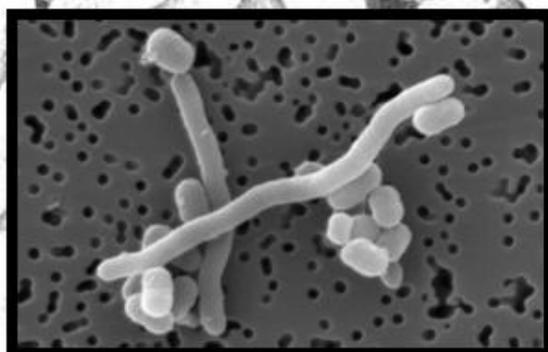
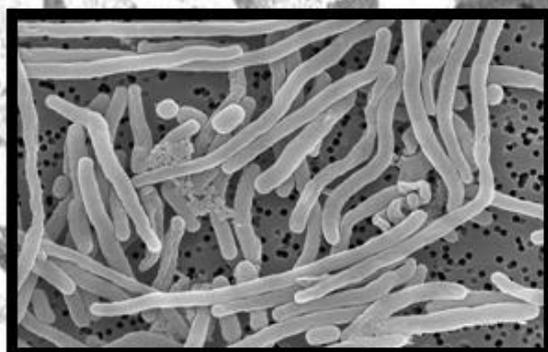




**Estrategias de supervivencia de
Acinetobacter baumannii en el
ámbito hospitalario**



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

Zalao Bravo del Hoyo
Tesis doctoral
Leioa, 2016



Universidad
del País Vasco Euskal Herriko
Unibertsitatea



TESIS DOCTORAL

ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA DE *Acinetobacter baumannii* EN EL ÁMBITO HOSPITALARIO

ZALOA BRAVO DEL HOYO

Leioa, 2016

UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO
EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA, MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

ESTRATEGIAS DE SUPERVIVENCIA DE *Acinetobacter baumannii* EN EL
ÁMBITO HOSPITALARIO

ZALOA BRAVO DEL HOYO

Directoras:

INÉS ARANA BASABE

MAITE ORRUÑO BELTRÁN

El trabajo incluido en la presente Tesis Doctoral ha sido objeto de las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones:

- **Bravo Z.**, Orruño M., Parada C., Kaberdin V. R., Barcina I. y Arana I. 2015. The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but nonculturable state. *Archives of Microbiology*. DOI: 10.1007/s00203-016-1200-1.
- Garaizabal I., **Bravo Z.**, Orruño M., Arana I. y Barcina I. 2012. Responses to temperature in three non-differentiating bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A* 163, S 23.

Comunicaciones:

- **Bravo Z.**, Parada C., Kaberdin V. R., Orruño M. y Arana I. 2015. Efecto del estrés ambiental sobre la capacidad de formación de biofilms de *Acinetobacter baumannii*. XXV Congreso Nacional de Microbiología. Logroño (España).
- **Bravo Z.**, Parada C., Orruño M. y Arana I. 2015. How *Acinetobacter baumannii* copes with stress provoked by common disinfectants used in hospital environment. 10th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Atenas (Grecia).
- **Bravo Z.**, Orruño M., Parada C., Garaizabal I., Kaberdin V.R. y Arana I. 2014. Effect of long-term starvation and temperature on survival and outer membrane proteome of *Acinetobacter baumannii*. Tagungsband zur 4. Gemeinsamen Konferenz von DGHM and VAAM. Dresden (Alemania).
- **Bravo Z.**, Fernández de Retana S., Garaizabal I., Orruño M., Gallego L., Arana I. y Barcina I. 2013. Efecto de la radiación visible sobre la cultivabilidad y viabilidad de *Acinetobacter baumannii*. XXIV Congreso de Microbiología SEM. L'Hospitalet (España).
- **Bravo Z.**, Gallego L., Garaizabal I., Orruño M., Arana I. y Barcina I. 2013. Persistence of *Acinetobacter baumannii* under adverse environmental conditions: nutrients absence,

desiccation and non-optimal temperatures. 9th International Symposium on the Biology of *Acinetobacter*. Colonia (Alemania).

- Garaizabal I., **Bravo Z.**, Orruño M., Arana I. y Barcina I. 2012. Responses to temperature in three non-differentiating bacteria. 28th Congress European Society for Comparative Physiology and Biochemistry. Bilbao (España).

La presente Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a la financiación recibida de los siguientes proyectos de investigación:

Beca de Investigación Predoctoral Gobierno Vasco: Enero 2012 - Diciembre 2015

Título del proyecto: Estrategias de supervivencia de *Acinetobacter baumannii* en el ambiente hospitalario

Entidad Financiadora: Gobierno Vasco

Duración: 2012 - 2014

Investigador principal: Inés Arana

Título del proyecto: Colonización de superficies y resistencia a biocidas: relación con la persistencia de *Acinetobacter baumannii* bajo condiciones de estrés

Entidad Financiadora: UPV/EHU

Duración: 2013 - 2015

Investigador principal: Inés Arana

Título del proyecto: Respuesta bacteriana al estrés

Entidad Financiadora: UPV/EHU

Duración: 2014 - 2017

Investigador principal: Inés Arana

AGRADECIMIENTOS

Dicen que lo bueno y breve dos veces bueno, así que en pocas palabras me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado de una manera o de otra a lo largo de estos cuatro años.

Por un lado, mis directoras Inés y Maite, sin olvidarme de Isabel, sin las cuales hubiera tirado la toalla en los momentos de flaqueza. Gracias por haberme enseñado tantas cosas.

Agradecer también a los compañeros del laboratorio Idoia, Itxaso, Claudia, Mikel, Olatz y a un sinfín de alumnos internos que han pasado por el laboratorio a lo largo de estos años, su ayuda tanto técnica como emocional, las maravillosas charlas, los eternos cafés, las sobremesas, los cumpleaños, las clases de *spinning*, las sorpresas, las comidas, etc.

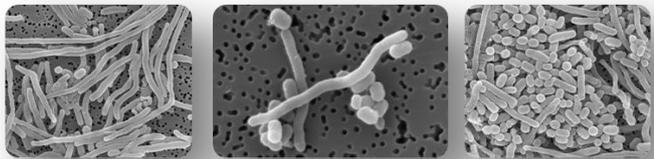
No me olvidó de los compañeros de la facultad, entre ellos Jimena y Mónica, por sus buenos consejos, y Pakillo, siempre dispuesto a alegrarnos el día con sus andaluzadas. A ti Mónica (siempre serás Minki para mí), que te voy a decir si creo que estos años y a ti te lo he dicho todo, simplemente gracias por todo, más allá de la tesis.

Tampoco puedo olvidarme de mis dos grandes amigos Iker y Aitor, sin vuestros ánimos y sin nuestros reencuentros por Santo Tomás nada hubiera sido lo mismo.

Por último, acordarme de mi familia y amigos, que aunque viendo las cosas desde fuera y sin saber mucho del tema, siempre han estado ahí para ayudarme, y sobre todo a ti Endika, por haberme aguantado y apoyado siempre.

Eskerrik asko denoi!

ÍNDICE



ÍNDICE	3
Índice de Figuras	7
Índice de Tablas	10
INTRODUCCIÓN	15
1. <i>Acinetobacter baumannii</i>	16
1.1. Características generales	16
1.1.1. Virulencia y patogenia	16
1.1.2. Resistencia a antimicrobianos	17
1.2. Importancia clínica	18
1.2.1. Epidemiología e incidencia de las infecciones producidas por <i>A. baumannii</i>	18
1.2.2. Factores de persistencia y transmisión en el ambiente hospitalario	19
1.3. Prevención y control	21
1.3.1. Niveles de actividad antimicrobiana de los desinfectantes	22
1.3.2. Requisitos del desinfectante ideal	23
1.3.3. Factores que influyen en los procesos de desinfección	23
1.3.4. Mecanismos de acción bactericida de los desinfectantes	24
1.3.5. Evaluación de la eficacia de los desinfectantes	24
2. Respuesta bacteriana al estrés	27
2.1. Estrategia <i>bust and boom</i>	27
2.2. Quiescencia celular o estado viable no cultivable (VNC)	28
3. Análisis proteómico	30
3.1. Metodologías proteómicas	31
3.1.1. Procesamiento de las muestras	31
3.1.2. Extracción de proteínas	31
3.1.3. Separación de proteínas	32
3.1.4. Identificación de proteínas. Espectrometría de masas (MS)	35
3.2. Estudio comparativo de proteínas de membrana	36

OBJETIVOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	45
1. Microorganismo y condiciones de cultivo	45
1.1. Cepa bacteriana	45
1.2. Curva de crecimiento	45
1.3. Preparación de los inóculos	46
2. Protocolo experimental para el estudio de la supervivencia	47
2.1. Experiencias de supervivencia	45
2.2. Ensayos supervivencia en medio líquido	47
2.3. Ensayos supervivencia sobre superficies sólidas	48
2.4. Análisis estadístico	48
3. Enumeración y caracterización de las poblaciones de <i>A. baumannii</i> en situaciones de estrés	50
3.1. Cuantificación del número total de bacterias	50
3.2. Cuantificación del número de bacterias que presentan membrana citoplasmática íntegra	50
3.3. Cuantificación del número de bacterias cultivables	51
3.4. Determinación de la longitud celular	51
3.5. Análisis de la capacidad de adhesión	51
3.6. Estudio de la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)	52
4. Estudio de la actividad antimicrobiana de desinfectantes de uso hospitalario sobre <i>A. baumannii</i>	53
4.1. Evaluación del efecto bactericida de los desinfectantes en medio líquido. Método de dilución-neutralización	53
4.1.1. Ensayo del neutralizante	54
4.1.2. Ensayo del desinfectante	54
4.2. Evaluación del efecto bactericida de los desinfectantes sobre superficies sólidas	55

5. Análisis de expresión génica	56
5.1. Obtención de las suspensiones celulares	56
5.2. Extracción y purificación del RNA total	56
5.3. Cuantificación y análisis de la calidad de RNA	57
5.4. Análisis de la expresión génica	57
5.4.1. Determinación semicuantitativa de la expresión génica mediante RT-PCR	57
5.4.2. Análisis cuantitativo de la expresión génica por RT-qPCR	59
6. Análisis proteómico	64
6.1. Obtención de suspensiones celulares	64
6.2. Obtención de proteínas de las envueltas celulares	64
6.3. Identificación y cuantificación de proteínas	65
6.4. Análisis de resultados	66
RESULTADOS	69
1. Estudio del efecto de factores abióticos sobre la supervivencia de <i>A. baumannii</i>	69
1.1. Estrategias de supervivencia de <i>A. baumannii</i>	69
1.2. Estudio del efecto de productos desinfectantes utilizados en el ambiente hospitalario	75
1.3. Estudio del efecto de los factores abióticos sobre la morfología y tamaño de <i>A. baumannii</i>	80
1.4. Estudio del efecto de los factores abióticos sobre la capacidad de adhesión de <i>A. baumannii</i>	83
1.5. Estudio del efecto de los factores abióticos sobre la expresión de varios genes implicados en la formación de biofilms	84
2. Análisis de las variaciones en la composición proteica de las envueltas celulares de <i>A. baumannii</i> durante su exposición a factores abióticos	92
DISCUSIÓN	107
1. Estudio del efecto de los factores abióticos sobre la supervivencia de <i>A. baumannii</i>	107

2. Efecto de los agentes físicos y químicos comúnmente utilizados en el control de <i>A. baumannii</i>	120
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXO	161
Anexo I: Abreviaturas	161
Anexo II: Soluciones, tampones y medios de cultivo	163
Anexo III: Análisis del subproteoma de las envueltas celulares de <i>A. baumannii</i> durante la supervivencia bajo condiciones de ayuno	168
Publicación: <i>The long-term survival of Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606^T under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but nonculturable state	187

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema representativo de las técnicas de separación de proteínas _____	33
Figura 2: Secuencia de pasos de un experimento típico de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) _____	36
Figura 3: Curva de crecimiento de <i>A. baumannii</i> ATCC 19606 ^T en caldo de cultivo MH _____	45
Figura 4: Evolución de la población de <i>A. baumannii</i> durante su permanencia en solución salina estéril mantenida a 4, 20 y 37°C _____	10
Figura 5: Imagen de las poblaciones de <i>A. baumannii</i> durante la permanencia como células en suspensión a 37°C obtenida mediante microscopía de epifluorescencia tras la tinción con el kit <i>Live/Dead® BacLight™</i> (Invitrogen) _____	71
Figura 6. Evolución de la población de <i>A. baumannii</i> durante la permanencia sobre superficies sólidas en condiciones de baja humedad relativa a 20 y 37°C _____	71
Figura 7: Evolución de la población de <i>A. baumannii</i> durante la permanencia a 20°C bajo radiación visible en solución salina estéril y mantenida sobre superficies sólidas _____	72
Figura 8: Evolución de la población de <i>A. baumannii</i> durante la permanencia a 20°C bajo radiación UV-C en solución salina estéril y mantenida sobre superficies sólidas _____	73
Figura 9: Recuentos bacterianos de las diferentes subpoblaciones obtenidas tras la exposición de suspensiones de <i>A. baumannii</i> a concentraciones crecientes de los agentes oxidantes hipoclorito sódico (NaOCl) y peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂) a 20°C _____	74
Figura 10: Actividad bactericida de los desinfectantes comerciales Instrunet® SURFA' SAFE, Instrunet® ANIOSYME DD1 y la lejía sobre <i>A. baumannii</i> mantenida en solución triptona-sal y sobre superficies sólidas de acero inoxidable a 20°C _____	79
Figura 11: Actividad bactericida del peróxido de hidrógeno 2% (H ₂ O ₂) frente a <i>A. baumannii</i> mantenida en solución triptona-sal a 20°C durante distintos periodos de tiempo _____	80
Figura 12: Fotografías de muestras de <i>A. baumannii</i> recogidas a lo largo de la supervivencia en solución salina estéril: 30 minutos tras la inoculación y tras 10 días a 37°C _____	82

Figura 13: Evolución de la distribución del tamaño celular de <i>A. baumannii</i> a lo largo de su permanencia en solución salina estéril a 20 y 37°C _____	82
Figura 14: Evolución de la distribución del tamaño celular de <i>A. baumannii</i> a lo largo de su permanencia sobre superficies sólidas con baja humedad relativa a 20 y 37°C _____	83
Figura 15: Variación en la adherencia, expresada como OD _{595nm} . Obtenidas para poblaciones de <i>A. baumannii</i> mantenidas en solución salina estéril y sobre superficies sólidas a 20°C y 37°C _____	84
Figura 16: Patrón electroforético obtenido para las muestras de RNA extraídas a partir de poblaciones mantenidas en suspensión salina y sobre superficies sólidas a 20 y 37°C ____	86
Figura 17: Determinación semicuantitativa (RT-PCR) de la variación de la expresión de los genes <i>ompA</i> , <i>bfmR</i> y <i>csuAB</i> respecto a la expresión inicial, obtenida tras 2 y 8 días de permanencia de <i>A. baumannii</i> en medio líquido a 20 y 37°C _____	87
Figura 18: Determinación semicuantitativa (RT-PCR) de la variación de la expresión de los genes <i>ompA</i> , <i>bfmR</i> y <i>csuAB</i> respecto a la expresión inicial, obtenida tras 2 y 8 días de permanencia de <i>A. baumannii</i> sobre superficies sólidas a 20 y 37°C _____	88
Figura 19: Análisis de variabilidad de los genes de referencia candidatos. Representación de los valores de Ct obtenidos para los genes <i>cpn60</i> y <i>gltA</i> en poblaciones mantenidas en suspensión salina y sobre superficies sólidas a 20 y 37°C _____	89
Figura 20: Variación, con respecto a la inicial, de la expresión de los genes <i>ompA</i> , <i>bfmR</i> y <i>csuAB</i> a los 2 y 8 días de permanencia de <i>A. baumannii</i> en solución salina a 20 y 37°C, obtenidos por RT-qPCR _____	90
Figura 21: Variación, con respecto a la inicial, de la expresión de los genes <i>ompA</i> , <i>bfmR</i> y <i>csuAB</i> a los 2 y 8 días de permanencia de <i>A. baumannii</i> sobre superficies sólidas a 20 y 37°C, obtenidos por RT-qPCR _____	91
Figura 22: Porcentajes de proteínas asociadas a envueltas celulares, citoplasmáticas y de localización indeterminada en extractos celulares obtenidos al inicio (P0) y tras 3 (P1) y 15 (P2) días de permanencia de <i>A. baumannii</i> en medio líquido y sobre superficies sólidas _____	93
Figura 23: Número de proteínas detectadas al inicio (P0) y tras 3 (P1) y 15 (P2) días de permanencia de <i>A. baumannii</i> en solución salina mantenida a 20 y 37°C. Proteínas	

asociadas a las envueltas celulares, citoplasmáticas y de localización indeterminada y clasificación de las mismas en base a la concentración normalizada _____ 94

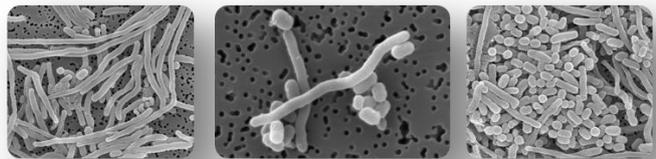
Figura 24: Número de proteínas detectadas al inicio (P0) y tras 3 (P1) y 15 (P2) días de permanencia de *A. baumannii* sobre superficies sólidas mantenida a 20 y 37°C. Proteínas asociadas a las envueltas celulares, citoplasmáticas y de localización indeterminada y clasificación de las mismas en base a la concentración normalizada _____ 95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Categorías establecidas por Stepanovic' y col. (2004) y utilizadas en este estudio para la clasificación de las células en función de su capacidad de adhesión _____	52
Tabla 2: Secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos de RT-PCR _____	58
Tabla 3: Condiciones de la reacción de transcripción reversa (RT) _____	58
Tabla 4: Parámetros utilizados para la reacción de PCR _____	59
Tabla 5: Secuencias de los cebadores específicos diseñados para la RT-qPCR _____	60
Tabla 6: Parámetros utilizados para la reacción de qPCR _____	61
Tabla 7: Resultados (UFCs ml ⁻¹) obtenidos en el ensayo de los productos Dey-Engley, caldo Lethen y neutralizante A frente al desinfectante Instrunet® SURFA' SAFE realizados según la norma AFNOR NF T 72-150 _____	76
Tabla 8: Resultados (UFCs ml ⁻¹) obtenidos en el ensayo de los productos Dey-Engley, caldo Lethen y neutralizante A frente al desinfectante Instrunet® ANIOSYME DD1 realizados según la norma AFNOR NF T 72-150 _____	76
Tabla 9: Resultados (UFCs ml ⁻¹) obtenidos en los ensayos de neutralización de la lejía con tiosulfato sódico a distintas concentraciones _____	77
Tabla 10: Resultados (UFCs ml ⁻¹) obtenidos en los ensayos de neutralización de la lejía con los neutralizantes Dey-Engley, caldo Lethen, neutralizante A y neutralizante B _____	77
Tabla 11: RNA total (fg cel ⁻¹) extraído de las poblaciones de <i>A. baumannii</i> a lo largo de su permanencia en solución salina y sobre superficies sólidas _____	85
Tabla 12: Resultado del análisis de calidad, expresado como ratios Abs 260/280 y Abs 260/230 de las muestras de RNA extraídas a partir de poblaciones mantenidas en solución salina y sobre superficies sólidas a 20 y 37°C _____	86
Tabla 13: Proteínas cuya expresión al inicio (P0) de las experiencias de supervivencia fue dependiente del soporte de incubación utilizado. Proteínas detectadas a los 30 minutos (P0), 3 días (P1) y 15 días (P2) de la supervivencia de <i>A. baumannii</i> tanto en solución salina como en superficies sólidas _____	99

Tabla 14: Proteínas directamente relacionadas con las envueltas celulares consideradas en este trabajo. Proteínas detectadas a los 30 minutos (P0), 3 días (P1) y 15 días (P2) de la supervivencia de <i>A. baumannii</i> tanto en solución salina como en superficies sólidas	100
Tabla 15: Proteínas citoplasmáticas asociadas con la membrana en determinadas condiciones de incubación. Proteínas detectadas a los 30 minutos (P0), 3 días (P1) y 15 días (P2) de la supervivencia de <i>A. baumannii</i> tanto en solución salina como en superficies sólidas	103
Tabla A1: Proteínas identificadas durante la permanencia de <i>A. baumannii</i> en solución salina a 20°C al inicio (P0), a los 3 (P1) y 15 (P2) días	168
Tabla A2: Proteínas identificadas durante la permanencia de <i>A. baumannii</i> en solución salina a 37°C al inicio (P0), a los 3 (P1) y 15 (P2) días	172
Tabla A3: Proteínas identificadas durante la permanencia de <i>A. baumannii</i> sobre superficies sólidas a 20°C al inicio (P0), a los 3 (P1) y 15 (P2) días	177
Tabla A4: Proteínas identificadas durante la permanencia de <i>A. baumannii</i> sobre superficies sólidas a 37°C al inicio (P0), a los 3 (P1) y 15 (P2) días	181

INTRODUCCIÓN



Las infecciones nosocomiales son infecciones adquiridas durante la estancia en un hospital que no estaban presentes, ni estaban en periodo de incubación, en el momento del ingreso del paciente. Estas infecciones, que aparecen tras 48 - 72 horas del ingreso hospitalario, ocasionan una elevada mortalidad, prolongan la estancia hospitalaria y aumentan los costes asistenciales. En 2014, el Estudio de Prevalencia de la Infección Nosocomial en España (EPINE) situó la frecuencia de las infecciones nosocomiales en un 5,6%. Este mismo estudio incluyó a *Acinetobacter baumannii* entre los microorganismos más prevalentes en este tipo de infecciones, siendo responsable del 1,64% de las mismas.

A pesar de los grandes avances en el control y prevención de las infecciones nosocomiales, éstas continúan suponiendo un grave problema de salud pública, y su control constituye uno de los retos más importantes de la medicina moderna. En este contexto, Pujol y Limón (2013) indican que la erradicación, es decir, la reducción a cero permanente de las infecciones nosocomiales, es una utopía; si bien, sí es posible su eliminación, entendida como la reducción máxima del número de infecciones mediante un esfuerzo continuado de prevención.

Cuanto más persista un patógeno nosocomial en el ambiente, durante más tiempo podrá ser una fuente de transmisión y, por tanto, poner en peligro a sujetos susceptibles (Kramer y col., 2006; Otter y col., 2011). Consecuentemente, conocer como las comunidades microbianas persisten y evolucionan en ambientes cerrados, como es el caso de los complejos hospitalarios, resulta de gran interés para los agentes implicados en salud pública (Ramos y col., 2015).

1. *Acinetobacter baumannii*

1.1. Características generales

A. baumannii es un bacilo Gram negativo con una longitud de entre 1,5 y 2,5 μm en fase logarítmica de crecimiento, pero que adopta una forma más cocoide en fase estacionaria. Son bacterias capsuladas en ocasiones, no formadoras de esporas, sin flagelos y que se disponen en parejas o formando cadenas de longitud variable. Es un microorganismo aerobio estricto, no fermentador, catalasa positivo, oxidasa negativo e inmóvil, aunque se ha descrito que es capaz de llevar a cabo movimientos de tipo *twitching* o *gliding* en medios semisólidos (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Towner, 2009). Pueden crecer en un rango amplio de temperaturas, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 30 a 35°C (Jawad y col., 1994; Bergogne-Bérézin y Towner, 1996).

A pesar de que los miembros del género *Acinetobacter* son considerados organismos ubicuos y que algunos investigadores han identificado *A. baumannii* en muestras vegetales (Berlau y col., 1999), de suelo (Houang y col., 2001) o de aguas residuales (Zhang y col., 2009), fuera del ambiente hospitalario no se conoce un hábitat natural para este microorganismo (Peleg y col., 2008). Dentro del ambiente hospitalario se encuentra colonizando alimentos en malas condiciones, sistemas de ventilación, material quirúrgico o la piel y el tracto respiratorio de pacientes hospitalizados.

En el pasado, las especies del género *Acinetobacter* eran consideradas saprófitos de escasa importancia clínica (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996), pero con la introducción de nuevos antibióticos y la utilización de metodologías invasivas en las Unidades de Cuidados Intensivos (UCIs), las infecciones causadas por *A. baumannii* y los problemas de resistencias a antibióticos se han hecho cada vez más frecuentes (McConnell y col., 2012) en los hospitales de todo el mundo. Hoy en día, *A. baumannii* es uno de los patógenos nosocomiales más importantes entre los microorganismos Gram negativos no fermentadores tras *Pseudomonas aeruginosa* (Landman y Quale, 2002).

1.1.1. Virulencia y patogenia

En comparación con otros microorganismos Gram negativos, en *A. baumannii* se han identificado muy pocos factores de virulencia. Si bien, la secuenciación de su genoma y el uso de nuevas

metodologías para su análisis están siendo cruciales para la identificación de los factores que contribuyen a su patogénesis.

El factor de virulencia mejor caracterizado hasta la fecha es probablemente la proteína de membrana externa OmpA. Choi y col. (2008) demostraron que se trata de una proteína inductora de la apoptosis celular con un papel muy importante en la adhesión e invasión de las células epiteliales. Además, Kim y col. (2009) relacionan la OmpA con la habilidad de *A. baumannii* de persistir y crecer en el suero humano, y su implicación en la formación de biofilms (Gaddy y Actis, 2009) podría facilitar la supervivencia de esta bacteria en condiciones desfavorables.

Además, se han descrito diversas moléculas y estructuras que contribuyen a la patogenicidad de este microorganismo. *A. baumannii* posee enzimas hidrolíticas y fosfolipasas que facilitan la invasión y la diseminación bacteriana, así como proteínas de unión a penicilinas (PBPs), moléculas encargadas de la unión e inactivación de los antibióticos β -lactámicos que participan en la síntesis del peptidoglucano, contribuyendo a la estabilidad de la célula bacteriana (Sauvage y col., 2008). Entre las estructuras relacionadas con la virulencia de *A. baumannii*, destaca el lipopolisacárido (LPS), que además de actuar como endotoxina, le confiere junto a la cápsula resistencia frente a disolventes orgánicos y detergentes y protege a las bacterias frente a la respuesta inmunitaria (Russo y col., 2010). Asimismo, *A. baumannii* es capaz de producir sideróforos, compuestos de bajo peso molecular que atrapan el hierro con alta afinidad (Dorsey y col., 2003) y que permiten su supervivencia bajo condiciones de escasez de hierro.

Finalmente, *A. baumannii* presenta la capacidad de comunicarse célula-célula mediante *quorum sensing*. Esta habilidad se ha relacionado con numerosos procesos celulares como la producción de factores de virulencia, la transferencia de plásmidos, o la bioluminiscencia (Whitehead y col., 2001; Vallenet y col., 2008). Asimismo, esta capacidad de comunicarse mediante *quorum sensing* interviene en la formación de biofilms, otro importante factor de virulencia relacionado con la supervivencia y la resistencia a antibióticos de *A. baumannii* (Gaddy y Actis, 2009; Bhargava y col., 2010).

1.1.2. Resistencia a antimicrobianos

La habilidad de *A. baumannii* de adquirir mecanismos de resistencia a antibióticos ha permitido a este microorganismo persistir en el ambiente hospitalario y ha propiciado la aparición de cepas multirresistentes en los hospitales de todo el mundo (McConnell y col., 2012). Los mecanismos de resistencia que presenta *A. baumannii* se pueden resumir en la disminución de la permeabilidad

de la membrana, la presencia de bombas de expulsión, la inactivación enzimática de antibióticos y las mutaciones de las estructuras diana.

A. baumannii es un microorganismo capaz de disminuir la permeabilidad de su membrana plasmática modificando el número de porinas. De esta manera consigue disminuir la velocidad de acumulación de los antibióticos β -lactámicos en el espacio periplásmico (Hancock, 1997). Además, las bombas de expulsión, estructuras proteicas capaces de expulsar del citoplasma y del periplasma bacteriano compuestos tóxicos para la bacteria, permiten mantener bajas las concentraciones de estos antibióticos en el interior de la célula (Grkovic y col., 2002). Por otra parte, *A. baumannii* posee numerosas enzimas capaces de hidrolizar los distintos tipos de antibióticos utilizados para el tratamiento de las infecciones que provoca. Entre estas enzimas destacarían β -lactamasas, encargadas de unirse e inhibir antibióticos β -lactámicos; enzimas AME (*aminoglycoside modifying enzymes*), con capacidad de hidrolizar antibióticos aminoglucósidos (Nemec y col., 2004; Hujer y col., 2006); carbapenemasas encargadas de hidrolizar los carbapenems (Queenan y Bush, 2007; Walsh, 2007) y enzimas responsables de la resistencia a las quinolonas (Vila y col., 2002; Wisplinghoff y col., 2004).

Por último, las alteraciones de las PBPs, responsables de la estabilidad de pared celular y blanco de los antibióticos β -lactámicos, evitan la lisis de la pared celular al disminuir la afinidad de los β -lactámicos por ellas (Vila y Marco, 2002).

1.2. Importancia clínica

1.2.1. Epidemiología e incidencia de las infecciones producidas por *A. baumannii*

Actualmente se considera a *A. baumannii* como uno de los patógenos nosocomiales más importantes a nivel mundial (Roca y col., 2012). En un estudio de prevalencia de las infecciones ocurridas en UCIs realizado en 75 países de los cinco continentes, este microorganismo fue considerado el quinto patógeno más común (Vincent y col., 2009). Diferentes estudios de vigilancia epidemiológica han determinado que *A. baumannii* es la quinta causa de neumonía, por detrás de *P. aeruginosa*, en pacientes hospitalizados, principalmente en UCIs (Jones, 2010). En el estudio multicéntrico llevado a cabo por Wisplinghoff y col. (2004) en EEUU, *A. baumannii* se identificó como el agente responsable del 34% de las infecciones sanguíneas sufridas por personas hospitalizadas.

Existen informes sobre brotes de *A. baumannii* multirresistente en hospitales de Europa, América del Norte, Argentina, Brasil, China, Taiwan, Hong Kong, Japón y Corea, así como en áreas más remotas como es el caso de Tahití en el Pacífico Sur (Levin y col., 1996; Houang y col., 2001; Barbolla y col., 2003; Quale y col., 2003; Lee y col., 2004; Nishio y col., 2004; Van Looveren y Goossens, 2004; Yu y col., 2004; Naas y col., 2005; Liu y col., 2006). Centrándonos en Europa, las infecciones producidas por *A. baumannii* han constituido un problema clínico importante en distintas regiones del continente (Van Looveren y Goossens, 2004), desde 1980 se ha informado acerca de brotes infecciosos hospitalarios producidos por *A. baumannii* en Inglaterra, Francia, Alemania, Italia, España y Holanda (Bergogne-Bérézin y Towner, 1996; Villegas y Harstein, 2003; Fournier y Richet, 2006).

En España, la prevalencia de infecciones debidas a *A. baumannii* ha seguido una tendencia al alza observada desde el año 1990 (Rodríguez-Baño y col., 2004), con una tasa de resistencias a carbapenems mucho mayor que las encontradas en UCIs de otros países europeos y EEUU (Asensio y col., 2008). Según los datos recogidos en el Estudio de Prevalencia de las Infecciones Nosocomiales de España (EPINE, 2014), *A. baumannii* es responsable del 1,64% de este tipo de infecciones en los hospitales de todo el estado, ocupando el duodécimo puesto en la lista de los patógenos más prevalentes causantes de infecciones nosocomiales.

1.2.2. Factores de persistencia y transmisión en el ambiente hospitalario

Como ya se ha mencionado, *A. baumannii* se ha convertido en las últimas décadas en uno de los patógenos nosocomiales más relevantes, siendo la causa de numerosas epidemias en hospitales de todo el mundo y afectando especialmente a pacientes críticos ingresados en la UCI (Bergogne-Bérézin, 2001). El control de estas epidemias resulta extremadamente difícil debido a la frecuente implicación de cepas multirresistentes a los antibióticos y a la elevada capacidad de *A. baumannii* de persistir en el ambiente hospitalario. Entre los factores responsables de esta habilidad para persistir en estos ambientes se encuentran su capacidad de formar biofilms (McConnell y col., 2012) y su resistencia a la desecación (Seifert y Dijkshoorn, 2008).

El primer paso para la colonización o infección es la adherencia a la célula hospedadora. Durante la colonización, las bacterias pueden formar microcolonias que resultan en la formación de comunidades microbianas correctamente estructuradas llamadas biofilms. Un biofilm constituye una comunidad de múltiples células bacterianas asociadas a una superficie biótica o abiótica, y embebidas en una matriz polisacárida (compuesta por carbohidratos, ácidos nucleicos, proteínas

y otras macromoléculas) (Costerton, 1995). Estos biofilms constituyen un mecanismo protector que contribuye a la supervivencia de los microorganismos bajo condiciones adversas o durante los procesos de infección. El hecho de que las bacterias capaces de formar estas estructuras sean más resistentes a los antimicrobianos y productos de limpieza que las células planctónicas convierte a la capacidad de formar biofilms en un importante factor de virulencia (Donlan y Costerton, 2002; Gaddy y Actis, 2009; de Breij y col., 2010).

La formación de biofilms puede estar influenciada por muchos factores como la disponibilidad de nutrientes, la presencia de apéndices celulares, los componentes de la superficie bacteriana o el *quorum sensing* (Gaddy y Actis, 2009). La formación de biofilms es un proceso estrictamente regulado que responde a señales ambientales (Stanley y Lazazzera, 2004). Tomaras y col. (2003) demostraron que la habilidad de *A. baumannii* ATCC 19606^T de sintetizar los *pili* implicados en la adhesión a superficies abióticas depende de la expresión del gen *csuE*, perteneciente al operón *CsuAB/ABCDE*. La inactivación del gen *csuE* da lugar a la abolición de la producción de los *pili* y de la formación de biofilms, lo que sugiere que los apéndices celulares dependientes del operón *CsuAB/ABCDE* tienen un papel esencial en la formación de biofilms sobre superficies abióticas. A su vez, la expresión de este operón está controlada por el sistema regulador de dos componentes *BfmRS*. Este sistema incluye una proteína sensora codificada por el gen *bfmS*, cuya inactivación tiene un leve efecto sobre la formación de biofilms, y una proteína reguladora codificada por el gen *bfmR*. La inactivación de esta última da lugar a la pérdida de la expresión del operón *CsuAB/ABCDE*, lo que limita/inhíbe la formación de biofilms sobre superficies abióticas (Tomaras y col., 2008).

Por otro lado, la adhesión a superficies bióticas, como las células epiteliales, es independiente de la expresión del operón *CsuAB/ABCDE*, pero en este proceso es esencial la expresión de la proteína de membrana externa *OmpA* (Gaddy y col., 2009). También se han identificado otros *pili*, independientes del operón *CsuAB/ABCDE*, implicados en la adhesión a estas superficies (de Breij y col., 2010).

Algunos autores han propuesto que la capacidad de las cepas clínicas de formar biofilms sobre superficies abióticas promueve la resistencia de determinadas cepas de *A. baumannii* a la desecación y a la acción de los antibióticos y desinfectantes (Tomaras y col., 2003; Rodríguez-Baño y col., 2008; Gaddy y Actis, 2009). Así, la resistencia a la desecación podría ser la responsable de la permanencia de *A. baumannii* en el ambiente hospitalario durante largos periodos de tiempo, facilitando su supervivencia sobre los distintos equipos médicos y su propagación a través

del personal hospitalario (Jawad y col., 1996; 1998; Wendt y col., 1997; Espinal y col., 2012; Gayoso y col., 2014).

1.3. Prevención y control

Para reducir la incidencia de las infecciones nosocomiales en los complejos hospitalarios es imprescindible el establecimiento de unas buenas medidas de prevención y control de la infección, así como el aislamiento estricto de pacientes, la estricta higiene de manos y la correcta descontaminación ambiental.

Los biocidas y los desinfectantes son ampliamente utilizados para la descontaminación del ambiente hospitalario y son fundamentales para prevenir las infecciones nosocomiales causadas por la microbiota hospitalaria. Pero tan importante como la elección de un desinfectante eficaz es que el procedimiento de desinfección sea correcto.

En los últimos años ha aumentado el interés por la desinfección de los equipos e instrumental médico como consecuencia del mayor conocimiento de los riesgos que supone una incorrecta desinfección y del incremento del número de exploraciones diagnósticas en pacientes graves o inmunodeprimidos que contribuyen al aumento del riesgo de adquisición de infecciones nosocomiales, sin olvidar el elevado coste que suponen estas infecciones a los sistemas sanitarios. A pesar del actual interés, como han puesto de manifiesto diversas comunicaciones sobre infecciones o brotes epidémicos (Michele y col., 1997; Wenzel, 1997; Wisplinghoff y col., 2007) todavía es frecuente el incumplimiento de las recomendaciones de los expertos sobre los procesos de desinfección o el incorrecto seguimiento de los mismos.

En la actualidad, existen numerosos tipos de desinfectantes disponibles en el mercado. No obstante, en muchos casos, estos productos no cumplen las exigencias de eficacia. Además, a nivel internacional existe una gran variedad de métodos de evaluación utilizados para determinar su eficacia y un gran desconocimiento sobre el tema entre el personal sanitario. Todo esto hace necesaria una correcta política de desinfección que ayude a descender la mortalidad y morbilidad hospitalaria y reduzca, en muchos casos, las cargas de trabajo y los costes económicos que suponen las infecciones nosocomiales.

1.3.1. Niveles de actividad antimicrobiana de los desinfectantes

A diferencia de la esterilización, la desinfección es un proceso mediante el cual se reduce el nivel de microorganismos contaminantes y la materia orgánica presente, pero que no elimina los microorganismos en su totalidad. Spaulding (1968) destacó la importancia de la desinfección y propuso tres niveles o grados para la misma (Spaulding, 1968; Rutala y col., 2008).

- La desinfección de alto nivel es aquel procedimiento que destruye las formas bacterianas vegetativas, incluidas micobacterias, los hongos y los virus sobreviviendo las esporas bacterianas. La imposibilidad de eliminar las esporas diferencia esta desinfección de la esterilización química. Entre los productos clasificados en esta categoría, desinfección de alto nivel, se incluyen el formaldehído, el glutaraldehído y el peróxido de hidrógeno.

- La desinfección de nivel intermedio provoca la destrucción de las formas bacterianas vegetativas, los virus con envueltas lipídicas y los hongos, pero pueden sobrevivir los virus no envueltos y las micobacterias, así como las esporas bacterianas. Ejemplos de desinfectantes de nivel intermedio son los alcoholes y los compuestos clorados y fenólicos.

- La desinfección de bajo nivel elimina únicamente las formas bacterianas vegetativas y los virus con envueltas lipídicas, pero no elimina, en los tiempos prácticos de uso, todas las formas fúngicas, las micobacterias, los virus no envueltos y las esporas bacterianas. Un ejemplo de desinfectante de bajo nivel lo constituyen los derivados de amonio cuaternario (QACs).

Spaulding (1968) también clasificó el instrumental y los dispositivos médicos utilizados en el diagnóstico y tratamiento en función del riesgo de infección que suponen para los pacientes: críticos, semicríticos y no críticos (Spaulding, 1968; Rutala y col., 2008; Rutala y Weber, 2013). De este modo, el nivel de desinfección usado en cada caso depende en parte de la naturaleza del equipo y de la categoría a la que pertenezca. Así, para la desinfección de material semicrítico como endoscopios, catéteres o equipos de anestesia, el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de EEUU (CDC) exige una desinfección de alto nivel. En el caso de los elementos no críticos, como instrumental médico que únicamente entra en contacto con la piel del paciente o con superficies del ambiente hospitalario (camas, mesillas o suelos), la desinfección requerida es de nivel bajo.

1.3.2. Requisitos del desinfectante ideal

Un desinfectante debe cumplir una serie de requisitos básicos que pueden variar dependiendo de su uso específico (Crawford, 1983). Un desinfectante debe actuar sobre un amplio espectro de microorganismos, debe ser eficaz en la eliminación de todo tipo de células bacterianas vegetativas incluidas las micobacterias. Aquellos que son utilizados para la eliminación de microorganismos sobre superficies inertes deben actuar de manera rápida o, al menos, en un tiempo práctico de uso. Estos productos no deben ser inactivados por la presencia de materia orgánica presente habitualmente sobre las superficies y dispositivos médicos de los sistemas hospitalarios. En lo que respecta a las características relacionadas con la seguridad, un desinfectante debe ser un producto estable, no tóxico ni alergénico, para asegurar la protección de los trabajadores. No debe dañar las superficies ni los dispositivos médicos tratados, por ello, la dilución de uso no debe ser corrosiva. Por otro lado, el desinfectante debe ir acompañado de un método indicativo para el usuario, que sea fácil de utilizar y biodegradable y que tenga un coste razonable para asegurar la provisión de los centros sanitarios.

Sin embargo, no todos los desinfectantes poseen las propiedades que debería cumplir el producto ideal.

1.3.3. Factores que influyen en los procesos de desinfección

La actividad de los desinfectantes depende de muchos factores que implican al propio desinfectante, a los microorganismos a eliminar, al material a tratar y al ambiente en el que se circunscribe el proceso (Rutala y col., 2008). La composición y la naturaleza química (solubilidad, constante de ionización, etc.), así como la concentración de los productos utilizados como desinfectantes, pueden afectar a la actividad de los mismos. Excepto en el caso de los compuestos iodóforos, cuanto mayor sea la concentración del desinfectante, mayor será la efectividad y menor el tiempo requerido para desinfectar un objeto (Russell y McDonnell, 2000). Además, se ha descrito que la resistencia de las poblaciones microbianas a los desinfectantes varía en función del tipo de microorganismo, de la densidad de la población microbiana o de su disposición en biofilms (Anderson y col., 1990; Donlan y Costerton, 2002; Dunne, 2002). La formación de estas comunidades microbianas, biofilms, hace a los microorganismos más resistentes a los desinfectantes debido a variaciones genotípicas o a la producción de enzimas neutralizantes (Vickery y col., 2004). Por otra parte, el tipo de material sobre el que se lleva a cabo la desinfección y la presencia de grietas o poros en las superficies, donde los microorganismos

pueden quedar atrapados y protegidos de la limpieza y desinfección, pueden afectar también a dicho proceso. Igualmente, el material orgánico como sangre, pus y heces presentes en objetos puede alterar la efectividad de los desinfectantes reduciendo significativamente su eficacia. Por último, los factores físico-químicos como temperatura, pH o humedad relativa junto con el tiempo de contacto también pueden hacer variar la actividad de los diferentes desinfectantes.

1.3.4. Mecanismos de acción bactericida de los desinfectantes

Como se ha indicado en el apartado anterior, la acción de los desinfectantes es distinta según el tipo de microorganismo. Generalmente, estos productos actúan sobre múltiples puntos o dianas. En lo que respecta a la acción bactericida, los desinfectantes afectan principalmente a la pared celular, a la membrana citoplasmática y a los ácidos nucleicos. Muchos productos interaccionan con la superficie celular y, una vez en el interior del microorganismo, pueden dañar uno o más componentes celulares (Rutala y col., 2008).

A continuación se reseñan algunos desinfectantes de uso común y sus dianas: el glutaraldehído altera el DNA y el RNA y la síntesis de proteínas (Scott y Gorman, 2001), los QACs provocan daños en la bicapa lipídica de la membrana celular bacteriana (Merianos 2001; Rahimi y col., 2012), los compuestos halógenos, como los derivados de cloro, son agentes oxidantes que provocan de la oxidación de los grupos sulfidrilos de las enzimas (Dychala 2001; Rahimi y col., 2012) y otros desinfectantes como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) producen radicales libres que dañan las proteínas y el DNA bacteriano (Block, 2001; Rahimi y col., 2012).

1.3.5. Evaluación de la eficacia de los desinfectantes

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los desinfectantes incluye tres fases fundamentales según recoge el Comité Europeo de Normalización (CEN/TC 216). La primera fase consiste en determinar la actividad antimicrobiana del producto mediante ensayos de suspensión básicos, realizados *in vitro*, en los que se enfrentan suspensiones de distintos microorganismos al desinfectante. La segunda fase consiste en determinar, en el laboratorio, si el desinfectante posee actividad antimicrobiana en las condiciones *reales* que se pueden encontrar en la práctica de la desinfección (concentración y tiempo de contacto compatibles con el material y la práctica clínica). En esta etapa son los procedimientos de desinfección los que son evaluados y no la

eficacia del desinfectante en sí misma. La tercera y última fase evalúa el desinfectante en la práctica clínica mediante estudios de campo en los que se controla el resultado de la desinfección.

Actualmente se dispone de algunos métodos oficiales para las dos primeras etapas. Sin embargo, los estudios de campo son muy difíciles de estandarizar.

A pesar de las limitaciones de los ensayos *in vitro*, éstos son indispensables para evaluar la dos primeras etapas de la actividad antimicrobiana de los compuestos considerados como posibles desinfectantes. Tanto los ensayos en suspensión como los ensayos en portagérmenes son ensayos *in vitro* ampliamente utilizados.

Los ensayos en suspensión son ensayos básicos que se utilizan en la primera de las fases de la evaluación de un desinfectante. Para ello, se mezcla un volumen apropiado de suspensión bacteriana con una determinada dilución del desinfectante y, tras un tiempo de contacto, se determina la reducción en la densidad bacteriana del inóculo inicial. Estos ensayos pueden ser cualitativos (cuando únicamente se determina la presencia/ausencia de microorganismos supervivientes) o cuantitativos (cuando se determina el número de microorganismos supervivientes con respecto al número inicial). Estas pruebas pueden realizarse con concentraciones variables de desinfectante, distintos tiempos de contacto, presencia o ausencia de materia orgánica y con aguas de diferente dureza.

El recuento de los microorganismos supervivientes puede hacerse por cultivo en medio sólido o por filtración sobre membrana. El recuento en medio sólido requiere la neutralización del desinfectante y, por tanto, ensayos previos para determinar cuál es el neutralizante ideal en cada caso (ensayos de dilución-neutralización); si bien, ésta es la metodología más utilizada.

Existen distintas normativas que describen esta metodología de los ensayos en suspensión, como la norma AFNOR NF T 72-150 de la Asociación Francesa de Normalización, equivalente a la normativa Europea (EN 1040) del Comité Europeo de Normalización (CEN).

Los ensayos con portagérmenes son ensayos diseñados para determinar la actividad antimicrobiana en condiciones similares a la práctica (desinfección de superficies, material quirúrgico, equipamiento, etc.). Suponen una aproximación mayor a la práctica de la desinfección que los ensayos en suspensión ya que utilizan pequeñas piezas de distintos materiales que simulan el instrumental y el equipo clínico. Estos ensayos comprenden los siguientes pasos: la contaminación del portagérmenes, la desinfección con la dilución de uso del producto a testar y la determinación de los microorganismos que han sido destruidos. A diferencia de los ensayos prácticos, los portagérmenes no son instrumentos clínicos reales sino objetos estandarizados y, a

semejanza de los ensayos en suspensión, las pruebas con portagérmenes pueden ser cualitativas o cuantitativas.

La inapropiada naturaleza del portagérmenes es la mayor fuente de variabilidad en los resultados, aumentando este problema con la reutilización de los mismos, bien por una incorrecta limpieza o por el posible deterioro (Sattar y Springthorpe, 1994). La rugosidad de las superficies, así como las grietas o poros pueden soportar una mayor carga microbiana y proteger a las bacterias de la acción del desinfectante (Cole y col., 1987; Mulberry, 1994).

La metodología para la evaluación de desinfectantes mediante el método de portagérmenes ha sido descrita en diferentes normativas como la AFNOR NF T 72-190, normativa equivalente a la europea EN 14561 del CEN.

2. Respuesta bacteriana al estrés

Durante su ciclo de vida, las bacterias experimentan momentos de estrés, situaciones en las que las condiciones ambientales se encuentran fuera de los parámetros normales de crecimiento. El éxito evolutivo de los microorganismos requiere de la habilidad para hacer frente a estas situaciones a través de un amplio abanico de estrategias que han sido estudiadas durante décadas.

Existen numerosos factores causantes de estrés para los microorganismos como son, entre otros, la ausencia/escasez de nutrientes, los cambios en la temperatura, la radiación solar o la baja disponibilidad de agua y, frecuentemente, estos factores actúan de forma combinada. Para adaptarse a estas condiciones adversas, los microorganismos poseen mecanismos de reconocimiento de los cambios ambientales que les permiten una respuesta apropiada, y en ocasiones, global, dada la actuación conjunta de los factores estresantes (Requena, 2012; Ron, 2013). En general, estas respuestas están orientadas a proteger los componentes celulares y a reparar las lesiones que puedan originarse, y se manifiestan por cambios bioquímicos que se acompañan de cambios fisiológicos y morfológicos y/o la inducción de mecanismos de resistencia al estrés (Madigan y col., 2003).

A nivel de población, 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 col., 2006). Ritterhaus y col. (2013) han descrito tres estrategias poblacionales que pueden adoptar las bacterias expuestas a condiciones de escasez de nutrientes, aunque pueden también ser características de poblaciones expuestas a otras condiciones ambientales adversas como la permanencia bajo condiciones de escasez de agua. Estas estrategias incluyen la estrategia *bust and boom*, la quiescencia celular y la esporulación, que estos autores denominan *verdadera dormancia* y no trataremos ya que *Acinetobacter* es un género que no forma esporas.

2.1. Estrategia *bust and boom*

Cuando los microorganismos se localizan en medios ricos en nutrientes su único objetivo es lograr la mayor tasa de crecimiento (Neidhardt, 1999). Sin embargo, en situaciones de escasez de nutrientes, la mayoría de las bacterias, individuos de una población, mueren, quedando únicamente una pequeña fracción de células viables que sobreviven a expensas de las células muertas. Así, se alcanza una situación de equilibrio entre los procesos de muerte celular y crecimiento ralentizado (Finkel, 2006) que se mantiene hasta que las condiciones se vuelven más

favorables y las células supervivientes retoman el crecimiento. Para llevar a cabo esta estrategia denominada *bust and boom*, los microorganismos deben ser capaces de una rápida replicación y de competir con otros microorganismos por el acceso a nuevos nutrientes introducidos en el sistema (Rittershaus y col., 2013). Posiblemente, esta estrategia se basa en la muerte programada de una parte de la población, permitiendo la liberación de nutrientes que sustentarán la supervivencia de otra fracción. Este fenómeno se ha descrito, por ejemplo, durante los primeros pasos del proceso de esporulación en *Bacillus subtilis* (Claverys y Håvarstein, 2007).

2.2. Quiescencia celular o estado viable no cultivable (VNC)

La quiescencia celular es una estrategia llevada a cabo por numerosas bacterias medioambientales (Lewis y Gattie, 1991). Cuando los microorganismos están expuestos a condiciones de estrés provocadas por la ausencia de nutrientes, la mayoría de la población ralentiza o inhibe su crecimiento para persistir durante largos periodos de tiempo como células viables sin capacidad de replicación. Estas células quiescentes, a diferencia de las células durmientes o esporas, presentan cierta actividad metabólica, mantienen el potencial de la membrana (Rao y col., 2008; Gengenbacher y col., 2010). Al contrario que la estrategia *bust and boom*, la quiescencia celular permite mantener el tamaño de la población durante los periodos de estrés (Jones y Lenon, 2010).

Esta descripción de la quiescencia celular coincide con la definición del estado viable no cultivable (VNC) realizada por Xu y col. (1982) y Roszak y Colwell (1987). Este estado implica que las células bacterianas no son capaces de crecer en medios de cultivo convencionales, si bien retienen algunas funciones metabólicas detectables (Oliver, 2005, 2010; Barcina y Arana, 2009) y, posiblemente su patogenicidad (Oliver, 2000; Karunasagar y Kuranasagar, 2005). La adopción del fenotipo VNC es una estrategia utilizada por un gran número de microorganismos como *P. aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio spp.* o *Escherichia coli* para hacer frente a condiciones adversas (Oliver, 2005; 2010).

La importancia de este estado radica en la posibilidad de que las células VNC recuperen la cultivabilidad cuando las condiciones ambientales devengan adecuadas. Este proceso denominado resucitación ha sido ampliamente descrito (Oliver y col., 1995; Whitesides y Oliver, 1997; Gupte y col., 2003; Wong y col., 2004; Coutard y col., 2007; Du y col., 2007), si bien no está exento de controversia (Bogosian y Bourneuf, 2001; Nystrom, 2001; Arana y col., 2007).

Además, desde un punto de vista sanitario, su importancia radica en la imposibilidad de detectar patógenos en estado VNC mediante métodos tradicionales de cultivos reglamentados por la legislación para su detección y recuento. Este hecho 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; o en los procesos de desinfección donde la eficacia de los productos se define en base a los descensos que producen en la cultivabilidad de los distintos microorganismos.

3. Análisis proteómico

La cantidad y el tipo de proteínas presentes en una célula están sometidos a cambios en respuesta al entorno y a otros factores (Madigan y col., 2003). El término *proteoma* fue usado por primera vez en 1995 (Wilkins y col., 1996) para describir a aquellas proteínas, específicas de un momento o condición concreta, producidas simultáneamente por una célula o tejido (Anderson y Anderson, 1998; Wilkins, 2009). La descripción del proteoma de un organismo, por tanto, permite tener una imagen dinámica de todas las proteínas expresadas, en un momento dado y bajo determinadas condiciones de tiempo y ambiente.

La proteómica puede describirse como el estudio de las proteínas a gran escala, que incluye identificación, cuantificación, determinación de la localización, modificaciones, interacciones, actividades y funciones de las mismas (Pandey y Mann, 2000; Fields, 2001). Fue en los años 70 cuando se empezaron a construir bases de datos de proteínas en base a los resultados obtenidos mediante electroforesis bidimensional (2DE). Sin embargo, no fue hasta los 90 cuando el desarrollo de la espectrometría de masas (MS), junto con la disponibilidad de un gran número de genomas secuenciados, marcaron el comienzo de la era proteómica.

Se puede hablar de tres tipos de proteómica: proteómica de expresión, cuyo objetivo es identificar todas las proteínas de una muestra, así como obtener toda la información acerca de las abundancias, modificaciones postraduccionales y localización subcelular; proteómica estructural, que permite la obtención de la estructura tridimensional de las proteínas; y proteómica funcional, cuya finalidad es averiguar la función de las proteínas y conocer las interacciones que pueden efectuar (Quero y col., 2015).

Las técnicas en proteómica ofrecen un novedoso y potente enfoque para diferentes áreas de la Microbiología, desde la Ecología Microbiana (identificación de microorganismos, mecanismos de respuesta al estrés, etc.) o la Biotecnología (mecanismos de degradación de contaminantes, productos microbianos de interés, desarrollo de fármacos y vacunas, etc.) hasta la Microbiología Clínica (diagnóstico de patógenos, seguimiento de brotes, dinámica patógeno-hospedador, control de la enfermedad, etc.). En el contexto del estudio de la respuesta bacteriana al estrés, la proteómica ha demostrado ser una herramienta válida para determinar las estrategias desarrolladas por los microorganismos para sobrevivir y proliferar en un ambiente dado (Nyström, 2001).

