



Tesis Doctoral

Efecto del cambio climático en la costa vasca: presencia de bacterias del género *Vibrio* e influencia de los factores ambientales en su perdurabilidad.

Elixabet Ogayar Sandoval

Leioa 2021

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

TESIS DOCTORAL

Efecto del cambio climático en la costa vasca: presencia de bacterias del género *Vibrio* e influencia de los factores ambientales en su perdurabilidad.

ELIXABET OGAYAR SANDOVAL
Leioa, 2021

UNIVERSIDAD DEL PAIS VASCO
EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología

Efecto del cambio climático en la costa vasca: presencia de bacterias del género *Vibrio* e influencia de los factores ambientales en su perdurabilidad.

ELIXABET OGAYAR SANDOVAL

Directoras:
INÉS ARANA BASABE
MAITE ORRUÑO BELTRÁN

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

Beca de Investigación Predoctoral UPV/EHU. Abril 2016 – Abril 2020. PPP 2017-3686 (UPV/EHU)

Título del proyecto: Presencia de bacterias del género *Vibrio* en la costa vasca e influencia de los factores ambientales en su supervivencia

Entidad financiadora: Universidad del País Vasco

Duración: 2016 - 2018

Investigador responsable: Maite Orruño

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

Publicaciones:

- Orruño M, Parada C, **Ogayar E**, Kaberdin VR, Arana I (2019). **Effects of abiotic and biotic factors on *Vibrio harveyi* ATCC 14126^T survival dynamics in seawater microcosms.** Aquatic Microbial Ecology 83:109-118. DOI: 10.3354/ame01910.

- Montánchez I, **Ogayar E**, Plágaro A.H, Esteve-Codina A, Gómez-Garrido J, Orruño M, Arana I, Kaberdin VR (2019). **Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation at elevated temperature reveals the putative mechanisms associated with its persistence and spread in the time of global warming.** Scientific Reports 9:289. DOI:10.1038/s41598-018-36483-0.

Contribuciones a congresos:

- **Ogayar E**, Orruño M, Catediano R, Escobero A, Gallego B, González-Uriarte A, Ramos L, Kaberdin VR, Arana I. 2016. **Efecto de la temperatura y la salinidad en cepas de *Vibrio* de origen ambiental y en la cepa de referencia *V. harveyi* ATCC 14126^T.** XI Congreso de Microbiología del Medio Acuático (XI-MMA'16). Oviedo, España. 20-22 julio 2016.

- Parada C, Orruño M, Bravo Z, **Ogayar E**, Kaberdin VR, Arana I. 2016. **Diferencias y semejanzas en las estrategias de supervivencia desarrolladas por *Escherichia coli* y *Vibrio harveyi* mantenidas bajo condiciones de estrés.** XI Congreso de Microbiología del Medio Acuático (XI-MMA'16). Oviedo, España. 20-22 julio 2016.

- **Ogayar E**, Orruño M, Montánchez I, Kaberdin VR, Arana I. 2016. **Isolation of *Vibrio* species from the Bay of Biscay.** XV International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay. Bilbao, España. 22-24 junio 2016.

- **Ogayar E**, Orruño M, Arana I. 2016. ***Vibrio* spp. en el litoral vizcaíno.** V Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencia y Tecnología. Leioa, España. 6-7 abril 2016

- Bravo Z, Parada C, **Ogayar E**, Montánchez I, Ramos L, Catediano R, Gallego B, Escobero A, Orruño M, Kaberdin VR, Arana I. 2016. **Bacterial resistance to stress. Survival strategies of *Vibrio* spp.** V Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencia y Tecnología. Leioa, España. 6-7 abril 2016.

- Orruño M, **Ogayar E**, Argos P, González-Uriarte A, Zaldibar B, Kaberdin VR, Arana I. 2015. **Presencia de *Vibrio* spp. en el litoral vizcaíno. Resultados preliminares.** XXV Congreso Nacional de Microbiología. Logroño, España. 7-10 julio 2015.

- Orruño M, Parada C, Bravo Z, **Ogayar E**, Larrañaga I, Kaberdin VR, Arana I. 2017. **Effects of long-term starvation on *Vibrio harveyi* membrane subproteome during its permanence in seawater.** Congress of European Microbiologists. FEMS 2017. Valencia, España. 9-13 julio 2017.

- Orruño M, Parada C, **Ogayar E**, Kaberdin V.R, Arana I. 2017. **Effect of temperature, starvation and predation in the survival of *Vibrio harveyi* populations.** HDID V (How dead is dead?). 5th Conference on Exploring the Edge of Bacterial Life. Vienna, Austria. 6-8 septiembre 2017.

- **Ogayar E**, Orruño M, Arana I. 2018. **Presence of *Vibrio* spp in the Basque coastal area and influence of environmental factors on their survival.** VI Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencia y Tecnología. Leioa, España. 14-15 marzo 2018.
- Orruño M, Kaberdin VR, Arana I, **Ogayar E**, Pascual A, Lomba A, González N. 2018. **Bacterial resistance to stress. *Vibrio* spp. in the aquatic systems.** VI Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencia y Tecnología. Leioa, España. 14-15 marzo 2018.
- **Ogayar E**, Lomba A, Larrañaga I, Kaberdin VR, Arana I, Orruño M. 2018. **Utilidad de la técnica CARD-FISH para estudiar la distribución de las bacterias del género *Vibrio*.** XVII Reunión del Grupo Taxonomía, Filogenia y Biodiversidad y XII Reunión del Grupo de Microbiología del Medio Acuático. Sitges, España. 1-2 octubre 2018.
- Orruño M, **Ogayar E**, Hernández A, Eguiraun H, Martínez I, Arana I, Kaberdin VR. 2018. **Analysis of bacterial stress responses associated with climate change.** MikrobioGune. 1st Basque Microbiology Meeting. Bilbao, España. 11 diciembre 2018.
- **Ogayar E**, Ruiz T, Sainz I, Uriarte F, Ordoñez I, Orruño M, Arana I. 2019. **Efecto del cambio climático en la costa Vasca: presencia de bacterias del género *Vibrio* e influencia de los factores ambientales en su perdurabilidad.** Concurso de Divulgación Científica UPV/EHU. Bilbao, España. 11 abril 2019.
- Kaberdin VR, Montánchez I, **Ogayar E**, Plágaro AH, Esteve-Codina A, Gómez-Garrido J, Orruño M, Arana I. 2019. **Addressing the impact of temperature on *Vibrio harveyi* adaptation in the time of climate change.** Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO). Lisboa, Portugal. 26-30 mayo 2019.
- Orruño M, **Ogayar E**, Alonso-Sáez L, Kaberdin VR, Arana I. 2019. **Seasonal distribution of *Vibrio* spp. populations in the coastal waters of the Bay of Biscay.** 8th Congress of European Microbiologists. FEMS 2019. Glasgow, Escocia. 7-11 julio 2019.
- **Ogayar E**, Ruiz T, Orruño M, Martínez I, Kaberdin VR, Arana I. 2019. **Colonización de superficies bióticas por *Vibrio harveyi*. Hacia el diseño de un modelo animal-*Vibrio*.** XXVII Congreso Nacional de Microbiología. Málaga, España. 2-5 julio 2019.

