitamina B12 (BTUB\_VIBHB). Otras proteínas mostraron un comportamiento dependiente de la temperatura de exposición, así, la lipoproteína A7MYB0\_VIBHB se mantuvo constante en poblaciones mantenidas a 4°C y su expresión fue variable a 20°C, tanto en oscuridad como en luz. Por el contrario, el factor de elongación EF-Tu (EFTU\_VIBHB) se mantuvo constante en las experiencias realizadas a 20°C, aumentando su expresión en poblaciones mantenidas a 4°C.

Además, dentro de este grupo de proteínas presentes en todas las condiciones estudiadas, se encontró un grupo cuya variación fue dependiente del tiempo de exposición y del tipo de estrés. La sobreexpresión de varias porinas, entre ellas OmpW (A7N5J5\_VIBHB) y porina OmpA-OmpF (A7N6I6\_VIBHB), y la proteasa de membrana HflK (A7MX88\_VIBHB) fue detectada en muestras recogidas tras 230 días de supervivencia. Por el contrario, la expresión de la subunidad b 1 de la ATP sintasa (ATPF1\_VIBHB) decayó en las poblaciones mantenidas a 4°C o expuestas a radiación visible.

Por otra parte, varias proteínas detectadas al inicio de las experiencias dejaron de detectarse en poblaciones sometidas a escasez de nutrientes. Así, dejaron de detectarse, independientemente de la temperatura de incubación y de la permanencia bajo condiciones de oscuridad o iluminación, la subunidad II del citocromo BD oxidasa (A7N1I2\_VIBHB), o toda una serie de proteínas quimiotácticas aceptoras de metilos implicadas en la transducción de señales (Tabla 10).

Adicionalmente, la flagelina (A7MS06\_VIBHB) fue indetectable tras periodos cortos de exposición a estrés severo (escasez de nutrientes y 4°C o escasez de nutrientes y radiación visible) o tras periodos prolongados de permanencia en agua de mar a 20°C. Por el contrario, otro grupo de proteínas se mantuvieron a pesar de que las poblaciones fueron sometidas a estrés severo inductor de pérdida de cultivabilidad (ayuno y 4°C) y, sin embargo, la exposición prolongada a una situación de escasez de nutrientes provocó el cese en su detección. Entre estas proteínas se encontraron algunas implicadas en transporte (por ejemplo, proteína formadora de canales específico de nucleósidos [A7N1T8\_VIBHB]), determinantes en la conservación de la energía (subunidades de ATP sintasa [ATPA2\_VIBHB, ATPB1\_VIBHB, ATPB2\_VIBHB]), elementos de la cadena de transporte de electrones (A7N0Q1\_VIBHB, A7MWL3\_VIBHB, A7MWL5\_VIBHB, NQRA\_VIBHB, NQRF\_VIBHB, A7N1D0\_VIBHB, A7MT34\_VIBHB) y factores de elongación (EF-G [A7MUX4\_VIBHB] y EF-Ts [EFTS\_VIBHB]) (Tabla 10). Finalmente, la bacterioferritina (A7MXB4\_VIBHB), proteína relacionada con la respuesta al estrés e indetectable en el inóculo, alcanzó niveles



detectables en poblaciones sometidas a estrés riguroso (escasez de nutrientes y 4°C o escasez de nutrientes y radiación visible).

Los resultados también mostraron un set de proteínas temperatura dependiente: la subunidad IIBC del sistema de transporte PTS del ácido N-acetilmurámico (A7MT41\_VIBHB) (indetectable tras 6 días de permanencia a 20°C), el factor de ensamblaje BamA (A7MXZ2\_VIBHB) o las proteínas MreB (A7MSA3\_VIBHB) y GspG (A7MST9\_VIBHB) (indetectables tras periodos cortos de permanencia a 4°C), al igual que varias proteínas relacionadas con la conservación de la energía como el citocromo b (A7MWL4\_VIBHB), la subunidad B del translocador de Na<sup>+</sup> NADH: ubiquinona reductasa (A7N6X4\_VIBHB) o la subunidad alfa de la NAD(P) transhidrogenasa (A7N542\_VIBHB). Por otra parte, la exposición a radiación visible indujo una evolución claramente diferente en el factor de ensamblaje BamD (A7MTB2\_VIBHB), ya que no se detectó en poblaciones sometidas a escasez de nutrientes y/o temperaturas subóptimas de crecimiento, y en una proteína exportadora de tipo-lisina (A7N7A7\_VIBHB) y la subunidad I del citocromo BD oxidasa (A7N111\_VIBHB), que dejaron de detectarse en poblaciones expuestas a radiación visible.

### 5.2.2. Estudio del subproteoma de *E. coli* bajo condiciones de estrés

Comparando los resultados obtenidos para poblaciones de *E. coli* expuestas a ayuno y temperaturas no óptimas para el crecimiento (Tabla 11), se encontraron diferencias en la variación del subproteoma bajo estrés respecto a *V. harveyi*. Así, se detectó una mayor estabilidad en la composición proteica de las membranas de *E. coli*. De las 51 proteínas analizadas (cumplían los requisitos establecidos [Apartado 5.5.1. Materiales y Métodos]), 32 no experimentaron cambios para ninguna de las condiciones ni tiempos estudiados y 6 se detectaron en todas las muestras aunque con variaciones.

Para *E. coli* las proteínas mayoritarias al inicio de las experiencias fueron la lipoproteína de membrana externa Lpp (LPP\_ECOLI) y las porinas OmpA (OMPA\_ECOLI) y OmpC (OMPC\_ECOLI). A diferencia de *V. harveyi*, estas tres proteínas mantuvieron su condición de más abundantes en el resto de puntos estudiados en las muestras de 4°C; sin embargo, la proteína EF-Tu 1 (EFTU1\_ECOLI) se encontró entre las más abundantes en las muestras de 20°C a partir de los 6 días de incubación.

Entre las proteínas que no experimentaron cambios en su expresión o detección, se encontraron proteínas estructurales y de transporte como YhcB (YHCB\_ECOLI), YdgA (YDGA\_ECOLI); lipoproteínas Lpp (LPP\_ECOLI), SlyB (SLYB\_ECOLI), YbjP (YBJP\_ECOLI), MetQ (METQ\_ECOLI) y porinas OmpA (OMPA\_ECOLI), OmpW (OMPW\_ECOLI), OmpC (OMPC\_ECOLI), TolC (TOLC\_ECOLI). También se mantuvieron proteínas relacionadas con la conservación de energía (subunidades de ATP sintasa [ATPA\_ECOLI, ATPB\_ECOLI, ATPL\_ECOLI], citocromo bd [CYDA\_ECOLI, CYDB\_ECOLI]) y otras, todas ellas relacionadas con el transporte de electrones, (FRDB\_ECOLI, FRDA\_ECOLI, DHSB\_ECOLI, NARG\_ECOLI). Varias proteasas relacionadas con la síntesis, degradación y recambio de proteínas (HFLK\_ECOLI, HFLC\_ECOLI, FTSH\_ECOLI); la proteína ElaB (ELAB\_ECOLI) relacionada con la respuesta al estrés y algunas proteínas asignadas al grupo funcional "Otras", como el factor de elongación Tu1 (EFTU1\_ECOLI) y la proteína MinD (MIND\_ECOLI) se encontraron igualmente entre la lista de proteínas que no experimentaron variaciones a lo largo de la supervivencia.

En el caso de las proteínas que experimentaron cambios en su expresión, la mayoría de estos cambios se produjeron tras periodos cortos de permanencia en solución salina a 20°C. Así, las lipoproteínas SLYB\_ECOLI y YBJP\_ECOLI, la proteína OmpA (OMPA\_ECOLI) y la proteasa HflC (HFLC\_ECOLI) disminuyeron de forma significativa su concentración transcurridos 6 días desde el inicio del ensayo. De todos modos, esta reducción no pareció afectar a su posterior expresión y/o detección. La lipoproteína E osmóticamente inducible (OSME\_ECOLI) fue la única proteína cuya

concentración aumentó significativamente, en este caso en poblaciones mantenidas a 4°C.

Entre aquellas proteínas que experimentaron cambios en su detección, destacó la insertasa de proteínas de membrana YidC (YIDC\_ECOLI), que no resultó detectable tras 21 días de permanencia a 4°C ó 20°C. Adicionalmente, se encontraron cambios dependientes de la temperatura de incubación pero que también se produjeron tras periodos prolongados de exposición a las condiciones de estrés. Por un lado, en las experiencias realizadas a 4°C, estuvieron ausentes la subunidad EIICBA del sistema de transporte PTS específico de la N-acetilglucosamina (PTW3C\_ECOLI) y la proteína HemY (HEMY\_ECOLI). Por otro lado, en poblaciones mantenidas a 20°C, dejaron de detectarse dos lipoproteínas (OSME\_ECOLI y PAL\_ECOLI), la subunidad SecD de translocasa de proteínas (SECD\_ECOLI) y la proteína QmcA (QMCA\_ECOLI).

Finalmente, a diferencia de lo encontrado para *V. harveyi*, en los ensayos realizados con poblaciones de *E. coli*, la bacterioferritina (BFR\_ECOLI) se detectó al inicio de las experiencias. No obstante, al igual que en *V. harveyi*, se mantuvo a lo largo de la supervivencia a 4°C, siendo indetectable en poblaciones mantenidas a 20°C. Además, en el análisis del subproteoma de *E. coli*, se identificó un mayor número de proteínas ausentes en el inóculo y detectadas posteriormente a lo largo de la supervivencia, como la proteína estructural MreB (MREB\_ECOLI), la peptidasa YgeY (YGEY\_ECOLI) y la proteína de estrés universal F (USPF\_ECOLI).

**Tabla 10.** Proteínas de las envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* mantenidas en agua de mar a 4°C y 20°C en condiciones de oscuridad y radiación visible a 20°C. Se tomaron muestras del inicio de las experiencias (P1), durante el periodo de adaptación de las bacterias a las condiciones expuestas (P2), y cuando la población se encontraba mayoritariamente en estado VNC (P3).

GF	Acceso a UniProt *	Nombre de la proteína	Oscuridad					Radiación visible	
			P1	4°C		20°C		20°C	
				P2	P3	P2	P3	P2	P3
Estructural	A7N6D3	Lipoproteína mureína	D	D	D	D	D	2,05 ↑	D
	A7MYB0	Lipoproteína	D	D	D	D	2,12 ↑	D	0,48 ↓
	A7N1S9	Lipoproteína sin caracterizar	D	D	D	D	D	D	1,40 ↑
	A7MRT5	Lipoproteína asociada al peptidoglicano	D	D	D	ND	ND	D	D
	A7MXZ2	Factor de ensamblaje BamA	D	ND	ND	D	ND	D	1,64 ↑
	A7MTB2	Factor de ensamblaje BamD	D	ND	ND	ND	ND	D	D
	A7MV25	Proteína de membrana	D	D	D	D	ND	D	D
	A7MSA3	Proteína MreB	D	ND	ND	D	ND	D	D
Transporte	A7N5J5	Omp W	D	D	D	D	2,72 ↑	D	D
	A7MWN4	Porina de membrana externa	D	D	D	D	2,59 ↑	D	D
	A7N6H4	Porina de membrana externa	D	2,66 ↑	0,21 ↓	1,91 ↑	D	D	1,83 ↑
	A7N6I6	Porina OmpA-OmpF, familia OOP	D	D	D	D	1,84 ↑	D	D
	LAMB	Maltoporina	D	D	D	D	D	D	D
	A7N5R0	Proteína periplásmica operón maltosa	D	D	D	D	D	D	D
	A7MVF7	Sistema de transporte PTS específico de glucosa, subunidad IIBC	D	D	D	D	D	D	D
	A7MT41	Sistema de transporte PTS ácido N-acetilmurámico, subunidad IIBC	D	D	D	ND	ND	ND	ND
	A7N1T8	Proteína formadora de canales específicos de nucleósidos	D	D	D	D	ND	D	D
	A7N7A7	Proteína exportadora de tipo-lisina	D	D	D	D	D	ND	ND
A7MSR9	Receptor TonB-dependiente	D	D	D	D	D	D	6,66 ↑	

D proteína detectada; ND proteína no detectada; los valores de los ratios que indican el aumento (↑) o la disminución (↓) significativos ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de algunas proteínas. \* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

Tabla 10. Continuación.

GF	Acceso a UniProt *	Nombre de la proteína	Oscuridad					Radiación visible		
			P1	4°C			20°C		20°C	
				P2	P3	P2	P3	P2	P3	
Transporte	BTUB	Transportador BtuB de la vitamina B12	D	D	D	D	D	D	1,95 ↑	
	A7MZM8	Proteína de membrana externa, sistema de transporte de adhesinas	D	3,18 ↑	D	D	2,67 ↑	2,39 ↑	2,02 ↑	
	A7MW50	Proteína de membrana externa, sistema de transporte de adhesinas	D	D	D	D	D	D	D	
	A7MU52	Translocasa de proteínas, subunidad YajC	D	D	ND	D	2,24 ↑	D	D	
	A7MU53	Translocasa de proteínas, subunidad SecD	D	D	ND	D	ND	D	D	
	A7MU67	Proteína MshL	D	D	ND	D	D	D	1,84 ↑	
	A7MST9	Proteína GspG	D	ND	ND	D	ND	D	D	
	A7N710	Exportador de polisacáridos de membrana externa	D	ND	D	ND	ND	ND	D	
	A7N7N0	Simportador sodio/prolina	D	ND	ND	D	ND	D	D	
Bioenergética	ATPA1	ATP sintasa, subunidad alfa 1	D	D	D	D	D	D	D	
	ATPA2; ATPB1; ATPB2	ATP sintasa, subunidades alfa 2, beta 1 y 2	D	D	D	D	ND	D	D	
	ATPF1	ATP sintasa, subunidad b 1	D	D	0,49 ↓	D	D	D	0,43 ↓	
	A7N0Q1	Citocromo c oxidasa tipo cbb3, subunidad III	D	D	D	D	ND	D	D	
	A7N1I1	Citocromo BD oxidasa, subunidad I	D	D	D	D	D	ND	ND	
	A7N1I2	Citocromo BD oxidasa, subunidad II	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	A7MWL3	Ubiquinol citocromo c reductasa, subunidad hierro-azufre	D	1,77 ↑	D	D	ND	D	D	
	A7MWL5	Ubiquinol citocromo c reductasa, subunidad citocromo c1	D	D	D	D	ND	D	D	
	A7MWL4	Citocromo b	D	D	ND	D	ND	D	D	
	NQRA	Translocador de Na <sup>+</sup> NADH: ubiquinona reductasa, subunidad A	D	D	D	D	ND	D	0,42 ↓	

D proteína detectada; ND proteína no detectada; los valores de los ratios que indican el aumento (↑) o la disminución (↓) significativos ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de algunas proteínas. \* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

Tabla 10. Continuación.

GF	Acceso a UniProt *	Nombre de la proteína	Oscuridad					Radiación visible	
			P1	4°C		20°C		20°C	
				P2	P3	P2	P3	P2	P3
Bioenergética	A7N6X4	Translocador de Na <sup>+</sup> NADH: ubiquinona reductasa, subunidad B	D	ND	ND	D	ND	D	D
	NQRC	Translocador de Na <sup>+</sup> NADH: ubiquinona reductasa, subunidad C	D	ND	ND	D	ND	D	ND
	NQRF	Translocador de Na <sup>+</sup> NADH: ubiquinona reductasa, subunidad F	D	D	D	D	ND	D	D
	A7N542	NAD(P) transhidrogenasa, subunidad alfa	D	D	ND	D	ND	D	D
	A7N1D0	Quinona oxidoreductasa	D	D	D	D	ND	1,80 ↑	0,48 ↓
	A7MT34	Succinato deshidrogenasa, subunidad hierro-azufre	D	D	D	D	ND	D	D
Síntesis, degradación y recambio de proteínas	A7MT59	Proteasa	D	D	D	D	D	D	D
	A7MX87	Proteasa de membrana, subunidad HflC	D	D	ND	D	D	D	D
	A7MX88	Proteasa de membrana HflK	D	D	D	D	1,60 ↑	D	D
	A7MUV4	Zinc metaloproteasa FtsH ATP-dependiente	D	D	ND	D	ND	D	D
Transducción de señales	A7N3U3; A7N3F7; A7N3W8; A7N839; A7MX68; A7MRW7; A7MUA2; A7MZL8; A7N2H6; A7MV20; A7N1Z9; A7N839; A7MUA2; A7MVN5	Proteína quimiotáctica aceptora de metilos	D	ND	ND	ND	ND	D	ND
	A7N6F4; A7N349	Proteína quimiotáctica aceptora de metilos	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND

D proteína detectada; ND proteína no detectada; los valores de los ratios que indican el aumento (↑) o la disminución (↓) significativos ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de algunas proteínas. \* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

Tabla 10. Continuación.

GF	Acceso a UniProt *	Nombre de la proteína	Oscuridad					Radiación visible	
			P1	4°C		20°C		20°C	
				P2	P3	P2	P3	P2	P3
Respuesta al estrés	A7MT90	Peroxidasa	D	D	D	ND	ND	D	D
	A7MXB4	Bacterioferritina	ND	D	D	ND	ND	D	D
Otras	A7MS06	Flagelina	D	ND	ND	D	ND	ND	ND
	EFTU	Factor de elongación Tu (EF-Tu)	D	D	2,09 ↑	D	D	D	D
	A7MUX4	Factor de elongación G (EF-G)	D	D	D	D	ND	D	D
	EFTS	Factor de elongación Ts (EF-Ts)	D	D	D	D	ND	D	D

D proteína detectada; ND proteína no detectada; los valores de los ratios que indican el aumento (↑) o la disminución (↓) significativos ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de algunas proteínas. \* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

**Tabla 11.** Proteínas de las envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *E. coli* mantenidas en solución salina a 4°C y 20°C en condiciones de oscuridad. Se tomaron muestras del inicio de las experiencias (P1), durante el periodo de adaptación de las bacterias a las condiciones expuestas (P2), y cuando la población se encontraba mayoritariamente en estado VNC (P3).

GF	Acceso a UniProt *	Nombre de la proteína	4°C			20°C	
			P1	P2	P3	P2	P3
Estructural	SLP	Omp slp	D	D	D	D	D
	LPP	Lipoproteína de membrana externa Lpp	D	D	D	D	D
	SLYB	Lipoproteína de membrana externa SlyB	D	D	0,62 ↓	D	D
	YBJP	Lipoproteína YbjP (sin caracterizar)	D	D	D	D	D
	OSME	Lipoproteína E osmóticamente inducible	D	1,93 ↑	D	ND	ND
	PAL	Lipoproteína asociada al peptidoglicano	D	D	D	ND	ND
	DACC	Carboxipeptidasa DacC D-alanil-D-alanina	D	D	D	D	D
	YHCB	Proteína de la membrana interna YhcB	D	D	D	D	D
	YIDC	Insertasa de proteínas de membrana YidC	D	D	ND	D	ND
	YDGA	Proteína YdgA	D	D	D	D	D
	MREB	Proteína MreB	ND	D	D	D	D
Transporte	OMPA	Omp A	D	D	D	D	D
	OMPC	Omp C	D	D	D	D	D
	OMPW	Omp W	D	D	D	D	D
	OMPX	Omp X	D	D	D	D	D
	TOLC	Omp TolC	D	D	D	D	D
	METQ	Lipoproteína MetQ	D	D	D	D	D
	PTND	Permeasa de manosa, subunidad IID	D	D	D	D	D
	PTNAB	Sistema de transporte PTS específico de manosa, subunidad EIIAB	D	D	D	D	D
	PTW3C	Sistema de transporte PTS específico de N-acetilglucosamina, subunidad EIICBA	D	D	ND	D	D
	COPA	Exportador de cobre tipo P ATPasa A	D	D	D	D	D
	ACRA	Bomba de eflujo de múltiples fármacos, subunidad AcrA	D	D	D	D	D
MSC	Canal mecanosensitivo de gran conductancia	D	D	D	D	D	

D proteína detectada; ND proteína no detectada; los valores de los ratios que indican el aumento (↑) o la disminución (↓) significativos ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de algunas proteínas. \* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_ECOLI”.



Tabla 11. Continuación.

GF	Acceso a UniProt *	Nombre de la proteína	4°C			20°C	
			P1	P2	P3	P2	P3
Transporte	YHII	Proteína Yhii (sin caracterizar)	D	D	D	D	D
	SECD	Translocasa de proteínas, subunidad SecD	D	D	D	ND	ND
	DCUA	Transportador anaeróbico DcuA de C4-dicarboxilato	D	D	D	D	D
	GLPT	Transportador de glicerol-3-fosfato	D	D	D	D	D
Bioenergética	ATPA; ATPB; ATPL	ATP sintasa, subunidades alfa, beta y c	D	D	D	D	D
	NUOCD	NADH: quinona oxidoreductasa, subunidad C/D	D	D	ND	D	D
	CYDA; CYDB	Citocromo bd-I ubiquinol oxidasa, subunidades 1 y 2	D	D	D	D	D
	FRDB; FRDA	Fumarato reductasa, subunidades hierro-azufre y flavoproteína	D	D	D	D	D
	DHSB	Succinato deshidrogenasa, subunidad hierro-azufre	D	D	D	D	D
	NARG	Nitrato reductasa, cadena 1 alfa	D	D	D	D	D
Síntesis, degradación y recambio de proteínas	HFLK	Proteasa HflK	D	D	D	D	D
	HFLC	Proteasa HflC	D	D	D	D	D
	FTSH	Zinc metaloproteasa FtsH, ATP-dependiente	D	D	D	0,57 ↓	D
	YGEY	Proteína YgeY (peptidasa putativa)	ND	ND	D	D	D
Respuesta al estrés	USPF	Proteína de estrés universal F	ND	D	D	D	D
	BFR	Bacterioferritina	D	D	D	ND	ND
	ELAB	Proteína ElaB	D	D	D	D	D
Otras	EFTU1	Factor de elongación Tu 1	D	D	D	D	D
	MIND	Proteína MinD	D	D	D	D	D
	HEMY	Proteína HemY	D	D	ND	D	D
	QMCA	Proteína QmcA	D	D	D	ND	ND
	YQJD	Proteína YqjD (sin caracterizar)	D	D	D	D	D
	HEMX	Uroporfirinógeno-III C metiltransferasa (putativa)	D	D	D	D	D
	PPID	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa D	D	D	D	ND	ND

D proteína detectada; ND proteína no detectada; los valores de los ratios que indican el aumento (↑) o la disminución (↓) significativos ( $p < 0,05$ ) en la cantidad de algunas proteínas. \* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_ECOLI”.

# Discusión





## 1. Efecto de los factores ambientales en la supervivencia de *V. harveyi* y *E. coli*

Las bacterias, tanto autóctonas como alóctonas, en los ambientes naturales están constantemente expuestas a condiciones estresantes. En estos ambientes deben afrontar variaciones de temperatura, salinidad y radiación luminosa, ausencia o escasez de nutrientes, etc., condiciones frente a las que desarrollan distintas estrategias de supervivencia, siendo la inducción del estado VNC una de las respuestas al estrés más ampliamente estudiadas (Barcina y cols., 1997; Gauthier, 2000; Gong y cols., 2002; Abedi-Moghaddam y cols., 2004; Oliver, 2005; Coutard y cols., 2007; Sun y cols., 2008; Arana y cols., 2010).

Numerosos autores (Flint, 1987; Barcina y cols., 1989, 1990; Lim y Flint, 1989; Özkanca y Flint, 1996, 1997; Rozen y Belkin, 2001; Craig y cols., 2004; Sampson y cols., 2006; Silhan y cols., 2006; Arana y cols., 2007; Hernroth y cols., 2009) han demostrado que la exposición a temperaturas subóptimas en condiciones de ayuno o escasez de nutrientes de poblaciones de *E. coli*, bacteria copiotrofa, mesófila y alóctona a los ecosistemas acuáticos, induce un patrón de supervivencia caracterizado por el mantenimiento de la cultivabilidad a 4°C, probablemente debido a que responden a las bajas temperaturas disminuyendo su metabolismo (Koch, 1971; Arana y cols., 2010), y por la aparición de una fracción VNC en poblaciones incubadas a 20°C. Este patrón también se ha confirmado en este trabajo para la cepa CECT 416 (Figuras 2E y 2F) y cuando las condiciones de ayuno se prolongan, incluso hasta 270 días, aún sigue detectándose la presencia de una fracción de células cultivables (Orruño, 2009). En cuanto a la radiación solar, incluido el componente visible (400-700 nm) de la misma, se ha demostrado que tiene un efecto negativo sobre la supervivencia de esta bacteria (Pommepuy y cols., 1996; Muela y cols., 2000, 2002), que se manifiesta en una pérdida tanto de la cultivabilidad como de la viabilidad celular (Arana y cols., 2007). Este efecto se atribuye a la generación de especies reactivas de oxígeno (peróxidos, superóxidos, radicales hidroxilo y oxígeno singlete) como consecuencias de las

reacciones de fotooxidación (Arana y cols., 1992; Davies-Colley y cols., 1994; MacGregor y cols., 1998; Muela y cols., 2002).

En el caso de *Vibrio* spp., dada la enorme diversidad del género (Tarr y cols., 2007; Thompson y cols., 2009), se han indicado distintos tiempos y condiciones adversas que inducen el estado VNC, pero numerosos autores (Duncan y cols., 1994; Oliver y Bockian, 1995; Coutard y cols., 2007; Jia y cols., 2013) han destacado el efecto de las bajas temperaturas. En el presente estudio, la entrada en estado VNC para *V. harveyi* CECT 525, mantenida en agua de mar natural a 4°C empezó a detectarse en el cuarto día de incubación y, aproximadamente el 95 % de la población se encontraba en este estado tras 21 días (Figura 2A). En el caso de las experiencias realizadas a 20°C, la mayoría de células preservaron la viabilidad y cultivabilidad al menos durante los 12 primeros días del ensayo (Figura 2B). A partir de este tiempo, sin embargo, se produjo un descenso progresivo de la cultivabilidad con la aparición de células VNCs, que constituyeron la población mayoritaria tras 230 días (Figura 3). Estos resultados son coherentes con los obtenidos por otros autores, que han constatado que la entrada de especies de *Vibrio* en estado VNC a temperaturas cercanas a 20°C (Wolf y Oliver, 1992; Pruzzo y cols., 2003; Vattakaven y cols., 2006) o superiores (Duncan y cols., 1994) puede requerir periodos de tiempo largos. Chen y Chen (2014) describieron diferentes fases en el proceso de supervivencia de poblaciones de *V. vulnificus* sometidas a condiciones de ayuno en diferentes medios a 30°C. Las poblaciones experimentaban una rápida caída de la cultivabilidad en la primera semana, seguida de una ralentización en el proceso durante la segunda semana de exposición hasta alcanzar estabilidad y las poblaciones entraban en un periodo de lenta decadencia, en la que sobrevivían durante meses o años. A diferencia de lo encontrado por estos autores, en este trabajo el descenso de la cultivabilidad fue progresivo desde el inicio de las experiencias, y la población se estabilizó a partir de los 170 días, detectándose del orden de  $10^5$  UFC de *V. harveyi* CECT 525/ml, es decir, un 0,15 % de las bacterias permanecían cultivables.

La exposición continuada de poblaciones de *V. harveyi* a radiación visible, tras un periodo inicial caracterizado por el mantenimiento de la cultivabilidad, indujo la entrada en el estado VNC en *V. harveyi* (Figura 4). Esta bacteria mostró una mayor resistencia al efecto negativo de la luz visible con respecto a las dinámicas descritas tanto para la cepa de *E. coli* utilizada en este estudio (CECT 416) (Arana y cols., 2004, 2007) como para otras cepas de colección y ambientales (Arana y cols., 1992; Muela y cols., 1994, 2000). Wang y cols. (2013) demostraron que la piomelanina producida por *V. campbellii* en presencia de peróxido de hidrógeno confiere a esta bacteria resistencia al estrés oxidativo. Dada la estrecha relación entre *V. campbellii* y *V. harveyi*, no podemos descartar la posibilidad de que éste sea un mecanismo de control de las reacciones de fotooxidación provocadas por la luz visible. En cualquier caso, la presencia de éste u otros mecanismos de protección frente a los efectos deletéreos de la radiación visible es esperable en una bacteria como *V. harveyi*, habituada a este estrés en su entorno natural, y explicaría su mayor resistencia con respecto a bacterias alóctonas como *E. coli*, que no está expuesta a la radiación lumínica en su hábitat natural.