3.1. Metodologías proteómicas

3.1.1. Procesamiento de las muestras

El primer y más relevante paso de los estudios proteómicos es la obtención y el procesamiento de la muestra. Es de vital importancia que las muestras sean tomadas y procesadas siguiendo rigurosamente el protocolo seleccionado para que los resultados obtenidos sean veraces, reproducibles y que las diferencias observadas no sean fruto de la manipulación. Sin embargo, debemos de considerar que el procesamiento de la muestra en el laboratorio difiere según la procedencia de ésta y la finalidad del estudio.

Habitualmente es necesario concentrar las suspensiones celulares y añadir inhibidores de proteasas para evitar la degradación de las proteínas. Además, puede ser necesario el aislamiento de los microorganismos mediante separación inmunomagnética o clasificación mediante citometría de flujo (FACS). Todas estas manipulaciones deben ser optimizadas para incrementar la velocidad de procesamiento de la muestra y reducir el riesgo de digestión por proteasas.

3.1.2. Extracción de proteínas

Para la extracción de las proteínas, en primer lugar, se lleva a cabo la lisis celular mediante diversos métodos que pueden agruparse en procedimientos mecánicos y químicos. El posterior análisis de las proteínas extraídas determinará el procedimiento más apropiado para la rotura celular (Brown y Audet, 2008).

La lisis mecánica consiste en la ruptura de las paredes bacterianas, permitiendo así la liberación de los componentes celulares, mediante el uso de instrumentos como el mortero, el molinillo de bolas (más conocido como *beadbeating*), la prensa de French o por técnicas como la congelación o la sonicación. Estas metodologías presentan una ventaja importante frente a la lisis química ya que no se utilizan productos que penetren e interaccionen con los componentes celulares.

La lisis química consiste en la utilización de enzimas o productos químicos como los detergentes para la ruptura de la pared celular bacteriana. En ocasiones, estos métodos se combinan con métodos mecánicos para la ruptura completa de la pared celular. Su principal desventaja es la necesidad de retirar los restos del producto utilizado tras la lisis celular.

Una vez lisadas las células existen varias alternativas para la extracción de las proteínas, bien sea las proteínas totales o una fracción de las mismas. El estudio del proteoma total de los

microorganismos puede ser muy valioso en cuanto a la información que se obtiene de la expresión proteica en una condición determinada, pero puede resultar muy complejo. En consecuencia, se pueden aislar y caracterizar las proteínas de determinados orgánulos u otras estructuras subcelulares como las membranas con el objetivo de reducir dicha complejidad (Pasquali y col., 1999; Andersen y col., 2003; Josic y col., 2008).

En el caso de los organismos procariotas, las proteínas de las diferentes fracciones subcelulares se pueden aislar atendiendo a propiedades específicas de las mismas. En este sentido, las proteínas del periplasma se pueden obtener sometiendo a las células a un shock osmótico a bajas temperaturas (Neu y Heppel, 1965). Una vez aisladas las proteínas periplásmicas, mediante lisis celular y posterior separación de las membranas celulares por centrifugación, es posible el aislamiento y purificación de las proteínas citoplasmáticas. La obtención de las proteínas de membrana se puede realizar mediante una centrifugación en gradiente de densidad tras la lisis celular (Osborn y col., 1972). De manera alternativa, estas últimas pueden también ser aisladas mediante una centrifugación diferencial (Weiner 2008) tras el uso de detergentes como el Triton X-100, que únicamente disuelve las proteínas citoplasmáticas (Schnaitman 1971; Dickie y Weiner, 1979; Köster y Braun, 1989), o tras la disolución de las vesículas formadas en la lisis celular mediante la incubación con carbonato sódico (Fujiki y col., 1982; Molloy y col., 2000).

3.1.3. Separación de proteínas

La muestra para análisis proteómico es una mezcla compleja de cientos o miles de proteínas. En consecuencia, es esencial la utilización de una técnica de separación. Las técnicas de separación de proteínas se agrupan en técnicas en gel y técnicas *gel-free* (Figura 1).

- Separación basada en gel (Técnicas en gel)

La separación basada en gel de las proteínas de una muestra compleja se lleva a cabo mediante la metodología denominada electroforesis bidimensional (2DE), descrita por primera vez por O'farrell y col. (1975). Esta técnica permite la separación o fraccionamiento de una muestra compleja de proteínas en base al punto isoeléctrico y peso molecular de cada una de ellas. En la primera fase, el fraccionamiento de las proteínas se realiza en función del punto isoeléctrico (pI), pH en el que la proteína tiene carga cero. En la segunda fase, esas mismas proteínas se separan de acuerdo con su peso molecular en un gel de poliacrilamida desnaturizante. Una vez realizada la separación se lleva a cabo la visualización de las proteínas mediante la tinción del gel con

distintos productos como colorantes orgánicos, plata, marcajes radiactivos o fluorescentes (Unlü y col., 1997; López y col., 2000; Patton y col., 2000; Yan y col., 2000; Shaw y col., 2003; Choi y col., 2004; Lanne y col., 2005). Para su identificación, las proteínas son aisladas de los geles y digeridas enzimáticamente generando péptidos específicos (Fenn y col., 1989; Hillenkamp y col., 1991) que son analizados mediante espectrometría de masas (MS).

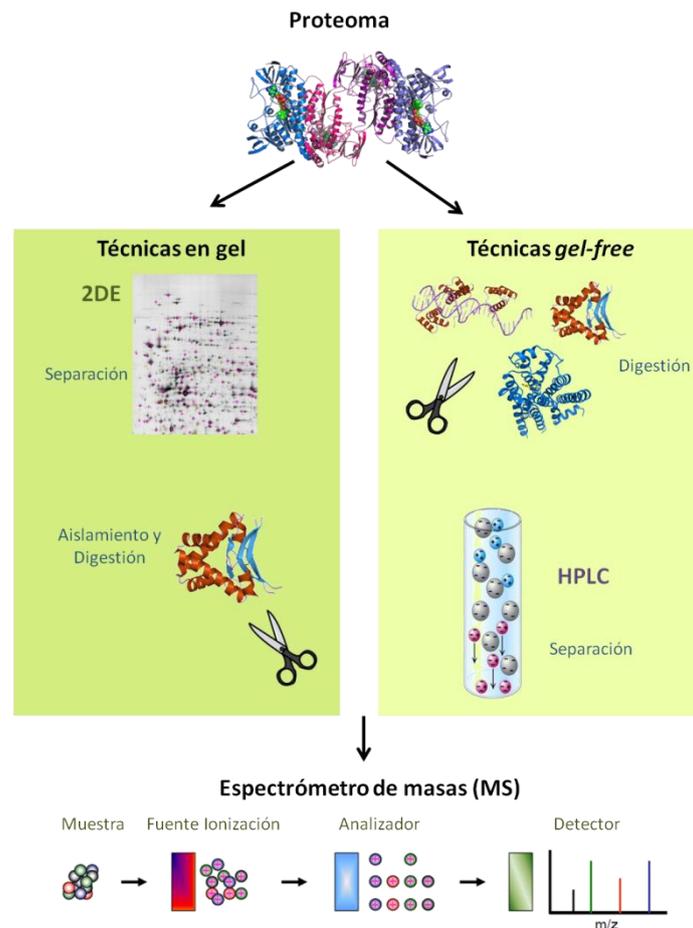


Figura 1. Esquema representativo de las técnicas de separación de proteínas.

- Separación no basada en gel (Técnicas *gel-free*)

La metodología para la separación de las proteínas de una muestra compleja sin el uso de geles de poliacrilamida es más conocida como *Shot-gun Proteomics*. Esta técnica consiste en la digestión previa de las proteínas, separación de los péptidos obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Chao y Hansmeier, 2012) y posterior análisis mediante MS para la identificación de las proteínas (LC-MS/MS).

En la actualidad, la tripsina es la enzima más utilizada para esta digestión proteica debido a su alta especificidad, eficiencia y bajo coste. La tripsina es capaz de escindir los enlaces peptídicos cuando el grupo carboxilo de un aminoácido es seguido por un residuo de lisina o arginina (Hustoft y col., 2012). Tras la digestión trípica, los péptidos resultantes tienen carga positiva, lo cual favorece su ionización en el posterior análisis por espectrometría de masas.

La cromatografía líquida (LC) es la técnica utilizada para la separación de los péptidos obtenidos tras la digestión (Van Oudenhove y Devreese, 2013), en concreto la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) caracterizada por su alto rendimiento y precisión. La cromatografía es un método de separación física donde los componentes a separar se distribuyen en dos fases; una estática (fase estacionaria) y otra que se mueve en una dirección (fase móvil) (IUPAC, 1997).

Existen diferentes tipos de cromatografía líquida (Tuli y Resson, 2009):

- Intercambio iónico (IEX): separación de las proteínas en función de la carga.
- Afinidad (AC): separación de las proteínas por afinidad a un ligando unido a la matriz.
- Filtración en gel (GF): separación de las proteínas en función de su tamaño.
- Fase inversa (RPC): separación de péptidos y proteínas en función de su hidrofobicidad. Esta es la cromatografía más adecuada para la separación de los péptidos y su posterior análisis por espectrometría de masas.

En los casos en los que la muestra de proteínas es muy compleja se lleva a cabo una cromatografía bidimensional que consiste en la combinación de dos tipos distintos de LC. La primera de las cromatografías es elegida en función del estudio a realizar, mientras que el último paso siempre ha de ser una RPC.

Mediante el uso de instrumentos de HPLC conectados en línea con equipos de MS, una vez realizada la separación de los péptidos, estos pasan directamente al espectrómetro de masas donde son analizados.

La utilización de ambas técnicas de separación presenta ciertas ventajas y desventajas. Las técnicas de separación en gel, tienen una alta resolución, permiten la separación de 3.000 - 5.000 proteínas y la detección de diferentes isoformas de una determinada proteína. Sin embargo, son metodologías que requieren cantidades considerables de proteína y que presentan ciertas limitaciones a la hora de detectar proteínas presentes en la muestra en baja concentración. Además, son técnicas laboriosas que no se pueden realizar de manera automatizada (Gil, 2003; Rodríguez, 2010; Quero y col., 2015). Las técnicas *gel-free*, aunque también presentan ciertas limitaciones como la alta redundancia o el enorme desafío informático que supone la obtención

de grandes cantidades de datos, solventan las limitaciones mencionadas de las técnicas basadas en gel. Las técnicas *gel-free* presentan una mayor sensibilidad, por lo que son aconsejables cuando la cantidad de proteínas de la muestra es escasa y permiten la detección de proteínas difícilmente separables por 2DE como las proteínas de membrana (Quero y col., 2015).

3.1.4. Identificación de proteínas. Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica en las que los átomos o moléculas de una muestra son ionizados, lo que permite que puedan ser separados en base a su relación masa/carga (m/z) y posteriormente registrados (Hernández, 2007).

Todos los equipos de espectrometría de masas están compuestos por una fuente de ionización, uno o varios analizadores de masas y un detector. Estos componentes pueden combinarse de distintas maneras con el objetivo de crear espectrofotómetros con distintas especificidades y prestaciones en términos de velocidad, resolución, sensibilidad, exactitud o precisión y rango de masas (Domon y Aebersold, 2006).

La fuente de ionización puede ser MALDI (*Matrix Assited Lasser Desorption Ionization*), donde los péptidos se mezclan con una matriz sólida para ser ionizados por la acción de pulsos de luz láser, o ESI (*Electrospray*), fuente que ioniza moléculas disueltas en fase líquida. Los iones resultantes de uno u otro proceso pasan al analizador de masas donde son separados en base a su relación m/z . Los analizadores de masas más comúnmente utilizados son el Quadropolo (Q), de Trampa Iónica (IT), de Tiempo de Vuelo (TOF) y de Trampa Orbital (Orbitrap). Estos analizadores poseen distintas propiedades y se pueden emplear de manera individual o combinados entre ellos dando lugar a lo que se conoce como espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

Tras el paso por los analizadores de masas, los iones entran en el detector, encargado de medir la abundancia de cada ión con relación m/z específica. El espectrofotómetro de masas en tándem (MS/MS) adquiere primero un espectro de masas de las mezcla de péptidos (MS) y selecciona ciertos péptidos candidatos (péptidos precursores) para su fragmentación. En concreto, aquellos que presentan ciertos requerimientos en cuanto a intensidad y carga se aíslan del resto para ser fragmentados, obteniéndose así un espectro de fragmentación (MS/MS). La información obtenida en ambos espectros se utiliza posteriormente para la identificación de las proteínas de la muestra (Nesvizhskii, 2007) mediante el uso de bases de datos y algoritmos como MASCOT (Perkins y col., 1999) o SEQUEST (Eng y col., 1994) (Figura 2).

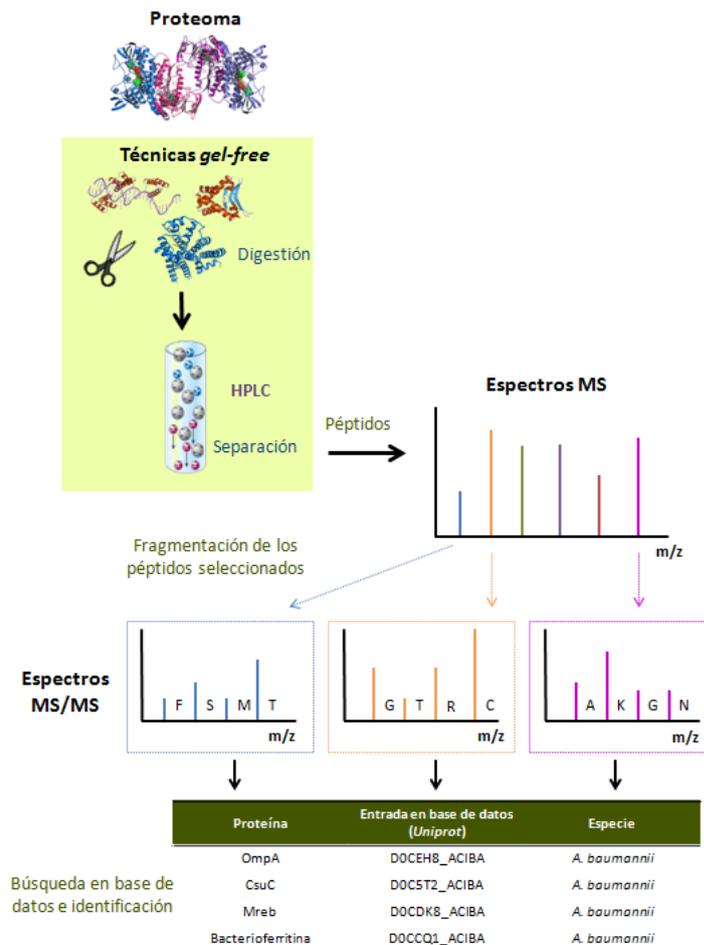


Figura 2. Secuencia de pasos de un experimento típico de espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS).

3.2. Estudio comparativo de proteínas de membrana

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre el proteoma de las envueltas celulares de diferentes microorganismos (Hommals y col., 2002; Blonder y col., 2004; Boyce y col., 2006; Siroy y col., 2006; Nally y col., 2007; Muela y col., 2008; Parada y col., 2016). Las membranas celulares juegan un importante papel en la estructura celular actuando de barrera entre la célula bacteriana y el medio que le rodea. Las proteínas embebidas en estas membranas son las responsables del flujo de nutrientes e iones entre el interior y el exterior celular, así como de prevenir la entrada a la célula de sustancias potencialmente peligrosas (Bernsel y Daley, 2009). Las proteínas de membrana actúan como receptores, transmitiendo información desde el exterior al interior de las células, están implicadas en la producción de energía, formando parte de la cadena de transporte de electrones, y en la virulencia y la patogenicidad de ciertos microorganismos. Por tanto, el estudio de esta fracción del proteoma es esencial para conocer y

comprender los procesos fisiológicos básicos que realiza un microorganismo en el ambiente, para el desarrollo de vacunas, para el desarrollo de métodos de identificación o para la identificación de potenciales dianas terapéuticas (Zielke y col., 2014). En este sentido, el conjunto de proteínas de membrana constituye el 60% de las dianas utilizadas por los productos generados en la industria farmacéutica (Hopkins y col., 2002).

En el caso concreto de *A. baumannii*, el análisis del subproteoma de membrana ha permitido incrementar el conocimiento sobre sus mecanismos de resistencia a antibióticos (Yun y col., 2008; Soares y col., 2010; Vashist y col., 2010).

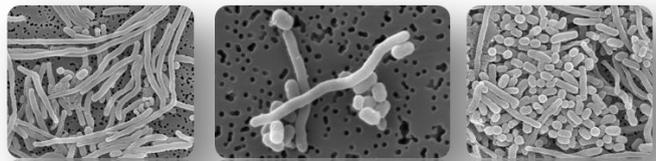
OBJETIVOS



A tenor de lo anteriormente expuesto, el objetivo planteado fue el estudio, desde un enfoque ecológico, de la respuesta de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T a las condiciones de estrés propias del ambiente hospitalario. Para alcanzar este objetivo global se establecieron los siguientes objetivos parciales:

1. Determinación de las estrategias de supervivencia desarrolladas por *A. baumannii* en respuesta al estrés inducido por factores abióticos. Análisis fenotípico, genómico y proteómico.
2. Estudio de los agentes físicos y químicos comúnmente utilizados en el control de *A. baumannii*.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Microorganismo y condiciones de cultivo

1.1. Cepa bacteriana

El microorganismo empleado en este trabajo fue *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T. A corto plazo esta cepa se conservó en agar Mantenimiento (Álvarez-Alcántara y col. 2001) a 4°C y para su conservación durante largos periodos de tiempo, se mantuvo a -80°C utilizando el sistema de conservación bacteriana MicrobankTM (Pro-Lab Diagnostics).

1.2. Curva de crecimiento

Se determinó la constante de la velocidad de crecimiento instantáneo (μ) de *A. baumannii* ATCC 19606^T. Para ello, un matraz de 1.000 ml conteniendo 500 ml de caldo de cultivo Mueller-Hinton (MH) estéril se inoculó hasta alcanzar una densidad final de 10^4 células ml^{-1} y se incubó en oscuridad y con agitación (120 r.p.m.) a 37°C. Periódicamente, se extrajeron alícuotas para la cuantificación de las células que se fijaron con formalina (3%, v/v) y se almacenaron a 4°C hasta su procesamiento. La cuantificación se realizó mediante microscopía de epifluorescencia tras tinción con naranja de acridina (Hobbie y col., 1977) (Ver apartado 3.1.). La constante de la velocidad de crecimiento instantáneo (μ) se determinó de acuerdo con Madigan y col. (2003).

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 3.

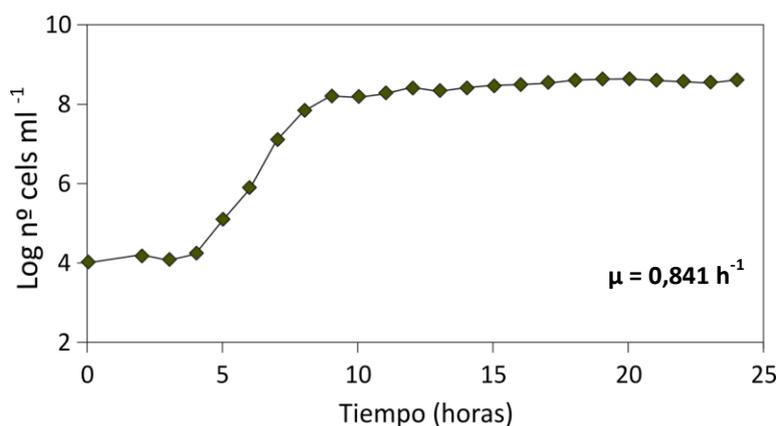


Figura 3. Curva de crecimiento de *A. baumannii* ATCC 19606^T en caldo de cultivo MH. Se indica la constante de la velocidad de crecimiento instantáneo (μ).

1.3. Preparación de los inóculos

Las bacterias se cultivaron como se describe en el apartado anterior. El tiempo de incubación se prefijó en base a la curva de crecimiento presentada anteriormente, de manera que las células se recogieron en fase estacionaria (12 horas de incubación).

Las células en fase estacionaria se recogieron por centrifugación (4.500 g, 20 minutos) realizándose 3 lavados sucesivos con solución salina estéril (NaCl 0,9%, p/v). Finalmente, las pastillas celulares se resuspendieron en solución salina estéril y las suspensiones bacterianas resultantes se emplearon como inóculos en las distintas experiencias.

2. Protocolo experimental para el estudio de la supervivencia

2.1. Experiencias de supervivencia

Para conocer las estrategias de supervivencia de *A. baumannii* frente a las condiciones ambientales adversas, células sometidas a la privación súbita de nutrientes se expusieron al efecto de la temperatura (4, 20 y 37°C), de la radiación visible (λ , 400-700 nm), de la radiación UV-C (λ , 280-100 nm) y de dos agentes oxidantes (hipoclorito sódico [Sigma Aldrich] y peróxido de hidrógeno [FORET]) durante distintos periodos de tiempo.

Excepto en el caso del estudio del efecto de los agentes oxidantes, las experiencias de supervivencia se realizaron en dos tipos de ensayos: células resuspendidas en medio líquido o mantenidas sobre superficies sólidas (Ver apartado 2.2. y 2.3.).

Previamente al inicio de las experiencias, todo el material de vidrio a utilizar se lavó con ácido sulfúrico (H_2SO_4 , 96%, v/v [Panreac AppliChem]) para eliminar los restos de materia orgánica. Posteriormente, el material tratado, se aclaró 10 veces con agua desionizada y se secó en estufa a 250°C durante 24 horas.

Para comprobar el efecto del agente oxidante hipoclorito sódico (NaOCl), las células se incubaron en solución salina estéril donde se adicionaron concentraciones crecientes (de 0 a 50 mg l⁻¹) de NaOCl con un tiempo de contacto de 15 minutos, a 20°C. Transcurrido ese tiempo, se tomaron muestras para medir el cloro residual total utilizando el kit de cloro *Microquant*TM (Merck) y se neutralizó el efecto del hipoclorito sódico con tiosulfato sódico (50 mM) (Fluka BioChemica). En el caso del peróxido de hidrógeno (H_2O_2), las células de *A. baumannii* se resuspendieron en solución salina estéril donde se adicionaron concentraciones crecientes (de 0 a 2 g 100 ml⁻¹) de H_2O_2 con un tiempo de contacto de 15 minutos a 20°C. Una vez transcurrido el tiempo de contacto, se llevó a cabo la neutralización mediante la adición de catalasa (11 U ml⁻¹) (Sigma Aldrich).

2.2. Ensayos supervivencia en medio líquido

En las experiencias en medio líquido, a los matraces pretratados (Ver apartado 2.1.) se añadió solución salina estéril para generar las condiciones de ausencia de nutrientes a la que fueron sometidas las células.

Los matraces, conteniendo solución salina estéril, se inocularon hasta una densidad celular final de aproximadamente 10⁸ células ml⁻¹. Posteriormente, las suspensiones celulares se sometieron a distintas situaciones de estrés (Ver apartado 2.1.). Excepcionalmente, la exposición a UV-C,

debido a su baja capacidad de penetración, se realizó con suspensiones celulares vertidas en placas Petri abiertas, así las células se expusieron directamente a la radiación.

Periódicamente, se tomaron alícuotas por triplicado con el fin de analizar los siguientes parámetros: número total de células, número de células con membrana citoplasmática íntegra, número de células cultivables, longitud celular, capacidad de adhesión a superficies inertes y morfología celular (Ver apartado 3.).

2.3. Ensayos supervivencia sobre superficies sólidas

Las experiencias para el estudio de la supervivencia sobre superficies sólidas se llevaron a cabo utilizando filtros de acetato de celulosa de 0,2 μm de diámetro de poro (Whatman) como soporte, que se incubaron en condiciones de ayuno severo y baja humedad relativa. Previo al inicio de las experiencias, los filtros se esterilizaron mediante exposición a luz UV-C (aprox. 255 nm; 70 mW cm^{-2}) durante 20 minutos. A continuación, cada filtro se inoculó con una suspensión celular recogida en fase estacionaria hasta una densidad celular final de aproximadamente 10^8 células cm^{-2} y se incubaron, en condiciones de baja humedad relativa (HR), 20-30%, que fue medida mediante un higrómetro *Fisher Scientific™ Traceable™ Digital Hygrometer/Thermometer* (Fisher Scientific). Posteriormente, las células recogidas sobre los filtros se sometieron a distintas situaciones de estrés (Ver apartado 2.1.). Excepcionalmente, cuando las células recogidas en los filtros se irradiaron con luz UV-C, las experiencias se realizaron irradiando directamente los filtros contenidos en placas Petri sin tapa.

Para el análisis de las muestras, periódicamente se recogieron 3 filtros y las células retenidas en cada filtro se resuspendieron en 10 ml de solución salina estéril mediante fuerte agitación durante 2 minutos. A partir de estas alícuotas se analizaron los siguientes parámetros: número total de células, número de células con membrana citoplasmática íntegra, número de células cultivables, longitud celular, capacidad de adhesión a superficies inertes y morfología celular (Ver apartado 3.).

2.4. Análisis estadístico

En cada experiencia las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores presentados se corresponden a la media de las tres réplicas. El coeficiente de variación entre las tres réplicas fue menor del 12% y las diferencias se determinaron mediante el análisis de la varianza (ANOVA),

considerándose como significativa una probabilidad (p) menor o igual que 0,05 ($p \leq 0,05$). Se realizó la transformación logarítmica para los datos microbiológicos.

3. Enumeración y caracterización de las poblaciones de *A. baumannii* en situaciones de estrés

3.1. Cuantificación del número total de bacterias

La determinación del número total de bacterias (*Total Number of Cells*, TNC) se llevó a cabo mediante microscopía de epifluorescencia, siguiendo el protocolo descrito por Hobbie y col. (1977).

Alícuotas de las experiencias de supervivencia o diluciones de las mismas en solución salina estéril se tiñeron con una solución de naranja de acridina (0,006% p/v) (Invitrogen) durante 2 minutos. Las muestras teñidas se filtraron a través de filtros de membrana de policarbonato de color negro con 0,22 μm de diámetro de poro (Merck Millipore) y 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 dicroico DM505 y filtro barrera BA520). Para cada una de las alícuotas se contaron un mínimo de 20 campos.

3.2. Cuantificación del número de bacterias que presentan membrana citoplasmática íntegra

El número de bacterias que conservan la integridad de la membrana citoplasmática (bacterias viables, Memb+) se determinó mediante microscopía de epifluorescencia utilizando el kit *Live/Dead® BacLight™* (Invitrogen) siguiendo el protocolo descrito por Joux y col. (1997). El kit está compuesto por dos fluorocromos, Ioduro de Propidio y SYTO 9, que difieren en sus características espectrales y en su capacidad para penetrar en la membrana citoplasmática. Tras la adición de ambos fluorocromos, las células viables o con membrana citoplasmática íntegra fluorescen en verde, mientras que las células no viables lo hacen en rojo.

Se mezclaron volúmenes iguales de ambos fluorocromos, y se añadieron 3 μl de la solución resultante a 1 ml de muestra o dilución de la misma. La mezcla se agitó y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se filtraron a través de filtros de policarbonato negros con 0,22 μm de diámetro de poro (Merck Millipore).

Las preparaciones se observaron utilizando un microscopio de epifluorescencia equipado como se ha indicado en el apartado 3.1. Las células viables y no viables se enumeraron por separado.

3.3. Cuantificación del número de bacterias cultivables

El número de bacterias cultivables (unidades formadoras de colonias, UFCs) se estimó por siembra en superficie, mediante la técnica de microgota, en el medio de cultivo agar Mueller-Hinton.

Tras la incubación durante 24 horas a 37°C se realizó el recuento de UFCs.

3.4. Determinación de la longitud celular

La longitud de las células de *A. baumannii* en condiciones de ayuno en suspensión o sobre superficies sólidas a 20 y 37°C se determinó siguiendo el protocolo descrito por Massana y col. (1997).

A partir de las preparaciones de microscopía de epifluorescencia (Ver apartado 3.1.) se capturaron imágenes de al menos 200 células utilizando una cámara Hamamatsu C2400, un ordenador (Macintosh) y un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400. Las imágenes con campos claros y bien definidos, con un número suficiente de bacterias y ausencia de partículas brillantes se seleccionaron para su análisis. Las imágenes se procesaron con el software Scion Image 1.62^a para determinar las dimensiones de las células.

Mediante el programa Microsoft Excel las bacterias se distribuyeron, de acuerdo a su longitud, en tres rangos. Para la obtención de estos tres rangos, se calculó la longitud media de 800 células de *A. baumannii* en fase estacionaria y su desviación estándar. El primero de los rangos comprendió aquellas células cuya longitud fue menor o igual que la media más su desviación estándar ($\leq 2,5 \mu\text{m}$); el segundo rango incluyó aquellas bacterias cuya longitud estuvo comprendida entre más de 2,5 μm y la media más dos veces su desviación estándar ($> 2,5 - \leq 3,75 \mu\text{m}$) y el tercero agrupó a aquellas cuya longitud superó los 3,75 μm ($> 3,75 \mu\text{m}$).

A partir de la información obtenida, para cada tiempo experimental se calcularon los porcentajes de células correspondientes a cada rango de longitud.

3.5. Análisis de la capacidad de adhesión

La capacidad de adhesión de *A. baumannii* ATCC 19606^T se evaluó de acuerdo al protocolo descrito por O'Toole y Kolter (1998) con ligeras modificaciones.

Alícuotas de 1 ml recogidas en los ensayos de supervivencia (tanto en medio líquido como sobre superficies sólidas) se añadieron a una placa de poliestireno de 24 pocillos estéril (Corning Incorporated) y se incubaron durante 48 horas a 37°C en ausencia de agitación. Transcurrido este

tiempo, los pocillos se lavaron 3 veces con agua desionizada y las células adheridas se visualizaron mediante la tinción con cristal violeta (0,5%, p/v) (Sigma Aldrich). A continuación, a cada pocillo se añadió etanol al 95% (v/v) (Panreac AppliChem) para disolver el colorante retenido en las células adheridas y se midió la densidad óptica de cada uno de ellos a 595 nm (OD_{595}) en un espectrofotómetro Synergy™HT (Biotek). Como control se utilizó 1 ml de solución salina estéril.

Las poblaciones se clasificaron en base a su capacidad de adherirse de acuerdo con Stepanovic' y col. (2004). Tras definir el punto de corte (OD_C), necesario para clasificar las células en base a su capacidad de adhesión, calculado como la densidad óptica media obtenida para los pocillos control más tres veces su desviación estándar, se establecieron las categorías que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Categorías establecidas por Stepanovic' y col. (2004) y utilizadas en este estudio para la clasificación de las células en función de su capacidad de adhesión.

Valor de $OD_{595\text{ nm}}$	Categoría
$OD_{595} \leq OD_C$	No adherentes
$OD_C < OD_{595} \leq (2 \times OD_C)$	Ligeramente adherentes
$(2 \times OD_C) < OD_{595} \leq (4 \times OD_C)$	Moderadamente adherentes
$(4 \times OD_C) < OD_{595}$	Fuertemente adherentes

3.6. Estudio de la morfología celular mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)

La obtención de imágenes de las células de *A. baumannii* en condiciones de supervivencia en medio líquido a 20 y 37°C mediante microscopía electrónica de barrido se realizó 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 fijadas con glutaraldehído al 2% (v/v) (Panreac AppliChem) en PBS 0,1 M (pH 7,4) se filtraron a través de filtros de membrana de 0,22 μm de diámetro de poro (Filtros GTTP, Merck Millipore). Los filtros con las células de *A. baumannii* adheridas fueron posteriormente deshidratados con soluciones crecientes de etanol (30, 50, 70, 90 y 97%, v/v). A continuación, los filtros se cubrieron con 1 ml de hexametildesilazán (Merck Millipore), se incubaron durante 5 minutos, se dejaron secar al aire y, finalmente, se recubrieron con oro para la obtención de las imágenes utilizando un microscopio electrónico de barrido Hitachi S4800.

4. Estudio de la actividad antimicrobiana de desinfectantes de uso hospitalario sobre *A. baumannii*

Se realizaron ensayos para comprobar el efecto de desinfectantes utilizados en hospitales de la Comunidad Autónoma del País Vasco sobre la viabilidad y la cultivabilidad de *A. baumannii*. Los desinfectantes testados fueron:

- 1 Lejía comercial (GARBE) (40 g de cloro activo l⁻¹).
- 2 Instrunet® SURFA' SAFE (Inibisa Laboratorios; Laboratorios ANIOS). Espuma detergente desinfectante destinada a la limpieza y desinfección de equipos y productos sanitarios. Utilizada comúnmente en el hospital para la desinfección de superficies (Ver Anexo II).
- 3 Instrunet® ANIOSYME DD1 (Inibisa Laboratorios; Laboratorios ANIOS). Desinfectante diseñado para la limpieza reforzada y pre-desinfección del material médico quirúrgico, de los equipos médicos y del material endoscópico. Este desinfectante se testó en la concentración indicada por el fabricante para su correcta utilización (0,5%, v/v) (Ver Anexo II).

Los tres desinfectantes se testaron sobre células en suspensión (diluyente caldo triptona-sal) y adheridas a discos de acero inoxidable durante tiempos cortos de 30 segundos, 2, 5 y 15 minutos siguiendo la metodología descrita por las normas AFNOR (Ver apartados 4.1. y 4.2.). Además, atendiendo a estas mismas normas se analizó el efecto del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) frente a *A. baumannii* resuspendido en caldo triptona-sal y se compararon los resultados con los obtenidos en los ensayos de supervivencia.

4.1. Evaluación del efecto bactericida de los desinfectantes en medio líquido. Método de dilución-neutralización

La evaluación del efecto bactericida de los desinfectantes en medio líquido se realizó siguiendo el protocolo descrito por Álvarez-Alcántara y col. (2001) de acuerdo con la técnica normalizada NF T 72-150 (AFNOR, 1987). Esta técnica consta de dos partes: ensayo preliminar de búsqueda de un neutralizante que evite la actividad antibacteriana residual del desinfectante, en nuestro caso, actividad residual sobre *A. baumannii*; y ensayo del desinfectante para valorar la efectividad del mismo.

4.1.1. Ensayo del neutralizante

Se probaron distintos neutralizantes con el fin de determinar su efectividad frente a los desinfectantes a testar. Por un lado, se comprobó la eficacia de neutralizantes ya diseñados como el caldo Dey-Engley (Sigma Aldrich), el caldo Letheen (Sutton, 1996) y el neutralizante diseñado por Sabbah y col. (2010) (Neutralizante B) y, por otro, en base a la composición de los desinfectantes testados en este trabajo se diseñó un posible neutralizante al que se denominó neutralizante A (Ver Anexo II).

Se comprobó la eficacia de cada uno de los neutralizantes mencionados frente a los desinfectantes de estudio con el fin de seleccionar el más efectivo en cada caso. Para comprobar esta idoneidad se prepararon 2 tubos, uno de ellos contenía 1 ml de agua destilada estéril (Tubo C) y el otro 1 ml del desinfectante a concentración máxima de ensayo (Tubo n). A ambos tubos se añadieron 9 ml del neutralizante de estudio y se mantuvieron a 20°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, a cada tubo se añadió la misma suspensión bacteriana (10^4 células ml^{-1}) y se mantuvieron a 20°C durante 5 minutos. Tras el periodo de incubación, se mezcló 1 ml de las suspensiones bacterianas tratadas con 15 ml de agar recuento (Ver Anexo II) fundido que se vertió en una placa Petri estéril. Este último paso se realizó por duplicado.

Los controles de crecimiento bacteriano (Control R) se realizaron mezclando 1 ml de la suspensión bacteriana (10^2 células ml^{-1}) con 15 ml de agar recuento (Ver Anexo II) y su posterior siembra en placa de la manera descrita anteriormente.

Una vez solidificado el agar, las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas.

La eficacia del neutralizante se comprobó calculando el valor medio de UFCs en los controles de crecimiento (R), el valor medio de UFCs de las placas de los controles en los que se adicionó agua destilada estéril (C), y el valor medio de las placas de los tubos con desinfectante (n). A partir de estos datos, se consideraron efectivos y no tóxicos aquellos neutralizantes que cumplieron los siguientes requisitos:

$$n \geq 0,5C; R \approx C$$

4.1.2. Ensayo del desinfectante

Para determinar el efecto de cada uno de los desinfectantes se prepararon baterías de 12 tubos con 0,9 ml del mismo y de 12 tubos con 2,25 ml de neutralizante seleccionado. A los tubos con desinfectante se añadió una suspensión bacteriana preparada en caldo triptona-sal (10^8 células ml^{-1}), se agitaron y se incubaron a 20°C durante 30 segundos, 2, 5 y 15 minutos. Transcurrido el

tiempo de contacto, 0,25 ml se transfirieron al tubo que contenía con el neutralizante y se mantuvieron durante 10 minutos a 20°C. Tras la neutralización, se realizaron diluciones seriadas de las suspensiones que se sembraron en medio MHA para el recuento de UFCs que se llevó a cabo tras la incubación de las placas Petri durante 48 h a 37°C. De acuerdo con la norma AFNOR NF T 72-150, un desinfectante se consideró efectivo cuando produjo una reducción de 5 unidades logarítmicas (10^{-5}) en el número de UFCs en un tiempo de contacto igual o inferior a 5 minutos.

4.2. Evaluación del efecto bactericida de los desinfectantes sobre superficies sólidas

Para testar el efecto de los desinfectantes sobre las células dispuestas en superficies se siguieron las instrucciones descritas en la norma AFNOR NF T 72-190 (AFNOR, 1989). Para ello, se utilizaron como portagérmenes discos de acero inoxidable de 1 cm de diámetro previamente esterilizados en autoclave sobre los que se vertieron 10 μ l de una suspensión bacteriana de aproximadamente 10^8 células ml^{-1} . Los discos se dejaron secar al aire durante 60 minutos dentro de una cabina de flujo laminar (Labculture® ESCO Class II BSC). Pasado ese tiempo, sobre cada disco se añadieron 50 μ l del desinfectante a evaluar y se dejó actuar durante 30 segundos, 2, 5 y 15 minutos. Transcurrido el tiempo de contacto, cada disco se introdujo en un vial que contenía 10 ml del neutralizante seleccionado. Cada vial se agitó durante dos minutos, tras los cuales se recogió la suspensión celular, se realizaron otros dos lavados de cada disco con solución salina estéril y, tras la agitación se recogió el líquido resultante. La suspensión obtenida o diluciones de la misma se utilizaron para cuantificar las células cultivables. Para ello, un volumen determinado de estas suspensiones o sus diluciones se filtraron a través de filtros de membrana estériles de 0,45 μm de diámetro de poro (Merck Millipore) y cada filtro se colocó sobre una placa Petri con medio MHA. Las placas se incubaron durante 48 horas a 37°C y tras este tiempo, se procedió al recuento de UFCs. Simultáneamente, se prepararon controles de la densidad celular inicial añadiendo 50 μ l de agua destilada estéril, en lugar del desinfectante, a discos de acero inoxidable previamente inoculados.

Atendiendo a la norma AFNOR NF T 72-190, un desinfectante se consideró efectivo cuando produjo una reducción de 5 unidades logarítmicas (10^{-5}) en el número de UFCs en un tiempo de desinfección acorde a la actividad presuntiva.

5. Análisis de expresión génica

Se determinó la expresión de los genes *ompA*, *bfmR* y *csuAB*, todos ellos implicados en la formación de biofilms (Tomaras y col., 2008; Gaddy y col. 2009), a lo largo de la supervivencia de *A. baumannii* bajo condiciones adversas.

5.1. Obtención de las suspensiones celulares

Alícuotas de los ensayos de supervivencia en suspensión y sobre superficies sólidas a 20 y 37°C, recogidas a los 30 minutos, 2 y 8 días, se mezclaron, por separado, en relación 8:1 con solución stop (Ver Anexo II), se incubaron en hielo durante 15-20 minutos y se centrifugaron (4.500 g, 15 minutos, 4°C) para recoger las células. A continuación, se realizaron 3 lavados sucesivos con solución salina estéril y una incubación con lisozima (1 mg ml⁻¹) (Sigma Aldrich) durante 30 minutos. Tras el tratamiento con lisozima, se recogieron las células por centrifugación (4.500 g, 5 minutos, 4°C) y a partir de las pastillas celulares obtenidas se extrajo el RNA total.

5.2. Extracción y purificación del RNA total

La extracción del RNA total se realizó con el kit *Trizol® Max™ Bacterial RNA Isolation kit* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez recogidas las células, en primer lugar, se añadió el reactivo *Max Bacterial Enhancement* para mejorar el aislamiento del RNA total y tras 4 minutos de incubación a 95°C se añadió 1 ml del reactivo *Trizol®*. Para la separación del RNA total, se añadieron 0,2 ml de cloroformo:isoamilalcohol 24:1 (AppliChem) frío. La mezcla se incubó durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó (12.000 g, 15 minutos, 4°C) para su separación en tres fases: fase inferior (fase de fenol-cloroformo), interfase (proteínas) y fase superior acuosa (RNA). El RNA de esta última fase se recogió cuidadosamente para la purificación que se llevó a cabo utilizando el kit *PureLink® RNA Mini Kit* (Thermo Fisher Scientific). Una vez diluida la muestra con etanol al 70% se transfirió a una columna *Spin Cartridge* preinsertada en un tubo colector que se centrifugó a 12.000 g durante 15 segundos para eluir los contaminantes del RNA. A continuación, se añadieron los tampones de lavado, *Wash buffer I y II*, y se repitió el proceso de centrifugación descrito anteriormente. Finalmente, con la columna insertada en un tubo nuevo se añadió agua libre de RNAsas para eluir por centrifugación (12.000 g, 2 minutos) el RNA total retenido y purificado.

En la extracción y purificación del RNA todo el material utilizado fue libre de RNAsas para evitar la degradación del RNA.

5.3. Cuantificación y análisis de la calidad del RNA

La cuantificación y el análisis de la calidad del RNA se realizaron en la Unidad de Expresión Génica de los Servicios Generales de Investigación (SGIker) de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU). La cuantificación se realizó con un sistema de cuantificación de alta precisión (Nanodrop ND-8000) y el análisis de la calidad con un espectrofotómetro bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) mediante el que se obtuvieron los ratios de pureza, 260/280 nm y 260/230 nm, y los patrones electroforéticos del RNA extraído.

5.4. Análisis de la expresión génica

A partir de las muestras de RNA, el análisis de la expresión génica se realizó de dos maneras distintas. Por un lado, se llevó a cabo la determinación semicuantitativa mediante RT-PCR (Transcripción inversa [RT] seguida de una PCR convencional) y por otro, se realizó la transcripción inversa seguida de una PCR a tiempo real para una cuantificación precisa (RT-qPCR).

5.4.1 Determinación semicuantitativa de la expresión génica mediante RT-PCR

Para llevar a cabo la RT-PCR, las muestras de RNA se trataron previamente con DNasa, para evitar contaminaciones de DNA genómico (gDNA), y se realizó el diseño y análisis de los cebadores para los genes de interés (*ompA*, *bfmR* y *csuAB*) y para el gen de referencia utilizado en este estudio (*16S rRNA*).

- Diseño y análisis de los cebadores

Mientras que en el protocolo de RT se utilizaron cebadores aleatorios, para la PCR convencional fueron necesarios cebadores específicos (Tabla 2). En todos los casos, los cebadores tuvieron una temperatura de fusión (T_m) de 50-56°C y un tamaño de amplicón de entre 255 y 951 pares de bases. Las secuencias de los cebadores fueron analizadas para evitar la formación de dímeros y estructuras en horquilla con la herramienta Primer 3 (v. 0.4.0.) y su especificidad fue confirmada mediante BLAST (NCBI).

Tabla 2. Secuencias de los cebadores utilizados en los ensayos de RT-PCR.

Nombre del cebador	Tipo*	Secuencia
<i>Acinetobacter baumannii ompA</i> (Turton y col., 2007)	F	CAATTGTTATCTCTGGAG
	R	ACCTTGAGTAGACAAACGA
<i>Acinetobacter baumannii bfmR</i> (Tomaras y col., 2008)	F	ATGAGCCAAGAAGAAAAG
	R	GACCAACCTTATAGGAAG
<i>Acinetobacter baumannii csuAB</i> (Tomaras y col., 2008)	F	TGGTCAGGTTGACGTTAAAT
	R	ATAATCGCCTTGTGCTTTTG
<i>Acinetobacter baumannii 16SrRNA</i> (Modificado de Rajamohan y col. [2010])	F	TCGATGCAACGCGAAGA
	R	CGTAAGGGCCATGATGA

* F: Forward; R: Reverse

- RT-PCR

Tras el tratamiento de las muestras de RNA con DNasa (Sigma Aldrich), el análisis de la expresión génica se llevó a cabo en dos pasos. En primer lugar se realizó la transcripción inversa (RT) del RNA con el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) y, a continuación, la PCR convencional del DNA copia (cDNA) generado en el paso anterior.

En la reacción de RT se partió de 500 ng de RNA en un total de reacción de 10 µl que incluía el buffer de reacción, los dNTPs, un inhibidor de RNasas y los cebadores aleatorios. Las condiciones de la reacción de RT se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones de la reacción de transcripción inversa (RT).

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	5	∞

Tras la RT, se llevó a cabo la PCR convencional a partir de 50 ng del cDNA obtenido con cebadores específicos para los genes de interés y referencia. En esta PCR, se incluyó también un control de presencia de gDNA, para lo cual se utilizó una muestra de RNA donde no se llevó a cabo la RT. Las condiciones de PCR utilizadas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros utilizados para la reacción de PCR.

Nº ciclos	T (°C)	Tiempo
1	95	5 min
	95	45 s
25	53	45 s
	72	2 min
1	72	5 min

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa (1,2%, p/v) (Invitrogen) y visualizados mediante la tinción con Gel Red™ (Biotium).

- Determinación semicuantitativa de la expresión génica

Para la semicuantificación de la expresión génica, una vez realizada la migración electroforética de los productos de PCR, se midió la intensidad de las bandas de obtenidas usando el software Gene Tools (Syngene). A partir de estas intensidades, con ayuda del programa Microsoft Excel, se calculó el ratio de expresión para cada gen de interés (*ompA*, *bfmR* y *csuAB*) en referencia a la expresión del gen de referencia (*16S rRNA*).

5.4.2 Análisis cuantitativo de la expresión génica por RT-qPCR

La cuantificación de la expresión mediante qPCR se realizó en varios pasos. Tras el diseño y análisis de los cebadores necesarios en este estudio, se llevó a cabo la transcripción inversa (RT) del RNA extraído y a continuación se realizó una qPCR. Este protocolo se llevó a cabo tanto para los genes de interés (*ompA*, *bfmR* y *csuAB*) como para los genes de referencia candidatos utilizados en el análisis (*gltA*, *cpn60*, *gyrB* y *gdhB*).

- Diseño y análisis de los cebadores

Los cebadores específicos necesarios para la reacción de qPCR se diseñaron con la herramienta PrimerQuest (Integrated DNA Technologies) y utilizando los parámetros universales para PCR a tiempo real. En todos los casos, su T_m fue de 61-63°C y su tamaño de amplicón de 88 a 104 pares de bases (Tabla 5). Las secuencias de los cebadores fueron analizadas para evitar la formación de dímeros y estructuras en horquilla con la herramienta OligoAnalyzer (Integrated DNA Technologies) y su especificidad fue confirmada mediante BLAST (NCBI).

Inicialmente, se propusieron 4 genes de referencia o housekeeping para el análisis de qPCR (*gltA*, *cpn60*, *gyrB* y *gdhB*) (Bartual y col., 2005; Hamouda y col., 2010). En el caso de los genes *gyrB* y *gdhB*, durante el diseño de los cebadores se realizó una comparación múltiple entre 14 cepas y se comprobó la existencia de una elevada variabilidad que descartó su utilización (Tabla 5). En consecuencia, la RT-qPCR únicamente se llevó a cabo para los genes de interés y los genes de referencia *gltA* y *cpn60*.

Tabla 5. Secuencias de los cebadores específicos diseñados para la RT-qPCR.

Nombre del cebador	Tipo*	Secuencia
<i>Acinetobacter baumannii ompA</i>	F	GCTTCTCGTTTGTCTACTCAAGG
	R	GCGAATACACGACGGTTCATAG
<i>Acinetobacter baumannii bfmR</i>	F	GTTCCGCCACACTATCATCAA
	R	TAATCGTCTGCACCCATTTC
<i>Acinetobacter baumannii csuAB</i>	F	ACTGCTTCTGCTGATGTAGTTG
	R	GTAGTGAAGTGTGTGGTTGGT
<i>Acinetobacter baumannii gltA</i>	F	GCGAGTTACCAACTGCTGAA
	R	ACGACGGAAACCATTGAAGAA
<i>Acinetobacter baumannii gyrB</i>	F	GCCGTTTACGTGAGCTTTCT
	R	GCCGCCTTCATAGTCATACAC
<i>Acinetobacter baumannii cpn60</i>	F	GGTAAAGAAGGCGTAATCACTGTA
	R	GGAGAGATATAACCACGGTCAAAC
<i>Acinetobacter baumannii gdhB</i>	F	CCGACATATAGCACGACTTTGG
	R	TACCTTCTGGACTAGCGATGAC

* F: Forward; R: Reverse

- Transcripción inversa (RT)

Para la síntesis de cDNA se empleó el kit *AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis* (Agilent Technologies). Para evitar que el DNA genómico contaminante interfiriera en los resultados, se partió de 600 ng de RNA tratado con DNasa en un volumen final de 20 µl de tampón de reacción que incluía los cebadores aleatorios. Esta mezcla se incubó a 65°C durante 5 minutos antes de llevarse a cabo la RT: 10 minutos a 25°C, 60 minutos a 55°C y 15 minutos a 70°C.

A lo largo del procedimiento, se efectuaron dos reacciones adicionales que fueron, por un lado, la obtención de la recta estándar a partir de diluciones seriadas del cDNA, necesaria para la

validación de la eficiencia de PCR y, por otro, los controles *RT minus*, controles de presencia de gDNA donde no se añadió la transcriptasa inversa.

- Protocolo de qPCR

Las amplificaciones de los genes de interés (*ompA*, *bfmR* y *csuAB*) y de los genes de referencia candidatos (*gltA* y *cpn60*) se realizaron de forma independiente, migrándose las muestras por triplicado para cada uno de los genes estudiados.

La qPCR se realizó en el sistema *7900HT Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystem) empleándose el kit *Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix* (Agilent Technologies) y el fluorocromo *SYBR Green* que se une a los amplicones de doble cadena. El protocolo de PCR empleando se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Parámetros utilizados para la reacción de qPCR.

Nº ciclos	T (°C)	Tiempo
1	95	3 min
40	95	5 s
	60	20 s
Curva de disociación	60-95	

Dado que el *SYBR Green* es un fluorocromo capaz de unirse a dímeros o amplificar productos inespecíficos pudiendo incrementar la fluorescencia total, se llevó a cabo un paso de disociación, en el que los productos se calentaron lentamente desde 60°C a 95°C. Este calentamiento provocó la disociación de las cadenas de DNA de los productos generados en la PCR y la liberación de las moléculas de *SYBR Green*, dando lugar a la disminución de la fluorescencia. Esto permitió calcular la T_m del amplicón y observar si existía más de un pico correspondiente a distintas T_m que pudiera estar originado por la presencia de dímeros de cebador. Dado que en el caso de los organismos procariontes el producto del gDNA es el mismo que el del cDNA (misma T_m), se requirió un control negativo adicional (NTC, *no template control*) donde no se añadió DNA molde, para detectar la amplificación de posibles dímeros o productos inespecíficos.

- Obtención y análisis de los resultados

Los resultados, estimados como fluorescencia normalizada respecto a ciclo de PCR, se obtuvieron con el software SDS 2.4 (Applied Biosystems) una vez fijados los parámetros línea base, que representa la fluorescencia basal, y valor umbral, que representa el punto en el que la fluorescencia supera significativamente la línea base. Para cada muestra se obtuvo el ciclo umbral (Ct), ciclo en el que la fluorescencia de la muestra superó el valor umbral, y se analizó la fase logarítmica de la amplificación.

Para el análisis de los resultados se estableció el siguiente procedimiento:

1. Cálculo y corrección de la eficiencia de PCR

El cálculo y la corrección de la eficiencia de PCR se llevaron a cabo mediante el software GenEx versión 5.4. (MultiD). Para ello, se realizaron diluciones seriadas a partir del cDNA obtenido, y se representó el valor Ct frente al logaritmo de la concentración de DNA. A partir de la pendiente de la recta obtenida se calculó la eficiencia de la PCR aplicando la fórmula:

$$\text{Eficiencia (E)} = [10^{(-1/\text{pendiente})}] - 1.$$

Tras la obtención y corrección de la eficiencia de PCR, se corrigieron los datos obtenidos para cada gen y se calculó el promedio de las réplicas de qPCR.

2. Análisis de estabilidad de los genes de referencia candidatos y normalización de la expresión de los genes a analizar

La normalización con respecto a genes de referencia con expresión estable entre los grupos y muestras de análisis trata de disminuir o eliminar toda variación sistemática técnica introducida en los diferentes pasos de la RT-qPCR (extracción RNA, síntesis de cDNA, qPCR, calidad RNA), así como compensar los efectos debidos a la diferente cantidad de muestra introducida. Por todo ello, en un análisis de qPCR es necesario utilizar un mínimo de 2 genes de referencia, para normalizar la expresión de los genes de interés, y además, estudiar previamente la variabilidad de los mismos.

El análisis de variabilidad de los genes de referencia propuestos en este trabajo se realizó utilizando el algoritmo Genorm (Vandesompele y col., 2002), implementado en el software GenEx. Mediante este algoritmo, se estableció la variabilidad de los genes de referencia y se determinó su validez para la normalización de la expresión de los genes a estudiar.

Adicionalmente, la cantidad de cDNA empleada en la reacción de qPCR se cuantificó por fluorimetría con el fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen) en combinación con *Qubit ssDNA assays*

(Invitrogen). Esta cuantificación es necesaria para la normalización de la expresión génica en caso de no encontrar ningún gen de referencia válido (Libus y Štorchová, 2006).

Una vez realizados ambos análisis se eligió el método más apropiado para la normalización y se normalizaron los valores de expresión obtenidos para los genes *ompA*, *bfmR* y *csuAB*.

3. Cálculo de la expresión relativa de cada gen y transformación logarítmica. Análisis de significación estadística.

Los dos últimos pasos para el análisis de los resultados se realizaron con el programa Microsoft Excel a partir de los datos de expresión corregidos y normalizados. Las expresiones relativas de cada gen se calcularon respecto a la media de todos los grupos atendiendo a la siguiente fórmula:

$$2^{-(\text{Ct normalizado muestra} - \text{Ct normalizado total de muestras})}$$

Una vez calculadas las cantidades relativas se calculó el logaritmo en base 2 de cada una de ellas y, a continuación, para conocer qué genes estaban regulados positiva o negativamente respecto al control se calculó el *Fold Change* (FC) o nivel de cambio. Para ello, se restaron las medias de los valores de cada grupo a comparar (en escala logarítmica), utilizando como grupo control las muestras recogidas a los 30 minutos (grupo de interés - grupo control).