Al hombre más inteligente que conozco,
por el deseo de ser como él, hoy soy Doctora,
mi padre.

AGRADECIMIENTOS

Mediante estas palabras me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho posible la realización de esta tesis. En primer lugar a mis directoras Inés Arana y Maite Orruño, que confiaron en mi y me propusieron llevar a cabo este proyecto. Por enseñarme, pero sobre todo por darme la libertad para fallar y aprender por mi misma. Muchas veces nos preguntan que queremos ser de mayor, o cuales son nuestros sueños. Mi respuesta era “trabajar con bata de laboratorio”, gracias por hacerlo posible.

Por supuesto, a todos mis compañeros y todos los alumnos internos que han pasado por el laboratorio. Agradezco toda vuestra ayuda, y no solo en el ámbito científico sino sobre todo en el ámbito personal. He sido muy feliz estos años en el laboratorio.

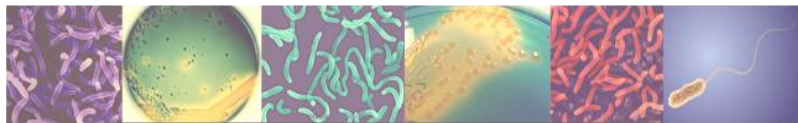
A mi familia, que se han interesado por cada uno de los pasos que he dado, y ha celebrado cada uno de ellos como nadie. Sobre todo a mis padres, que siempre me han ayudado en todo y me han dado toda la confianza para lograr lo que me proponga.

A todos mis amigos, que siempre han estado pendientes de mí, y me han ayudado a evadirme cuando más lo he necesitado, incluso desde la distancia. Gracias por llenarme el alma.

A todos los que me habeis acompañado en este camino, hay un trocito de vosotros mismos en esta tesis (que sólo los más observadores sabrán encontrar).

Mila esker!

ÍNDICE



ÍNDICE	3
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	13
INTRODUCCIÓN	18
1. Calentamiento global y <i>Vibrio</i>	19
2. Problemática en la identificación de <i>Vibrio</i> spp.	21
3. Detección de <i>Vibrio</i> spp. en muestras ambientales	23
4. Supervivencia de <i>Vibrio</i> spp.	24
OBJETIVOS	31
OBJETIVO 1: Distribución y dinámica espacio-temporal de <i>Vibrio</i> spp. en aguas costeras del golfo de Vizcaya	32
MATERIALES Y MÉTODOS	32
1. Adecuación de la técnica CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence <i>In situ</i> Hybridization) para la detección de <i>Vibrio</i> spp.	35
1.1. Elección de las sondas para la detección y enumeración de <i>Vibrio</i> spp.	35
1.2. Procedimiento estandarizado	38
1.3. Verificación de la idoneidad de las sondas	42
2. Enumeración de <i>Vibrio</i> spp. en la costa vasca a lo largo de un ciclo anual	44
2.1. Área de muestreo	44
2.2. Procesamiento y análisis de las muestras	46
3. Aislamiento e identificación de vibrios	46
4. Análisis estadístico	48
RESULTADOS	51
1. Adecuación de la técnica CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence <i>In situ</i> Hybridization) para la detección de <i>Vibrio</i> spp.	51
2. Enumeración de las comunidades bacterianas totales y de <i>Vibrio</i> spp. en la costa vasca a lo largo de un ciclo anual	57
2.1. Determinación de la presencia del género <i>Vibrio</i> en las costas vizcaínas (CAMPAÑA 2014-2015)	57
2.2. Determinación de la presencia del género <i>Vibrio</i> en las aguas de transición y costeras de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAMPAÑA 2018-2019)	62

OBJETIVO 2: Efecto de los factores ambientales en la supervivencia de <i>Vibrio</i> spp.	67
MATERIALES Y MÉTODOS	67
1. Cepas de <i>Vibrio</i> y obtención de inóculos	67
2. Experiencias de supervivencia	67
3. Parámetros microbianos estimados	69
4. Análisis estadístico	71
RESULTADOS	75
1. Influencia de factores abióticos en la supervivencia de <i>Vibrio</i> spp.	75
2. Influencia de factores bióticos en la supervivencia de <i>Vibrio</i> spp.	87
3. Variación en la capacidad de adhesión de <i>Vibrio</i> spp.	88
3.1. Variación en la capacidad de adhesión de <i>Vibrio</i> spp. a superficies abióticas	88
3.2. Variación en la capacidad de adhesión de <i>Vibrio</i> spp. a superficies bióticas	93
OBJETIVO 3: Caracterización de los cambios moleculares que, a nivel del subproteoma de las envueltas celulares, experimenta <i>V. harveyi</i> durante la adaptación a condiciones adversas	103
MATERIALES Y MÉTODOS	103
1. Obtención de extractos proteicos durante los ensayos de supervivencia	103
2. Extracción de proteínas	103
3. Aislamiento de proteínas de la envuelta celular	103
4. Cuantificación proteica	104
5. Procesamiento de las muestras para la identificación proteica: espectrometría de masas	104
5.1. Digestión de proteínas	104
5.2. Análisis LC-MS/MS	104
5.3. Procesamiento de datos	105
RESULTADOS	104
1. Proteínas relacionadas con el mantenimiento de la estructura celular	109
2. Proteínas relacionadas con el transporte	111
3. Proteínas relacionadas con la bioenergética celular	118
4. Proteínas relacionadas con la síntesis y degradación proteica	121
5. Proteínas relacionadas con la división celular	122
6. Proteínas sensoras y relacionadas con el movimiento	123
7. Proteínas relacionadas con la respuesta al estrés	125
8. Otras proteínas	126