En su conjunto, los ensayos de supervivencia realizados en este trabajo ponen de manifiesto las diferencias en la respuesta al estrés de *V. harveyi* y *E. coli*. Incluso si obviamos las diferentes condiciones requeridas para inducir el estado VNC en ambas bacterias, observamos que los descensos en la cultivabilidad asociados a la aparición de poblaciones VNCs son más rápidos y de mayor magnitud en el caso de *V. harveyi* tanto a 4°C como a 20°C. *V. harveyi*, que por su origen se presupone mejor adaptada a las bajas temperaturas y a la escasez de nutrientes, desarrolla una respuesta aparentemente menos eficaz que la de *E. coli* en estas condiciones. Esto sugiere que la inducción del estado VNC en *V. harveyi* podría ser un proceso activo que favorezca su supervivencia en condiciones adversas, como discutiremos más adelante. En el caso de *E. coli*, la relación inversa entre la temperatura y su capacidad de permanecer cultivable parece indicar que, en condiciones de ayuno y oscuridad, esta bacteria intenta mantener su cultivabilidad en la medida en que la temperatura le permite

reducir su metabolismo. Por tanto, la entrada en el estado VNC no sería un proceso activo inducido por la exposición a condiciones desfavorables, y orientada a la perdurabilidad de la especie, sino el resultado directo de la pérdida de cultivabilidad.

Por otra parte, en estas experiencias de supervivencia la enumeración de células cultivables de *V. harveyi* se realizó simultáneamente en dos medios de cultivo: agar marino (AM) y agar tripton-soja (TSA). Aunque ambos medios mostraron una misma tendencia, los resultados obtenidos difirieron, rindiendo el medio AM valores superiores (aproximadamente 1 orden de magnitud) a los obtenidos en TSA en todos los ensayos realizados en oscuridad (Figuras 2A y 2B). Estos medios presentan dos diferencias fundamentales en su composición, la riqueza en nutrientes orgánicos (TSA > AM) y la concentración de sal (TSA < AM) (Anexo 2), que podrían justificar las diferencias en las enumeraciones (Leyton y Riquelme, 2008). Diversos autores (Ray, 1989; Mackey, 2000; Bogosian y Bourneuf, 2001; Pinto y cols., 2013) han indicado que las células dañadas por exposición a situaciones adversas son más sensibles a componentes de los medios de cultivo que normalmente no resultan inhibitorios para el crecimiento. Las diferencias entre las enumeraciones, detectables a medida que aumentaba el tiempo de exposición al estrés, podrían deberse a la aparición de una fracción de células de *V. harveyi* lesionadas. Cuando las células crecen sobre TSA, medio rico no selectivo, lo hacen a una tasa metabólica máxima que provocaría la formación de radicales libres intracelulares que, en células ya estresadas, podría causar daños celulares. Aunque el medio TSA se utiliza de forma rutinaria en muchos laboratorios para el crecimiento y el mantenimiento de diferentes especies de *Vibrio*, debe suplementarse con cloruro sódico (NaCl) hasta valores similares a los del agua de mar (Biosca y cols., 1996) y la CECT recomienda suplementar con NaCl al 3 % el medio utilizado para el crecimiento de nuestra cepa (*V. harveyi* CECT 525). Es posible que las células de *V. harveyi* experimenten lesiones a medida que aumenta el tiempo de permanencia en agua de mar a 4°C, de manera que las células sean más sensibles al exceso de nutrientes (formación de radicales libres) y menos eficaces en mantener la homeostasis en condiciones de salinidad no óptima, es decir, se produzca la aparición

de una pequeña fracción de células cultivables lesionadas. Un comportamiento similar, la formación de una fracción de células lesionadas, se demostró para poblaciones de *E. coli* CECT 416 mantenidas a 20°C en agua de río (Arana y cols., 1997). Sin embargo, en este caso, las enumeraciones en TSA fueron superiores a las obtenidas empleando un medio de cultivo selectivo mFC.

Estas diferencias entre medios de cultivo no se observaron en poblaciones expuestas a la radiación visible (Figura 4). La posible activación en *V. harveyi* de mecanismos de protección frente a las reacciones de fotooxidación en respuesta a la exposición a luz visible podría actuar neutralizando los radicales libres generados en el medio TSA de manera que, en estas condiciones, no se detecte una fracción de células cultivables lesionadas.

Retomando el análisis de la supervivencia de *E. coli* y *V. harveyi* en condiciones de ayuno, se ha determinado que durante este proceso se produce la liberación de moléculas al medio circundante. Arana y cols. (2004) y Seco (2004) demostraron que, durante el proceso de supervivencia de *E. coli*, se liberan moléculas orgánicas (proteínas, carbohidratos y aminoácidos) utilizadas como nutrientes por la fracción de bacterias cultivables superviviente. Al igual que ocurre en experiencias realizadas con poblaciones de *E. coli* (Reeve y cols., 1984; Arana y cols., 2004; Seco, 2004), hemos verificado la liberación de compuestos al medio circundante durante la exposición de poblaciones de *V. harveyi* a condiciones adversas (Tabla 8). Además, descartamos que el aumento en la concentración tanto de ADN como de proteína total durante la permanencia de *V. harveyi* en agua de mar natural a 4°C se deba a la lisis de una fracción de la población, ya que las bacterias mantuvieron tanto la viabilidad como la integridad celular.

A diferencia de lo observado para *E. coli* (Arana y cols., 2004), un aumento en la cantidad de proteínas en el medio circundante en las primeras 24 horas de exposición al estrés y posterior mantenimiento; para *V. harveyi* solo se detectó un aumento en la concentración proteica en sobrenadantes de 21 días. Además, la



permanencia de *V. harveyi* en agua de mar indujo un aumento progresivo en la concentración de ADN en el medio circundante, no detectado para *E. coli* (Arana y cols., 2004). Los compuestos liberados al medio permitieron un mayor crecimiento de poblaciones inoculadas en los sobrenadantes respecto a las inoculadas en agua de mar natural y retrasaron la pérdida de cultivabilidad de poblaciones en condiciones de supervivencia. Estos resultados sugieren que poblaciones de *V. harveyi* sometidas a estrés podrían, a largo plazo, liberar moléculas al medio que favorezcan la reparación de lesiones, el retraso en el deterioro celular y, por consiguiente, la supervivencia de la bacteria. Sin embargo, los sobrenadantes obtenidos en fases tempranas del estudio (3 días) no ejercen efecto positivo en las poblaciones resuspendidas en los mismos.

Estas moléculas liberadas al medio podrían contribuir a un hipotético proceso de resucitación de las células VNCs, bien directamente, por la presencia de factores que promuevan este proceso, o indirectamente, como fuente de nutrientes. Para *V. harveyi*, tras la adopción del estado VNC por efecto de la exposición a bajas temperaturas (4°C), la reversión de las condiciones adversas (incubación a 26°C) provoca un incremento en la población cultivable. La reversión desde célula VNC a célula cultivable, o resucitación, es un proceso discutido. Algunos estudios indican que determinadas bacterias no cultivables son incapaces de resucitar (Kolling y Matthews, 2001; Ziprin y cols., 2003), como es el caso de la cepa de *E. coli* utilizada en este trabajo (Arana y cols., 2007). Otros autores no descartan que el fenómeno sea atribuible al crecimiento de una pequeña subpoblación cultivable que falsee los resultados presentados como resucitación (Bogosian y cols., 1998; Bogosian y Bourneuf, 2001). Comprobamos que, en el caso de *V. harveyi*, la presencia de nutrientes y la exposición a la temperatura óptima de crecimiento favorecen tanto el crecimiento como la resucitación (Tabla 7), como ya habían indicado varios trabajos (Nilsson y cols., 1991; Weichart y cols., 1992; Whitesides y Oliver, 1997; Ramaiah y cols., 2002; Coutard y cols., 2007; Zhong y cols., 2009). Además, se requiere síntesis de proteínas *de novo* en ambos procesos, crecimiento y resucitación, si bien este último no implica la replicación del ADN tal y como se deduce de la combinación de

los resultados obtenidos tras la adición de rifampicina (inhibidor de la síntesis de proteínas), ausencia de crecimiento de células cultivables, y de ácido nalidíxico (inhibidor de la enzima ADN girasa), incremento de células cultivables sin aumento del número total de células.

Este proceso de resucitación no ha podido ser demostrado para la cepa de *E. coli* CECT 416 utilizada en este estudio, tras la inducción del estado VNC. Ni la reversión de las condiciones adversas, ni la prevención de estrés oxidativo provocan la resucitación de *E. coli* (Arana y cols., 2007; Orruño, 2009). Mediante el empleo de un protocolo similar para discernir crecimiento y resucitación, estos autores demostraron que la adición de nutrientes al medio de resucitación provoca únicamente el crecimiento de una fracción de células cultivables.

El análisis conjunto de los procesos de supervivencia y la posibilidad de resucitación de *V. harveyi* y *E. coli* parecen señalar que estas bacterias desarrollan estrategias de supervivencia distintas en condiciones de estrés. En el caso de *E. coli*, los factores ambientales adversos inducen el fenotipo VNC, y este fenotipo se ha sugerido que supone una respuesta altruista que permitiría el mantenimiento de una fracción cultivable hasta la llegada de condiciones más favorables (Arana y cols., 2004; Seco, 2004); sin embargo, esta adopción del estado VNC no supone una estrategia de supervivencia por sí misma, ya que no parece posible la reversión al estado cultivable. Por tanto, la estrategia de supervivencia de *E. coli* parece englobarse dentro del modelo *bust and boom* propuesto por Rittershaus y cols. (2013). Por contra, en el caso de *V. harveyi* aparentemente hay un control más activo de la inducción y reversión del estado VNC, lo que indicaría que esta estrategia de supervivencia está detrás de la perdurabilidad de esta bacteria en el medio natural. Sin embargo, *V. harveyi* también mantiene una pequeña población de células cultivables, incluso a largo plazo, que podrían contribuir a su persistencia. Por tanto, la estrategia de supervivencia de *V. harveyi* podría resultar de la combinación de la inducción del estado VNC y del modelo *bust and boom*.

En este trabajo también se analizaron los cambios en la morfología y el tamaño de *V. harveyi* a lo largo de las experiencias de supervivencia. Las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) corroboraron el mantenimiento de la integridad celular en poblaciones VNCs de *V. harveyi*, aunque se observó un aumento subjetivo de la rugosidad superficial de *V. harveyi* tras 21 días en supervivencia tanto a 4°C como a 20°C (Figura 9). Además, bajo todas las situaciones de estrés, *V. harveyi* experimentó una reducción significativa en su tamaño. Se ha sugerido que el proceso de reducción del tamaño celular puede ir acompañado por cambios en la superficie externa de la bacteria, como aparición de polímeros que forman conexiones para mejorar la adhesión (Jiang y Chai, 1996), desarrollo de apéndices para la interacción entre células (Kjelleberg y cols., 1987; Östling y cols., 1993), incremento de la rugosidad superficial (Kjelleberg y cols., 1993; Kondo y cols., 1994), y formación de vesículas de membrana (Mårdén y cols., 1985; Östling y cols., 1993; Jiang y Chai, 1996). Por el contrario, algunos investigadores han indicado que los supuestos cambios observados podrían tratarse de artefactos, exopolisacáridos deshidratados por el etanol durante la preparación de las muestras (Fraser y Gilmour, 1986; Ravenscroft y cols., 1991; Jiang y Chai, 1996).

Aunque no esté claro su origen o función, esta aparente rugosidad superficial podría ser paralela a o consecuencia de la reducción de tamaño que experimenta *V. harveyi* en condiciones de ayuno (Figura 8). Algunos autores (Kjelleberg y cols., 1982; Morita, 1990; Nyström y cols., 1990) indicaron que esta reducción del tamaño celular se debe al proceso de división reductiva y lo relacionaron con un incremento en las células totales observado para algunas especies de *Vibrio* spp. durante la inducción del estado VNC. Sin embargo, coincidiendo con los resultados presentados en este trabajo, también se ha comprobado el mantenimiento del número total de células acompañado de reducción del tamaño a lo largo del proceso de supervivencia bajo condiciones adversas (Marco-Noales y cols., 1999; Wong y Wang, 2004; Amel y cols., 2008). La reducción del tamaño celular se ha propuesto como una estrategia de supervivencia que permite minimizar los requerimientos del metabolismo de

mantenimiento e incrementa la toma de nutrientes al aumentar la relación superficie/volumen (Jiang y Chai, 1996; Biosca y cols., 1996). Diversos autores (Kjelleberg y cols., 1993; Chaiyanan y cols., 2001; Falcioni y cols., 2008; Sun y cols. 2008) sugirieron que la reducción del tamaño celular y la adquisición de una morfología cocoide en algunas especies de *Vibrio* sería un indicativo de la entrada en el estado VNC. Sin embargo, en este trabajo, la reducción del tamaño celular para *V. harveyi* no parece guardar relación con el fenotipo VNC. Nuestros resultados indican que la adquisición de la morfología cocoide en el género *Vibrio* podría representar una respuesta temprana específica frente a la escasez de nutrientes en el medio. En el caso de *E. coli*, nuestros resultados coinciden con los obtenidos en trabajos previos (Muela y cols., 1994; Orruño, 2009) y, a diferencia de la estrategia identificada para *Vibrio* spp., no detectamos variaciones en el tamaño celular que pudieran relacionarse con el estado VNC o la respuesta a la escasez de nutrientes.

En los sistemas acuáticos, las poblaciones bacterianas, además de responder a factores abióticos cambiantes, se interrelacionan con la microbiota natural, siendo la depredación bacteriana debida a protistas una de las principales responsables de su control en estos sistemas. Se ha indicado que los protistas depredadores regulan la abundancia bacteriana, la composición de las comunidades e influyen en el funcionamiento de los sistemas microbianos (Barcina y cols., 1992; Hahn y Höfle, 2001; Sherr y Sherr, 2002; Pernthaler, 2005; Alonso-Sáez y cols., 2009; Bell y cols., 2010; Saleem y cols., 2013).

El estudio de estas interacciones con poblaciones naturales requiere el empleo de herramientas que permitan distinguir fácilmente la población objeto de estudio del resto, en nuestro caso las poblaciones de *V. harveyi* CECT 525 se marcaron con la proteína fluorescente GFP. La inserción del plásmido portador del gen que codifica dicha proteína en *V. harveyi* CECT 525 no afectó a su crecimiento (Tabla 3) ni a su supervivencia en ausencia de poblaciones microbianas autóctonas (Figuras 2C y 2D). Además, la fluorescencia desarrollada se mantuvo durante al menos 21 días y permitió distinguir a esta bacteria de la comunidad bacteriana del agua de mar. Estos

resultados concuerdan con los obtenidos por diversos autores tanto para *V. harveyi* (Widanarni y cols., 2005; Travers y cols., 2008) así como otras especies, entre las que cabría destacar *V. parahaemolyticus* (Cabello y cols., 2005), *V. aestuarianus* (Aboubaker y cols., 2013) o *E. coli* (Arana y cols., 2003; Na y cols., 2006).

La mayoría de los protistas fagótrofos son consumidores muy selectivos capaces de reconocer el estado u otras características de sus presas potenciales (Hahn y Höfle, 2001; Jürgens y Matz, 2002). Así, son capaces de seleccionar sus presas en función de la densidad, del estado fisiológico, del tamaño o de las defensas del microorganismo presa, entre otros (Chrzanowski y Šimek, 1990; González y cols., 1990a; Jürgens y Matz, 2002; Arana y cols., 2003; Jürgens, 2006; Jouseet, 2012). Además, Sieburth y Davis (1982) y Soto y Bianchi (1988) indicaron que, en situaciones oligotróficas, el número de depredadores bacterívoros depende de la densidad de la presa. En nuestras experiencias, la densidad inicial de ambas poblaciones presa, bacterias del agua de mar y *V. harveyi gfp*, fue similar si bien el estado fisiológico difería, ya que *V. harveyi gfp* provenía de un cultivo de 24 horas en fase estacionaria, mientras que las comunidades bacterianas naturales, según Sherr y cols. (1999), están constituidas por bacterias que crecen activamente, por bacterias activas adaptadas al ayuno que muestran un crecimiento poco activo y por células *durmientes* (quiescentes). Asimismo, la enumeración de bacterias marinas utilizando medios de cultivo con abundantes nutrientes, no aporta información de la importancia de las bacterias no cultivables en dichos medios (por ejemplo, bacterias quimiolitotrofas) (Atlas y Bartha, 1998; Sogin y cols., 2006; Kennedy y cols., 2010). Es por ello que en este trabajo, ya desde el inicio de las experiencias, encontramos diferencias significativas entre las enumeraciones de bacterias totales y quimioorganotrofas cultivables del agua de mar (Figura 5); sin embargo, la población de *V. harveyi gfp* inoculada estaba constituida por > 99 % de células cultivables. Por otra parte, Jürgens y Matz (2002) indicaron que partículas de unos 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, tamaño que presentan la mayor parte de las bacterias planctónicas en los sistemas naturales, soportan una depredación entre 4 y 6 veces menor que partículas en el rango de 1  $\mu\text{m}$ . En nuestro caso, el tamaño celular

medio estimado para la población de *V. harveyi* al inicio de las experiencias fue de 1,639  $\mu\text{m}$ . En este trabajo encontramos, por tanto, diferencias en el estado fisiológico y en el tamaño celular de ambos grupos de bacterias, por lo que la respuesta depredadora podría estar orientada a la selección de *V. harveyi gfp*. Una vez que la población de *V. harveyi gfp* disminuye drásticamente, la población de bacterias naturales volvería a ser sujeto de la actividad depredadora por parte de los protozoos.

El efecto de la temperatura en la permanencia de *V. harveyi* en presencia de la microbiota del agua de mar fue inverso al observado en ausencia de población natural (Figura 5). Esto puede ser debido a que el descenso de la temperatura reduce el impacto depredador/consumidor de los protistas sobre las presas (Beveridge y cols., 2010a) y/o a que la viscosidad de los fluidos incrementa a bajas temperaturas y afecta a la velocidad de natación, reduciendo las tasas de alimentación (Beveridge y cols., 2010b, 2010c).

En los medios acuáticos naturales, tanto de agua dulce como salada, se ha demostrado que la población de *E. coli* se reduce rápidamente por efecto de la depredación (González y cols., 1990b, 1992). Además, en la medida en que es una bacteria alóctona a estos sistemas no parece tener ningún mecanismo, como la reducción de tamaño, que la proteja de la depredación por parte de protistas, por tanto, será una presa preferente, lo que limita su supervivencia a largo plazo en entornos acuáticos naturales. Por el contrario, en condiciones de escasez de nutrientes en que *V. harveyi* no puede dividirse activamente, la reducción de tamaño podría proteger a la población de la depredación.

## 2. Análisis proteómico de las envueltas celulares de *V. harveyi* y *E. coli*

Las diferencias mencionadas al respecto de las estrategias de supervivencia de *V. harveyi* y *E. coli* se manifiestan también a nivel molecular. En primer lugar, para *V. harveyi* se detectó un descenso en la concentración de proteína de envueltas celulares/célula, mientras que en el caso de *E. coli*, la concentración de proteína incrementó en los dos casos estudiados a medida que aumentaba el tiempo de permanencia en solución salina (Tabla 9). Diversos autores han indicado que células VNCs de *E. coli*, *Enterococcus faecalis* o *V. parahaemolyticus* sintetizan (Rahman y cols., 1994; Heim y cols., 2002; Lai y cols., 2009; Pinto y cols., 2013) e incluso sobreexpresan (Weber y cols., 2006) determinadas proteínas para hacer frente a diferentes condiciones de estrés. Por ejemplo, en *E. coli* se sobreexpresan proteínas como la OmsY y la OmsC, ambas reguladas por el factor RpoS ( $\sigma^5$ ) y la proteína Dps de tipo ferritina, en condiciones de estrés osmótico (Weber y cols., 2006). Por su parte, la estrategia de *V. harveyi* parece ajustarse a la reducción del gasto energético y posiblemente a la reutilización de su contenido macromolecular (Nyström y cols., 1988; Wai y cols., 1999).

La comparación de los geles 2-D obtenidos para los extractos proteicos recogidos una vez establecidas las condiciones que inducen la entrada en el estado VNC para *V. harveyi* (escasez de nutrientes, 4°C) y *E. coli* (ayuno, 20°C) (Figura 2), aparte de los cambios en la concentración de proteínas, resalta de nuevo diferencias para ambos microorganismos (Figuras 11 y 12). Estas diferencias son patentes ya desde el momento inicial del estudio. Así, y coincidiendo con otros autores (Kiraga y cols., 2007; Bermúdez-Crespo y cols., 2012; Zhao y cols., 2012), detectamos un predominio de proteínas con puntos isoeléctricos (pI) más bajos para *V. harveyi* (Figura 11) respecto a los valores obtenidos para *E. coli* (Figura 12). Además, los pesos moleculares (Pm) de la mayoría de las proteínas detectadas en los geles de *V. harveyi* fueron inferiores a 50 kDa. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kao y

cols. (2009) y Shen y cols. (2009) para *V. anguillarum* y *V. parahaemolyticus*, respectivamente. La diferencia en el pI de las proteínas de estas bacterias puede justificarse por su origen, ya que los proteomas de bacterias halófilas y mesohalófilas, como sería el caso de *V. harveyi*, presentan proteínas más ácidas que los proteomas de las no halófilas, lo que es atribuible a la mayor estabilidad y solubilidad de las proteínas ricas en residuos ácidos en ambientes salinos (Kiraga y cols., 2007)

Antes de discutir los resultados obtenidos en este trabajo utilizando espectrometría de masas debemos indicar que esta técnica de análisis proteico presenta limitaciones entre las que se incluye la baja reproducibilidad. En este trabajo, esta limitación quedó reflejada en la variabilidad de los resultados obtenidos para algunas de las proteínas detectadas (Apartado 5.5. de Materiales y Métodos) que llevó a descartar para su análisis un gran número de las mismas. Además, no podemos obviar el hecho, puesto de manifiesto por diversos autores (Chart y cols., 1996; Moser y cols., 1997; Molloy y cols., 2000, 2001; Xu y cols., 2004), de que el proceso de extracción proteica, aunque diseñado para la extracción específica de proteínas de las envueltas celulares, no previene la recogida de proteínas de otras localizaciones celulares. Coincidiendo con estos trabajos, y utilizando el programa *PSORTb v 3.0.2* (Yu y cols., 2010) que predice la localización subcelular de las proteínas bacterianas, en nuestro caso verificamos la extracción de proteínas citoplasmáticas tanto para poblaciones de *V. harveyi* como de *E. coli*. Sin embargo, consideramos que parte de estas proteínas pueden formar parte de complejos proteicos asociados a la membrana y, así lo reconocen implícitamente la base *UniProt* que, para la mayoría de estos casos, las asigna o relaciona con las membranas. Este es el caso de la proteína ATPA1\_VIBHB (ATP sintasa, subunidad alfa 1). Además, otras proteínas pueden relacionarse temporalmente con las membranas celulares, como discutiremos más adelante para el caso de MreB y EF-TU o establecer una relación funcional temporal. Este último caso correspondería, por ejemplo, a ribosomas implicados en la síntesis de proteínas destinadas a ser exportadas a la membrana externa o secretadas al espacio periplásmico y, por tanto, temporalmente estarían ligados a membrana tras el



reconocimiento de la secuencia señal (Randall y Hardy, 1977; Etémadi, 1989; Fekkes y Driessen, 1999; Herskovits y Bibi, 2000; Prinz y cols., 2000).

Teniendo en cuenta estas consideraciones, a lo largo de este trabajo, se analizaron aquellas proteínas localizadas en las envueltas celulares, integrantes de un complejo con proteínas transmembrana o cuya función se relacionaba con la misma.

La comparación de los subproteomas de *V. harveyi* y *E. coli* pone de manifiesto la estabilidad del perfil proteico obtenido para esta última bacteria. Aproximadamente el 75 % de las proteínas consideradas para *E. coli* se detectaron en todos los puntos analizados (Tabla 11), los escasos cambios se deben a proteínas que no se detectan en las poblaciones VNCs, y a la aparición de 3 proteínas en condiciones de estrés. En el caso de *V. harveyi*, en condiciones de escasez de nutrientes en oscuridad, solo un 29 % de las proteínas estudiadas se detectó en todos los puntos analizados (Tabla 10). Estos resultados parecen estar relacionados con las diferentes respuestas al estrés que presentan las dos bacterias estudiadas, como ya se ha comentado anteriormente.

Los cambios observados en el perfil proteico de *V. harveyi*, exceptuando la aparición de la bacterioferritina en condiciones de estrés, se debe a la no detección de proteínas en poblaciones expuestas a escasez de nutrientes y, especialmente, en poblaciones VNCs. Las proteínas quimiotácticas desaparecieron rápidamente ya durante la fase de adaptación aunque las poblaciones permanecían cultivables, mientras que lipoproteínas, porinas y proteasas fueron los grupos de proteínas más estables. Como era de esperar los cambios más relevantes fueron los observados en las experiencias de larga duración.

La mayoría de los estudios acerca de la variación del proteoma por efecto del estrés se centran en periodos de exposición relativamente cortos, desde horas o días (Amy y Morita, 1983; Nyström y cols., 1988; 1992) a 1-3 meses (Hood y cols., 1986; Johnstone y Jones, 1988). Sin embargo, no encontramos trabajos que analicen la evolución del proteoma (y aún menos subproteoma de membrana) en poblaciones mantenidas bajo condiciones de estrés durante periodos de tiempo tan largos como el

presentado en este trabajo para *V. harveyi*. En el caso de *V. harveyi* mantenida en agua de mar durante 230 días a 20°C (experiencias de larga duración) los perfiles proteicos obtenidos presentaron algunas particularidades; así junto con la no detección de más del 60 % de las proteínas iniciales, detectamos la sobreexpresión de determinadas proteínas en condiciones de escasez de nutrientes prolongadas. La mayor parte de las proteínas implicadas en la bioenergética celular dejaron de detectarse (Tabla 10), probablemente debido a limitaciones del método de espectrometría de masas para detectar proteínas en bajas concentraciones. Por otro lado, la sobreexpresión que se observa en algunas proteínas podría, de algún modo, compensar la pérdida de otras y así mantener la viabilidad celular, o ser consecuencia de la normalización de las cuantificaciones, que implica que la detección de un menor número de proteínas de lugar a un aumento relativo de la expresión del resto.

En las experiencias de larga duración (230 días) realizadas con poblaciones de *V. harveyi*, la no detección de proteínas presentes en el resto de condiciones como la proteína formadora de canales específico de nucleósidos (A7N1T8\_VIBHB), las subunidades alfa 2, beta 1 y 2 de la ATP sintasa, la subunidad III del citocromo c oxidasa tipo cbb3, las subunidades hierro-azufre y citocromo c1 de la ubiquinol citocromo c reductasa, las subunidades A y F de la NADH:ubiquinona oxidoreductasa o la subunidad hierro-azufre de la succinato deshidrogenasa parecen corroborar la estrategia de *V. harveyi* de reducción del gasto energético previamente discutida y la sobreexpresión de la lipoproteína A7MYB0\_VIBHB, de las porinas Omp W, A7MWN4\_VIBHB y OmpA-OmpF de la familia OOP y, fundamentalmente, de la proteasa de membrana HflK serían un indicativo de procesos de mantenimiento y reparación de la estructura celular bajo condiciones adversas (Langer, 2000).

A pesar de las diferencias observadas para ambos microorganismos, a lo largo de la permanencia bajo condiciones de estrés durante al menos 21 días se detectaron proteínas con funciones similares; componentes estructurales de la envuelta celular o con una función esencial en el transporte o implicadas en procesos bioenergéticos (Tablas 10 y 11).

La conservación de diversas lipoproteínas (A7N6D3\_VIBHB, A7MYB0\_VIBHB o A7N1S9\_VIBHB, en el caso de *V. harveyi* o LPP\_ECOLI, SLYB\_ECOLI, YBJP\_ECOLI, para *E. coli*) se corresponde con el mantenimiento de la integridad celular reflejado por la constancia del número total de células a lo largo de la supervivencia. Además, otras proteínas de membrana externa como las porinas OmpW y OmpA, también presentan una función adicional de mantenimiento de la integridad de la membrana externa (Sonntag y cols., 1978; Koebnik y cols., 2000; Asakura y cols., 2008), y se ha resaltado la importancia de la proteína OmpW en este proceso durante la exposición a estrés oxidativo (Asakura y cols., 2008) y osmótico (Xu y cols., 2004; Wu y cols., 2006).