Finalmente, se realizó un T-test de muestras independientes para comprobar si las diferencias de expresión obtenidas eran o no significativas ($p \leq 0,05$).

6. Análisis proteómico

Durante la exposición de *A. baumannii* ATCC 19606^T a condiciones adversas se caracterizaron las variaciones producidas en la composición proteica de las envueltas celulares de esta bacteria.

6.1. Obtención de suspensiones celulares

El análisis proteómico se realizó a partir de alícuotas recogidas a los 30 minutos, 3 y 15 días de las experiencias de supervivencia, tanto en medio líquido como sobre superficies sólidas, a 20 y 37°C.

A partir de las experiencias realizadas en medio líquido, las células se recogieron por centrifugación (8.000 g, 45 minutos, 4°C), realizándose 3 lavados sucesivos con TBS pH 7,5. Las poblaciones retenidas en los filtros, de las experiencias realizadas con células mantenidas en soporte sólido se resuspendieron en solución salina mediante agitación y, posteriormente, se recogieron por centrifugación (8.000 g, 20 minutos, 4°C). Finalmente, en ambos casos las pastillas celulares se resuspendieron en 10 ml de TBS pH 7,5 añadiéndose dos inhibidores de proteasas: *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma Aldrich, 250 µl por gramo celular) y PMSF 2 mM (AppliChem).

Las suspensiones celulares obtenidas se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C.

6.2. Obtención de proteínas de las envueltas celulares

La extracción de las proteínas de las envueltas celulares se llevó a cabo mediante el método de extracción por carbonato descrito por Molloy y col. (2000) con modificaciones. Las células se rompieron por sonicación intermitente utilizando un sonicador SONICS VibraCellTM VCX130 Ultrasonic Cell Disrupter (Sonics & Materials, Inc.) dotado con una sonda de 6 mm de diámetro (amplitud del 65%, ciclos de un total de 3 minutos de 30 segundos on/45 segundos off).

Los extractos se centrifugaron (6.000 g, 20 minutos, 4°C) para eliminar las células intactas. El sobrenadante obtenido se mantuvo en hielo mientras que las pastillas resultantes se resuspendieron de nuevo en TBS y se sonicaron en las mismas condiciones descritas anteriormente. Este proceso se repitió al menos tres veces.

A continuación, los sobrenadantes obtenidos en el paso anterior, se diluyeron (1:1) con carbonato sódico 0,2 M y se incubaron en hielo durante una hora con fuerte agitación. Tras la incubación, las muestras se ultracentrifugaron a 115.000 g durante 1 hora a 4°C. Los sobrenadantes se desecharon y las proteínas retenidas en las pastillas se resuspendieron en 1 ml de TBS.

Las suspensiones de proteína total se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80°C.

6.3. Identificación y cuantificación de proteínas

El análisis de las muestras 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 ello, 50 µg de proteínas totales se precipitaron siguiendo los pasos indicados por el protocolo del kit *2-D Clean-Up* (GE Healthcare). El pellet se resuspendió en *RapiGest* (0,2%) (Waters Corporation), se incubó durante 15 minutos a 85°C, se redujo con DTT (5 mM) (Sigma Aldrich), se alquiló con iodocetamida (15 mM) (Sigma Aldrich) y se digirió con tripsina (1:25) (Roche Diagnostics) durante toda la noche a 37°C. El reactivo *RapiGest* se inactivó mediante la adición de HCl hasta una concentración final de 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 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 µm x 20 mm (Waters Corporation). Las precolumnas se conectaron a columnas BEH130 C18, 75 µm x 200 mm, 1,7 µm (Waters Corporation) y los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 120 minutos del 3 al 40% de acetonitrilo (v/v) seguido de un gradiente lineal de 15 minutos del 40 al 60% de este mismo reactivo.

Los espectros de masas se adquirieron usando el modo de adquisición independiente de datos *MSE-Data Independent Acquisition*, descrito por Silva y col. (2005). Brevemente, se realizaron adquisiciones 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 adquirieron 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 col., 2009). Se utilizó la base de

datos UniProtKB de *Acinetobacter baumannii* (versión 2015_11) donde se añadieron las secuencias de ENO1_YEAST y TRYP_PIG.

En 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. Los errores de masa de los precursores y fragmentos fueron automáticamente asignados por el programa y se permitió una tasa de falsos positivos máxima del 5%.

Finalmente, la cuantificación absoluta de proteínas se realizó automáticamente mediante el programa ProteinLynx Global Server utilizando péptidos de enolasa como estándar (Silva y col., 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. Los resultados obtenidos se exportaron a un archivo Excel.

6.4. Análisis de resultados

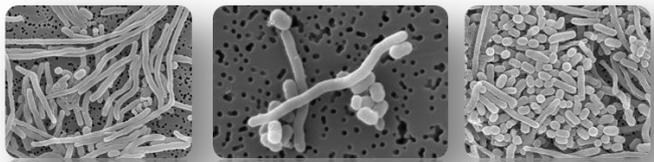
El análisis de los resultados se llevó a cabo con el programa Microsoft Excel donde se calcularon los ratios de expresión y se realizó el análisis de significación estadística. Los ratios de expresión se calcularon dividiendo los datos de cuantificación de cada uno de los tiempos analizados respecto a los valores iniciales (30 minutos). A continuación, a cada uno de los ratios se realizó el T test para comprobar si eran o no significativos.

Finalmente, para el análisis de las proteínas se establecieron los siguientes criterios: se consideraron proteínas presentes en cada punto analizado aquellas que se detectaron en dos o más réplicas de la tres existentes, excepto en el caso de los puntos control (30 minutos) donde fueron aquellas detectadas en al menos 4 de las seis réplicas existentes. Se identificó, mediante la herramienta PSORTb (v.3.0.2.) la localización celular de cada una de las proteínas identificadas y se estableció el criterio para considerar aumento o disminución significativa en la cantidad de proteína:

Aumento significativo: Ratio de expresión > 1,5; T test < 0,05

Descenso significativo: Ratio de expresión < 0,66; T test < 0,05

RESULTADOS



1. Estudio del efecto de factores abióticos sobre la supervivencia de *A. baumannii*

1.1. Estrategias de supervivencia de *A. baumannii*

La supervivencia de *A. baumannii* ATCC 19606^T bajo condiciones adversas se estudió evaluando los cambios, a lo largo del tiempo, en el número de células totales (TNC), viables (Memb+), y cultivables (UFCs).

La permanencia bajo condiciones de ayuno severo en solución salina no afectó a la integridad celular dado que a lo largo del periodo de estudio el número total de células permaneció constante (Figura 4). Sin embargo, el resto de los parámetros estudiados, viabilidad y cultivabilidad, variaron en función la temperatura de incubación. Mientras que, a 4 y 20°C ambos parámetros se mantuvieron constantes, a 37°C se observó una clara caída en las células viables y cultivables, descendiendo hasta aproximadamente 10^5 células ml^{-1} . En este contexto, ninguna de las temperaturas estudiadas indujo la formación de células viables no cultivables (VNCs) ya que no se observaron diferencias significativas entre el número de células viables y cultivables. En todas las alícuotas testadas, a medida que avanzaba el tiempo de exposición al estrés, se detectaron células que, teñidas con el kit *Live/Dead® BacLight™*, emitían fluorescencia combinada en verde y rojo. La importancia de estas células dependió de la temperatura de incubación; así, a 4 y 20°C su detección fue mínima, mientras que bajo condiciones de ayuno a 37°C su presencia resultó más patente (Figura 5).

Por otro lado, la evolución de las poblaciones de *A. baumannii* expuestas a condiciones de ayuno y mantenidas sobre superficies sólidas a baja humedad relativa (Figura 6) fue independiente de la temperatura de exposición para el periodo de 30 días estudiado. A lo largo de este tiempo, en ninguna de las condiciones estudiadas se observaron cambios en el número de células totales, viables ni cultivables. Por tanto, y al igual que sucedía en condiciones de supervivencia en solución salina, las temperaturas estudiadas no afectaron a la integridad celular ni indujeron la adopción del fenotipo VNC.

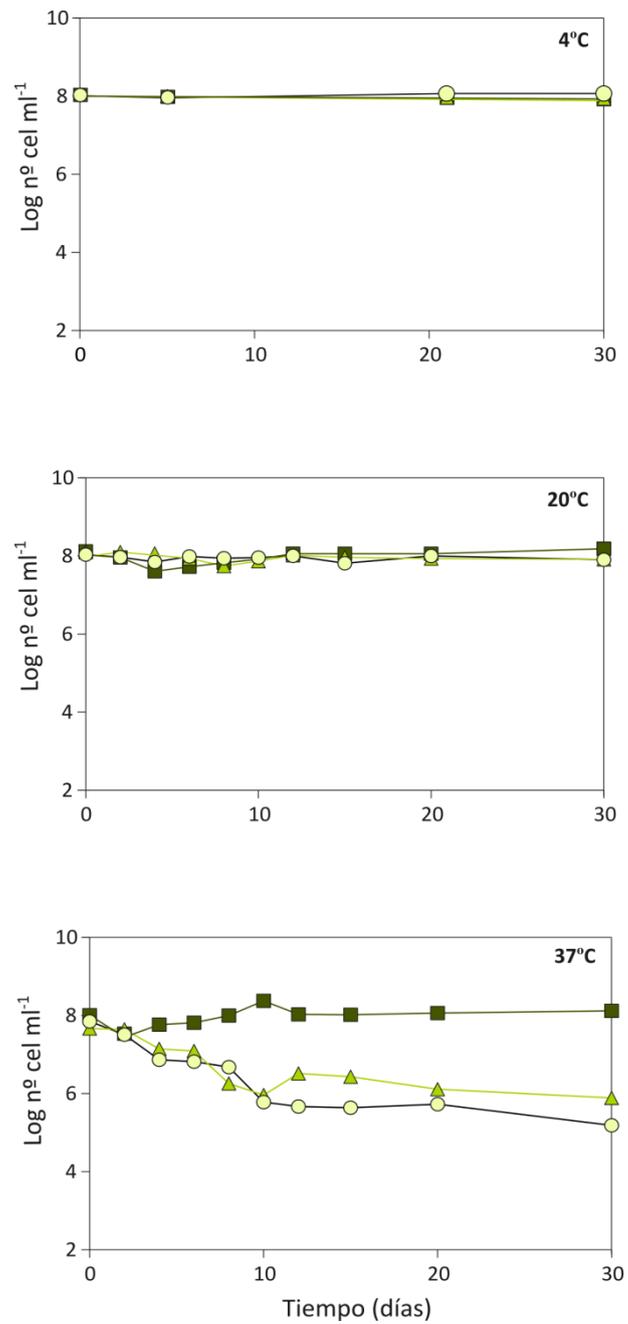


Figura 4. Evolución de la población de *A. baumannii* durante su permanencia en solución salina estéril mantenida a 4, 20 y 37°C. Número total de bacterias (■); número de bacterias viables (▲) y número de células cultivables (●).

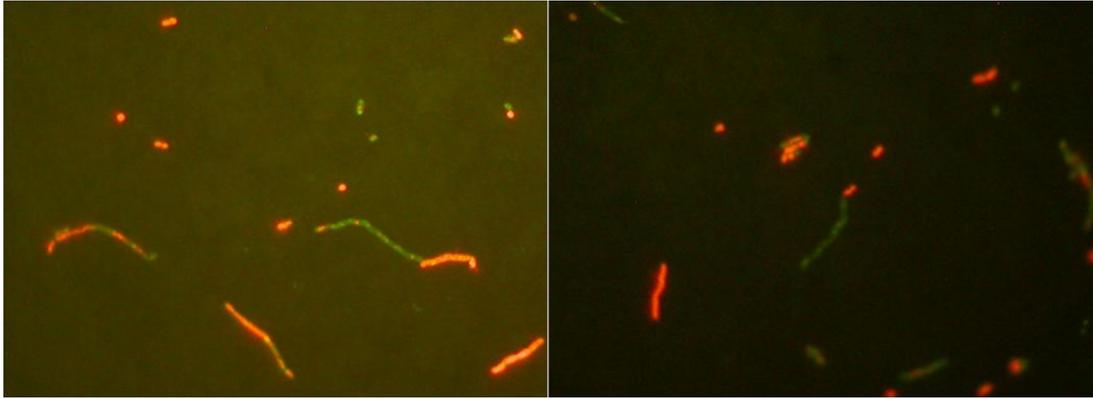


Figura 5. Imagen de las poblaciones de *A. baumannii* durante la permanencia como células en suspensión a 37°C obtenida mediante microscopía de epifluorescencia tras la tinción con el kit *Live/Dead® BacLight™* (Invitrogen).

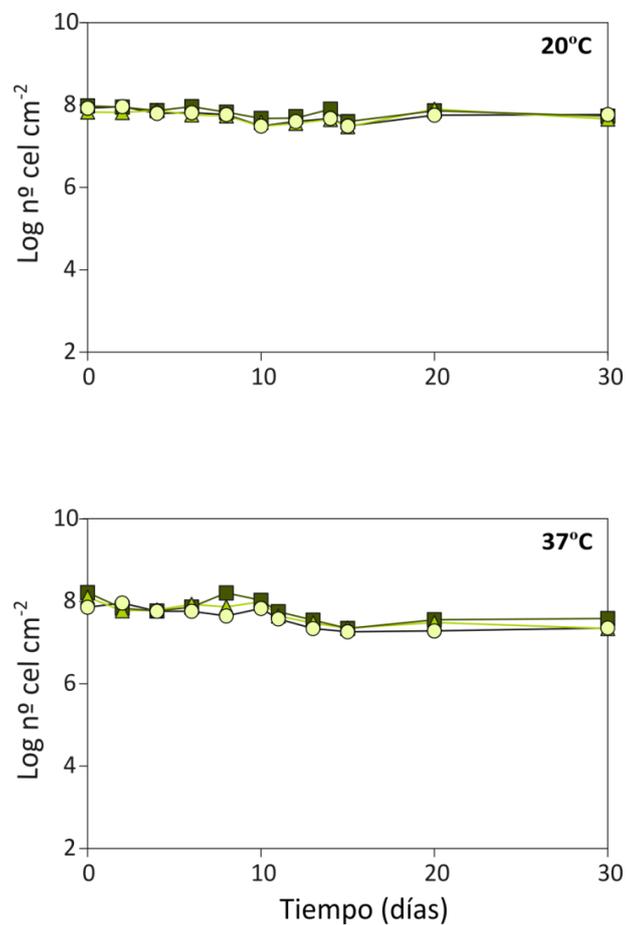


Figura 6. Evolución de la población de *A. baumannii* durante la permanencia sobre superficies sólidas en condiciones de baja humedad relativa a 20 y 37°C. Número total de bacterias (■); número de bacterias viables (▲) y número de células cultivables (○).

En cambio, la exposición de poblaciones de *A. baumannii* a radiación visible modificó el comportamiento de esta bacteria respecto a lo observado en condiciones de oscuridad, además, este comportamiento fue dependiente del soporte de incubación (Figura 7). Aunque para ninguna de las condiciones estudiadas se detectaron cambios en el número de células totales a lo largo del periodo de estudio, sí se detectaron descensos en la viabilidad y en la cultivabilidad. En medio líquido se produjo un descenso progresivo de la viabilidad y cultivabilidad a lo largo de los 30 días de exposición. En superficies sólidas, este descenso se manifestó de forma más rápida ya que, tras solo 7 días, el número de células cultivables se encontró por debajo del límite de detección ($12,5 \text{ UFCs cm}^{-2}$). En ambos casos, se observó la formación de una fracción de células VNCs, algo mayor en aquellas poblaciones irradiadas sobre superficies sólidas.

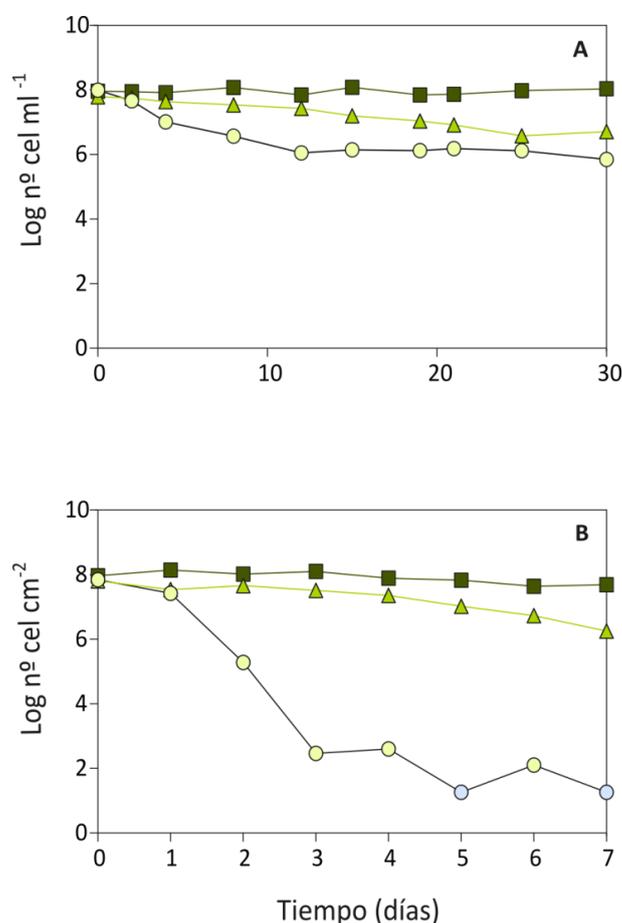


Figura 7. Evolución de la población de *A. baumannii* durante la permanencia a 20°C bajo radiación visible en solución salina estéril (A) y mantenida sobre superficies sólidas (B). Número total de bacterias (■); número de bacterias con membrana citoplasmática íntegra (▲) y número de células cultivables (○). Marcados en color azul, valores por debajo del límite de detección del método de enumeración.

La radiación UV-C tuvo un claro efecto negativo, que se manifestó a corto plazo tanto en poblaciones mantenidas en solución salina estéril como sobre superficies sólidas (Figura 8). En medio líquido, tras la primera hora de incubación, el descenso de la cultivabilidad fue significativo, situándose por debajo del límite de detección ($12,5 \text{ UFCs ml}^{-1}$). En cambio, el número de células viables se mantuvo constante durante las 4 primeras horas, momento a partir del cual se observó un descenso. En consecuencia, tras una hora de exposición a la radiación UV-C, el porcentaje de células VNCs representó el 96% de la población, fracción que disminuyó a lo largo de la permanencia hasta registrarse valores inferiores al 15% pasadas 6 horas.

Sobre superficies sólidas, la evolución de las poblaciones totales y viables bajo el efecto de la radiación UV-C fue similar a lo ocurrido en medio líquido. En cambio, en este caso, la radiación UV-C provocó un descenso más progresivo del número de células cultivables disminuyendo hasta valores de aproximadamente $10^3 \text{ células cm}^{-2}$ registrados a las 6 horas de incubación. En este punto, el porcentaje de células VNCs fue únicamente del 7% (Figura 8).

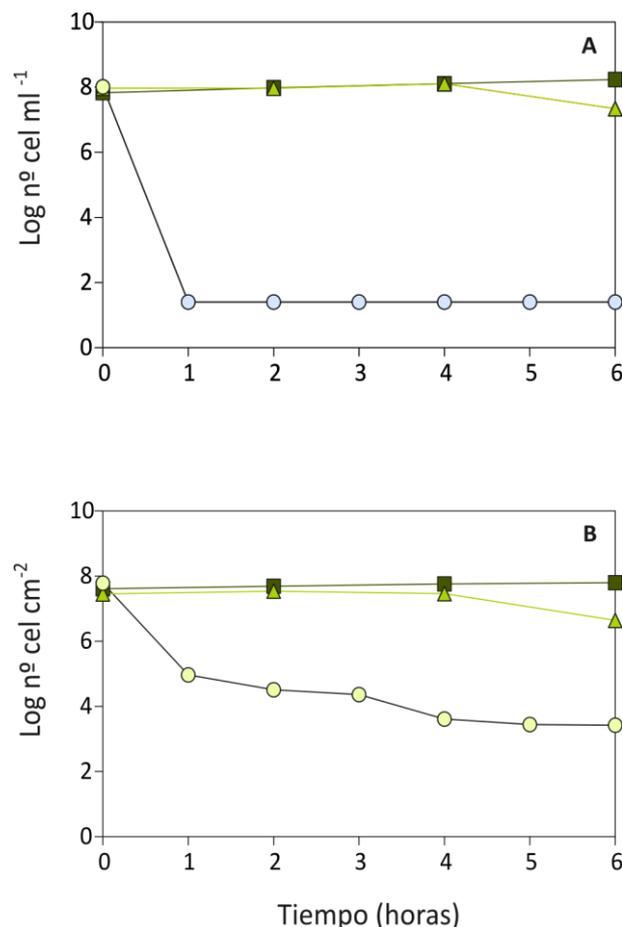


Figura 8. Evolución de la población de *A. baumannii* durante la permanencia a 20°C bajo radiación UV-C en solución salina estéril (A) y mantenida sobre superficies sólidas (B). Número total de bacterias (■); número de bacterias viables (▲) y número de células cultivables (○). Marcados en color azul, valores por debajo del límite de detección del método de enumeración.

Por otro lado, el efecto producido por los agentes oxidantes sobre *A. baumannii* fue dependiente de dosis (Figura 9). En el caso del hipoclorito sódico (NaOCl) se produjo una caída brusca de la cultivabilidad tras la exposición a 2 mg NaOCl l⁻¹. Cuando el agente utilizado fue el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) se observó una caída paulatina de la cultivabilidad a partir de concentraciones iguales o superiores a 0,5% (p/v). En ambos casos, la adición de los agentes oxidantes a concentración máxima de ensayo, generó poblaciones con aproximadamente un 40% de células VNCs.

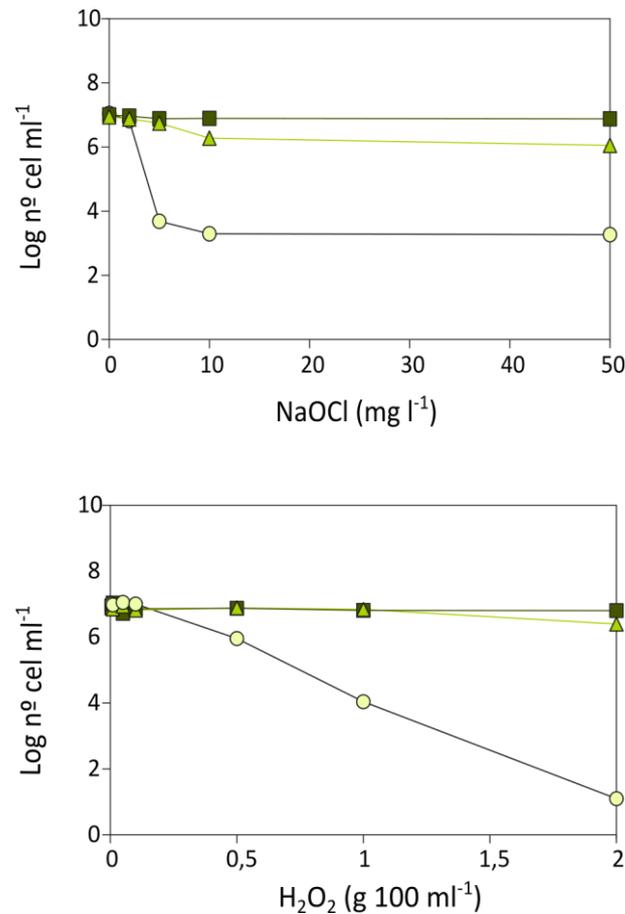


Figura 9. Recuentos bacterianos de las diferentes subpoblaciones obtenidas tras la exposición de suspensiones de *A. baumannii* a concentraciones crecientes de los agentes oxidantes hipoclorito sódico (NaOCl) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) a 20°C. Número total de bacterias (■); número de bacterias viables (▲) y número de células cultivables (○).

1.2. Estudio del efecto de productos desinfectantes utilizados en el ambiente hospitalario

Además del estudio del efecto de los agentes oxidantes mencionados, se analizó el efecto de varios desinfectantes comerciales, comúnmente utilizados en el ámbito hospitalario, frente a poblaciones de *A. baumannii* ATCC 19606^T mantenidas en solución triptona-sal y sobre superficies sólidas. Este estudio se desarrolló siguiendo los protocolos descritos por las normas AFNOR NF T 72-150 y AFNOR NF T 72-190 y los productos testados fueron los desinfectantes Instrunet® SURFA' SAFE, Instrunet® ANIOSYME DD1 y la lejía comercial. Además, una vez conocido el efecto sobre *A. baumannii* de las distintas dosis peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en los ensayos previos, se estudió también el efecto de este producto siguiendo los protocolos estipulados por las normas mencionadas.

Para testar los desinfectantes Instrunet® SURFA' SAFE, Instrunet® ANIOSYME DD1 y la lejía se desarrollaron dos tipos de ensayos, el ensayo del neutralizante y el del desinfectante (Ver Materiales y Métodos, apartado 4.).

Ensayo del neutralizante

El objetivo de este ensayo fue encontrar un producto capaz de detener la acción del desinfectante y, a su vez, no ser tóxico para las células. Por tanto, el neutralizante seleccionado debía cumplir el criterio establecido por la norma AFNOR NF T 72-150:

$$n \geq 0,5C; R \approx C$$

Donde R es el valor medio de UFCs en los controles de crecimiento de la cepa, C es el valor medio de UFCs de las placas de los controles en los que se adicionó agua destilada estéril, y n es el valor medio de UFCs de las placas de los tubos con desinfectante (Ver Materiales y Métodos, apartado 4.1.1.)

La búsqueda del neutralizante para los productos Instrunet® SURFA' SAFE e Instrunet® ANIOSYME DD1 se realizó en base a la composición química de ambos productos (Ver Anexo II). De manera simultánea, se testaron los neutralizantes Dey-Engley (Sigma-Aldrich), caldo Lethen (Sutton, 2006) y neutralizante A, diseñado en el laboratorio expresamente para los productos Instrunet® (Ver Anexo II).

Los resultados obtenidos con cada uno de los neutralizantes mencionados fueron diferentes (Tablas 7 y 8). El producto Dey-Engley no tuvo ningún efecto sobre los desinfectantes, ya que el número de células cultivables obtenido tras la adición del inóculo al medio con la mezcla

desinfectante-neutralizante estuvo por debajo del límite de detección ($n \leq 12,5 \text{ UFC ml}^{-1}$). El caldo Letheen, tal y como se observa en la Tabla 8, fue efectivo únicamente como neutralizante del producto Instrunet® ANIOSYME DD1 y, el neutralizante A fue efectivo para ambos productos Instrunet®. En consecuencia, se seleccionó el neutralizante A para llevar a cabo los ensayos del desinfectante con dichos productos.

Tabla 7. Resultados (UFCs ml^{-1}) obtenidos en el ensayo de los productos Dey-Engley, caldo Letheen y neutralizante A frente al desinfectante Instrunet® SURFA' SAFE realizados según la norma AFNOR NF T 72-150.

Instrunet SURFA' SAFE			
	Dey-Engley	Caldo Letheen	Neutralizante A
R	308,5	308,5	308,5
C	204,5	332	371
n	$\leq 12,5^*$	30,3	387

*, valores por debajo del límite de detección del método de enumeración.

Tabla 8. Resultados (UFCs ml^{-1}) obtenidos en el ensayo de los productos Dey-Engley, caldo Letheen y neutralizante A frente al desinfectante Instrunet® ANIOSYME DD1 realizados según la norma AFNOR NF T 72-150.

Instrunet ANIOSYME DD1			
	Dey-Engley	Caldo Letheen	Neutralizante A
R	308,5	308,5	308,5
C	204,5	332	371
n	$\leq 12,5^*$	305	413

*, valores por debajo del límite de detección del método de enumeración.

En el caso de la lejía comercial, se siguieron los pasos descritos anteriormente para la búsqueda de un neutralizante efectivo y no tóxico para las células. Para ello, se realizaron distintos ensayos utilizando como neutralizante el tiosulfato sódico a distintas concentraciones (0,5; 5; 50 y 500 mM), los productos Dey-Engley, caldo Letheen y neutralizante A, y un nuevo neutralizante (neutralizante B) diseñado por Sabbah y col. (2010) (Ver Anexo II).

Como puede observarse en la Tabla 9 ninguna de las concentraciones de tiosulfato sódico utilizadas resultó efectiva frente a la lejía. Los neutralizantes Dey-Engley, caldo Letheen y neutralizante A fueron también descartados, ya que en presencia de lejía no se detectaron células cultivables ($n \leq 12,5 \text{ UFC ml}^{-1}$) y, por tanto, no cumplieron el criterio establecido por la norma

ANFOR NF T 72-150 (Tabla 10). El producto diseñado por Sabbah y col. (2010), neutralizante B, fue el único efectivo como neutralizante ya que, como se muestra en la Tabla 10, cumplió los criterios mencionados anteriormente ($R \approx C$; $n \geq 0,5C$) y, por tanto, se seleccionó para llevar a cabo el posterior ensayo del desinfectante.

Tabla 9. Resultados (UFCs ml^{-1}) obtenidos en los ensayos de neutralización de la lejía con tiosulfato sódico a distintas concentraciones.

Lejía				
Tiosulfato sódico (mM)				
	0,5	5	50	500
R	390	390	390	390
C	225	312	310	120
n	$\leq 12,5^*$	$\leq 12,5^*$	$\leq 12,5^*$	$\leq 12,5^*$

*, valores por debajo del límite de detección del método de enumeración.

Tabla 10. Resultados (UFCs ml^{-1}) obtenidos en los ensayos de neutralización de la lejía con los neutralizantes Dey-Engley, caldo Letheen, neutralizante A y neutralizante B.

Lejía				
	Dey-Engley	Caldo Letheen	Neutralizante A	Neutralizante B
R	334	334	334	1008
C	454	324	380	1070
n	$\leq 12,5^*$	$\leq 12,5^*$	$\leq 12,5^*$	749,6

*, valores por debajo del límite de detección del método de enumeración.

Ensayo del desinfectante

Una vez seleccionado el neutralizante apropiado para cada uno de los desinfectantes testados, se llevaron a cabo los ensayos para comprobar el efecto de estos productos comerciales sobre *A. baumannii* siguiendo las indicaciones de las normas AFNOR NF T 72-150 (ensayos en suspensión) y NF T 72-190 (ensayos sobre superficies de acero inoxidable).

Cuando se analizó el efecto del producto Instrunet® SURFA' SAFE sobre poblaciones mantenidas en solución triptona-sal, al cabo de 30 segundos de exposición se obtuvo una disminución de 4 log en el número de células cultivables que se mantuvo en los distintos tiempos de contacto estudiados (Figura 10). Sobre superficies sólidas, aunque al cabo de 30 segundos, este

desinfectante no provocó una reducción significativa de la cultivabilidad; su poder de actuación fue aumentando con el tiempo de exposición. Así, tras 15 minutos de exposición, se alcanzó una reducción de la cultivabilidad de 3,5 órdenes logarítmicos (Figura 10). A pesar de los altos valores de reducción detectados, el desinfectante Instrunet® SURFA' SAFE no alcanzó, frente a *A. baumannii*, los valores exigidos por las normas AFNOR para los microorganismos de referencia, ya que no provocó una reducción de 5 órdenes en el número de UFCs ml⁻¹ en el tiempo exigido por la normativa.

Cuando las poblaciones de *A. baumannii* fueron mantenidas en solución triptona-sal, el efecto del producto Instrunet® ANIOSYME DD1 fue similar al observado para Instrunet® SURFA' SAFE (Figura 10). Tras 30 segundos de contacto, la dilución del producto utilizada (la especificada por el fabricante) provocó una gran reducción en el número de células cultivables que se mantuvo durante los distintos tiempos estudiados. Sin embargo, sobre acero inoxidable, este producto no tuvo efecto sobre las células de *A. baumannii*, no alcanzando un orden de reducción decimal de la cultivabilidad en ninguno de los tiempos de contacto estudiados.

El efecto de la lejía sobre la supervivencia de *A. baumannii* varió ligeramente en función de las condiciones de incubación (Figura 10). El efecto sobre las células en suspensión fue inmediato, alcanzando una reducción de las células cultivables superior a 5 órdenes logarítmicos ya en los primeros 30 segundos de contacto. Cuando las células fueron mantenidas sobre superficies sólidas, aunque no se obtuvieron los valores de reducción alcanzados en medio líquido, su efecto fue muy elevado provocando reducciones de más de 4 órdenes tras 30 segundos de exposición. Por tanto, atendiendo a los criterios establecidos por las normas AFNOR, la lejía sí fue un desinfectante efectivo frente a poblaciones de *A. baumannii* mantenidas en medio líquido.

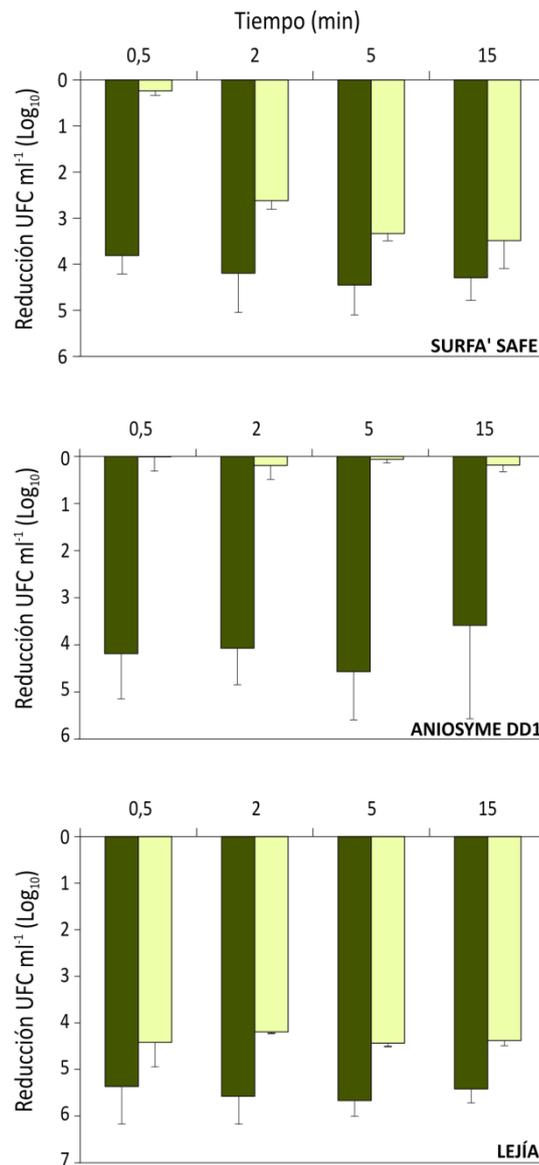


Figura 10. Actividad bactericida de los desinfectantes comerciales Instrunet® SURFA' SAFE, Instrunet® ANIOSYME DD1 y la lejía sobre *A. baumannii* mantenida en solución triptona-sal (■) y sobre superficies sólidas de acero inoxidable (□) a 20°C. Los resultados se expresan como descenso en la cultivabilidad (± DS) respecto a la muestra no tratada. Protocolo adaptado de las normas AFNOR NF T 72-150 y NF T 72-190.

Por último, se verificó el efecto del agente oxidante H₂O₂ sobre las células de *A. baumannii* en suspensión, siguiendo el protocolo descrito en la norma AFNOR F T 72-150. En este caso se utilizó como neutralizante la catalasa (11 U ml⁻¹).

A partir de los resultados de supervivencia obtenidos en el apartado 1.1., se seleccionó aquella concentración de H₂O₂ que provocó una reducción de 5 órdenes en el número de células cultivables (2%, p/v). Como se observa en la Figura 11, a pesar de que la concentración del desinfectante seleccionada provocó reducciones de la cultivabilidad de 5 órdenes en los ensayos

de supervivencia, el H_2O_2 no alcanzó ese efecto cuando los ensayos se realizaron según las indicaciones de la norma AFNOR NF T 72-150.

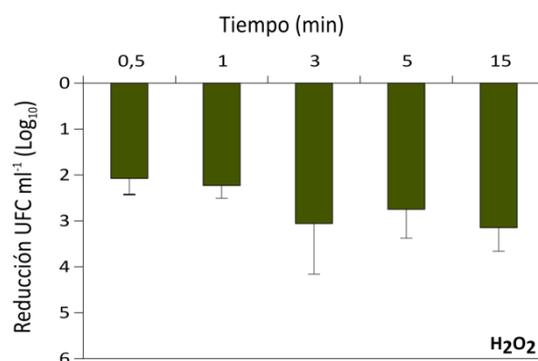


Figura 11. Actividad bactericida del peróxido de hidrógeno 2% (H_2O_2) frente a *A. baumannii* mantenida en solución triptona-sal a 20°C durante distintos periodos de tiempo. Los resultados se expresan como descenso en la cultivabilidad (\pm DS) respecto a la muestra no tratada. Protocolo adaptado de la norma AFNOR NF T 72-150.

A modo de resumen, todos los productos testados en este apartado, tuvieron una mayor eficacia de desinfección en medios líquidos donde, a pesar de que los productos Instrunet® no alcanzaron los valores fijados por las normas AFNOR, provocaron una alta reducción del número de células cultivables. El desinfectante Instrunet® SURFA' SAFE y la lejía fueron los productos más eficaces. En lo que se refiere al tiempo de exposición necesario para buena actuación, fue sin duda la lejía, tanto en medio líquido como sobre superficies de acero inoxidable, la que tuvo mayor poder de desinfección en menos tiempo.

1.3. Estudio del efecto de los factores abióticos sobre la morfología y tamaño de *A. baumannii*

A lo largo de la permanencia de *A. baumannii* en solución salina se obtuvieron imágenes mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) para estudiar el efecto del ayuno sobre su morfología celular. Este análisis morfológico puso de manifiesto el deterioro que sufren algunas células bajo estas condiciones especialmente pasados 10 días a 37°C (Figura 12). Mientras que a 20°C no se observaron cambios en las células desde el punto de vista morfológico, a 37°C se observó la aparición de algunas células deformadas (Figura 12).

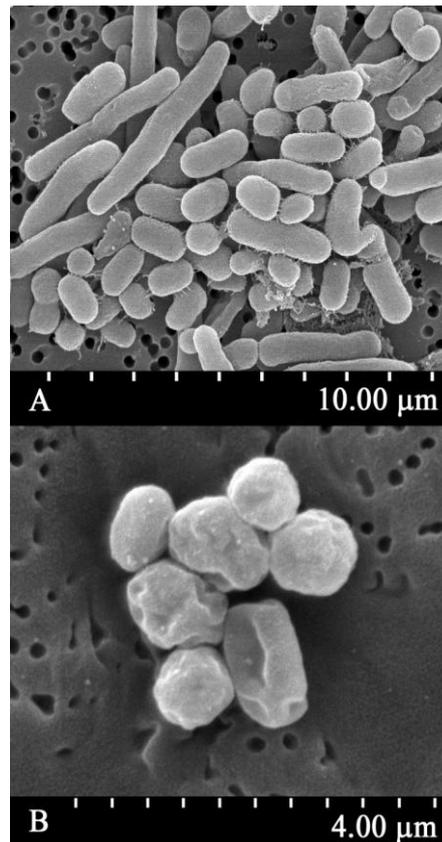


Figura 12. Fotografías de muestras de *A. baumannii* recogidas a lo largo de la supervivencia en solución salina estéril: 30 minutos tras la inoculación (A) y tras 10 días a 37°C (B).

Además de las posibles variaciones en la morfología, a lo largo de la supervivencia se determinó la variación de la longitud celular. En lo referente al tamaño medio de las bacterias, que inicialmente fue de $1,84 \mu\text{m}$ ($\pm 0,17$), se observó una clara diferencia en su evolución en función de la temperatura de incubación. Las células mantenidas a 20°C apenas variaron su tamaño medio, que tras 15 días fue de $1,79 \mu\text{m}$ ($\pm 0,32$) y $2,06 \mu\text{m}$ ($\pm 0,70$) en poblaciones planctónicas y retenidas en superficies sólidas, respectivamente. A 37°C, sin embargo, se detectó un aumento de la longitud celular media de estas poblaciones hasta, pasados 15 días, alcanzar los $2,50 \mu\text{m}$ ($\pm 0,57$ y $\pm 0,40$ en poblaciones planctónicas y retenidas, respectivamente).

Adicionalmente, para analizar más detalladamente estas variaciones observadas en el tamaño medio, las células se distribuyeron en tres rangos ($\leq 2,5 \mu\text{m}$, $> 2,5 - \leq 3,75 \mu\text{m}$ y $> 3,75 \mu\text{m}$) (Ver apartado 3.4. de Materiales y Métodos). Al inicio de los experimentos, la mayoría de las células (más del 85%) se encontraron dentro del primer rango de longitud ($\leq 2,5 \mu\text{m}$), mientras que las células alargadas ($> 3,75 \mu\text{m}$) supusieron únicamente un 6% de la población (Figuras 13 y 14). Esta distribución inicial por tamaños fue relativamente constante en las poblaciones mantenidas durante 15 días a 20°C. Sin embargo, el aumento de la longitud celular media detectado a 37°C

supuso un cambio en la distribución de tamaños, que se vio reflejado en un aumento de las células más alargadas en detrimento de las células de menor tamaño. Así, después de 15 días de incubación, esta fracción de células de mayor tamaño ($> 3,75 \mu\text{m}$) se duplicó en las poblaciones retenidas sobre superficies sólidas y se incrementó hasta valores de entorno al 20% en las poblaciones planctónicas.

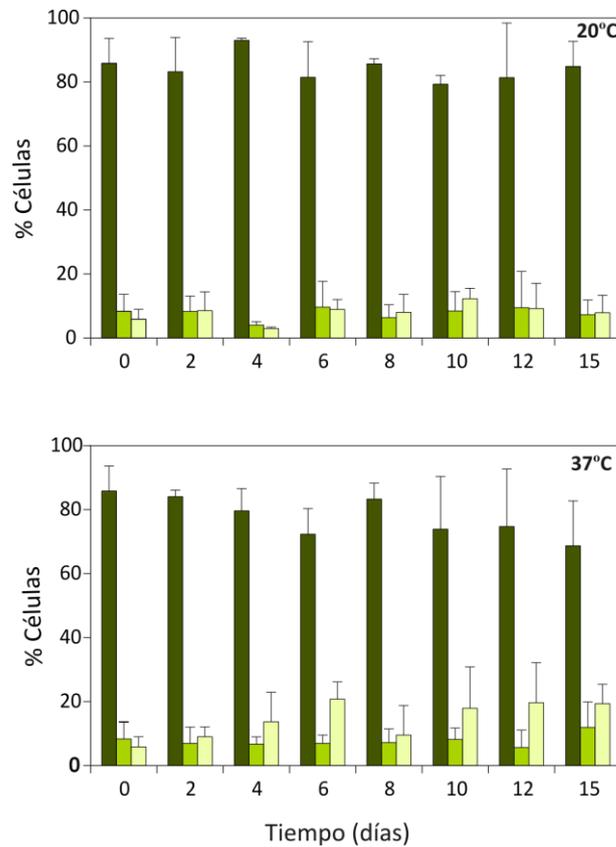


Figura 13. Evolución de la distribución del tamaño celular de *A. baumannii* a lo largo de su permanencia en solución salina estéril a 20 y 37°C. Datos expresados en porcentajes de células (\pm DS) dentro de los rangos establecidos en base al tamaño medio de *A. baumannii*: $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (■), $> 2,5 - \leq 3,75 \mu\text{m}$ (▒) y $> 3,75 \mu\text{m}$ (□).

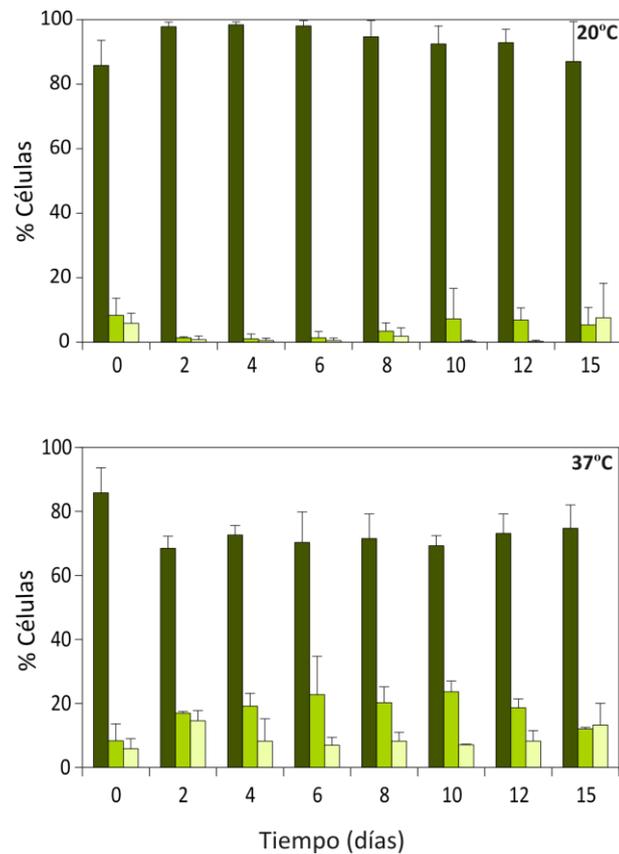


Figura 14. Evolución de la distribución del tamaño celular de *A. baumannii* a lo largo de su permanencia sobre superficies sólidas con baja humedad relativa a 20 y 37°C. Datos expresados en porcentajes de células (\pm DS) dentro de los rangos establecidos en base al tamaño medio de *A. baumannii*: $\leq 2,5 \mu\text{m}$ (■), $> 2,5 - \leq 3,75 \mu\text{m}$ (■) y $> 3,75 \mu\text{m}$ (□).

1.4. Estudio del efecto de los factores abióticos sobre la capacidad de adhesión de *A. baumannii*

Para el estudio del efecto de los factores abióticos sobre la capacidad de adhesión de *A. baumannii* bajo condiciones de estrés, se establecieron las siguientes categorías: células no adherentes ($\text{OD} \leq 0,11$), ligeramente ($0,11 < \text{OD} \leq 0,22$), moderadamente ($0,22 < \text{OD} \leq 0,44$) y fuertemente adherentes ($\text{OD} > 0,44$), como se indica en el apartado 3.5. de Materiales y Métodos.

El efecto de las condiciones adversas sobre la adherencia de las poblaciones de *A. baumannii* ATCC 19606^T, inicialmente clasificadas como *moderadamente adherentes*, difirió a lo largo de la permanencia en función de las condiciones de incubación. A lo largo de la supervivencia en solución salina, tanto a 20 como a 37°C, esta capacidad disminuyó rápidamente dando lugar a una población *no adherente* pasados 5 días de estudio (Figura 15 A). Sin embargo, cuando las células

se mantuvieron sobre superficies sólidas la capacidad de adherirse experimentó un ligero descenso inicial, dando lugar a una población *ligeramente adherente* (Figura 15 B).

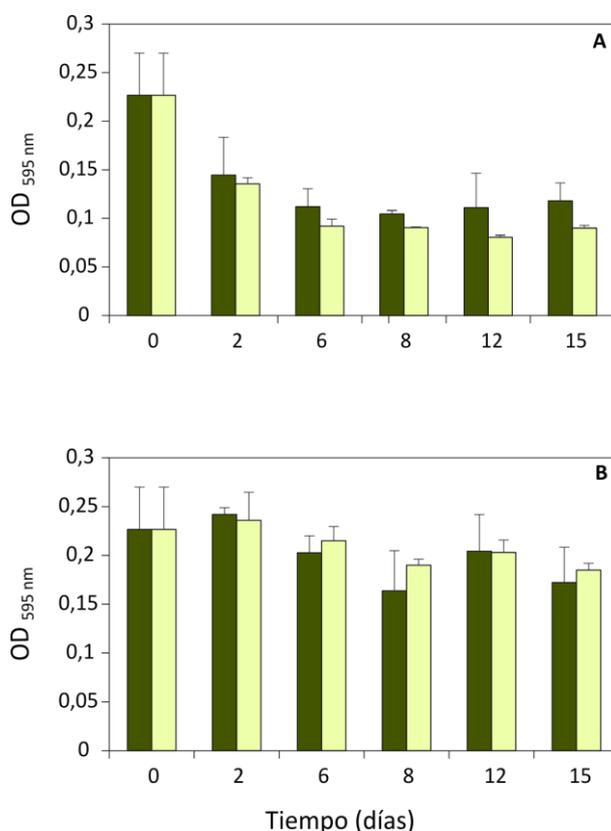


Figura 15. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595 nm} (±DS). Obtenidas para poblaciones de *A. baumannii* mantenidas en solución salina estéril (A) y sobre superficies sólidas (B) a 20°C (■) y 37°C (□).

1.5. Estudio del efecto de los factores abióticos sobre la expresión de varios genes implicados en la formación de biofilms

Una vez determinada la variación de la capacidad de adherirse para poblaciones de *A. baumannii* mediante el método descrito por O'Toole y Kolter (1998), se analizó la expresión de varios genes relacionados con el proceso de formación de biofilms: *ompA*, *bfmR* y *csuAB*. Para ello, en primer lugar se extrajo el RNA de las muestras recogidas en los ensayos de supervivencia con poblaciones mantenidas tanto en suspensión como sobre superficies sólidas.

La Tabla 11 muestra la cantidad de RNA total extraída por célula a lo largo de la supervivencia. Los resultados obtenidos indican que la cantidad de RNA total varió en función de las condiciones de incubación. Mientras que en poblaciones mantenidas sobre superficies sólidas permaneció relativamente constante a lo largo del tiempo, en poblaciones resuspendidas en solución salina,

las variaciones en la cantidad de RNA recuperado fueron significativas, especialmente a 37°C, donde la cantidad de RNA tras 8 días de experimental fue únicamente el 6% de la extraída al comienzo del ensayo.

Tabla 11. RNA total (fg cel⁻¹) (\pm DS) extraído de las poblaciones de *A. baumannii* a lo largo de su permanencia en solución salina y sobre superficies sólidas.

Condiciones de incubación	Temperatura (°C)	Tiempo (días)		
		0	2	8
Medio líquido	20	42,01 \pm 2,30	74,56 \pm 6,09	35,65 \pm 5,18
	37	42,01 \pm 2,30	7,10 \pm 0,58	2,52 \pm 0,56
Superficie sólida	20	50,12 \pm 5,39	69,20 \pm 3,75	57,89 \pm 4,37
	37	50,12 \pm 5,39	41,09 \pm 14,60	55,34 \pm 11,68

Las ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 superiores a 2 (Tabla 12) y la ausencia, en general, de RNA degradado (Figura 16) (Ver Materiales y Métodos, apartado 5.3.) fueron indicativos de la calidad de las muestras de RNA. Únicamente se detectó degradación parcial en las muestras obtenidas tras 8 días de permanencia en condiciones de ayuno en medio líquido a 37°C.

Tabla 12. Resultado del análisis de calidad, expresado como ratios Abs 260/280 y Abs 260/230 de las muestras de RNA extraídas a partir de poblaciones mantenidas en solución salina (parte izquierda) y sobre superficies sólidas (parte derecha) a 20 y 37°C.

Solución salina	Muestra	Abs 260/280	Abs 260/230	Superficies sólidas	Muestra	Abs 260/280	Abs 260/230
0 días	1	2,17	2,5	0 días	16	2,14	2,32
	2	2,16	2,51		17	2,13	2,41
	3	2,17	2,24		18	2,14	2,39
2 d 20°C	4	2,16	2,47	2 d 20°C	19	2,13	2,45
	5	2,15	2,37		20	2,14	2,46
	6	2,15	2,3		21	2,16	2,32
8 d 20°C	7	2,16	2,47	8 d 20°C	22	2,14	2,32
	8	2,16	2,46		23	2,13	2,28
	9	2,15	2,38		24	2,15	2,3
2 d 37°C	10	2,12	1,78	2 d 37°C	25	2,18	2,49
	11	2,13	2,11		26	2,17	2,29
	12	2,14	2,34		27	2,2	2,41
8 d 37°C	13	2,07	2,08	8 d 37°C	28	2,17	2,44
	14	2,13	2,21		29	2,11	2,38
	15	2,12	1,67		30	2,16	2,41

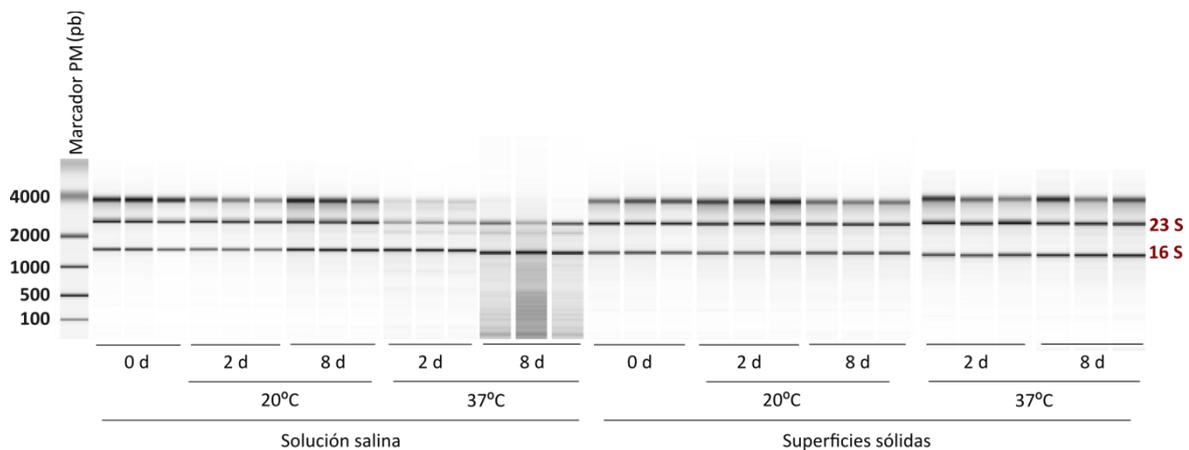


Figura 16. Patrón electroforético obtenido para las muestras de RNA extraídas a partir de poblaciones mantenidas en suspensión salina y sobre superficies sólidas a 20 y 37°C.

Una vez realizada la extracción, purificación, análisis de calidad y cuantificación del RNA, se llevó a cabo la determinación semicuantitativa (RT-PCR) de la expresión de los genes *ompA*, *bfmR* y *csuAB* con respecto a la del gen *16S rRNA*, gen de referencia o *housekeeping*.