DISCUSIÓN	134
1. Distribución y dinámica espacio-temporal de <i>Vibrio</i> spp. en aguas costeras del golfo de Vizcaya	133
2. Efecto de los factores ambientales en la supervivencia de <i>Vibrio</i> spp.	138
3. Caracterización de los cambios moleculares que, a nivel del subproteoma de las envueltas celulares, experimenta <i>V. harveyi</i> durante la adaptación a condiciones adversas	146
CONCLUSIONES	133
BIBLIOGRAFÍA	158
ANEXOS	203
ANEXO 1: Composición de soluciones del CARD-FISH.	203
ANEXO 2: Primers utilizados para la amplificación de los 7 genes <i>housekeeping</i> mediante Multilocus Sequence Analysis (MLSA). Se indica gen, nombre de los primers forward y reverse y la secuencia del primer (5'→3').	205
ANEXO 3: Especies identificadas mediante los diferentes amplicones secuenciados, número de genes <i>housekeeping</i> que coinciden con la identificación e identificación más probable para los 12 aislados y valores <i>Query</i> e <i>Identity</i> de cada una de las identificaciones (mediante BLAST, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).	206
ANEXO 4: Agua de mar artificial (Farmer III JJ y Hickman-Brenner FW, 2006)	207
ANEXO 5: TBS 1x: Tampón salino Tris-HCl 1x	208

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Representación de los 21 clados pertenecientes al género *Vibrio*. (Adaptado de Sawabe *et al.* J. Bacteriol. 2007; doi:10.1128/JB.00693-07)..... 20
- Figura 2.** Esquema de CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In situ* Hybridization) aplicado a bacterias planctónicas..... 42
- Figura 3.** Mapa aéreo de la costa vizcaína donde se muestran las zonas de muestreo. Imagen modificada de Google Maps (maps.google.es). Playa de Laida (●), puerto de Armintza (●) y bahía de Astondo (●). 44
- Figura 4.** Mapa aéreo de la costa vasca donde se muestran las zonas de muestreo. Imagen modificada de Google Maps (maps.google.es). Aguas costeras (●), mar abierto (●) y aguas de transición, salida estuario (●)..... 45
- Figura 5.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión A (*V. harveyi* CECT 525) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000. 52
- Figura 6.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión B (*V. harveyi* ambiental) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000..... 52
- Figura 7.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión C (*E. coli* CECT 416, *S. marcescens* CECT 159, *P. aeruginosa* CECT 108, *C. freundii* CECT 401) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000..... 53
- Figura 8.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión D (*V. harveyi* CECT 525, *E. coli* CECT 416, *St. aureus* CECT 240, *B. subtilis* CECT 40, *M. luteus* CECT 245) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000..... 54
- Figura 9.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión E (*V. harveyi* CECT 525 y vibrios ambientales: *V. harveyi*, *V. cyclitrophicus*, *V. kanaloae*, *V. tubiashi*) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000..... 55
- Figura 10.** Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión F (vibrios ambientales: *V. cyclitrophicus*, *V. kanaloae*, *V. tubiashi*) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000..... 56

Figura 11. Variación de la temperatura del agua en los tres puntos a lo largo del periodo de estudio. Se diferencia la época cálida (gris claro) y época fría (gris oscuro). 57

Figura 12. Distribución estacional de las poblaciones bacterianas determinadas en los 3 puntos de muestreo. Se indica la densidad de bacterias totales (■), bacterias quimioorganotrofas cultivables (■) y *Vibrio* spp. presuntivos (■). Se diferencian las épocas cálida (gris claro) y fría (gris oscuro)..... 58

Figura 13. Distribución estacional de las poblaciones bacterianas determinadas en los 3 puntos de muestreo. Se indica la densidad de bacterias totales (■), bacterias quimioorganotrofas cultivables (■) y *Vibrio* spp. presuntivos (■). Se diferencian las épocas cálida (gris claro) y fría (gris oscuro)..... 59

Figura 14. Resultados de las migraciones de la electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de la secuencia parcial del gen ARNr 16S. Cada banda corresponde a una cepa seleccionada (cepas 1-12). 60

Figura 15. Distribución estacional de poblaciones bacterianas estudiadas en las 15 estaciones muestreadas, ordenadas de oeste a este según su ubicación en el mapa mostrado en la Figura 4. Primavera (P), verano (V), otoño (O) e invierno (I). Se indica la densidad de bacterias totales (■), bacterias quimioorganotrofas cultivables (■), *Vibrio* spp. totales (■) *Vibrio* spp. presuntivos cultivables (■) y la temperatura (°C) (●). Las estaciones de muestreo se dividen en aguas costeras (recuadro morado), mar abierto (recuadro verde) y aguas de transición, salida estuario (recuadro amarillo). 63

Figura 16. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas en agua de mar estéril en oscuridad a 4°C, 12°C, 20°C y 30°C. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE)..... 76

Figura 17. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas en agua de mar estéril bajo radiación visible a 20°C y 30°C. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE)..... 77

Figura 18. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas a 12°C en agua de mar artificial estéril. 0,5‰, 15‰ y 30‰. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE)..... 79

Figura 19. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas a 20°C en agua de mar artificial estéril. 0,5‰, 15‰ y 30‰. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE)..... 80

Figura 20. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas a 30°C en agua de mar artificial estéril. 0,5‰, 15‰ y 30‰. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE)..... 81