Para *V. harveyi* se encontraron cambios importantes en algunas proteínas que intervienen en el ensamblaje y el mantenimiento de la envuelta celular. Entre ellas cabría destacar dos proteínas pertenecientes al complejo Bam de la membrana externa (los factores de ensamblaje BamA y BamD) y las subunidades YajC y SecD de la translocasa de proteínas, y para *E. coli* la insertasa de proteínas de membrana YidC. El complejo Bam se encarga del ensamblaje de las proteínas de la membrana externa en bacterias gram negativas (Volokhina y cols., 2013), siendo la proteína BamA el componente principal, esencial y bien conservado. En *E. coli* se ha comprobado, además, que hay cuatro lipoproteínas asociadas a BamA, denominadas BamB, BamC, BamD y BamE (Wu y cols., 2005; Sklar y cols., 2007; Volokhina y cols., 2013). Para *V. harveyi*, la ausencia de la proteína BamA a partir del tercer día en supervivencia a 4°C y a los 230 días a 20°C, en oscuridad, podría ser indicativo de la reducción de producción y/o ensamblaje activo de proteínas en la membrana externa. Volokhina y cols. (2013) indicaron que el cese de actividad de la proteína BamA promueve la acumulación de proteínas de membrana externa que no son capaces de insertarse en la misma. Esta acumulación podría ser letal para la bacteria por su aglomeración en forma de agregados en el espacio periplásmico. Además, el retraso en la cinética de ensamblaje de las proteínas de membrana externa puede llevar a la incorporación espontánea de estas proteínas en la membrana interna, lo que desacoplaría la fuerza protón-motriz (Gessmann y cols., 2014). Sin embargo, en este trabajo no se produjo

muerte celular ni cese en la síntesis de proteínas de membrana externa. Es más, como ya se ha discutido, proteínas de *V. harveyi* relacionadas con el transporte como OmpW, porinas de membrana externa y alguna lipoproteína aumentaron su expresión en condiciones de ayuno severo (230 días) a pesar de no detectarse proteínas del complejo Bam, lo que parece indicar que este complejo siga funcionando aunque la concentración de las proteínas que lo conforman haya disminuido a niveles no detectables.

Otro complejo proteico relacionado con el ensamblaje de proteínas de la membrana externa es el sistema de secreción denominado Sec, el complejo SecDFYajC es el encargado del mantenimiento de la fuerza protón motriz necesaria para la translocación de proteínas a través de la membrana interna por el subcomplejo SecYEG (Beckwith, 2013). Las subunidades YajC y SecD de este complejo parecen jugar un papel importante pero no esencial durante la translocación de proteínas de membrana externa a través de la membrana interna, donde se localizan (Silhavy y cols., 2010). Por ello, su ausencia tras la permanencia de *V. harveyi* en agua de mar durante 21 días no afectaría a la supervivencia de la bacteria, pero sí parece indicativa de una reducción de este proceso de translocación de proteínas. Por el contrario, la insertasa de proteínas de membrana YidC de *E. coli* sí juega un papel importante en el ensamblaje de proteínas de membrana relacionadas con la transducción de energía, como la subunidad c de la ATPasa (Silhavy y cols., 2010). En este trabajo es una de las pocas proteínas que no se cuantificó tras 21 días de permanencia de *E. coli* en ayuno. Sin embargo, en esta bacteria todas las subunidades de ATPasa analizadas se detectaron a lo largo de todo el experimento, pudiendo, por tanto, esta no detección atribuirse a las limitaciones del método.

En este contexto debe destacarse el mantenimiento en la expresión de diversas proteasas implicadas en el control de la calidad de las proteínas integrales de membrana: las proteasas A7MT59\_VIBHB y HflK en el caso de *V. harveyi* y las proteasas HflC, HflK y FtsH en el caso de *E. coli*. Estas proteínas colaboran en la estabilidad celular degradando proteínas dañadas o innecesarias para la célula que

podrían inhabilitar determinadas funciones de la propia membrana (Ito y Akiyama, 2005; Narberhaus y cols., 2009). Por ejemplo, debido a que los movimientos de la mayoría de proteínas de membrana se restringen al plano bidimensional de la bicapa lipídica, la presencia de proteínas anómalas puede resultar fácilmente en un colapso de la permeabilidad, uno de los requisitos fundamentales de las membranas biológicas (Ito y Akiyama, 2005).

En el caso de la metaloproteasa FtsH ATP-dependiente se encontraron respuestas diferentes para ambas bacterias analizadas. En *E. coli* esta proteína se mantuvo a lo largo de todo el estudio, mientras que en *V. harveyi* dejó de detectarse en poblaciones VNCs. La proteasa FtsH ATP-dependiente es una proteasa activa por sí misma, que *in vivo* forma un complejo con el heterodímero HflKC, modulador de FtsH, anclado a la membrana y expuesto hacia el periplasma (Kihara y cols., 1996, 1998; Schumann, 1999).

A lo largo de la supervivencia bajo condiciones adversas destaca la conservación de proteínas implicadas en procesos de transporte transmembrana, entre ellas varias porinas como la porina OmpA-OmpF en *V. harveyi*, las porinas OmpA, OmpC y OmpX en *E. coli* y OmpW en ambas bacterias. Xu y cols. (2004) encontraron una relación estrecha de las proteínas OmpW y OmpV con el intercambio entre *V. parahaemolyticus* y el medio circundante, si bien, no se ha establecido la función exacta de la OmpW durante la supervivencia. Para *E. coli*, la influencia de la osmolaridad en la regulación de la expresión de las proteínas OmpC y OmpF ha sido ampliamente estudiada y se ha indicado que estas proteínas forman canales en la membrana externa que permiten la difusión pasiva de pequeñas moléculas hidrofílicas con un tamaño inferior a 650 Da (Cai e Inouye, 2002; Xu y cols., 2004).

La estabilidad de determinadas proteínas implicadas en la conservación de la energía (subunidades de ATP sintasa, subunidades de citocromos u otros componentes de la cadena de transporte de electrones) en ambas bacterias (Tablas 10 y 11) sería indicativa del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones

y de un metabolismo energético activo a pesar de las condiciones de escasez o ausencia de nutrientes imperantes. El mantenimiento de una cadena de transporte de electrones funcional es coherente con ciertas características de las bacterias en estado VNC. Diversos autores (Baffone y cols., 2003; Chaiyanan y cols., 2001; Falcioni y cols., 2008) han demostrado el funcionamiento de las cadenas de transporte de electrones en bacterias VNCs mediante el análisis de la capacidad de reducir intracelularmente cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (CTC). Algunos autores han indicado que las tasas de respiración de bacterias sometidas a ayuno disminuyen hasta niveles casi indetectables y, sin embargo, retienen la capacidad de metabolizar sustratos rápidamente con el fin de dar una rápida respuesta a cambios ambientales e iniciar el proceso de resucitación (Nilsson y cols., 1991; Özkanca y Flint, 1997). Estos resultados concuerdan con el mantenimiento de diversas porinas y proteínas implicadas en el transporte de, por ejemplo, maltosa (LAMB\_VIBHB, A7N5R0\_VIBHB) o glucosa (A7MVF7\_VIBHB), la capacidad de resucitar previamente discutida para *V. harveyi* y la demostración de que es un proceso que requiere síntesis de proteínas, por tanto, energéticamente costoso. Trabajos previos (Arana y cols., 2007), en los que se desarrolló un completo protocolo para promover la resucitación, demostraron que *E. coli* CECT 416 no es susceptible de experimentar resucitación, si bien el hecho de que las células VNCs fueran capaces de perdurar proporcionaba los recursos necesarios para la supervivencia de la fracción cultivable y, por tanto, la permanencia de la especie en el ambiente (Arana y cols., 2004).

A pesar de las evidencias en el mantenimiento de la actividad respiratoria, para *V. harveyi* destacó la pérdida de las subunidades B y C del complejo NADH: ubiquinona reductasa. A través de este complejo es extruído el sodio de las bacterias siendo capaces de generar una fuerza sodio-motriz, que se acopla a su vez a la toma activa de nutrientes y a la rotación del flagelo polar. El sodio es esencial para el crecimiento óptimo de las bacterias marinas (Unemoto, 2000). En nuestro trabajo, la no detección de este complejo coincidió con el inicio de la pérdida de cultivabilidad en los medios

de cultivos empleados, TSA y AM, más acusado en el primero y que posee una concentración de sales menor.

EF-Tu (EFTU\_VIBHB y EFTU1\_ECOLI) ha sido descrito previamente como una chaperona citoplasmática implicada en la síntesis proteica, regulación del crecimiento celular y respuesta al estrés (Yu y cols., 1986; Caldas y cols., 1998). Muela y cols. (2008) demostraron que esta proteína alcanzaba la expresión máxima y se asociaba a la membrana durante la inanición en poblaciones de *E. coli*. Sin embargo, para *Vibrio* spp. los resultados encontrados en la bibliografía son contradictorios. Así, Lai y cols. (2009) indicaron que el gen que codifica para el EF-Tu estaba regulado positivamente en poblaciones de *V. parahaemolyticus* ST550 en estado VNC, mientras que Jia y cols. (2013) encontraron que esta proteína estaba negativamente regulada en células de *V. harveyi* SF1 en estado VNC. En ambos casos, la entrada en estado VNC se produjo tras la incubación a 4°C en agua de mar artificial. En este trabajo EF-Tu en el caso de *V. harveyi* se detectó desde el inicio hasta el final de la incubación en todas las condiciones estudiadas, aunque su concentración y asociación con la membrana alcanzaron valores máximos al final de las experiencias a 4°C. Igualmente, el mantenimiento del resto de factores de elongación detectados para *V. harveyi* (EF-G y EF-Ts), que también participan en la elongación de las cadenas peptídicas durante la síntesis proteica (Kaziro, 1978; Blank y cols., 1995), podría ser indicativo de que la síntesis de proteínas se mantuvo activa por lo menos hasta los 21 días de supervivencia en agua de mar.

Una proteína bien caracterizada en las bacterias es la proteína MreB, responsable de controlar la forma bacilar. Esta proteína se ensambla en filamentos helicoidales bajo la membrana celular bacteriana y participa en la polaridad celular, segregación de los cromosomas y la esporulación (Shih y Rothfield, 2006; Chen y cols., 2009). Los análisis de las secuencias predicen que se trata de una proteína citoplasmática, sin embargo, hay evidencias que muestran la asociación de esta proteína con la membrana (Wachi y cols., 1989; Figge y cols., 2004; Mazza y cols., 2006). Chiu y cols. (2008) demostraron que la proteína MreB se encontraba muy

próxima a la membrana durante la permanencia de *V. parahamolyticus* en ayuno y localizada en diferentes focos entorno de la membrana citoplasmática cuando la bacteria había adoptado el estado VNC. A bajas temperaturas esta proteína MreB formaba agregados localizados periféricamente, y probablemente exhibían una elevada tendencia a unirse a la membrana citoplasmática. Además, estos autores relacionaron el inicio de la reducción del tamaño de *V. parahaemolyticus* con un aumento en la expresión del gen *mreB*. En este trabajo, la detección de MreB en *V. harveyi* varió dependiendo de las condiciones de estudio. Así, a 4°C la proteína dejó de detectarse, mientras que a 20°C no varió su concentración, excepto a los 230 días y se mantuvo constante bajo radiación visible. Por tanto, se encontró una relación variable entre la expresión de la proteína MreB y la reducción del tamaño de *V. harveyi*, mientras que pareció establecerse una relación directa entre el mantenimiento de la concentración de la proteína MreB y el tamaño celular en *E. coli*. Kruse y cols. (2003) demostraron que la disminución de la proteína MreB en *E. coli* daba lugar a células esféricas que continuaban con su ciclo celular hasta que finalmente se lisaban. En este estudio, esta proteína no solo se mantiene sino que pasa de no detectarse en el inóculo a estar presente en todas las situaciones de ayuno, lo que puede relacionarse con el mantenimiento del tamaño en esta bacteria.

Defeu y cols. (2015) encontraron una interacción entre las proteínas MreB y EF-Tu en *E. coli* y *B. subtilis* y sugirieron que EF-Tu podría influir en la morfología celular mediante la interacción con la proteína MreB. EF-Tu mejoraría la capacidad de MreB para formar filamentos y las estructuras de EF-Tu bajo la membrana celular podían servir como una pista para estos filamentos de MreB. En este trabajo, esta interacción es factible en el caso de *E. coli*, ya que ambas proteínas se detectan de forma constante; sin embargo, no hemos podido establecer relación similar entre ambas proteínas en el caso de *V. harveyi* ya que, por ejemplo la proteína MreB dejó de detectarse a 4°C, coincidiendo con el aumento en la expresión de EF-Tu.

Las proteínas quimiotácticasceptoras de metilos participan en la quimiotaxis (Ferris y cols., 2014). Las señales se tramiten a través de toda una cascada de



metilaciones, fosforilaciones y cambios conformacionales, desde las proteínas quimiotácticas aceptores de metilos hasta el cuerpo basal del flagelo, que se traducen finalmente en un cambio en la rotación del mismo (Karatan y cols., 2001; Alexandre y Zhulin, 2003) y resultan en la atracción o repulsión de la bacteria por el estímulo. El número de proteínas quimiotácticasceptoras de metilos es variable según la especie bacteriana a la que nos refiramos (Borziak y cols., 2013) y, a pesar de que en *E. coli* se han caracterizado varias de estas proteínas (Alexandre y Zhulin, 2003), en este trabajo no se detectaron como tampoco componentes del flagelo. Para *V. harveyi*, observamos un cese casi simultáneo en la detección de las proteínas quimiotácticasceptoras de metilos y de la flagelina. Chen y Chen (2014) demostraron que, en condiciones de escasez de nutrientes, la motilidad de *V. vulnificus* disminuía con el tiempo. Los resultados obtenidos en este trabajo también indican la pérdida y/o reducción de movilidad. La pérdida de este tipo de proteínas (tanto proteínas quimiotácticasceptoras de metilos como componentes del flagelo) podría ser una estrategia de las bacterias adaptadas a ambientes en los que la escasez de nutrientes es habitual, aunque reversible, como puede ocurrir en ambientes marinos (Mitchell y cols., 1995; Stretton y cols., 1997). Este hecho supondría para las células un ahorro energético (adicional al de la reducción del tamaño), ya que la fuerza sodio-motriz utilizada para potenciar la rotación del flagelo (Häse y Barquera, 2001) se emplearía en procesos celulares más rentables en condiciones de supervivencia. Por otra parte, esta pérdida de la respuesta a estímulos y del movimiento se correlaciona con el mantenimiento de la proteína de membrana externa A7MW50\_VIBHB y el incremento de la expresión de A7MZM8\_VIBHB, ambas sistemas de transporte de adhesinas, a medida que aumenta el tiempo de exposición. Estos resultados coinciden con los descritos por otros autores para poblaciones de *Vibrio* spp. (Dawson y cols., 1981; Wai y cols., 1999; Lutz y cols., 2013), quienes relacionan la pérdida de la movilidad y el incremento en la capacidad de adhesión con la capacidad para sobrevivir de este microorganismo en condiciones de escasez de nutrientes.

La concentración de hierro en la superficie del agua en zonas de mar abierto es muy baja (Johnson y cols., 1997). En este ambiente, las bacterias se encuentran bajo condiciones limitante de hierro, lo que da lugar a una regulación negativa de genes que codifican proteínas relacionadas con el uso y almacenamiento de hierro, y a sobreexpresar proteínas implicadas en la adquisición del mismo (Mey y cols., 2005; Alice y cols., 2008; Thode y cols., 2015). Los resultados obtenidos para *V. harveyi* mostraron que la proteína bacterioferritina, indetectable al inicio de los experimentos, se expresó en oscuridad a 4°C y bajo condiciones de iluminación. En trabajos previos, Montánchez y cols. (2014) y Kaberdin y cols. (2015) demostraron una fuerte regulación positiva de los genes que codifican ferredoxinas asociadas a la bacterioferritina y proteínas transportadoras de hierro durante las 12 primeras horas de incubación de *V. harveyi* ATCC 14126 en agua de mar natural a 4°C y 20°C. Estos resultados indicaron que la adaptación y supervivencia de *V. harveyi* en microcosmos de agua de mar están ligadas, entre otros, a la homeostasis del hierro.

En el caso de poblaciones de *E. coli* a 20°C, la proteína bacterioferritina no se detectó en poblaciones que adoptaban el estado VNC, incluso en periodos previos a la entrada en dicho estado. En el caso de esta bacteria este resultado parece estar relacionado con la posible ralentización del metabolismo ya discutida.

Cuando se analizaron los cambios en el proteoma de *V. harveyi* en respuesta a la radiación visible en condiciones de ayuno, sorprendentemente y a pesar de que estas condiciones eran *a priori* más estresantes, los cambios en el perfil proteico de las envueltas celulares fueron menores que en condiciones de oscuridad. La respuesta se caracterizó por la estabilidad general de las proteínas analizadas, especialmente aquellas con función estructural, que conservaron en su totalidad. Además, algunas proteínas que desaparecieron rápidamente en oscuridad se detectaron, e incluso aumentaron su expresión, tras 21 días con iluminación. Entre ellas, los factores de ensamblaje Bam, cuya función se ha comentado anteriormente, o la proteína GspG, que forma parte del sistema de secreción tipo II. La pseudopilina GspG es el componente mayoritario de una estructura en forma de *pilus* de este sistema de

secreción. La sobreexpresión de la proteína GspG, que usa el sistema de translocación Sec para insertarse en la membrana interna, genera el ensamblaje de largos *pseudopili* que podrían actuar como un pistón que empujara a las proteínas a secretarse a través del poro en la membrana externa (Korotkov y cols., 2013). La detección de esta proteína, por tanto, puede ser indicativo de que, en estas condiciones, se produce una secreción activa de proteínas al medio.

Como se ha comentado con anterioridad, el transporte de hierro parece tener cierta importancia durante la supervivencia de *V. harveyi*. El hierro es un elemento celular importante ya que es capaz de aceptar y donar electrones fácilmente en las reacciones redox celulares, por lo que se encuentra en muchos de los componentes de los complejos enzimáticos. Sin embargo, el hierro también puede causar daño celular catalizando la conversión del superóxido y el peróxido de hidrógeno a radicales libres, que pueden dañar la membrana celular, lípidos, proteínas y ADN (Andrews, 1998; Bou-Abdallah y cols., 2013). Chen y Morse (1999) demostraron que la bacterioferritina está implicada en el almacenamiento de hierro y ofrece protección frente a estrés oxidativo en *Neisseria gonorrhoeae*, y Figueiredo y cols. (2012) determinaron que la bacterioferritina protegía a *Desulfovibrio vulgaris* frente al oxígeno. La detección de esta proteína, junto con la peroxidasa, en condiciones de iluminación a 20°C podría deberse a que ejerza un papel antioxidante en respuesta a estrés oxidativo (Andrews, 1998; Bou-Abdallah y cols., 2013).

Entre las pocas proteínas que dejan de detectarse en estas condiciones, el grupo más numeroso es el de las proteínas quimiotácticas, aunque en presencia de luz se mantienen en su mayoría durante al menos 6 días. La pérdida de estas proteínas, junto con la flagelina, se puede relacionar con una limitación en la expresión de aquellas proteínas no necesarias para la supervivencia, como se ha discutido previamente.

El conjunto de los resultados presentados en este apartado corrobora que ambas bacterias desarrollan diferentes estrategias bajo situaciones de estrés. *E. coli*

muestra una gran estabilidad del subproteoma de las envueltas celulares con apenas cambios que permitan hacer frente al estrés, mientras que *V. harveyi* experimenta modificaciones del subproteoma orientadas en gran medida a compensar las deficiencias del sistema en el que se encuentra, principalmente la escasez de nutrientes. Por tanto, los cambios proteicos observados en *V. harveyi* reflejan la necesidad de, entre otras, reducir el gasto energético, de mantener o aumentar los sistemas de captación de nutrientes o de disminuir la movilidad.



# Conclusiones



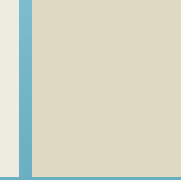


1. La permanencia de *V. harveyi* y *E. coli* bajo condiciones adversas genera la formación de una subpoblación de células en estado viable no cultivable, aunque las condiciones que promueven este proceso difieren para ambas bacterias. Las bajas temperaturas provocan la inducción reversible del estado viable no cultivable en *V. harveyi*, mientras que *E. coli* requiere temperaturas más elevadas para iniciar una pérdida irreversible de la cultivabilidad. Ninguna de las condiciones estudiadas provoca una desaparición total de las células cultivables.
2. Independientemente de la inducción del estado VNC, las células de *V. harveyi* expuestas a escasez de nutrientes, temperatura subóptima y/o radiación visible reducen su tamaño celular como una estrategia para aumentar la relación superficie/volumen y, probablemente, para escapar de la depredación por protistas. Bajo condiciones de estrés similares, *E. coli* no experimenta cambios en su tamaño celular.
3. La estrategia de supervivencia de *E. coli* parece englobarse dentro del modelo *bust and boom*, suponiendo la adopción del estado VNC un proceso degenerativo. Por contra, para *V. harveyi* la estrategia basada en la adopción del estado VNC está detrás de la perdurabilidad de esta bacteria en el medio natural, si bien, el mantenimiento de una pequeña población de células cultivables que podrían contribuir a su persistencia sugiere la combinación de la inducción del estado VNC y del modelo *bust and boom*.
4. Las variaciones detectadas en el subproteoma de las envueltas celulares de ambas bacterias durante la permanencia bajo condiciones adversas son reflejo de las estrategias de supervivencia de estas bacterias: la estabilidad del subproteoma de *E. coli*, indicativa de una entrada pasiva en el estado VNC, frente al cambio en *V. harveyi*, necesario para una inducción activa de este proceso.
5. La permanencia bajo condiciones de estrés provoca cambios cuantitativos y cualitativos en el subproteoma de *V. harveyi*, produciéndose un descenso en la concentración de proteínas de envueltas celulares/célula y cambios en la expresión



de proteínas que intervienen en el ensamblaje y el mantenimiento de las envueltas celulares y en la bioenergética y el cese en la detección de proteínas implicadas en la quimiotaxis. Estas modificaciones estarían orientadas en gran medida a compensar las deficiencias del sistema en el que se encuentra, principalmente la escasez de nutrientes.

# Bibliografía





- Abdallah FB, Kallel H, Bakhrouf. 2009.** Enzymatic, outer membrane proteins and plasmid alterations of starved *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* cells in seawater. *Arch Microbiol.* 191: 493-500.
- Abdallah FB, Ellafi A, Lagha R, Bakhrouf A, Namane A, Rousselle JC, Lenormand P, Kallel H. 2012.** Identification of outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* altered in response to  $\gamma$ -irradiation or long-term starvation. *Res Microbiol.* 161: 869-875.
- Abedi-Moghaddam N, Bulic A, Henderson L, Lam E. 2004.** Survival of *Escherichia coli* to UV irradiation during exponential and stationary phases of growth. *JEMI.* 5: 44-49.
- Aboubaker MH, Sabrié J, Huert M, Koken M. 2013.** Establishment of stable GFP-tagged *Vibrio aestuarianus* strains for the analysis of bacterial infection-dynamics in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Vet Microbiol.* 164: 392-398.
- Aertsen A y Michiels CW. 2004.** Stress and how bacteria cope with death and survival. *Crit Rev Microbiol.* 30: 263-273.
- Alexandre G y Zhulin IB. 2003.** Different evolutionary constraints on chemotaxis proteins CheW and CheY revealed by heterologous expression studies and protein sequence analysis. *J Bacteriol.* 185(2): 544-552.
- Alice AF, Naka H, Crosa JH. 2008.** Global gene expression as a function of the iron status of the bacterial cell: influence of differentially expressed genes in the virulence of the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun.* 76: 4019-4037.
- Alonso-Sáez L, Unanue M, Latatu A, Azúa I, Ayo B, Artolozaga I, Iriberry J. 2009.** Changes in marine prokaryotic community induced by varying types of dissolved organic matter and subsequent grazing pressure. *J Plankton Res.* 31: 1373-1383.
- Amel BK, Amine B, Amina B. 2008.** Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions. *Microbiol Res.* 163: 323-328.
- Amy PS y Morita RY. 1983.** Starvation-survival patterns of sixteen freshly isolated open-ocean bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 45: 1109-1115.
- Andersen C, Maier E, Kemmer G, Blass J, Hilpert AK, Benz R, Reidl J. 2003.** Porin OmpP2 of *Haemophilus influenzae* shows specificity for nicotinamide-derived nucleotide substrates. *J Biol Chem.* 278: 24269-24276.
- Andrews SC. 1998.** Iron storage in bacteria. *Adv Microb Physiol.* 40: 281-351.

- Arana I, Irizar A, Seco C, Muela A, Fernández-Astorga A, Barcina I. 2003.** gfp-tagged cells as a useful tool to study the survival of *Escherichia coli* in the presence of the river microbial community. *Microb Ecol.* 45: 29-38.
- Arana I, Justo JI, Muela A, Pocino M, Iriberry J, Barcina I. 1997.** Influence of a survival process in a freshwater system upon plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Microb Ecol.* 33: 41-49.
- Arana I, Muela A, Iriberry J, Egea L, Barcina I. 1992.** Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a fresh water ecosystem. *Appl Environ Microbiol.* 58: 3903-3907.
- Arana I, Muela A, Orruño M, Seco C, Garaizabal I, Barcina I. 2010.** Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescent* CHAO: comparison with *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.
- 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 Leeuw J Microb.* 86: 189-199.
- Armada SP, Farto R, Perez MJ, Nieto TP. 2003.** Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I. *Microbiol.* 149: 369-375.
- Asakura H, Kawamoto K, Haishima Y, Igimi S, Yamamoto S, Makino S. 2008.** Differential expression of the outer membrane protein (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Res Microbiol.* 159: 709-717.
- Asakura H, Panutdaporn N, Kawamoto K, Igimi S, Yamamoto S, Makino S. 2007.** Proteomic characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in the oxidation-induced viable but non-culturable state. *Microbiol Immunol.* 51(9): 875-881.
- Atlas RM y Bartha R. 1998.** Microbial Ecology. Fundamentals and Applications, 4th ed. Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, California, USA.
- Austin B y Zhang XH. 2006.** *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol.* 43: 119-124.

- Baffone W, Citterio B, Vittoria E, Casaroli A, Campana R, Falzano L, Donelli G. 2003.** Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp. *Int J Food Microbiol.* 89: 31-39.
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuola I, Cunningham D, Vendrell D, Muzquiz JL. 2006.** The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiology.* 114: 173-186.
- Baleux B, Caro A, Lesne J, Got P, Binard S, Delpeuch B. 1998.** Survie et maintenance de la virulence de *Salmonella typhimurium* VNC exposée simultanément à trois facteurs stressants expérimentaux. *Oceanol Acta.* 21: 939-950.
- Barák I, Ricca E, Cutting SM. 2005.** From fundamental studies of sporulation to applied spore research. *Mol Microbiol.* 55: 330-338.
- Barcina I y Arana I. 2009.** The viable but nonculturable phenotype, a crossroad in the live cycle of non differentiating bacteria? *Rev Environ Sci BioTechnol.* 8: 245-255.
- Barcina I, Arana I, Iriberry J, Egea L. 1986a.** Factors affecting the survival of *Escherichia coli* in a river. *Hydrobiol.* 141: 249-253.
- Barcina I, Arana I, Iriberry J, Egea L. 1986b.** Influence of the light and natural microbiota of the Butron river on *Escherichia coli* survival. *A Van Leeuw.* 52: 555-566.
- Barcina I, Ayo B, Unanue M, Egea L, Iriberry J. 1992.** Comparison of rates of flagellate bacterivory and bacterial production in a marine coastal system. *Appl Environ Microbiol.* 58: 3850-3856.
- Barcina I, González JM, Iriberry J, Egea L. 1989.** Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl Environ Microbiol.* 55: 246-251.
- Barcina I, González JM, Iriberry J, Egea L. 1990.** Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *J Appl Bacteriol.* 2: 189-198.
- Barcina I, González JM, Iriberry J, Egea L. 1991.** Role of protozoa in the regulation of enteric bacteria populations in seawater. *Mar Microb Food Webs.* 5: 179-187.
- Barcina I, Lebaron P, Vives-Rego J. 1997.** Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach. *FEMS Microb Ecol.* 23: 1-9.
- Barer MR y Harwood CR. 1999.** Bacterial viability and culturability. *Adv Microb Physiol.* 41: 93-137.

- Basaglia M, Povolo S, Casella S. 2006.** Resuscitation of viable but not culturable *Sinorhizobium meliloti* 41 pRP4-*luc*: effects of oxygen and host plant. *Curr Microbiol.* 54: 167-174.
- Bates TC y Oliver JD. 2004.** The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Microbiol.* 42: 74-79.
- Baumann P, Baumann L, Bang, SS, Woolkallis MJ. 1981.** Re-evaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia* and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. *Curr Microbiol.* 4: 127-132.
- Baumann P, Furniss AL, Lee JV. 1984.** Section 5. Facultatively Anaerobic Gram-negative Rods- Genus *Vibrio*. En: *Bergey's Manual of Systemic Bacteriology* Volume 1, pp. 518-538. Edited by NR Krieg & JR Holt. London: Williams & Wilkins.
- Beckwith J. 2013.** The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol.* 164(6): 497-504.
- Bell T, Bonsall MB, Buckling A, Whiteley AS, Goodall T, Griffiths RI. 2010.** Protists have divergent effects on bacterial diversity along a productivity gradient. *Biol Lett.* 6(5): 639-642.
- Bermúdez-Crespo J, Balboa S, Alonso J, Romalde JL. 2012.** Two-dimensional proteome reference map of *Vibrio tapetis*, the aetiological agent of brown ring disease in clams. *J Appl Microbiol.* 112(5): 853-864.
- Beveridge OS, Humphries S, Petchey OL. 2010a.** The interacting effects of temperature and food chain length on trophic abundance and ecosystem function. *J Anim Ecol.* 79: 693-700.
- Beveridge OS, Petchey OL, Humphries S. 2010b.** Direct and indirect effects of temperature on the population dynamics and ecosystem functioning of aquatic microbial ecosystems. *J Anim Ecol.* 79: 1324-1331.
- Beveridge OS, Petchey OL, Humphries S. 2010c.** Mechanisms of temperature-dependent swimming: the importance of physics, physiology and body size in determining protist swimming speed. *J Exp Biol.* 213: 4223-4231.
- Biosca EG, Amaro C, Marco-Noales ED, Oliver JD. 1996.** Effect of low temperature on starvation-survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl Environ Microbiol.* 62: 450-455.
- Blank J, Grillenbeck NW, Kreutzer R, Sprinzl M. 1995.** Overexpression and purification of *Thermus thermophilus* elongation factors G, Tu, and Ts from *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 6(5): 637-645.

- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davids NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 177: 1453-1474.
- Boenigk J y Arndt H. 2000. Comparative studies on the feeding behavior of two heterotrophic nanoflagellates: the filter-feeding choanoflagellate *Monosiga ovata* and the raptorial-feeding kinetoplastid *Rhynchomonas nasuta*. *Aquat Microb Ecol*. 22: 243-249.
- Bogosian G, Aardema ND, Bourneuf E, Morris PJL, O'Neil JP. 2000. Recovery of hydrogen peroxide-sensitive culturable cells of *Vibrio vulnificus* gives the appearance of resuscitation from a viable but nonculturable state. *J Bacteriol*. 182: 5050-5075.
- Bogosian G y Bourneuf EV. 2001. A matter of bacterial life and death. *EMBO Rep*. 2: 770-774.
- Bogosian G, Morris PJL, O'Neil JP. 1998. A mixed culture recovery method indicates that enteric bacteria do not enter the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*. 64: 1736-1742.
- Borrego JJ, Arrabal F, de Vicente A, Gómez, Romero P. 1983. Study of microbial inactivation in the marine environment. *J Water Pollut Control Fed*. 55: 297-302.
- Borziak K, Fleetwood AD, Zhulin IB. 2013. Chemoreceptor gene loss and acquisition via horizontal gene transfer in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 195(16): 3596-3602.
- Bou-Abdallah F, Yang H, Awomolo A, Cooper B, Woodhall MR, Andrews SC, Chasteen ND. 2013. Functionality of the three-site ferroxidase center of *Escherichia coli* bacterial ferritin (EcFtnA). *Biochem*. 53: 483-495.
- Burkhardt III W, Calci KR, Watlins WD, Rippey SR, Chirtel SJ. 2000. Inactivation of indicator microorganisms in estuarine waters. *Water Res*. 34: 2207-2214.
- Cabello AE, Espejo RT, Romero J. 2005. Tracing *Vibrio parahaemolyticus* in oysters (*Tiostrea chilensis*) using a Green Fluorescent Protein tag. *J Exp Mar Biol Ecol*. 327(2): 157-166.
- Cai SJ e Inouye M. 2002. EnvZ-OmpR interaction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 277: 24155-24161.
- Caldas TD, El Yaagoubi A, Kohiyama M, Richarme G. 1998. Purification of elongation factors EF-Tu and EF-G from *Escherichia coli* by covalent chromatography on thiol-sepharose. *Protein Expr Purif*. 14: 65-70.



- Cappelier JM, Minet J, Magras C, Colwell RR, Federighi M. 1999. Recovery in embryonated eggs of viable but nonculturable *Campylobacter jejuni* cells and maintenance of ability to adhere to HeLa cells after resuscitation. *Appl Environ Microbiol.* 65: 5154-5157.
- Caron DA, Goldman JC, Dennett MR. 1988. Experimental demonstration of the roles of bacteria and bacterivorous protozoa in plankton nutrient cycles. *Hydrobiologia.* 159: 27-40.
- Cavallo RA y Stab L. 2004. Culturable vibrios biodiversity in the Northern Ionian Sea (Italian coasts). *Sci Mar.* 68: 23-29.
- Chaiyanan S, Chaiyanan S, Huq A, Mangel T, Colwell RR. 2001. Viability of the nonculturable *Vibrio cholerae* O1 and O139. *Syst Appl Microbiol.* 24: 331-341.
- Chaiyanan S, Chaiyanan S, Grim C, Mangel T, Huq A, Colwell RR. 2007. Ultrastructure of coccoid viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol.* 9(2): 393-402.
- Chandran A y Hatha AAM. 2005. Relative survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in a tropical estuary. *Water Res.* 39: 1397-1403.
- Chart H, Conway D, Frost J, Rowe B. 1996. Outer membrane characteristics of *Campylobacter jejuni* grown in chickens. *FEMS Microbiol Let.* 145: 469-472.
- Chaveerach P, ter Huurne A, Lipman LJA, van Knapen F. 2003. Survival and resuscitation of ten strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under acid conditions. *Appl Environ Microbiol.* 69: 711-714.
- Chen H y Chen CY. 2014. Starvation induces phenotypic diversification and convergent evolution in *Vibrio vulnificus*. *PLoS ONE.* 9(2): e88658.
- Chen S-Y, Jane W-N, Chen Y-S, Wong H-C. 2009. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. *Int J Food Microbiol.* 129: 157-165.
- Chen S-Y y Morse SA. 1999. *Neisseria gonorrhoeae* bacterioferritin: structural heterogeneity, involvement in iron storage and protection against oxidative stress. *Microbiol.* 145: 2967-2975.
- Chiu S-W, Chen S-Y, Wong H. 2008. Dynamic localization of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* and in the ectopic host bacterium *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol.* 74(21): 6739-6745.
- Chrzanowski TH y Šimek K. 1990. Prey-size selection by freshwater flagellated protozoa. *Limnol Oceanogr.* 35: 1429-1436.

- Citterio B, Casaroli A, Pierfelici L, Battistelli M, Falcieri E, Baffone W. 2004. Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form. *New Microbiol.* 27: 353-360.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard, Ninth Edition. M07-A9. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colwell RR. 1996. Global climate and infectious disease: the cholera paradigm. *Science.* 274: 2025-2031.
- Colwell RR y Gray DJ. 2000. Nonculturable Microorganisms in the Environment. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Corper HJ y Cohn ML. 1933. The viability and virulence of old cultures of tubercle bacilli. *Am Rev Tuberc.* 28: 856-874.
- Coutard F, Crassouss P, Droguet M, Gobin E, Colwell RR, Pommepuy M, Hervio-Heath D. 2007. Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* regrowth or resuscitation? *ISME J.* 1: 111-120.
- Craig DL, Fallowfield HJ, Cromar NJ. 2004. Use of microcosmos to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediments and validation with in situ measurements. *J Appl Microbiol.* 96: 922-930.
- Crane SR y Moore JA .1986. Modelling enteric bacterial die-off: A review. *Water Air Soil Pollut.* 27: 411-439.
- Darcan C, Ozkanca R, Idil O, Flint KP. 2009. Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water. *Pol J Microbiol.* 58: 307-317.
- Davies-Colley RJ, Bell RG, Donnison AM. 1994. Sunlight inactivation of enterococci and faecal coliforms in sewage effluent diluted in seawater. *Appl Environ Microbiol.* 60: 2049-2058.
- Davies CM, Long JAH, Donald M, Ashbolt NJ. 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. *Appl Environ Microbiol.* 61: 1888-1896.
- Davis B J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann NY Aca Sci.* 121: 404-427.
- Dawson MP, Humphrey BA, Marshall KC. 1981. Adhesion: A tactic in the survival strategy of a marine *Vibrio* during starvation. *Curr Microbiol.* 6: 195-199.

- Defeu HJ, Reimold C, Breddermann H, MannherzHG, Graumann PL. 2015.** Translation elongation factor EF-Tu modulates filament formation of actin-like MreB protein *in vitro*. *J Mol Biol.* 427: 1715-1727.
- Desnues B, Cuny C, Grégori G, Dukan S, Aguilaniu H, Nyström T. 2003.** Differential oxidative damage and expression of stress defence regulons in culturable and non-culturable *Escherichia coli* cells. *EMBO Rep.* 4: 400-404.
- Downing KJ, Mischenko VV, Shleeva MO, Young DI, Young M, Kaprelyants AS, Apt AS, Mizrahi V. 2005.** Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth *in vivo* and for resuscitation *in vitro*. *Infect Immun.* 73: 3038-3043.
- Duncan S, Glover LA, Killham K, Prosser JI. 1994.** Luminiscence-based detection of starved and viable but nonculturable bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 60(4): 1308-1316.
- Easton JH, Gauthier JJ, Lalor MM, Pitt RE. 2005.** Die-off of pathogenic *E. coli* O157:H7 in sewage contaminated waters. *J Amer Water Res Assoc.* 41: 1187-1193.
- Etémadi AH. 1989.** Reconstitution and Physiological Protein Translocation Processes. Pp 379-486. En: Artificial and Reconstituted Membrane Systems J. R. Harris, A.H. Etémadi (eds.) Springer. US
- Falcioni T, Papa S, Campana R, Manti A, Battistelli M, Baffone W. 2008.** State transitions of *Vibrio parahaemolyticus* VBNC cells evaluated by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 74B: 272-281.
- Fekkes P y Driessen AJM. 1999.** Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63(1): 161-173.
- Fenchel T y Blackburn N. 1999.** Motile chemosensory behavior of phagotrophic protists: mechanisms for and efficiency in congregating at food patches. *Protist.* 150: 325-336.
- Ferris HU, Zeth K, Hulko M, Dunin-Horkawicz S, Lupas AN. 2014.** Axial helix rotation as a mechanism for signal regulation inferred from the crystallographic analysis of the *Escherichia coli* serine chemoreceptor. *J Struct Biol.* 186: 349-356.
- Figge RM, Divakaruni AV, Gober JW. 2004.** MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, coordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol.* 51: 1321-1332.

- Figueiredo MCO, Lobo SAL, Carita JN, Nobre LS, Saraiva LM. 2012.** Bacterioferritin protects the anaerobe *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough against oxygen. *Anaerobe*. 18: 454-458.
- Flint KP. 1987.** The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J Appl Bacteriol*. 60: 261-270.
- Fraser TW y Gilmour A. 1986.** Scanning electron microscopy preparation methods: their influence on the morphology and fibril formation in *Pseudomonas fragi* (ATCC 4973). *J Appl Bacteriol*. 60: 527-533.
- Freese E. 1981.** Initiation of bacterial sporulation. En: Sporulation and germination. Levison HS, Sonenshein AL y Tipper DJ (Eds.), American Society of Microbiology, Washington D.C., pp: 1-12.
- Freese E y Heinze J. 1984.** Metabolic and genetic control of bacterial sporulation. En: The bacterial spore, vol. 2. Hurst A y Gould GW (Eds.), Academic Press Ltd., London, pp: 101-172.
- Fujioka RS y Narikawa OT. 1982.** Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field conditions. *Appl Environ Microbiol*. 44: 395-401.
- García-Lara J, Menon P, Servais P, Billen G. 1991.** Mortality of fecal bacteria in seawater. *Appl Environ Microbiol*. 57: 885-888.
- Gagnaire B, Frouin H, Moreau K, Thomas-Guyon H, Renault T. 2006.** Effects of temperature and salinity on haemocyte activities of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Fish and Shellfish Immun*. 2: 536-547.
- Gasol JM. 1994.** A framework for the assessment of top-down vs bottom-up control of heterotrophic nanoflagellate abundance. *Mar Ecol Prog Ser*. 113: 291-300.
- Gauger EJ y Gomez-Chiarri M. 2002.** 16S ribosomal DNA sequencing confirms the synonymy of *Vibrio harveyi* and *V. carchariae*. *Dis Aquat Org*. 52: 39-46.
- Gauthier MJ. 2000.** Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state, p. 87–112. RR Colwell and DJ Grimes (ed.), Nonculturable microorganisms in the environment. ASM Press, Washington D.C. 10.
- Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduva O, Bou G. 2014.** Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*.13(2): 460-476.
- Gengenbacher M, Rao SP, Pethe K, Dick T. 2010.** Nutrient-starved, non-replicating *Mycobacterium tuberculosis* requires respiration, ATP synthase and isocitrate

lyase for maintenance of ATP homeostasis and viability. *Microbiology*. 156: 81-87.

**Gessmann D, Chung YH, Danoff EJ, Plummer AM, Sandlin CW, Zaccai NR, Fleming KG. 2014.** Outer membrane  $\beta$ -barrel protein folding is physically controlled by periplasmic lipid head groups and BamA. *PNAS*. 111(16): 5878-5883.

**Gong L, Takayama K, Kjelleberg S. 2002.** Role of spoT-dependent ppGpp accumulation in the survival of light exposed starved bacteria. *Microbiol*. 148: 559-570.

**González JM, Iriberry J, Egea L, Barcina I. 1990a.** Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Appl Environ Microbiol*. 56: 1821-1837.

**González JM, Iriberry J, Egea I, Barcina I. 1992.** Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Appl Environ Microbiol*. 58: 998-1004.

**González JM, Sherr EB, Sherr BF. 1990b.** Size-selective grazing on bacteria by natural assemblages of estuarine flagellates and ciliates. *Appl Environ Microbiol*. 56: 583-589.

**Graves PR y Haystead TAJ. 2002.** Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66: 39-63.

**Grimes DJ, Brayton P, Colwell RR, Ruber SH. 1985.** Vibrios as autochthonous flora of neritic sharks. *Syst Appl Microbiol*. 6: 221-226.

**Groat RG, Schultz JE, Zychlinsky E, Bockman A, Martin A. 1986.** Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J Bacteriol*. 168: 486-493.

**Guerrero R, Pedrós-Alió C, Esteve I, Más I, Chase D, Margulis L. 1986.** Predatory prokaryotes: predation and primary consumption evolved in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*. 83: 2138-2142.

**Gupte AR, de Rezende CLE, Joseph SW. 2003.** Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Appl Environ Microbiol*. 69: 6669-6675.

**Hahn MW y Höfle MG. 2001.** Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria. *FEMS Microbiol Ecol*. 35: 113-121.

**Häse CC y Barquera B. 2001.** Role of sodium bioenergetics in *Vibrio cholerae*. *Biochim Biophys Acta*. 1505: 169-178.

- Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dobson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill RS, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD y cols. 2000. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 406(6795): 477-483.
- Heim S, Lleó MM, Bonato B, Guzman CA, Canepari P. 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J Bacteriol*. 184: 6739-6745.
- Hendrie MS, Hodgkiss W, Shewan JM. 1970. The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria. *J Gen Microbiol*. 64: 151-169.
- Henis Y y Alexander M. 1990. Effect of organic amendments on bacterial multiplication in lake water. *A Van Leeuw*. 57: 9-20.
- Henzel WJ, Watanabe C, Stults JT. 2003. Protein identification: the origins of peptidemass fingerprinting. *J Am Soc Mass Spectrom*. 14: 931-942.
- Hernroth B, Lothigius Å, Bölin I. 2009. Factors influencing survival of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) and *Vibrio parahaemolyticus* in marine environment. *FEMS Microbiol Ecol*. 71: 272-280.
- Herskovits AA y Bibi E. 2000. Association of *Escherichia coli* ribosomes with the inner membrane requires the signal recognition particle receptor but is independent of the signal recognition particle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97(9): 4621-4626.
- Hobbie JE, Caley RJ, Jasper S. 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 33: 1225-1228.
- Hood MA, Guckert JB, White DC, Deck F. 1986. Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microb*. 52: 788-793.
- Iriberry J, Azua I, Labirua-Iturburu A, Artolozaga I, Barcina I. 1994a. Differential elimination of enteric bacteria by protist in a freshwater system. *J Appl Bacteriol*. 77: 476-483.
- Iriberry J, Ayo B, Artolozaga I, Barcina I, Egea L. 1994b. Grazing on allochthonous vs autochthonous bacteria in river water. *Lett Appl Microbiol*. 18: 12-14.
- Ito K y Akiyama Y. 2005. Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease. *Annu Rev Microbiol*. 59: 211-231.

- Iwamoto Y, Suzukki Y, Kurita A, Watanabe Y, Shimizu T, Ohgami H, Yanagihara Y. 1996. *Vibrio trachuri* sp. nov., a new species isolated from diseased Japanese horse mackerel. *Microbiol Immun.* 39: 831-837.
- Jaen AJ, Dahllöf B, Kjelleberg S. 1986. Changes in protein composition of three bacterial isolates from marine waters during short periods of energy and nutrient deprivation. *Appl Environ Microbiol.* 52: 1419-1421.
- Jenkins DE, Schultz JE, Matin A. 1988. Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 170: 3910-2914.
- Jia J, Li Z, Cao J, Jiang Y, Liang C, Liu M. 2013. Proteomic analysis of protein expression in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio harveyi* SF1. *Curr Microbiol.* 67: 442-447.
- Jiang XP y Chai JT. 1996. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Appl Environ Microbiol.* 62: 1300-1305.
- John DE y Rose JB. 2005. Review of factors affecting microbial survival in groundwater. *Environ Sci Tech.* 39: 7345-7356.
- Johnson KS, Gordon RM, Coale KH. 1997. What controls dissolved iron in the world ocean? *Mar Chem.* 57: 137-161.
- Johnson FH y Shunk IV. 1936. An interesting new species of luminous bacteria. *J Bacteriol.* 31: 585-59.
- Johnston MD y Brown MH. 2002. An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing. *J Appl Microbiol.* 92: 1066-1077.
- Johnstone BH y Jones RD. 1988. Physiological effects of long-term energy-source deprivation on the survival of a marine chemolithotrophic ammonium-oxidizing bacterium. *Mar Ecol Prog Ser.* 49: 295-303.
- Jones PG, VanBogelen RA, Neidhart FC. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 169: 2092-2095.
- Jones MK, Warner E, Oliver JD. 2008. Survival of and in situ gene expression by *Vibrio vulnificus* at varying salinities in estuarine environments. *Appl Environ Microbiol.* 74: 182-187.
- Josic D, Clifton JG, Kovac S, Hixson DC. 2008. Membrane proteins as diagnostic biomarkers and targets for new therapies. *Curr Opin Mol Ther.* 10(2): 116-123.

- Jouseet A. 2012.** Ecological and evolutive implications of bacterial defences against predators. *Environ Microbiol.* 14(8): 1830-1843.
- 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.
- Jürgens, K. 2006.** Predation on bacteria and bacterial resistance mechanisms: comparative aspects among different predator groups in aquatic systems. En: *Predatory prokaryotes*, Jurkevitch E. (ed.). *Microbiology Monographs.* 4: 57-92.
- Jürgens K y Matz C. 2002.** Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Anton Leeuw Int J G.* 81: 413-434.
- Jürgens K y Sala MM. 2000.** Predation-mediated shifts in size distribution of microbial biomass and activity during detritus decomposition. *Oikos.* 91: 29-40.
- Kaberdin VR, Montánchez I, Parada C, Orruño M, Arana I, 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(3): 689-700.
- Kao D-Y, Cheng Y-C, Kuo T-Y, Lin S-B, Lin C-C, Chow L-P, Chen W-J. 2009.** Salt-responsive outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* serotype O1 as revealed by comparative proteome analysis. *J Appl Microbiol.* 106: 2079-2085.
- Karatan E, Saulmon MM, Bunn MW, Ordal GW. 2001.** Phosphorylation of the response regulator CheV is required for adaptation to attractants during *Bacillus subtilis* chemotaxis. *J Biol Chem.* 276(47): 43618-43626.
- Kaspar CW y Tamplin ML. 1993.** Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish. *Appl Environ Microbiol.* 59: 2425-2429.
- Kaziro Y. 1978.** The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. *Biochim Biophys Acta.* 505: 95-127.
- Keep NH, Ward JM, Robertson G, Cohen-Gonsaud M, Henderson B. 2006.** Bacterial resuscitation factors: revival of viable but non-culturable bacteria. *Cell Mol Life Sci.* 63: 2555-2559.
- Kell DB y Young M. 2000.** Bacterial dormancy and culturability: the role of autocrine growth factors. *Curr Op Microbiol.* 3: 238-243.
- Kennedy J, Flemer B, Jackson SA, Lejon DPH, Morrissey JP, O'Gara F, Dobson ADW. 2010.** Marine metagenomics: new tool for the study and exploitation of marine microbial metabolism. *Mar Drugs.* 8: 608-628.



- Kihara A, Akiyama Y, Ito K. 1996. A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY. *EMBO J.* 15: 6122-6131.
- Kihara A, Akiyama Y, Ito K. 1998. Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA. *J Mol Biol.* 279: 175-188.
- Kiraga J, Mackiewicz P, Mackiewicz D, Kowalczyk M, Biecek P, Polak N, Smolarczyk K, Dudek MR, Cebzat S. 2007. The relationships between the isoelectric point and length of proteins, taxonomy and ecology of organisms. *BMC Genomics.* 8: 163.
- Kjelleberg S (ed). 1993. Starvation in bacteria. Plenum Press, New York.
- Kjelleberg S, Hermansson M, Mårdén P. 1987. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annu Rev Microbiol.* 41: 25-49.
- Kjelleberg S, Humphrey BA, Marshall KC. 1982. Effect of interfaces on small, starved marine bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 43(5): 1166-1172.
- Koch AL. 1971. The adaptive responses of *Escherichia coli* to a famine and feast existence. *Adv Microb Physiol.* 6: 147-217.
- Koebnik R, Locher KP, Van Gelder P. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol.* 37: 239-253.
- Koksharova OA. 2013. Bacteria and phenoptosis. *Biochemistry.* 78(9): 1229-1238.
- Kolling GL y Matthews KR. 2001. Examination of recovery *in vitro* and *in vivo* of nonculturable *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 67: 3928-3933.
- Kondo K, Takade A, Amako K. 1994. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. *FEMS Microbiol Lett.* 123: 179-184.
- Korotkov KV, Sandkvist M, Hol WGJ. 2013. The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol.* 10(5): 336-351.
- Kramer A, Schwebke I, Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis.* 6: 130.
- Kruse T, Møller-Jensen J, Løbner-Olesen, Gerdes K. 2003. Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 22(19): 5283-5292.

- Kvint K, Nachin L, Diez A, Nyström T. 2003. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Curr Opin Microbiol.* 6: 140-145.
- Lai C-J, Chen S-Y, Lin I-H, Chang C-H, Wong H-C. 2009. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *Int J Food Microbiol.* 135: 118-124.
- Langer T. 2000. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci.* 25(5): 247-251.
- Leyton Y y Riquelme C. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 43: 441-456.
- Li L, Mendis N, Trigui H, Oliver JD, Faucher SP. 2014. The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol.* 5(258): 1-20.
- Li GZ, Vissers JP, Silva JC, Golick D, Gorenstein MV, Geromanos SJ. 2009. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics.* 9(6): 1696-1719.
- Lim C-H y Flint KP. 1989. The effects of nutrients on the survival of *Escherichia coli* in lake water. *J Appl Bacteriol.* 66: 559-569.
- Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. 2001. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol.* 91: 1095-1102.
- Lleò MM, Tafi MC, Canepari P. 1998. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Syst Appl Microbiol.* 21: 333-339.
- Long RA, Rowley DC, Zamora E, Liu J, Bartlett DH, Azam F. 2005. Antagonistic interactions among marine bacteria impide the proliferation of *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol.* 71: 8531-8536.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Lutz C, Erken M, Noorian P, Sun S, McDougald D. 2013. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholera*. En: *Vibrio ecology, pathogenesis and evolution*, Ceccarelli D, Colwell RR (ed.) Frontiers Media SA. pp. 156-170.

- MacGregor SJ, Rowan NJ, MacIlvaney L, Anderson JG, Fouracre RA, Farrish O. 1998.** Light inactivation of food-related pathogenic bacteria using a pulsed power source. *Lett Appl Microbiol.* 27: 67-70.
- Mackey BM. 2000.** Injured bacteria, p. 315–341. En: B. M. Lund, T. C. Baird-Parker, and G. W. Gould (ed.), *The microbiological safety and quality of food*, vol. 1. Aspen Publishers, Gaithersburg, Md.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2004.** Brock. *Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson education S. A. Madrid (Ed.). ISBN: 8420536792.
- Magariños B, Romalde JL, Cid A, 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.
- Marco-Noales E, Biosca EG, Amaro C. 1999.** Effects of salinity and temperature on long-term survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E). *Appl Environ Microbiol.* 65(3): 1117-1126.
- Marco-Noales E, Biosca EG, Rojo C, Amaro C. 2004.** Influence of aquatic microbiota on the survival in water of the human and eel pathogen *Vibrio vulnificus* serovar E. *Environ Microbiol.* 6: 364-376.
- Mårdén P, Tunlid A, Malmcrona-Friberg K, Odham G, Kjelleberg S. 1985.** Physiological and morphological changes during short term starvation of marine bacterial isolates. *Arch Microbiol.* 142: 326-332.
- Massana R, Gasol JM, Bjørnsen PK, Blackburn N, Hagstrom Å, Hietanen S, Hygum BH, Kuparinen J, Pedrós-Alió C. 1997.** Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems. *Sci Mar.* 61: 397–407.
- Mazza P, Noens EE, Schirner K, Grantcharova N, Mommaas AM, Koerten HK, Muth G, Flårdh K, van Wezel GP, Wohlleben W. 2006.** MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores. *Mol Microbiol.* 60(4): 838-852.
- McCambridge J y McMeekin TA. 1980.** Relative effects of bacterial and protozoan predators on survival of *Escherichia coli* in estuarine water samples. *Appl Environ Microbiol.* 40: 907-911.
- McCambridge J y McMeekin TA. 1981.** Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of fecal and other bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 41: 1083-1087.

- McDougald DM, Rice SA, Kjelleberg S. 1999. New perspectives on the viable but nonculturable response. *Biologia Bratislava*. 54: 617-623.
- Merril CR, Goldman D, Sedman SA, Ebert MH. 1981. Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science*. 211(4489): 1437-1438.
- Mey AR, Wyckoff EE, Kanukurthy V, Fisher CR, Payne SM. 2005. Iron and Fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of Fur in virulence. *Infect Immun*. 73 (12): 8167-8178.
- Mitchell JG, Pearson L, Bonazinga A, Dillon S, Khouri H, Paxinos R. 1995. Long lag times and high velocities in the motility of natural assemblages of marine bacteria. *Appl Environ Microbiol*. 61: 877-882.
- Molloy MP, Herbert BR, Slade MB, Rabilloud T, Nouwens AS, Williams KL, Gooley AA. 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem*. 267: 2871-2881.
- Molloy MP, Phadke ND, Maddock JR, Andrews PC. 2001. Two dimensional electrophoresis and peptide mass fingerprinting of bacterial outer membrane proteins. *Electrophoresis*. 22: 1686-1696.
- Montánchez I, Arana I, Parada C, Garaizabal I, Orruño M, Barcina I, Kaberdin VR. 2014. Reprogramming of *Vibrio harveyi* gene expression during adaptation in cold seawater. *FEMS Microbiol Ecol*. 87(1): 193-203.
- Morita RY. 1990. The starvation-survival state of microorganisms in nature and its relationship to the bioavailable energy. *Experientia*. 46(8): 813-817.
- Moser I, Schroeder W, Salnikow J. 1997. *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein and a 59-kDa protein are involved in binding to fibronectin and INT 407 cell membranes. *FEMS Microbiol Let*. 157: 233-238.
- Muela A, Santorum P, Arana I, García-Bringas JM, Barcina I. 1998. Discharge of disinfected wastewater in recipient aquatic systems: Fate of allochthonous bacterial and autochthonous protozoa populations. *J Appl Microbiol*. 85: 263-270.
- Muela A, Garcia-Bringas JM, Arana I, Barcina I. 2000. The effect of simulated solar radiation on *Escherichia coli*: The relative roles of UV-B, UV-A, and photosynthetically active radiation. *Microb Ecol*. 39: 65-71.
- Muela A, García-Bringas JM, Seco C, Arana I, Barcina I. 2002. Participation of oxygen and role of exogenous and endogenous sensitizers in the photoinactivation of

- Escherichia coli* by photosynthetically active radiation, UV-A and UV-B. *Microb Ecol.* 44(4): 354-364.
- Muela A, Pocino M, Arana I, Justo JI, Iriberry J, Barcina I. 1994.** Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol.* 60(12): 4273-4278.
- Muela A, Seco C, Camafeita E, Arana I, Orruño M, López JA, Barcina I. 2008.** Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol.* 64: 28-36.
- Mukamolova GV, Kormer SS, Kell DB, Kaprelyants AS. 1999.** Stimulation of the multiplication of *Micrococcus luteus* by an autocrine growth factor. *Arch Microbiol.* 172: 9-14.
- Mukamolova GV, Murzin AG, Salina EG, Demina GR, Kell DB, Kaprelyants AS. 2006.** Muralytic activity of *Micrococcus luteus* Rpf and its relationship to physiological activity in promoting bacterial growth and resuscitation. *Mol Microbiol.* 59: 84-98.
- Mukamolova GV, Turapov OA, Young DI, Kaprelyants AS, Kell DB, Young M. 2002.** A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol.* 46: 623-635.
- Na SH, Miyanaga K, Unno H, Yanji Y. 2006.** The survival response of *Escherichia coli* K-12 in a natural environment. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72: 386-392.
- Narberhaus F, Obrist M, Führer F, Langklotz S. 2009.** Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. *Res Microbiol.* 160(9): 652-659.
- Neidhardt FC. 1999.** Bacterial growth: Constant obsession with dN/dt. *J Bacteriol.* 181: 7405-7408.
- Nikaido H. 1994.** Isolation of outer membranes. *Methods Enzymol.* 235: 225-234.
- Nikaido H y Vaara M. 1985.** Molecular bases of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 49: 1-32.
- Nilsson L, Oliver JD, Kjelleberg S. 1991.** Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J Bacteriol.* 173(16): 5054-5059.
- Noble RT, Lee IM, Schiff KC. 2004.** Inactivation of indicator microorganisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *J Appl Microbiol.* 96: 464-472.