En la Figura 17 se muestra el descenso en la expresión de los genes *ompA* y *bfmR* cuando las células se mantuvieron en solución salina tanto a 20 como a 37°C, siendo este descenso más pronunciado a 20°C. En lo que respecta al gen *csuAB*, su expresión no varió de manera significativa para ninguna de las temperaturas de incubación estudiadas.

Durante la supervivencia de *A. baumannii* sobre superficies sólidas los cambios de expresión fueron menos homogéneos que los obtenidos para poblaciones mantenidas en suspensión (Figura 18). A pesar de que tras 2 días de exposición a 20°C la expresión de los genes *ompA* y *bfmR* aumentó ligeramente, finalmente se observó un descenso de dicha expresión para poblaciones mantenidas tanto a 20 como a 37°C. Este descenso, a diferencia del observado para poblaciones en suspensión, fue más acusado cuando las células se mantuvieron a 37°C. En lo que respecta al gen *csuAB*, nuevamente su expresión se mantuvo constante a lo largo del tiempo de estudio.

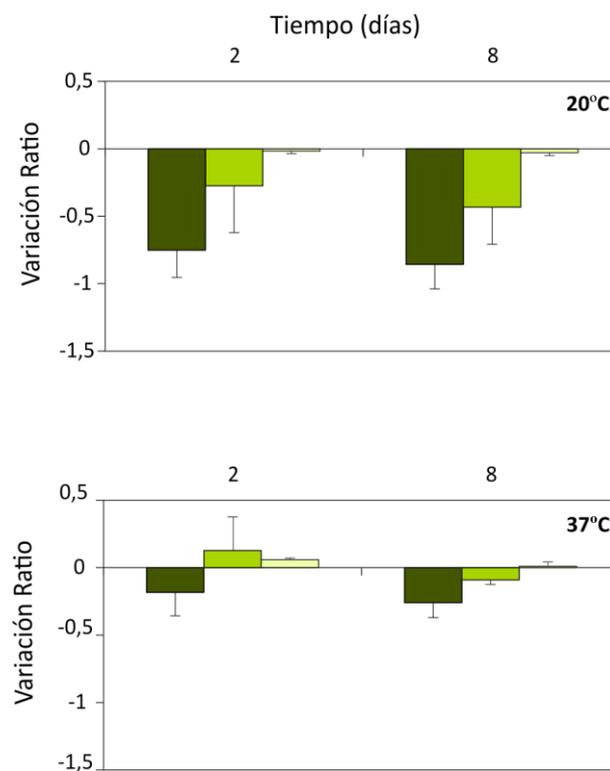


Figura 17. Determinación semicuantitativa (RT-PCR) de la variación de la expresión (\pm DS) de los genes *ompA* (■), *bfmR* (□) y *csuAB* (□) respecto a la expresión inicial, obtenida tras 2 y 8 días de permanencia de *A. baumannii* en medio líquido a 20 y 37°C. La cuantificación de la expresión está corregida respecto a la expresión del gen *housekeeping 16S rRNA*.

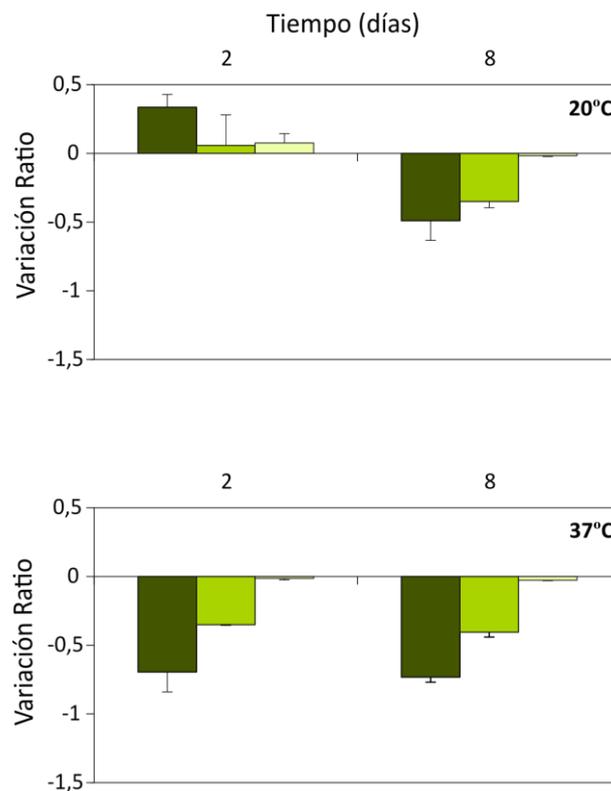


Figura 18. Determinación semicuantitativa (RT-PCR) de la variación de la expresión (\pm DS) de los genes *ompA* (■), *bfmR* (▒) y *csuAB* (□) respecto a la expresión inicial, obtenida tras 2 y 8 días de permanencia de *A. baumannii* sobre superficies sólidas a 20 y 37°C. La cuantificación de la expresión está corregida respecto a la expresión del gen housekeeping *16S rRNA*.

Los resultados obtenidos mediante RT-PCR se corroboraron mediante RT-qPCR. El análisis de expresión mediante RT-qPCR se realizó tanto para los genes de interés *ompA*, *bfmR* y *csuAB* como para los genes de referencia candidatos *gltA* y *cpn60*.

Tras la realización de la RT-qPCR, el análisis de variabilidad de los genes de referencia demostró que ambos (*gltA* y *cpn60*) tenían una expresión muy variable tanto entre las muestras como entre los grupos estudiados (diferencia de hasta 5 Cts) lo que impidió su uso para la normalización de la expresión de los genes de interés (Figura 19). Por tanto, la expresión de estos genes se normalizó con respecto a la cantidad de cDNA empleada en la reacción de qPCR (Libus y Štorchová, 2006).

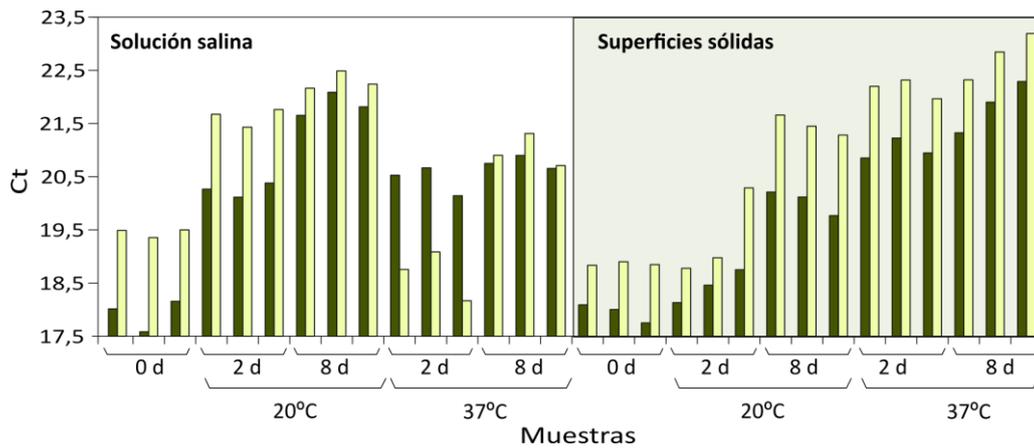


Figura 19. Análisis de variabilidad de los genes de referencia candidatos. Representación de los valores de Ct obtenidos para los genes *cpn60* (■) y *gltA* (□) en poblaciones mantenidas en suspensión salina y sobre superficies sólidas a 20 y 37°C.

A tenor de los resultados obtenidos mediante qPCR, tanto para células mantenidas en suspensión como sobre superficies sólidas, la expresión de los tres genes estudiados (*ompA*, *bfmR* y *csuAB*) siguió la tendencia observada con los ensayos RT-PCR (Figura 20 y 21).

Durante la permanencia en solución salina, en todos los casos, se observó el descenso de la expresión génica (Figura 20). Para ambas temperaturas de exposición, la expresión de los genes *ompA* y *bfmR* descendió de manera significativa alcanzando, al cabo de 8 días, valores de *fold change* cercanos a -3 con respecto al inicio de las experiencias. En cuanto al gen *csuAB*, tal y como se describió mediante RT-PCR, su expresión fue la más estable de los genes analizados.

Sobre superficies sólidas, la tendencia fue la misma que en suspensión (Figura 21). Las expresiones de los genes *ompA* y *bfmR* disminuyeron desde el inicio del estudio, siendo este descenso más acusado a 37°C donde alcanzaron incluso valores de *fold change* cercanos a -4. Por último, en lo que respecta al gen *csuAB*, a diferencia de lo que sucedía en las células en suspensión, al cabo de 8 días de supervivencia, se observó un descenso significativo de su expresión aunque de menor magnitud que el observado en otros genes.

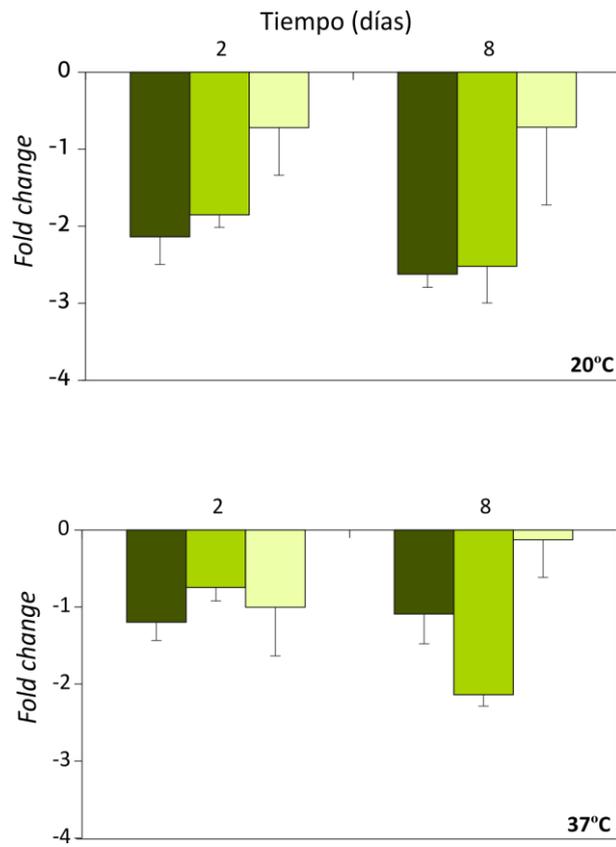


Figura 20. Variación (\pm DS), con respecto a la inicial, de la expresión de los genes *ompA* (■), *bfmR* (■) y *csuAB* (□) a los 2 y 8 días de permanencia de *A. baumannii* en solución salina a 20 y 37°C, obtenidos por RT-qPCR.

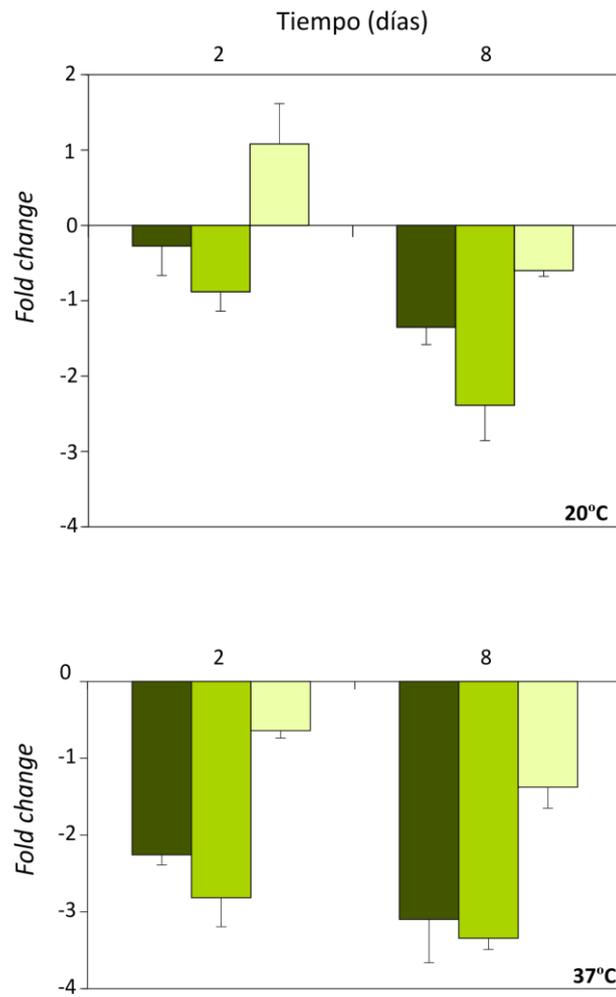


Figura 21. Variación (\pm DS), con respecto a la inicial, de la expresión de los genes *ompA* (■), *bfmR* (■) y *csuAB* (■) a los 2 y 8 días de permanencia de *A. baumannii* sobre superficies sólidas a 20 y 37°C, obtenidos por RT-qPCR.

2. Análisis de las variaciones en la composición proteica de las envueltas celulares de *A. baumannii* durante su exposición a factores abióticos

Con el fin de caracterizar el subproteoma de membrana de *A. baumannii* y analizar las variaciones que experimenta en condiciones de supervivencia, se extrajeron las proteínas de las envueltas celulares a partir de muestras recogidas en los ensayos llevados a cabo tanto en medio líquido como sobre superficies sólidas a 20 y 37°C. Aunque el método utilizado en este trabajo doctoral está destinado a la extracción de proteínas de membrana externa (Molloy y col., 2000), en el proceso se extraen un gran número de proteínas de membrana citoplasmática y periplasma, por lo que en este estudio se ha decidido incluirlas en el análisis y discusión de los resultados.

La identificación de las proteínas obtenidas reveló la presencia tanto de proteínas de envueltas celulares como de proteínas citoplasmáticas. Tras el análisis de las proteínas que cumplían los requisitos establecidos en el apartado 6.4. de Materiales y Métodos (detectadas en al menos 2 de las 3 réplicas), se determinó el porcentaje de proteínas, asociadas a envueltas celulares, citoplasmáticas y de localización indeterminada. Para ello se utilizaron los valores normalizados (número de secuencias aminoacídicas correspondientes a una proteína / 1000 secuencias aminoacídicas caracterizadas) asignados a cada una de las proteínas identificadas. Los resultados obtenidos muestran que al inicio de los ensayos de supervivencia, tanto para poblaciones en suspensión como adheridas a superficies sólidas, en los extractos proteicos, aproximadamente un 18% de proteínas correspondían a proteínas citoplasmáticas (Figura 22) como por ejemplo proteínas ribosómicas. En ambas condiciones de estudio, este porcentaje de proteínas citoplasmáticas incrementó a medida que aumentaba el tiempo de permanencia bajo condiciones de estrés, alcanzándose valores superiores al 25% de proteínas citoplasmáticas al cabo de 15 días. El mayor incremento en el porcentaje de proteínas citoplasmáticas se detectó durante la supervivencia de *A. baumannii* en solución salina a 37°C, donde esta fracción llegó a suponer el 33% de las proteínas recogidas (Figura 22 A).

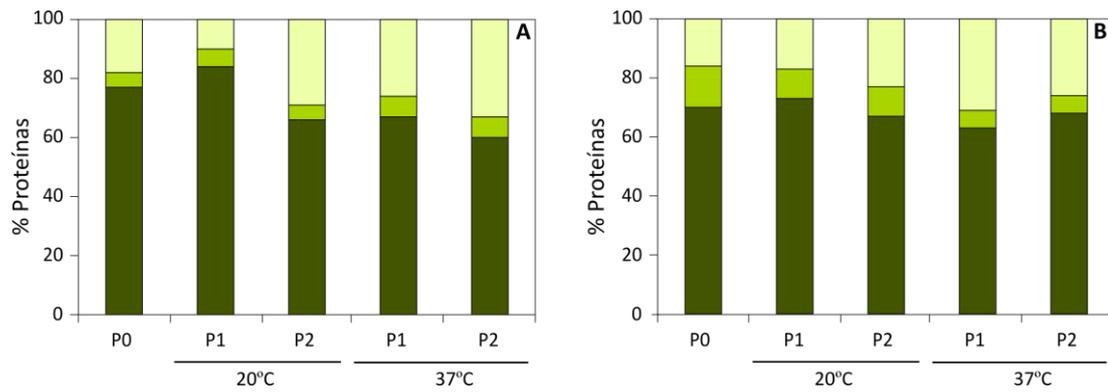


Figura 22. Porcentajes de proteínas asociadas a envueltas celulares (■), citoplasmáticas (□) y de localización indeterminada (■) en extractos celulares obtenidos al inicio (P0) y tras 3 (P1) y 15 (P2) días de permanencia de *A. baumannii* en medio líquido (A) y sobre superficies sólidas (B).

Además, considerando los valores normalizados, se establecieron tres categorías: proteínas con valores normalizados ≥ 10 ; proteínas con valores en el rango $\geq 5 - < 10$ y proteínas con valores normalizados < 5 . En las Figuras 23 y 24 se muestra, organizadas según las categorías establecidas, la distribución de las identificaciones proteicas asociadas a envueltas, citoplasma o sin asignación determinada a tiempo 0, 3 y 15 días de supervivencia, así como el número total de proteínas diferentes presentes en cada punto.

Tanto en los ensayos de supervivencia con células en suspensión (Figura 23) como con células mantenidas sobre superficies sólidas (Figura 24) llama la atención el aumento del número de identificaciones proteicas obtenido a medida que se incrementaba la permanencia especialmente a 37°C. En las diferentes condiciones estudiadas (supervivencia en medio líquido y sobre medio sólido) este incremento se relacionó con un incremento de las proteínas citoplasmáticas, concretamente en aquellas detectadas con un bajo número de secuencias.

Durante la permanencia de *A. baumannii* como células en suspensión las proteínas con mayor presencia en las envueltas celulares, fueron las proteínas de membrana externa Omp38 (AbOmpA) (D0CDF2_ACIBA), otra proteína de la familia OmpA (D0C9R5_ACIBA), el efector del sistema de secreción de tipo VI (D0C8P3_ACIBA) y la porina D0CF50_ACIBA. Además, destacó la importancia del factor de elongación Tu (D0CG85_ACIBA). Igualmente, sobre superficies sólidas, la proteína detectada con mayor presencia en las envueltas celulares de *A. baumannii* fue la Omp38 (D0CDF2_ACIBA), seguida de las proteína D0C9R5_ACIBA de la familia OmpA, la catalasa (D0C8B2_ACIBA) y de varias proteínas no caracterizadas (D0C780_ACIBA y D0C5R3_ACIBA) (Ver Anexo III).

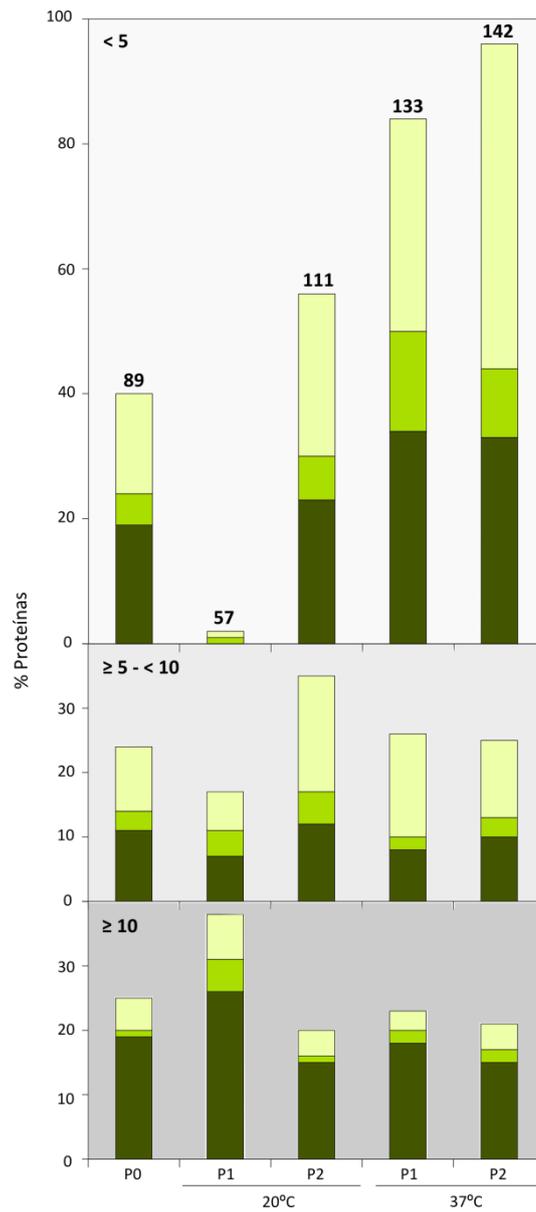


Figura 23. Número de proteínas detectadas al inicio (P0) y tras 3 (P1) y 15 (P2) días de permanencia de *A. baumannii* en solución salina mantenida a 20 y 37°C. Proteínas asociadas a las envoltas celulares (■), citoplasmáticas (□) y de localización indeterminada (▨) y clasificación de las mismas en base a los valores de concentración normalizados: > 10; > 5 - ≤ 10 y ≤ 5.

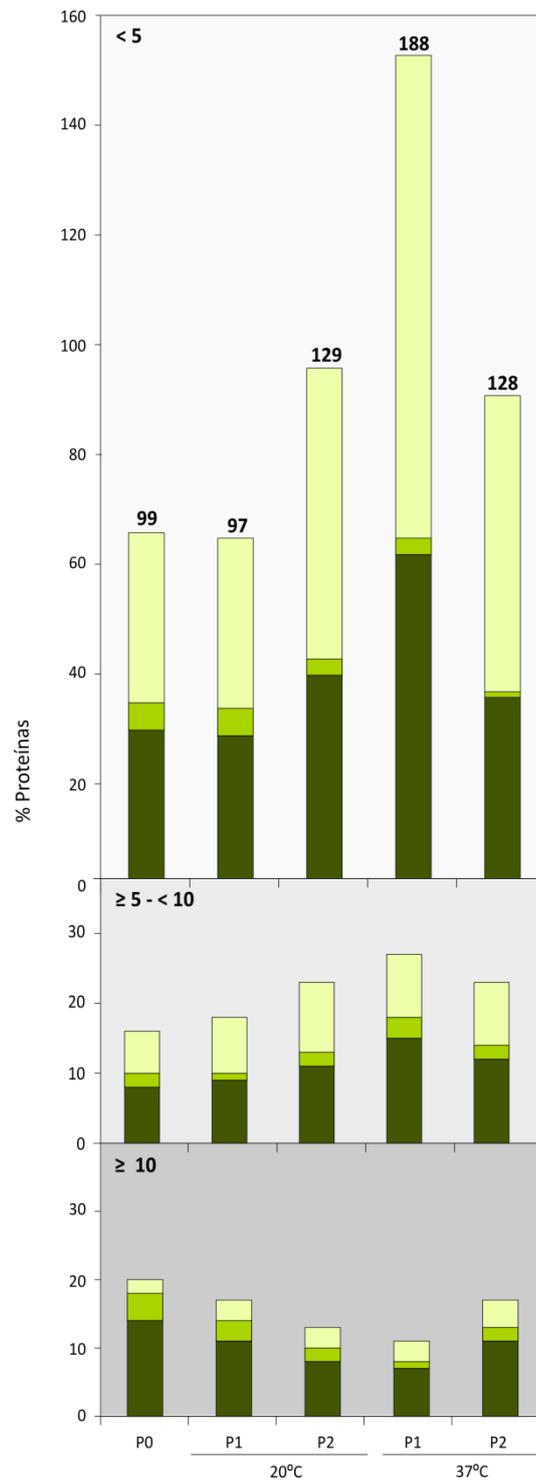


Figura 24. Número de proteínas detectadas al inicio (P0) y tras 3 (P1) y 15 (P2) días de permanencia de *A. baumannii* sobre superficies sólidas mantenida a 20 y 37°C. Proteínas asociadas a las envueltas celulares (■), citoplasmáticas (□) y de localización indeterminada (▨) y clasificación de las mismas en base a los valores de concentración normalizados: > 10; > 5 - ≤ 10 y ≤ 5.

Una vez identificadas las proteínas de las muestras correspondientes a cada uno de los puntos de estudio para las 4 condiciones de estrés analizadas, se procedió a aplicar los criterios de selección y, posteriormente, de clasificación de las proteínas seleccionadas según se describe en el apartado 6.4. de Materiales y Métodos.

A partir de la información obtenida, se verificó la composición proteica de cada uno de los PO establecidos para las cuatro condiciones estudiadas. Como se detalla en la Tabla 13, encontramos que el factor de ensamblaje de OMPs BamE (DOC9S5_ACIBA) se detectó en PO de poblaciones planctónicas pero no así de poblaciones adheridas. Por el contrario, una peptidasa de la familia M48 (DOCEG5_ACIBA) y una proteína trimérica de la familia de adhesinas autotransportadoras (DOC912_ACIBA) se detectaron en poblaciones adheridas, pero no en poblaciones en suspensión (Tabla 13). Estos resultados fueron indicativos de que el procesamiento inicial adicional, resuspensión de las células mantenidas sobre filtros, que se aplicó como tratamiento previo al proceso de extracción de proteínas en poblaciones adheridas afectó al resultado final.

Las proteínas que se han considerado para este trabajo se muestran en las Tablas 14 y 15. La Tabla 14 comprende proteínas directamente relacionadas con membranas celulares (proteínas de membrana citoplasmática, espacio periplásmico y/o membrana externa). Estas proteínas se clasificaron para su estudio en 5 categorías (no excluyentes) en base a su función biológica: estructural, transporte, bioenergética celular, respuesta al estrés y otras, donde se incluyeron aquellas cuya función no correspondía con ninguna de las anteriores. Además, se indican en las tablas aquellas proteínas que experimentaron variaciones significativas en cuanto a su expresión.

En este trabajo, y para todas las condiciones estudiadas, se detectaron una serie de proteínas cuyo nivel de expresión no varió significativamente a lo largo del periodo de permanencia en condiciones de ayuno a las dos temperaturas estudiadas, tanto en poblaciones planctónicas como en mantenidas sobre superficies sólidas, siendo por tanto, su detección independiente del estado fisiológico de las células. En este grupo podemos citar proteínas con una función principalmente estructural como las lipoproteínas DOCBL2_ACIBA y DOCE28_ACIBA, la proteína asociada a la membrana externa con dominio barril-beta (DOCF71_ACIBA) o la proteína Omp38 (DOCDF2_ACIBA) relacionada con la virulencia de *A. baumannii*. Además, a lo largo de este estudio, se detectaron la porina OprB (DOCDE3_ACIBA), una porina inespecífica (DOCF50_ACIBA), la translocasa YajC (DOCD79_ACIBA) y otras proteínas cuya función principal está relacionada con el transporte (DOC699_ACIBA y D0CDF9_ACIBA) que no experimentaron variaciones en su expresión a lo largo del tiempo para ninguna de las condiciones estudiadas.

Entre las proteínas con función bioenergética, varias subunidades de la ATP sintasa (DOCEK4_ACIBA, DOCEK6_ACIBA, DOCEK8_ACIBA y DOCEK9_ACIBA), de citocromos (DOC5Z5_ACIBA y DOC6M4_ACIBA) y de la enzima succinato deshidrogenasa (DOCD59_ACIBA y DOCDT0_ACIBA), además de algunas oxidorreductasas (DOC9E0_ACIBA y DOC9E7_ACIBA) permanecieron estables.

Además, entre las proteínas que no experimentaron variaciones en su expresión a lo largo del tiempo, se detectaron proteínas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo como catalasa (DOC8B2_ACIBA) y superóxido dismutasa (DOCCT4_ACIBA), la proteína putativa de resistencia a carbapenems (DOCBN6_ACIBA) que muestra similitudes con la proteína CarO, la proteína OprM implicada en la expulsión de los antibióticos fuera de la célula y una metaloproteasa FtsH dependiente de ATP (DOCBC3_ACIBA).

Entre las proteínas no asignadas a ninguno de los grupos funcionales destacó la estabilidad de la proteína con secuencia señal de la vía TAT (DOCDN5_ACIBA) o la tirosina quinasa Ptk (DOCEW0_ACIBA).

En contraste con este elevado número de proteínas que no experimentaron cambios debemos resaltar el bajísimo número de proteínas que dejaron de detectarse a medida que aumentaba el tiempo de permanencia bajo condiciones de ayuno, dos en este trabajo, la proteína fimbrial DOC767_ACIBA y la peptidasa señal I (DOCBQ1_ACIBA).

Además, nuestros resultados mostraron que la evolución de varias proteínas guardaba relación con las condiciones de estrés, además del ayuno, a las que se sometió a la población. Así, la temperatura de incubación modificó el patrón de expresión de la proteína determinante del lugar de formación del septo de división (DOC9R1_ACIBA) cuya concentración incrementó tanto en poblaciones planctónicas como adheridas mantenidas a 37°C. Por su parte, la evolución observada para la proteína de transporte de la familia Ompp1/FadL/TodX (DOCDL7_ACIBA) fue claramente dependiente del soporte de estudio. Además, la proteína de transporte efector del sistema de secreción tipo VI (familia Hcp1, DOC8P3_ACIBA) no mostró un patrón claro de disminución de la expresión a lo largo de la supervivencia en poblaciones planctónicas, si bien, en poblaciones mantenidas sobre superficies sólidas no pudo detectarse. La combinación de soporte y temperatura de incubación también afectó a la detección y/o expresión de proteínas. Así, la proteína de la familia LemA (DOCCP5_ACIBA) disminuyó su expresión, el factor de ensamblaje de OMPs BamB (DOCAE4_ACIBA) fue indetectable y la proteína DOCB10_ACIBA (una proteína con dominio de inserción a la membrana externa) pasó a detectarse a medida que aumentaba la permanencia de las células en solución salina mantenida a 37°C. Otras como la proteína BamA,

factor de ensamblaje de OMPs, no se detectó durante la supervivencia de las poblaciones mantenidas en suspensión a 20°C.

Varias proteínas se detectaron sistemáticamente en todas las muestras estudiadas, si bien, su evolución en algunos casos no mostró un patrón asociado a un factor de estrés. Este fue el caso de lipoproteína inespecífica (D0C8Y7_ACIBA). Esta ausencia de patrón, se observó también en el caso de varias proteínas relacionadas con transporte tanto al interior como al exterior celular (D0CD78_ACIBA, D0CCLO_ACIBA, D0CFL9_ACIBA, etc...). En este caso, las proteínas no fueron detectadas en los inóculos, si bien puntualmente se identificaron durante la exposición al estrés, resultando más usuales en poblaciones mantenidas a 37°C en soporte sólido.

Es de resaltar la evolución de las proteínas D0C9R5_ACIBA y D0CEH8_ACIBA, proteínas de la familia OmpA que mostraron una evolución netamente diferente, disminución de la expresión o indetectables, en poblaciones mantenidas en solución salina a 20°C y no mostraron cambios en el resto de las situaciones de estrés. Estos resultados difieren de los obtenidos cuando se analizó la expresión del gen *ompA* para estas mismas poblaciones y que han sido previamente comentados.

Finalmente, en la Tabla 15 se muestra la evolución de una serie de proteínas citoplasmáticas, pero que en la bibliografía se contempla la posibilidad de asociación a la membrana en determinadas condiciones de incubación. Este es el caso de la proteína MreB (D0CDK8_ACIBA), determinante de la forma bacilar, no detectada en poblaciones planctónicas a 37°C ni sobre filtros de acetato de celulosa a 20°C; de la bacterioferritina (D0CCQ1_ACIBA), de la que destacamos la no detección en poblaciones planctónicas mantenidas a 37°C o el descenso en poblaciones adheridas; y del factor de elongación Tu (D0CG85_ACIBA), que incrementa su concentración en tres de las cuatro situaciones estudiadas.

Tabla 13. Proteínas cuya expresión al inicio (P0) de las experiencias de supervivencia fue dependiente del soporte de incubación utilizado. Proteínas detectadas a los 30 minutos (P0), 3 días (P1) y 15 días (P2) de la supervivencia de *A. baumannii* tanto en solución salina como en superficies sólidas.

		SOLUCIÓN SALINA					SUPERFICIES SÓLIDAS				
		20°C			37°C		20°C			37°C	
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	P0	P1	P2	P1	P2	P0	P1	P2	P1	P2
DOC9S5_ACIBA	BamE, factor de ensamblaje de OMPs	D	D	D	D	D	ND	ND	ND	D	ND
DOCEG5_ACIBA	Peptidasa, familia M48	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D	D
DOC912_ACIBA	Proteína trimérica de la familia de adhesinas autotransportadoras	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	D	D

				SOLUCIÓN SALINA				SUPERFICIES SÓLIDAS			
				20°C		37°C		20°C		37°C	
Función	Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	P0	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
Transporte	D0CDF9_ACIBA	Canal mecanosensible de gran conductancia	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0C9F9_ACIBA	Canal mecanosensible de baja conductancia*	D	D	ND	D	D	D	D	D	D
	D0CD79_ACIBA	Translocasa, subunidad YajC del sistema Sec	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0C699_ACIBA	ATPasa importadora de magnesio	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0C8P3_ACIBA	Efector del sistema de secreción Tipo VI, de la familia Hcp1	D	D	↓ 0,32	↓ 0,20	↓ 0,25	ND	ND	ND	ND
	D0CDL7_ACIBA	Proteína de membrana externa, proteína de transporte de la familia Ompp1/FadL/TodX	D	D	↑ 2,19	D	D	ND	ND	D	ND
	D0CD78_ACIBA	Proteína translocasa subunidad SecD	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	D	D
	D0CCL0_ACIBA	Proteína transportadora de la familia ChvD	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	D
	D0CFL9_ACIBA	Proteína transportadora de la familia ABC	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND
	D0C8V3_ACIBA	ATPasa del sistema de secreción Tipo I	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND
	D0C617_ACIBA	Proteína de la familia ABC1	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	D	D
Bioenergética	D0CEK4_ACIBA	ATP sintasa subunidad beta	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0CEK6_ACIBA	ATP sintasa subunidad alfa	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0CEK8_ACIBA	ATP sintasa subunidad b	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0CEK9_ACIBA	ATP sintasa subunidad c	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0C5Z4_ACIBA	Citocromo subunidad I	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0C6M4_ACIBA	Citocromo D subunidad I	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0C5Z5_ACIBA	Citocromo subunidad II	D	D	D	D	D	D	↓ 0,51	D	D
	D0C9E0_ACIBA	NADH-quinona oxidorreductasa subunidad A	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0C9E7_ACIBA	NADH-quinona oxidorreductasa subunidad I	D	D	D	D	D	D	D	D	D
	D0C9E2_ACIBA	NADH-quinona oxidorreductasa subunidad C/D	D	D	D	D	D	D	ND	D	D

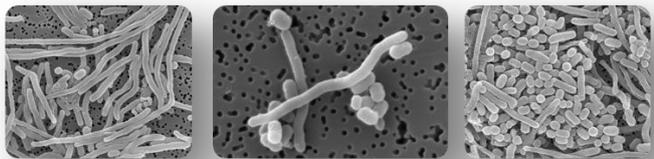
				SOLUCIÓN SALINA				SUPERFICIES SÓLIDAS				
				20°C		37°C		20°C		37°C		
Función	Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	P0	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2	
Bioenergética	D0C9F0_ACIBA	NADH-quinona oxidorreductasa subunidad L	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	
	D0C9E5_ACIBA	NADH-quinona oxidorreductasa	ND	ND	D	D	ND	ND	ND	D	D	
	D0CDS9_ACIBA	Succinato deshidrogenasa, subunidad flavoproteína	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0CDT0_ACIBA	Succinato deshidrogenasa, subunidad hierro-azufre	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0C6L9_ACIBA	Proteína de la familia nitrorreductasa	ND	ND	D	D	D	ND	D	D	ND	
Estrés	D0C8B2_ACIBA	Catalasa	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0CCT4_ACIBA	Superóxido dismutasa [Cu-Zn]	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0CBC3_ACIBA	Zinc metaloproteasa FtsH dependiente de ATP	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0CBN6_ACIBA	Proteína asociada a la resistencia a carbapenems*	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0CDQ0_ACIBA	OprM, proteína de flujo de membrana externa	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0CDQ1_ACIBA	BpeB, bomba de expulsión de antibióticos	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND
	D0CDQ2_ACIBA	Proteína A de resistencia a la acriflavina	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	D	D	ND
Otras	D0CDN5_ACIBA	Proteína con secuencia señal de la vía Tat	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0CEW0_ACIBA	Proteína tirosina quinasa Ptk	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	D0CCP5_ACIBA	Proteína de la familia LemA	D	D	D	D	↓ 0,58	D	D	D	D	
	D0C9K9_ACIBA	Proteína con dominio LysM	D	D	D	D	ND	ND	ND	D	D	
	D0CBQ1_ACIBA	Peptidasa señal tipo I	D	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	D0CB10_ACIBA	Proteína con dominio de inserción a la membrana externa	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND	ND

* Identificación de la proteína por homología (Uniprot).

Tabla 15. Proteínas citoplasmáticas asociadas con la membrana en determinadas condiciones de incubación. Proteínas detectadas a los 30 minutos (P0), 3 días (P1) y 15 días (P2) de la supervivencia de *A. baumannii* tanto en solución salina como en superficies sólidas.

			SOLUCIÓN SALINA				SUPERFICIES SÓLIDAS			
			20°C		37°C		20°C		37°C	
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	P0	P1	P2	P1	P2	P1	P2	P1	P2
DOCCQ1_ACIBA	Bacterioferritina	D	D	D	D	ND	↓ 0,40	↓ 0,49	↓ 0,42	D
DOCDK8_ACIBA	Proteína MreB, determinante de la forma bacilar	D	D	D	D	ND	ND	ND	D	D
DOCFW7_ACIBA	Alquil hidroperóxido reductasa (subunidad C)	D	ND	D	D	D	D	D	D	D
DOCG85_ACIBA	Factor de elongación Tu	D	D	↑ 3,30	↑ 2,10	↑ 2,77	↑ 1,55	↑ 2,39	D	D
DOCKK5_ACIBA	Proteína reguladora de la transcripción OmpR	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND

DISCUSIÓN



1. Estudio del efecto de factores abióticos sobre la supervivencia de *A. baumannii*

A lo largo de la última década, *A. baumannii* ha emergido como un importante patógeno nosocomial responsable de un gran número de infecciones hospitalarias, convirtiéndose en endémico en algunos hospitales (Webster y col., 2000; Towner, 2009; Lambiase y col., 2012; Roca y col., 2012).

Debido a su importancia clínica, encontramos una gran cantidad de estudios relativos a la incidencia de los brotes causados por *A. baumannii* y a sus mecanismos de patogenicidad y/o de resistencia a antimicrobianos. Sin embargo, los trabajos sobre las estrategias de supervivencia que podrían explicar su alta persistencia bajo las condiciones imperantes en el ambiente hospitalario son limitados.

La mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha sobre la supervivencia de *A. baumannii* en ambientes hostiles evalúan su supervivencia sobre distintos tipos de soportes sólidos (Jawad y col., 1996; 1998; Wendt y col., 1997; Espinal y col., 2012; Gayoso y col., 2014). No obstante, en el ambiente hospitalario *A. baumannii* puede verse obligada a sobrevivir como células en suspensión. En este trabajo, la simulación de las condiciones del medio ambiente hospitalario se realizó sometiendo a *A. baumannii* ATCC 19606^T a distintas temperaturas, grado de humedad relativa y soportes de incubación bajo condiciones de ayuno, convirtiéndose así en uno de los pocos trabajos que aborda el efecto de la temperatura sobre poblaciones planctónicas de *A. baumannii*.

En nuestro trabajo, las poblaciones en suspensión de *A. baumannii* mantenidas en condiciones de ayuno mostraron patrones de supervivencia diferentes en función de la temperatura de incubación. Así, las células conservaron la cultivabilidad, viabilidad e integridad durante al menos 30 días cuando se expusieron a 4 y 20°C (Figura 4). Sin embargo, las poblaciones mantenidas a 37°C disminuyeron paulatinamente su viabilidad y cultivabilidad de manera que tras 30 días de permanencia en dichas condiciones únicamente el 0,2% de la población permaneció viable y cultivable (Figura 4), descartando la aparición de formas viables no cultivables. Esta pérdida de viabilidad y de cultivabilidad se vio acompañada por un descenso de la cantidad de RNA por célula (Tabla 11) y por la aparición de algunas células deformadas (Figura 12). La reducción de la cantidad de RNA observada podría estar asociada a un descenso de la actividad metabólica en favor de un ahorro energético para la supervivencia (Lever y col., 2015) o bien, junto con la pérdida de viabilidad y cultivabilidad y la aparición de células morfológicamente alteradas, podría ser un indicativo del efecto negativo de la temperatura más elevada en la supervivencia de poblaciones de *A. baumannii* mantenidas en suspensión.

Además, estos resultados mostraron que la temperatura óptima de crecimiento no coincide con el rango de temperaturas que promueven la supervivencia de *A. baumannii*, tal y como sucede en otros microorganismos tanto mesófilos como psicrófilos o psicrotolerantes (Craig y col., 2004; Arana y col., 2010). Se ha indicado que las bajas temperaturas disminuyen la velocidad a la que ocurren las reacciones químicas y enzimáticas, ralentizando el metabolismo y, en consecuencia, retrasando el daño celular (Morita, 1997; Atlas y Bartha, 1998; Madigan y col., 2003).

Como ya se ha comentado, la mayoría de las investigaciones relacionadas con la supervivencia de este microorganismo se han centrado en el estudio de su permanencia sobre distintos soportes sólidos en condiciones de baja humedad relativa. En este sentido, Wendt y col. (1997) establecieron que *A. baumannii* es capaz de sobrevivir durante más de 4 meses sobre diversas superficies inanimadas, aunque constataron que las cepas de colección sobreviven peor que las cepas clínicas. Más recientemente, Gayoso y col. (2014) han demostrado la capacidad de varios aislados clínicos para sobrevivir al menos 30 días sobre superficies a 21°C, y Espinal y col. (2012) han obtenido resultados similares para poblaciones mantenidas a 30°C. Sin embargo, cuando se revisan los métodos de cuantificación utilizados, basados exclusivamente en cultivabilidad, y se estima el porcentaje de células supervivientes, todos estos trabajos coinciden en asociar la resistencia a la desecación con la persistencia durante largos periodos de tiempo de una pequeña fracción de células cultivables. En el presente trabajo el mantenimiento de las poblaciones de *A. baumannii* ATCC 19606^T sobre superficies sólidas en condiciones de ayuno y baja humedad relativa (30%), tanto a 20 como a 37°C, no afectó a su integridad, viabilidad y cultivabilidad durante al menos 30 días (Figura 6), es decir, no se detectó un aparente efecto negativo sobre *A. baumannii*. Esta discrepancia en los resultados de cultivabilidad apoya la observación de Wendt y col. (1997) de que, en el caso de *A. baumannii*, la capacidad de sobrevivir en condiciones de desecación parece ser característica de la cepa más que de la especie. En cualquier caso, la persistencia de cepas de *A. baumannii* en superficies clínicas comunes durante periodos relativamente largos podría explicar parcialmente el reiterado aislamiento (tanto en pacientes como en el ambiente) de cepas *locales* durante los brotes y repuntes de infecciones atribuidas a *A. baumannii* (Webster y col., 2000).

Al analizar la variación del tamaño celular en condiciones de ayuno encontramos diferencias entre experiencias claramente dependientes de la temperatura de incubación (Figuras 13 y 14). Mientras que a 20°C la tendencia fue mantener el tamaño celular, *A. baumannii* respondió a la incubación a mayor temperatura (37°C) incrementando su longitud. Este cambio, que supuso un aumento próximo al 50% en el tamaño celular medio, fue consecuencia principalmente del incremento del porcentaje de células alargadas (> 3,75 µm) a expensas de la fracción de células de

menor tamaño. Comportamientos similares, aumento del tamaño celular en condiciones desfavorables, se han descrito durante la supervivencia de *E. coli* en agua destilada (Na y col., 2006) y Mary y col. (2002) detectaron células alargadas durante la entrada de *Aeromonas hydrophila* en el estado VNC mantenida en estas mismas condiciones. Sin embargo, esta respuesta no parece un fenómeno muy habitual entre bacterias sometidas a ayuno. De hecho, en el caso de *A. baumannii* GJ12 se ha descrito una reducción del tamaño celular durante la supervivencia sobre superficies sólidas en ausencia de nutrientes (James y col., 1995). Esta reducción del tamaño también ha sido descrita para otras poblaciones planctónicas de sistemas acuáticos oligotróficos (Vattakaven y col., 2006; Chen y col., 2009; Oliver, 2010).

Para definir la estrategia de supervivencia que presenta *A. baumannii* en respuesta al estrés ambiental, debemos retomar el trabajo de Rittershaus y col. (2013). Como ya hemos comentado, estos autores describieron tres estrategias poblacionales de respuesta al estrés ambiental: *bust and boom*, quiescencia celular (similar al estado viable no cultivable [VNC]) y esporulación, descartada en nuestro estudio ya que *Acinetobacter* es un género que no forma esporas. En la bibliografía encontramos respuestas al estrés ambiental por parte de *A. baumannii* que corresponderían a ambos tipos de estrategias, si bien las referencias son escasas.

Así, Lemke y Leff (2006) describieron la detección de al menos un 0,29% de células VNC de *A. calcoaceticus* en poblaciones bacterianas de sistemas lóticos. Por su parte, Gayoso y col. (2014) indicaron que tras permanecer largos periodos de tiempo en condiciones de baja humedad relativa, las células de *A. baumannii* AbH12O-A2 adoptan un estado durmiente, similar al estado VNC (Oliver, 2010; Rittershaus y col., 2013) y que la fracción de células cultivables supervivientes adoptan la estrategia *bust and boom*. Sin embargo, el estudio llevado a cabo por Gayoso y col. (2014) presenta únicamente datos de cultivabilidad. La ausencia de datos que reflejen la viabilidad de las células, tales como la actividad de la cadena de transporte de electrones o la integridad de la membrana, no permitirían confirmar la presencia de células en estado durmiente o VNC.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo doctoral, parecen indicar que la adopción del fenotipo VNC no es la estrategia utilizada por poblaciones planctónicas de *A. baumannii* para sobrevivir bajo condiciones de ayuno a 37°C. Por el contrario, la estrategia *bust and boom* si sería compatible con nuestros resultados; por tanto, la persistencia de *A. baumannii* y la subsecuente colonización de otros ambientes podría verse facilitada por los mecanismos que permiten la supervivencia de las células más resistentes a expensas de las células muertas. Sin embargo, como se discute más adelante es probable que ambas estrategias, VNC y *bust and boom*, ocurran

simultáneamente, asegurando la persistencia de *A. baumannii* en ambientes hostiles y facilitando su diseminación.

Numerosos autores han demostrado que la formación de biofilms está estrechamente relacionada con la respuesta al estrés (Hall- Stoodley y col., 2004; Landini, 2009), ya que puede incrementar la capacidad de los microorganismos de soportar condiciones ambientales adversas como la desecación (Costerton y col., 1999; Espinal y col., 2012; Marks y col., 2014). *A. baumannii* es considerado como un microorganismo con una alta capacidad de formar biofilms sobre distintas superficies como cristal o materiales plásticos como poliestireno, polipropileno, policarbonato, etc. (Tomaras y col., 2003; Lee y col., 2008; Kazemi y col., 2011; Martí y col., 2011). La cepa de *A. baumannii* ATCCC 19606^T utilizada en este trabajo es una cepa *moderadamente adherente*. El análisis de la capacidad de adherirse a superficies inertes durante la supervivencia llevado a cabo en este trabajo doctoral reveló que las poblaciones de *A. baumannii* ATCC 19606^T mantenidas en solución salina, poblaciones planctónicas, pierden esta capacidad por efecto del estrés (poblaciones *no adherentes*). En comparación, las células retenidas en filtros de acetato de celulosa (Figura 15), aunque experimentaron una reducción en dicha habilidad, ésta no desapareció por completo con el paso del tiempo bajo condiciones adversas, dando lugar a poblaciones *ligeramente adherentes*. Es decir, su capacidad de adherirse a superficies inertes se vio modificada por efecto del ayuno, siendo esta modificación dependiente del soporte de exposición al estrés.

Tomaras y col. (2003, 2008) demostraron que en *A. baumannii* los genes del operón *CsuAB/ABCDE*, cuya expresión está controlada por la proteína reguladora *BfmR*, están relacionados con la producción de los *pili* implicados en la adhesión, impidiendo que se lleven a cabo las primeras etapas de la formación de biofilms sobre superficies abióticas. A su vez, la proteína *OmpA*, entre otras funciones, se ha indicado que participa en la formación de biofilms en poliestireno (Gaddy y col., 2009).

A pesar de las diferencias observadas en cuanto a viabilidad y cultivabilidad durante la supervivencia de *A. baumannii* en distintas condiciones experimentales, invariablemente la expresión de los genes *ompA*, *bfmR* y, en menor medida, *csuAB* experimentó un significativo descenso a lo largo del tiempo de incubación (Figuras 20 y 21). Chang y col. (2014) indicaron que, bajo situaciones adversas, las bacterias mantienen la expresión de aquellos genes que son necesarios para la adaptación al estrés ambiental y prescinden de los genes no necesarios. El descenso en la expresión de genes implicados en la formación de biofilms sugiere, por tanto, que son genes sin un papel importante en la supervivencia y que *A. baumannii* estaría limitando su expresión con el fin de ahorrar energía.

Por otro lado, la baja expresión génica detectada no se reflejó en la pérdida total de la capacidad de adherirse a superficies inertes de *A. baumannii* ATCC 19606^T revelada por los estudios realizados en placas de poliestireno. La formación de biofilms es un proceso complejo donde están implicados un gran número de genes (Lee y col., 2008; Shin y col., 2009; Park y col., 2011), y existen ciertas discrepancias sobre los genes implicados en la adhesión a superficies abióticas. Para *A. baumannii* no existe consenso, así Tomaras y col. (2008), defendieron el papel de la proteína BfmR como reguladora principal de la expresión del operón CsuAB/ABCDE y Liou y col. (2014) han demostrado como la proteína BfmS tiene también un papel fundamental en la formación de biofilms sobre superficies abióticas, mientras que McQueary y Actis (2011) indicaron la existencia de otros apéndices independientes del operón CsuAB/ABCDE implicados en la formación de biofilms/adhesión sobre estas superficies. Por tanto, sería necesario el estudio de un número mayor de genes implicados en este proceso para poder establecer claramente su relación con la relativa pérdida de la capacidad de formar biofilms y de adherirse a superficies inertes observadas durante los ensayos de supervivencia.

Por último, el descenso en la expresión del gen *ompA* indicaría que la persistencia bajo condiciones adversas podría afectar también a la virulencia potencial de *A. baumannii* ATCC 19606^T, ya que actualmente la proteína OmpA es considerada uno de los factores de virulencia más importantes de *A. baumannii*, implicada no solo en la formación de biofilms (Walzer y col., 2006; Gaddy y col., 2009), sino también en otros procesos como la resistencia a antibióticos (Choi y col., 2005; Martí y col., 2006; Gaddy y col., 2009) o el mantenimiento de la integridad estructural de la membrana externa (Sonntag y col., 1978).

El estudio de la respuesta bacteriana al estrés se ha enfocado también desde un punto de vista proteómico. Los trabajos son muy variados y en la bibliografía encontramos desde referencias de cambios en la expresión de proteínas concretas hasta estudios de la variación del proteoma en muy diferentes bacterias. Así, podemos citar estudios realizados con bacterias Gram negativas como *E. coli* (Muela y col., 2008), *Vibrio* spp. (Nyström y col., 1992; Morton y Oliver, 1994; Ben Abdallah y col., 2010; Parada y col., 2016), *Pseudomonas* spp. (Nouwens y col., 2000; Madhusudhan y col., 2003), *Flexibacter chinensis* (Raheb y col., 2008), *Listeria monocytogenes* (Caballero Gómez y col., 2013), *C. jejuni* (Dedieu y col., 2002) e incluso *A. baumannii* (Gayoso y col., 2014; Tiwari y Tiwari, 2014), o llevados a cabo con bacterias Gram positivas como es el caso de *Enterococcus faecalis* (Heim y col., 2002) o *Bacillus* spp. (Oosthuizen y col., 2002; Marashi y col., 2007).

A pesar del enorme potencial que tiene analizar y comparar (sub)proteomas de poblaciones procedentes o sometidas a diferentes condiciones, esta metodología presenta también varias

limitaciones que hay que tener presentes a la hora de analizar y discutir los resultados obtenidos. Aunque el método utilizado en este trabajo doctoral está destinado a la extracción de proteínas de membrana, en todos los puntos de la supervivencia analizados se detectó una importante presencia de proteínas citoplasmáticas. El paso de incubación con carbonato sódico que incluye la metodología empleada tiene como objetivo eliminar las proteínas solubles (Quero y col., 2015). Sin embargo, en nuestro trabajo, a pesar del uso de este compuesto, las proteínas de origen citoplasmático supusieron casi un 20% de las proteínas extraídas al inicio de las experiencias y este porcentaje fue aumentando durante la permanencia de *A. baumannii* bajo condiciones adversas. Este porcentaje relativamente elevado de proteínas citoplasmáticas se puede explicar en parte por la importante presencia de proteínas ribosómicas. Éstas suelen aparecer asociadas a las membranas celulares al estar los ribosomas implicados en la síntesis de proteínas destinadas a ser exportadas a la membrana externa o secretadas al espacio periplásmico y, por tanto, estarían temporalmente ligados a la 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). Además, destacaron subunidades citoplasmáticas de ATP sintasas que, al formar parte de un complejo con subunidades transmembrana, se asociarían a las mismas o proteínas que en determinadas condiciones pueden relacionarse con membranas (Muela y col., 2008; Salie y col., 2011) (Tabla 15).

Además, se detectaron algunas diferencias en la detección de proteínas presentes en los puntos iniciales (P0) en función del soporte de incubación (Tabla 14), lo que pudo deberse al paso “extra” de agitación, necesario para resuspender las poblaciones de *A. baumannii* de los filtros de acetato de celulosa.

En el presente trabajo, la gran capacidad para sobrevivir en ambientes hostiles de *A. baumannii* ATCC 19606^T descrita previamente, parece corresponderse con la estabilidad del subproteoma de las envueltas celulares. En todas las condiciones de estrés estudiadas (ayuno a distintas temperaturas y condiciones hídricas), incluso en aquellas condiciones que promueven cambios morfológicos, pérdida de viabilidad y descenso significativo de la cantidad de RNA por célula, como es el caso de las poblaciones planctónicas mantenidas a 37°C, este microorganismo mantuvo, en gran medida, la composición proteica de las envueltas celulares. La ausencia de cambios en la expresión de varias lipoproteínas y proteínas de membrana externa, incluida la proteína Omp38 (AbOmpA), con diferencia la proteína con mayor presencia en las envueltas celulares de *A. baumannii*, reflejaría el mantenimiento de la integridad de estas envueltas y, por tanto, de la estructura celular (Lin y col., 2002). Esta estabilidad se corresponde con el aparente

mantenimiento de la integridad celular según refleja la constancia del número total de células, incluso en poblaciones que han perdido viabilidad y cultivabilidad (Figura 3).