Figura 21. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas a 20°C en agua de mar natural estéril (AMN) y agua de mar artificial estéril (AMA) con salinidad 35,5‰. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 82

Figura 22. Variación del tamaño celular obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar estéril en oscuridad a 4°C, 12°C, 20°C y 30°C. Se muestran el porcentaje de células (%) con longitud corta (■), media (■) y larga (■), y el tamaño celular medio (μm) (●) en los días 0, 3 y 21. Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 84

Figura 23. Variación del tamaño celular obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525 y *V. harveyi* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar estéril bajo radiación visible a 20°C y 30°C. Se muestran el porcentaje de células (%) con longitud corta (■), media (■) y larga (■), y el tamaño celular medio (μm) (●) en los días 0, 3 y 21. Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 85

Figura 24. Variación del tamaño celular obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525 y *V. harveyi* ambiental, mantenidas durante 21 días a 20°C en agua de mar artificial, salinidades de 0,5‰, 15‰, 30‰ y 35,5‰. Se muestran el porcentaje de células (%) con longitud corta (■), media (■) y larga (■), y el tamaño celular medio (μm) (●) en los días 0, 3 y 21. Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 86

Figura 25. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi gfp* en presencia de la microbiota de agua de mar en experiencias realizadas a 4°C (Parada, 2016), 12°C, 20°C (Parada, 2016) y 30°C. Se muestran los números de bacterias totales del agua de mar (●), *V. harveyi gfp* totales (●), bacterias cultivables quimioorganotrófas (▲), *V. harveyi gfp* cultivables (▲), protozoos flagelados (◆) y protozoos ciliados (■). Las líneas discontinuas indican recuentos de células cultivables por debajo del límite de detección del método de enumeración. Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 87

Figura 26. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus*, mantenidas durante 21 días en agua de mar estéril en oscuridad a 4°C, 12°C, 20°C y 30°C. La línea discontinua inferior indica el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y, la superior, el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 89

Figura 27. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar estéril bajo radiación visible a 20°C y 30°C. La línea discontinua inferior marca el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y la línea superior el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 90

Figura 28. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar artificial y a 10°C en salinidades de 0,5‰, 15‰ y 30‰. La línea discontinua inferior marca el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y la línea superior el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 91

- Figura 29.** Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar artificial y a 20°C en salinidades de 0,5‰, 15‰, 30‰ y 35,5‰. La línea discontinua inferior marca el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y la línea superior el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 92
- Figura 30.** Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar artificial y a 30°C en salinidades de 0,5‰, 15‰ y 30‰. La línea discontinua inferior marca el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y la línea superior el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 93
- Figura 31.** Adhesión de *V. harveyi gfp* sobre piel de *B. brama* (A) y sobre piel de *T. alalunga* (B). 94
- Figura 32.** Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* durante 48 h. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas a 12°C con densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL. 95
- Figura 33.** Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* durante 48 h. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas a 20°C con densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL. 95
- Figura 34.** Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* durante 48 h. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas a 26°C con densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL. 95
- Figura 35.** Porcentaje de cobertura de *V. harveyi gfp* sobre piel de *B. brama* (columnas) y densidad de las poblaciones planctónicas (líneas) de las muestras incubadas a 12°C, 20°C y 26°C. Densidades celulares iniciales de 10⁴ cel/mL (●, █), 10⁵ cel/mL (■, █) y 10⁶ cel/mL (▲, █). Se muestran valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 96
- Figura 36.** Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* en experiencias realizadas a 20°C. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas con poblaciones recogidas tras 0 días de permanencia en agua de mar incubada a 20°C. Densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL. 97
- Figura 37.** Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* en experiencias realizadas a 20°C. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas con poblaciones recogidas tras 3 días de permanencia en agua de mar incubada a 20°C. Densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL. 98
- Figura 38.** Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* en experiencias realizadas a 20°C. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas con poblaciones recogidas tras 6 días de permanencia en agua de mar incubada a 20°C. Densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL. 98

Figura 39. Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* en experiencias realizadas a 20°C. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas con poblaciones recogidas tras 14 días de permanencia en agua de mar incubada a 20°C. Densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL. 99

Figura 40. Variación de la capacidad de adhesión a piel de *B. brama* de poblaciones de *V. harveyi gfp* mantenidas en agua de mar a 20°C. Porcentaje de cobertura de *V. harveyi gfp* sobre piel de *B. brama* (columnas) y densidad celular de la población planctónica (líneas). Poblaciones obtenidas tras 0, 3, 6 y 14 días de permanencia en agua de mar estéril e incubada a 20°C. Densidades celulares iniciales de 10⁴ cel/mL (●, ■), 10⁵ cel/mL (■ y ■) y 10⁶ cel/mL (▲, ■). Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE). 100

Figura 41. Acceso a las estructuras secundarias del ARNr 16S. Se muestra la clasificación de las zonas del ARNr en función de la accesibilidad de las sondas. Los diferentes colores indican el rango de accesibilidad de las diferentes clases (clases I a VI). Sonda GV841 (A) y sonda VIB572a (B). (Adaptado de Kumar *et al.* *BMC Bioinformatics* 2005, doi: 10.1186/1471-2105-6-61). 135