- Nyström T, Albertson NH, Flärdh K, Kjelleberg S. 1990. Physiological adaptation to starvation and recovery from starvation by the marine *Vibrio* S14. *FEMS Microbiol Ecol.* 74: 129-140.
- Nyström T, Albertson N, Kjelleberg S. 1988. Synthesis of membrane and periplasmic proteins during starvation of a marine *Vibrio* sp. *J Gen Microbiol.* 134(6): 1645-1651.
- Nyström T, Olsson RM, Kjelleberg S. 1992. Survival, stress resistance, and alterations in protein expression in the marine *Vibrio* sp. Strain S14 during starvation for different individual nutrients. *Appl Environ Microbiol.* 58(1): 55-65.
- O'Brien CH y Sizemore RK. 1979. Distribution of the luminous bacterium *Beneckea harveyi* in a semitropical estuarine environment. *Appl Environ Microbiol.* 38: 928-933.
- 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.
- Oliver JD y Bockian R. 1995. In vivo resuscitation and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol.* 61: 2620-2623.
- Oliver JD, Hite F, McDougald D, Andon NL, Simpson LM. 1995. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment. *Appl Environ Microbiol.* 61(7): 2624-2630.
- Orruño M. 2009. El estado viable no cultivable. Proceso degenerativo o estrategia de supervivencia de las bacterias no diferenciadas. Análisis proteómico del proceso. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco.
- Östling J, Holmquist L, Flärdh K, Svenblad B, Jouper-Jaan A, Kjelleberg S. 1993. Starvation and recovery of *Vibrio*, p. 103-127. En: S. Kjelleberg (ed.), Starvation in bacteria. Plenum Press, New York, N.Y.
- Özkanca R y Flint KP. 1996. Alkaline phosphatase activity of *Escherichia coli* starved in sterile lake water microcosms. *J Appl Bacteriol.* 80: 252-258.
- Özkanca R y Flint KP. 1997. Relationship between respiratory enzymes and survival of *Escherichia coli* under starvation stress in lake water. *J Appl Microbiol.* 82(3): 301-309.
- Özkanca R y Flint KP. 2002. The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water. *Lett Appl Microbiol.* 35: 533-537.

- Paillard C, Allam B, Oubella R. 2004. Effect of temperature on defense parameters in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, challenged with *Vibrio tapetis*. *Dis Aquat Organ*. 59: 249-262.
- Panutdaporn N, Kawamoto K, Asakura H, Makino SI. 2006. Resuscitation of the viable but non-culturable state of *Salmonella enterica* serovar Oranienburg by recombinant resuscitation-promoting factor derived from *Salmonella typhimurium* strain LT2. *Int J Food Microbiol*. 106: 241-247.
- Pasquali C, Fialka I, Huber LA. 1999. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 722(1-2): 89-102.
- Pavia AT, Bryan JA, Maher KL, Hester TR, Jr., Farmer III JJ. 1989. *Vibrio carchariae* infection after a shark bite. *Ann Inter Med*. 111: 85-86.
- Pedersen K, Verdonck L, Austin B, Austin DA, Blanch AR, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Tiainen T, Vigneulle M, Swings J. 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes y cols., 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson y Shunk, 1936) Bauman y cols., 1981. *Int J Syst Bacteriol*. 48: 1749-1758.
- Pernthaler J. 2005. Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications. *Nat Rev Microbiol*. 3: 537-546.
- Perkins, DN, Pappin, DJ, Creasy, DM, Cottrell, JS. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*. 20(18): 3551-3567.
- Perrot F, Hebraud M, Junter GA, Jouenne T. 2000. Protein synthesis in *Escherichia coli* at 4°C. *Electrophoresis*. 21: 1625-1629.
- Pinto D, Santos MA, Chambel L. 2013. Thirty years of viable but nonculturable state research: Unsolved molecular mechanisms. *Crit Rev Microbiol*. 41(1): 61-76.
- Pommepuy M, Butin M, Derrien A, Gourmelon M, Colwell RR, Cormier M. 1996. Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight. *Appl Environ Microbiol*. 62: 4621-4626.
- Posch T, Šimek K, Vrba J, Pernthaler J, Nedoma J, Sattler B, Sonntag B, Psenner R. 1999. Predator-induced changes of bacterial size, structure and productivity studied on an experimental microbial community. *Aquat Microb Ecol*. 18: 235-246.
- Prinz A, Behrens C, Rapoport TA, Hartmann E, Kalies KU. 2000. Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J*. 19(8): 1900-1906.

- Pruzzo C, Tarsi R, Lleo MM, Signoretto C, Zampini M, Pane L, Colwell RR, Canepari P. 2003. Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water. *Environ Microbiol.* 5: 850-858.
- Pujalte MJ, Ortigosa M, Macian MC, Garay E. 1999. Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. *Int Microbiol.* 2: 259-266.
- Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J Proteomics.* 73: 2064-2077.
- Rahman I, Shahamat M, Kirchman PA, Russek-Cohen E, Colwell RR. 1994. Methionine uptake and cytopathogenicity of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae*. *Appl Environ Microbiol.* 60: 3573-3578.
- Ramaiah N, Ravel J, Straube WL, Hill RT, Colwell RR. 2002. Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but nonculturable state. *J Appl Microbiol.* 93: 108-116.
- Ramos JL, Gallegos MT, Marqués S, Ramos-González MI, Espinosa-Urgel M, Segura A. 2001. Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors. *Curr Op Microbiol.* 4: 166-171.
- Randall LL y Hardy SJ. 1977. Synthesis of exported proteins by membrane-bound polysomes from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem.* 75(1): 43-53.
- Rao SP, Alonso S, Rand L, Dick T, Pethe K. 2008. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105: 11945-11950.
- Ravenscroft N, Walker SG, Dutton GS, Smit J. 1991. Identification, isolation, and structural studies of extracellular polysaccharides produced by *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* 173: 5677-5684.
- Ray B. 1989. Injured index and pathogenic bacteria. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Raymond L, Kepner JR, Pratt JR. 1994. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol Rev.* 58 (4): 603-615.
- Reeve CA, Amy PS, Matin A. 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 160(3): 1041-1046.
- Reichert JL y Baumann P. 1973. Taxonomy of the marine luminous bacteria. *Arch Microbiol.* 94: 283-330.



- Rittershaus ESC, Baek SH, Sasseti CM. 2013. The normalcy of dormancy. *Cell Host Microbe*. 13(6): 643-651.
- Rivers B y Steck TR. 2001. Viable but nonculturable uropathogenic bacteria are present in the mouse urinary tract following urinary tract infection and antibiotic therapy. *Urol Res*. 29: 60-66.
- Robertson PAW, Calderon J, Carrera L, Stark JR, Zherdmant M, Austin B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vennamei* larvae. *Dis Aquat Organ*. 32: 151-155.
- Rozsak DB y Colwell RR. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev*. 51: 365-379.
- Roth WG, Leckie MP, Dietzler DN. 1988. Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine. *Appl Environ Microbiol*. 54: 3142-3146.
- Rowan NJ. 2004. Viable but non-culturable forms of food and waterborne bacteria: quo vadis? *Trends Food Sci Tech*. 15: 462-467.
- Rozen Y y Belkin S. 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microb Rev*. 725: 1-17.
- Saleem M, Fetzer I, Harms H, Chatzinotas A. 2013. Diversity of protists and bacteria determines predation performance and stability. *The ISME Journal*. 7: 1912-1921.
- Sampson RW, Swiatnicki SA, Osinga VL, Supita JL, McDermott CM, Kleinheinz GT. 2006. Effects of temperature and sand on *E. coli* survival in a northern lake water microcosm. *J Water Health*. 4: 389-393.
- Sanders RW, Caron DA, Berninger UG. 1992. Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters – An interecosystem comparison. *Mar Ecol Prog Ser*. 86: 1-14.
- Scheuerman PR, Schmidt JP, Alexander M. 1988. Factors affecting the survival and growth of bacteria introduced into lake water. *Arch Microbiol*. 150: 320-325.
- Schumann W. 1999. FtsH – a single-chain charonin? *FEMS Microbiol Rev*. 23: 1-11.
- Seco C. 2004. El estado viable no cultivable: interacciones con el medio circundante y caracterización molecular. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco.

- Sganga G, Cozza V, Spanu T, Spada PL, Fadda G. 2009.** Global climate change and wound care: Case study of an off-season *Vibrio alginolyticus* infection in a healthy man. *Ostomy Wound Manag.* 55(4): 60-62.
- Shen C-J, Kuo T-Y, Lin C-C, Chow L-P, Chen W-J. 2009.** Proteomic identification of membrane proteins regulating antimicrobial peptide resistance in *Vibrio parahaemolyticus*. *J Appl Microbiol.* 108: 1398-1407.
- Sherr EB y Sherr BF. 2002.** Phagotrophy in aquatic microbial food webs. En: Newell S (Ed) Manual of Environmental Microbiology II. pp 409–418. ASM Press, Washington, DC.
- Sherr BF, Sherr EB, Pedros-Alio C. 1989.** Simultaneous measurement of bacterioplankton production and protozoan bacterivory in estuarine water. *Mar Ecol Prog Ser.* 54: 209-219.
- Sherr BF, Sherr EB, Rassoulzadegan F. 1988.** Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: temperature dependence. *Appl Environ Microb.* 54 (5): 1091-1095.
- Sherr EB, Sherr BF, Sigmon CT. 1999.** Activity of marine bacteria under incubated and *in situ* conditions. *Aquat Microb Ecol.* 20: 213-223.
- Shih Y-L y Rothfield L. 2006.** The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(3): 729-754.
- Shleeva MO, Bagramyan K, Telkov MV, Mukamolova GV, Young, Kell DB, Kaprelyants AS. 2002.** Formation and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Rhodococcus rhodochrous* and *Mycobacterium tuberculosis* in prolonged stationary phase. *Microbiol.* 148: 1581-1591.
- Sieburth JMcN y Davis PG. 1982.** The role of heterotrophic nanoplankton in the grazing and nurturing of planktonic bacteria in the Sargasso and Caribbean Seas. *Ann Inst Oceanogr Paris.* 58: 285-296.
- Silhan J, Corfitzen CB, Albrechtsen HJ. 2006.** Effect of temperature and pipe material on biofilm formation and survival of *Escherichia coli* in used drinking water pipes: a laboratory-based study. *Water Sci Technol.* 54: 49-56.
- Silhavy JT, Kahne D, Walker S. 2010.** The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2: a000414.
- Silva JC, Denny R, Dorschel CA, Gorenstein M, Kass IJ, Li GZ, McKenna T, Nold MJ, Richardson K, Young P, Geromanos S. 2005.** Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem.* 77(7): 2187-2200.

- Silva JC, Gorenstein MV, Li GZ, Vissers JP, Geromanos SJ. 2006.** Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics*. 5(1): 144-156.
- Sinclair JL y Alexander M. 1984.** Role of resistance to starvation in bacterial survival in sewage and lake water. *Appl Environ Microbiol*. 48: 410-415.
- Singleton FL, Attwell R, Jangi S, Colwell RR. 1982.** Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Appl Environ Microbiol*. 44(5): 1047-1058.
- Sinton LW, Hall CH, Lynch PA, Davies-Colley RJ. 2002.** Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl Environ Microbiol*. 68: 1122-1131.
- SjØgren RE y Gibson MJ. 1981.** Bacterial survival in dilute environment. *Appl Environ Microbiol*. 41: 1331-1336.
- Skillman LC, Sutherland IW, Jones MV, Goulsbra A. 1998.** Green fluorescent protein as a novel species-specific marker in enteric dual-species biofilms. *Microbiol*. 144: 2095-2101.
- Sklar JG, Wu T, Gronenberg LS, Malinverni JC, Kahne D, Silhavy TJ. 2007.** Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *PNAS*. 104(15): 6400-6405.
- Smith B y Oliver JD. 2006.** *In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*. 72: 1445-1451.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Mark Welch D, Huse SM, Neal PR. 2006.** Microbial diversity in the deep sea and the underexplored 'rare biosphere'. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103: 12115-12120.
- Sonntag I, Scharz H, Henning U. 1978.** Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and the major outer membrane proteins. *J Bacteriol*. 136: 280-285.
- Soto Y y Bianchi M. 1988.** Bacterial abundance and growth in oligotrophic mediterranean seawater and Rhone river plume. *Marine Nature*. 1 (1): 15-20.
- Srinivasan S, Ostling J, Charlton T, de Nys R, Takayama K, Kjelleberg S. 1998.** Extracellular signal molecule(s) involved in the carbon starvation response of marine *Vibrio* sp. strain S14. *J Bacteriol*. 180: 201-209.
- Stephens C. 1998.** Bacterial sporulation: a question of commitment? *Curr Biol*. 8: 1245-1248.

- Stretton S, Danon SJ, Kjelleberg S, Goodman AE. 1997.** Changes in cell morphology and motility in the marine *Vibrio* sp. strain S14 during conditions of starvation and recovery. *FEMS Microbiol Lett.* 146: 23-29.
- Sun F, Chen J, Zhong L, Zhang X-h, Wang R, Guo Q, Dong Y. 2008.** Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*. *FEMS Microbiol Ecol.* 64: 37-44.
- Tarr CL, Patel JS, Pühr ND, Sowers EG, Bopp CA, Strockbine NA. 2007.** Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination. *J Clin Microbiol.* 45(1): 134-140.
- Thaithongnum S, Ratanama P, Weeradechapol K, Sukhoom A, Vuddhakul V. 2006.** Detection of *V. harveyi* in shrimp postlarvae and hatchery tank water by the Most Probable Number technique with PCR. *Aquaculture.* 261: 1-9.
- Thingstad T. 2000.** Control of bacterial growth in idealized food webs. En: Kirchman D (ed) *Microbial ecology of the oceans.* Wiley-Liss, New York.
- Thode SK, Kahlke T, Robertsen EM, Hansen H, Haugen P. 2015.** The immediate global responses of *Aliivibrio salmonicida* to iron limitations. *BMC Microbiol.* 15: 9.
- Thompson FL, Hoste B, Vandemeulbroecke K, Engelbeen K, Denys R, Swings J. 2002.** *Vibrio trachuri* Iwamoto y cols., 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson y Shunk, 1936) Baumann y cols., 1981. *Int J Syst Bacteriol.* 52: 973-976.
- Thompson CC, Vicente AC, Souza RC, Vasconcelos AT, Vesth T, Alves N Jr. y cols. 2009.** Genomic taxonomy of Vibrios. *BMC Evol Biol.* 9: 258. doi: 10.1186/1471-2148-9-258.
- Travers MA, Barbou A, Goïc NL, Huchette S, Paillard C, Koken M. 2008.** Construction of a stable GFP-tagged *Vibrio harveyi* strain for bacterial dynamics analysis of abalone infection. *FEMS Microbiol Lett.* 298: 34-40.
- Travers MA, Basuyaux O, Le Goic N, Huchette S, Nicolas JL, Koken M, Paillard C. 2009.** Influence of temperature and spawning effort on *Haliotis tuberculata* mortalities caused by *Vibrio harveyi*: an example of emerging vibriosis linked to global warming. *Glob Change Biol.* 15: 1365-1376.
- Troussellier M, Bonnefont JL, Courties C, Derrien A, Dupray E, Gauthier M, Gourmelon M, Joux F, Lebaron P, Martin Y, Pommepuy M. 1999.** Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanol Acta.* 21: 965-981.

- Unemoto T. 2000. Bioenergetics of marine bacteria-repiration-coupled  $\text{NA}^+$  pump. *Yakugaku Zasshi*. 120(1): 16-27.
- Vattakaven T, Bond P, Bradley G, Munn CB. 2006. Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*. *Appl Environ Microbiol*. 72: 6508-6513.
- Volokhina E, Grijpstra J, Beckers F, Lindh E, Robert V, Tommassen J, Bos MP. 2013. Species-specificity of the BamA component of the bacterial outer membrane protein-assembly machinery. *PLOS ONE*. 8(12): e85799.
- Wachi M, Doi M, Okada Y, Matsushashi M. 1989. New mre genes mreC and mreD, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cell. *J Bacteriol*. 171: 6511-6516.
- Wai SN, Mizunoe Y, Yoshida S-i. 1999. How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiol Lett*. 180(2): 123-131.
- Wang Z, Lin B, Mostaghim A, Rubin RA, Glaser ER, Mittraparp-arhorn P, Thompson JR, Uddhaku V, Vora GJ. 2013. *Vibrio campbellii* hmgA-mediated pyomelanization impairs quorum sensing, virulence, and cellular fitness. *Front Microbiol*. 379(4): 1-11.
- Weber A, Kogl SA, Jung K. 2006. Time-dependent proteome alterations under osmotic stress during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 188: 7165-7175.
- Weichart D, Oliver JD, Kjelleberg S. 1992. Low temperature induced nonculturability and killing of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Ecol*. 100: 205-210.
- Whitesides MD y Oliver DJ. 1997. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microbiol*. 64: 3025-3028.
- Whitman RL, Nevers MB, Korinek GC, Bvappanahalli MN. 2004. Solar and temporal effects on *Escherichia coli* concentration at a Lake Michigan swimming beach. *Appl Environ Microbiol*. 70: 4276-4285.
- Widanarni, Suwanto A, Sukenda, Lay BW. 2005. Construction of recombinant *Vibrio harveyi* to study its adherence in shrimp larvae. En: P. Walker, R. Lester and M. G. Bondad-Reantaso (eds). Diseases in Asian Aquaculture V, pp. 465-474. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila.
- Wilkins S, Millar M, Hemsworth S, Johnson G, Warwick S, Pizer B. 2007. *Vibrio harveyi* sepsis in a child with cancer. *Pediatr Blood and Cancer*. 50: 891-892.

- Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. 1997. Proteome research: New frontiers in functional genomics. Springer.
- Wolf P y Oliver JD. 1992. Temperature effects on the viable but nonculturable state of *Vibrio vulnificus*. *FEMS Microbiol Ecol*. 101: 33-39.
- Wong HC y Wang P. 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J Appl Microbiol*. 96: 359-366.
- 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.
- Wu L, Lin X, Wang F, Ye D, Xiao X, Wang S, Peng X. 2006. OmpW and OmpV are required for NaCl regulation in *Photobacterium damsela*. *J Proteome Res*. 5: 2250-2257.
- Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D. 2005. Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*. 121: 235-245.
- Xu C, Ren H, Wang S, Peng X. 2004. Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Res Microbiol*. 155: 835-842.
- Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. 1982. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol*. 8: 313-323.
- Xu C, Wang S, Ren H, Lin X, Wu L, Peng X. 2005. Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations. *Proteomics*. 5(12): 3142-3152.
- Yu F, Inouye S, Inouye M. 1986. Lipoprotein-28, a cytoplasmic membrane lipoprotein from *Escherichia coli*. Cloning, DNA sequence, and expression of its gene. *J Biol Chem*. 261: 2284-2288.
- Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FSL. 2010. PSORTb 3.0: Improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*. 26(13): 1608-1615.
- Yukselen MA, Calli B, Gokyay O, Saatci A. 2003. Inactivation of coliform bacteria in Black Sea waters due to solar radiation. *Environ Int*. 29: 45-50.

- Zhao P, Huang J, Wang X-H. 2012.** Comparative proteomics of two *Vibrio anguillarum* serotype O1 strains with different virulence phenotypes. *Curr Microbiol.* 65: 262-271.
- Zhong L, Chen J, Zhang XH, Jiang YA. 2009.** Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation. *Lett Appl Microbiol.* 48(2): 247-252.
- Ziprin RL, Droleskey RE, Hume ME, Harvey RB. 2003.** Failure of viable nonculturable *Campylobacter jejuni* to colonize the cecum of newly hatched leghorn chicks. *Avian Dis.* 47: 753-758.

# Anexos







## Abreviaturas

2D-PAGE: electroforesis bidimensional

AMN: agua de mar natural

AMA: agua de mar artificial

AM: agar marino

AN: agar nutritivo

ATCC: American Type Culture Collection

BCA: ácido bicinconínico

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CM: caldo marino

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria

CMB: Concentración Mínima Bactericida

DAPI: 4',6'-diamino-2-fenil indol

DTT: ditioneitol

GF: grupo funcional

HMDS: hexametildisilazano

IAA: iodoacetamida

IEF: isoelectroenfoque

IPG: *immobiline pH gradient* (Tiras de gradiente de pH inmovilizado)

LB: medio Luria-Bertani

MEMB-: células con membrana citoplasmática lesionada

MEMB+: células con membrana citoplasmática íntegra

MS: espectrometría de masas

nm: nanometro

pI: punto isoeléctrico

Pm: peso molecular

PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo

SDS: dodecil sulfato sódico

TBS: tampón salino Tris-HCl

TDC: total direct count (número total de células)

TSA: agar de triptona soja

TSB: caldo de triptona soja

UFC: unidades formadoras de colonias

VNC: viable no cultivable

## Medios de cultivo

### Caldo marino (CM)

Fórmula por litro:

Peptona 5 g  
Extracto de levadura 1 g  
Hierro citrato 0,1 g  
Cloruro sódico 19,45 g  
Magnesio cloruro 5,9 g  
Magnesio sulfato 3,24 g  
Calcio cloruro 1,8 g  
Potasio cloruro 0,55 g  
Sodio hidrógeno carbonato 0,16 g  
Potasio bromuro 0,08 g  
Estroncio cloruro 34 mg  
Ácido bórico 22 mg  
Sodio silicato 4 mg  
Sodio fluoruro 2,4 mg  
Amonio nitrato 1,6 mg  
di-Sodio hidrógeno fosfato 8 mg

pH final  $7,6 \pm 0,2$

Suspender 40 g en 1 litro de agua destilada calentando hasta ebullición y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para preparar agar marino añadir 15 g L-1 de agar y calentar hasta ebullición antes de esterilizar.

### Caldo de Triptona-Soja (TSB)

Fórmula por litro:

Peptona de caseína 17 g  
Peptona de soja 3 g  
Cloruro sódico 5 g  
di-Potasio hidrógeno fosfato 2,5 g  
Glucosa 2,5 g

pH final  $7,3 \pm 0,2$

Suspender 30 g en 1 litro de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para preparar agar TSA añadir 15 g L<sup>-1</sup> de agar y calentar hasta ebullición antes de esterilizar.

### **Medio Luria-Bertani (LB)**

Fórmula por litro:

Peptona de caseína 10 g

Extracto de levadura 5 g

Cloruro sódico 10 g

pH final 7,0 ± 0,2

Suspender 25 g en 1 litro de agua destilada y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Para preparar agar LB añadir 15 g L<sup>-1</sup> de agar y calentar hasta ebullición antes de esterilizar.

### **Agar Nutritivo (AN)**

Fórmula por litro:

Extracto de carne de res 3 g

Peptona de gelatina 5 g

Agar 15 g

pH final 6,8 ± 0,2

Suspender 23 g en 1 litro de agua destilada calentando hasta ebullición y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

## Soluciones

### Tampón salino Tris-HCl 1x (TBS)

Fórmula por litro:

Tris-HCl 3 g  
Cloruro sódico 8,8 g  
Cloruro potásico 0,2 g

Disolver en 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 7,5 con una solución de HCl al 37 %. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos y almacenar a 4°C.

### Lugol (Sherr y col., 1988)

Concentración final 0,5 % (v/v)

Iodina 10 g  
Yoduro de potasio 20 g  
Acetato sódico 10 g  
Agua destilada 140 ml

Mezclar todos los compuestos mediante agitación y almacenar a 4°C.

### Formalina tamponada

Concentración final 3 % (v/v)

Formaldehído al 37 % 100 ml  
Tetraborato sódico 20 g

Disolver mediante agitación durante 1 hora y dejar reposar durante 24 horas. Filtrar a través de un filtro de polietersulfona de 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore). Almacenar a temperatura ambiente.

### Glutaraldehído (Raymond y col., 1994)

Concentración al 10 % (v/v)

Tampón fosfato de Sorensen 0,1 M (pH 7,4) 6 ml  
Glutaraldehído al 25 % 4 ml

Mezclar las soluciones mediante agitación y almacenar a 4°C en oscuridad como máximo 3 semanas.

### Agua de mar artificial (Farmer III JJ y Hickman-Brenner FW, 2006)

Fórmula MacLeod's

Cloruro sódico 23,38 g  
Sulfato magnésico 24,65 g  
Cloruro potásico 1,49 g  
Cloruro cálcico 2,94 g

Disolver los compuestos en 1 L de agua destilada, resultando una solución incolora de un pH aproximado a 6,6. Dispensarlo en botellas o tubos con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. La solución final debe ser incolora y libre de cristales sin disolver. Almacenar a temperatura ambiente.

### Tampón fosfato de Sorensen 0,1 M

Concentración 0,1 M

Fosfato sódico dibásico 28,39 g  
Fosfato sódico monobásico 24 g

Se disuelve cada compuesto por separado en un litro de agua destilada para obtener cada solución al 0,2 M. A continuación, se mezclan 40,5 ml de la solución de fosfato sódico dibásico y 9,5 ml de la solución fosfato sódico monobásico para obtener el tampón de Sorensen a 0,1 M y pH 7,4.

### Tampón de isoelectroenfoco

Urea 7 M  
Tiourea 2 M  
ASB-14 1 % [p/v]  
Tris 40 mM  
TCEP-HCl 2 mM  
Anfolitos3-10 0,5 % [v/v]

### Tampón de rehidratación

Urea 8 M  
Triton X-100 0,5 % [v/v]  
Orange G o Azul de Bromofenol trazas

Añadir en el momento de uso:

Anfolitos3-10 0,6 % [v/v]

$\beta$ -mercaptoetanol 0,2 % [v/v]

### **Tampón de equilibrado**

Dodecil sulfato sódico (SDS) 2 %

Tris-HCl pH 6,8 50 mM

Urea 6 M

Glicerol 30 % [v/v]

Azul de bromofenol 0,0002 g

### **Solución I (de lavado)**

Metanol 40 % [v/v]

Acido acético glacial 10 % [v/v]

### **Solución II (de fijación)**

Etanol 100 ml

Acido acético glacial 25 ml

Ajustar a 250 ml con agua bidestilada.

### **Solución III (de sensibilización)**

Etanol 75 ml

Tiosulfato sódico (5 % [p/v]) 10 ml

Acetato sódico 17 g

Ajustar a 250 ml con agua bidestilada.

### **Reactivo de plata**

Nitrato de plata (2,5 % [p/v]) 25 ml

Formaldehído (37 % [p/v]) 0,1 ml

Ajustar a 250 ml con agua bidestilada.



**Solución IV (de revelado)**

Carbonato sódico 6,25 g

Formaldehído (37 % [p/v]) 0,05 ml

Ajustar a 250 ml con agua bidestilada.

**Solución V (de parada)**

EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 3,65 g

Ajustar a 250 ml con agua bidestilada.

**Tabla A1.** Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* mantenidas en agua de mar a 4°C en condiciones de oscuridad. Se tomaron muestras del inicio de las experiencias (P1), durante el periodo de adaptación de las bacterias a las condiciones expuestas (P1.1 y P2) y cuando la población se encontraba en estado VNC (P3).