A pesar de que el análisis de expresión génica reveló un descenso significativo de la expresión del gen *ompA* durante la supervivencia en condiciones de ayuno de *A. baumannii*, la detección de altos niveles de la proteína Omp38 (AbOmpA) sugeriría que, a pesar del descenso en la síntesis de esta proteína durante la permanencia bajo condiciones adversas, no se produciría la degradación de las proteínas ya sintetizadas. Un comportamiento similar se observó con la proteína CsuAB. Mientras que el análisis de la expresión génica puso de manifiesto un descenso en su expresión, *A. baumannii* fue capaz de mantener bastante estables los niveles de esta proteína, especialmente, durante la permanencia sobre superficies sólidas.

Por su parte, la estabilidad de determinadas proteínas implicadas en la conservación de la energía (subunidades de ATP sintasa, de citocromos y de NADH-quinona oxidorreductasas) (Tabla 14), sería indicativa del funcionamiento de la cadena de transporte electrones y de un metabolismo energético activo a pesar de las condiciones de ayuno imperantes. La sobreexpresión de la ATP sintasa (subunidad alfa F1) se ha demostrado en *Vibrio parahaemolyticus*, durante la inducción del estado VNC debida a la permanencia en condiciones de ayuno a bajas temperaturas (Lai y col., 2009). En nuestro estudio el mantenimiento de las proteínas relacionadas con procesos bioenergéticos resulta paradójico en el caso de poblaciones planctónicas mantenidas a 37°C, para las cuales se detectó un descenso significativo del número de células cultivables y, lo que es más importante, de células activas.

El kit *Live/Dead® BacLight™*, utilizado en este estudio, determina la viabilidad de una población bacteriana en base a la integridad de la membrana celular. Las células que presentan una membrana comprometida se tiñen con Ioduro de Propidio (IP), que no puede penetrar membranas intactas, y se consideran células muertas; mientras que las células con una membrana citoplasmática íntegra se observan teñidas en verde (Joux y col., 1997; Davey, 2011). Se considera que, una vez que las membranas están suficientemente lesionadas como para permitir el paso de IP, las células han superado el *punto de no retorno* (recuperación) y se describen como no viables o *muertas* (Davey y Kell, 1996). Sin embargo, se han descrito situaciones que muestran que la adscripción de las células a una categoría (*viva* o *muerta*) es compleja. Así, Berney y col. (2007) indicaron la existencia de estadios intermedios de lesión celular en los que las células no se pueden definir como rojas o verdes. Esta situación coincide con lo observado en nuestras experiencias, en las que algunas células emiten fluorescencia combinada en verde y rojo, hecho especialmente patente en las células más *alargadas* (Figura 5). Estas tinciones dudosas pueden ser debidas a que, en función del microorganismo estudiado, la

capacidad de penetración y la intensidad de la fluorescencia emitida por ambos fluorocromos difieran del estándar asumido (Davey, 2011; Stiefel y col., 2015). Además, según indican Dupont y col. (2010), es posible que las membranas celulares sufran remodelaciones y experimenten lesiones que puedan ser reparadas si la célula sobrevive a las mismas. En este sentido, Yang y col. (2015) describen como células aparentemente *muertas* (permeadas por IP) de *Shewanella decolorationis* repararon sus membranas, impermeabilizándolas a IP, cuando se eliminaron las condiciones estresantes del medio.

Por tanto, no podemos descartar que los indicadores de funcionamiento de la cadena de transporte electrones (p.e. citocromos) y de metabolismo energético activo (p.e. ATP sintasas) reflejen un mal funcionamiento del kit *Live/Dead® BacLight™* en *A. baumannii* ATCC 19606^T y estemos obviando una fracción de células VNC en poblaciones planctónicas mantenidas a 37°C.

Por otro lado, la constancia en la detección, durante al menos 15 días de exposición a condiciones ambientales adversas, de proteínas destinadas a hacer frente al estrés oxidativo, como catalasa, superóxido dismutasa y, en gran medida, la proteína alquil hidroperóxido reductasa (Tabla 15), indicaría que las células son capaces de hacer frente a un nivel de estrés oxidativo estable por periodos de tiempo prolongados. En este contexto, proteínas de resistencia al estrés, destaca también la estabilidad en la detección de la zinc metaloproteasa FtsH dependiente de ATP, implicada en el control de calidad de las proteínas integrales de membrana, degradando aquellas proteínas de membrana dañadas o “innecesarias” para la célula (Narberhaus, 2009).

Además, aunque el grupo que engloba aquellas proteínas que intervienen en procesos de transporte fue el más variable, en este estudio comprobamos que varias porinas y otras proteínas relacionadas con esta función no experimentaron variaciones en su expresión a lo largo del tiempo por efecto del ayuno, el soporte de incubación y/o la temperatura de exposición al estrés. Entre estas proteínas se detectaron, entre otras, una porina de la familia OprB, selectiva de carbohidratos, la subunidad YajC del sistema Sec o el canal mecanosensible de gran conductancia.

Las porinas de la familia OprB, relacionadas con el transporte de monosacáridos, se ha comprobado que facilitan la difusión de glucosa, manitol, glicerol y fructosa a través de la membrana externa en *P. aeruginosa* (Wylie y Worobec, 1995). Estas porinas, que se mantienen a pesar de las condiciones de ayuno imperantes, posibilitarían una rápida toma de nutrientes si las condiciones nutricionales mejoraran.

La subunidad YajC del sistema Sec, junto con las proteínas SecD y SecF conforman el subcomplejo SecDFYajC 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). Otra de las proteínas que se mantuvo estable en las diferentes condiciones estudiadas fue la proteína D0CDN5_ACIBA con secuencia señal de la vía Tat, vía para la translocación de proteínas ya plegadas. La constancia en la detección de esta secuencia señal no es una evidencia directa pero puede ser indicativa de que esta vía de translocación de proteínas se mantuvo funcional durante el periodo de estudio. Por tanto, la detección de la subunidad YajC, implicada en el funcionamiento del sistema Sec, principal sistema de translocación de proteínas no plegadas en bacterias Gram negativas, junto con los indicios del funcionamiento de la vía Tat, indicarían que a pesar de las condiciones estresantes, *A. baumannii* mantendría activo estos dos importantes sistemas de translocación de proteínas.

Por su parte, los canales mecanosensibles de baja y gran conductancia han sido descrito como proteínas implicadas, junto con otros componentes celulares, en el mantenimiento de la presión osmótica celular (Booth y Blount, 2012).

Diversos autores han demostrado cambios en el proteoma de bacterias Gram negativas mantenidas bajo condiciones adversas. Así, para *E. coli*, Muela y col. (2008) han demostrado que factores adversos, como ayuno, salinidad y radiación visible, pueden inducir cambios en el subproteoma de las envueltas celulares. Kao y col. (2009), Ben Abdallah y col. (2010) y Parada y col. (2016) demuestran variaciones en el subproteoma de membrana externa cuando poblaciones de *Vibrio* spp. se someten a condiciones adversas (nuevamente ayuno y salinidad, además de temperaturas subóptimas y radiación γ). En nuestro caso, a pesar de la gran capacidad de persistencia, la aparente ausencia de cambios fisiológicos y la estabilidad de la expresión proteica, observamos que la respuesta al estrés provocada por las fluctuaciones en las condiciones ambientales indujo cambios en la expresión de determinadas proteínas de membrana. Así, las proteínas peptidasa señal I y proteína fimbrial dejaron de detectarse en todas las condiciones de estudio. Probablemente, *A. baumannii* estaría limitando la expresión de proteínas no fundamentales para la supervivencia, manteniendo los niveles de aquellas necesarias para la adaptación al estrés ambiental. En este sentido, la expresión de la proteína fimbrial, implicada en la formación de biofilms (Smith y col., 2016), no sería necesaria para su supervivencia bajo condiciones de ayuno y coincidiría con la disminución en la capacidad de adhesión detectada.

Nuestros resultados mostraron que la evolución de varias proteínas guardaba relación con las condiciones de estrés, además del ayuno, a las que se sometió a la población. Así, la temperatura de incubación de 37°C indujo la sobreexpresión de la proteína determinante del lugar de formación del septo de división, producto del gen *minD* (UniProt), tanto en poblaciones planctónicas como adheridas. Los componentes del sistema MinCDE, junto con el nucleóide regulan la localización de la proteína FtsZ que interviene orquestando la formación del septo y

determina la forma celular (Wu y col., 2015). Se ha demostrado que la sobreexpresión de MinD provoca la formación de formas filamentosas en *Bacillus subtilis* (van Baarle y Bramkamp, 2010) y suprime la división en *E. coli* (Howard y col., 2001), resultados que coincidirían con el incremento del tamaño medio de las células detectado en las poblaciones incubadas a 37°C (Figuras 13 y 14).

Además, los componentes del sistema MinCDE junto con MreB intervienen regulando la forma (y el tamaño) celular (Shih y Rothfield, 2006; Margolin, 2009). La eliminación de la proteína MreB provoca la pérdida de la forma bacilar en *B. subtilis*, *E. coli* o *Caulobacter* (Jones y col., 2001; Kruse y col., 2003; Figge y col., 2004) y la subexpresión de la misma se correlaciona con la disminución de tamaño y la adquisición de la forma cocoide en *Vibrio harveyi* mantenido en condiciones de ayuno (Parada y col., 2016). En este trabajo, la proteína MreB, que no pudo detectarse en varios puntos, mostró un comportamiento discordante con respecto a MinD y no guardó relación con las variaciones en la distribución de tamaños de las poblaciones observadas. Esta discrepancia puede deberse a que, a pesar de que MreB suele encontrarse asociada a la membrana, esta proteína es citoplasmática lo que puede dificultar su detección mediante el método empleado.

Por otro lado, en relación con el transporte celular, otras proteínas como el efector del sistema de secreción Tipo VI, disminuyeron su concentración a lo largo de la supervivencia tanto en poblaciones planctónicas como adheridas a soportes, llegando a no ser detectados durante la permanencia sobre superficies sólidas. Los sistemas de secreción de Tipo VI son proteínas transportadoras implicadas en relaciones de competición entre bacterias (Carruthers y col., 2013; Russell y col., 2014). Sin embargo, su función más interesante radica en la analogía de algunos de sus componentes con el ensamblaje de la cola contráctil del fago lambda (Pell y col., 2009) lo que facilita la inyección de efectores en las células eucariotas diana pudiendo promover inhibición de la fagocitosis e inducción de la apoptosis (Ma y col., 2009; Suarez y col., 2010). El comportamiento de esta proteína sería un ejemplo más de que *A. baumannii* estaría limitando la expresión de aquellas proteínas no fundamentales para la supervivencia, manteniendo los niveles de aquellas necesarias para la adaptación al estrés ambiental.

La combinación de soporte y temperatura de incubación también afectó a la detección y/o expresión de proteínas. Así, la permanencia bajo las condiciones más estresantes que inducen pérdida de viabilidad y cultivabilidad (poblaciones mantenidas a 37°C en suspensión y ausencia de nutrientes) provocó un descenso en la expresión de una proteína de la familia LemA, que en *Pseudomonas* se considera un factor de virulencia tanto en especies patógenas de plantas como de humanos (Hrabak y Willis., 1992; Willis y col., 1994) y la no detección de la bacterioferritina, principal reservorio de hierro de las células (Ma y col., 1999). Este hecho, sería consistente con la consideración de la no inducción del estado VNC en *A. baumannii* por efecto del estrés. Sin

embargo, la detección de “nuevas” proteínas como OmpR, proteína reguladora de la transcripción o CsgG, relacionada con la producción, transporte y ensamblaje de las fimbrias tipo “curli” en estas condiciones y la paradoja del mantenimiento de las proteínas relacionadas con procesos bioenergéticos en estas mismas poblaciones, discutida previamente, nos afianzan en reconsiderar la idoneidad del uso del kit *Live/Dead® BacLight™* para todo tipo de bacterias y situaciones experimentales. Es obvio, que las células planctónicas mantenidas a 37°C no son células *muertas* y que incluso experimentan cambios en su proteoma indicativos de una cierta actividad.

Varias proteínas implicadas en el transporte de solutos a través de las membranas experimentaron cambios que no respondían a un patrón de efecto del ayuno, el soporte, la temperatura o combinaciones de ellos. Estas evoluciones podrían reflejar la respuesta de *A. baumannii* al estrés generado por los factores abióticos estudiados. Así, en poblaciones de *A. baumannii* expuestas a condiciones adversas, se detectaron algunas proteínas no presentes en poblaciones no estresadas, como proteínas transportadoras de las familias ABC, ABC1 o ChvD (Tabla 14). Un hecho similar ha sido constatado previamente por Gayoso y col. (2014), quienes han descrito que el estrés ocasionado por baja humedad relativa provoca en *A. baumannii* AbH120-A2 la expresión de un gran número de proteínas asociadas con el transporte. Nuestros resultados muestran, además, que estas variaciones resultan más usuales en poblaciones mantenidas a 37°C en soporte sólido.

Finalmente, en nuestro trabajo, el factor de elongación Tu se detectó en los extractos de células sometidas a diferentes condiciones adversas e, incluso se sobreexpresó en poblaciones en suspensión. Este factor EF-Tu ha sido descrito como una chaperona citoplasmática implicada en la síntesis de proteínas, en la regulación del crecimiento celular y en la respuesta al estrés (Yu y col., 1986; Caldas y col., 1998). Wong y col. (1999) han sugerido que la escasez de nutrientes podría resultar en la liberación de esta proteína en la membrana. De un modo más general, para *E. coli* (Muela y col., 2008) y *V. harveyi* (Parada y col., 2016) la presencia y/o sobreexpresión de esta proteína en las membranas se ha considerado un indicador de estrés. Defeu Soufo y col. (2015) han indicado que la actividad de la proteína MreB estaría regulada por el factor de elongación Tu y que esta interacción dirigiría la asociación a membrana de EF-Tu. Además, estos mismos autores han descrito a la proteína EF-Tu como un modulador de la proteína MreB con la que interaccionaría en relación 1:1, otorgándole así, un papel relevante en la morfología celular (Defeu Soufo y col., 2010, 2015). Sin embargo, en nuestro trabajo no encontramos relación entre la evolución de MreB y EF-Tu en *A. baumannii*, hecho que podría evidenciar de nuevo las limitaciones del método de extracción para la detección de proteínas citoplasmáticas como MreB.

No obstante, durante el análisis de los resultados se detectaron ciertas incoherencias en la presencia/ausencia de determinadas proteínas. Por ejemplo, durante la supervivencia de *A. baumannii* como células en suspensión a 20°C no se detectó BamA, proteína que forma parte de complejo Bam (β -barrel assembly machinery) de ensamblaje de OMPs (Voulhoux y col., 2003) y que sí estuvo presente en el resto de condiciones analizadas. Esta proteína, expresada de manera constitutiva por las bacterias Gram negativas (Mirsa y col., 2014), es esencial para la viabilidad de estas células (Noinaj y col., 2013). El complejo Bam (BamABCDE) es el responsable del correcto ensamblaje de las proteínas de membrana externa (OMPs) con dominios barril- β (Malinverni y Silhavy, 2011) y la ausencia de BamA provoca la acumulación de las proteínas desplegadas en el periplasma, la activación de la respuesta al estrés y, de manera ocasional, la muerte celular (Malinverni y Silhavy, 2011). La estabilidad detectada en un gran número de OMPs (DOCDE3_ACIBA, DOCDQ0_ACIBA, DOCF71_ACIBA, etc.), ensambladas en la membrana externa gracias al complejo Bam, junto con el mantenimiento de la viabilidad de estas poblaciones, pondrían en duda la aparente ausencia de la subunidad BamA en solución salina a 20°C. Asimismo, la variabilidad en la detección de proteínas pertenecientes al mismo operón, como es el caso de las proteínas pertenecientes a los operones *CsuAB/ABCDE* o *SecDFYajC*, ponen de manifiesto las limitaciones de los métodos utilizados para la extracción (discutido previamente) y detección de proteínas. Entre estas proteínas con aparente variabilidad en su expresión, no podemos descartar que los niveles de expresión de algunas de ellas impidan/dificulten su detección. Además, Bernsel y Daley (2009) han indicado que la digestión con tripsina, previa a la espectrometría de masas, puede suponer un problema para la detección de algunas proteínas de membrana; ya que debido al proceso de digestión se generan péptidos trípticos largos e hidrofóbicos, lo que dificultaría su identificación posterior.

En cualquier caso, los datos analizados durante el presente trabajo muestran que, a pesar de las condiciones adversas, *A. baumannii* ATCC 19606^T mantiene una estabilidad general en las proteínas asociadas a sus membranas con algunos cambios puntuales, sobre todo en los mecanismos de transporte. Esta conservación/mantenimiento de sus envueltas celulares puede ser un reflejo más de su gran capacidad de persistencia, que ya hemos discutido previamente.

Centrándonos en la patogenicidad de esta bacteria, a pesar de los cambios detectados en el efector del sistema de secreción Tipo VI y en la proteína LemA, que parecen indicar una disminución de la capacidad patogénica en poblaciones de *A. baumannii* que han permanecido largo tiempo bajo condiciones ambientales adversas, la aparente estabilidad en la expresión de varias OMPs sugeriría la conservación de virulencia potencial en estas poblaciones. Entre ellas, cabe destacar la detección de Omp38 (AbOmpA) responsable de la apoptosis inducida por *A. baumannii* en células

de mamíferos (Choi y col., 2005) o la presencia de diversas porinas que se han relacionado con la adhesión célula-célula y con la unión de compuestos bactericidas a la superficie de las células bacterianas Gram negativas (Vila y col., 2007). Además, la presencia constante de OprM, que en *P. aeruginosa* forma un complejo junto con MexAB implicado en la exportación de antibióticos (Hancock y Brinkman, 2002; Yoshihara y col., 2002), de una proteína putativa similar a CarO que pudiera estar implicada en la resistencia a carbapenems o la detección de la bomba de expulsión BpeB, pueden ser indicativas de que, incluso en condiciones estresantes, este microorganismo mantiene su capacidad de resistencia frente a antibióticos. Asimismo, la estabilidad detectada en la expresión de las proteínas como la catalasa, la superóxido dismutasa o la alquil hidroperóxido reductasa permitirían a *A. baumannii* resistir al estrés oxidativo generado por las ROS producidas por la respuesta innata del sistema inmunitario humano tras la infección (Henningham y col., 2015). Estos hechos, junto con su enorme capacidad para sobrevivir en la mayoría de las condiciones adversas testadas, nos llevan a confirmar el riesgo de diseminación de este microorganismo en el ambiente hospitalario y la necesidad de buscar sistemas de control en dicho ambiente.

2. Efecto de los agentes físicos y químicos en el control de *A. baumannii*

La multirresistencia a antibióticos detectada en diferentes microorganismos como *A. baumannii* o *Staphylococcus aureus* hace imprescindible la utilización de métodos de control de estos y otros patógenos, especialmente en el ambiente hospitalario. Junto con el uso de desinfectantes se están buscando nuevas estrategias y metodologías para su inactivación. En la actualidad existen diversos estudios sobre la utilización de las radiaciones, tanto visible como UV-C, como alternativa a los desinfectantes tradicionales en el control de estos microorganismos (Maclean y col., 2007, 2009; Lipovsky y col., 2008, 2010; Dai y col., 2012; Zhang y col., 2014).

Maclean y col. (2009) demostraron que se requieren periodos de tiempo cortos (menos de 3 h) para reducir 4 órdenes la cultivabilidad de poblaciones de *A. baumannii* NCTC 12156 directamente expuestas a la luz visible. En nuestro trabajo, aunque la luz visible tuvo un claro efecto negativo sobre las poblaciones planctónicas de *A. baumannii* ATCC 19606^T, fue necesario un mayor tiempo de exposición, detectándose un descenso progresivo de la cultivabilidad y viabilidad durante los 30 días de exposición (Figura 7 A). La utilización de matraces de vidrio y la elevada densidad celular inoculada (10^8 cel ml⁻¹) ejercerían un efecto protector sobre las células de *A. baumannii*, y justificarían en gran medida las diferencias observadas con respecto a los resultados de Maclean y col. (2009). El modo de exposición de las células a la radiación, exposición indirecta (contenidas en matraces de vidrio) o directa (irradiadas sobre filtros de acetato de celulosa) influyó en el tiempo necesario para detectar un efecto negativo sobre las poblaciones. Así, en el caso de poblaciones expuestas directamente a la radiación visible, dejaron de detectarse células cultivables a partir de los 7 días (Figura 7 B). Por otro lado, y a diferencia de lo observado durante los ensayos de supervivencia en condiciones de oscuridad, la radiación visible provocó la adopción del fenotipo VNC, tal y como se ha descrito para otros microorganismos como *E. coli* (Canteras y col., 1999; Muela y col., 2000; Idil y col., 2010) o *C. jejuni* (Oh y col., 2015).

Coincidiendo con Dai y col. (2012), quienes describieron el efecto bactericida de la radiación UV-C sobre cepas clínicas de *A. baumannii* tanto *in vitro* como sobre células de mamíferos, la radiación UV-C provocó la inactivación de las poblaciones de *A. baumannii* ATCC 19606^T. Este efecto bactericida del UV-C se suele estudiar en función del descenso de cultivabilidad. En nuestro caso, el UV-C, si bien indujo pérdida de cultivabilidad, dio lugar a la detección de una importante fracción de células en estado VNC, fracción que fue disminuyendo progresivamente al aumentar el tiempo de exposición, detectándose una población final mayoritariamente no viable (NV) (87% en solución salina y 93% sobre superficies sólidas). Estos resultados, inducción de estado VNC, coinciden con los escasos trabajos que estudian el efecto del UV-C sobre la cultivabilidad y la

viabilidad celular de *E. coli* o *P. aeruginosa* (Ben Said y col., 2010; Zhang y col., 2015), y que no están exentos de polémica (Linden y col., 2015).

Un fenómeno similar se observó cuando *A. baumannii* ATCC 19606^T fue expuesta a la acción de los agentes oxidantes hipoclorito sódico (NaOCl) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂), cuyo efecto deletéreo se vehiculiza mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Dunkan y Touati, 1996; Dunkan y col., 1999; Touati, 2000). La exposición a concentraciones crecientes de ambos desinfectantes derivó en la aparición de una importante fracción de células VNCs, que fue disminuyendo dando lugar a una población en su mayoría no viable (60%). Resultados similares fueron obtenidos por Orruño (2009) tras la exposición de *E. coli* a concentraciones crecientes de hipoclorito sódico y peróxido de hidrógeno. El efecto negativo de estos agentes oxidantes puede ser consecuencia del daño acumulativo producido por las ROS en las membranas celulares (Arana y col., 1999; Henningham y col., 2015). Karumathil y col. (2014) establecieron que la solución de cloro recomendada para el tratamiento de las aguas potables y destinadas al uso recreativo (4 mg l⁻¹) no afecta a la cultivabilidad de varios aislamientos clínicos de *A. baumannii*. Sin embargo, en este trabajo doctoral, concentraciones más bajas de NaOCl (2 mg l⁻¹) provocaron un claro descenso de la cultivabilidad de *A. baumannii* ATCC 19606^T. Orruño (2009) obtuvo para *E. coli* descensos similares con concentraciones de hipoclorito sódico de 1 mg l⁻¹. Estas diferencias en la eficacia de un mismo desinfectante sugieren que existe una variabilidad en la sensibilidad/susceptibilidad no solo entre distintas especies bacterianas, sino incluso entre cepas de una misma especie tan diversa como *A. baumannii* (Towner, 2009; Imperi y col., 2011; Villalón y col., 2011).

Una práctica habitual en los hospitales de todo el mundo es el uso de productos derivados de cloro, alcoholes o compuestos de amonio cuaternario (QACs) para la descontaminación de las superficies y/o material médico-quirúrgico con el objetivo de prevenir las infecciones y brotes causados por *A. baumannii*. En el presente trabajo se comprobó la eficacia de varios desinfectantes, incluyendo algunos comerciales utilizados en hospitales de la provincia Bizkaia, con el objetivo de verificar su eficacia frente a la cepa *A. baumannii* ATCC 19606^T.

Previa a su aplicación, los desinfectantes deben ser testados para verificar si cumplen los requisitos exigidos en las normativas vigentes (AFNOR NF T 72-150 y NF T 72-190). Estas normativas, que permiten establecer la eficacia de los desinfectantes frente a los organismos de referencia *E. coli*, *P. aureginosa*, *S. aureus* y *E. faecalis*, se siguieron para determinar la eficacia de diferentes productos de uso común en los hospitales de nuestro entorno (Instrunet® SURFA'SAFE e Instrunet® ANIOSYME DD1) sobre *A. baumannii* ATCC 19606^T. Nuestros resultados indican que estos productos presentan una actividad variable frente a las poblaciones de *A. baumannii* en

función del tiempo de exposición y del soporte de estudio (medio líquido o soporte sólido). En cualquier caso, ninguno de los productos Instrunet® testados alcanzó los requisitos exigidos por las normas AFNOR para los microorganismos de referencia (reducción de la cultivabilidad de 5 logaritmos decimales) (Figura 10). En este sentido debemos indicar que Favero y Bond (1991) detectaron una actividad limitada de estos compuestos sobre microorganismos relacionados con *A. baumannii* como *P. aeruginosa*.

En el caso de poblaciones planctónicas de *A. baumannii*, la presencia de materia orgánica, como resultado de la resuspensión de las células de *A. baumannii* en caldo triptona-sal, pudo ser la responsable de que los desinfectantes Instrunet® no alcanzaran una reducción de la cultivabilidad mayor o igual a 5 logaritmos decimales (Rahimi y col., 2012; Rutala y Weber, 2013). Martró y col. (2003) demostraron la idoneidad de un producto similar al SURFA' SAFE (Instrunet Superficies®) en el control de diferentes aislamientos clínicos de *A. baumannii*, sin embargo, este estudio se realizó en ausencia de materia orgánica. En el caso de poblaciones adheridas a superficies de acero inoxidable, y tratadas con Instrunet® SURFA'SAFE, se observó un incremento de la eficacia de desinfección a medida que incrementaba el tiempo de exposición. Este resultado sería indicativo de que el producto SURFA'SAFE necesitaría un tiempo de contacto mayor que el recomendado por el fabricante (5 minutos) para lograr la eliminación de *A. baumannii* exigida por la normativa AFNOR NF T 72-190 para la inactivación de los microorganismos de referencia. El producto ANIOSYME DD1 no resultó efectivo en la eliminación de células de *A. baumannii* de superficies inertes de acero inoxidable (Figura 10). Debemos recordar que, según el fabricante, este producto está indicado para la "limpieza reforzada y pre-desinfección" del material médico quirúrgico. Nuestros resultados confirman que ANIOSYME DD1 no es una buena opción para desinfectar objetos de acero inoxidable, de hecho, los QACs no son productos recomendados para la desinfección de este tipo material debido a su limitada acción frente a virus y esporas (Weber y col., 2007, Rutala y Weber, 2013).

Los compuestos derivados del cloro se han sugerido como alternativa a los QACs (Rutala y Weber, 2004) por su mayor efectividad frente a ciertos microorganismos como *Clostridium difficile* (Mayfield y col., 2000). Entre los inconvenientes del uso de estos compuestos en el ambiente hospitalario se encuentra la posibilidad de provocar irritaciones tanto en el personal sanitario como en las personas ingresadas. La lejía comercial de uso doméstico (solución de 40 g l⁻¹ de NaOCl) mostró en este estudio ser una alternativa válida debido a su mayor eficacia en el control de *A. baumannii* ATCC 19606^T respecto a la determinada para los productos Instrunet® (Figura 10). Cuando se determinó su efecto sobre poblaciones planctónicas de *A. baumannii*, la lejía comercial cumplió los requisitos exigidos en la norma AFNOR NF T 72-150 para las bacterias de

referencia, incluso en un tiempo de contacto (30 segundos) significativamente inferior al exigido (5 minutos). A su vez, el peróxido de hidrógeno es un producto altamente eficaz frente a bacterias (French y col., 2004; Boyce y col., 2008; Falagas y col., 2011; Bentley y col., 2012) y se considera que concentraciones del 3% de H₂O₂ son eficaces para la desinfección de superficies inanimadas (Sota, 2000). Los ensayos de supervivencia en presencia de H₂O₂ demostraron que la concentración del 2% era suficiente para reducir 5 logaritmos decimales la cultivabilidad de *A. baumannii* (Figura 11). Sin embargo, estos resultados no fueron ratificados en los ensayos llevados a cabo mediante la metodología descrita en la normativa AFNOR. Uno de los inconvenientes del peróxido de hidrógeno es su baja estabilidad (de la Macorra García y col., 2004) y su velocidad de descomposición aumenta con el pH y la temperatura ambientales, además, es muy sensible a la presencia de pequeñas trazas de iones metálicos (Yazici y Deveci, 2010) lo que podría explicar las diferencias observadas cuando se emplearon portagérmenes metálicos.

El conjunto de estos resultados indican que la lejía sería el desinfectante más indicado para la eliminación de *A. baumannii* de los complejos hospitalarios. Sin embargo, las consecuencias o efectos que puede tener el uso de este tipo de compuestos clorados sobre determinados pacientes debido a su toxicidad, junto con la alta eficacia demostrada por los productos Instrunet®, convertiría a estos últimos en una buena alternativa.

En el presente trabajo demostramos por primera vez la inducción del estado VNC en *A. baumannii* ATCC 19606^T. Las células VNC, debido a sus características entre las que se incluye una baja tasa metabólica (Signoretto y col., 2000), son más resistentes que las células cultivables a factores abióticos como la temperatura, salinidad, pH o incluso a la acción de los antimicrobianos (Wong y Wang, 2004; Lleó y col., 2007; Oliver, 2010). Los microorganismos patógenos en estado VNC, generalmente, no son capaces de producir una enfermedad, pero si retienen la virulencia, y la infección puede comenzar una vez producido el proceso de resucitación (recuperación de la cultivabilidad por parte de las células VNC cuando las condiciones ambientales devienen favorables) (Oliver, 2010). Desde un punto de vista sanitario, la detección de células VNCs en *A. baumannii* en ambientes correctamente tratados con desinfectantes, no documentada hasta el momento, podría explicar su gran persistencia en el ambiente hospitalario. Además, plantearía serias dudas sobre la interpretación de los análisis rutinarios llevados a cabo en los centros sanitarios, en los que se asume que las bacterias infecciosas pueden ser detectadas por su capacidad de crecer en un medio de cultivo; o en los procesos de desinfección donde la eficacia de los productos se obtiene en base a los descensos que producen en la cultivabilidad de los distintos microorganismos.

En cualquier caso, a pesar de que las dudas planteadas acerca de la idoneidad del kit *Live/Dead*[®] *BacLight*[™] para detectar células viables, la demostración de la generación de una fracción de células VNC bajo determinadas condiciones de estudio son indicativas de la capacidad de *A. baumannii* para adoptar este estado. Sin embargo, el descenso en el porcentaje de células VNCs observado tras la exposición de *A. baumannii* a la radiación UV-C y a los agentes oxidantes podría indicar que este fenotipo no es la estrategia de supervivencia principal de *A. baumannii* ATCC 19606^T, sino que podría ser un estadio previo a la muerte celular, tal y como se ha documentado para otros microorganismos como *P. fluorescens* (Hase y col., 1999) o *E. coli* (Arana y col., 2007).

CONCLUSIONES



1. La temperatura y el soporte de incubación condicionan la permanencia de *A. baumannii* ATCC 19606^T bajo condiciones de ayuno. La permanencia en medio líquido a 37°C, en ausencia de nutrientes, provoca la aparición de una fracción de células no viables y de células distorsionadas, así como el descenso en el contenido celular de RNA. El resto de los factores de estrés ensayados no afectan a la supervivencia de *A. baumannii*.
2. La adopción del fenotipo Viable No Cultivable no parece ser una estrategia de éxito para *A. baumannii* ATCC 19606^T, ya que, en las situaciones en las que se induce este fenotipo, la subpoblación Viable No Cultivable no representa la fracción predominante en la población. Además, esta fracción Viable No Cultivable disminuye a medida que incrementa el periodo de exposición a condiciones adversas. *A. baumannii* sometida a condiciones adversas podría desarrollar una estrategia de supervivencia combinada, *bust and boom* y estado Viable No Cultivable.
3. La capacidad de *A. baumannii* ATCC 19606^T de adherirse a superficies abióticas y la expresión de genes directamente implicados en la formación de biofilms se ven alterados por la permanencia bajo condiciones de ayuno tanto en poblaciones planctónicas como retenidas en superficies. Por tanto, si bien *A. baumannii* ATCC 19606^T es capaz de persistir bajo condiciones adversas, su capacidad para colonizar nuevos ambientes estaría comprometida.
4. La estabilidad del proteoma de las envueltas celulares, especialmente de proteínas estructurales e implicadas en la conservación de la energía, se relaciona con la capacidad de *A. baumannii* ATCC 19606^T para permanecer en ambientes hostiles. Además, la conservación de proteínas implicadas en la patogenicidad y en la resistencia frente a antibióticos y estrés oxidativo parece indicativa del mantenimiento de su virulencia potencial.
5. Los agentes químicos y físicos recomendados para el control de microorganismos y testados en este trabajo provocan pérdidas de cultivabilidad y viabilidad durante la exposición a los mismos, aunque no eliminan las células de *A. baumannii* ATCC 19606^T de los sistemas estudiados. Estos agentes inducen la entrada en el estado Viable No Cultivable. La lejía comercial fue el desinfectante más eficaz de acuerdo con los criterios establecidos por las normas AFNOR vigentes. Sin embargo, los productos de amonio cuaternario (QACs) de la casa comercial Instrunet® podrían considerarse más adecuados al carecer de efectos negativos para los pacientes y personal hospitalario.

BIBLIOGRAFÍA



- ✓ AFNOR NF T 72-150:1995. Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau et neutralisables-Détermination de l'activité bactéricide. Méthode par dilution-neutralization. 3^a Ed. Paris 1987.
- ✓ AFNOR NF T 72-190:1988. Désinfectants de contact utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau. Détermination de l'activité bactéricide, fongicide et sporicide. Méthode des porte-germes. Paris : La Défense.1989.
- ✓ Álvarez A., Rodríguez E. y Gálvez R. 2001. Valoración de desinfectantes. Método de dilución-neutralización. *Hig San Amb*. Vol. 1: 1-5.
- ✓ Andersen J.S., Wilkinson C.J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E.A. y Mann M. 2003. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature*. Vol. 426: 570-574.
- ✓ Anderson N.L. y Anderson N.G. 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts and new words. *Electrophoresis*. Vol. 19: 1853-1861.
- ✓ Anderson R.L., Holland B.W., Carr J.K., Bond W.W. y Favero M.S. 1990. Effect of disinfectants on pseudomonads colonized on the interior surface of PVC pipes. *Am J Public Health*. Vol. 80: 17-21.
- ✓ Arana I., Muela A., Orruño M., Seco C., Garaizabal I. y Barcina I. 2010. Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Ecol*. Vol. 74: 500-509.
- ✓ Arana I., Orruño M., Pérez-Pascual D., Seco C., Muela A. y Barcina I. 2007. Inability of *Escherichia coli* to resuscitate from the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol*. Vol. 62: 1-11.
- ✓ Arana I., Santorum P., Muela A. y Barcina I. 1999. Chlorination and ozonation of waste-water: comparative analysis of efficacy through the effect on *Escherichia coli* membranes. *J Appl Microbiol*. Vol. 86(5): 883-888.
- ✓ Asensio A., Cantón R., Vaque J., Calbo-Torrecillas F., Herruzo R., Arribas J.L. y Saenz M.C. Grupo de trabajo EPINE. 2008. Prevalence of infection by carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Spain (1999-2005). *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol. 26: 199-204.
- ✓ Atlas R.M. y Bartha R. 1998. *Microbial ecology: fundamentals and applications* (4^a edición). Menlo Park, California: Benjamin/Cummings Science Publishing (Ed.). ISBN: 9780805306552.

- ✓ Barbolla R.E., Centron D., Di Martino A., Maimone S., Salgueira C., Famiglietti A., Vay C. y Catalano M. 2003. Identification of an epidemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strain at hospitals in Buenos Aires City. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Vol. 45: 261-264.
- ✓ Barcina I. y Arana I. 2009. The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Rev Environ Sci Biotechnol*. Vol. 8: 245–255.
- ✓ Bartual S.G., Seifert H., Hippler C., Luzon M.A., Wisplinghoff H. y Rodríguez-Valera F. 2005. Development of a Multilocus Sequence Typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. Vol. 43: 4382-4390.
- ✓ Beckwith J. 2013. The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol*. Vol. 164(6): 497-504.
- ✓ Ben Abdallah F., Lagha A., Bakhrouf A., Namane A., Rousselle J.C, Lenormand P. y Kallel H. 2010. Identification of outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* altered in response to γ -irradiation or long-term starvation. *Res Microbiol*. Vol. 161: 869-875.
- ✓ Ben Said M., Masahiro O. y Hassen A. 2010. Detection of viable but non cultivable *Escherichia coli* after UV irradiation using a lytic Qbeta phage. *Ann Microbiol*. Vol. 60(1):121-127.
- ✓ Bergogne-Bérézin E. 2001. The increasing role of *Acinetobacter* species as nosocomial pathogens. *Curr Infect Dis Rep*. Vol.3: 440-444.
- ✓ Bergogne-Bérézin E. y Towner K.J. 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*. Vol. 9: 148-165.
- ✓ Berlau J., Aucken H.M., Houang M. y Epitt T.L. 1999. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. *J Hosp Infect*. Vol. 42: 201-204.
- ✓ Berney M., Hammes F., Bosshard F., Weilenmann H.U. y Egli T. 2007. Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 73(10): 3283-3290.
- ✓ Bernsel A. y Daley D. 2009. Exploring the inner membrane proteome of *Escherichia coli*: which proteins are eluding detection and why? *Trends in Microbiology*. Vol. 17 (10): 444-449.
- ✓ Bhargava N., Sharma P. y Capalash N. 2010. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *Crit Rev Microbiol*. Vol. 36: 349-360.
- ✓ Block S.S. 2001. Peroxygen compounds. En: Block S.S. (Ed). *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 185-204. ISBN: 0683307401.

- ✓ Blonder J., Goshe M.B., Xiao W., Camp D.G., Wingerd M., Davis R.W. y Smith R.D. 2004. Global analysis of the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Proteome Res.* Vol. 3: 434-444.
- ✓ Bogosian G. y Bourneuf E.V. 2001. A matter of bacterial life and death. *EMBO Reports.* Vol. 2(9): 770-774.
- ✓ Booth I. R. y Blount P. 2012. Microbial emergency release valves: The MscS and MscL families of mechanosensitive channels. *J Bacteriol.* Vol. 194: 4802-4809.
- ✓ Boyce J.M., Havill N.L., Otter J.A., McDonald L.C., Adams N.M., Cooper T., Thompson A., Wiggs L., Killgore G., Tauman A. y Noble-Wang J. 2008. Impact of hydrogen peroxide vapor room decontamination on *Clostridium difficile* environmental contamination and transmission in a healthcare setting. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Vol. 29(8): 723-729.
- ✓ Broun R.B. y Audet J. 2008. Current techniques for single-cell lysis. *J R Soc Interface.* Vol. 5: S131-S138.
- ✓ Caballero Gómez N., Abriouel H., Ennahar S. y Gálvez A. 2013. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to enterocin AS-48 in planktonic and sessile states. *Int J Food Microbiol.* Vol. 167 (2):202-207.
- ✓ Caldas T.D., Yaagoubi E., Kohiyama M. y Richarme G. 1998. Purification of elongation factors EF-Tu and EF-G from *Escherichia coli* by covalent chromatography on thiol-sepharose. *Protein Expr Purif.* Vol. 14: 65-70.
- ✓ Canteras J.C., Pérez L., León P. y Lorda T. 1999. Efecto de la radiación luminosa en la desaparición de *Escherichia coli* (T₉₀) en medio acuático. Estudio experimental. *Ingeniería del agua.* Vol. 6: 269-274.
- ✓ Carruthers M.D., Nicholson P.A., Tracy E.N. y Munson R.S. 2013. *Acinetobacter baumannii* utilizes a Type VI Secretion System for bacterial competition. *PLoS ONE.* Vol. 8(3): e59388.
- ✓ CEN. Comité Europeo de Normalización. www.cen.eu. Última consulta: Enero 2016.
- ✓ CEN/TC 216. Comité técnico 216 del CEN para la normalización de antisépticos y desinfectantes químicos.
- ✓ Chang K.C., Kuo H.Y., Tang C.Y., Chang C.W., Lu C.W., Liu C.C., Lin H.R., Chen K.H. y Liou M.L. 2014. Transcriptome profiling in imipenem-selected *Acinetobacter baumannii*. *BMC Genomics.* Vol. 15: 815.

- ✓ Chao T.C. y Hansmeier N. 2012. The current state of microbial proteomics: where we are and where we want to go. *Proteomics*. Vol. 12: 638-650.
- ✓ Chen S.Y., Jane W.N., Chen Y.S. y Wong H.C. 2009. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. *Int J Food Microbiol*. Vol. 129: 157-165.
- ✓ Choi C.H., Hyun S.H., Kim J., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T. y Lee J.C. 2008. Nuclear translocation and DNase I-like enzymatic activity of *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A. *FEMS Microbiol Lett*. Vol 288: 62-67.
- ✓ Choi C.H., Lee E.Y., Lee Y.C., Park T.I., Kim H.J., Hyun S.H., Kim S.A., Lee S.K. y Lee J.C. 2005. Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol*. Vol. 7: 1127-1138.
- ✓ Choi J.K., Chae H.Z., Hwang S.Y., Choi H.I., Jinn L.T. y Yoo G.S. 2004. Fast visible dye staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels compatible with matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Electrophoresis*. Vol. 25: 1136-1141.
- ✓ Claverys J.P. y Håvarstein L.S. 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat Rev Microbiol*. Vol. 5: 219-229.
- ✓ Cole E.C., Rutala W.A. y Johnson J.L. 1987. Evaluation of penicylinders used in disinfectant testing: bacterial attachment and surface texture. *J AOAC*. Vol. 70: 903-906.
- ✓ Costerton J.W. 1995. Overview of microbial biofilms. *J Ind Microbiol*. Vol.15: 137-140.
- ✓ Costerton J.W., Stewart P.S. y Greenberg E.P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. Vol. 284: 1318-1322.
- ✓ Coutard F., Crassouss P., Droguet M., Gobin E., Colwell R.R., Pommepuy M. y Hervio-Heath D. 2007. Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus* regrowth or resuscitation? *ISME J*. Vol. 1: 111-120.
- ✓ Craig D.L., Fallowfield H.J. y Cromar N.J. 2004. Use of microcosms to determine persistence of *Escherichia coli* in recreational coastal water and sediment and validation with in situ measurements. *J Appl Microbiol*. Vol. 96: 922-930.
- ✓ Crawford J.J. 1983. Sterilization, disinfection and asepsis in dentistry. En: Block S.S. (Ed). *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1049-1068. ISBN: 0683307401.

- ✓ Dai T., Murray C.K., Vrahas M.S., Baer D.G., Tegos G.P. y Hamblin M.R. 2012. Ultraviolet C light for *Acinetobacter baumannii* wound infections in mice: potential use for battlefield wound decontamination? *J Trauma Acute Care Surg.* Vol. 73(3): 661-667.
- ✓ Davey H. 2011. Life, Death, and In-Between: meanings and methods in microbiology. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 77(16): 5571-5576.
- ✓ Davey H.M. y Kell D.B. 1996. Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiol Rev.* Vol. 60(4): 641-696.
- ✓ de Breij A., Dijkshoorn L., Lagendijk E., Van der Meer J., Koster A., Bloemberg G., Wolterbeek R., van den Broek P. y Nibbering P. 2010. Do biofilm formation and interactions with human cells explain the clinical success of *Acinetobacter baumannii*? *PLoS ONE.* Vol. 5 (5): e10732.
- ✓ de la Macorra C., Sánchez R. y Brizard A. 2004. Estudio cinético de la descomposición del peróxido de hidrógeno en condiciones de extrema alcalinidad. *Tecnología y desarrollo.* ISSN-e: 16968085, Nº 2.
- ✓ Dedieu L., Pagès J.M. y Bolla J.M. 2002. Environmental regulation of *Campylobacter jejuni* major outer membrane protein porin expression in *Escherichia coli* monitored by using green fluorescent protein. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 68(9): 4209-15.
- ✓ Defeu Soufo H.J., Reimold C., Breddermann H., Mannherz H.G. y Graumann P.L. 2015. Translation elongation factor EF-Tu modulates filament formation of actin-like MreB protein in vitro. *J Mol Biol.* Vol. 227: 1715-1727.
- ✓ Defeu Soufo H.J., Reimold C., Linne U., Knust T., Gescher J. y Graumann P.L. 2010. Bacterial translation elongation factor EF-Tu interacts and colocalizes with actin-like MreB protein. *PNAS.* Vol. 107 (7): 3163- 3168.
- ✓ Dickie P. y Weiner J.H. 1979. Purification and characterization of membrane-bound fumarate reductase from anaerobically grown *Escherichia coli*. *Can J Biochem.* Vol. 57 (6): 813-821.
- ✓ Domon B. y Aebersold R. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* Vol. 312: 12-17.
- ✓ Donlan R.M. y Costerton J.W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *J Clin Microbiol Rev.* Vol. 15: 167-193.
- ✓ Dorsey C.W., Beglin M.S. y Actis L.A. 2003. Detection and analysis of iron uptake components expressed by *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol.* Vol. 41: 4188-4193.

- ✓ Du M., Chen J. y Zhang X. 2007. Characterization and resuscitation of viable but nonculturable *Vibrio alginolyticus* VIB283. *Arch Microbiol.* Vol. 188: 283-288.
- ✓ Dukan S. y Touati D. 1996. Hypochlorous acid stress in *Escherichia coli*: resistance, DNA damage, and comparison with hydrogen peroxide stress. *J Bacteriol.* Vol. 178: 6145-6150.
- ✓ Dunkan S., Belkin S. y Touati D. 1999. Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. *Arch. Biochem. Biophys.* Vol. 367 (2): 311-316.
- ✓ Dunne W.M. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* Vol. 15: 155-166.
- ✓ Dupont S., Beney L., Ritt J.F., Lherminier J. y Gervais P. 2010. Lateral reorganization of plasma membrane is involved in the yeast resistance to severe dehydration. *Biochim Biophys Acta.* Vol. 1798(5): 975-85.
- ✓ Dychdala G.R. 1991. Chlorine and chlorine compounds. En: Block S.S. (Ed). *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 135-158. ISBN: 0683307401.
- ✓ EN 1040: 2005. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo de suspensión para la evaluación de la actividad bactericida básica de los antisépticos y desinfectantes químicos. Método de ensayo y requisitos (fase 1) (Ratificada por AENOR en agosto de 2006).
- ✓ EN 14561: 2007. Antisépticos y desinfectantes químicos. Ensayo cuantitativo en portagérmenes para la evaluación de la actividad bactericida para instrumental utilizado en el área médica. Método y requisitos de ensayo (fase 2/etapa 2).
- ✓ Eng J.K., McCormack A.L. y Yates J.R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Anal Chem.* Vol. 5: 976-989.
- ✓ EPINE. Estudio de prevalencia de las infecciones nosocomiales en España. 2014. Evolución 1990-2014, con resumen de 2014.
- ✓ Espinal P., Martí S. y Vila J. 2012. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect.* Vol. 80: 56-60.
- ✓ Etémadi A.H. 1989. Reconstitution and physiological protein translocation processes. *Subcell Biochem.* Vol. 14: 379-486.
- ✓ Falagas M.E., Thomaidis P.C., Kotsantis I.K., Sgouros K., Samonis G. y Karageorgopoulos D.E. 2011. Airborne hydrogen peroxide for disinfection of the hospital environment and infection control: a systematic review. *J Hosp Infect.* Vol. 78(3): 171-177.

- ✓ Favero M.S. y Bond W.W. Chemical disinfection of medical and surgical materials. En: Block S.S. (Ed). *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 881-918. ISBN: 0683307401.
- ✓ Fekkes P. y Driessen A.J. 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol Mol Biol Rev*. Vol. 63(1): 161-173.
- ✓ Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F. y Whitehouse C.M. 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. Vol. 246: 64-71.
- ✓ Fields S. 2001. Proteomics. Proteomics in genomeland. *Science*. 2001. Vol. 291: 1221-1224.
- ✓ Figge R.M., Divakaruni A.V. y Gober J.W. 2004. MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol*. Vol. 51: 1321-1332.
- ✓ Finkel S.E. 2006. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol*. Vol.4: 113-120.
- ✓ Fournier P.E. y Richet H. 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. *Clin Infect Dis*. Vol. 42: 692-699.
- ✓ French G.L., Otter J.A., Shannon K.P., Adams N.M., Watling D. y Parks M.J. 2005. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. *J Hosp Infect*. Vol. 57(1): 31-37.
- ✓ Fujiki Y., Hubbard A.L., Fowler S., y Lazarow P.B. 1982. Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. Vol. 93 (1): 97-102.
- ✓ Gaddy J.A., Tomaras A.P. y Actis L.A. 2009. The *Acinetobacter baumannii* 19606 OmpA protein plays a role in biofilm formation on abiotic surfaces and in the interaction of this pathogen with eukaryotic cells. *Infect Immun*. Vol. 77 (8): 3150-3160.
- ✓ Gaddy J.A. y Actis L.A. 2009. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol*. Vol. 4: 273-278.
- ✓ Gayoso C.M., Mateos J., Méndez J.A., Fernández-Puente P., Rumbo C., Tomás M., Martínez de Ilarduya Ó. y Bou G. 2014. Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress and persistence in *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res*. Vol. 13: 460-476.

- ✓ Gengenbacher M., Rao S.P., 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. *Microbiol.* Vol. 156 (Pt 1): 81-87.
- ✓ Gil C.G. 2003. La metodología proteómica, una herramienta para la búsqueda de función. *SEM.* Vol. 35: 12-20.
- ✓ Grkovic S., Brown M.H. y Skurray R.A. 2002. Regulation of bacterial drug export systems. *Microbiol Mol Biol Rev.* Vol. 66: 671-701.
- ✓ Gupte A.R., de Rezende C.L. y Joseph S.W. 2003. Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* DT104. *Appl Environ Microb.* Vol. 69: 6669-6675.
- ✓ Hall-Stoodley L., Costerton J.W. y Stoodley P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Rev Microbiol.* Vol. 2: 95-108.
- ✓ Hamouda A., Evans B.A., Towner K.J. y Amyes S.G.B. 2010. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of Multilocus Sequence Typing, Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Sequence-Based Typing of blaOXA-51-like genes. *J Clin Microbiol.* Vol. 48: 2476-2483.
- ✓ Hancock R.E. 1997. The bacterial outer membranes a drug barrier. *Trends Microbiol.* Vol. 5: 37-42.
- ✓ Hancock R.E.W. y Brinkman F.S.L. 2002. Functions of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol.* Vol. 56: 17-38.
- ✓ Hase C., Maschera F., Moënné-Loccoz Y. y Défago G. 1990. Nutrient deprivation and the subsequent survival of biocontrol *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in soil. *Soil Biol Biochem.* Vol. 31: 1181-1188.
- ✓ Heim S., Lleò M., Bonato B., Guzman C.A. y Canepari P. 2002. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *J Bacteriol.* Vol. 184: 6739-6745.
- ✓ Henningham A., Döhrmann S., Nizet V. y Cole J.N. 2015. Mechanisms of group A *Streptococcus* resistance to reactive oxygen species. *FEMS Microbiol Rev.* Vol. 39(4): 488-508.
- ✓ Hernández J. 2007. Espectrometría de masas. Aplicaciones clínicas. *Cont Lab Clin.* Vol.11: 19-30.

- ✓ Herskovits A.A. 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*. Vol. 97(9): 4621-4626.
- ✓ Hillenkamp F., Karas M., Beavis R.C. y Chait B.T. 1991. Matrixassisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem*. Vol. 63: 1193a-1203a.
- ✓ Hobbie J.E., Caley R.J. y Jasper S. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 33: 1225-1228.
- ✓ Hommais F., Laurent-Winter C., Labas V., Krin E., Tendeng C., Soutourina O., Danchinc A. y Bertin P. 2002. Effect of mild acid pH on the functioning of bacterial membranes in *Vibrio cholerae*. *Proteomics*. Vol. 2: 571-579.
- ✓ Hopkins A.L. y Groom C.R. 2002. The druggable genome. *Nat Rev Drug Discovery*. Vol. 1: 727-730.
- ✓ Houang E.T., Chu Y.W., Leung C.M., Chu K.Y., Berlau J., Ng K.C. y Cheng A.F. 2001. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. In Hong Kong. *J Clin Microbiol*. Vol. 39: 228-234.
- ✓ Howard M., Rutenberg A.D. y de Vet S. 2001. Dynamic compartmentalization of bacteria: accurate division in *E. coli*. *Phys Rev Lett*. Vol. 87(27 Pt 1): 278102.
- ✓ Hrabak E.M. y Willis D.K. 1992. The *lemA* gene required for pathogenicity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean is a member of a family of two-component regulators. *J Bacteriol*. Vol: 174(9): 3011-20.
- ✓ Hujer K.M., Hujer A.M., Hulten E.A., Bajaksouzian S., Adams J.M., Donskey C.J., Ecker D.J., Massire C., Eshoo M.W., Sampath R., Thomson J.M., Rather P.N., Craft D.W., Fishbain J.T., Ewell A.S., Jacobs M.R., Paterson D.C. y Bonomo R.A. 2006. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*. Vol. 50: 4114-4123.
- ✓ Hustoft H.K., Malerod H., Wilson S.R., Reubsaet L., Lundanes E. y Greibrokk T. 2012. A critical review of trypsin digestion for LC-MS based proteomics. En: Dr. Hon-Chiu Leung (Ed.). *Integrative Proteomics*. Publisher InTech. ISBN: 9789535100706.
- ✓ İdil Ö., Özkanca R., Darcan C. y Flint K.P. 2010. *Escherichia coli*: Dominance of red light over other visible light sources in establishing viable but nonculturable state. *Photochem & Photobiol*. Vol. 86: 104-109.