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sondas de oligonucleótidos dirigidas a ARNr 16S de bacterias del género <i>Vibrio</i> recogidas en la literatura científica de los últimos 20 años. Se muestra la secuencia, la posición de referencia en <i>Escherichia coli</i> (https://www.arb-silva.de/search/testprobe/), la población con la que hibridan y referencias para cada sonda.....	35
Tabla 2. Cobertura (Cob) y especificidad (Esp), expresados como porcentajes, para las sondas GV841, Vib-16S-1 y VIB572a (base de datos SILVA). Se muestran aquellos taxones cuyos valores superan el 75% para ambas características en alguna de las tres sondas analizadas.	36
Tabla 3. Cobertura (QC, query cover %), identidad (Iden, identity %), coincidencia (Match, matches) y valor E (E value, probabilidad de encontrar la secuencia - entre todos los organismos - dentro de esta base de datos), para las sondas GV841, Vib-16S-1 Y VIB572a (base de datos BLAST). Se muestran aquellos taxones cuyos valores superan el 75% en cobertura e identidad en alguna de las tres sondas analizadas.	37
Tabla 4. Condiciones para CARD-FISH específicas para las sondas GV841 (Giuliano <i>et al.</i> , 1999) y VIB572a (Hugget <i>et al.</i> , 2008). Se muestran los volúmenes y porcentajes de formamida (FA), agua MiliQ y NaCl indicados en la bibliografía y los finalmente utilizados en este estudio; así como, las temperaturas de hibridación y de lavado.....	39
Tabla 5. Microorganismos utilizados para preparar las suspensiones.	43
Tabla 6. Suspensiones de microorganismos y finalidad de su utilización.....	43
Tabla 7. Estaciones de muestreo (Sistema de Coordenadas: European Datum 1950, UTM zona 30N). Se muestra el nombre de la estación, unidad hidrológica, localización de la estación y coordenadas.....	45
Tabla 8. Programa térmico de la reacción PCR para la amplificación de una secuencia parcial del gen ARNr 16S y los 7 genes <i>housekeeping</i>	47
Tabla 9. Porcentaje (\pm DE) de células que hibridaron con las sondas para las suspensiones de microorganismos testadas.	51
Tabla 10. Distribución estacional del porcentaje de <i>Vibrio</i> spp. identificados respecto a <i>Vibrio</i> spp. presuntivos en época cálida y época fría, determinada en los 3 puntos de muestreo.....	60
Tabla 11. Resultados obtenidos mediante los distintos sistemas de identificación utilizados (API 20E, ARNr 16S y MLSA) para las 12 cepas aisladas.	61
Tabla 12. Combinaciones de las condiciones analizadas en los estudios de supervivencia.....	68
Tabla 13. Categorías establecidas por Stepanovic´ <i>et al.</i> (2004) y utilizadas en este estudio para la clasificación de las poblaciones en función de su capacidad de adhesión.	70
Tabla 14. Rangos de longitud celular (μ m) para <i>V. harveyi</i> CECT 525, <i>V. harveyi</i> ambiental y <i>V. cyclitrophicus</i> ambiental. Se muestran el valor medio de longitud (X_L) y la correspondiente desviación estándar (DE).....	83

Tabla 15. Rangos de valores para cada categoría establecidas de acuerdo con Stepanovic´ <i>et al.</i> (2004), para la clasificación de poblaciones en función de su capacidad de adhesión para agua de mar natural y agua de mar artificial.	88
Tabla 16. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas estructurales que no varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	110
Tabla 17. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas estructurales que si varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	111
Tabla 18. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas de transporte que no varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	112
Tabla 19. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas de transporte que si varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	116
Tabla 20. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas de bioenergética que no varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	119
Tabla 21. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas de bioenergética que si varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	120
Tabla 22. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas de síntesis y degradación proteica que no varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	121
Tabla 23. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas de síntesis y degradación proteica que si varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	122
Tabla 24. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas de división celular que no varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	123
Tabla 25. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas de división celular que si varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	123
Tabla 26. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas sensoras y de movimiento que no varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	124
Tabla 27. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de <i>V. harveyi</i> ambiental adscritas al grupo funcional Proteínas sensoras y de movimiento que si varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.	125

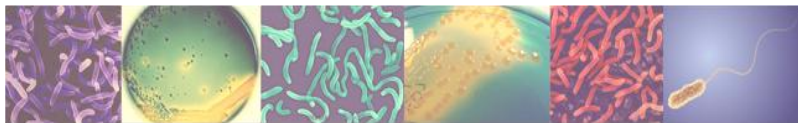
Tabla 28. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional ***Proteínas de estrés*** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C..... 126

Tabla 29. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional ***Proteínas de estrés*** que **si** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C..... 126

Tabla 30. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional ***Otras proteínas*** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C..... 127

Tabla 31. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional ***Otras proteínas*** que **si** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C..... 128

INTRODUCCIÓN



1. Calentamiento global y *Vibrio*

En las últimas décadas, el calentamiento global, una de las consecuencias directas del aumento de gases de efecto invernadero en la atmósfera, se ha convertido en motivo de preocupación no solo en el ámbito científico sino también para la sociedad. Desde finales del siglo XIX hasta la actualidad, la temperatura media de la tierra ha aumentado 0,6°C, dándose un incremento de 0,2-0,3°C en el periodo comprendido entre los años 1960 y 2000 (Hughes, 2000) y la temperatura de los sistemas acuáticos ha aumentado 0,2°C por década (Hansen *et al.*, 2006) lo que supone un incremento de hasta 1°C por siglo (Hughes, 2000).

Reid (2016) ha indicado que el calentamiento de los océanos se debe principalmente a las emisiones excesivas de CO₂ a la atmósfera, provocadas por actividades humanas. Dichas emisiones incrementan la temperatura de la superficie marina, llegando a afectar las profundidades oceánicas (Reid, 2016; Stocker *et al.*, 2013). Además, el aumento de la temperatura media mundial tanto del aire como de los océanos tiene como consecuencia el derretimiento de los casquetes polares y el aumento del nivel medio del mar (The Intergovernmental Panel on Climate Change [IPCC], 2007). El incremento del nivel del agua causado por el derretimiento de los polos ha sido estudiado y descrito por varios autores (Houghton, 2001; Meier *et al.*, 2014; Nerem *et al.*, 2006; Raper y Braithwaite, 2006; Vermeer y Rahmstorf, 2009). Nicholls y Cazenave (2010) señalaron que en el periodo de 1993 a 2010, el nivel del mar sufrió un ascenso anual de 3,3 mm; además, apuntaron que si esta tendencia continua, a finales de siglo el nivel del mar habrá aumentado 60 cm. A estos hechos debe sumarse que el calentamiento global está alterando los patrones de precipitación y escorrentía, lo que provoca una reducción en la salinidad de los estuarios y humedales costeros (Häkkinen, 2002).