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P1.1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
A7MRS3	Acetyl coenzyme A synthetase 2	C	1	0,24	1	0,08	0	0	1	0,72
A7MRT5	Peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein	C	2	9,11	2	18,21	3	12,92	3	5,44
A7MRW7	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	1,72	0	0	0	0	0	0
A7MS06	Flagellin	C	2	3,47	2	0,97	0	0	0	0
A7MS80	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	C	1	1,84	0	0	1	4,07	3	5,34
A7MSA3	Rod shape-determining protein MreB	C	3	1,88	0	0	0	0	0	0
A7MSB3	PhoH-like ATPase	C	0	0	0	0	0	0	1	2,69
A7MSK6	OtnA protein	C	1	3,04	2	1,75	0	0	1	3,62
A7MSR7	Biopolymer transporter ExbB	C	1	2,14	2	1,76	1	5,38	0	0
A7MSR9	TonB-dependent receptor	C	2	2,11	2	2,48	2	0,32	2	0,56
A7MST9	T2SS/secretion-dependent pathway protein GspG	C	2	4,03	2	2,97	0	0	0	0
A7MT32	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	C	1	2,39	2	3,18	0	0	0	0
A7MT33	Citrate synthase	C	2	6,99	3	6,90	0	0	0	0
A7MT34	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	C	2	3,65	3	4,31	2	6,79	2	5,42
A7MT35	2-oxoglutarate dehydrogenase E1	C	1	4,45	1	3,66	0	0	0	0
A7MT36	Succinate dehydrogenase Cytochrome b556 large membrane subunit	C	1	2,453	1	3,615	0	0	0	0
A7MT37	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	C	3	6,00	3	7,40	2	1,78	2	3,80
A7MT41	PTS N-acetylmuramic acid transporter subunit IIBC	C	3	4,29	2	2,04	2	2,01	2	1,98
A7MT48	Asparagine synthetase B	C	1	2,59	1	4,45	1	3,40	0	0
A7MT59	Protease	C	3	9,10	3	6,42	3	9,33	3	6,02
A7MT90	Peroxiredoxin (alkyl hydroperoxide reductase subunit C)	C	2	1,90	3	3,81	2	10,87	3	5,35
A7MTB2	Outer membrane protein assembly factor BamD	C	2	1,867	0	0	0	0	0	0
A7MTD3	Putative uncharacterized protein	C	2	11,03	0	0	1	1,67	3	15,36
A7MTH1	Hypothetical protein	C	1	15,87	2	8,68	1	2,13	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A1. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P1.1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
A7MTQ5	Transketolase	C	1	3,69	1	4,98	0	0	0	0
A7MTT2	Enolase 1	C	2	3,16	1	1,71	0	0	0	0
A7MTU5	Glutamine synthetase	C	0	0	0	0	0	0	1	1,24
A7MU52	Preprotein translocase subunit YajC	C	3	4,37	3	4,01	2	5,13	0	0
A7MU53	Protein translocase subunit SecD	C	3	2,90	3	2,09	2	12,67	0	0
A7MU67	MSHA biogenesis protein MshL	C	2	2,92	2	2,37	2	2,88	0	0
A7MUA2	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	2,02	2	1,24	0	0	0	0
A7MUH6	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	C	1	6,71	3	4,14	0	0	0	0
A7MUJ8	Acetaldehyde dehydrogenase	C	2	4,12	3	5,49	3	12,75	2	3,78
A7MUV4	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	C	3	4,97	2	3,45	3	7,70	0	0
A7MUX4	Elongation factor G 2	C	2	5,53	3	5,80	2	2,10	2	3,46
A7MV20	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC/ME	2	0,98	0	0	0	0	0	0
A7MV23	Putative uncharacterized protein	C	0	0	2	3,94	0	0	0	0
A7MV25	Membrane protein	C	3	7,83	3	9,85	3	69,22	2	2,84
A7MV83	Lon protease	C	2	1,94	0	0	0	0	1	0,58
A7MV86	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	C	3	3,85	2	2,59	3	9,49	2	4,26
A7MVE6	AsmA protein	C	2	14,29	0	0	0	0	0	0
A7MVF4	Ribonuclease E	C	3	3,61	1	1,82	0	0	0	0
A7MVF7	PTS glucose transporter subunit IIBC	C	3	19,07	3	18,31	2	18,123 i	2	19,25
A7MVN5	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	0,11	2	3,44	0	0	0	0
A7MW50	Outer membrane protein, adhesin transport system	C	3	8,11	2	3	3	8,79	3	89,61
A7MWH8	Preprotein translocase subunit secY	C	1	1,19	1	2,52	0	0	0	0
A7MWL3	Ubiquinol cytochrome c reductase iron sulfur subunit	C	3	6,22	3	7,12	2	3,86	3	25,60
A7MWL4	Cytochrome b	C	2	7,34	3	4,85	2	2,45	0	0
A7MWL5	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit	C	3	10,20	3	7,31	3	4,90	3	6,31
A7MWM7	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit III	C	3	5,82	3	7,43	3	10,66	3	7,40
A7MWN4	Outer membrane channel protein	C	3	12,34	3	10,07	2	14,17	3	17,16
A7MWS3	Pyruvate kinase	C	1	3,86	1	1,51	1	3,16	0	0
A7MX44	Alanine dehydrogenase	C	3	4,59	3	5,24	2	3,81	2	20,58

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A1. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P1.1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
A7MX68	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	0,43	0	0	0	0	0	0
A7MX72	Putative uncharacterized protein	C	2	3,45	3	3,32	3	5,74	2	7,92
A7MX83	Adenylosuccinate synthetase 1	C	0	0	3	2,107	1	0,668	0	0
A7MX85	Ribonuclease R	C	2	3,51	0	0	0	0	1	2,17
A7MX87	Protein HflC (serine protease)	C	3	5,09	3	5,02	2	5,66	0	0
A7MX88	Membrane protease HflK (serine protease)	C	3	7,94	3	6,41	3	2,64	2	5,83
A7MX91	Transcriptional regulator (cAMP-regulatory protein)	C	2	5,11	3	4,12	0	0	3	4,97
A7MX99	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	C	3	7,50	3	8,72	3	7,22	3	8,07
A7MXB4	Bacterioferritin	C	0	0	0	0	2	1,24	2	2,68
A7MXI1	Acetyl-coenzyme A synthetase	C	1	4,71	3	5,41	0	0	1	2,39
A7MXI2	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	C	1	1,61	0	0	1	3,77	0	0
A7MXJ5	Anaerobic C4-dicarboxylate transporter DcuA	C	2	1,96	0	0	1	3,17	0	0
A7MXQ5	Cell division protein ftsZ	C	0	0	1	1,84	0	0	0	0
A7MXU6	Uroporphyrin-III C-methyltransferase	C	3	3,59	3	3,63	1	1,79	0	0
A7MXU7	Heme biosynthesis protein HemY	C	2	3,76	1	2,21	0	0	1	8,35
A7MXZ2	Outer membrane protein assembly factor BamA	C	2	1,17	2	1,47	0	0	0	0
A7MY40	Outer membrane protein assembly factor BamC	C	1	0,62	1	1,35	0	0	2	1,60
A7MY64	Membrane protein	C	1	1,569	0	0	0	0	0	0
A7MY71	5'-nucleotidase	C	3	16,55	3	24,61	3	12,30	3	93,92
A7MY78	Ribose phosphate pyrophosphokinase	C	3	4,46	3	3,36	2	4,18	2	3,90
A7MYA4	Serine hydroxymethyltransferase	C	0	0	1	2,05	0	0	1	3,35
A7MYB0	Lipoprotein	C	3	3,93	3	4,77	3	17,03	3	9,98
A7MYE8	Putative uncharacterized protein	C	1	6,28	2	5,165	0	0	0	0
A7MYT7	Protein RecA	C	2	2,27	1	2,76	1	0,28	0	0
A7MYU4	Oxaloacetate decarboxylase, alpha subunit	C	3	8,60	3	7,11	3	6,15	3	11,54
A7MYW3	Dihydrolipoyl dehydrogenase	C	2	4,23	1	2,79	0	0	0	0
A7MYX7	Aconitate hydratase 2	C	1	2,10	1	1,90	0	0	0	0
A7MZ17	multidrug transporter	C	0	0	2	1,38	0	0	0	0
A7MZ54	Acetylornithine aminotransferase	C	1	4,62	3	3,38	0	0	0	0
A7MZE3	membrane protein	C	0	0	1	3,22	0	0	0	0
A7MZI6	Transcription elongation factor NusA	C	1	2,18	0	0	0	0	1	3,71

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplásmica; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A1. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P1.1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
A7MZL8	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	0,75	0	0	0	0	0	0
A7MZM8	Outer membrane protein, adhesin transport system	C	3	5,56	3	4,30	3	7,02	3	4,55
A7MZN4	PrkA family serine protein kinase	C	3	5,53	3	4,54	2	4,93	2	13,81
A7N0H9	50S ribosomal protein L17	C	1	12,28	0	0	0	0	1	0,762
A7N0L5	Glutamate dehydrogenase	C	3	3,427	3	3,51	0	0	0	0
A7N0Q1	Cytochrome c oxidase cbb3-type subunit III	C	3	16,43	2	11,52	3	7,40	2	44,43
A7N0Q3	Transcription termination factor Rho	C	1	7,26	1	3,27	0	0	3	5,39
A7N0V5	Transcription termination factor Rho	C	1	1,13	0	0	0	0	1	0,33
A7N159	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit alpha	C	1	2,81	1	4,04	1	1,56	0	0
A7N1D0	Quinone oxidoreductase	C	2	1,84	2	1,12	2	1,24	2	0,86
A7N111	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I	C	3	13,93	3	13,87	2	10,57	2	4,58
A7N112	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II	C	2	16,39	0	0	0	0	0	0
A7N115	Hypothetical protein	C	1	2,84	0	0	0	0	1	7,92
A7N1N1	Keto-acid formate acetyltransferase (pyruvate-formate lyase)	C	1	3,51	2	4,35	0	0	1	0,69
A7N1S9	Uncharacterized lipoprotein	C	3	6,55	3	5,39	3	10,89	2	3,62
A7N1T8	Nucleoside-specific channel-forming protein	C	2	27,24	2	37,31	2	3,02	3	2,01
A7N1Z8	Transketolase	C	1	0,20	2	2,68	0	0	0	0
A7N1Z9	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	2,30	0	0	0	0	0	0
A7N282	Oligopeptidase B	C	1	0,42	1	1,84	0	0	0	0
A7N299	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	C	2	27,90	3	35,12	0	0	3	5,78
A7N2H6	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC/ME	2	0,83	0	0	0	0	0	0
A7N349	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	1,09	0	0	0	0	0	0
A7N3F7	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	0,43	0	0	0	0	0	0
A7N3I2	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	1	0,77	0	0	0	0	0	0
A7N3S6	Hypothetical protein	C/ME	0	0	1	3,46	0	0	0	0
A7N3U0	Alcohol dehydrogenase	MC	3	3,03	3	6,14	3	88,35	3	4,41
A7N3U3	Histidine kinase/response regulator hybrid protein	MC	2	0,43	0	0	0	0	0	0
A7N3W8	Methyl-accepting chemotaxis protein	ME	2	0,34	0	0	0	0	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

Tabla A1. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P1.1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
A7N3X4	Hypothetical protein	MC	1	4,09	2	4,22	1	4,06	0	0
A7N3X6	Polyhydroxyalkanoic acid synthase PhaC	MC	0	0	1	2,75	0	0	0	0
A7N4P4	Type VI secretion system protein ImpB	MC	2	4,13	3	2,8	2	14,31	2	3,76
A7N4P7	Type VI secretion system protein ImpC	MC	3	4,83	2	4,78	1	2,83	0	0
A7N4V7	Phosphoenolpyruvate synthase	MC	2	4,89	2	3,68	3	44,95	3	5,08
A7N542	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	MC	2	5,31	3	5,15	2	5,26	0	0
A7N5I8	Prolyl oligopeptidase	MC	3	6,18	3	8,18	3	12,86	3	5,71
A7N5J5	Outer membrane protein W	MC	3	61,85	3	64,13	2	10,74	1	1,85
A7N5R0	Maltose operon periplasmic protein	MC	2	3,26	2	2,47	2	2,45	2	1,59
A7N5T3	Hypothetical protein	MC	3	5,56	1	3,69	1	1,11	0	0
A7N6B9	Phosphate ABC transporter ATP-binding protein	MC	0	0	1	2,026	0	0	0	0
A7N6D3	Murein lipoprotein	MC	3	78,24	3	64,29	2	15,84	3	11,95
A7N6F4	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	0,11	2	0,83	0	0	0	0
A7N6H4	Outer membrane protein porin	MC	3	19,96	3	33,24	2	3,10	2	4,81
A7N6I6	OmpA-OmpF porin, OOP family	MC	3	25,20	3	24,09	2	25,12	2	20,00
A7N6X1	Tryptophanase	MC	0	0	1	1,58	0	0	1	3,01
A7N6X4	Na translocating NADH quinone reductase subunit B 2	MC	2	5,27	2	4,86	0	0	0	0
A7N710	Polysaccharide export outer membrane protein	MC	2	3,27	2	1,64	0	0	2	6,39
A7N7A7	Lysine type translocator	MC	3	5,33	1	12,09	2	6,46	2	2,34
A7N7A9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	MC	1	4,70	2	1,93	0	0	0	0
A7N7M8	Bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	MC	3	4,90	3	5,29	0	0	2	4,91
A7N7N0	Sodium/proline symporter	MC	2	11,16	2	2,07	0	0	0	0
A7N7N5	Diguanylate cyclase	MC	2	2,80	3	2,03	3	9,64	3	5,65
A7N839	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	0,90	2	0,86	0	0	0	0
A7N8K0	Aromatic amino acid aminotransferase	MC	2	3,73	3	2,66	3	9,02	3	5,02
ACKA	Acetate kinase	MC	0	0	1	1,78	0	0	1	2,75
ACP	Acyl carrier protein	MC	0	0	0	0	0	0	3	14,40
ATPA1	ATP synthase subunit alpha 1	MC	3	14,92	3	8,86	2	4,46	3	3,35
ATPA2	ATP synthase subunit alpha 2	MC	2	1,54	2	0,83	2	0,78	2	0,60

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

Tabla A1. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P1.1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
ATPB1	ATP synthase subunit beta 1	MC	3	9,47	3	6,56	2	3,12	3	6,58
ATPB2	ATP synthase subunit beta 2	MC	2	0,10	2	0,09	2	2,73	2	0,38
ATPF1	ATP synthase subunit b 1	MC	3	12,77	3	13,23	2	8,54	2	5,37
BTUB	Vitamin B12 transporter BtuB	MC	3	4,38	3	5,90	2	7,77	2	3,34
DEOC	Deoxyribose phosphate aldolase	MC	1	4,70	1	2,21	0	0	2	1,82
DNAK	Chaperone protein DnaK	MC	3	2,96	2	3,25	1	14,26	2	4,56
EFTS	Elongation factor Ts	MC/ EX	2	1,17	2	1,94	3	13,33	3	57,34
EFTU	Elongation factor Tu	MC/P	3	38,14	3	63,40	3	65,69	3	2,90
GRCA	Autonomous glycyl radical cofactor	MC/P	0	0	0	0	0	0	3	4,99
GSA	Glutamate 1 semialdehyde 2 1 aminomutase	EX	1	4,36	1	2,21	0	0	2	1,78
IF2	Translation initiation factor IF 2	EX	2	3,48	0	0	0	0	0	0
LAMB	Maltoporin	NC	3	9,19	3	9,05	2	9,12	2	9,73
MDH	Malate dehydrogenase	NC	3	8,27	3	3,59	2	4,72	3	5,24
METK	S adenosylmethionine synthase	NC	2	2,50	2	1,54	2	3,84	2	6,55
NQRA	Na translocating NADH quinone reductase subunit A	ME	3	5,41	3	5,71	2	2,86	2	1,87
NQRB	Na translocating NADH quinone reductase subunit B	ME	0	0	1	7,87	0	0	0	0
NQRC	Na translocating NADH quinone reductase subunit C	ME	2	2,42	2	3,34	0	0	0	0
NQRF	Na translocating NADH quinone reductase subunit F	ME	3	9,87	3	8,63	3	11,50	3	5,72
OXAA	Inner membrane protein oxaA	ME	3	5,22	3	3,93	3	7,06	2	4,23
PCKA	Phosphoenolpyruvate carboxykinase ATP	ME	2	9,65	2	2,93	3	10,60	2	2,58
PGK	Phosphoglycerate kinase	ME	0	0	0	0	0	0	1	4,19
PURR	HTH type transcriptional repressor purR	ME	1	0,62	0	0	0	0	2	3,85
RISB	6 7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase	ME	3	3,40	3	5,30	2	2,53	3	3,51
RL14	50S ribosomal protein L14	ME	1	2,96	3	2,94	0	0	0	0
RL15	50S ribosomal protein L15	ME	2	11,47	0	0	0	0	3	1,85
RL16	50S ribosomal protein L16	ME	2	11,04	1	4,78	0	0	1	4,35
RL2	50S ribosomal protein L2	ME	3	14,08	3	4,60	3	13,66	3	15,21
RL20	50S ribosomal protein L20	ME	3	9,97	3	8,95	3	9,65	3	2,65
RL21	50S ribosomal protein L21	ME	1	9,19	0	0	0	0	0	0
RL3	50S ribosomal protein L3	ME	2	7,86	0	0	0	0	0	0
RL4	50S ribosomal protein L4	ME	2	8,94	0	0	0	0	0	0
RL5	50S ribosomal protein L5	ME	3	6,79	3	7,34	3	4,05	3	8,59

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A1. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P1.1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
RL7	50S ribosomal protein L7 L12	ME/C	1	1,20	0	0	0	0	1	4,17
RPOB	DNA directed RNA polymerase subunit beta	P	1	1,89	2	3,47	0	0	2	4,52
RPOC	DNA directed RNA polymerase subunit beta	P	3	6,02	3	5,52	0	0	3	18,77
RS11	30S ribosomal protein S11	P	3	7,39	1	5,41	0	0	3	5,42
RS12	30S ribosomal protein S12	P	2	6,22	3	4,82	3	56,52	3	10,75
RS14	30S ribosomal protein S14	P/C	2	5,10	1	2,97	0	0	0	0
RS18	30S ribosomal protein S18	IN	3	5,21	3	5,5	0	0	0	0
RS2	30S ribosomal protein S2	IN	3	10,16	3	6,92	3	12,59	3	9,75
RS21	30S ribosomal protein S21	IN	2	6,91	0	0	0	0	0	0
RS3	30S ribosomal protein S3	IN	3	22,15	3	14,24	2	3,57	3	6,31
RS4	30S ribosomal protein S4	IN	3	12,07	3	4,10	3	43,06	3	5,53
RS9	30S ribosomal protein S9	IN	1	10,97	1	4,71	0	0	0	0
SUCC	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit beta	IN	1	2,74	3	34,47	0	0	1	4,16
SYD	Aspartyl tRNA synthetase	IN	1	1,67	1	1,63	0	0	3	36,14
TAL	Transaldolase	IN	3	2,95	0	0	0	0	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".



**Tabla A2.** Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* mantenidas en agua de mar a 20°C en condiciones de oscuridad. Se tomaron muestras del inicio de las experiencias (P1), durante el periodo de adaptación de las bacterias a las condiciones expuestas (P2) y cuando la población se encontraba en estado VNC (P3).

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7MRS3	Acetyl coenzyme A synthetase 2	C	2	4,17	0	0	0	0
A7MRT5	Peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein	C	2	8,26	0	0	0	0
A7MRW7	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	1,72	0	0	0	0
A7MSA3	Rod shape-determining protein MreB	C	2	1,49	3	2,23	0	0
A7MSR7	Biopolymer transporter ExbB	MC	2	8,61	2	8,76	2	7,02
A7MSR9	TonB-dependent receptor	ME	3	10,26	2	1,98	3	31,39
A7MST9	T2SS/secretion-dependent pathway protein GspG	MC	2	4,00	2	6,41	0	0
A7MT33	Citrate synthase	C	2	8,99	1	2,61	0	0
A7MT34	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	C	2	2,42	2	1,07	2	0,77
A7MT37	Dihydropyridyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	C	3	8,50	3	7,17	0	0
A7MT41	PTS N-acetylmuramic acid transporter subunit IIBC	C	2	2,67	0	0	0	0
A7MT59	Protease	C	3	11,44	3	11,03	3	11,20
A7MT90	Peroxiredoxin (alkyl hydroperoxide reductase subunit C)	C	2	1,49	0	0	0	0
A7MTB2	Outer membrane protein assembly factor BamD	C	2	1,11	0	0	0	0
A7MTQ5	Transketolase	C	1	79,19	2	0,91	0	0
A7MU52	Preprotein translocase subunit YajC	C	3	5,45	3	4,47	2	10,03
A7MU53	Protein translocase subunit SecD	MC	2	2,23	2	3,50	0	0
A7MU67	MSHA biogenesis protein MshL	MC	2	2,73	2	3,08	2	7,33
A7MUA2	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	3	0,96	0	0	0	0
A7MUH6	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	C	2	6,55	3	11,90	2	8,25
A7MUJ8	Acetaldehyde dehydrogenase	C	1	3,26	3	6,08	0	0
A7MUV4	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	MC	2	3,70	2	4,03	0	0
A7MUX4	Elongation factor G 2	C	1	4,87	2	7,91	0	0
A7MV20	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC/ME	2	1,49	0	0	0	0
A7MV23	Putative uncharacterized protein	C	1	6,56	0	0	2	8,52
A7MV25	Membrane protein	IN	2	11,31	2	12,37	0	0
A7MVE2	Phosphate acetyltransferase	C	2	3,00	2	4,09	0	0
A7MVF7	PTS glucose transporter subunit IIBC	MC	3	35,81	3	26,70	3	37,55
A7MVN5	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	0,11	0	0	0	0
A7MW50	Outer membrane protein, adhesin transport system	ME	2	4,41	3	13,05	2	22,15
A7MWL3	Ubiquinol cytochrome c reductase iron sulfur subunit	MC	2	4,23	2	13,81	0	0
A7MWL4	Cytochrome b	C	2	4,18	2	2,45	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A2. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7MWL5	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit	NC	2	14,48	3	13,77	0	0
A7MWM7	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit III	MC	3	6,66	3	9,01	0	0
A7MWN4	Outer membrane channel protein	ME	3	11,50	3	12,63	3	32,70
A7MWS3	Pyruvate kinase	C	3	5,70	3	5,60	0	0
A7MWS5	Glutamine--fructose-6-phosphate aminotransferase	C	2	4,72	0	0	0	0
A7MX44	Alanine dehydrogenase	C	3	5,81	0	0	0	0
A7MX68	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	0,34	0	0	0	0
A7MX87	Protein HflC (serine protease)	C	2	8,08	3	8,39	2	11,11
A7MX88	Membrane protease HflK (serine protease)	IN	3	7,919	3	9,14	3	14,663
A7MX91	Transcriptional regulator (cAMP-regulatory protein)	C	2	5,78	1	2,95	0	0
A7MX99	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	P	3	10,15	3	8,70	0	0
A7MXB4	Bacterioferritin	C	0	0	0	0	0	0
A7MXI1	Acetyl-coenzyme A synthetase	C	2	2,09	2	2,89	0	0
A7MXU6	Uroporphyrin-III C-methyltransferase	MC	3	3,95	3	3,78	0	0
A7MXZ2	Outer membrane protein assembly factor BamA	C	3	1,88	3	1,98	0	0
A7MY71	5'-nucleotidase	P	3	20,55	3	21,64	3	38,44
A7MY78	Ribose phosphate pyrophosphokinase	C	2	5,95	3	5,21	0	0
A7MYB0	Lipoprotein	MC	2	4,67	3	6,66	3	14,12
A7MYE8	Putative uncharacterized protein	NC	0	0	1	7,69	2	14,69
A7MYT7	Protein RecA	C	2	2,51	2	3,40	0	0
A7MYU4	Oxaloacetate decarboxylase, alpha subunit	C	3	10,24	2	5,09	0	0
A7MZL8	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	0,75	0	0	0	0
A7MZM8	Outer membrane protein, adhesin transport system	ME	3	13,77	3	21,94	3	58,56
A7MZN4	PrkA family serine protein kinase	C	3	7,80	0	0	0	0
A7N0Q1	Cytochrome c oxidase cbb3-type subunit III	MC	2	16,26	3	17,89	0	0
A7N1D0	Quinone oxidoreductase	C	2	3,04	2	2,43	0	0
A7N1I1	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I	MC	2	20,65	3	12,42	2	11,67
A7N1I2	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II	C	2	14,35	0	0	0	0
A7N1I7	ATP-dependent Zn protease	C	1	4,81	2	1,98	0	0
A7N1S9	Uncharacterized lipoprotein	NC	2	5,28	2	8,20	2	7,11
A7N1T8	Nucleoside-specific channel-forming protein	ME	2	63,20	2	43,08	0	0
A7N1Z8	Transketolase	C	2	8,41	3	5,60	0	0
A7N1Z9	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	1,48	0	0	0	0
A7N299	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	IN	1	8,87	3	19,24	0	0
A7N2H6	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC/ ME	2	0,72	0	0	0	0
A7N2P7	Membrane protein	C	0	0	0	0	2	7,46
A7N349	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	0,14	0	0	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A2. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7N3F7	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	0,68	0	0	0	0
A7N3U0	Alcohol dehydrogenase	C	3	9,87	2	3,84	0	0
A7N3U3	Histidine kinase/response regulator hybrid protein	MC	2	0,46	0	0	0	0
A7N3W8	Methyl-accepting chemotaxis protein	ME	2	0,34	0	0	0	0
A7N4V7	Histidine kinase/response regulator hybrid protein	C	3	7,49	2	2,62	0	0
A7N542	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	MC	2	5,49	2	7,35	0	0
A7N5D6	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	C/MC	0	0	2	1,982	0	0
A7N5I8	Prolyl oligopeptidase	C	3	5,46	3	8,88	2	8,87
A7N5J5	Outer membrane protein W	ME	3	52,24	2	51,07	3	138,68
A7N5R0	Maltose operon periplasmic protein	MC	3	2,57	3	2,732	2	1,56
A7N6D3	Murein lipoprotein	ME	3	136,49	3	150,38	3	283,07
A7N6F4	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	0,201	0	0	0	0
A7N6H4	Outer membrane protein porin	ME	3	20,88	3	39,93	3	47,72
A7N6I6	OmpA-OmpF porin, OOP family	ME	3	30,70	3	36,48	2	67,15
A7N6X4	Na translocating NADH quinone reductase subunit B 2	MC	2	3,49	2	2,17	0	0
A7N710	Polysaccharide export outer membrane protein	ME	2	4,91	0	0	0	0
A7N7A7	Lysine type translocator	MC	2	14,12	2	14,25	2	14,75
A7N7M8	Bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	C	3	7,27	0	0	0	0
A7N7N0	Sodium/proline symporter	MC	2	2,55	3	2,28	0	0
A7N839	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	1,38	0	0	0	0
ATPA1	ATP synthase subunit alpha 1	C	3	17,47	3	14,74	2	3,65
ATPA2	ATP synthase subunit alpha 2	C	2	0,28	2	2,64	0	0
ATPB1	ATP synthase subunit beta 1	C	3	14,9	3	15,11	0	0
ATPB2	ATP synthase subunit beta 2	C	2	7,66	2	0,43	0	0
ATPF1	ATP synthase subunit b 1	MC	3	9,13	3	9,55	2	4,34
BTUB	Vitamin B12 transporter BtuB	MC	3	3,23	3	2,64	3	5,15
EFTS	Elongation factor Ts	MC/EX	3	2,07	3	5,82	0	0
EFTU	Elongation factor Tu	C	3	63,19	3	74,98	3	46,68
IF2	Translation initiation factor IF 2	C	0	0	3	4,95	0	0
LAMB	Maltoporin	ME	1	6,12	3	10,29	1	17,79
MDH	Malate dehydrogenase	MC/P	2	9,27	0	0	0	0
METK	S adenosylmethionine synthase	C	2	3,40	1	3,66	0	0
NQRA	Na translocating NADH quinone reductase subunit A	C	2	2,18	2	7,05	0	0
NQRC	Na translocating NADH quinone reductase subunit B 2	IN	2	1,99	2	3,36	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A2. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
NQRF	Na translocating NADH quinone reductase subunit F	C	3	6,26	3	5,19	0	0
RISB	6 7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase	C	2	7,73	0	0	0	0
RL14	50S ribosomal protein L14	C	0	0	3	2,63	0	0
RL16	50S ribosomal protein L16	C	1	7,01	2	5,58	0	0
RL2	50S ribosomal protein L2	C	3	7,91	1	6,88	0	0
RL20	50S ribosomal protein L20	C	2	5,92	1	5,02	0	0
RL3	50S ribosomal protein L3	C	0	0	3	6,41	0	0
RL5	50S ribosomal protein L5	C	3	8,85	3	7,44	0	0
RPOC	DNA directed RNA polymerase subunit beta	C	2	5,45	2	5,50	0	0
RS11	30S ribosomal protein S11	C	1	5,75	2	4,79	0	0
RS12	30S ribosomal protein S12	C	3	5,88	3	4,73	0	0
RS2	30S ribosomal protein S2	C	3	9,72	2	5,42	0	0
RS3	30S ribosomal protein S3	C	3	15,83	3	15,29	0	0
RS4	30S ribosomal protein S4	C	2	11,00	3	14,22	0	0
RS5	30S ribosomal protein S5	C	0	0	2	2,71	0	0
RS9	30S ribosomal protein S9	C	2	6,65	2	4,80	0	0
SUCC	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit beta	C	2	72,12	0	0	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana ciroplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplásmica; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

**Tabla A3.** Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* mantenidas en agua de mar a 20°C bajo radiación visible. Se tomaron muestras del inicio de las experiencias (P1), durante el periodo de adaptación de las bacterias a las condiciones expuestas (P2) y cuando la población se encontraba en estado VNC (P3).