- ✓ Imperi F., Antunes L.C., Blom J., Villa L., Iacono M., Visca P. y Carattoli A. 2011. The genomics of *Acinetobacter baumannii*: insights into genome plasticity, antimicrobial resistance and pathogenicity. *IUBMB Life*. Vol. 63(12):1068-74.
- ✓ IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson, Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK (1997).
- ✓ James G.A., Korber D.R., Caldwell D.E. y Costerton J.W. 1995. Digital image analysis of growth and starvation responses of a surface-colonizing *Acinetobacter* sp. *J Bacteriol*. Vol. 177 (4): 907-915.
- ✓ Jawad A., Hawkey P.M., Heritage J. y Snelling A.M. 1994. Description of Leed *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp. and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J Clin Microbiol*. Vol. 32: 2353-2358.
- ✓ Jawad A., Heritage J., Snelling A.M., Gascoyne-Binzi D.M. y Hawkey P.M. 1996. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter* spp. on dry surfaces. *J Clin Microbiol*. Vol. 34: 2881-2887.
- ✓ Jawad A., Snelling A.M., Heritage J. y Hawkey P.M. 1998. Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter rudioresistens*. *J Hosp Infect*. Vol. 39: 235-240.
- ✓ Jones L.J., Carballido-López R. y Errington J. 2001. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*. Vol. 104: 913-922.
- ✓ Jones R.N. 2010. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis*. Vol. 51: S81- S87.
- ✓ Jones S.E. y Lennon J.T. 2010. Dormancy contributes to the maintenance of microbial diversity. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 107: 5881-5886.
- ✓ Josic D., Clifton J.G., Kovac S. y Hixson D.C. 2008. Membrane proteins as diagnostic biomarkers and targets for new therapies. *Curr Opin Mol Ther*. Vol. 10: 116-123.
- ✓ Joux F., Lebaron P. y Troussellier M. 1997. Succession of cellular states in *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms. *FEMS Microbiol. Ecol*. Vol. 22: 65-76.
- ✓ Kao D.Y., Cheng Y.C., Kuo T.Y., Lin S.B., Lin C.C., Chow L.P. y Chen W.W. 2009. Salt-responsive outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* serotype O1 as revealed by comparative proteome analysis. *J App Microbiol*. Vol. 106: 2079-2085.

- ✓ Karumathil D.P., Yin H.B., Kollanoor-Johny A. y Venkitanarayanan K. 2014. Effect of chlorine exposure on the survival and antibiotic gene expression of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in water. *Int J Environ Res Public Health*. Vol. 11: 1844-1854.
- ✓ Karunasagar I. y Karunasagar I. 2005. Retention of pathogenicity in Viable Nonculturable Pathogens. En: Shimshon Belkin, Rita R. Colwell (Eds.). *Oceans and health: Pathogens in the marine environment*. Springer, New York, pp. 361-371. ISBN: 9780387237084.
- ✓ Kazemi N.K., Dusane D.H., Dhakephalka P.K., Rokhbakhsh F.R., Zinjarde S.S. y Chapade B.A. 2011. Biofilms formation by *Acinetobacter baumannii* strains isolated from urinary tract infection and urinary catheters. *FEMS Immunol Med Microbiol*. Vol. 62: 328-338.
- ✓ Kim S.W., Choi C.H., Moon D.C., Jim J.S., Lee J.H., Shin J.H., Kim J.M., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T. y Lee J.C. 2009. Serum resistance of *Acinetobacter baumannii* through the binding of factor H to outer membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett*. Vol. 301: 224-231.
- ✓ Köster W. y Braun V. 1989. Iron-hydroxamate transport into *Escherichia coli* K12: localization of FhuD in the periplasm and of FhuB in the cytoplasmic membrane. *Mol Gen Genet*. Vol. 217 (2-3): 233-239.
- ✓ Kramer A., Schewebke I. y Kampf G. 2006. How long do nosocomial pathogens persist in inanimate surfaces? A systematic review. *BMC Infect Dis*. Vol. 16 (6): 130.
- ✓ Kruse T., Moller-Jensen J., Lobner-Olesen A. y Gerdes K. 2003. Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*. *EMBO J*. Vol. 22: 5283-5292.
- ✓ Lai C.J. , Chen S.Y. , Lin I.H. , Chang C.H. y Wong H.C. 2009. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *Inter J Food Microbiol*. Vol. 135 (2): 118-124.
- ✓ Lambiase A., Piazza O., Rossano F., Del Pezzo M., Tufano R. y Catania M. 2012. Persistence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in an Italian intensive care unit during a forty-six month study period. *New Microbiol*. Vol. 35: 199-206.
- ✓ Landini P. 2009. Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. *Res Microbiol*. Vol. 60: 259-266.
- ✓ Landman D. y Quale J. 2002. *Pseudomonas aureginosa* and *Acinetobacter baumannii*: pathogens of the millennium. *Ochsner Clinic Reports on Serious Hospital Infections*. Vol. 14:1-7.

- ✓ Lanne B. y Panfilov O. 2005. Protein staining influences the quality of mass spectra obtained by peptide mass fingerprinting after separation on 2-D gels. A comparison of staining with coomassie brilliant blue and sypro ruby. *J Proteome Res.* Vol.4: 175-179.
- ✓ Lee H.W., Koh Y.M., Kim J., Lee J.C., Lee Y.C., Seol S.Y., Cho D.T. y Kim J. 2008. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilms and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect.* Vol. 14: 49-54.
- ✓ Lee K., Ha G.Y., Shin B.M., Kim J.J., Kang J.O., Jang S.J., Yong D., Chong Y. y Korean Nationwide Surveillance of Antimicrobial Resistance (KONSAR) group. 2004. Metallobeta-lactamase-producing Gram-negative bacilli in Korean nationwide surveillance of antimicrobial resistance group hospitals in 2003: continued prevalence of VIM-producing *Pseudomonas* spp. and increase of IMP producing *Acinetobacter* spp. *Diagn Microbiol Infect Dis.* Vol. 50: 51-58.
- ✓ Lemke M.J. y Leff L.C. 2006. Culturability of stream bacteria assessed at the assemblage and population level. *Microb Ecol.* Vol. 51: 365-374.
- ✓ Lever M., Rogers K., Lloyd K., Overmann J., Schink B., Thauer R., Hoehler T. y Barker Jørgensen B. 2015. Life under extreme energy limitation: a synthesis of laboratory- and field-based investigations. *FEMS Microbiol Rev.* Vol. 39(5): 688-728.
- ✓ Levin A.S., Mendes C.M., Sinto S.I., Sader H.S., Scarpitta C.R., Rodrigues E., Sauaia N. y Boulos M. 1996. An outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* in a university hospital in Sao Paulo, Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.* Vol. 17: 366-368.
- ✓ Lewis D. y Gattie D. 1991. Ecology of quiescent microbes. *ASM News.* Vol. 57: 27-32.
- ✓ Li G.Z., Vissers J.P., Silva J.C., Golick D., Gorenstein M.V. y Geromanos S.J. 2009. Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics.* Vol. 9 (6): 1696-1719.
- ✓ Libus J. y Storchová H. 2006. Quantification of cDNA generated by reverse transcription of total RNA provides a simple alternative tool for quantitative RT-PCR normalization. *BioTechniques.* Vol. 41: 156-164.
- ✓ Lin J., Huang S. y Zhang Q. 2002. Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes Infect.* Vol. 4: 325-331.
- ✓ Linden K.G., Hull N.M. y Rodriguez R.A. 2015. Comment on "UV Disinfection Induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*" *Environ Sci Technol.* Vol. 49 (17): 10750-10751.

- ✓ Liou M.L., Soo P.C., Ling S.R., Kuo H.Y., Tang C.Y. y Chang K.C. 2014. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immun Infect.* Vol. 47 (4): 275-281.
- ✓ Lipovsky A., Nitzan Y. y Lubart R. 2008. A possible mechanism for visible light-induced wound healing. *Lasers Surg Med.* Vol. 40(7): 509-514
- ✓ Lipovsky A., Nitzan Y., Gedanken A. y Lubart R. 2010. Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: implication for wound healing. *Lasers Surg Med.* Vol. 42(6): 467-472.
- ✓ Liu S.Y., Lin J.Y., Chu C., Su L.H., Lin T.Y. y Chiu C.H. 2006. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. *Int J Antimicrob Agents.* Vol. 27: 81-84.
- ✓ Lleò M.M., Benedetti D., Tafi M.C., Signoretto C. y Canepari, P. 2007. Inhibition of the resuscitation from the viable but non-culturable state in *Enterococcus faecalis*. *Environ Microbiol.* Vol.9: 2313-2320.
- ✓ López M.F., Berggren K., Chernokalskaya E., Lazarev A., Robinson M. y Patton W.F. 2000. A comparison of silver stain and SYPRO Ruby Protein Gel Stain with respect to protein detection in twodimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis.* Vol.21: 3673-3683.
- ✓ Ma A.T., McAuley S., Pukatzki S. y Mekalanos J.J. 2009. Translocation of a *Vibrio cholerae* type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells. *Cell Host Microbe.* Vol. 5: 234-243.
- ✓ Ma J.F., Ochsner U.A., Klotz M.G., Nanayakkara V.K., Howell M.L., Johnson Z., Posey J.E., Vasil M.L., Monaco J.J. y Hasset D.J. 1999. Bacterioferritin A modulates catalase A (KatA) activity and resistance to hydrogen peroxide in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* Vol. 181(12): 3730-3742.
- ✓ Maclean M., MacGregor S.J., Anderson J.G. y Woolsey G. 2008. High-intensity narrow-spectrum light inactivation and wavelength sensitivity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett.* Vol. 285(2): 227-232.
- ✓ Maclean M., MacGregor S.J., Anderson J.G. y Woolsey G. 2009. Inactivation of bacterial pathogens following exposure to light from a 495-nanometer light emitting diode array. *Appl Environ Microbiol.* Vol. 75 (87): 1932-1937.
- ✓ Madhusudhan K.T., McLaughlin R., Komori N. y Matsumoto H. 2003. Identification of a major protein upon phosphate starvation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Basic Microbiol.* Vol. 43(1): 36-46.

- ✓ Madigan M.T., Martinko J.M. y Parker J. 2004. *Brock. Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson Educación S.A. Madrid (Ed.). ISBN: 8420536792.
- ✓ Malinverni J. y Silhavy T. 2011. Assembly of outer membrane β -barrel proteins: the Bam complex. *EcoSal Plus*. Vol. 4(2).
- ✓ Marashi S.A., Behrouzi R. y Pezeshk H. 2007. Adaptation of proteins to different environments: a comparison of proteome structural properties in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Theor Biol*. Vol. 244(1): 127-132.
- ✓ Margolin W. 2009. Sculpting the bacterial cell. *Curr Biol*. Vol. 19(17): R812-822.
- ✓ Marks L.R., Reddinger R.M. y Hakansson A.P. 2014. Biofilm formation enhances fomite survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun*. Vol. 82: 1141-1146.
- ✓ Martí S., Rodríguez-Baño J., Catel-Ferreira M., Jouenne T., Vila J., Seifert H. y Emmanuelle D. 2011. Biofilm formation at the solid-liquid and air-liquid interfaces by *Acinetobacter* species. *BMC Res Notes*. Vol. 4: 5.
- ✓ Martí S., Sánchez-Céspedes J., Oliveira E., Bellido D., Giralt E. y Vila J. 2006. Proteomic analysis of a fraction in cell envelope proteins of *Acinetobacter baumannii*. *Proteomics*. Vol. 6: S82-S87.
- ✓ Martró E., Hernández A., Ariza J., Domínguez M.A., Matas I., Argerich M.J., Martin R. y Ausina V. 2003. Assessment of *Acinetobacter baumannii* susceptibility to antiseptics and disinfectants. *J Hosp Infect*. Vol. 55: 39-46.
- ✓ Mary P., Chihib N.E., Charafeddine O., Defives C. y Hornez J.P. 2002. Starvation survival and viable but nonculturable states in *Aeromonas hydrophila*. *Microb Ecol*. Vol. 43: 250-258.
- ✓ Massana R., Gasol J.M., Bjørnsen P.K., Blackburn N., Hagström Å., Hietanen S., Hygum B.H., Kuparinen J. y 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 problem. *Sci Mar*. Vol. 61 (3): 397-407.
- ✓ Mayfield J.L., Leet T., Miller J. y Mundy L.M. 2000. Environmental control to reduce transmission of *Clostridium difficile*. *Clin Infect Dis*. Vol. 31: 995-1000.
- ✓ McConnell M.J., Actis L. y Pachón J. 2012. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev*. 1-26.
- ✓ McQueary C.N. y Actis L.A. 2011. *Acinetobacter baumannii* biofilms: variations among strains and correlations with other cell properties. *J Microbiol*. Vol. 49(2): 243-250.

- ✓ Merianos J.J. 2001. Surface-active agents. En: Block S.S. (Ed). *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 283-320. ISBN: 0683307401.
- ✓ Michele T.M., Cronin W.A., Graham N.M., diuyer D.M., Pope D.S., Harrington S. y Chaisson R.E., Bishai W.R. 1997. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* by a Fiberoptic Bronchoscope. *JAMA*. Vol 278 (13): 1093-1095.
- ✓ Misra R., Stikeleather R. y Gabriele R. 2015. In vivo roles of BamA, BamB and BamD in the biogenesis of BamA, a core protein of the β -Barrel Assembly Machine of *Escherichia coli*. *J Mol Biol*. Vol. 427: 1061-1074.
- ✓ Molloy M.P., Herbert B.R., Slade M.B., Rabilloud T., Nouwens A.S., Williams K.L. y Gooley A.A. 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem*. Vol. 267 (10): 2871-2881.
- ✓ Morita R.Y. 1997. *Bacteria in oligotrophic environments: starvation-survival lifestyles*. (Ed.) Chapman & Hall, New York .ISBN-13: 9780412106613.
- ✓ Morton D.S. y Oliver J.D. 1994. Induction of carbon starvation-induced proteins in *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 60 (10):3653-3659.
- ✓ Muela A., García-Bringas J.M., Arana I. y 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*. Vol. 39: 65-71.
- ✓ Muela A., Pocino M., Arana I., Justo J., Iriberry J. y Barcina I. 1994. Effect of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 60: 4273-4278.
- ✓ Muela A., Seco C., Camafeita E., Arana I., Orruño M., López J. y Barcina I. 2008. Changes in *Escherichia coli* outer membrane subproteome under environmental conditions inducing the viable but nonculturable state. *FEMS Microbiol Ecol*. Vol. 64: 28-36.
- ✓ Mulberry G. 1994. Current methods of testing disinfectants. En: Association for professionals in infection control and epidemiology (Ed.). *Proceedings of the International Symposium on chemical germicides in health care*. Cincinnati, pp. 225-235.
- ✓ Na S.H., Miyanaga K., Uhno H. y Tanji Y. 2006. The survival response of *Escherichia coli* K12 in a natural environment. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol. 72: 386-392.
- ✓ Naas T., Levy M., Hirschauer C., Marchandin H. y Nordmann P. 2005. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-23 in a tertiary care hospital of Papeete, French Polynesia. *J Clin Microbiol*. Vol. 43: 4826-4829.

- ✓ Nally J.E., Whitelegge J.P., Bassilian S., Blanco D.R. y Lovett M.A. 2007. Characterization of the outer membrane proteome of *Leptospira interrogans* expressed during acute lethal infection. *Infect Immun.* Vol. 75: 766-773.
- ✓ Narberhaus F., Obrist M., Führer F. y Langklotz S. 2009. Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. *Res Microbiol.* Vol. 160(9): 652-659.
- ✓ Neidhardt F.C. 1999. Bacterial growth: constant obsession with dN/dt. *J Bacteriol.* Vol. 181: 7405-7408.
- ✓ Nemec A., Dolzani L., Brisse S., van den Broek P. y Dijkshoorn L. 2004. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-european *Acinetobacter baumannii* clones. *J Med Microbiol.* Vol.53: 1233-1240.
- ✓ Nesvizhskii A.I. 2007. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. *Methods Mol Biol.* Vol. 367: 87-119.
- ✓ Neu H.C. y Heppel L.A. 1965. The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J Biol Chem.* Vol. 240 (9): 3685-3692.
- ✓ Nishio H., Komatsu M., Shibata N., Shimakawa K., Sueyoshi N., Ura T., Satoh K., Toyokawa M., Nakamura T., Wada Y., Orita T., Kofuku T., Yamasaki K., Sakamoto M., Kinoshita S., Aihara M. Y Arakawa Y. 2004. Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory-based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol.* Vol. 42: 5256-5263.
- ✓ Noinaj N., Kuszak A.J., Gumbart J.C., Lukacik P., Chang H., Easley N.C., Lithgow T. y Buchanan S.K. 2013. Structural insight into the biogenesis of β -barrel membrane proteins. *Nature.* Vol. 501(7467):385-390.
- ✓ Nouwens A.S., Cordwell S.J., Larsen M.R., Molloy M.P., Gillings M., Willcox M.D. y Walsh B.J. 2000. Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Electrophoresis.* Vol. 21(17): 3797-809.
- ✓ Nystrom T. 2001. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. *Arch Microbiol.* Vol. 176: 159-164.
- ✓ Nyström T., Olsson R.M. y 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.* Vol. 58(1): 55-65.

- ✓ O'Farrell P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. Vol. 250: 4007-4021.
- ✓ O'Toole G.A. y Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol*. Vol. 28 (3): 449-461.
- ✓ Oh E., McMullen L. y Jeon B. 2015. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Front Microbiol*. Vol. 6: 295.
- ✓ Oliver J.D. 1995. The viable but nonculturable state in the human pathogen, *Vibrio vulnificus* (Minireview). *FEMS Microbiol Lett*. Vol.133: 203-208.
- ✓ Oliver J.D. 2000. The public health significance of viable but nonculturable bacteria. En: R.R. Colwell, D.J. Grimes (Eds.). *Nonculturable Microorganisms in the Environment*. Amer Soc Microbiol Press. Washington D.C., pp. 277-300. ISBN: 9781475702736.
- ✓ Oliver J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol*. Vol. 43: 93-100.
- ✓ Oliver J.D. 2010. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. Vol. 34: 415-425.
- ✓ Oosthuizen M.C., Steyn B., Theron J., Cosette P., Lindsay D., Von Holy A. y Brözel V.S. 2002. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. Vol. 68(6): 2770-2780.
- ✓ Orruño M. 2009. *El estado Viable No Cultivable en bacterias no diferenciadas. Análisis proteómico del proceso*. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Leioa (España).
- ✓ Osborn M.J., Gander J.E., Parisi E. y Carson J. 1972. Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Isolation and characterization of cytoplasmic and outer membrane. *J Biol Chem*. Vol. 247 (12): 3962-3972.
- ✓ Otter J.A., Yezli S. y French G.L. 2011. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Vol. 32 (7): 687-699.
- ✓ Pandey A. y Mann M. 2000. Proteomics to study genes and genomes. *Nature*. Vol.405: 837-846.
- ✓ Parada C., Orruño M., Kaberdin V.R., Bravo Z., Barcina I. y Arana I. 2016. Changes in the *Vibrio harveyi* cell envelope subproteome during permanence in cold seawater. *Microb Ecol*. En revisión.

- ✓ Park J.Y., Kim S., Kim S.M., Cha S.H., Lim S.K. y Kim J. 2011. Complete genome sequence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain 1656-2, which forms sturdy biofilm. *J Bacteriol.* Vol. 193: 6393-6394.
- ✓ Pasquali C., Fialka I. y Huber L.A. 1999. Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* Vol. 722: 89-102.
- ✓ Patton W.F. 2000. A thousand points of light: the application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics. *Electrophoresis.* Vol.21: 1123-1144.
- ✓ Peleg A.Y., Seifert H. y Paterson D.L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence if a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* Vol. 21: 538-582.
- ✓ Pell L.G., Kanelis V., Donaldson L.W., Howell P.L. y Davidson A.R. 2009. The phage lambda major tail protein structure reveals a common evolution for long-tailed phages and the type VI bacterial secretion system. *Proc Natl Acad Sci USA.* Vol. 106: 4160-4165.
- ✓ Perkins D.N., Pappin D.J., Creasy D.M. y Cottrell J.S. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* Vol. 20: 3551-3567.
- ✓ Prinz A., Behrens C., Rapoport T.A., Hartmann E. y Kalies K.U. 2000. Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *EMBO J.* Vol. 19(8): 1900-1906.
- ✓ Pujol M. y Limón E. Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia. 2013. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* Vol. 31(2): 108-113.
- ✓ Quale J., Bratu S., Landman D. y Heddurshetti R. 2003. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* endemic in New York City. *Clin Infect Dis.* Vol. 37: 214-220.
- ✓ Queenan A.M. y Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* Vol.20: 440-458.
- ✓ Quero S., Párraga-Niño N., García-Nuñez M y Sabrià M. 2015. Proteómica en enfermedades infecciosas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 1254.
- ✓ Raheb J., Naghdi S., Flint K.P. 2008. The effect of starvation stress on the protein profiles in *Flexibacter chinensis*. *Iran Biomed J.* Vol. 12(2): 67-75.

- ✓ Rahimi S., Salem A., Ghasemi N. y Shahi S. 2012. Antibacterial agents in dental treatments. En: Varaprasad Bobbarala (Ed.). *Antimicrob Agents*. InTech, pp. 333-344. ISBN: 9789535107231.
- ✓ Rajamohan G., Srinivasan V.B. y Gebreyes W.A. 2010. Molecular and functional characterization of a novel efflux pump, AmvA, mediating antimicrobial and disinfectant resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. Vol. 65(9): 1919-1925.
- ✓ Ramos T., Dedesko S., Siegel J.A., Gilbert J.A. y Stephens B. 2015. Spatial and temporal variations in Indoor environmental conditions, human occupancy, and operational characteristics in a new hospital building. *PLoS ONE*. Vol. 10(3): e0118207.
- ✓ Randall L.L. y Hardy S.J. 1977. Synthesis of exported proteins by membrane-bound polysomes from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*. Vol. 75(1): 43-53.
- ✓ Rao S.P., Alonso S., Rand L., Dick T. y Pethe K. 2008. The protonmotive force is required for maintaining ATP homeostasis and viability of hypoxic, nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 105: 11945-11950.
- ✓ Requena J.M. (Ed.). 2012. *Stress response in microbiology*. Caister Academic Press, Suffolk, UK. ISBN: 9781908230041.
- ✓ Rittershaus E.S., Baek S.H. y Sasseti C.M. 2013. The normalcy of dormancy. *Cell Host Microbe*. Vol. 13: 643-651.
- ✓ Roca I., Espinal P., Vila-Farrés X., y Vila J. 2012. The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: commensal hospital dweller turned pan-drug-resistant menace. *Frontiers in Microbiology*. Vol. 3: 148.
- ✓ Rodríguez, M. 2010. *Proteómica de expresión diferencial en Acinetobacter baumannii resistente a colistina*. Tesis doctoral. Universitat Pompeu Fabra de Barcelona (España).
- ✓ Rodríguez-Baño J., Cisneros J.M., Fernández-Cuenca F., Ribera A., Vila J., Pascual A., Martínez-Martínez L., Bou G., Pachón J. y Grupo de Estudio de Infección Hospitalaria (GEIH) 2004. Clinical features and epidemiology of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in Spanish hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Vol. 25: 819-824.
- ✓ Rodríguez-Baño J., Martí S., Soto S., Fernández-Cuenca F., Cisneros J.M., Pachón J., Pascual A., Martínez-Martínez L., McQueary C., Actis L.A., Vila J. y Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH). 2008. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. *Clin Microbiol Infect*. Vol. 14 (3): 276-278.

- ✓ Ron E.Z. 2013. Bacterial stress response. En: Rosenberg E., E.F. DeLong, S. Lory E. Stackebrandt, F. Thompson (Eds.). *The Prokaryotes – Prokaryotic Physiology and Biochemistry (4th ed.)*. Springer, NY, pp. 589-603. ISBN: 9783642301407.
- ✓ Roszak D.B. y Colwell R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol Rev.* Vol. 51: 365-379.
- ✓ Russell A.B., Peterson S.B. y Mougous J.D. 2014. Type VI secretion effectors: poisons with a purpose. *Nat Rev Microbiol.* Vol. 12(2): 137-148.
- ✓ Russell A.D. y McDonnell G. 2000. Concentration: a major factor in studying biocidal action. *J Hosp Infect.* Vol. 4: 1-3.
- ✓ Russo T.A., Luke N.r., Beanan J.M., Olson R., Sauberman S.L., MacDonald U., Schultz L.W., Umland T.C. y Campagnari A.A. 2010. The K1 capsular polysaccharide of *Acinetobacter baumannii* strain 307-0294 is a major virulence factor. *Infect Immun.* Vol.78: 3993-4000.
- ✓ Rutala W.A. y Weber D.J. 2004. The benefits of surface disinfection. *Am J Infect Control.* Vol. 32: 226-231.
- ✓ Rutala W.A. y Weber D.J. 2013. Disinfection and sterilization: an overview. *Am J Infect Control.* Vol. 41: S2-S5.
- ✓ Rutala W.A., Weber D.J. y *Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)*. 2008. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities.
- ✓ Sabbah S., Springthorpe S. y Sattar SA. 2010. Use of a mixture of surrogates for infectious bioagents in a standard approach to assessing disinfection of environmental surfaces. *Appl environ microbiol.* Vol. 76 (17): 6020-6022.
- ✓ Salje J., van den Ent F., de Boer P. y Löwe J. 2011. Direct membrane binding by bacterial actin MreB. *Mol Cell.* Vol. 43(3): 478-487.
- ✓ Sattar S.A. y Springthorpe V.S. 1994. Methods under development for evaluating the antimicrobial activity of chemical germicides in health care. Cincinnati: association for professionals in infection control and epidemiology Inc. 237-254.
- ✓ Sauvage E., Kerff F., Terrak M., Ayala J.A. y Charlier P. 2008. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.* Vol. 32: 234-258
- ✓ Schnaitman C. 1971. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid, Triton X-100, and lysozyme on the morphology and chemical composition of isolate cell walls of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* Vol. 108 (1): 553-563.

- ✓ Scott E.M. y Gorman S.P. 1991. Glutaraldehyde. En: Block S.S. (Ed). *Disinfection, sterilization, and preservation*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 0683307401.
- ✓ Seifert H. y Dijkshoorn L. 2008. Overview of the microbial characteristics, taxonomy, and epidemiology of *Acinetobacter*. En: E. Bergogne-Bérézin, Friedman H. y Bendinelli M. (Eds.). *Acinetobacter biology and pathogenesis*. Springer, New York, pp: 19-45. ISBN: 978038777943.
- ✓ Shaw J., Rowlinson R., Nickson J., Stone T., Sweet A., Williams K. y Tonge R. 2003. Evaluation of saturation labelling two-dimensional difference gel electrophoresis fluorescent dyes. *Proteomics*. Vol. 3: 1181-1195.
- ✓ Shih Y.L. y Rothfield L. 2006. The bacterial cytoskeleton. *Microbiol Mol Biol Rev*. Vol. 70(3): 729-754.
- ✓ Shin J.H., Lee H.W., Kim S.M. y Kim J. 2009. Proteomic analysis of *Acinetobacter baumannii* in biofilm and planktonic growth mode. *J Microbiol*. Vol. 47: 728-735.
- ✓ Signoretto C., Lleo M.M., Tafi M.C. y Canepari P. 2000. Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microb*. Vol. 66: 1953-1959.
- ✓ Silva J.C, Denny R., Dorschel C.A., Gorenstein M., Kass I.J. Li G.Z., McKenna T., Nold M.J., Richardson K., Young P. y Geromanos S. 2005. Quantitative proteomic analysis by accurate mass retention time pairs. *Anal Chem*. Vol. 77: 2187-2200.
- ✓ Silva J.C., Gorenstein M.V., Li G.Z., Vissers J.P. y Geromanos S.J. 2006. Absolute quantification of proteins by LCMSE: a virtue of parallel MS acquisition. *Mol Cell Proteomics*. Vol. 5 (1): 144-156.
- ✓ Siroy A., Cosette P., Seyer, D., Lemaitre-Guillier C., Vallenet D., Van Dorssealer A., Boyer-Mariotte S., Jounenne T. y Dé E. 2006. Global comparison of the membrane subproteomes between a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain and a reference strain. *J Proteome Res*. Vol. 5: 3385-3398.
- ✓ Smith K.P., Ruiz T. y Mintz K.P. 2016. The inner membrane protein, MorC, is involved in fimbriae production and biofilm formation in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbiol*. doi: 10.1099/mic.0.000246.
- ✓ Soares N.C., Cabral M.P., Gayoso C., Mallo S., Rodríguez-Velo P., Fernández-Moreira E. y Bou G. 2010. Associating growth-phase-related changes in the proteome of *Acinetobacter baumannii* with increased resistance to oxidative stress. *J Proteome Res*. Vol. 9: 1951-1964.

- ✓ Sonntag I., Schwarz H., Hirota Y., Henning U. 1978. Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins. *J Bacteriol.* Vol. 136: 280-285.
- ✓ Sota M. 2000. *Evaluación de la actividad micobactericida de tres desinfectantes frente a aislados clínicos de M. tuberculosis, M. kansasii y M. avium-intracellulare.* Tesis doctoral. Universidad del País Vasco (UPV/EHU). Leioa (España).
- ✓ Spaulding E.H. 1968. Chemical disinfection of medical and surgical materials. En: Block S.S. (Ed). *Disinfection, sterilization, and preservation.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN: 0683307401.
- ✓ Stanley N.R. y Lazazzera B.A. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol.* Vol.52: 917-924.
- ✓ Stepacnovic S., Circovic I., Ranin L. y Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett in Appl Microbiol.* Vol. 38: 428-432.
- ✓ Stiefel P., Schmidt-Emrich S., Maniura-Weber K. y Ren Q. 2015. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol.* Vol. 15: 36.
- ✓ Suarez G., Sierra J.C., Erova T.E., Sha J., Horneman A.J. y Chopra A.K. 2010. A type VI secretion system effector protein, VgrG1, from *Aeromonas hydrophila* that induces host cell toxicity by ADP ribosylation of actin. *J Bacteriol.* Vol. 192: 155-168.
- ✓ Sutton S. 1996. Neutralizer evaluations as control experiments for antimicrobial efficacy tests. En: Joseph M. Ascenzi (Ed.). *Handbook of disinfectants and antiseptics.* Marcel Dekker, Inc. New York, pp: 43-62. ISBN: 0824795245.
- ✓ Tiwari V. y Tiwari M. 2014. Quantitative proteomics to study carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* Vol. 5: 512.
- ✓ Tomaras A.P., Dorsey C.W., Edelman R.E. y Actis L.A. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiol.* Vol. 149: 3473-3484.
- ✓ Tomaras A.P., Flager M.J., Dorsey C.W., Gaddy J.A., y Actis L.A. 2008. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiol.* Vol. 154: 3398-3409.
- ✓ Touati D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys.* Vol. 373 (1): 1-6.

- ✓ Towner K.J. 2009. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J Hosp Infect.* Vol.73: 355-363.
- ✓ Tuli L. y Resson H.W. 2009. LC-MS based detection of differential protein expression. *J Proteomics Bioinform.* Vol. 2(10): 416-438.
- ✓ Turton J.F., Gabriel S.N., Valderrey C., Kaufmann M.E. y Pitt T.L. 2007. Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Infect.* Vol. 13(8): 807-815.
- ✓ UNIPROT (Base de datos en línea). www.uniprot.org. Última consulta: Enero 2016.
- ✓ Unlü M., Morgan M.E. y Minden J.S. 1997. Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis.* Vol. 18: 2071-2077.
- ✓ Vallenet D., Nordmann P., Barbe V., Poirel L., Mangenot S., Bataille E., Dossat C., Gas S., Kreimeyer A., Lenoble P., Oztas S., Poulain J., Segurens B., Robert C., Abergel C., Claverie J.M., Raoult D., Medigue C., Weissenbach J. y Cruveiller S. 2008. Comparative analysis of *Acinetobacters*: three genomes for three lifestyles. *PLoS ONE.* Vol 3: e1805.
- ✓ van Baarle S. y Bramkamp M. 2010. The MinCDJ system in *Bacillus subtilis* prevents minicell formation by promoting divisome disassembly. *PLoS One.* Vol. 5(3): e9850.
- ✓ Van Looveren M., Goossens H. y ARPAC Steering Group. 2004. Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. *Clin Microbiol Infect.* Vol. 10: 684-704.
- ✓ Van Oudenhove L. y Devreese B. 2013. A review on recent developments in mass spectrometry instrumentation and quantitative tools advancing bacterial proteomics. *Appl Microbiol Biotechnol.* Vol. 97: 4749-4762.
- ✓ Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., y Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* Vol. 3 (7): research0034.1–0034.11
- ✓ Vashist J., Tiwari V., Kapil A. y Rajeswari M.R. 2010. Quantitative profiling and identification of outer membrane proteins of beta-lactam resistant strain of *Acinetobacter baumannii*. *J Proteome Res.* Vol. 9: 1121-1128.
- ✓ Vattakaven T., Bond P., Bradley G. y Munn C. 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.* Vol. 72: 6508-6513.

- ✓ Vickery K., Pajkos A. y Cossart Y. 2004. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. *Am J Infect Control*. Vol. 32: 170-6.
- ✓ Vila J. y Marco F. 2002. Interpretative Reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. Vol. 20: 304-10.
- ✓ Vila J., Marti S. y Sanchez-Céspedes J. 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. Vol. 59: 1210-1215.
- ✓ Vila J., Ribera A., Marco F., Ruiz J., Mensa J., Chaves J., Hernández G. y Jiménez de Anta M.T. 2002. Activity of clinafloxacin, compared with six other quinolones, against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Antimicrob Chemoter*. Vol. 49: 471-477.
- ✓ Villalón P., Valdezate S., Medina-Pascual M.J., Rubio V., Vindel A. y Sáez-Nieto J. 2011. Clonal diversity of nosocomial epidemic *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Spain. *J Clin Microbiol*. Vol. 49 (3): 875-882.
- ✓ Villegas M.V. y Hartstein A.I. 2003. *Acinetobacter* outbreaks, 1977-2000. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Vol. 24:284-295.
- ✓ Vincent J.L., Rello J., Marshall J., Silva E., Anzueto A., Martin C.D., Moreno R., Lipman J., Gomersall C., Sakr Y., Reinhart K. y EPIC II Group of Investigators. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*. Vol. 302: 2323-2329.
- ✓ Voulhoux R., Bos M.P., Geurtsen J., Mols M. y Tommassen J. 2003. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science*. Vol. 299: 262-265.
- ✓ Walsh F. 2007. Doripenem: a new carbapenem antibiotic a review of comparative antimicrobial and bactericidal activities. *Ther Clin Risk Manag*. Vol.3: 789-794.
- ✓ Walzer G., Rosenberg E. y Ron E.Z. 2006. The *Acinetobacter* outer membrane protein A (OmpA) is a secreted emulsifier. *Environ Microbiol*. Vol. 8: 1026-1032.
- ✓ Weber D.J., Rutala W.A. y Sickbert-Bennett E.E. 2007. Outbreaks associated with contaminated antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemoter*. Vol. 51: 4217-4224.
- ✓ Webster C., Towner K.J. y Humphreys H. 2000. Survival of *Acinetobacter* on three clinically related inanimate surfaces. *Infect Control Hosp Epidemiol*. Vol. 21:246.
- ✓ Weiner J.H. y Li L. 2008. Proteome of the *Escherichia coli* envelope and technological challenges in membrane proteome analysis. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1778 (9): 1698-1713.
- ✓ Wendt C., Dietze B., Dietz E. y Rüdén H. 1997. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Clin Microbiol*. Vol. 35: 1394-1397.

- ✓ Wenzel R.P. 1997. *M. tuberculosis* infection after bronchoscopy. *JAMA*. Vol. 278: 1111.
- ✓ Whitehead N.A., Barnard A.M., Slater H., Simpson N.J. y Salmond G.P. 2001. Quorum sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. Vol. 25: 365-404.
- ✓ Whitesides M.D. y Oliver J.D. 1997. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl Environ Microb*. Vol. 64: 3025-3028.
- ✓ Wilkins M. 2009. Proteomics data mining. *Expert Rev Proteomics*. Vol. 6: 599-603.
- ✓ Wilkins M.R., Sanchez J.C., Gooley A.A., Appel R.D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D.F. y Williams K.L. 1996. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*. Vol. 13:19-50.
- ✓ Willis D.K., Kinscherf T.G. y Rich J.J. 1994. Conservation of the *lemA* gene, a virulence regulator from the plant pathogen *Pseudomonas syringae*, within a human pathogenic bacterium. En: C. I. Kado, J. H. Crosa (Eds.). *Developments in Plant Pathology Volume 3, Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence*. Springer Science+Business Media Dordrecht, pp 505-510. ISBN: 9789401043229.
- ✓ Wisplinghoff H., Bischoff T., Tallent S.M. Seifert H., Wenzel R.P. y Edmond M.B. 2004. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis*. Vol. 39: 309-317.
- ✓ Wisplinghoff H., Scmitt S., Wöhrmann A., Stefanik D. y Seifert H. 2007. Resistance to disinfectants in epidemiologically defined clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Hosp Infect*. Vol. 66: 174-181.
- ✓ Wong D.K., Lee B.Y., Horwitz M.A., y Gibson B.W. 1999. Identification of fur, aconitase, and other proteins expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under conditions of low and high concentrations of iron by combined two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Infect Immun*. Vol. 67: 327-336.
- ✓ Wong H.C. y Wang P. 2004. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *J Appl Microbiol*. Vol. 96(2): 359-366.
- ✓ Wong H.C., Wang P., Chen S.Y. y Chiu S.W. 2004. Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium. *FEMS Microbiol Lett*. Vol. 233: 269-275.

- ✓ Wu F., Van Rijn E., Van Schie B.G.C., Keymer J.E. y Dekker C. 2015. Multi-color imaging of the bacterial nucleoid and division proteins with blue, orange, and near-infrared fluorescent proteins. *Front Microbiol.* Vol. 6: 607.
- ✓ Wylie J.L. y Worobec E.A. 1995. The OprB porin plays a central role in carbohydrate uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* Vol. 177(11): 3021-3026.
- ✓ Xu H.S., Roberts N., Singleton F. L., Attwell R. W., Grimes D. J. y Colwell R. R. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb Ecol.* Vol. 8 (4): 313-323.
- ✓ Yan J.X., Wait R., Berkelman T., Harry R.A., Westbrook J.A., Wheeler C.H. y Dunn M.J. 2000. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis.* Vol. 21: 3666-3672.
- ✓ Yang Y., Xiang Y. y Xua M. 2015. From red to green: the propidium iodide-permeable membrane of *Shewanella decolorationis* S12 is repairable. *Sci Rep.* Vol. 5: 18583.
- ✓ Yazici E.Y. y Deveci H. 2010. Factors affecting decomposition of hydrogen peroxide. Proceedings of the XIIth. International mineral processing symposium, Gülsoy O.Y., Ergün L.S., Can N.M. y Celik İ.B. Capadocia (Turquía).
- ✓ Yoshihara E., Maseda H. y Saito K. 2002. The outer membrane component of the multidrug efflux pump from *Pseudomonas aeruginosa* may be a gated channel. *Eur J Biochem.* Vol. 269: 4738-4745.
- ✓ Yu F., Inouye S. e Inouye M. 1986. Lipoprotein-28, a cytoplasmic membrane lipoprotein from *Escherichia coli*. Cloning, DNA sequence, and expression of its gene. *J Biol Chem.* Vol 261: 2284-2288.
- ✓ Yu Y.S., Yang Q., Xu X.W., Kong H.S., Xu G.Y. y Zhong B.Y. 2004. Typing and characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in a Chinese hospital. *J Med Microbiol.* Vol. 53: 653-656.
- ✓ Yun S.H., Choi C.W., Park S.H., Lee J.C., Leem S.H., Choi J.S., Kim S., y Kim S.I. 2008. Proteomic analysis of outer membrane proteins from *Acinetobacter baumannii* DU202 in tetracycline stress condition. *J Microbiol.* Vol. 46: 720-727.
- ✓ Zhang Y., Zhu Y., Gupta A., Huang Y., Murray C.K., Vrahas M.S., Sherwood M.E., Baer D.G., Hamblin M.R. y Dai T. 2014. Antimicrobial blue light therapy for multidrug-resistant

Acinetobacter baumannii infection in a mouse burn model: implications for prophylaxis. *J Infect Dis.* Vol. 209 (12): 1963-1971.

- ✓ Zhang S., Ye C., Lin H., Lv L. y Yu X. 2015. UV disinfection induces a VBNC state in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Sci Technol.* Vol. 49(3): 1721-1728.
- ✓ Zhang Y., Marrs C.F., Simon C. y Xi C. 2009. Wastewater treatment contributes to selective increase of antibiotic resistance among *Acinetobacter* spp. *Sci Total Environ.* Vol. 407(12): 3702- 3706.
- ✓ Zielke R.A., Gafken P.R. y Sikora A.E. 2014. Quantitative proteomic analysis of the cell envelopes and native membrane vesicles derived from gram-negative bacteria. *Curr Protoc Microbiol.* Vol. 34: 1F.3.1-1F.3.16.

ANEXO



ANEXO I: ABREVIATURAS

μ: Constante de la velocidad de crecimiento instantáneo

2DE: Electroforesis bidimensional

AC: *Affinity chromatography* o cromatografía de afinidad

AO: *Acridine orange* o naranja de acridina

ATCC: *American Type Culture Collection*

BLAST: *Basic Local Alignment Research Tool*

cDNA: Ácido desoxirribonucleico copia

C_t: *Threshold cycle* o ciclo umbral

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNasa: Desoxirribonucleasa

DS: Desviación estándar

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético

ESI: *Electrospray ionization* o ionización por electrospray

F: *Forward primer* o cebador que se encuentra más próximo al marco de lectura de un determinado gen

FACS: *Flourescence-activated cell shorting*

FC: *Fold Change* o nivel de cambio

gDNA: ADN genómico

GF: *Gel filtration chromatography* o cromatografía de filtración en gel

HPLC: *High performance liquid chromatography* o cromatografía líquida de alta resolución

HR: Humedad relativa

IAA: Iodoacetamida

IEX: *Ion exchange chromatography* o cromatografía de intercambio iónico

IP: Ioduro de propidio

IT: *Ion trap mass spectrometer* o espectrómetro de masas de trampa iónica.

LC: *Liquid chromatography* o cromatografía líquida

LPS: Lipopolisacárido

MALDI: *Matrix Assited Laser Desorption Ionization*

Memb+: Células con membrana citoplasmática íntegra

MH: Mueller-Hinton

MHA: Mueller-Hinton Agar

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

MS: Espectrometría de masas

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

NTC: *No template control*

NV: No viable

OMPs: *Outer membrane proteins* o proteínas de membrana externa

pb: Pares de bases

pl: Punto Isoeléctrico

Q: *Quadrupole mas spectrometer* o espectrómetro de masas quadropolo

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real

R: *Reverse primer* o cebador que se encuentra más alejado del principio del marco de lectura de un determinado gen

RNA: Ácido ribonucleico

RNasa: Ribonucleasa

RPC: *Reversed phase chromatography* o cromatografía líquida de fase reversa

RT: *Reverse transcription* o transcripción inversa

RT-qPCR: Transcripción inversa junto con PCR cuantitativa a tiempo real

SEM: Microscopio electrónico de barrido

SGIker: Servicios Generales de Investigación de la UPV/EHU

SS: Solución salina

T_m: *Melting temperature* o temperatura de fusión

TNC: *Total number of cells* o número total de células

TOF: *Time-of-flight mass spectrometer* o espectrómetro de masas de tiempo de vuelo

UCI: Unidad de Cuidados Intensivos

UFC: Unidades formadoras de colonias

UV-C: Ultravioleta C

VNC: Viable No Cultivable

λ: Longitud de onda

ANEXO II: SOLUCIONES, TAMPONES Y MEDIOS DE CULTIVO

Caldo Mueller-Hinton (MH)

Almidón	1,5 g
Infusión de carne	2 g
Peptona de caseína hidrolizada	17,5 g
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,4 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Mueller-Hinton (MHA)

Almidón	1,5 g
Infusión de carne	2 g
Peptona de caseína hidrolizada	17,5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,4 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar recuento (Álvarez-Alcántara y col., 2001)

Extracto de levadura	2,5 g
Peptona tríptica de caseína	5 g
Glucosa	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Agar Mantenimiento (Álvarez-Alcántara y col., 2001)

Peptona tríptica de caseína	15 g
Peptona de soja	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agar	15 g
Agua destilada	1 l

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo triptona-sal

Peptona de caseína	1 g
Cloruro sódico	8,5 g
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,2 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Formalina tamponada 3% (v/v)

Carbonato cálcico	8,75 gr
Formaldehído 37 %	100 ml

Agitar durante una hora. Tras dejar reposar durante 24 horas, filtrar a través de un filtro de membrana de poliétersulfona de 0,22 µm de diámetro de poro (Merck Millipore) y conservar a temperatura ambiente.

Tampón Tris Salino (TBS)

Tris-HCl	3 g
Cloruro sódico	8,8 g
Cloruro potásico	0,2 g
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,5 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Tampón Fosfato Salino (PBS)

Fosfato disódico	1,44 g
Bifosfato potásico	0,24 g
Cloruro sódico	8 g
Cloruro potásico	0,2 g
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,5 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Lisozima (1 mg ml⁻¹)

Lisozima	1 mg
EDTA 0,5 M	100 µl
Tris – HCl pH 7,5	100 µl
Agua libre de RNAsas	800 µl

Preparar la disolución justo antes de utilizar y mantener a 4°C.

Protease Inhibitor Cocktail

Inhibitor Cocktail	10,5 mg
Dimetil sulfoxido (DMSO)	50 µl
Agua destilada	200 µl

Mantener a 4°C.

Solución Stop

Fenol	5 ml
Etanol	95 ml

Preparar justo antes de usar y mantener en hielo hasta su utilización. Añadir 1ml de solución Stop por mililitro de muestra.

Instrunet® SURFA' SAFE (Inibisa Laboratorios; Laboratorios ANIOS)

Cloruro de didecildimetilamonio
 Clorhidrato de polihexametileno biguanida
 Agentes tensioactivos, espumantes, dispersantes, secuestrantes y excipientes

Instrunet® ANIOSYME DD1 (Inibisa Laboratorios; Laboratorios ANIOS)

Propionato de amonio cuaternario
 Clorhidrato de polihexametileno biguanida
 Complejo enzimático (proteasa, lipasa y amilasa)
 Agentes tensioactivos, estabilizantes y secuestrantes
 Perfume
 Colorante

Caldo Dey-Engley

Polisorbato 80	5 g
Hidrolizado enzimático de caseína	5 g
Extracto de levadura	2,5 g
Dextrosa	10 g
Tiosulfato sódico	6 g
Tioglicolato sódico	1 g
Bisulfito sódico	2,5 g
Lecitina	7 g
Púrpura de bromocresol	5 g
Agua destilada	1 l

Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Caldo Letheen (Sutton, 1996)

Polisorbato 80	5 g
Lecitina	0,7 g
Peptona	10 g
Extracto de carne	5 g
Cloruro sódico	5 g
Agua destilada	1 l

Ajustar el pH a 7,2 y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Finalmente, en condiciones de esterilidad, añadir la lecitina y agitar hasta su disolución.

Neutralizante A

Tween® 80	30 g
Saponina	30 g
Lecitina	3 g
Triptona Sal	1 l

Disolver el Tween® 80 y la saponina en triptona sal. Ajustar el pH a 7,5 y después filtrar a través de un filtro de membrana de poliétersulfona de 0,22 µm de diámetro de poro (Merck Millipore). Finalmente, en condiciones de esterilidad, añadir la lecitina y agitar hasta su disolución.

Neutralizante B (Sabbah y col., 2010)

Tween® 80	1 g
Dextrosa	10 g
Lecitina	7 g
Bisulfito de sodio	2,5 g
Tioglicolato de sodio	1 g
Tiosulfato de sodio	6 g
Cisteína	2 g
Triptona	5 g
Triptona sal	1 l

Ajustar el pH a 7,2 y después filtrar a través de un filtro de membrana de poliétersulfona de 0,22 µm de diámetro de poro (Merck Millipore). Finalmente, en condiciones de esterilidad, añadir la lecitina y agitar hasta su disolución.

ANEXO III: ANÁLISIS DEL SUBPROTEOMA DE LAS ENVUELTAS CELULARES DE *A. baumannii* DURANTE LA SUPERVIVENCIA BAJO CONDICIONES DE AYUNO

Tabla A1: Proteínas identificadas durante la permanencia de *A. baumannii* en solución salina a 20°C al inicio (P0), a los 3 (P1) y 15 (P2) días. R: número de réplicas; C: cuantificación normalizada; ND: Cuantificación no determinada. Localización celular de las proteínas identificadas: M, asociadas a las envueltas celulares; C, citoplasma; I, localización no determinada; E, extracelular.