En el área geográfica del Mar Cantábrico se ha constatado un incremento gradual de la temperatura del agua superficial. Así, Díez *et al.* (2012), tras revisar datos meteorológicos recopilados desde 1980 hasta 2008, indicaron que este incremento se situaba en un 1°C. Por su parte, Chust *et al.* (2010) modelizaron que para final del siglo XXI, el nivel del mar en el área de la Bahía de Vizcaya incrementará de 28,5 cm a 48,7 cm.

Esta situación de aumento a un ritmo acelerado de las emisiones de CO₂, de la temperatura de la superficie del mar o de la acidificación oceánica, condiciona el sino de la humanidad, de las especies y de los ecosistemas marinos (Reid, 2016), poniendo en peligro el equilibrio y la supervivencia de las comunidades que en ellos habitan (http://coastalwarming.com/data_global.html; Vezzulli *et al.*, 2012), ya que altera la diversidad, estructura e interacción de los organismos, incluidos microorganismos (Pecl *et al.*, 2017). Doney *et al.* (2012) han indicado que el cambio climático provoca variaciones en las poblaciones bacterianas debido a la posible intolerancia fisiológica a las nuevas condiciones ambientales y las alteraciones en las interacciones interespecíficas, lo que afecta a la estructura y la diversidad de la comunidad.

Las bacterias del género *Vibrio* (clase *Gammaproteobacteria*, familia *Vibrionaceae*) son principalmente acuáticas y se aíslan de aguas continentales, estuarios, aguas marinas y sedimentos y/o asociadas a organismos en todo el mundo (Thompson *et al.*, 2004a; Vezzulli *et al.*, 2012). Son bacterias Gram negativas, quimioorganotrofas, oxidasa positivas, con metabolismo fermentativo anaerobio facultativo y en su mayoría mesófilas. La mayoría de las especies pueden reducir el nitrato a nitrito. Además, requieren Na⁺ para su crecimiento (Gomez-Gil *et al.*, 2014) y crecen en medio Thiosulphate Citrate Bile salts Sucrose (TCBS) y en Agar Marino (Farmer *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005, 2009). Estas bacterias presentan morfología bacilar, son generalmente móviles mediante un flagelo polar y tienen un tamaño

comprendido entre 0,5 y 0,8 μm de ancho y entre 1,4 y 2,6 μm de largo (Baumann y Schubert, 1984).

Los sistemas acuáticos de zonas tropicales y templadas constituyen su hábitat principal (Brehm *et al.*, 2020) donde factores como la temperatura, la salinidad y los niveles de oxígeno disuelto controlan su distribución y abundancia. Las condiciones más favorables para su crecimiento son ambientes cálidos ($>18^{\circ}\text{C}$) con una salinidad baja ($<25\text{‰ NaCl}$) (Vezzulli *et al.*, 2012). Por tanto, el calentamiento global supondría una ventaja para la multiplicación de estas especies; y por ello, se consideran un indicador adecuado para el estudio del mismo (Martinez-Urtaza *et al.*, 2010; Vezzulli *et al.*, 2012).

Se considera que el grupo taxonómico *Vibrionaceae* es muy diverso (Noguerola y Blanch, 2008), estando la taxonomía del género *Vibrio* en constante proceso de revisión (Gomez-Gil *et al.*, 2004). Recientemente, Li *et al.* (2020) han establecido que el género *Vibrio* consta de más de 120 especies agrupadas en 21 clados (Figura 1); destacando la gran diversidad de cepas, biotipos, etc. (Taxonomy Browser, 2020). Las cepas de los diferentes clados presentan una elevada similitud entre genomas (caso de las especies del clado *Splendidus* y *Orientalis*) que Thompson *et al.* (2005) justifican por la adaptación al nicho.

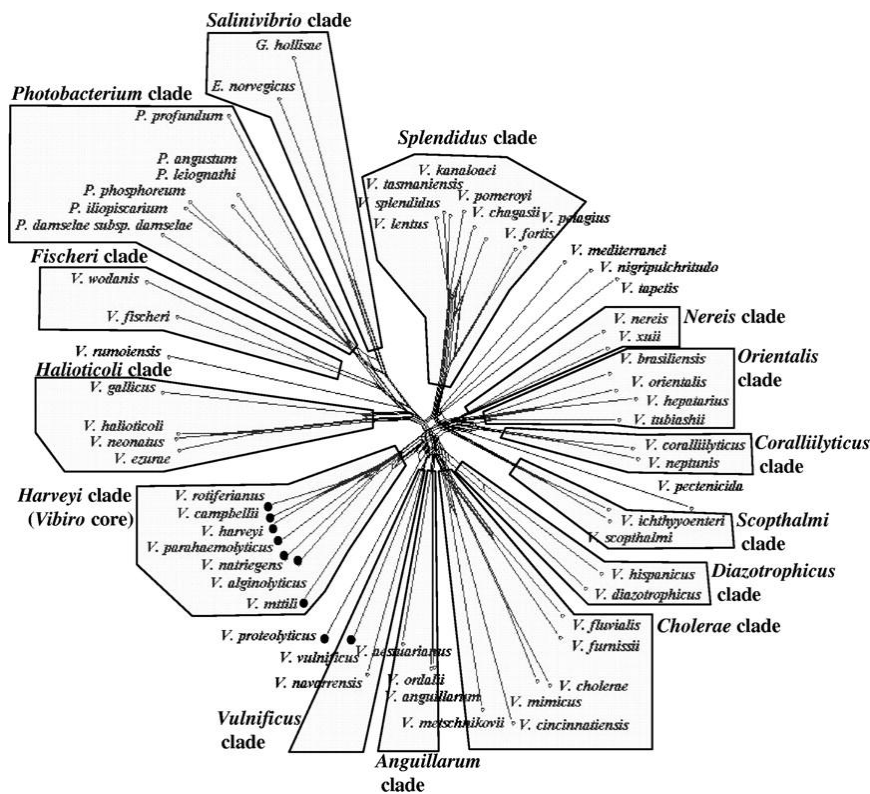


Figura 1. Representación de los 21 clados pertenecientes al género *Vibrio*. (Adaptado de Sawabe *et al.* J. Bacteriol. 2007; doi:10.1128/JB.00693-07).