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7MRS3	Acetyl coenzyme A synthetase 2	C	2	2,65	0	0	0	0
A7MRT4	Protein TolB	P	1	1,55	2	1,53	3	2,13
A7MRT5	Peptidoglycan-associated outer membrane lipoprotein	ME	3	13,49	3	17,59	3	25,83
A7MRW7	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	1,72	2	3,98	0	0
A7MS06	Flagellin	EX	3	0,96	0	0	0	0
A7MS08	Flagellin	EX	3	0,46	2	0,33	0	0
A7MS31	RNA polymerase sigma factor FliA	C	0	0	2	3,66	0	0
A7MS80	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	C	1	1,13	3	1,19	0	0
A7MSA3	Rod shape-determining protein MreB	C	3	1,94	3	2,57	3	1,54
A7MSB3	PhoH-like ATPase	C	3	6,28	0	0	0	0
A7MSH6	Transcriptional regulator	C	3	1,59	2	1,69	2	1,46
A7MSK6	OtnA protein	P	3	1,25	3	1,63	3	3,16
A7MSR9	TonB-dependent receptor	ME	3	5,73	3	1,32	3	8,79
A7MST9	T2SS/secretion-dependent pathway protein GspG	MC	2	4,36	2	4,24	2	6,93
A7MSV2	Phage shock protein A	MC	0	0	0	0	2	2,18
A7MSW4	AsnC family transcriptional regulator	C	0	0	0	0	3	1,96
A7MT19	starvation lipoprotein Slp	ME	0	0	3	1,44	3	2,06
A7MT32	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	MC	1	1,33	3	2,54	2	1,61
A7MT33	Citrate synthase	C	3	4,36	2	1,13	0	0
A7MT34	Succinate dehydrogenase iron-sulfur subunit	MC	3	2,70	3	3,01	3	1,77
A7MT35	2-oxoglutarate dehydrogenase E1	C	3	1,73	3	4,77	3	2,54
A7MT36	Succinate dehydrogenase cytochrome b556 large membrane subunit	MC	3	3,72	3	1,81	0	0
A7MT37	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	C	3	5,31	3	7,09	3	5,31
A7MT41	PTS N-acetylmuramic acid transporter subunit IIBC	MC	2	3,15	0	0	0	0
A7MT48	Asparagine synthetase B	C	3	1,30	1	0,68	0	0
A7MT59	Protease	C	3	6,75	3	8,17	3	4,39
A7MT67	PTS glucose transporter subunit IIA	C	0	0	0	0	3	2,64
A7MT69	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase	C	1	2,95	2	2,21	0	0
A7MT90	Peroxiredoxin (alkyl hydroperoxide reductase subunit C)	C	2	1,40	2	1,35	2	4,45
A7MT93	Chemotaxis protein CheY	C	3	2,30	2	1,51	0	0
A7MTB2	Outer membrane protein assembly factor BamD	ME	3	1,18	3	1,61	3	4,62

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7MTB5	Chaperone protein ClpB	C	0	0	2	1,43	0	0
A7MTD3	Putative uncharacterized protein	C	1	1,42	2	3,02	0	0
A7MTQ5	Transketolase	C	3	1,79	2	3,44	3	4,45
A7MTQ6	Fructose-bisphosphate aldolase	C	3	4,88	3	6,75	3	4,18
A7MTR0	3-phosphoglycerate dehydrogenase	C	2	0,86	0	0	0	0
A7MTU3	GTP-binding protein TypA	MC	1	1,33	2	1,90	0	0
A7MTU5	Glutamine synthetase	C	3	3,55	0	0	0	0
A7MTU6	DNA repair ATPase	IN	1	0,41	2	0,73	0	0
A7MTW5	DNA polymerase I	C	0	0	2	1,44	0	0
A7MU52	Preprotein translocase subunit YajC	C	2	4,61	3	4,75	3	6,09
A7MU53	Protein translocase subunit SecD	MC	3	1,73	3	1,57	2	0,63
A7MU67	MSHA biogenesis protein MshL	MC	2	1,26	2	1,61	3	2,95
A7MU78	DNA gyrase subunit A	C	1	1,51	2	2,92	3	1,22
A7MU83	Ribonucleoside diphosphate reductase	C	2	0,77	0	0	0	0
A7MUA2	Methyl-accepting chemotaxis protein	ME	3	2,96	2	4,34	0	0
A7MUC3	Heat shock protein HslJ	IN	1	3,42	2	5,57	0	0
A7MUH0	Alkaline phosphatase	P	0	0	0	0	2	2,05
A7MUH3	Protease 4	MC	2	1,15	0	0	0	0
A7MUH6	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	C	2	5,99	3	8,19	3	9,25
A7MUJ8	Acetaldehyde dehydrogenase	C	3	3,11	3	7,52	3	4,90
A7MUM5	Pyruvate kinase	C	2	1,06	2	1,39	0	0
A7MUP1	30S ribosomal protein S1	C	1	1,68	0	0	3	4,24
A7MUV4	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	MC	3	4,17	3	2,75	3	3,83
A7MV20	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	3	1,13	2	0,12	0	0
A7MV23	Putative uncharacterized protein	MC/ ME	3	5,17	3	9,54	3	5,50
A7MV24	Hypothetical protein	C	1	1,17	3	2,31	3	4,39
A7MV25	Membrane protein	IN	3	5,88	3	8,43	3	5,02
A7MV83	Lon protease	C	3	1,72	3	1,26	0	0
A7MV86	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	MC	3	2,94	3	2,10	0	0
A7MV99	Hypothetical protein	MC	2	0,26	1	0,404	0	0
A7MVE2	Phosphate acetyltransferase	C	3	1,47	3	4,59	3	2,64
A7MVE6	AsmA protein	IN	3	1,15	3	1,60	3	1,12
A7MVF4	Ribonuclease E	C	3	2,04	3	2,00	0	0
A7MVF7	PTS glucose transporter subunit IIBC	MC	3	22,35	3	13,02	3	15,16
A7MVN5	Methyl-accepting chemotaxis protein	ME/C	2	0,28	2	2,64	0	0
A7MW12	6 phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating	IN	1	0,95	2	0,65	1	0,30
A7MW50	Outer membrane protein, adhesin transport system	ME	3	2,26	3	4,09	3	7,49
A7MW57	Putative uncharacterized protein	MC	0	0	3	0,85	1	0,67

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7MWC9	LPS assembly protein IptD	ME	3	1,54	3	1,02	3	1,96
A7MWD5	C4-dicarboxylate ABC transporter substrate-binding protein	MC/EX	0	0	3	1,37	3	8,11
A7MWL3	Ubiquinol cytochrome c reductase iron sulfur subunit	MC	3	12,60	3	6,64	2	2,74
A7MWL4	Cytochrome b	MC	3	5,89	3	3,23	2	2,38
A7MWL5	Ubiquinol-cytochrome c reductase cytochrome c1 subunit	NC	3	8,60	3	6,25	2	1,05
A7MWL6	Stringent starvation protein A	C	0	0	0	0	3	0,74
A7MWM1	Putative uncharacterized protein	MC	0	0	1	1,44	3	1,72
A7MWM6	Serine protease Do	P	2	1,14	2	0,77	2	0,92
A7MWM7	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit III	MC	2	7,75	3	5,11	1	1,72
A7MWN4	Outer membrane channel protein	OM	3	7,47	3	10,02	3	36,4
A7MWP4	Phosphate transport regulator	C	2	1,00	1	0,97	0	0
A7MWQ8	RNA polymerase sigma factor	C	1	1,04	2	1,29	0	0
A7MWR4	Putative uncharacterized protein	IN	1	1,81	1	1,80	2	6,17
A7MWS3	Pyruvate kinase	C	2	2,95	3	2,22	3	2,10
A7MWX6	Serine protease Do	MC	2	0,60	0	0	0	0
A7MWY3	Multidrug transporter AcrB	MC	2	0,97	3	1,40	2	1,10
A7MWY4	Putative uncharacterized protein	MC	2	1,00	2	1,19	0	0
A7MWY7	Putative uncharacterized protein	MC	1	0,57	3	0,90	0	0
A7MX23	amine oxidase	IN	0	0	2	3,23	0	0
A7MX25	Putative uncharacterized protein	C	2	3,29	2	1,69	0	0
A7MX29	Hypothetical protein	IN	0	0	3	4,87	3	9,82
A7MX44	Alanine dehydrogenase	C	3	2,27	0	0	1	0,46
A7MX67	Fumarate reductase flavoprotein subunit	MC	2	1,07	0	0	2	0,60
A7MX68	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	0,22	2	0,51	0	0
A7MX72	Putative uncharacterized protein	IN	2	2,39	3	3,90	2	1,34
A7MX83	Adenylosuccinate synthetase 1	C	1	1,78	2	1,61	0	0
A7MX85	Ribonuclease R	IN	3	2,50	3	11,72	2	2,98
A7MX87	Protein HflC (serine protease)	C	3	4,23	3	8,01	3	7,48
A7MX88	Membrane protease HflK (serine protease)	IN	3	6,91	3	10,1	3	11,4
A7MX91	Transcriptional regulator (cAMP-regulatory protein)	C	3	3,22	3	1,78	3	5,21
A7MX99	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	P	3	9,78	3	11,42	3	6,21
A7MXB4	Bacterioferritin	C	0	0	3	6,57	3	2,86
A7MXC5	Hypothetical protein	MC	2	0,87	2	3,12	0	0
A7MXD0	Glutathione amide-dependent peroxidase	IN	2	0,43	0	0	0	0
A7MXD2	LOG family protein ygdH	IN	2	1,69	3	1,63	1	0,55
A7MXF4	50S ribosomal protein L10	C	0	0	2	0,52	0	0
A7MXI1	Acetyl-coenzyme A synthetase	C	3	5,22	1	1,28	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7MXI2	Acetyl-CoA carboxylase biotin carboxylase subunit	C	1	0,49	2	1,81	3	1,73
A7MXQ5	Cell division protein ftsZ	C/MC	3	2,77	0	0	0	0
A7MXU6	Uroporphyrin-III C-methyltransferase	MC	3	3,52	3	3,61	3	1,38
A7MXU7	Heme biosynthesis protein HemY	MC	3	6,84	3	2,07	0	0
A7MXZ2	Outer membrane protein assembly factor BamA	OM	3	1,88	3	1,98	3	3,26
A7MY24	Uracil phosphoribosyltransferase	C	1	1,1	2	0,77	0	0
A7MY40	Outer membrane protein assembly factor BamC	C/OM	2	1,25	2	1,15	2	0,70
A7MY71	5'-nucleotidase	P	3	20,56	3	19,88	3	23,96
A7MY78	Ribose phosphate pyrophosphokinase	C	3	3,21	3	6,18	3	3,14
A7MYA1	PTS maltose transporter subunit IIBC	MC	2	1,66	0	0	0	0
A7MYB0	Lipoprotein	MC	3	5,95	3	7,57	3	3,63
A7MYB3	Hypothetical protein	C	0	0	2	1,19	1	0,69
A7MYD8	Enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase [NADH]	C	1	2,40	2	2,48	0	0
A7MYD9	Acyl-CoA dehydrogenase	IN	0	0	3	4,45	3	3,15
A7MYS0	Asparaginyl tRNA synthetase	C	2	0,94	2	1,15	2	0,77
A7MYS8	Membrane protein	IN	1	2,51	0	0	2	2,11
A7MYT7	Protein RecA	C	3	2,39	3	1,84	2	1,01
A7MYU4	Oxaloacetate decarboxylase, alpha subunit	C	3	9,18	3	1,71	0	0
A7MYV7	Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	C	3	1,78	3	2,16	3	1,84
A7MYV8	Pyruvate dehydrogenase E1 component	C	1	0,75	3	1,82	3	4,44
A7MYW3	Dihydrolipoyl dehydrogenase	C	2	3,55	3	3,47	3	3,51
A7MYX7	Aconitate hydratase 2	C	1	7,27	2	0,77	0	0
A7MZ15	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	0,19	1	0,39	0	0
A7MZ17	Multidrug transporter	MC	3	1,49	0	0	0	0
A7MZ91	Membrane protein	MC	2	1,69	1	1,26	0	0
A7MZA9	Signal peptidase I	MC	2	0,67	0	0	0	0
A7MZB6	general secretion pathway protein D	IN	2	2,54	3	1,83	3	4,12
A7MZE3	Membrane protein	IN	3	1,87	3	1,57	0	0
A7MZE4	Outer membrane protein assembly factor BamB	ME	2	2,28	1	2,26	3	3,75
A7MZI1	Lipoprotein Nlpl	MC	1	0,69	1	0,66	2	2,17
A7MZI6	Transcription elongation factor NusA	C	2	1,46	3	2,50	1	0,84
A7MZJ2	AMP-dependent synthetase	C	0	0	2	1,53	1	1,16
A7MZL8	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC/ EX	3	0,45	2	0,08	0	0
A7MZL9	C4-dicarboxylate ABC transporter substrate-binding protein	IN	0	0	1	0,84	3	3,54
A7MZM4	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	2,34	0	0	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.



Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7MZM8	Outer membrane protein, adhesin transport system	ME	3	4,26	3	10,18	3	20,65
A7MZM9	Hypothetical protein	ME	2	1,62	2	4,99	3	1,85
A7MZN3	UPF0229 protein VIBHAR 01540	C	1	1,23	3	0,49	0	0
A7MZN4	PrkA family serine protein kinase	C	3	4,75	3	1,82	0	0
A7MZU4	3-ketoacyl-ACP reductase	C	2	1,14	3	1,24	0	0
A7MZW0	Mechanosensitive ion channel protein MscS	MC	1	0,51	2	2,15	3	0,79
A7MZY2	Peptidase M16	IN	2	1,17	0	0	0	0
A7N069	DNA-binding protein HU-alpha	C	0	0	1	1,25	2	2,62
A7N0C6	Hypothetical protein	IN	1	0,56	3	1,51	0	0
A7N0H9	50S ribosomal protein L17	C	3	2,69	3	3,61	0	0
A7N0K0	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein	P	0	0	1	1,57	3	3,62
A7N0L5	Glutamate dehydrogenase	C	2	1,41	3	6,46	3	2,73
A7N0L9	Carboxy-terminal protease	MC	0	0	2	0,93	3	0,96
A7N0Q1	Cytochrome c oxidase cbb3-type subunit III	MC	3	13,26	3	4,12	2	0,78
A7N0Q3	Transcription termination factor Rho	IN	2	1,97	2	1,98	0	0
A7N0T2	Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein	C	0	0	0	0	2	3,18
A7N0V5	Transcription termination factor Rho	C	2	1,06	2	3,35	1	0,58
A7N0Y7	ATP synthase subunit c 1	MC	2	3,54	1	4,08	0	0
A7N110	Sporulation-control protein	C	2	0,77	0	0	0	0
A7N149	UvrABC system protein A	C	0	0	2	1,18	0	0
A7N1A5	ABC transporter ATPase	MC	2	0,74	3	0,92	0	0
A7N1A6	Cytochrome C	P	0	0	0	0	3	3,35
A7N1A8	ABC transporter permease	MC	1	1,17	2	1,30	1	1,13
A7N1B2	Multidrug efflux pump	MC	2	0,90	2	1,31	1	1,13
A7N1B3	Membrane protein	MC	0	0	1	1,20	2	1,14
A7N1B6	Cytochrome C	P	2	3,10	0	0	0	0
A7N1C2	Ketol-acid reductoisomerase	C	2	2,83	0	0	0	0
A7N1C3	Hypothetical protein	C	0	0	2	1,62	0	0
A7N1D0	Quinone oxidoreductase	C	3	2,43	3	4,39	2	2,10
A7N1F2	DNA gyrase subunit B	C	1	0,55	3	1,20	1	7,80
A7N1I1	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit I	MC	3	13,77	0	0	0	0
A7N1I2	Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II	C	2	11,48	0	0	0	0
A7N1I5	Hypothetical protein	C	2	1,64	2	2,14	0	0
A7N1I6	Gonadoliberin III	MC	2	1,67	3	3,22	3	3,67
A7N1I7	ATP-dependent Zn protease	C	2	2,07	1	2,76	0	0
A7N1K5	DNA topoisomerase	C	0	0	2	0,74	0	0
A7N1K6	Glucose 1 phosphate adenyltransferase 1	C	2	1,32	0	0	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7N1L6	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	C	3	1,82	0	0	0	0
A7N1N0	Isocitrate dehydrogenase NADP	C	3	2,72	3	0,97	0	0
A7N1N1	Keto-acid formate acetyltransferase (pyruvate-formate lyase)	C	3	3	3	4,20	3	2,37
A7N1N2	membrane protein	MC	0	0	2	1,61	0	0
A7N1S9	Uncharacterized lipoprotein	NC	3	4,22	3	4,69	3	6,56
A7N1T8	Nucleoside-specific channel-forming protein	C	2	57,20	2	49,01	2	54,17
A7N1Z8	Transketolase	C	2	2,53	2	2,50	1	0,04
A7N1Z9	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	2,30	2	0,31	0	0
A7N282	Oligopeptidase B	C/P	3	1,77	3	1,59	1	1,07
A7N299	dTDP-D-glucose 4,6-dehydratase	IN	3	36,06	3	3,91	1	1,16
A7N2H6	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC/ME	3	0,67	2	1,71	0	0
A7N2N2	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	C	0	0	0	0	2	1,84
A7N2P7	Membrane protein	C	0	0	3	2,82	3	3,35
A7N2R8	Hypothetical protein	IN	1	1,41	3	5,44	3	6,13
A7N2Z1	Flagellar P ring protein 2	P	2	0,64	1	0,30	3	0,91
A7N349	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	0,30	0	0	0	0
A7N3C2	Methyl-accepting chemotaxis protein	C	2	0,99	0	0	0	0
A7N3F7	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	0,78	2	0,42	0	0
A7N3G2	Transporter	IN	0	0	0	0	2	1,68
A7N3I2	Methyl-accepting chemotaxis protein	C/ME	2	5,02	0	0	0	0
A7N3L3	Glycerol-3-phosphate ABC transporter substrate-binding protein	P	2	1,18	0	0	0	0
A7N3S6	Hypothetical protein	EX	3	2,95	3	3,11	3	6,36
A7N3U0	Alcohol dehydrogenase	C	3	4,25	1	0,57	0	0
A7N3U3	Histidine kinase/response regulator hybrid protein	MC	3	1,03	2	0,76	0	0
A7N3V1	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	C	2	1,19	0	0	0	0
A7N3W8	Methyl-accepting chemotaxis protein	ME	2	0,43	2	0,35	0	0
A7N3X1	Acetoacetyl-CoA reductase	C	3	3,14	0	0	0	0
A7N3X4	Hypothetical protein	IN	3	21,45	0	0	0	0
A7N3X6	Polyhydroxyalkanoic acid synthase PhaC	C	3	11,17	0	0	0	0
A7N412	Outer membrane lipoprotein Blc	ME	0	0	1	1,91	2	1,61
A7N4P7	Type VI secretion system protein ImpC	C	2	0,94	0	0	0	0
A7N542	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha	MC	3	6,89	3	7,23	2	2,06
A7N544	NAD P transhydrogenase subunit beta	MC	2	3,58	2	3,69	0	0
A7N579	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	2	0,26	1	0,05	0	0
A7N5D6	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	C/MC	3	1,84	3	2,21	3	2,81

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
A7N5E2	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	0,26	2	0,92	0	0
A7N5E7	CreA family protein	IN	0	0	2	1,46	1	1,57
A7N5I8	Prolyl oligopeptidase	C	3	8,00	3	5,30	3	3,43
A7N5J5	Outer membrane protein W	ME	2	30,90	2	37,37	3	33,51
A7N5L8	Putative isomerase	IN	2	1,43	0	0	0	0
A7N5R0	Maltose operon periplasmic protein	P	3	2,57	3	2,73	2	1,56
A7N5R1	Glycosidase	IN	2	1,45	0	0	0	0
A7N5T3	Hypothetical protein	MC/ EX	3	2,56	0	0	0	0
A7N6B9	Phosphate ABC transporter ATP-binding protein	MC	3	2,82	0	0	0	0
A7N6C7	Methyl-accepting chemotaxis protein	ME/ MC	2	0,55	1	0,14	0	0
A7N6C9	Phosphate ABC transporter substrate-binding protein	MC	3	1,80	2	1,58	3	6,58
A7N6D3	Murein lipoprotein	ME	3	27,30	3	55,8	3	61,55
A7N6E5	MFP transporter	MC	1	1,20	3	0,99	0	0
A7N6F4	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	0,22	0	0	0	0
A7N6H4	Outer membrane protein porin	ME	3	64,24	3	53,08	3	97,86
A7N6I6	OmpA-OmpF porin, OOP family	ME	3	19,02	3	21,45	3	28,31
A7N6X4	Na translocating NADH quinone reductase subunit B 2	MC	3	3,49	2	2,176	2	2,00
A7N710	Polysaccharide export outer membrane protein	ME	2	4,90	0	0	3	1,25
A7N734	D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	MC	2	1,0	1	0,68	0	0
A7N736	Enoyl-CoA hydratase	C	0	0	2	1,63	2	1,25
A7N743	Cytochrome C	MC	0	0	3	1,77	0	0
A7N744	Cytochrome c oxidase cbb3-type subunit II	IN	0	0	3	1,72	1	1,25
A7N7A7	Lysine type translocator	MC	2	11,02	0	0	0	0
A7N7A9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	C	2	1,17	0	0	0	0
A7N7M8	Bifunctional proline dehydrogenase/pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase	C	3	3,78	2	1,46	0	0
A7N7N0	Sodium/proline symporter	MC	2	3,52	3	3,56	3	6,10
A7N7N5	Diguanylate cyclase	MC	3	2,03	3	2,80	3	2,0
A7N7N7	Membrane fusion protein, adhesin transport system	MC	0	0	2	1,45	0	0
A7N839	Methyl-accepting chemotaxis protein	MC	3	1,38	2	0,75	0	0
A7N8K1	ATP-dependent Zn protease	IN	1	2,20	1	2,60	2	2,24
A7N8M2	sn-glycerol-3-phosphate import ATP-binding protein UgpC	MC	3	1,64	0	0	0	0
ACCA	Acetyl coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	C	1	0,42	2	1,53	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
ACKA	Acetate kinase	C	2	1,51	2	2,67	1	2,30
ACP	Acyl carrier protein	C	0	0	1	2,90	2	11,6
AMPA	Probable cytosol aminopeptidase	C	0	0	1	0,53	3	2,70
ASTD	N succinylglutamate 5 semialdehyde dehydrogenase	C	3	1,56	0	0	0	0
ATPA1	ATP synthase subunit alpha 1	C	3	6,31	3	11,11	3	8,16
ATPA2	ATP synthase subunit alpha 2	C	3	3,00	3	5,75	3	3,48
ATPB1	ATP synthase subunit beta 1	C	3	5,14	3	8,86	3	7,00
ATPB2	ATP synthase subunit beta 2	C	2	0,48	2	0,04	3	4,26
ATPF1	ATP synthase subunit b 1	MC	3	9,88	3	13,68	3	5,91
BTUB	Vitamin B12 transporter BtuB	ME	3	3,23	3	2,64	3	5,15
CLPX	ATP dependent Clp protease ATP binding subunit ClpX	C	3	2,209	0	0	0	0
DEOC	Deoxyribose phosphate aldolase	C	1	2,59	2	2,57	2	9,82
DNAK	Chaperone protein DnaK	C	3	3,16	3	4,14	3	2,27
EFTS	Elongation factor Ts	C	2	1,32	2	1,75	3	1,44
EFTU	Elongation factor Tu	C	3	22,87	3	39,15	3	28,45
G6PI	Glucose 6 phosphate isomerase	C	1	15,68	2	13,74	0	0
GLMM	Phosphoglucosamine mutase	C	0	0	2	1,04	0	0
IF2	Translation initiation factor IF 2	C	3	1,31	3	5,29	3	1,88
IHFA	Integration host factor subunit alpha	C	0	0	2	0,88	0	0
KAD	Adenylate kinase	C	0	0	2	1,26	0	0
KATG	Catalase peroxidase	C	1	0,88	2	2,01	3	2,56
LAMB	Maltoporin	ME	3	9,52	2	5,78	2	10,1
MDH	Malate dehydrogenase	MC/P	2	2,15	0	0	1	0,83
METK	S adenosylmethionine synthase	C	2	1,52	3	1,37	3	1,06
NQRA	Na translocating NADH quinone reductase subunit A	C	3	5,81	3	4,58	3	1,93
NQRB	Na translocating NADH quinone reductase subunit B	MC	3	2,99	0	0	1	2,85
NQRC	Na translocating NADH quinone reductase subunit C	IN	3	3,61	3	2,73	0	0
NQRF	Na translocating NADH quinone reductase subunit F	C	3	5,64	3	3,63	2	1,90
OXAA	Inner membrane protein oxaA	MC	3	3,10	3	4,67	3	4,20
PCKA	Phosphoenolpyruvate carboxykinase ATP	C	2	1,72	1	3,43	0	0
PGK	Phosphoglycerate kinase	C	3	2,00	2	4,62	3	2,09
PNP	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	C	2	0,48	2	0,49	3	1,58
PROB	Glutamate 5 kinase	C	0	0	2	4,41	0	0
PURR	HTH type transcriptional repressor purR	C	1	0,72	3	1,37	3	1,25
PYRG	CTP synthase	C	1	0,99	3	2,74	3	1,67

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
RHLB	ATP dependent RNA helicase rhIB	C	1	1,36	3	1,20	0	0
RISB	6 7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase	C	3	2,57	3	5,25	3	5,41
RL1	50S ribosomal protein L1	C	1	1,55	2	1,90	2	0,97
RL11	50S ribosomal protein L11	C	0	0	2	1,49	0	0
RL13	50S ribosomal protein L13	C	1	0,84	1	1,30	2	0,98
RL14	50S ribosomal protein L14	C	1	1,89	3	1,86	1	2,27
RL15	50S ribosomal protein L15	C	1	1,43	2	4,29	2	1,86
RL16	50S ribosomal protein L16	C	3	5,60	3	4,32	1	1,09
RL18	50S ribosomal protein L18	C	1	1,13	2	2,75	1	1,45
RL2	50S ribosomal protein L2	C	3	5,34	3	5,28	2	1,06
RL20	50S ribosomal protein L20	C	3	4,59	3	3,64	2	1,04
RL21	50S ribosomal protein L21	C	0	0	3	1,21	1	0,52
RL22	50S ribosomal protein L22	C	1	2,92	2	2,87	3	1,47
RL3	50S ribosomal protein L3	C	1	3,02	2	3,01	1	1,83
RL4	50S ribosomal protein L4	C	3	10,45	3	15,8	3	13,5
RL5	50S ribosomal protein L5	C	3	4,30	3	4,70	3	1,83
RL6	50S ribosomal protein L6	C	1	1,91	2	4,10	0	0
RL7	50S ribosomal protein L7 L12	MC/P	2	1,60	1	2,71	1	3,15
RL9	50S ribosomal protein L9	C	1	2,17	2	4,22	2	0,99
RPOA	DNA directed RNA polymerase subunit alpha	C	1	2,28	3	2,73	3	3,14
RPOB	DNA directed RNA polymerase subunit beta	C	1	1,56	3	8,47	3	3,23
RPOC	DNA directed RNA polymerase subunit beta	C	3	5,42	3	5,48	3	3,14
RS10	30S ribosomal protein S10	C	1	1,97	2	3,58	0	0
RS11	30S ribosomal protein S11	C	3	3,59	3	3,59	1	0,60
RS12	30S ribosomal protein S12	C	3	1,87	3	2,05	1	1,20
RS14	30S ribosomal protein S14	C	1	1,29	2	2,06	0	0
RS18	30S ribosomal protein S18	C	3	4,38	1	3,19	0	0
RS2	30S ribosomal protein S2	C	3	10,91	3	4,42	3	2,41
RS3	30S ribosomal protein S3	C	3	11,05	3	10,15	3	2,34
RS4	30S ribosomal protein S4	C	3	3,58	3	5,66	3	2,03
RS5	30S ribosomal protein S5	C	3	2,95	3	4,24	3	1,80
RS6	30S ribosomal protein S6	C	0	0	2	2,031	0	0
RS7	30S ribosomal protein S7	C	3	2,37	3	3,75	1	0,88
RS9	30S ribosomal protein S9	C	2	2,46	3	4,32	3	2,18
SECA	Protein translocase subunit secA	C	3	2,24	3	1,36	1	4,04
SUCC	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit beta	C	2	3,16	1	0,46	0	0
SYA	Alanyl tRNA synthetase	P	1	1,11	2	0,77	0	0
SYD	Aspartyl tRNA synthetase	C	0	0	2	1,54	0	0
SYGB	Glycyl tRNA synthetase beta subunit	C	2	0,56	2	0,83	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_VIBHB".