Información de las proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0C5N9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	11,02	3	33,25	2	6,77
D0C5R3_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	2	1,92	0	0,00	1	2,35
D0C5S9_ACIBA	CsuAB	M	2	4,84	1	7,78	2	9,29
D0C5Y8_ACIBA	50S ribosomal protein L9	C	0	0,00	0	0,00	2	2,89
D0C5Z0_ACIBA	30S ribosomal protein S6	C	3	6,20	3	5,16	3	8,07
D0C5Z4_ACIBA	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	M	3	15,09	3	29,05	3	17,15
D0C5Z5_ACIBA	Ubiquinol oxidase subunit II	M	3	7,74	3	15,86	3	10,79
D0C617_ACIBA	ABC1 family protein	M	0	0,00	1	1,46	2	1,12
D0C632_ACIBA	Aconitate hydratase 2	C	0	0,00	1	1,96	3	7,43
D0C648_ACIBA	Predicted protein	I	1	ND	0	0,00	2	4,39
D0C694_ACIBA	Universal stress protein family	C	0	0,00	1	2,46	2	12,12
D0C699_ACIBA	Magnesium translocating P type ATPase	M	3	8,74	3	24,81	3	8,12
D0C6C8_ACIBA	Acetyl CoA carboxylase biotin carboxylase	C	0	0,00	0	0,00	2	1,36
D0C6F8_ACIBA	D amino acid dehydrogenase	I	1	1,80	1	2,96	2	2,75
D0C6H3_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamA	M	2	2,54	1	2,46	0	0,00
D0C6I0_ACIBA	Protein RecA	C	1	0,93	0	0,00	3	3,86
D0C6L6_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	0	0,00	0	0,00	2	3,66
D0C6L9_ACIBA	Nitroreductase	M	0	0,00	0	0,00	2	4,95
D0C6M4_ACIBA	Cytochrome d terminal oxidase	M	1	16,47	2	16,76	3	15,14
D0C6P0_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	1,48	2	1,33	0	0,00
D0C6Q5_ACIBA	Enolase	C	1	1,35	1	2,22	3	4,31
D0C6S2_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	4,86	1	17,80	2	6,28
D0C767_ACIBA	Fimbrial subunit	E	2	6,97	2	6,89	0	0,00
D0C7L2_ACIBA	Ppic type ppiase domain containing protein	C	2	1,50	0	0,00	0	0,00
D0C7N1_ACIBA	30S ribosomal protein S20	C	2	ND	1	ND	0	0,00
D0C7Q4_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	6,98	2	12,29	2	5,43
D0C8B2_ACIBA	Catalase HPII Hydroxyperoxidase II	M	3	11,27	3	30,69	3	5,52
D0C8P3_ACIBA	Type VI secretion system effector	M	3	79,82	3	44,10	3	25,20
D0C8Y7_ACIBA	Lipoprotein	M	3	18,40	3	46,82	3	10,22
D0C907_ACIBA	Heat shock protein Fragment	I	3	6,62	3	15,89	3	5,86
D0C910_ACIBA	ATP dependent protease La	I	0	0,00	0	0,00	2	1,41
D0C911_ACIBA	DNA binding ATP dependent protease La	C	0	0,00	0	0,00	2	0,80
D0C9C1_ACIBA	Methionine synthase II	I	0	0,00	1	2,17	2	2,49
D0C9D5_ACIBA	Ribonucleoside diphosphate reductase	C	3	3,30	1	4,65	3	7,14
D0C9D6_ACIBA	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB	C	0	0,00	0	0,00	2	2,52

Información de las proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
DOC9E0_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit A	M	3	3,22	2	3,29	2	3,79
DOC9E2_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit C D	M	1	1,71	2	1,65	2	3,19
DOC9E5_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase	M	0	0,00	0	0,00	2	2,91
DOC9E7_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit I	M	3	2,53	3	6,65	2	2,08
DOC9F9_ACIBA	Small-conductance mechanosensitive channel	M	1	8,87	2	6,95	1	9,29
DOC9G9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	0	0,00	2	25,51	1	9,31
DOC9K9_ACIBA	LysM domain containing protein	M	3	8,91	3	29,81	3	7,21
DOC9M4_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamD	M	2	2,01	1	1,51	2	1,79
DOC9P5_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	1,64	0	0,00	2	2,81
DOC9P7_ACIBA	30S ribosomal protein S7	C	3	6,11	2	8,24	3	7,93
DOC9P8_ACIBA	Elongation factor G	C	0	0,00	1	1,26	3	4,55
DOC9R1_ACIBA	Site determining protein	M	1	1,56	2	2,40	3	8,46
DOC9R5_ACIBA	OmpA family protein	M	3	72,66	3	166,44	3	42,51
DOC9S5_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamE	M	1	4,02	3	6,47	3	2,68
D0CA76_ACIBA	50S ribosomal protein L20	C	3	4,70	1	21,63	0	0,00
D0CAD0_ACIBA	LPS-assembly lipoprotein LptE	I	1	3,06	2	5,66	2	2,49
D0CAD9_ACIBA	Rhodanese domain containing protein	M	2	1,90	1	ND	0	0,00
D0CAE4_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamB	M	3	2,93	3	9,32	2	2,40
D0CAE5_ACIBA	UPF0070 protein	I	2	2,60	2	6,79	1	2,64
D0CAG7_ACIBA	Fumarate hydratase class I	C	0	0,00	2	1,54	1	2,64
D0CAR1_ACIBA	Ribonuclease E	C	3	3,73	1	2,14	0	0,00
D0CAV4_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	2	5,15	2	7,00	0	0,00
D0CB18_ACIBA	50S ribosomal protein L7 L12	C	2	3,44	1	2,52	3	7,01
D0CB19_ACIBA	50S ribosomal protein L10	C	0	0,00	1	1,24	3	2,48
D0CB20_ACIBA	50S ribosomal protein L1	C	2	1,41	1	1,25	3	4,09
D0CB21_ACIBA	50S ribosomal protein L11	C	1	1,03	0	0,00	2	3,18
D0CB85_ACIBA	Porin D	M	2	2,07	1	2,35	2	1,99
D0CBC3_ACIBA	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	M	2	4,23	2	3,36	3	2,91
D0CBD4_ACIBA	Phosphoenolpyruvate carboxykinase GTP	C	0	0,00	0	0,00	2	1,85
D0CBD9_ACIBA	60 kDa chaperonin	C	3	2,21	1	3,22	3	4,95
D0CBE3_ACIBA	Protease HtpX	M	3	2,38	3	5,29	1	3,59
D0CBL2_ACIBA	Peptidoglycan associated lipoprotein	M	3	5,61	3	13,61	3	4,43
D0CBN6_ACIBA	Carbapenem associated resistance protein	M	3	16,48	3	60,45	3	12,99
D0CBQ1_ACIBA	Signal peptidase I	M	2	1,78	0	0,00	0	0,00
D0CBT2_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	2	1,51	0	0,00	0	0,00
D0CBX0_ACIBA	Diaminobutyrate 2 oxoglutarate aminotransferase	C	0	0,00	0	0,00	3	1,05
D0CBY8_ACIBA	Penicillin binding protein 6	C	3	3,00	3	6,94	2	2,59
D0CC58_ACIBA	Periplasmic serine peptidase DegS	M	2	3,03	1	2,72	1	2,10
D0CC74_ACIBA	30S ribosomal protein S2	C	3	9,46	3	14,12	3	10,07
D0CCLO_ACIBA	ABC transporter ATPase	M	2	2,97	0	0,00	1	3,01
D0CCP5_ACIBA	LemA family protein	M	3	13,57	3	32,19	3	11,75
D0CCQ1_ACIBA	Bacterioferritin	C	3	3,38	2	13,69	2	4,17
D0CCT4_ACIBA	Superoxide dismutase Cu Zn	M	3	10,32	3	28,42	3	7,13

Información de las proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0CCX6_ACIBA	Toluene tolerance efflux transporter	M	2	2,69	2	6,04	2	2,55
D0CCZ6_ACIBA	30S ribosomal protein S10	C	1	3,62	0	0,00	2	6,38
D0CCZ7_ACIBA	50S ribosomal protein L3	C	0	0,00	0	0,00	3	5,99
D0CCZ8_ACIBA	50S ribosomal protein L4	C	2	3,89	1	5,61	3	4,80
D0CD00_ACIBA	50S ribosomal protein L2	C	3	18,95	3	37,92	3	11,61
D0CD03_ACIBA	30S ribosomal protein S3	C	3	13,09	3	14,39	3	9,84
D0CD04_ACIBA	50S ribosomal protein L16	C	3	5,35	3	11,43	3	2,34
D0CD07_ACIBA	50S ribosomal protein L14	C	3	5,74	1	6,41	3	6,09
D0CD09_ACIBA	50S ribosomal protein L5	C	3	5,18	2	5,65	3	7,63
D0CD14_ACIBA	30S ribosomal protein S5	C	2	3,25	0	0,00	3	4,91
D0CD16_ACIBA	50S ribosomal protein L15	C	3	4,79	1	3,15	1	6,61
D0CD19_ACIBA	30S ribosomal protein S13	C	3	5,74	2	6,07	3	8,53
D0CD20_ACIBA	30S ribosomal protein S11	C	0	0,00	0	0,00	2	2,78
D0CD21_ACIBA	30S ribosomal protein S4	C	3	10,26	2	9,75	3	9,49
D0CD22_ACIBA	DNA directed RNA polymerase subunit alpha	C	0	0,00	0	0,00	2	1,39
D0CD34_ACIBA	Ribonuclease R	C	2	2,05	0	0,00	0	0,00
D0CD53_ACIBA	Malate dehydrogenase	C	1	0,49	0	0,00	2	2,60
D0CD79_ACIBA	Preprotein translocase subunit	M	2	3,71	3	18,13	2	2,45
D0CD98_ACIBA	Aspartate tRNA ligase	C	0	0,00	0	0,00	2	3,96
D0CDD0_ACIBA	Peroxiredoxin	M	0	0,00	0	0,00	2	1,35
D0CDE3_ACIBA	Carbohydrate-selective porin, OprB family	M	2	5,10	2	4,68	2	4,26
D0CDE5_ACIBA	Quinoprotein glucose dehydrogenase A	M	3	7,75	3	18,51	3	7,55
D0CDF2_ACIBA	Outer membrane protein omp38	M	3	251,6	3	592,2	3	234,9
D0CDF9_ACIBA	Large conductance mechanosensitive channel	M	3	8,13	2	6,72	3	8,69
D0CDK8_ACIBA	Rod shape determining protein MreB	C	3	3,19	2	3,23	2	1,94
D0CDL7_ACIBA	Outer membrane transporter	M	3	2,38	2	3,06	2	5,20
D0CDN5_ACIBA	Tat pathway signal sequence domain protein	M	3	11,59	3	17,00	3	11,82
D0CDQ0_ACIBA	Outer membrane protein OprM	M	2	1,53	2	1,56	2	1,90
D0CDQ2_ACIBA	Acriflavine resistance protein A	M	1	0,90	0	0	0	0
D0CDQ6_ACIBA	50S ribosomal protein L21	C	2	3,93	1	3,67	1	3,37
D0CDS8_ACIBA	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein	C	2	0,00	3	10,42	2	5,39
D0CDS9_ACIBA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	M	3	9,91	3	20,00	3	9,62
D0CDT0_ACIBA	Succinate dehydrogenase fumarate reductase	M	3	9,09	3	17,36	3	9,63
D0CDT3_ACIBA	2 oxoglutarate dehydrogenase E2 component dihydrolipoamide succinyltransferase	C	0	0,00	1	2,92	2	2,04
D0CDT5_ACIBA	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit beta	C	1	4,92	1	3,19	2	3,98
D0CDT6_ACIBA	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit alpha	C	0	0,00	0	0,00	2	2,43
D0CE28_ACIBA	NLPA lipoprotein	M	3	6,36	3	13,41	2	3,79
D0CEH1_ACIBA	ATP dependent chaperone ClpB	C	0	0,00	1	1,85	2	5,40
D0CEH8_ACIBA	OmpA family protein	M	1	ND	0	0	0	0
D0CEK4_ACIBA	ATP synthase subunit beta	M	3	12,45	3	13,10	3	10,99
D0CEK6_ACIBA	ATP synthase subunit alpha	M	3	8,61	3	10,29	3	11,30
D0CEK8_ACIBA	ATP synthase subunit b	M	3	16,19	3	31,33	3	12,76

Información de las proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
DOCEK9_ACIBA	ATP synthase F0 C subunit	M	3	15,89	2	20,36	3	11,44
DOCEQ9_ACIBA	D amino acid dehydrogenase small subunit	C	3	2,15	0	0,00	2	6,25
DOCEW0_ACIBA	Protein tyrosine kinase fragment	M	2	2,53	2	3,92	2	2,53
DOCEW1_ACIBA	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	C	2	1,95	0	0,00	2	1,89
DOCF50_ACIBA	Porin	M	3	27,75	3	66,30	3	25,06
DOCF71_ACIBA	Outer membrane protein	M	3	11,16	3	24,65	3	13,62
DOCF98_ACIBA	Chaperone protein DnaJ	C	1	1,37	0	0,00	2	1,92
DOCFJ2_ACIBA	Ribosomal subunit interface protein	C	0	0,00	0	0,00	3	7,68
DOCFLO_ACIBA	Cell division protein FtsZ	M	2	1,85	1	2,14	3	5,49
DOCFW7_ACIBA	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	C	2	2,17	0	0,00	2	7,43
DOCFX9_ACIBA	Chaperone protein DnaK	C	2	11,20	1	4,53	3	7,67
DOCG24_ACIBA	Peptidoglycan associated lipoprotein	M	1	1,48	1	1,40	3	1,21
DOCG36_ACIBA	30S ribosomal protein S9	C	3	13,06	3	18,15	3	9,45
DOCG85_ACIBA	Elongation factor Tu Fragment	C	3	12,35	2	34,35	3	40,69

Tabla A2: Proteínas identificadas durante la permanencia de *A. baumannii* en solución salina a 37°C al inicio (P0), a los 3 (P1) y 15 (P2) días. R: número de réplicas; C: cuantificación normalizada; ND: Cuantificación no determinada. Localización celular de las proteínas identificadas: M, asociadas a las envueltas celulares; C, citoplasma; I, localización no determinada; E, extracelular.

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0C5M4_ACIBA	Prephenate dehydratase	C	0	0,00	0	0,00	2	0,71
D0C5N9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	8,53	2	11,74	3	8,08
D0C5S9_ACIBA	CsuAB	M	2	3,90	1	3,77	2	11,52
D0C5T2_ACIBA	CsuC	M	1	0,95	0	0,00	2	3,33
D0C5Y8_ACIBA	50S ribosomal protein L9	C	1	0,89	2	2,97	3	3,41
D0C5Z0_ACIBA	30S ribosomal protein S6	C	3	3,84	3	3,19	3	3,90
D0C5Z4_ACIBA	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	M	3	8,17	3	9,49	3	8,46
D0C5Z5_ACIBA	Ubiquinol oxidase subunit II	M	3	10,52	3	13,71	3	12,43
D0C5Z7_ACIBA	Phosphoenolpyruvate synthase	C	1	0,64	3	2,50	3	5,12
D0C617_ACIBA	ABC1 family protein	M	0	0,00	2	1,54	0	0,00
D0C621_ACIBA	Potassium transporting ATPase B chain	M	2	1,90	0	0,00	1	2,97
D0C632_ACIBA	Aconitate hydratase 2	C	0	0,00	3	6,10	3	8,13
D0C648_ACIBA	Predicted protein	I	3	2,66	3	2,93	3	7,13
D0C694_ACIBA	Universal stress protein family	C	1	0,00	3	6,62	3	15,19
D0C699_ACIBA	Magnesium translocating P type ATPase	M	3	9,76	3	13,52	3	10,64
D0C6A8_ACIBA	Short chain dehydrogenase reductase	M	0	0,00	3	1,67	1	1,47
D0C6C8_ACIBA	Acetyl CoA carboxylase biotin carboxylase	C	0	0,00	0	0,00	2	2,94
D0C6F8_ACIBA	D amino acid dehydrogenase	I	1	1,84	2	2,64	2	1,75
D0C6H3_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamA	M	3	2,77	2	3,54	2	2,52
D0C6I0_ACIBA	Protein RecA	C	2	1,86	2	2,71	2	3,50
D0C6L6_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	0	0,00	0	0,00	2	3,39
D0C6L9_ACIBA	Nitroreductase	M	0	0,00	2	2,02	2	2,28
D0C6M4_ACIBA	Cytochrome d terminal oxidase	M	3	10,42	3	10,41	3	18,20
D0C6P0_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	1,64	0	0,00	0	0,00
D0C6Q5_ACIBA	Enolase	C	2	2,83	3	4,41	3	3,86
D0C6S2_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	4,30	3	4,12	3	4,54
D0C767_ACIBA	Fimbrial subunit	E	3	3,99	1	1,30	1	2,23
D0C7L2_ACIBA	Ppic type ppiase domain containing protein	C	2	1,15	1	0,61	1	1,39
D0C7N1_ACIBA	30S ribosomal protein S20	C	2	10,70	0	0,00	0	0,00
D0C7Q4_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	5,46	3	3,70	2	3,75
D0C7Q6_ACIBA	30S ribosomal protein S1	C	0	0,00	2	3,11	3	4,74
D0C7T1_ACIBA	LPS assembly protein LptD	M	0	0,00	1	1,11	2	2,49
D0C7T3_ACIBA	Fructose bisphosphate aldolase class II Calvin cycle subtype	C	1	6,56	2	1,59	3	2,50
D0C8B2_ACIBA	Catalase HP11 Hydroxyperoxidase II	M	3	11,32	3	12,88	3	12,72
D0C8N8_ACIBA	Type VI secretion protein IcmF	M	2	0,59	0	0,00	0	0,00
D0C8P3_ACIBA	Type VI secretion system effector	M	3	70,24	3	14,06	3	17,39
D0C8P4_ACIBA	Type VI secretion protein	M	2	3,89	0	0,00	0	0,00
D0C8P5_ACIBA	Type VI secretion protein	M	2	4,95	0	0,00	0	0,00
D0C8U9_ACIBA	Universal stress protein family	C	1	1,03	3	3,20	3	3,37
D0C8Y7_ACIBA	Lipoprotein	M	3	18,69	3	12,88	3	2,85

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
DOC907_ACIBA	Heat shock protein Fragment	I	3	5,84	3	10,47	3	7,52
DOC911_ACIBA	DNA binding ATP dependent protease La	C	0	0,00	0	0,00	2	1,80
DOC988_ACIBA	Phenylacetic acid degradation protein PaaY	I	0	0,00	0	0,00	2	0,40
DOC9C1_ACIBA	Methionine synthase II	I	0	0,00	2	2,09	0	0,00
DOC9D5_ACIBA	Ribonucleoside diphosphate reductase	C	2	3,92	3	4,27	3	2,73
DOC9D6_ACIBA	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB	C	1	0,39	2	3,21	2	4,10
DOC9E0_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit A	M	2	2,76	2	2,93	2	4,37
DOC9E2_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit C D	M	3	1,99	3	3,18	2	3,20
DOC9E5_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase	M	0	0,00	2	3,10	0	0,00
DOC9E7_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit I	M	3	2,71	2	2,74	2	1,93
DOC9F0_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit L	M	0	0,00	1	2,45	2	0,68
DOC9F9_ACIBA	Small-conductance mechanosensitive channel	M	3	14,96	3	13,96	3	16,04
DOC9G9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	6,76	2	5,93	1	3,68
DOC9J0_ACIBA	Bacterioferritin	M	1	2,79	2	1,74	2	2,45
DOC9K9_ACIBA	LysM domain containing protein	M	2	12,76	2	9,89	1	21,79
DOC9M4_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamD	M	1	3,04	2	2,49	1	1,68
DOC9P5_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	1,42	3	2,96	2	1,49
DOC9P7_ACIBA	30S ribosomal protein S7	C	3	8,53	3	7,14	3	6,16
DOC9P8_ACIBA	Elongation factor G	C	1	1,79	3	6,35	3	8,99
DOC9R1_ACIBA	Site determining protein	M	3	1,92	3	4,80	3	3,09
DOC9R5_ACIBA	OmpA family protein	M	3	73,03	3	68,71	3	59,82
DOC9S5_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamE	M	3	3,76	3	4,02	3	3,58
DOCA76_ACIBA	50S ribosomal protein L20	C	2	4,03	0	0,00	0	0,00
DOCAC5_ACIBA	Ketol acid reductoisomerase	C	1	2,73	1	0,67	3	0,81
DOCADO_ACIBA	LPS-assembly lipoprotein LptE	I	3	2,84	3	3,54	3	3,01
DOCAD5_ACIBA	Enoyl acyl carrier protein reductase NADH	C	0	0,00	0	0,00	2	4,62
DOCAD9_ACIBA	Rhodanese domain containing protein	M	3	2,25	2	2,41	0	0,00
DOCAE4_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamB	M	2	2,07	2	2,70	1	2,64
DOCAH2_ACIBA	Trigger factor	C	0	0,00	1	1,10	2	0,61
DOCAR1_ACIBA	Ribonuclease E	C	2	5,74	2	4,56	2	3,29
DOCAV4_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	5,35	2	ND	1	4,05
DOCAZ9_ACIBA	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	C	0	0,00	1	3,25	2	2,42
DOCB08_ACIBA	Chaperone protein HtpG	C	1	5,40	1	0,84	2	1,92
DOCB10_ACIBA	Outer membrane insertion signal domain protein	M	0	0,00	0	0,00	2	1,29
DOCB16_ACIBA	DNA directed RNA polymerase	C	0	0,00	3	2,64	3	4,73
DOCB17_ACIBA	DNA directed RNA polymerase subunit beta	C	0	0,00	1	0,92	3	3,40
DOCB18_ACIBA	50S ribosomal protein L7 L12	C	3	2,74	3	14,49	3	7,39
DOCB19_ACIBA	50S ribosomal protein L10	C	1	0,74	3	5,29	3	4,88
DOCB20_ACIBA	50S ribosomal protein L1	C	3	2,25	3	2,50	3	3,40
DOCB21_ACIBA	50S ribosomal protein L11	C	1	2,12	2	4,76	3	3,60
DOCB58_ACIBA	Homoserine dehydrogenase	C	2	0,65	3	1,06	1	1,23
DOCB85_ACIBA	Porin D	M	3	4,57	3	3,36	3	2,81
DOCBC3_ACIBA	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	M	3	3,42	3	2,47	2	1,94
DOCBD0_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	2	3,37	2	3,47	2	3,39

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0CBD4_ACIBA	Phosphoenolpyruvate carboxykinase GTP	C	0	0,00	2	1,28	2	1,99
D0CBD9_ACIBA	60 kDa chaperonin	C	3	1,95	3	5,84	3	10,70
D0CBE3_ACIBA	Protease HtpX	M	3	3,71	2	3,48	2	4,48
D0CBH7_ACIBA	Electron transfer flavoprotein subunit beta	M	0	0,00	1	3,32	2	3,06
D0CBH8_ACIBA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	M	0	0,00	2	3,12	2	1,73
D0CBH9_ACIBA	DNA gyrase subunit A	C	0	0,00	0	0,00	2	2,63
D0CBL2_ACIBA	Peptidoglycan associated lipoprotein	M	3	5,89	3	8,08	3	8,08
D0CBL9_ACIBA	Holliday junction ATP dependent DNA helicase RuvB	C	0	0,00	2	0,78	0	0,00
D0CBN6_ACIBA	Carbapenem associated resistance protein	M	3	18,69	3	22,66	3	13,72
D0CBQ1_ACIBA	Signal peptidase I	M	3	1,30	0	0,00	0	0,00
D0CBT2_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	2,18	2	1,85	1	2,16
D0CBT5_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	1,36	2	3,19	0	0,00
D0CBU4_ACIBA	Monomeric isocitrate dehydrogenase	C	0	0,00	1	3,11	3	4,73
D0CBW6_ACIBA	Linoleoyl CoA desaturase Delta 6 desaturase	I	0	0,00	2	2,35	1	1,20
D0CBX0_ACIBA	Diaminobutyrate 2 oxoglutarate aminotransferase	C	1	0,83	2	1,26	2	0,90
D0CBX1_ACIBA	Diaminobutyrate decarboxylase	C	0	0,00	1	1,04	2	1,42
D0CBY8_ACIBA	Penicillin binding protein 6	C	3	3,58	3	2,49	1	1,79
D0CC50_ACIBA	Glutamine synthetase	C	2	2,66	1	2,48	1	3,05
D0CC58_ACIBA	Periplasmic serine peptidase DegS	M	3	2,52	1	2,55	3	2,03
D0CC64_ACIBA	Adenosylhomocysteinase	C	0	0,00	1	1,21	3	2,04
D0CC67_ACIBA	Acyl coenzyme A dehydrogenase ACDH	C	2	1,81	3	1,34	1	2,03
D0CC74_ACIBA	30S ribosomal protein S2	C	3	8,70	3	6,54	2	1,58
D0CC75_ACIBA	Elongation factor Ts	C	1	0,28	1	0,96	3	2,45
D0CCD8_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	0	0,00	0	0,00	2	0,55
D0CCK5_ACIBA	Transcriptional regulatory protein OmpR	C	0	0,00	0	0,00	2	2,84
D0CCLO_ACIBA	ABC transporter ATPase	M	1	2,12	1	1,76	1	0,89
D0CCP5_ACIBA	LemA family protein	M	3	15,83	3	12,09	3	9,20
D0CCQ1_ACIBA	Bacterioferritin	C	3	4,98	3	4,10	1	6,05
D0CCT4_ACIBA	Superoxide dismutase Cu Zn	M	3	11,19	3	13,91	3	10,54
D0CCX6_ACIBA	Toluene tolerance efflux transporter	M	3	2,78	1	2,54	2	1,79
D0CCZ6_ACIBA	30S ribosomal protein S10	C	3	4,24	3	4,47	2	4,93
D0CCZ7_ACIBA	50S ribosomal protein L3	C	0	0,00	3	5,28	3	4,43
D0CCZ8_ACIBA	50S ribosomal protein L4	C	2	4,59	3	5,33	3	4,98
D0CD00_ACIBA	50S ribosomal protein L2	C	3	17,79	3	6,52	2	5,77
D0CD02_ACIBA	50S ribosomal protein L22	C	2	6,97	0	0,00	0	0,00
D0CD03_ACIBA	30S ribosomal protein S3	C	3	15,45	3	10,86	3	8,51
D0CD04_ACIBA	50S ribosomal protein L16	C	3	7,06	2	3,65	0	0,00
D0CD07_ACIBA	50S ribosomal protein L14	C	3	5,92	2	4,44	2	4,39
D0CD09_ACIBA	50S ribosomal protein L5	C	3	6,00	3	5,13	3	6,58
D0CD11_ACIBA	30S ribosomal protein S8	C	1	4,05	2	ND	1	3,17
D0CD12_ACIBA	50S ribosomal protein L6	C	3	4,55	1	4,06	1	3,92
D0CD14_ACIBA	30S ribosomal protein S5	C	2	4,47	3	5,52	2	2,02
D0CD16_ACIBA	50S ribosomal protein L15	C	3	5,27	2	2,67	2	3,68
D0CD19_ACIBA	30S ribosomal protein S13	C	3	5,23	3	6,73	3	5,00

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0CD21_ACIBA	30S ribosomal protein S4	C	3	7,31	3	4,56	3	4,24
D0CD22_ACIBA	DNA directed RNA polymerase subunit alpha	C	0	0,00	1	1,10	2	2,23
D0CD53_ACIBA	Malate dehydrogenase	C	0	0,00	3	5,63	3	3,45
D0CD78_ACIBA	Protein translocase subunit SecD	M	1	2,99	1	3,04	1	2,76
D0CD79_ACIBA	Preprotein translocase subunit	M	3	6,05	3	5,19	3	4,59
D0CD98_ACIBA	Aspartate tRNA ligase	C	0	0,00	2	1,18	3	2,82
D0CDA8_ACIBA	Acyl CoA dehydrogenase	C	0	0,00	1	1,33	3	1,10
D0CDE1_ACIBA	AraC family transcriptional regulator	C	0	0,00	2	2,64	0	0,00
D0CDE3_ACIBA	Carbohydrate-selective porin, OprB family	M	3	5,27	3	3,97	3	4,79
D0CDE5_ACIBA	Quinoprotein glucose dehydrogenase A	M	3	8,27	3	7,67	3	6,82
D0CDF2_ACIBA	Outer membrane protein omp38	M	3	172,5	3	179,9	3	165,2
D0CDF9_ACIBA	Large conductance mechanosensitive channel	M	3	13,35	2	12,24	3	9,70
D0CDK8_ACIBA	Rod shape determining protein MreB	C	2	2,67	3	2,94	1	1,33
D0CDL7_ACIBA	Outer membrane transporter	M	2	5,00	2	3,32	2	6,40
D0CDN0_ACIBA	Band 7 protein	M	2	1,79	1	1,82	3	2,11
D0CDN5_ACIBA	Tat pathway signal sequence domain protein	I	3	10,29	3	7,68	3	12,12
D0CDQ0_ACIBA	Outer membrane protein OprM	M	3	1,74	3	1,43	2	1,98
D0CDQ1_ACIBA	Inner membrane multidrug efflux protein BpeB	M	2	1,96	1	1,93	1	2,06
D0CDQ2_ACIBA	Acriflavine resistance protein A	M	3	1,97	1	1,03	0	0,00
D0CDQ6_ACIBA	50S ribosomal protein L21	C	3	3,70	3	2,32	2	2,18
D0CDQ9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	2,84	2	2,86	0	0,00
D0CDR0_ACIBA	Serine tRNA ligase	C	0	0,00	2	2,01	1	3,00
D0CDS8_ACIBA	Succinate dehydrogenase hydrophobic membrane anchor protein	M	3	3,29	2	4,10	2	4,50
D0CDS9_ACIBA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	M	3	11,63	3	10,32	3	8,10
D0CDT0_ACIBA	Succinate dehydrogenase fumarate reductase	M	3	10,17	3	10,18	3	10,68
D0CDT2_ACIBA	Oxoglutarate dehydrogenase Succinyl transferring E1 component	C	0	0,00	1	1,71	3	3,39
D0CDT3_ACIBA	2 oxoglutarate dehydrogenase E2 component dihydrolipoamide succinyltransferase	C	1	0,90	2	1,47	3	1,99
D0CDT5_ACIBA	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit beta	C	1	1,94	3	4,06	3	6,37
D0CDT6_ACIBA	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit alpha	C	0	0,00	1	2,38	3	4,65
D0CDX7_ACIBA	Periplasmic or secreted lipoprotein	M	0	0,00	3	4,11	2	3,21
DOCE28_ACIBA	NLPA lipoprotein	M	3	5,80	3	3,65	2	2,09
DOCE32_ACIBA	Curli production assembly transport component CsgG	M	0	0,00	1	1,23	2	2,10
DOCE96_ACIBA	Aspartokinase	C	0	0,00	1	0,96	2	2,18
DOCEF9_ACIBA	Alanine tRNA ligase	C	0	0,00	1	1,02	2	2,39
DOCEG3_ACIBA	Adenylosuccinate synthetase	C	0	0,00	0	0,00	2	3,30
DOCEH1_ACIBA	ATP dependent chaperone ClpB	C	0	0,00	3	3,18	3	6,43
DOCEH8_ACIBA	OmpA family protein	M	3	6,27	3	4,20	3	3,82
DOCEJ1_ACIBA	TonB dependent copper receptor	M	2	4,81	1	1,76	0	0,00
DOCEK4_ACIBA	ATP synthase subunit beta	M	3	17,09	3	13,25	3	13,19
DOCEK5_ACIBA	ATP synthase gamma chain	M	2	1,85	2	0,78	2	1,40
DOCEK6_ACIBA	ATP synthase subunit alpha	M	3	9,71	3	9,27	3	10,07
DOCEK7_ACIBA	ATP synthase subunit delta	M	3	2,24	0	0,00	1	0,67
DOCEK8_ACIBA	ATP synthase subunit b	M	3	11,22	3	12,42	3	11,89

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0CEK9_ACIBA	ATP synthase F0 C subunit	M	2	12,31	2	14,02	3	10,95
D0CELO_ACIBA	ATP synthase subunit a	M	1	3,56	2	4,03	1	4,02
D0CEN2_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	0	0,00	1	1,54	1	1,26
D0CEQ9_ACIBA	D amino acid dehydrogenase small subunit	C	2	2,82	0	0,00	1	1,41
D0CEW0_ACIBA	Protein tyrosine kinase fragment	M	2	3,04	3	3,71	3	3,44
D0CEW1_ACIBA	Peptidyl prolyl cis trans isomerase	C	3	1,81	2	1,70	1	0,41
D0CF24_ACIBA	2 deoxy D gluconate 3 dehydrogenase	M	0	0,00	0	0,00	2	3,00
D0CF46_ACIBA	Inosine 5 monophosphate dehydrogenase	C	0	0,00	1	1,20	2	1,08
D0CF50_ACIBA	Porin	M	3	11,43	3	10,84	3	8,24
D0CF71_ACIBA	Outer membrane protein	M	3	13,70	3	9,37	3	8,98
D0CF98_ACIBA	Chaperone protein DnaJ	C	3	1,93	0	0,00	2	2,55
D0CFA3_ACIBA	Aldehyde reductase	I	0	0,00	0	0,00	2	1,41
D0CFF8_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	0	0,00	2	1,95	0	0,00
D0CFLO_ACIBA	Cell division protein FtsZ	M	1	2,03	3	3,54	0	0,00
D0CFQ5_ACIBA	Predicted protein	I	0	0,00	2	0,88	0	0,00
D0CFW7_ACIBA	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	C	2	1,72	3	6,47	3	8,54
D0CFX9_ACIBA	Chaperone protein DnaK	C	3	2,69	3	6,56	3	16,75
D0CG24_ACIBA	Peptidoglycan associated lipoprotein	M	1	2,00	2	1,59	1	2,42
D0CG36_ACIBA	30S ribosomal protein S9	C	3	12,29	3	9,20	3	7,85
D0CG39_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	1,74	3	1,82	3	2,64
D0CG85_ACIBA	Elongation factor Tu Fragment	C	3	16,61	3	34,81	3	46,04

Tabla A3: Proteínas identificadas durante la permanencia de *A. baumannii* sobre filtros de acetato de celulosa a 20°C al inicio (P0), a los 3 (P1) y 15 (P2) días. R: número de réplicas; C: cuantificación normalizada; ND: Cuantificación no determinada. Localización celular de las proteínas identificadas: M, asociadas a las envueltas celulares; C, citoplasma; I, localización no determinada; E, extracelular.

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
DOC5N9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	19,02	3	12,57	3	11,08
DOC5R3_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	32,29	2	52,62	3	61,24
DOC5S9_ACIBA	CsuA B	M	2	4,76	2	4,95	3	7,25
DOC5T2_ACIBA	CsuC	M	0	0,00	0	0,00	2	1,54
DOC5Z0_ACIBA	30S ribosomal protein S6	C	1	1,81	2	2,96	3	4,04
DOC5Z4_ACIBA	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	M	3	15,11	2	11,03	3	9,43
DOC5Z5_ACIBA	Ubiquinol oxidase subunit II	M	2	11,34	3	6,42	3	5,82
DOC5Z7_ACIBA	Phosphoenolpyruvate synthase	C	1	2,01	2	2,40	3	1,26
DOC632_ACIBA	Aconitate hydratase 2	C	2	2,32	2	2,35	3	2,88
DOC648_ACIBA	Predicted protein	C	3	5,07	2	5,96	3	3,36
DOC694_ACIBA	Universal stress protein family	C	1	2,55	1	ND	2	3,22
DOC699_ACIBA	Magnesium translocating P type ATPase	M	3	27,66	3	19,25	3	17,53
DOC6A8_ACIBA	Short chain dehydrogenase reductase	M	3	3,36	2	1,82	3	2,02
DOC6H3_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamA	M	2	1,51	2	1,90	3	1,71
DOC6I0_ACIBA	Protein RecA	C	2	2,56	1	0,65	2	1,71
DOC6L9_ACIBA	Nitroreductase	M	0	0,00	0	0,00	3	2,09
DOC6M4_ACIBA	Cytochrome d terminal oxidase	M	1	3,13	2	2,11	3	2,04
DOC6S2_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	0	0,00	2	4,67	3	4,06
DOC767_ACIBA	Fimbrial subunit	E	2	2,15	0	0	0	0
DOC780_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	2	ND	2	ND	3	98,21
DOC7N1_ACIBA	30S ribosomal protein S20	C	1	ND	0	0,00	2	ND
DOC7Q4_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	2	ND	2	5,28	3	2,76
DOC7Q6_ACIBA	30S ribosomal protein S1	C	0	0,00	1	1,32	2	1,46
DOC7T3_ACIBA	Fructose bisphosphate aldolase class II Calvin cycle subtype	C	1	2,91	0	0,00	3	2,57
DOC8B2_ACIBA	Catalase HPII Hydroxyperoxidase II	M	3	64,10	3	40,60	3	51,25
DOC8P3_ACIBA	Type VI secretion system effector	M	3	4,11	0	0,00	0	0,00
DOC8U9_ACIBA	Universal stress protein family	C	3	3,36	2	2,68	3	2,27
DOC8Y6_ACIBA	Isocitrate lyase	C	0	0,00	0	0,00	2	0,89
DOC8Y7_ACIBA	Lipoprotein	M	3	56,49	3	33,61	3	27,55
DOC907_ACIBA	Heat shock protein Fragment	M	3	8,72	2	8,94	3	6,54
DOC912_ACIBA	Autotransporter adhesin	M	3	1,96	2	2,72	2	3,13
DOC9D5_ACIBA	Ribonucleoside diphosphate reductase	C	3	4,07	2	3,81	3	5,61
DOC9D6_ACIBA	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB	C	2	1,96	1	2,30	3	3,30
DOC9E0_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit A	M	2	2,84	2	2,89	2	1,77
DOC9E2_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit C D	M	2	1,20	2	1,17	0	0,00
DOC9E7_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit I	M	2	2,11	2	1,74	2	2,15
DOC9F9_ACIBA	Small-conductance mechanosensitive channel	M	2	9,94	2	8,24	2	6,29
DOC9G9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	6,04	2	11,74	3	9,48
DOC9J0_ACIBA	Bacterioferritin	M	1	4,54	0	0,00	3	2,25

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0C9K9_ACIBA	LysM domain containing protein	M	1	1,21	0	0	0	0
D0C9P5_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	6,62	2	5,55	3	6,16
D0C9P6_ACIBA	30S ribosomal protein S12	C	1	10,18	2	7,66	0	0,00
D0C9P7_ACIBA	30S ribosomal protein S7	C	2	1,62	1	1,95	2	3,08
D0C9P8_ACIBA	Elongation factor G	C	2	1,21	2	1,95	3	3,08
D0C9P9_ACIBA	Predicted protein	C	0	0,00	1	8,30	2	11,71
D0C9R1_ACIBA	Site determining protein	M	2	2,41	2	2,96	3	4,99
D0C9R5_ACIBA	OmpA family protein	M	3	55,78	3	42,79	3	43,61
D0CA70_ACIBA	Integration host factor subunit alpha	C	0	0,00	1	ND	2	1,68
D0CA76_ACIBA	50S ribosomal protein L20	C	3	5,24	1	4,17	1	3,22
D0CAB6_ACIBA	Aconitate hydratase 1	C	2	3,90	2	2,53	3	3,24
D0CAB8_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	2	2,46	2	2,36	3	2,39
D0CAD0_ACIBA	LPS-assembly lipoprotein LptE	M	1	1,26	2	1,80	3	1,48
D0CAD5_ACIBA	Enoyl acyl carrier protein reductase NADH	C	2	1,54	1	ND	1	1,11
D0CAE4_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamB	M	2	2,24	2	2,20	2	10,75
D0CAE5_ACIBA	UPF0070 protein	I	1	ND	2	4,85	0	0,00
D0CAF1_ACIBA	Nucleoside diphosphate kinase	C	1	2,29	1	1,95	2	2,79
D0CAR1_ACIBA	Ribonuclease E	C	3	2,74	2	3,33	3	2,43
D0CAT3_ACIBA	Electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	M	0	0,00	0	0,00	2	0,55
D0CAV4_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	13,83	2	4,89	2	3,23
D0CAZ9_ACIBA	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	C	2	2,47	2	1,31	3	2,00
D0CB00_ACIBA	3 ketoacyl CoA thiolase	C	1	ND	1	1,72	3	1,97
D0CB16_ACIBA	DNA directed RNA polymerase	C	3	3,00	2	2,57	3	2,13
D0CB18_ACIBA	50S ribosomal protein L7 L12	C	3	4,21	2	3,83	3	4,94
D0CB20_ACIBA	50S ribosomal protein L1	C	0	0,00	1	1,07	2	1,61
D0CB21_ACIBA	50S ribosomal protein L11	C	1	1,39	0	0,00	2	1,85
D0CB57_ACIBA	Thiol disulfide interchange protein	I	1	1,23	2	1,22	0	0,00
D0CB89_ACIBA	Dicarboxylate CoA ligase PimA	M	0	0,00	0	0,00	2	1,03
D0CBB7_ACIBA	Carbamoyl phosphate synthase large chain	M	0	0,00	1	0,57	2	0,92
D0CBB9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	C	1	1,75	1	1,39	2	1,60
D0CBC3_ACIBA	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	M	2	2,72	2	1,91	3	1,52
D0CBD0_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	1	1,71	0	0,00	2	2,24
D0CBD9_ACIBA	60 kDa chaperonin	C	3	3,57	2	3,34	3	4,81
D0CBH7_ACIBA	Electron transfer flavoprotein subunit beta	M	0	0,00	1	1,70	3	2,41
D0CBH8_ACIBA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	M	1	3,29	0	0,00	3	1,67
D0CBL2_ACIBA	Peptidoglycan associated lipoprotein	M	3	4,17	2	5,46	3	4,49
D0CBN6_ACIBA	Carbapenem associated resistance protein	M	3	38,37	2	36,95	3	32,10
D0CBQ1_ACIBA	Signal peptidase I	M	2	1,32	0	0,00	0	0,00
D0CBS0_ACIBA	Outer membrane lipoprotein blc	M	3	5,41	2	2,84	3	3,14
D0CBS2_ACIBA	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase typeI	C	1	1,23	0	0,00	2	1,68
D0CBT5_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	3	1,94	1	2,61	0	0,00
D0CBU4_ACIBA	Monomeric isocitrate dehydrogenase	C	1	1,07	0	0,00	2	1,76
D0CBV7_ACIBA	Membrane protein	M	1	2,39	2	2,32	2	2,43
D0CBW6_ACIBA	Linoleoyl CoA desaturase Delta 6 desaturase	C	3	7,41	3	5,61	3	8,06

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
DOCBX0_ACIBA	Diaminobutyrate 2 oxoglutarate aminotransferase	C	0	0,00	0	0,00	2	1,26
DOCBY8_ACIBA	Penicillin binding protein 6	C	3	3,25	3	2,85	3	2,64
DOCC50_ACIBA	Glutamine synthetase	C	3	5,52	2	4,01	3	6,14
DOCC56_ACIBA	Superoxide dismutase	M	3	12,18	2	10,62	3	16,24
DOCC60_ACIBA	Malic enzyme	C	0	0,00	0	0,00	2	0,93
DOCC64_ACIBA	Adenosylhomocysteinase	C	0	0,00	1	0,62	2	0,98
DOCC67_ACIBA	Acyl coenzyme A dehydrogenase ACDH	C	2	2,10	2	1,29	3	1,51
DOCC74_ACIBA	30S ribosomal protein S2	C	3	6,79	2	5,16	3	6,42
DOCC75_ACIBA	Elongation factor Ts	C	1	2,34	1	2,89	3	1,85
DOCCK5_ACIBA	Transcriptional regulatory protein OmpR	C	2	2,16	0	0,00	1	2,75
DOCCK6_ACIBA	Transcriptional accessory protein	C	2	2,95	0	0,00	1	2,43
DOCCK8_ACIBA	2 hydroxycyclohexanecarboxyl CoA dehydrogenase	C	2	3,91	2	3,16	2	3,53
DOCCP5_ACIBA	LemA family protein	M	3	14,34	3	10,04	3	8,88
DOCCQ1_ACIBA	Bacterioferritin	C	3	7,25	2	2,88	3	3,51
DOCCT4_ACIBA	Superoxide dismutase Cu Zn	M	3	9,78	2	9,07	3	5,95
DOCCU3_ACIBA	Glutamate dehydrogenase	C	0	0,00	2	1,95	2	1,63
DOCCX6_ACIBA	Toluene tolerance efflux transporter	M	2	2,38	1	2,49	2	1,88
DOCCZ6_ACIBA	30S ribosomal protein S10	C	1	2,48	1	2,14	3	3,20
DOCD00_ACIBA	50S ribosomal protein L2	C	3	11,64	2	10,88	3	7,20
DOCD03_ACIBA	30S ribosomal protein S3	C	3	7,92	3	8,27	3	6,71
DOCD04_ACIBA	50S ribosomal protein L16	C	3	5,15	2	4,36	3	4,43
DOCD07_ACIBA	50S ribosomal protein L14	C	2	2,90	2	20,33	3	2,39
DOCD09_ACIBA	50S ribosomal protein L5	C	1	1,97	2	1,74	3	1,98
DOCD13_ACIBA	50S ribosomal protein L18	C	0	0,00	0	0,00	2	1,52
DOCD14_ACIBA	30S ribosomal protein S5	C	2	2,83	3	3,02	3	3,93
DOCD16_ACIBA	50S ribosomal protein L15	C	2	2,08	2	2,12	2	1,60
DOCD19_ACIBA	30S ribosomal protein S13	C	3	6,93	2	5,39	3	5,71
DOCD20_ACIBA	30S ribosomal protein S11	C	3	3,07	0	0,00	2	1,84
DOCD21_ACIBA	30S ribosomal protein S4	C	3	4,35	2	5,02	3	5,12
DOCD34_ACIBA	Ribonuclease R	C	2	9,20	2	1,39	0	0,00
DOCD53_ACIBA	Malate dehydrogenase	C	0	0,00	2	1,30	3	11,34
DOCD78_ACIBA	Protein translocase subunit SecD	M	0	0,00	2	1,41	1	1,05
DOCD79_ACIBA	Preprotein translocase subunit	M	2	4,49	2	3,03	2	ND
DOCDD0_ACIBA	Peroxiredoxin	M	0	0,00	0	0,00	2	1,43
DOCDE3_ACIBA	Carbohydrate-selective porin, OprB family	M	3	1,22	2	1,64	2	1,66
DOCDF2_ACIBA	Outer membrane protein omp38	M	3	230,1	3	226,6	3	205,2
DOCDF9_ACIBA	Large conductance mechanosensitive channel	M	2	16,75	2	7,95	3	6,13
DOCDK8_ACIBA	Rod shape determining protein MreB	C	3	1,46	1	1,74	0	0,00
DOCDL7_ACIBA	Outer membrane transporter	M	1	ND	0	0	0	0
DOCDN5_ACIBA	Tat pathway signal sequence domain protein	M	1	2,65	2	4,04	3	2,47
DOCDP4_ACIBA	Valine tRNA ligase	C	0	0,00	0	0,00	2	2,29
DOCDQ0_ACIBA	Outer membrane protein OprM	M	2	1,52	2	1,74	3	1,36
DOCDQ2_ACIBA	Acriflavine resistance protein A	M	1	1,99	2	1,80	3	1,65
DOCDQ6_ACIBA	50S ribosomal protein L21	C	2	3,81	2	2,99	3	2,90

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0CDS6_ACIBA	Citrate synthase	C	2	4,11	2	2,82	3	2,79
D0CDS9_ACIBA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	M	3	2,84	2	2,48	2	1,79
D0CDT0_ACIBA	Succinate dehydrogenase fumarate reductase	M	2	2,86	3	2,32	2	2,14
D0CDT2_ACIBA	Oxoglutarate dehydrogenase Succinyl transferring E1 component	C	1	1,24	2	0,83	3	1,37
D0CDT3_ACIBA	2 oxoglutarate dehydrogenase E2 component dihydrolipoamide succinyltransferase	C	3	3,11	2	2,04	3	2,66
D0CDT4_ACIBA	Dihydrolipoyl dehydrogenase	C	1	3,39	2	2,11	1	2,09
D0CDT5_ACIBA	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit beta	C	3	2,92	2	3,33	3	5,14
D0CDT6_ACIBA	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit alpha	C	1	ND	2	2,31	3	2,57
D0CE28_ACIBA	NLPA lipoprotein	M	3	4,73	2	7,14	3	3,58
D0CEG5_ACIBA	Peptidase family M48 family protein	M	2	3,19	1	1,74	2	2,36
D0CEH1_ACIBA	ATP dependent chaperone ClpB	C	1	1,42	1	0,99	3	1,66
D0CEH8_ACIBA	OmpA family protein	M	3	4,86	2	2,90	3	3,19
D0CEK4_ACIBA	ATP synthase subunit beta	M	3	4,52	2	4,15	3	3,08
D0CEK6_ACIBA	ATP synthase subunit alpha	M	3	4,62	2	4,91	3	2,80
D0CEK8_ACIBA	ATP synthase subunit b	M	3	13,65	3	12,39	3	8,64
D0CEK9_ACIBA	ATP synthase F0 C subunit	M	2	14,93	2	12,70	3	9,77
D0CEW0_ACIBA	Protein tyrosine kinase fragment	M	2	4,23	2	2,41	2	1,76
D0CF50_ACIBA	Porin	M	3	6,62	2	8,96	3	7,80
D0CF71_ACIBA	Outer membrane	M	3	8,31	3	10,11	3	8,08
D0CFJ2_ACIBA	Ribosomal subunit interface protein	C	0	0,00	0	0,00	3	4,33
D0CFW7_ACIBA	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	C	3	3,93	2	3,63	3	3,91
D0CFX9_ACIBA	Chaperone protein DnaK	C	3	2,84	3	2,53	3	4,83
D0CG36_ACIBA	30S ribosomal protein S9	C	2	7,49	2	6,79	3	7,82
D0CG85_ACIBA	Elongation factor Tu Fragment	C	3	9,58	2	14,85	3	22,93

Tabla A4: Proteínas identificadas durante la permanencia de *A. baumannii* sobre filtros de acetato de celulosa a 37°C al inicio (P0), a los 3 (P1) y 15 (P2) días. R: número de réplicas; C: cuantificación normalizada; ND: Cuantificación no determinada. Localización celular de las proteínas identificadas: M, asociadas a las envueltas celulares; C, citoplasma; I, localización no determinada; E, extracelular.

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
DOC5H8_ACIBA	Tail tape measure protein	M	1	1,63	2	0,71	0	0,00
DOC5N9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	3	12,32	3	9,27	3	11,29
DOC5P7_ACIBA	Amidophosphoribosyltransferase	C	0	0,00	1	0,67	2	1,17
DOC5R3_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	21,94	3	28,96	3	32,50
DOC5S9_ACIBA	CsuAB	M	2	3,89	3	4,37	2	4,68
DOC5Y8_ACIBA	50S ribosomal protein L9	C	0	0,00	2	1,32	1	1,19
DOC5Z0_ACIBA	30S ribosomal protein S6	C	1	2,06	3	1,98	2	3,24
DOC5Z4_ACIBA	Cytochrome o ubiquinol oxidase subunit I	M	3	12,05	3	8,78	3	8,55
DOC5Z5_ACIBA	Ubiquinol oxidase subunit II	M	3	11,32	3	7,41	3	7,22
DOC5Z7_ACIBA	Phosphoenolpyruvate synthase	C	3	3,37	3	2,55	3	3,20
DOC617_ACIBA	ABC1 family protein	M	2	1,17	3	2,05	2	1,58
DOC632_ACIBA	Aconitate hydratase 2	C	3	2,59	3	8,68	3	8,12
DOC648_ACIBA	Predicted protein	C	3	3,62	3	3,26	3	3,44
DOC694_ACIBA	Universal stress protein family	C	0	0,00	2	1,41	1	0,00
DOC699_ACIBA	Magnesium translocating P type ATPase	M	3	20,63	3	14,86	3	17,70
DOC6A4_ACIBA	Transaldolase	C	0	0,00	2	1,35	0	0,00
DOC6A8_ACIBA	Short chain dehydrogenase reductase	M	3	4,14	3	2,67	3	2,83
DOC6C8_ACIBA	Acetyl CoA carboxylase biotin carboxylase	C	2	1,13	1	1,86	1	1,38
DOC6F8_ACIBA	D amino acid dehydrogenase	M	1	1,24	3	1,75	1	2,33
DOC6H3_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamA	M	3	1,83	3	1,66	2	1,23
DOC6I0_ACIBA	Protein RecA	C	3	1,46	2	1,44	1	2,11
DOC6L6_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	0	0,00	2	3,88	0	0,00
DOC6L9_ACIBA	Nitroreductase	M	1	1,36	3	1,25	1	1,16
DOC6M4_ACIBA	Cytochrome d terminal oxidase	M	3	3,21	3	2,53	2	2,88
DOC6P0_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	2	1,09	1	0,87	0	0,00
DOC6Q5_ACIBA	Enolase	C	3	2,69	3	2,77	1	3,01
DOC6S2_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	ND	3	3,01	2	3,17
DOC767_ACIBA	Fimbrial subunit	E	2	2,00	0	0	0	0
DOC780_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	2	39,34	3	46,03	2	80,06
DOC784_ACIBA	Pyroloquinoline quinone synthase	C	2	0,77	1	0,95	0	0,00
DOC7L2_ACIBA	Ppic type ppiase domain containing protein	C	2	0,51	2	0,51	0	0,00
DOC7N1_ACIBA	30S ribosomal protein S20	C	3	ND	3	ND	1	ND
DOC7Q4_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	3	5,82	3	4,82	3	4,04
DOC7Q6_ACIBA	30S ribosomal protein S1	C	3	1,39	3	1,92	2	1,80
DOC7T1_ACIBA	LPS assembly protein LptD	M	3	0,68	2	0,90	1	0,45
DOC7T3_ACIBA	Fructose biphosphate aldolase class II Calvin cycle subtype	C	2	2,17	3	2,78	3	2,54
DOC825_ACIBA	Protein PII uridylyltransferase	C	0	0,00	2	0,66	0	0,00
DOC836_ACIBA	Serine acetyltransferase	C	0	0,00	2	0,52	0	0,00
DOC8B1_ACIBA	2 hydroxycyclohexanecarboxyl CoA dehydrogenase	M	3	1,10	1	1,09	0	0,00

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0C8B2_ACIBA	Catalase HP11 Hydroxyperoxidase II	M	3	57,44	3	45,04	3	47,84
D0C8D0_ACIBA	Urea carboxylase	C	2	0,54	2	0,49	0	0,00
D0C8D3_ACIBA	Pyruvate ferredoxin flavodoxin oxidoreductase	I	2	0,93	1	0,39	0	0,00
D0C8P3_ACIBA	Type VI secretion system effector	M	1	2,27	0	0	0	0
D0C8R0_ACIBA	Formaldehyde dehydrogenase glutathione independent	C	0	0,00	2	1,47	1	1,06
D0C8R9_ACIBA	Acetyl CoA carboxylase biotin carboxylase	C	2	0,85	0	0,00	1	0,61
D0C8U9_ACIBA	Universal stress protein family	C	3	2,99	3	2,82	3	2,79
D0C8V3_ACIBA	Secretion ABC efflux system	M	0	0,00	2	0,36	1	0,75
D0C8Y6_ACIBA	Isocitrate lyase	C	1	0,42	2	0,51	0	0,00
D0C8Y7_ACIBA	Lipoprotein	M	3	33,04	3	24,26	3	25,81
D0C907_ACIBA	Heat shock protein Fragment	M	3	8,13	3	7,25	3	7,38
D0C912_ACIBA	Autotransporter adhesin	M	1	2,06	2	1,91	2	1,36
D0C9C1_ACIBA	Methionine synthase II	C	0	0,00	2	1,80	1	2,71
D0C9D3_ACIBA	Ribonucleoside diphosphate reductase subunit beta	M	1	0,84	2	1,30	2	1,66
D0C9D5_ACIBA	Ribonucleoside diphosphate reductase	C	3	3,79	3	7,22	3	7,11
D0C9D6_ACIBA	Phosphate regulon transcriptional regulatory protein PhoB	C	2	1,44	3	2,50	3	2,52
D0C9E0_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit A	M	3	2,52	3	2,87	2	2,02
D0C9E2_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit C D	M	3	1,72	3	1,42	2	1,10
D0C9E5_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase	M	2	0,73	3	1,08	2	0,96
D0C9E7_ACIBA	NADH quinone oxidoreductase subunit I	M	2	1,67	2	2,00	2	2,10
D0C9F9_ACIBA	Small-conductance mechanosensitive channel	M	3	12,34	3	8,35	2	12,99
D0C9G3_ACIBA	Secretion protein HlyD	M	2	0,31	0	0,00	0	0,00
D0C9G9_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	2	5,63	3	6,57	3	11,33
D0C9J0_ACIBA	Bacterioferritin	M	3	3,69	1	0,73	1	ND
D0C9K6_ACIBA	Malonyl CoA acyl carrier protein transacylase	C	0	0,00	2	0,98	0	0,00
D0C9K9_ACIBA	LysM domain containing protein	M	3	5,03	2	5,24	2	ND
D0C9P5_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	5,70	3	4,45	3	5,62
D0C9P6_ACIBA	30S ribosomal protein S12	C	0	0,00	3	2,71	0	0,00
D0C9P7_ACIBA	30S ribosomal protein S7	C	1	3,32	3	3,39	3	3,13
D0C9P8_ACIBA	Elongation factor G	C	3	1,34	3	2,68	3	3,72
D0C9P9_ACIBA	Predicted protein	C	1	ND	3	8,03	2	14,79
D0C9R1_ACIBA	Site determining protein	M	3	1,90	3	4,49	3	4,77
D0C9R5_ACIBA	OmpA family protein	M	3	48,90	3	39,62	3	44,86
D0C9S5_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamE	M	3	2,07	2	2,47	0	0,00
D0C9Z6_ACIBA	Probable malate quinone oxidoreductase	M	2	0,79	1	0,71	1	0,44
D0CA76_ACIBA	50S ribosomal protein L20	C	0	0,00	1	2,92	2	2,80
D0CA83_ACIBA	Threonine tRNA ligase	C	0	0,00	1	1,33	2	1,12
D0CAB6_ACIBA	Aconitate hydratase 1	C	3	2,30	3	2,63	2	2,75
D0CAB8_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	3	2,56	3	1,45	1	2,64
D0CAC5_ACIBA	Ketol acid reductoisomerase	C	2	1,59	3	2,16	3	1,56
D0CAD0_ACIBA	LPS-assembly lipoprotein LptE	M	3	1,73	2	1,71	1	2,40
D0CAD5_ACIBA	Enoyl acyl carrier protein reductase NADH	C	1	1,49	2	0,96	0	0,00
D0CAD9_ACIBA	Rhodanese domain containing protein	M	3	1,96	3	1,45	0	0,00

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
DOCAE4_ACIBA	Outer membrane protein assembly factor BamB	M	3	2,00	3	1,77	2	1,74
DOCAE5_ACIBA	UPF0070 protein	M	2	0,97	1	0,95	0	0,00
DOCAF1_ACIBA	Nucleoside diphosphate kinase	C	0	0,00	3	1,65	1	1,66
DOCAG7_ACIBA	Fumarate hydratase class I	C	0	0,00	3	1,38	0	0,00
DOCAH2_ACIBA	Trigger factor	C	0	0,00	2	0,61	0	0,00
DOCAR1_ACIBA	Ribonuclease E	C	3	2,93	3	1,60	3	2,54
DOCAT3_ACIBA	Electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase	M	0	0,00	2	0,70	1	0,93
DOCAU8_ACIBA	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	C	1	0,83	3	1,36	1	2,44
DOCAV4_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	2	6,32	3	7,62	1	4,16
DOCAX2_ACIBA	Transcription termination factor NusA	C	0	0,00	1	1,06	2	0,52
DOCAZ9_ACIBA	Fatty acid oxidation complex subunit alpha	C	3	2,09	3	2,47	2	2,72
DOCB00_ACIBA	3 ketoacyl CoA thiolase	C	2	0,80	3	2,58	2	1,37
DOCB16_ACIBA	DNA directed RNA polymerase	C	3	3,37	3	3,20	3	2,89
DOCB17_ACIBA	DNA directed RNA polymerase subunit beta	C	3	1,34	3	1,40	2	1,41
DOCB18_ACIBA	50S ribosomal protein L7 L12	C	3	4,20	3	5,42	3	5,14
DOCB19_ACIBA	50S ribosomal protein L10	C	1	0,98	2	1,65	0	0,00
DOCB20_ACIBA	50S ribosomal protein L1	C	2	1,66	3	1,48	1	1,26
DOCB21_ACIBA	50S ribosomal protein L11	C	3	1,69	2	2,60	2	1,75
DOCB57_ACIBA	Thiol disulfide interchange protein	M	2	1,58	1	0,99	0	0,00
DOCB58_ACIBA	Homoserine dehydrogenase	C	3	1,03	1	0,80	1	0,86
DOCB85_ACIBA	Porin D	M	2	0,78	3	1,01	1	1,05
DOCB89_ACIBA	Dicarboxylate CoA ligase PimA	M	1	1,20	2	0,85	1	0,91
DOCB87_ACIBA	Carbamoyl phosphate synthase large chain	M	0	0,00	2	0,90	2	1,10
DOCB89_ACIBA	Putative uncharacterized protein	C	2	1,33	2	1,05	2	1,41
DOCBC3_ACIBA	ATP dependent zinc metalloprotease FtsH	M	3	2,11	3	2,34	2	1,67
DOCBD0_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	2	1,47	1	1,57	1	1,66
DOCBD4_ACIBA	Phosphoenolpyruvate carboxykinase GTP	C	0	0,00	2	1,12	2	1,45
DOCBD9_ACIBA	60 kDa chaperonin	C	3	3,89	3	4,07	3	4,16
DOCBE3_ACIBA	Protease HtpX	M	1	1,54	1	0,65	3	0,88
DOCBH7_ACIBA	Electron transfer flavoprotein subunit beta	M	2	2,69	2	1,95	0	0,00
DOCBH8_ACIBA	Electron transfer flavoprotein subunit alpha	M	2	1,80	3	1,37	1	2,12
DOCBK1_ACIBA	Phosphoribosylformylglycinamide cyclo ligase	C	0	0,00	1	0,58	2	0,61
DOCBL2_ACIBA	Peptidoglycan associated lipoprotein	M	3	3,77	3	3,43	3	2,93
DOCBM2_ACIBA	Phosphoribosylformylglycinamide synthase	C	3	1,70	3	1,49	1	1,59
DOCBN6_ACIBA	Carbapenem associated resistance protein	M	3	34,91	3	33,29	3	37,14
DOCBQ1_ACIBA	Signal peptidase I	M	2	1,98	0	0,00	0	0,00
DOCBS0_ACIBA	Outer membrane lipoprotein blc	M	3	4,06	3	2,91	3	3,82
DOCBS2_ACIBA	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase type I	C	2	0,50	3	1,39	0	0,00
DOCBS5_ACIBA	GTPase obg	C	1	0,47	2	0,69	1	1,33
DOCBT2_ACIBA	Putative uncharacterized protein	C	2	0,78	3	0,80	0	0,00
DOCBT5_ACIBA	Putative uncharacterized protein	M	3	2,16	2	1,17	1	1,45
DOCBU4_ACIBA	Monomeric isocitrate dehydrogenase	C	0	0,00	3	0,92	1	0,94
DOCBV7_ACIBA	Membrane protein	M	2	1,92	1	1,31	0	0,00