Dentro de este género se incluyen especies patógenas que pueden afectar al ser humano (Pruzzo *et al.*, 2005). Hasta la fecha, se han señalado 12 especies con potencial para causar infecciones en humanos (Brehm *et al.*, 2020), siendo *V. cholerae* la especie más conocida. Los serogrupos productores de toxinas O1 y O139 de *V. cholerae* pueden causar cólera endémico y epidémico, una enfermedad diarreica secretoria aguda grave que es principalmente transmitida por ingestión de alimentos o agua contaminados. Las infecciones provocadas por *Vibrio* spp.-no cólera son más frecuentemente causadas por especies halofílicas que prosperan

en agua salada y se asocian con el consumo de mariscos crudos o poco cocidos o la exposición de traumatismos al mar o al agua salobre y, en un grado variable, pueden causar gastroenteritis e infecciones de heridas (Brehm *et al.*, 2020).

En las dos últimas décadas, ha incrementado la detección de cepas patógenas facultativas del género *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2004a, b) y la incidencia de enfermedades relacionadas con el uso de aguas contaminadas por estos microorganismos (Paz *et al.*, 2007; Vezzulli *et al.*, 2012, 2013), incluso en países europeos donde no eran habituales (<https://e3geoportal.ecde.europe.eu/SitePages/VibrioRiskMap.aspx>, Vezzulli *et al.*, 2012). De hecho, se ha constatado un aumento de los casos de cólera y gastroenteritis (Baker-Austin *et al.*, 2018; Jones y Oliver, 2009; Morris y Acheson, 2003) causados por el consumo de agua y marisco contaminados por especies patógenas de *Vibrio* (Martínez-Urtaza *et al.*, 2010; McMichael *et al.*, 2006; Paz *et al.*, 2007; Vezzulli *et al.*, 2013). Además, se ha establecido la presencia de *V. cholerae* en estuarios de Portugal (Machado y Bordalo, 2014), de *V. parahaemolyticus* en la costa atlántica francesa (Deter *et al.*, 2010; Quilici *et al.*, 2005) y de *V. parahaemolyticus* O3:K6, altamente patógeno, en el noroeste de España (Martínez-Urtaza *et al.*, 2005, 2008). Se considera, que este incremento global de las vibriosis; así como, el incremento en la expresión de rasgos asociados a la virulencia en cepas patógenas, son debidos a las alteraciones experimentadas en los océanos por efecto de la variación de temperatura (y parámetros relacionados) asociada al cambio climático (Vezzulli *et al.*, 2013). En este sentido, Huehn *et al.* (2014) y Oberbeckmann *et al.* (2011) han sugerido una asociación entre la alteración de parámetros ambientales y el cambio de la comunidad de *Vibrio* hacia especies y cepas potencialmente más patógenas. Por ejemplo, *V. harveyi*, agente causante de enfermedades zoonóticas en peces y mariscos (Brehm *et al.*, 2020), durante mucho tiempo no ha sido considerado patógeno humano de interés (Zhou *et al.*, 2012). No obstante, en los últimos años se han reportado casos de infecciones de heridas (Janda *et al.*, 2015), infecciones por consumo de alimentos contaminados (Fadel y El-Lamie, 2019) e incluso se ha informado de casos de infecciones poco habituales en humanos (Brehm *et al.*, 2020; Del Gigia-Aguirre *et al.*, 2017; Wilkins *et al.*, 2008). Además, la incidencia de vibriosis en regiones no endémicas altamente afectadas por el cambio climático (Vezzulli *et al.*, 2013) ha supuesto grandes pérdidas económicas (Tall *et al.*, 2012, 2013; Vezzulli *et al.*, 2013), en especial a las industrias extractivas y procesadoras de productos del mar (Hernández *et al.*, 2005).

Existen diversos estudios acerca de los mecanismos de adaptación de *Vibrio* spp. a la variación de factores ambientales causados por el calentamiento global (Martínez-Urtaza *et al.*, 2010; Montánchez *et al.*, 2019; Paz *et al.*, 2007; Vezzulli *et al.*, 2013, 2016); sin embargo, se desconoce cómo los efectos del calentamiento global pueden alterar, directa o indirectamente, la estructura y abundancia de los reservorios y hospedadores de *Vibrio* en el medio acuático (Vezzulli *et al.*, 2013).

2. Problemática en la identificación de *Vibrio* spp.

Hasta la década de 1990, la taxonomía del género *Vibrio* se basaba principalmente en la descripción de rasgos morfológicos de cepas crecidas en medios selectivos y en pruebas bioquímicas. Sin embargo, aunque se han realizado varios intentos para caracterizar e identificar vibrios de medios acuáticos basándose en caracteres fenotípicos (Vandenberghé *et al.*, 2003), se han encontrado dificultades debido a la gran diversidad bioquímica que presentan. De hecho, la identificación basada en pruebas bioquímicas, si bien es adecuada para cepas clínicas, no resulta fiable para la identificación de la mayoría de cepas ambientales debido a la diversidad de su metabolismo (Tall *et al.*, 2013). Por otra parte, la continua

descripción de nuevas especies conlleva a que la taxonomía de la familia *Vibrionaceae* esté en constante cambio (Alsina y Blanch, 1994; Thompson *et al.*, 2004b; Vandenberghe *et al.*, 2003).

El método de identificación bioquímico API 20E, que originalmente fue diseñado para la identificación de *Enterobacteriaceae* (Shayegani *et al.*, 1978) con una orientación de aplicación clínica (Swanson y Collins, 1980), más adelante se adaptó para la identificación de bacterias Gram negativas (Holmes *et al.*, 1978; Shayegani *et al.*, 1978). Hoy en día, se dispone comercialmente de variantes capaces de abarcar un amplio espectro de grupos bacterianos y, aunque con limitaciones, fuera del campo clínico se han utilizado en estudios de microbiología acuática. El género *Vibrio* se encuentra dentro de los perfiles identificables mediante el sistema bioquímico API 20E, siendo necesarias ciertas variaciones en la metodología, así como el uso de diluyentes de mayor salinidad (MacDonell *et al.*, 1982).