Tabla A3. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
SYI	Isoleucyl tRNA synthetase	C	1	0,54	2	0,6	0	0
SYP	Prolyl tRNA synthetase	C	0	0	2	0,66	0	0
SYR	Arginyl tRNA synthetase	MC/P	1	0,54	2	2,84	0	0
TAL	Transaldolase	C	1	4,71	3	2,74	3	3,40
TATA	Sec independent protein translocase protein tatA E homolog	MC	2	3,02	0	0	0	0
THII	tRNA sulfurtransferase	C	0	0	2	1,32	1	0,67
TIG	Trigger factor	C	1	1,65	2	1,27	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana ciroplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplásmica; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_VIBHB”.

**Tabla A4.** Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de *E. coli* mantenidas en solución salina a 4°C en condiciones de oscuridad. Se tomaron muestras del inicio de las experiencias (P1), durante el periodo de adaptación de las bacterias a las condiciones expuestas (P2) y cuando la población se encontraba en estado VNC (P3).

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
ACRA	Acridine resistance protein A	MC	3	3,40	3	3,60	3	2,79
ACRB	Acridine resistance protein B	MC	0	0	3	1,95	0	0
ALF1	Fructose biphosphate aldolase class 1	IN	0	0	1	2,58	2	2,23
ASPA	Aspartate ammonia lyase	C	0	0	1	2,63	3	12,05
ATPA	ATP synthase subunit alpha	C	2	3,27	2	1,76	3	2,80
ATPB	ATP synthase subunit beta	MC	2	3,36	2	5,41	2	6,93
ATPL	ATP synthase subunit c	MC	3	8,88	3	8,84	3	7,69
BFR	Bacterioferritin	C	2	3,82	2	5,73	2	3,30
CLPB	Chaperone protein ClpB	C	2	3,47	2	4,88	3	3,72
COPA	Copper exporting P type ATPase A	MC	3	4,73	3	5,23	3	3,90
CYDA	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 1	MC	3	27,80	3	29,77	3	24,00
CYDB	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 2	MC	2	8,26	2	8,03	2	8,01
DACC	D alanyl D alanine carboxypeptidase DacC	MC	3	5,84	3	6,13	2	5,59
DAMX	Protein DamX	IN	2	0,88	3	1,18	2	0,90
DCUA	Anaerobic C4 dicarboxylate transporter DcuA	MC	3	7,12	3	8,46	3	6,90
DHSA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	MC	3	8,97	3	9,55	3	9,27
DHSB	Succinate dehydrogenase iron sulfur subunit	MC	3	10,61	3	10,03	3	9,93
DLDH	Dihydrolipoil dehydrogenase	C	0	0	2	1,47	1	0,99
DNAK	Chaperone protein DnaK	C	2	1,73	2	2,89	1	4,25
ECNB	Entericidin B	MC	2	15,89	0	0	0	0
EFTU1	Elongation factor Tu 1	C	3	13,89	3	39,06	3	64,20
ELAB	Protein ElaB	IN	3	22,24	3	21,40	3	16,80
FABF	3 oxoacyl acyl carrier protein synthase 2	C	0	0	1	1,16	2	1,64
FDOG	Formate dehydrogenase O major subunit	P	3	3,10	3	3,16	3	2,75
FLIC	Flagellin	EX	2	7,05	2	6,41	1	8,98
FRDA	Fumarate reductase flavoprotein subunit	MC	2	2,59	2	3,49	3	2,85
FRDB	Fumarate reductase iron sulfur subunit	MC	2	4,15	3	4,18	2	3,80
FTSH	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	MC	3	4,59	3	5,22	3	6,38
GLPT	Glycerol 3 phosphate transporter	MC	2	2,21	3	2,56	2	3,38
HEMX	Putative uroporphyrinogen III C methyltransferase	MC	3	4,50	3	4,21	3	3,37
HEMY	Protein HemY	MC	2	2,62	3	2,27	0	0
HFLC	Modulator of FtsH protease HflC	C	3	4,95	3	5,67	3	4,52
HFLK	Modulator of FtsH protease HflK	C/EX	3	4,78	3	5,71	3	4,79
LPP	Major outer membrane lipoprotein Lpp	ME	3	135,25	3	133,52	3	106,88

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_ECOLI".

Tabla A4. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
METQ	D methionine binding lipoprotein MetQ	MC	3	4,12	3	3,02	3	3,10
MIND	Septum site determining protein MinD	MC	2	2,36	2	3,66	3	4,10
MREB	Rod shape determining protein MreB	C	0	0	2	1,74	3	3,01
MSCL	Large conductance mechanosensitive channel	MC	3	4,28	3	5,34	3	4,02
NARG	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	MC	2	4,24	2	2,99	2	2,42
NMPC	Putative outer membrane porin protein NmpC	ME	1	3,76	2	0,35	2	1,79
NUOCD	NADH quinone oxidoreductase subunit C D	C	2	3,69	3	3,18	0	0
OMPA	Outer membrane protein A	ME	3	98,38	3	75,97	3	74,76
OMPC	Outer membrane protein C	ME	3	82,91	3	80,71	3	65,56
OMPW	Outer membrane protein W	ME	3	24,69	3	25,85	3	22,17
OMPX	Outer membrane protein X	ME	3	13,97	3	11,66	3	9,85
OSME	Osmotically inducible lipoprotein E	IN	3	11,99	2	23,13	3	15,35
PAL	Peptidoglycan associated lipoprotein	ME	3	10,40	3	8,64	3	7,47
PGK	Phosphoglycerate kinase	C	0	0	3	1,85	3	2,17
PPID	Peptidyl prolyl cis trans isomerase D	MC	3	2,25	2	2,04	2	1,12
PPSA	Phosphoenolpyruvate synthase	C	0	0	2	4,37	3	5,81
PRET	NAD dependent dihydropyrimidine dehydrogenase subunit PreT	C	0	0	0	0	2	2,45
PTA	Phosphate acetyltransferase	C	0	0	2	1,36	2	1,99
PTM3C	PTS system mannitol specific EIICBA component	MC	2	3,14	1	3,22	0	0
PTNAB	PTS system mannose specific EIIBAB component	C	2	1,06	2	0,69	2	0,56
PTND	Mannose permease IID component	MC	3	5,88	2	1,12	1	7,95
PTW3C	PTS system N acetylglucosamine specific EIICBA component	MC	2	1,88	3	1,47	0	0
QMCA	Protein QmcA	IN	2	2,36	2	2,16	2	1,57
RHO	Transcription termination factor Rho	C	0	0	1	3,23	3	3,65
RL10	50S ribosomal protein L10	C	3	1,88	1	3,09	2	3,74
RL14	50S ribosomal protein L14	C	2	5,46	3	6,47	3	8,755
RL15	50S ribosomal protein L15	C	1	12,55	1	8,52	2	5,89
RL16	50S ribosomal protein L16	C	3	8,45	3	6,26	3	6,31
RL17	50S ribosomal protein L17	C	0	0	0	0	3	5,13
RL2	50S ribosomal protein L2	C	3	20,54	3	17,09	3	18,94
RL20	50S ribosomal protein L20	C	2	9,35	3	8,01	3	7,22
RL28	50S ribosomal protein L28	C	0	0	2	4,73	1	5,59
RL35	50S ribosomal protein L35	C	3	7,00	2	5,48	3	4,85
RL4	50S ribosomal protein L4	C	1	3,87	2	2,39	1	2,51
RL5	50S ribosomal protein L5	C	3	6,48	3	7,92	3	9,08
RL6	50S ribosomal protein L6	C	0	0	1	1,86	2	2,81

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplama; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_ECOLI".



Tabla A4. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q
RNE	Ribonuclease E	MC	3	4,05	3	3,27	1	1,94
RNR	Ribonuclease R	C	3	6,63	2	5,71	2	3,85
RS11	30S ribosomal protein S11	C	3	7,65	2	8,08	3	6,86
RS12	30S ribosomal protein S12	C	3	7,00	1	5,27	0	0
RS12	30S ribosomal protein S12	C	2	10,28	3	9,28	3	9,89
RS13	30S ribosomal protein S13	C	2	5,61	2	6,07	3	5,47
RS14	30S ribosomal protein S14	C	0	0	2	5,11	2	5,22
RS18	30S ribosomal protein S18	C	3	8,84	3	8,90	3	7,98
RS2	30S ribosomal protein S2	C	3	3,95	3	5,15	3	5,50
RS3	30S ribosomal protein S3	C	3	9,29	3	9,10	3	9,49
RS4	30S ribosomal protein S4	C	3	3,84	3	4,93	3	5,95
RS9	30S ribosomal protein S9	C	3	9,77	3	9,13	3	9,54
SECD	Protein translocase subunit SecD	MC	3	1,42	3	1,23	2	0,81
SELD	Selenide water dikinase	C	0	0	0	0	2	3,03
SLP	Outer membrane protein slp	ME	3	62,19	3	48,23	3	45,50
SLYB	Outer membrane lipoprotein SlyB	ME	2	16,82	3	18,04	2	11,24
SRMB	ATP dependent RNA helicase SrmB	C	2	3,48	1	3,41	0	0
TOLC	Outer membrane protein TolC	ME	3	4,27	3	3,07	2	3,55
TSX	Nucleoside specific channel forming protein tsx	ME	2	5,40	1	4,65	0	0
USPF	Universal stress protein F	C	0	0	2	3,39	3	6,00
YAJC	UPF0092 membrane protein YajC	MC	1	12,22	2	12,75	1	7,43
YBAY	Uncharacterized lipoprotein YbaY	P	2	3,86	1	1,95	1	1,82
YBJP	Uncharacterized lipoprotein YbjP	IN	3	8,39	3	8,16	2	6,13
YDGA	Protein YdgA	MC	3	10,63	3	4,51	3	3,78
YGAU	Uncharacterized protein YgaU	IN	3	10,21	3	8,11	3	7,45
YGEY	Uncharacterized protein YgeY	C	0	0	0	0	2	2,36
YGFK	Uncharacterized protein Ygfk	C	0	0	1	2,32	3	3,03
YHCB	Inner membrane protein YhcB	MC	3	9,94	3	11,08	3	10,58
YHII	Uncharacterized protein Yhil	MC	2	3,17	2	3,29	2	2,10
YIDC	Membrane protein insertase YidC	MC	2	1,31	2	1,514	0	0
YQJD	Uncharacterized protein YqjD	IN	3	25,44	3	33,14	3	23,28

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana ciroplasmática; ME, membrana externa; P, periplama; NC, no citoplásmica; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_ECOLI".

**Tabla A5.** Proteínas obtenidas a partir de poblaciones de *E. coli* mantenidas en solución salina a 20°C en condiciones de oscuridad. Se tomaron muestras del inicio de las experiencias (P1), durante el periodo de adaptación de las bacterias a las condiciones expuestas (P2 y P2.1) y cuando la población se encontraba en estado VNC (P3).

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P2.1		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
6PGD	6 phosphogluconate dehydrogenase decarboxylating	C	0	0	0	0	2	1,62	2	1,58
ACEA	Isocitrate lyase	C	0	0	0	0	0	0	2	0,80
ACON1	Aconitate hydratase 1	C	1	0,57	0	0	2	2,43	1	3,32
ACRA	Acriflavine resistance protein A	CM	3	4,33	3	3,14	3	2,10	3	2,19
ACRB	Acriflavine resistance protein B	CM	2	2,09	0	0	0	0	0	0
ADHE	Aldehyde alcohol dehydrogenase	C	0	0	1	2,62	2	2,48	1	3,17
AHPC	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	C	0	0	3	6,97	3	11,23	1	20,02
ALDB	Aldehyde dehydrogenase B	C	0	0	2	3,38	2	2,45	1	3,71
ALF	Fructose bisphosphate aldolase class 2	C	0	0	2	7,03	3	7,51	2	7,05
ALF1	Fructose bisphosphate aldolase class 1	IN	1	1,34	2	3,69	2	6,01	1	8,45
ASPA	Aspartate ammonia lyase	C	1	1,34	2	5,50	3	7,19	3	5,24
ASPG2	L asparaginase 2	P	0	0	1	2,51	2	3,65	1	3,66
ATPA	ATP synthase subunit alpha	C	2	3,27	2	1,76	3	2,80	3	2,46
ATPB	ATP synthase subunit beta	CM	3	3,84	3	4,77	3	4,15	3	3,31
ATPL	ATP synthase subunit c	CM	2	12,04	3	8,92	2	6,26	2	6,70
BAMA	Outer membrane protein assembly factor BamA	ME	3	2,69	1	0,48	0	0	0	0
BAMB	Outer membrane protein assembly factor BamB	ME	3	2,23	1	1,16	1	1,43	1	0,80
BAMD	Outer membrane protein assembly factor BamD	ME	1	0,94	2	0,65	0	0	0	0
BFR	Bacterioferritin	C	2	3,82	0	0	0	0	0	0
CISY	Citrate synthase		0	0	1	3,49	3	2,48	1	6,17
CLPB	Chaperone protein ClpB	C	3	2,96	3	9,87	3	18,9	2	26,21
COPA	Copper exporting P type ATPase A	C	3	5,09	3	3,66	2	2,20	3	3,46
CORA	Magnesium transport protein CorA	CM	2	1,48	1	1,33	1	0,83	2	1,39
CSTA	Carbon starvation protein A	CM	2	3,53	1	2,87	1	1,73	1	2,95
CYDA	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 1	CM	3	32,84	3	24,11	3	19,43	3	20,47
CYDB	Cytochrome d ubiquinol oxidase subunit 2	MC	2	9,99	2	9,92	2	4,27	2	11,37
DACA	D alanyl D alanine carboxypeptidase DacA	MC	1	0,90	2	0,71	1	0,24	1	0,27

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplama; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_ECOLI”.

Tabla A5. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P2.1		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
DACC	D alanyl D alanine carboxypeptidase DacC	MC	3	6,40	3	5,75	2	3,21	2	2,85
DCOS	Ornithine decarboxylase inducible	C	0	0	1	0,76	1	1,48	2	2,64
DCRB	Protein DcrB	P	3	2,51	1	1,81	0	0	0	0
DCUA	Anaerobic C4 dicarboxylate transporter DcuA	MC	3	9,68	3	6,51	2	5,35	3	5,35
DHNA	NADH dehydrogenase	MC	2	1,03	0	0	0	0	0	0
DHSA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	MC	3	16,42	3	10,59	3	8,18	3	8,53
DHSB	Succinate dehydrogenase iron sulfur subunit	MC	3	13,10	3	11,22	3	9,13	3	9,18
DLDH	Dihydrolipoyl dehydrogenase	C	1	0,24	1	1,05	0	0	1	1,52
DNAK	Chaperone protein DnaK	C	3	2,30	3	5,59	3	8,04	2	7,86
EFTU1	Elongation factor Tu 1	IN	3	16,44	3	69,30	3	81,71	3	56,45
ELAB	Protein ElaB	C	3	21,59	3	14,07	3	10,47	3	10,61
FABG	3 oxoacyl acyl carrier protein reductase FabG	P	0	0	2	0,51	1	1,25	0	0
FDOG	Formate dehydrogenase O major subunit	EX	3	3,03	2	2,55	2	2,65	3	2,58
FLIC	Flagellin	MC	2	4,52	3	5,79	3	3,92	1	3,00
FRDA	Fumarate reductase flavoprotein subunit	MC	3	2,86	3	2,55	3	2,01	2	3,17
FRDB	Fumarate reductase iron sulfur subunit	MC	2	4,80	2	3,67	2	3,78	3	3,43
FTSH	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	C	3	9,27	3	4,77	3	2,71	2	3,08
FUMA	Fumarate hydratase class I aerobic	C	0	0	1	1,13	3	1,03	2	2,59
FUMB	Fumarate hydratase class I anaerobic	C	0	0	2	1,37	3	2,51	2	1,63
G3P1	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase A	MC	1	1,07	1	2,16	3	2,86	2	2,14
GLPT	Glycerol 3 phosphate transporter	MC	3	3,56	2	2,19	2	1,43	1	0,92
HEMX	Putative uroporphyrinogen III C methyltransferase	MC	3	5,25	3	3,15	3	2,21	3	2,94
HEMY	Protein HemY	MC	3	3,03	3	2,13	2	1,04	2	1,43
HFLC	Modulator of FtsH protease HflC	C	3	5,94	3	3,69	3	2,75	3	2,65
HFLK	Modulator of FtsH protease HflK	C/EX	3	6,43	3	4,91	3	3,73	2	3,46
HTPG	Chaperone protein HtpG	C	0	0	3	3,01	3	2,18	2	2,14
IDH	Isocitrate dehydrogenase NADP	C	0	0	3	4,80	3	6,20	2	7,99
IMDH	Inosine 5 monophosphate dehydrogenase	C	0	0	1	0,46	3	1,55	2	0,75

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplama; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_ECOLI”.

Tabla A5. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P2.1		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
KPYK2	Pyruvate kinase II	C	0	0	2	2,98	3	3,15	1	4,46
LON	Lon protease	C	0	0	1	1,17	0	0	2	1,50
LPP	Major outer membrane lipoprotein Lpp	ME	3	117,25	3	84,64	3	71,81	3	73,55
MBHM	Hydrogenase 2 large chain	MC	3	4,82	2	0,46	1	2,22	0	0
MCP1	Methyl accepting chemotaxis protein I	MC	3	2,02	0	0	1	0,71	0	0
METQ	D methionine binding lipoprotein MetQ	MC	3	3,72	3	3,06	2	2,49	2	1,94
MIND	Septum site determining protein MinD	MC	2	1,01	3	3,71	3	4,23	3	4,42
MREB	Rod shape determining protein MreB	C	0	0	2	3,21	3	2,50	2	2,59
NARG	Respiratory nitrate reductase 1 alpha chain	MC	3	3,53	3	2,65	2	2,19	2	2,32
NLPA	Lipoprotein 28	MC	0	0	0	0	2	0,14	0	0
NMPC	Putative outer membrane porin protein NmpC	ME	1	0,85	0	0	1	3,50	2	4,69
NUOCD	NADH quinone oxidoreductase subunit C D	C	2	4,51	2	4,23	2	2,82	2	2,42
ODO2	Dihydrolipoyllysine residue succinyltransferase component of 2 oxoglutarate dehydrogenase complex	C	2	4,11	2	4,07	3	5,21	2	5,86
ODP1	Pyruvate dehydrogenase E1 component	C	1	0,95	2	4,12	2	6,16	2	5,32
ODP2	Dihydrolipoyllysine residue acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	C	0	0	3	1,61	3	2,01	2	2,89
OMPA	Outer membrane protein A	ME	3	85,02	3	53,22	3	51,79	3	63,95
OMPC	Outer membrane protein C	ME	3	89,85	3	64,32	3	51,11	3	51,48
OMPW	Outer membrane protein W	ME	3	20,87	2	14,19	3	12,32	3	20,44
OMPX	Outer membrane protein X	ME	3	11,35	3	8,32	2	6,80	3	6,58
OSME	Osmotically inducible lipoprotein E	IN	3	13,96	2	1,07	0	0	0	0
PAL	Peptidoglycan associated lipoprotein	ME	3	11,26	3	9,16	3	6,34	3	6,52
PFLB	Formate acetyltransferase 1	MC	1	0,65	2	7,14	3	8,68	2	8,20
PNTA	NAD P transhydrogenase subunit alpha	MC	2	5,72	2	3,36	0	0	1	3,95
PNTB	NAD P transhydrogenase subunit beta	MC	3	4,72	1	3,03	0	0	0	0
PPID	Peptidyl prolyl cis trans isomerase D	MC	3	2,25	2	2,04	0	0	0	0

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplama; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_ECOLI”.

Tabla A5. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P2.1		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
PPSA	Phosphoenolpyruvate synthase	C	0	0	2	2,13	3	3,21	3	3,62
PRET	NAD dependent dihydropyrimidine dehydrogenase sunbunit PreT	C	0	0	1	3,93	1	3,35	2	2,30
PT1	Phosphoenolpyruvate protein phosphotransferase	C	0	0	1	1,76	3	1,83	1	2,84
PTA	Phosphate acetyltransferase	C	1	1,16	3	2,19	3	2,74	2	3,45
PTM3C	PTS system mannitol specific EIICBA component	MC	3	3,30	2	2,04	1	1,21	1	0,74
PTNAB	PTS system mannose specific EIIB component	C	2	2,17	1	2,15	2	1,26	3	1,69
PTND	Mannose permease IID component	MC	3	7,27	3	5,26	3	4,96	2	4,55
PTW3C	PTS system N acetylglucosamine specific EIICBA component	MC	3	2,41	3	2,08	2	1,14	3	1,58
PUTA	Bifunctional protein PutA	C	0	0	1	2,33	2	2,02	1	4,48
QMCA	Protein Qmca	IN	3	2,79	2	2,06	0	0	0	0
RHO	Transcription termination factor Rho	C	0	0	2	0,99	1	1,73	1	0,71
RL1	50S ribosomal protein L1	C	1	2,29	3	4,03	3	4,14	2	4,62
RL10	50S ribosomal protein L10	C	2	1,74	3	6,28	3	8,74	3	6,55
RL11	50S ribosomal protein L11	C	0	0	3	4,63	3	6,35	3	6,21
RL14	50S ribosomal protein L14	C	3	3,67	3	9,52	3	9,31	3	8,54
RL15	50S ribosomal protein L15	C	2	3,76	3	5,10	3	3,90	1	5,55
RL16	50S ribosomal protein L16	C	1	5,52	2	5,31	3	4,47	2	4,94
RL17	50S ribosomal protein L17	C	0	0	1	4,83	2	4,503	3	4,39
RL2	50S ribosomal protein L2	C	3	9,63	3	18,35	3	11,71	3	9,33
RL20	50S ribosomal protein L20	C	3	9,08	3	9,43	3	7,39	3	6,68
RL21	50S ribosomal protein L21	C	0	0	0	0	0	0	2	5,47
RL22	50S ribosomal protein L22	C	1	2,53	1	4,23	2	4,40	2	4,68
RL28	50S ribosomal protein L28	C	0	0	1	5,49	2	3,50	1	5,12
RL3	50S ribosomal protein L3	C	0	0	2	3,03	1	4,29	2	4,05
RL4	50S ribosomal protein L4	C	2	3,59	3	3,95	3	4,52	3	4,53
RL5	50S ribosomal protein L5	C	3	6,00	3	8,94	3	10,06	3	10,93
RL6	50S ribosomal protein L6	C	2	2,86	2	5,98	3	6,96	2	8,10
RL7	50S ribosomal protein L7 L12	MC/P	1	1,69	3	5,47	3	6,57	1	5,31
RL9	50S ribosomal protein L9	C	0	0	1	2,78	2	3,61	1	5,72
RNE	Ribonuclease E	MC	2	2,91	2	3,17	2	2,11	1	3,70
RNR	Ribonuclease R	C	2	2,77	2	2,16	3	1,82	2	3,22
RS1	30S ribosomal protein S1	C	3	1,52	3	3,87	3	4,96	2	5,27
RS10	30S ribosomal protein S10	C	1	3,60	3	8,68	3	11,8	3	9,43

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplama; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “\_ECOLI”.

Tabla A5. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P2.1		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
RS11	30S ribosomal protein S11	C	2	5,08	3	10,78	3	8,93	3	9,23
RS12	30S ribosomal protein S12	C	2	3,81	2	3,48	1	4,16	1	6,77
RS12	30S ribosomal protein S12	C	1	7,53	2	5,54	2	5,73	1	3,63
RS13	30S ribosomal protein S13	C	2	4,00	3	6,44	2	6,96	2	8,64
RS16	30S ribosomal protein S16	C	0	0	0	0	0	0	2	2,05
RS18	30S ribosomal protein S18	C	3	6,93	3	8,75	2	8,68	3	8,23
RS2	30S ribosomal protein S2	C	3	4,48	3	6,99	3	7,66	3	6,59
RS3	30S ribosomal protein S3	C	3	13,10	3	12,48	3	11,58	3	11,99
RS4	30S ribosomal protein S4	C	1	4,95	3	5,78	3	6,63	3	7,04
RS5	30S ribosomal protein S5	C	3	3,63	2	4,06	3	5,32	3	4,11
RS6	30S ribosomal protein S6	C	0	0	2	2,14	0	0	1	2,16
RS9	30S ribosomal protein S9	C	3	7,50	3	10,20	3	7,90	3	6,85
SECD	Protein translocase subunit SecD	MC	2	1,60	3	1,33	0	0	0	0
SLP	Outer membrane protein slp	ME	3	43,60	3	32,09	3	25,26	3	26,50
SLYB	Outer membrane lipoprotein SlyB	ME	3	18,92	3	11,93	3	8,15	3	9,33
SUCD	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit alpha	C	0	0	1	2,82	3	4,22	3	5,31
SYK2	Lysine tRNA ligase heat inducible	C	0	0	2	1,36	1	1,22	1	2,56
TALB	Transaldolase B	C	1	1,02	3	1,88	3	2,25	2	2,60
TKT1	Transketolase 1	C	0	0	2	1,47	2	3,49	2	2,94
TOLC	Outer membrane protein TolC	ME	3	5,38	3	3,47	2	2,91	2	3,31
TPX	Thiol peroxidase	P	0	0	2	2,39	2	3,96	1	5,25
TSX	Nucleoside specific channel forming protein tsx	ME	2	5,05	0	0	0	0	2	3,02
USPF	Universal stress protein F	C	2	7,26	2	7,40	3	13,51	3	11,37
USPG	Universal stress protein G	C	0	0	0	0	1	2,71	2	2,49
YAJC	UPF0092 membrane protein YajC	MC	1	10,65	2	10,70	0	0	1	11,52
YBAY	Uncharacterized lipoprotein YbaY	P	1	4,21	2	1,05	2	1,44	1	1,76
YBJP	Uncharacterized lipoprotein YbjP	IN	3	9,34	3	5,81	2	3,81	2	7,84
YCEB	Uncharacterized lipoprotein YceB	IN	0	0	1	1,06	1	0,81	2	0,17
YDGA	Protein YdgA	MC	3	6,11	3	4,45	3	3,37	3	5,45
YEAG	Uncharacterized protein YeaG	C	0	0	2	2,14	3	2,54	2	2,28
YEDS	Putative outer membrane protein YedS	ME	3	3,28	0	0	0	0	0	0
YGAU	Uncharacterized protein YgaU	IN	3	9,75	3	10,64	3	5,48	2	5,18

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplama; NC, no citoplásmica; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_ECOLI".

Tabla A5. Continuación.

Acceso a UniProt *	Descripción de la proteína	L	P1		P2		P2.1		P3	
			R	Q	R	Q	R	Q	R	Q
YGEY	Uncharacterized protein YgeY	C	2	1,45	2	1,83	2	3,06	2	4,15
YHCB	Inner membrane protein YhcB	MC	3	15,18	3	6,96	3	5,28	3	4,49
YHII	Uncharacterized protein Yhil	MC	3	2,611	2	1,85	2	1,10	2	1,46
YIDC	Membrane protein insertase YidC	MC	3	1,644	2	0,75	2	3,08	0	0
YNIA	Uncharacterized protein YniA	IN	0	0	2	1,76	1	2,43	1	5,08
YQJD	Uncharacterized protein YqjD	IN	3	27,42	3	23,95	3	16,13	3	17,31

L, localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplama; NC, no citoplasmática; EX, extracelular; IN, indeterminada. R, número de réplicas en las que aparece la proteína. Q, cuantificación media normalizada.

\* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "\_ECOLI".







Las bacterias en los sistemas naturales están continuamente expuestas a cambios en las condiciones ambientales a los que hacen frente adoptando estrategias que aseguran su perdurabilidad. Enfrentadas a la escasez de nutrientes y/o ayuno, poblaciones de *Vibrio harveyi*, bacteria autóctona del agua de mar, y de *Escherichia coli*, bacteria entérica y alóctona a los sistemas acuáticos, mantienen su viabilidad, si bien experimentan pérdida de cultivabilidad, originando subpoblaciones de células viables no cultivables (VNC) y cultivables. Las condiciones de inducción del estado VNC en *V. harveyi*, los cambios morfológicos que experimenta, junto a su capacidad de resucitación al revertir las condiciones adversas, difieren de los establecidos para *E. coli*. Las diferencias entre ambas bacterias también quedan reflejadas en la caracterización del subproteoma de las envueltas celulares. Así, aunque ambas bacterias conservan proteínas implicadas en el mantenimiento de la estructura celular, el transporte y la bioenergética, *E. coli* adopta una estrategia más conservadora manteniendo su perfil proteico, mientras que *V. harveyi* modifica la expresión de un gran número de proteínas en función de las condiciones de estrés. Estos resultados indican que ambas bacterias desarrollan estrategias de supervivencia distintas bajo condiciones de estrés. La estrategia de supervivencia de *E. coli* parece englobarse dentro del modelo *bust and boom*, suponiendo la adopción del estado VNC un proceso degenerativo. Por contra, para *V. harveyi* la estrategia basada en la adopción del estado VNC está detrás de la perdurabilidad de esta bacteria en el medio natural, si bien, el mantenimiento de una pequeña población de células cultivables que podrían contribuir a su persistencia sugiere la combinación de la inducción del estado VNC y del modelo *bust and boom*.