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0CBW6_ACIBA	Linoleoyl CoA desaturase Delta 6 desaturase	C	3	6,46	3	5,48	3	7,19
D0CBX0_ACIBA	Diaminobutyrate 2 oxoglutarate aminotransferase	C	1	0,76	3	1,06	2	1,21
D0C8Y8_ACIBA	Penicillin binding protein 6	C	3	3,72	3	2,98	3	3,12
D0CC50_ACIBA	Glutamine synthetase	C	3	6,66	3	5,21	3	6,29
D0CC56_ACIBA	Superoxide dismutase	M	3	10,06	3	7,31	3	10,68
D0CC58_ACIBA	Periplasmic serine peptidase DegS	M	3	1,84	3	1,15	3	1,46
D0CC60_ACIBA	Malic enzyme	C	0	0,00	3	0,82	1	1,37
D0CC67_ACIBA	Acyl coenzyme A dehydrogenase ACDH	C	3	1,74	3	1,34	2	1,60
D0CC74_ACIBA	30S ribosomal protein S2	C	3	6,43	3	5,11	3	5,69
D0CC75_ACIBA	Elongation factor Ts	C	2	1,01	3	1,59	2	1,22
D0CCK5_ACIBA	Transcriptional regulatory protein OmpR	C	1	1,49	1	2,10	1	3,10
D0CCK6_ACIBA	Transcriptional accessory protein	C	1	2,96	3	1,43	1	3,39
D0CCK8_ACIBA	2 hydroxycyclohexanecarboxyl CoA dehydrogenase	C	3	3,12	3	3,23	3	3,06
D0CCLO_ACIBA	ABC transporter ATPase	M	0	0,00	3	0,88	2	0,87
D0CCP5_ACIBA	LemA family protein	M	3	12,77	3	9,77	3	10,55
D0CCQ1_ACIBA	Bacterioferritin	C	3	5,30	3	2,21	2	4,87
D0CCT4_ACIBA	Superoxide dismutase Cu Zn	M	3	21,67	3	7,39	3	7,31
D0CCU3_ACIBA	Glutamate dehydrogenase	C	3	1,72	3	2,55	3	2,41
D0CCW5_ACIBA	Acyl CoA dehydrogenase domain containing protein	C	0	0,00	2	0,50	0	0,00
D0CCX6_ACIBA	Toluene tolerance efflux transporter	M	2	2,05	3	1,43	1	1,65
D0CCX7_ACIBA	Toluene tolerance protein Ttg2D	M	2	1,00	1	0,76	1	9,78
D0CCY6_ACIBA	Glycerol 3 phosphate acyltransferase	M	0	0,00	2	1,19	0	0,00
D0CCZ6_ACIBA	30S ribosomal protein S10	C	2	2,18	3	3,25	3	2,56
D0CCZ7_ACIBA	50S ribosomal protein L3	C	1	0,99	3	2,84	0	0,00
D0CCZ8_ACIBA	50S ribosomal protein L4	C	1	2,33	3	2,76	2	2,49
D0CD00_ACIBA	50S ribosomal protein L2	C	3	9,18	3	10,07	3	13,73
D0CD02_ACIBA	50S ribosomal protein L22	C	1	1,72	2	2,63	1	4,32
D0CD03_ACIBA	30S ribosomal protein S3	C	3	6,69	3	6,93	3	6,51
D0CD04_ACIBA	50S ribosomal protein L16	C	3	5,90	3	4,60	3	4,62
D0CD07_ACIBA	50S ribosomal protein L14	C	3	2,32	3	3,13	3	3,02
D0CD09_ACIBA	50S ribosomal protein L5	C	3	2,04	3	2,86	2	3,92
D0CD12_ACIBA	50S ribosomal protein L6	C	1	1,50	3	1,77	1	1,64
D0CD13_ACIBA	50S ribosomal protein L18	C	0	0,00	2	1,89	1	1,72
D0CD14_ACIBA	30S ribosomal protein S5	C	3	2,60	3	3,21	3	2,59
D0CD16_ACIBA	50S ribosomal protein L15	C	1	1,85	3	1,91	2	1,69
D0CD19_ACIBA	30S ribosomal protein S13	C	3	5,46	3	4,77	3	5,50
D0CD20_ACIBA	30S ribosomal protein S11	C	2	2,28	1	2,35	2	2,13
D0CD21_ACIBA	30S ribosomal protein S4	C	3	3,49	3	3,27	3	4,11
D0CD22_ACIBA	DNA directed RNA polymerase subunit alpha	C	1	0,50	2	0,83	1	0,72
D0CD23_ACIBA	50S ribosomal protein L17	C	1	1,08	3	1,45	2	1,26
D0CD34_ACIBA	Ribonuclease R	C	3	1,06	1	0,58	0	0,00
D0CD53_ACIBA	Malate dehydrogenase	C	3	13,69	3	28,54	3	13,66
D0CD78_ACIBA	Protein translocase subunit SecD	M	2	1,09	3	1,36	3	1,13
D0CD79_ACIBA	Preprotein translocase subunit	M	3	5,27	3	2,94	3	2,01

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
DOFDA7_ACIBA	Acyl CoA dehydrogenase domain containing protein	C	0	0,00	3	0,54	1	0,85
DOFDA8_ACIBA	Acyl CoA dehydrogenase	C	1	0,88	3	0,69	1	0,68
DOFDE3_ACIBA	Carbohydrate-selective porin, OprB family	M	1	ND	2	1,17	2	2,14
DOFDF2_ACIBA	Outer membrane protein omp38	M	3	198,9	3	157,8	3	197,7
DOFDF8_ACIBA	GTP binding protein TypA BipA	C	0	0,00	1	1,34	2	1,17
DOFDF9_ACIBA	Large conductance mechanosensitive channel	M	3	9,45	3	6,26	3	7,57
DOFCK8_ACIBA	Rod shape determining protein MreB	C	3	3,33	3	2,20	2	2,29
DOFCL7_ACIBA	Outer membrane transporter	M	3	1,80	2	1,49	1	1,71
DOFCDN5_ACIBA	Tat pathway signal sequence domain protein	M	3	2,99	3	3,10	2	3,40
DOFCDQ0_ACIBA	Outer membrane protein OprM	M	3	2,56	3	1,45	2	1,15
DOFCDQ1_ACIBA	Inner membrane multidrug efflux protein BpeB	M	3	1,11	3	0,95	1	1,16
DOFCDQ2_ACIBA	Acriflavine resistance protein A	M	3	1,61	3	1,68	1	1,52
DOFCDQ6_ACIBA	50S ribosomal protein L21	C	3	2,84	3	2,34	2	2,86
DOFCD6_ACIBA	Citrate synthase	C	3	4,27	3	4,19	3	4,07
DOFCD9_ACIBA	Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit	M	3	1,97	3	1,38	2	1,33
DOFCDT0_ACIBA	Succinate dehydrogenase fumarate reductase	M	3	2,69	3	2,15	3	2,24
DOFCDT2_ACIBA	Oxoglutarate dehydrogenase Succinyl transferring E1 component	C	3	0,92	3	1,24	2	1,49
DOFCDT3_ACIBA	2 oxoglutarate dehydrogenase E2 component dihydrolipoamide succinyltransferase	C	3	2,39	3	2,30	2	2,23
DOFCDT5_ACIBA	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit beta	C	3	3,73	3	4,26	3	4,70
DOFCDT6_ACIBA	Succinyl CoA ligase ADP forming subunit alpha	C	2	1,46	3	2,82	3	2,68
DOFCDX7_ACIBA	Periplasmic or secreted lipoprotein	M	1	1,70	3	1,89	0	0,00
DOFCE28_ACIBA	NLPA lipoprotein	M	3	5,01	3	3,35	3	5,48
DOFCEG3_ACIBA	Adenylosuccinate synthetase	C	0	0,00	1	1,38	2	1,54
DOFCEG5_ACIBA	Peptidase family M48 family protein	M	3	2,20	2	2,49	2	2,27
DOFCEH1_ACIBA	ATP dependent chaperone ClpB	C	3	0,83	3	1,02	3	1,32
DOFCEH8_ACIBA	OmpA family protein	M	3	3,99	3	3,11	3	2,62
DOFCEK4_ACIBA	ATP synthase subunit beta	M	3	5,59	3	5,71	3	5,29
DOFCEK5_ACIBA	ATP synthase gamma chain	M	0	0,00	2	0,91	0	0,00
DOFCEK6_ACIBA	ATP synthase subunit alpha	M	3	5,51	3	4,54	3	5,10
DOFCEK8_ACIBA	ATP synthase subunit b	M	3	9,68	3	7,33	3	9,07
DOFCEK9_ACIBA	ATP synthase F0 C subunit	M	3	8,80	3	7,46	3	9,24
DOFCEL9_ACIBA	Arginine tRNA ligase	C	2	2,48	2	1,36	1	0,90
DOFCEM0_ACIBA	Cell division protein	M	3	ND	2	ND	0	0,00
DOFCEQ9_ACIBA	D amino acid dehydrogenase small subunit	C	2	1,77	1	0,71	1	1,77
DOFCEW0_ACIBA	Protein tyrosine kinase fragment	M	2	2,76	3	2,01	2	2,52
DOCF50_ACIBA	Porin	M	3	6,07	3	5,75	3	6,82
DOCF71_ACIBA	Outer membrane protein	M	3	8,27	3	8,16	3	7,88
DOCF73_ACIBA	UvrABC system protein A	C	1	0,49	3	0,70	1	0,68
DOCF93_ACIBA	Phosphoenolpyruvate carboxylase	C	1	1,01	3	1,00	0	0,00
DOCFE8_ACIBA	Glutamine fructose 6 phosphate aminotransferase isomerizing	C	2	1,51	3	1,58	2	2,09
DOCFF3_ACIBA	6 7 dimethyl 8 ribityllumazine synthase	C	1	1,28	2	1,43	0	0,00
DOCFF8_ACIBA	Putative uncharacterized protein	I	1	19,84	3	5,91	2	5,85
DOCFJ2_ACIBA	Ribosomal subunit interface protein	C	0	0,00	1	4,22	2	3,28

Información proteínas identificadas			Nº réplicas y concentración normalizada					
Acceso Uniprot	Descripción de la proteína	Localización celular	P0		P1		P2	
			R	C	R	C	R	C
D0CFLO_ACIBA	Cell division protein FtsZ	C	2	1,03	3	2,32	3	2,56
D0CFL9_ACIBA	Lipopolysaccharide ABC transporter	M	0	0,00	2	0,57	1	0,98
D0CFW7_ACIBA	Alkyl hydroperoxide reductase subunit C	C	3	3,49	3	3,67	3	3,93
D0CFX9_ACIBA	Chaperone protein DnaK	C	3	2,95	3	4,00	3	4,29
D0CG03_ACIBA	Membrane protein insertase YidC	M	1	2,51	2	1,02	0	0,00
D0CG36_ACIBA	30S ribosomal protein S9	C	3	5,09	3	6,07	3	6,46
D0CG85_ACIBA	Elongation factor Tu Fragment	C	3	16,76	3	26,19	3	26,55

The long-term survival of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T under nutrient-deprived conditions does not require the entry into the viable but non-culturable state

Z. Bravo¹ · M. Orruño² · C. Parada¹ · V. R. Kaberdin^{1,3} · I. Barcina¹ · I. Arana¹

Received: 16 October 2015 / Revised: 26 January 2016 / Accepted: 29 January 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract *Acinetobacter baumannii* possesses a tremendous potential to thrive under hostile conditions. To learn more about its survival strategy and capacity to persist in the environment, we studied the effect of temperature, nutrient deprivation and dryness on the long-term survival of two *A. baumannii* strains (ATCC 19606^T and a clinical isolate). Our results revealed that both strains show a great persistence under stress that appears to involve a bust-and-boom strategy. Bacterial survival was differentially affected by temperature and physical environment: Desiccation favored cell resistance to stress at 20 and 37 °C, while survival in aqueous environments was temperature dependent and led to changes in several cellular characteristics. In addition, we tested the ability of the *A. baumannii* ATCC 19606^T strain to form biofilms by monitoring the expression of adhesion-/biofilm-related genes (*ompA*, *bfmR* and *csuAB*). The observed downregulation of these genes suggests that the potential difficulties to adhere to solid surfaces and form biofilms likely limit the capacity of starved cells to spread and colonize abiotic surfaces.

Keywords *Acinetobacter baumannii* · Persistence · Survival strategy · Temperature · Dryness

Introduction

Microorganisms in the environment are often exposed to adverse physicochemical conditions. To increase their capacity of persistence and survival in hostile environments, bacteria can trigger a number of adaptation mechanisms. Rittershaus et al. (2013) highlighted three major strategies enabling to cope with the growth-limiting stress: bust-and-boom, cellular quiescence and true dormancy (sporulation). This last strategy can be neglected for non-spore-forming bacteria.

In the bust-and-boom model, most cells die upon starvation, and the few survivors subsist at the expense of the dead cells. These remaining cells have been defined as persisters (Zhang 2014). In the second model, cellular quiescence/dormancy or acquisition of viable but non-culturable (VBNC) state represents a common strategy enabling many non-differentiating bacteria to survive under various adverse conditions (Roszak and Colwell 1987; Barcina and Arana 2009; Oliver 2010). The entry into the VBNC state suggests that cells are unable to grow on the media that are normally used to culture them, although they retain metabolic activity and can possibly act as pathogens (Karunasagar and Karunasagar 2005), thus representing a hidden risk to public health. Moreover, since the VBNC response can occur simultaneously with the bust-and-boom strategy, Arana et al. (2007) suggested that VBNC cells could serve as a source of nutrients to sustain the survival of the persisting culturable cells until environmental conditions improve.

Over the last decade, *Acinetobacter baumannii* has emerged as an important nosocomial pathogen that has

Communicated by Erko Stackebrandt.

✉ I. Arana
ines.arana@ehu.es

¹ Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Science and Technology, University of Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Spain

² Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Basque Country (UPV/EHU), Vitoria-Gasteiz, Spain

³ IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

become endemic in some hospitals, causing serious opportunistic infections (Towner 2009; Lambiase et al. 2012; Roca et al. 2012). Hospital outbreaks of *A. baumannii* have been frequently reported worldwide from many medical, surgical and neonatal intensive care and burn units (Diancourt et al. 2010; Roca et al. 2012). Moreover, the emergence and rapid spread of multidrug-resistant isolates becomes a great concern because very few therapeutic options remain effective against them (Kempf et al. 2012; Eveillard et al. 2013).

Due to its clinical significance, during the last years several studies have contributed to understanding the pathogenesis of this organism. Although it is evident that this opportunistic pathogen has developed several mechanisms that control its persistence and spread, very little is known about the survival strategies that could explain the high persistence of this pathogen in adverse environments. Gayoso et al. (2014) have suggested that the bust-and-boom model could explain the recurrent outbreaks of *A. baumannii* found in intensive care units; however, the viability of non-culturable cells was not examined to assess the possible involvement of the VBNC state.

On the other hand, the environmental survival of *A. baumannii* has been suggested to involve its ability to colonize biotic and abiotic surfaces (Espinal et al. 2012). Among the biofilm-related virulence determinants, the *pilus* usher-chaperone assembly system (encoded by the *csuAB–A–B–C–D–E* gene cluster) and the outer membrane protein OmpA appear to play the major role. The expression of the *csuAB–A–B–C–D–E* gene cluster is controlled by a two-component regulatory system comprising the sensor kinase BfmS and the response regulator BfmR encoded by the *bfmRS* operon (Tomaras et al. 2008; Gaddy and Actis 2009). Inactivation of *bfmR* results in a loss of expression of the *csuAB* operon and the subsequent inhibition of both *pili* production and biofilm formation on abiotic surfaces (Tomaras et al. 2008). OmpA is essential for attachment to biotic and abiotic surfaces and biofilm formation (Choi et al. 2008; Lee et al. 2008).

Study and characterization of the changes occurring during the long-term starvation process can contribute to a better understanding of *A. baumannii* survival in the environment and its persistence strategies, which could provide key information for its control. The aim of this study was to examine the effect of temperature and nutrient-deprived environments on *A. baumannii* ATCC 19606^T (model strain) and on a clinical isolate to assess how environmental conditions affect *A. baumannii* survival and persistence. Moreover, we also analyzed how these stressful conditions affect the expression of genes (*ompA*, *bfmR* and *csuAB*) implicated in adhesion and biofilm formation and known to play essential roles in colonization of abiotic environments.

Materials and methods

Acinetobacter baumannii strain and inocula preparation

Two *Acinetobacter baumannii* strains were used in this study: American Type Culture Collection (ATCC) strain 19606^T and a clinical isolate of *A. baumannii*, strain 06-2790, obtained from a skin ulcer of a patient at the Hospital Universitario Marqués de Valdecilla (Prof. J Ramos-Vivas, Santander, Spain). Both strains were separately grown overnight at 37 °C in Mueller–Hinton (MH) broth. Cells were transferred to fresh MH broth and grown at 37 °C with shaking (120 rpm) to stationary phase. Cells were collected by centrifugation (4500 g for 15 min) and washed three times with sterile saline solution (0.9 % w/v NaCl). Finally, the pellets were suspended in sterile saline solution.

Survival assays

Acinetobacter baumannii cells from stationary phase were incubated under nutrient deprivation at 20 or 37 °C in liquid or solid environments. Starvation was implemented by incubating cells in sterile saline solution or on cellulose acetate filters (Whatman, GE Healthcare Life Sciences) sterilized by a 20-min exposure to UV-C (approximately 253.7 nm; 70 mW/cm²).

For survival assays in the aqueous environment, experiments were carried out in Erlenmeyer flasks containing 300 ml of sterile saline solution inoculated to reach a density of 10⁸ cells/ml. To avoid organic residues, the glass flasks were first cleaned with acid, rinsed with deionized water and kept at 250 °C for 24 h.

For survival assays on solid surfaces, cellulose acetate filters were inoculated with *A. baumannii* by filtering cellular suspensions (described above) to a density of approximately 10⁸ cells/cm². The filters were incubated in sterile Petri dishes at 20 or 37 °C. Ambient humidity inside of Petri dishes was measured with a Fisher Scientific™ Traceable™ Digital Hygrometer/Thermometer (Fisher Scientific) and maintained at a relatively low level (21–27 %) at 20 and 37 °C. For each strain, the samples for subsequent analyses consisted of three randomly chosen filters that were individually placed in 10 ml of sterile saline solution and vigorously shaken for 2 min.

For the survival assays from both liquid and solid environments, subsamples were periodically collected to enumerate total, viable and culturable bacteria and analyzed directly their ability to adhere. Moreover, for *A. baumannii* ATCC 19606^T, the expression of *ompA*, *bfmR* and *csuAB* genes by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) was analyzed.

Bacterial counts

The total bacterial count (TBC) was determined by means of the standard acridine orange staining as described by (Hobbie et al. 1977). Viable bacteria were estimated as bacteria with intact cytoplasmic membranes (MEMB+). These MEMB+ bacteria were counted with the Live/Dead BacLight™ kit (Invitrogen Life Technologies) (Joux et al. 1997). Culturability, expressed as colony-forming units (CFUs), was determined by spreading aliquots of *A. baumannii* cells on Mueller–Hinton agar followed by incubation at 37 °C for 24 h.

Scanning electron microscopy (SEM)

A. baumannii ATCC 19606^T cells, periodically collected from survival assays in aqueous environments, were fixed with 2 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4). The suspensions of the fixed cells were filtered through 0.22- μ m-pore-size membrane filters (GTTP02500 filters, Merck Millipore). The filters and the attached *A. baumannii* cells were further dehydrated by applying a series of increasing ethanol concentrations (30, 50, 70, 90 and 100 %). The filters were then overlaid with 1 ml of hexamethyldisilazane, incubated for 5 min and air-dried. Finally, the samples were coated with gold, and imaging was carried out by analyzing samples in a Hitachi S4800 scanning electron microscope.

Quantification of cell adherence to solid surfaces

To assess cell adherence, we employed the microtiter dish assay (O'Toole and Kolter 1998) with some modifications. Aliquots of cell suspensions (1 ml each), periodically collected from survival experiments, were added into the wells of sterile 24-well polystyrene plates (Corning Inc.) and incubated for 48 h at 37 °C without shaking. Sterile saline solution was used as a negative control. After incubation, plates were washed three times with sterile water and stained with 200 μ l of 0.5 % (w/v) crystal violet solution. Then, plates were newly washed with sterile water (three times), and the dye bound to the attached cells was solubilized in 0.5 ml of 95 % ethanol. The optical density (OD) of each well was measured at 595 nm using an automated Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc., Vermont). During the survival experiments, cells were classified according to Stepanović et al. (2000). The cutoff OD (OD_c) was defined as a value equal to three standard deviations above the mean OD of the negative control, and the following categories were established: $OD \leq OD_c$, non-adherent; $OD_c < OD \leq (2 \times OD_c)$, weakly adherent; $(2 \times OD_c) < OD \leq (4 \times OD_c)$,

moderately adherent; and $(4 \times OD_c) < OD$, strongly adherent cells.

Along the survival experiments, the variation in the ability to adhere was expressed with an arbitrary value, OD decline values which were calculated by subtracting the respective initial OD from those obtained in each survival period.

Statistical data analysis

Statistical tests were carried out with the Stat View program (Abacus Concept, Inc.). All of the results presented are means of at least three experiments, and the coefficients of variation between replicate experiments were less than 12 %. The differences between the means were detected by a one-way analysis of variances. Probabilities less than or equal to 0.05 were considered significant. Logarithmic transformation for bacterial counts was used.

RNA preparation and reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) analysis

Samples of cells collected from the survival experiments of *A. baumannii* ATCC 19606^T (aqueous and dry conditions) were mixed with stop solution (5 % phenol in ethanol) at a ratio of 8:1 and incubated on ice for 15–20 min, and the cells were collected by centrifugation (15 min, 4 °C, 4400 g). The pelleted cells were used to isolate total RNA using the Trizol® Max™ Bacterial RNA Isolation Kit (Ambion). Each RNA sample was further purified using the PureLink® RNA Mini Kit (Ambion) and treated with DNase I (Invitrogen). RNA samples were subjected to RT-qPCR at the General Genomic Service (SGIker) of the University of Basque Country (Spain). Namely, after verifying RNA quality and integrity by Lab-chip technology on an Agilent 2100 Bioanalyzer with Agilent RNA 6000 Nano Chips, RNA was used for cDNA synthesis using Affinity-Script Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies).

The expression of three different genes related to adhesion or biofilm formation (*ompA*, *bfmR* and *csuAB*) was analyzed by RT-qPCR. Specific primer pairs were designed using PrimerQuest tool available at IDT Integrated DNA Technologies, using universal primer design parameters for qPCR. Primer secondary structure analysis (hairpin and primer dimer formation analysis) was verified with Oligo-Analyzer tool, from IDT Integrated DNA Technologies, and primer specificity was checked using BLAST (NCBI). Specific primer pairs were designed for four candidate reference genes potentially suitable for normalization purposes: *gltA*, *gyrB*, *cpn60* and *gdhB* (Bartual et al. 2005; Hamouda et al. 2010). The target and candidate reference

Table 1 Primers used in this study

Gene	Forward primer (5'–3')	Reverse primer (5'–3')
<i>ompA</i>	GCTTCTCGTTTGTCTACTCAAGG	GCGAATACACGACGGTTCATAG
<i>bfmR</i>	GTTCGCCACACTATCATCAA	TAATCGTCTGCACCCATTTCC
<i>csuA/B</i>	ACTGCTTCTGCTGATGTAGTTG	GTAGTGAAGTGTGTGGTTGGT
<i>gltA</i>	GCGAGTTACCAACTGCTGAA	ACGACGGAAACCATTGAAGAA
<i>gyrB</i>	GCCGTTTACGTGAGCTTTCT	GCCGCCCTTCATAGTCATACAC
<i>cpn60</i>	GGTAAAGAAGGCGTAATCACTGTA	GGTAAAGAAGGCGTAATCACTGTA
<i>gdhB</i>	CCGACATATAGCAGACTTTGG	TACCTTCTGGACTAGCGATGAC

gene specific primers used for RT-qPCR are listed in Table 1.

The RT-qPCR was carried out using Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), and 10 ng of cDNA and 500 nM of primers were added per reaction. RT-qPCR experiments were performed in 384-well plates in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) to determine the relative changes in the level of three transcripts. The PCR amplification conditions were 3 min at 95 °C followed by 40 cycles of 95 °C for 5 s and 60 °C for 20 s. The specificity of the primer pairs was verified by melting curve analysis following the last amplification cycle. No-template controls and minus reverse transcriptase controls (samples in which no reverse transcriptase was added) were also included. Having found no reference candidate genes with low variability, the amount of cDNA, quantified fluorometrically by Qubit 2.0 (Invitrogen), was used for data normalization. All reactions were carried out in triplicate for three biological replicates.

RT-qPCR data analysis

The analysis of RT-qPCR results was carried out using the SDS 2.4 software (Applied Biosystems). The qPCR efficiency calculation and correction, and data normalization with respect to the amount of cDNA were done using GenEx version 5.4 software (MultiD). Then, the relative changes in mRNA expression levels were determined with respect to the initial amounts of cDNA obtained by RT, and the significance of differences was assessed using Student's *t* test ($p < 0.05$).

Results

The effects of temperature (20 or 37 °C) and desiccation on culturability, viability and integrity of *A. baumannii* under nutrient deprivation are summarized in Fig. 1. For both strains, the total bacterial count (TBC) did not change during permanence in aqueous environments (Fig. 1a, b, e, f) or on solid surfaces (Fig. 1c, d, g, h), suggesting that *A. baumannii* cells preserved their integrity throughout the

course of the experiment (at least 30 days). Moreover, culturability and viability also remained unchanged except for the populations incubated at 37 °C in saline solution (Fig. 1b, f). In this last case, the numbers of viable and culturable *A. baumannii* ATCC 19606^T cells decreased by 100-fold between 5 and 12 days of incubation (Fig. 1b) and *A. baumannii* clinical isolate 06-2790 by 15-fold during the same period (Fig. 1f). The concurrent loss of viability and culturability indicates that a fraction of population presented cellular membrane injured and the VBNC state was not induced under these conditions. For both strains, at the end of the experimental period, there were approximately 10⁵ viable and culturable cells/ml.

Scanning electron microscopy (SEM) analysis of *A. baumannii* ATCC 19606^T populations during survival experiments (Fig. 2) revealed some cells with altered cell morphology (distorted cells). These cells were only observed in populations maintained in saline solution at 37 °C for ten or more days (Fig. 2c).

To learn more about the putative survival strategies employed by *A. baumannii* during its persistence in saline solutions, we also estimated the ability of populations maintained in aqueous and dry environments to adhere to solid surfaces (Fig. 3a). We found that the *A. baumannii* ATCC 19606^T strain behaves as a moderately adherent strain (OD = 0.224 ± 0.048) and its ability to adhere to solid surfaces progressively decreased along the survival period in both environments, being also temperature dependent (Fig. 3a). In the experiments in saline solution, this ability diminished quickly resulting in the complete loss of adhesiveness after 5 days (data not shown). Under dry conditions, the adhesiveness was also reduced but the populations retained a weak capacity to adhere at least for 15 days (data not shown). *A. baumannii* clinical isolate 06-2790, a strongly adherent strain (OD = 0.529 ± 0.065), showed a similar behavior (Fig. 3b).

During the survival experiments, concentration of total RNA per cell varied with conditions (Table 2). In general, despite slight fluctuations, the amount of total RNA recovered per cell in *A. baumannii* ATCC 19606^T populations maintained on the dry surfaces was constant over time. In contrast, variations in the amount of RNA were more evident in planktonic cells, especially at 37 °C, where the

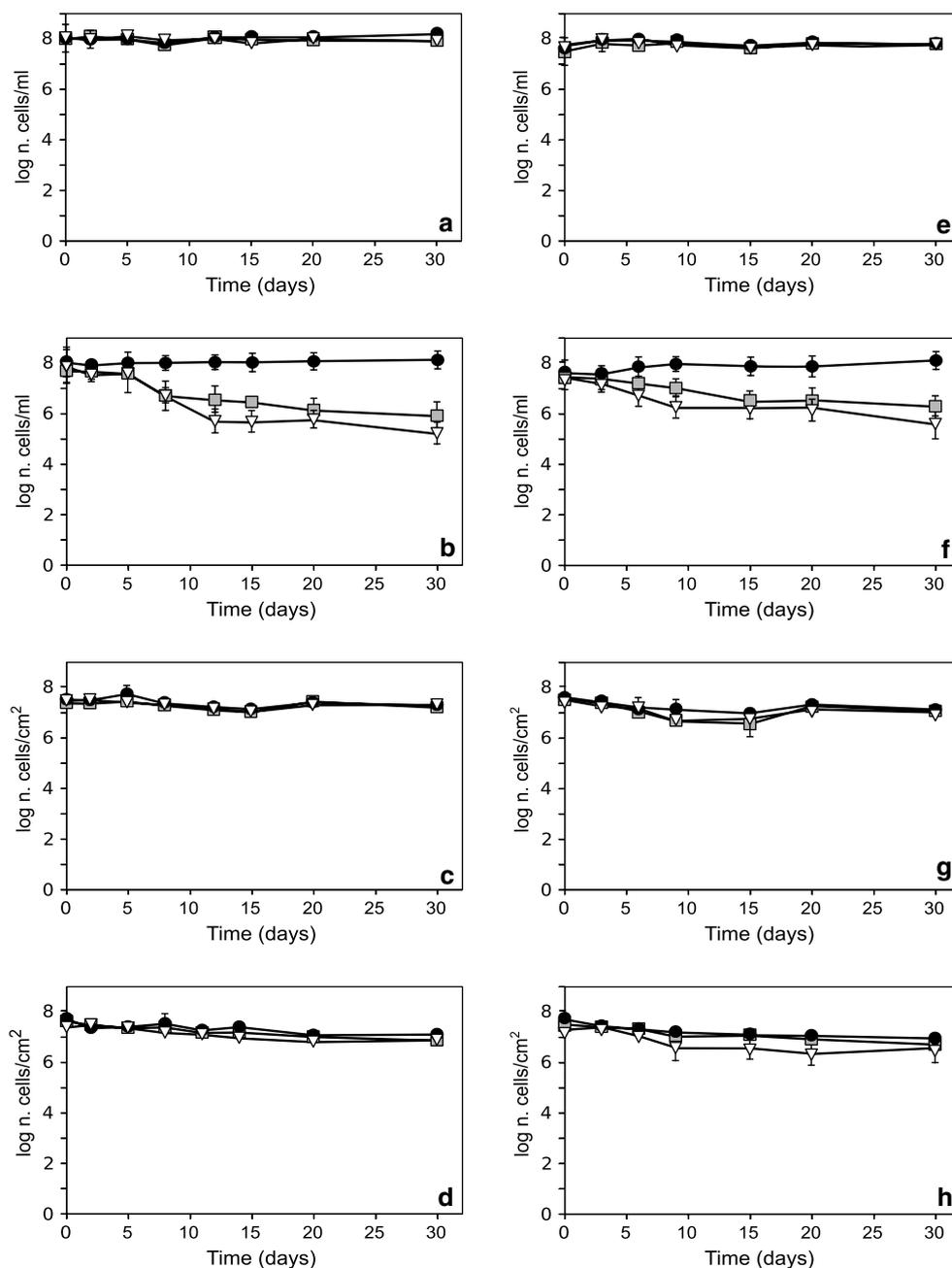


Fig. 1 Evolution of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T (a–d) and clinical isolate 06-2790 (e–h) populations maintained in aqueous environment at 20 °C (a, e) and 37 °C (b, f) and on dry surfaces at

20 °C (c, g) and 37 °C (d, h). Total (filled circle), viable (gray square) and culturable (inverted triangle) cells

quantity of RNA recovered at the end of the experiment (after 8 days) was only 6 % when compared to the amount isolated from the cells present at the beginning of the experiments (Table 2).

The effects of temperature and desiccation under nutrient deprivation on the expression of the *ompA*, *bfnR* and *csuAB* genes are shown in Fig. 4. Regardless of the experimental conditions, for *A. baumannii* model strain, the

expression of *ompA* and *bfnR* genes decreased progressively ($p \leq 0.05$) from the beginning of the experiments. After 8 days of experimentation, lower expression was detected in cells exposed to dry environments at 37 °C. Both *ompA* and *bfnR* genes were downregulated by over threefold with respect to the initial values. *csuAB* gene showed greater variability in expression depending on environment. In contrast to slight variations detected for

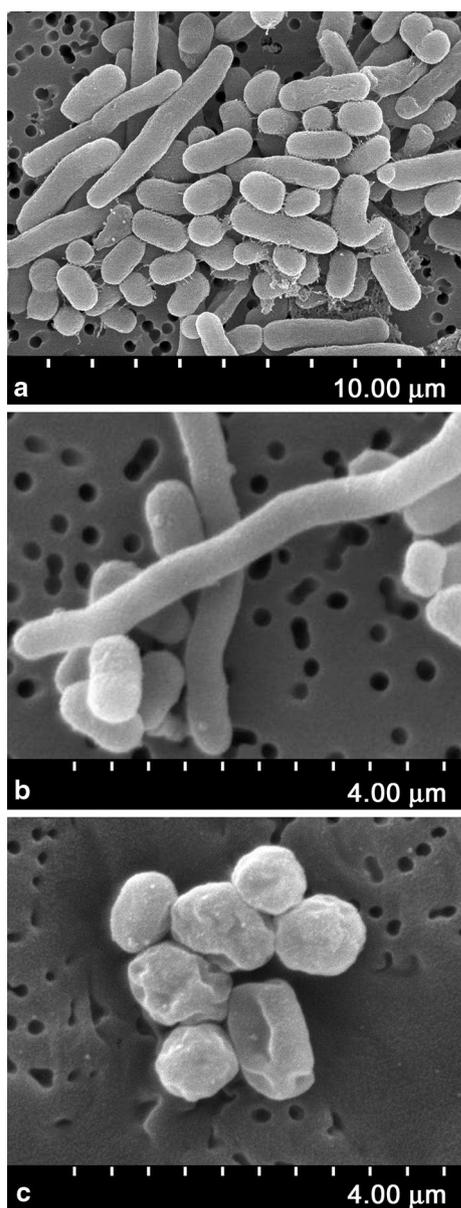


Fig. 2 Scanning electron microscopy (SEM) analysis of the morphology and integrity of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T cells maintained in saline solution (aqueous environment). Panel **a** shows cells sampled at the beginning of the experiments and panels **b** and **c** after more than 10 days of permanence at 20 °C and 37 °C, respectively

populations maintained in saline solution at 20 and 37 °C, the *csuAB* gene was readily downregulated when the populations were maintained on dry surfaces.

Discussion

In its habitats ranging from natural ecosystems to medical devices and clinical surfaces, *A. baumannii* is often

exposed to adverse conditions (nutrient deprivation, desiccation or non-optimal temperatures). To better characterize its ability to persist under stress (potentially facilitating infection outbreaks), we studied *A. baumannii* adaptation to starvation.

We found that its survival in liquid environments was clearly temperature dependent. Populations of *A. baumannii* ATCC 19606^T and clinical isolate 06-2790 both incubated at 37 °C displayed a loss of viability and culturability (Fig. 1b, f), resulting in a large fraction of non-culturable non-viable cells [i.e., cells showing altered cytoplasmic membrane permeability (Joux et al. 1997)] and the appearance of distorted cells (Fig. 2c). The loss of viability and physiological functions at 37 °C seems to correlate with a profound decrease in the amount of total RNA in the stressed cells (Table 2), thus indicating that this temperature can be detrimental under certain starvation conditions. As a result, only a small fraction (ca. 0.2 %) of the whole population remained culturable after 30 days. In contrast, no loss of culturability was observed when *A. baumannii* ATCC 19606^T was exposed to lower temperature (20 °C) at least for 30 days. The moderate decrease in the RNA content observed after 2 and 8 days could be associated with the overall decrease in the metabolism, thereby helping to save energy in favor of cell survival (Lever et al. 2015). Although there is no published work addressing the survival of *A. baumannii* in aqueous environments, several studies that were previously carried out on other mesophilic bacteria, including *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* (Arana et al. 2010), support our observation that lower temperatures could be beneficial for prolong persistence of mesophilic bacteria under starvation.

Unlike survival in saline solutions, experiments with *A. baumannii* cells retained on dry surfaces revealed that the resistance to stress and survival under such conditions was even better. In other words, the viability and culturability of *A. baumannii* population did not experience significant changes for at least one month, and total RNA content remained constant for 8 days regardless of the temperature. Although several works (Wendt et al. 1997; Jawad et al. 1998; Espinal et al. 2012; Gayoso et al. 2014) have highlighted that *A. baumannii* survives long time on dry surfaces, these studies generally associate the resistance to desiccation to the longtime presence of only some culturable surviving bacteria. In this sense, our results differ from those obtained by Gayoso et al. (2014) and Wendt et al. (1997), who described the negative effect of dry conditions. With reference to these reports, it is even more remarkable that, in this study, the bacteria on dry surfaces at 37 °C could survive longer (and with higher percentage of survivors) than their planktonic counterparts. Webster et al. (2000) observed that a local strain of *Acinetobacter* species could persist on common clinical surfaces for relatively

Fig. 3 Time-dependent changes in the ability of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T (a) and clinical isolate 06-2790 (b) populations maintained in aqueous environment (filled rectangle) and under dry conditions (open rectangle) to adhere to solid surfaces at 20 °C and 37 °C. Relative values were calculated with respect to the initial time (0 days)

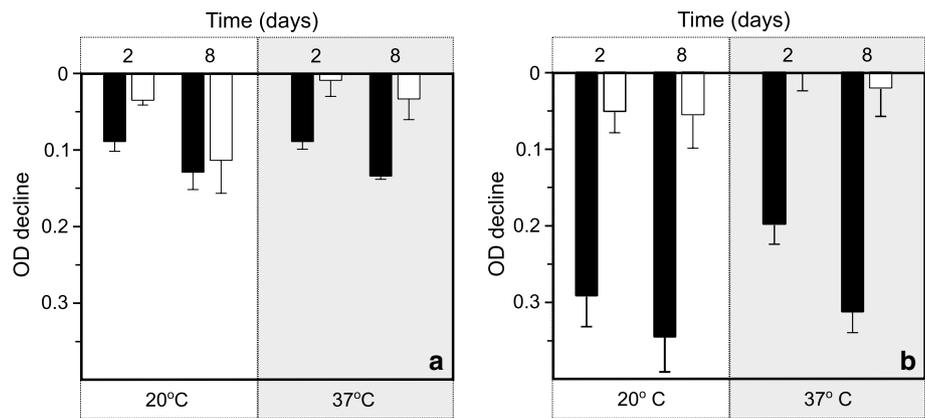


Table 2 Total RNA (\pm SD) content expressed as fg/cell and determined during starvation under aqueous and dry conditions at 20 and 37 °C

Starvation conditions	Time (days)			
	0	2	4	8
Aqueous conditions				
20 °C	42.01 \pm 2.30	74.56 \pm 6.09	23.93 \pm 1.35	35.05 \pm 5.18
37 °C	42.01 \pm 2.30	7.10 \pm 0.58	6.20 \pm 0.14	2.52 \pm 0.56
Dry conditions				
20 °C	50.12 \pm 5.39	69.20 \pm 3.75	32.66 \pm 13.34	57.89 \pm 4.37
37 °C	50.12 \pm 5.39	41.09 \pm 14.60	54.14 \pm 4.71	55.34 \pm 11.68

long periods, and this could partly explain that during the outbreaks the same *A. baumannii* strain(s) continues to be recovered from both patients and environment. This result is consistent with our data and those obtained in other studies like the one conducted by Houang et al. (1998). The latter described the persistence (without loss of culturability) of a clinical isolate of *A. baumannii* maintained over 30 days at 22–24 °C under desiccation.

Different strategies have been envisaged to explain the mechanisms that allow bacteria to face stress conditions. The acquisition of the VBNC phenotype by *Acinetobacter* has been demonstrated only for *A. calcoaceticus* in aquatic systems (Lemke and Leff 2006). Gayoso et al. (2014) indicated that *A. baumannii* strain AbH12O-A2 maintained under prolonged desiccation conditions becomes dormant, a definition that corresponds to the VBNC state (Rittershaus et al. 2013), and that a few surviving cells embedded in biofilm followed a bust-and-boom strategy. In our work, populations of *A. baumannii* starved at 37 °C in a liquid environment (the only condition we found to decrease culturability) did not enter the VBNC state. This indicates that transition to the dormant state was not the major strategy for cells to maintain viability under these conditions. In contrast, the bust-and-boom strategy is compatible with our results: The persistence and subsequent colonization of other environments would be facilitated by mechanisms that allow the survival of the most persistent cells at the expense of dying cells.

Several authors have demonstrated that biofilm formation is closely linked to stress responses (Hall-Stoodley et al. 2004; Landini 2009) as it can increase the capacity to withstand environmental challenges, including desiccation (Costerton et al. 1999; Espinal et al. 2012; Marks et al. 2014). We observed that the survivability of *A. baumannii* strains used in this study was clearly dependent on the cell distribution in the environment (free cells in saline solution vs retained on filters). While cells on solid surfaces showed a high capacity for survival under all conditions, the response to aqueous environments was variable and dependent on temperature. We also found that planktonic bacteria under starvation possessed a lower adhesiveness in contrast to those retained on filters, thus indicating that non-planktonic bacteria could be more stable *per se*. Moreover, the expression of biofilm-related genes declined under all conditions, even though *A. baumannii* maintained viability for a long time. This suggests that starved populations could find difficulties to adhere to solid surfaces and develop biofilms and, therefore, were unable to spread and colonize abiotic surfaces. As suggested by Chang et al. (2014), the downregulation of genes playing less important roles in cell survival (e.g., *ompA*, *bfmR* and *csuAB*) should allow to save the energy required for the expression of those genes involved in adaption to environmental stress. Moreover, the low expression level of *ompA*, *bfmR* and *csuAB* does not seem to completely prevent cell adhesion and subsequent biofilm formation and therefore

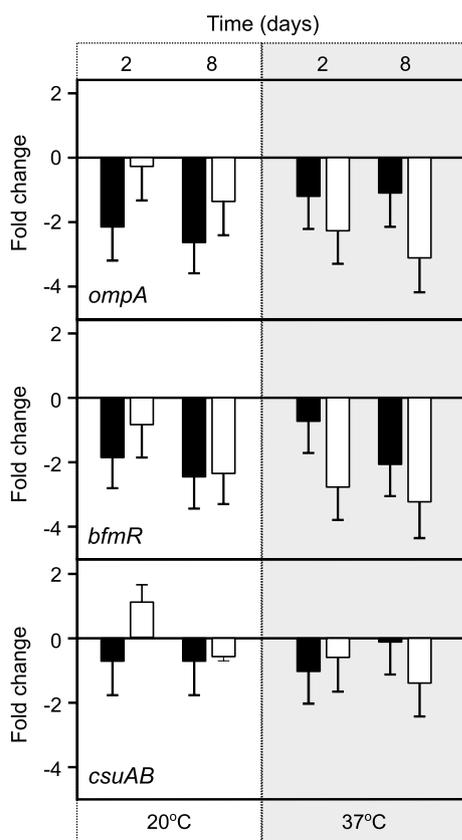


Fig. 4 Time-dependent changes in the expression level of the *ompA*, *bfmR* and *csuAB* genes determined for *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T populations maintained in aqueous environment (filled rectangle) and under dry conditions (open rectangle) at 20 and 37 °C. Relative values were calculated with respect to the initial time (0 days)

could explain why bacteria maintained under water-free conditions still preserved their adhesiveness, especially at 37 °C.

In summary, *A. baumannii* shows a great persistence under stress, although starvation and physical environment differentially affect its survival. The dissemination of this pathogen seems to be based on the ability of the bulk of the bacterial population to tolerate and overcome the negative effects of stress factors. We found that the adaptation process did not initiate the entry of *A. baumannii* cells into the VBNC state. Moreover, the populations maintained on dry surfaces were especially resistant to stress and were able to preserve not only cell culturability but also the cellular appearance and nearly unaltered RNA content. In contrast, the survival of bacteria in aqueous environments is temperature dependent and involves changes in viability, morphology and RNA content, as well as a loss of the ability to adhere to solid surfaces. Thus, while being a common stress factor, dryness seems to have a protective role for *A. baumannii* cells.

Acknowledgments Real-time PCR analysis and scanning electron microscopy of *A. baumannii* preparations were performed at the Advanced Research Core Facilities (SGIker) of the University of Basque Country UPV/EHU (Gene Expression Unit of the Genomics Core Facility and Analytical and High-Resolution Microscopy in Biomedicine Service). This work was supported by the research projects S-PE12UN59 and S-PE13UN059 from the Basque Government and EHU13/57 from the Basque Country University (UPV/EHU), as well as Basque Government Predoctoral Grants BFI-2011-84 to Z. Bravo and BFI-2011-85 to C. Parada. V.R. Kabardin was supported by IKERBASQUE (Basque Foundation for Science). Authors thank Prof. J. Ramos-Vivas (Department of Microbiology, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IDIVAL, Santander, Spain) for providing them with the clinical *Acinetobacter baumannii* isolate.

References

- 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. doi:[10.1111/j.1574-6941.2007.00362.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00362.x)
- Arana I, Muela A, Orruño M, Seco C, Garaizabal I, Barcina I (2010) Effect of temperature and starvation upon survival strategies of *Pseudomonas fluorescens* CHA0: comparison with *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Ecol* 74:500–509. doi:[10.1111/j.1574-6941.2010.00979.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00979.x)
- Barcina I, Arana I (2009) The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria? *Rev Environ Sci Bio/Technol* 3:245–255. doi:[10.1007/s1157-009-9159-x](https://doi.org/10.1007/s1157-009-9159-x)
- Bartual SG, Seifert H, Hippler C, Domínguez-Luzon MA, Wisplinghoff H, Rodríguez-Valera F (2005) Development of a Multilocus Sequence Typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43:4382–4390. doi:[10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.9.4382-4390.2005)
- Chang KC, Kuo HY, Tang CY, Chang CW, Lu CW, Liu CC, Lin HR, Chen KH, Liou ML (2014) Transcriptome profiling in imipenem-selected *Acinetobacter baumannii*. *BMC Genom* 15:815. doi:[10.1186/1471-2164-15-815](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-815)
- Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, Kim SA, Chae JP, Yoo SM, Lee JC (2008) *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol* 10:309–319. doi:[10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01041.x)
- Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–1322. doi:[10.1126/science.284.5418.1318](https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318)
- Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L, Brisse S (2010) The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5:e10034. doi:[10.1371/journal.pone.0010034](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010034)
- Espinal P, Martí S, Vila J (2012) Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. *J Hosp Infect* 80:56–60. doi:[10.1016/j.jhin.2011.08.013](https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.08.013)
- Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriés H, Joly-Guillou ML (2013) Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int J Infect Dis* 17:e802–e805. doi:[10.1016/j.ijid.2013.03.021](https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.03.021)
- Gaddy JA, Actis LA (2009) Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol* 4:273–278. doi:[10.2217/fmb.09.5](https://doi.org/10.2217/fmb.09.5)
- Gayoso CM, Mateos J, Méndez JA, Fernández-Puente P, Rumbo C, Tomás M, Martínez de Ilarduya O, Bou G (2014) Molecular mechanisms involved in the response to desiccation stress

- and persistence in *Acinetobacter baumannii*. J Proteome Res 13:460–476. doi:10.1021/pr400603f
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature Rev Microbiol 2:95–108. doi:10.1038/nrmicro821
- Hamouda A, Evans BA, Towner KJ, Amyes SGB (2010) Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} genes. J Clin Microbiol 48:2476–2483. doi:10.1128/JCM.02431-09
- Hobbie JE, Daley RJ, Jasper S (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. Appl Environ Microbiol 33:1225–1228
- Houang ETS, Sormunen RT, Lai L, Chan CY, Leong ASY (1998) Effect of desiccation on the ultrastructural appearances of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter lwoffii*. J Clin Pathol 51:786–788. doi:10.1136/jcp.51.10.786
- Jawad A, Snelling AM, Heritage J, Hawkey PM (1998) Exceptional desiccation tolerance of *Acinetobacter radioresistens*. J Hosp Infect 39:235–240. doi:10.1016/S0195-6701(98)90263-8
- 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. doi:10.1111/j.1574-6941.1997.tb00357.x
- Karunasagar I, Karunasagar I (2005) Retention of pathogenicity in viable nonculturable pathogens. In: Belkin S, Colwell RR (eds) Oceans and health: pathogens in the marine environment. Springer, New York, pp 361–371
- Kempf M, Rolain JM, Azza S, Diene S, Joly-Guillou ML, Dubourg JG, Colson P, Papazian L, Richet H, Fournier PE, Ribeiro A, Raoult D (2012) Investigation of *Acinetobacter baumannii* resistance to carbapenems in Marseille hospitals, south of France: a transition from an epidemic to an endemic situation. APMIS 121:64–71. doi:10.1111/j.1600-0463.2012.02935.x
- Lambiase A, Piazza O, Rossano F, Del Pezzo M, Tufano R, Catania MR (2012) Persistence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains in an Italian intensive care unit during a forty-six month study period. New Microbiol 35:199–206
- Landini P (2009) Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. Res Microbiol 60:259–266. doi:10.1016/j.resmic.2009.03.001
- Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Kim J (2008) Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. Clin Microbiol Infect 14:49–54. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x
- Lemke M, Leff L (2006) Culturability of stream bacteria: assemblage and population level responses. Microb Ecol 51:365–374. doi:10.1007/s00248-006-9026-z
- Lever MA, Rogers KL, Lloyd KG, Overmann J, Schink B, Thauer RK, Hoehler TM, Jørgensen BB (2015) Life under extreme energy limitation: a synthesis of laboratory-and field-based investigations. FEMS Microbiol Rev. doi:10.1093/femsre/fuv020
- Marks LR, Reddinger RM, Hakansson AP (2014) Biofilm formation enhances fomite survival of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Infect Immun 82:1141–1146. doi:10.1128/IAI.01310-13
- Oliver JD (2010) Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev 34:415–425. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x
- O’Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol 28:449–461. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00797.x
- Rittershaus ESC, Baek SH, Sassetti CM (2013) The normalcy of dormancy: common themes in microbial quiescence. Cell Host Microbe 13:643–651. doi:10.1016/j.chom.2013.05.012
- Roca D, Espinal P, Vila-Farres X, Vila J (2012) The *Acinetobacter baumannii* oxymoron: comensal hospital dweller turned pan-drug resistant menace. Front Microbiol 3:1–30. doi:10.3389/fmicb.2012.00148
- Rozsak DB, Colwell RR (1987) Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol Rev 51:365–379
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Svabić-Vlahović M (2000) A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 40:175–179. doi:10.1016/S0167-7012(00)00122-6
- Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA (2008) Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. Microbiology 154:3398–3409. doi:10.1099/mic.0.2008/019471-0
- Towner KJ (2009) *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. J Hosp Infect 73:355–363. doi:10.1016/j.jhin.2009.03.032
- Webster C, Towner KJ, Humphreys H (2000) Survival of *Acinetobacter* on three clinically related inanimate surfaces. Infect Control Hosp Epidemiol 21:246. doi:10.1086/503214
- Wendt C, Dietze B, Dietz E, Rüden H (1997) Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J Clin Microbiol 35:1394–1397
- Zhang Y (2014) Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. Emerg Microb Infect 3:e3. doi:10.1038/emi.2014.3

Acinetobacter baumannii es un importante patógeno nosocomial responsable de un gran número de brotes epidémicos en los hospitales de todo el mundo. Este microorganismo es capaz de persistir bajo condiciones adversas durante largos periodos de tiempo debido a su resistencia a la desecación y a los antimicrobianos. Este trabajo doctoral pretende profundizar, desde un enfoque ecológico, en el conocimiento de la respuesta de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606^T al estrés inducido por factores abióticos y establecer las estrategias de supervivencia que le permiten persistir en condiciones propias del ambiente hospitalario. Los resultados de este estudio indicaron que cuando esta bacteria se encuentra sobre superficies sólidas es capaz de preservar su cultivabilidad y otras características celulares durante al menos 30 días. Sin embargo, la supervivencia como células en suspensión es dependiente de la temperatura que, a 37°C, induce un gran número de cambios en diferentes características celulares, como cultivabilidad, integridad de la membrana citoplasmática, morfología, tamaño o adherencia. Además, el análisis del subproteoma de las envueltas celulares de este microorganismo durante su exposición a condiciones adversas reveló, en términos generales, una gran estabilidad en las proteínas asociadas con el metabolismo, la estructura, la respuesta al estrés o la patogenicidad. Por otro lado, se analizó el efecto de la exposición de *A. baumannii* a la radiación (visible o UV-C) y la acción de diferentes desinfectantes, agentes que indujeron la entrada de *A. baumannii* en el estado Viable No Cultivable. Aunque ninguno de los desinfectantes estudiados eliminó totalmente a este microorganismo, los resultados demostraron que la lejía fue el desinfectante más eficaz, sin embargo, los productos de amonio cuaternario testados podrían considerarse más adecuados al carecer de efectos negativos para los pacientes y personal hospitalario.