No obstante, se ha comprobado que los métodos tradicionales de identificación fenotípica son incapaces de identificar y diferenciar con seguridad entre especies pertenecientes al género *Vibrio*, ya que sus distintos integrantes comparten un alto grado de similitudes genéticas y fenotípicas (Cano-Gomez *et al.*, 2009; Sawabe *et al.*, 2007).

El desarrollo de técnicas basadas en ribotipificación, hibridación ADN-ADN o PCR han aportado valiosas informaciones, nuevos conocimientos y han proporcionado una sistemática para identificar estos microorganismos, lo que ha mejorado enormemente la taxonomía dentro de este grupo (Pascual *et al.*, 2010; Sawabe *et al.*, 2007; Tall *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2005).

La molécula ARNr 16S se compone de regiones altamente conservadas que pueden revelar relaciones como pertenencia a clases, phyla, etc., pero también contiene regiones variables que pueden discriminar dentro de taxonomías más precisas (género). Thompson *et al.* (2004b) establecieron que la similitud del ARNr 16S dentro de la familia *Vibrionaceae* era superior al 90-91%; dentro del género *Vibrio*, de un 95-96% y, al menos de 99,3%, entre cepas de la misma especie. Por ello, este gen, debido a su alta conservación, resulta una herramienta adecuada para la identificación a nivel de género *Vibrio*. Así, las filogenias obtenidas por la secuenciación del gen ARNr 16S han señalado que en el caso del género *Vibrio*, la agrupación mediante criterios clásicos (morfología y características bioquímicas) resulta inadecuada (Thompson *et al.*, 2004b). No obstante, Tall *et al.* (2013) indicaron el bajo poder discriminatorio de este gen entre especies dentro del género *Vibrio*, siendo una herramienta insuficiente a la hora de una identificación precisa de especies estrechamente relacionadas (Nagpal *et al.*, 1998) debido a la similitud existente de dicho gen, como en el caso de *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbelli*, *V. natriegens* (Dorsch *et al.*, 1992) y *V. rotiferianus* (Gomez-Gil *et al.*, 2003).

Esta problemática llevó a establecer otros marcadores filogenéticos que permitieran discriminar entre especies estrechamente relacionadas (Tall *et al.*, 2013; Thompson *et al.*, 2007, 2008). El análisis de secuencias *multilocus* (Multilocus Sequencing Analysis, MLSA) ha permitido superar la problemática de la noción de especies o grupos de especies dentro del género *Vibrio* (Pascual *et al.*, 2010; Sawabe *et al.*, 2007; Thompson *et al.*, 2007, 2009), ofreciendo resultados contrastados por análisis de otros marcadores filogenéticos y genéticos. La agrupación de las especies de *Vibrio* mediante MLSA está de acuerdo con la agrupación realizada por estudios de taxonomía polifásica (Thompson *et al.*, 2005), lo que la define como una herramienta potente para la identificación de bacterias estrechamente relacionadas (Cano-Gomez *et al.*, 2011). Esta técnica se ha aplicado con resultados positivos en la descripción de nuevas cepas de *Vibrio* (Cano-Gomez *et al.*, 2010; Yoshizawa *et al.*, 2010) y en estudios epidemiológicos (Pascual *et al.*, 2010).

3. Detección de *Vibrio* spp. en muestras ambientales

La enumeración y detección de poblaciones bacterianas de muestras ambientales de sistemas acuáticos resulta problemática a causa de la Gran Anomalía del Recuento de Placa (Harwani, 2013; Pace, 1996): no todas las bacterias enumeradas mediante técnicas de microscopía son cultivables en los medios convencionales y las metodologías de las que se dispone actualmente. Además, una fracción de las bacterias observadas al microscopio, pero no cultivables, podría corresponder a microorganismos que, si bien habitualmente crecen en medio de cultivo, tras ser expuestos a condiciones desfavorables, pueden perder esta capacidad aunque permanecen metabólicamente activas; es decir, bacterias que adoptan el estado Viable no Cultivable (VNC) (Barcina y Arana, 2009; Oliver, 2010; Roszak y Colwell, 1987; Xu *et al.*, 1982). Este estado se ha reportado en hasta 85 especies bacterianas que comprenden una amplia distribución filogenética, lo que sugiere que pueda ser una estrategia general de supervivencia ante condiciones ambientales desfavorables o estresantes (Oliver, 2010). *Vibrio* spp. adopta este estado bajo condiciones de estrés (Coutard *et al.*, 2007; Jiang y Chai, 1996; Oliver *et al.*, 1991, 1995; Oliver, 2005; Parada *et al.*, 2016; Ramaiah *et al.*, 2002; Srinivasan *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2008; Whitesides y Oliver, 1997). Obviamente, estos hechos dificultan la detección y enumeración bacterianas en los sistemas naturales mediante técnicas basadas en el cultivo.

Además, es de resaltar que los medios de cultivo diseñados para la detección de *Vibrio* spp. están dirigidos principalmente a entornos clínicos. Un ejemplo de ello es el medio selectivo TCBS, el cual fue inicialmente diseñado para el aislamiento de especies del género *Vibrio* de carácter patógeno en muestras clínicas y, hoy en día, es uno de los más empleados para dicho fin (Harwood *et al.*, 2004). Su uso permite diferenciar *V. cholerae* de *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* en base a la fermentación de la sacarosa. Sin embargo, la validez del uso de este medio para el aislamiento de especies del género *Vibrio* a partir de muestras ambientales es cuestionable (Lotz *et al.*, 1983; West *et al.*, 1982), ya que el Agar TCBS parece ser un medio inhibitorio para muchas de las especies del género *Vibrio* frecuentes en los entornos marinos (Simidu *et al.*, 1980). Y, aunque en diversos estudios se considere como el mejor medio de aislamiento para el género *Vibrio* (Karunasagar *et al.*, 1986; Morris *et al.*, 1979), Cleland *et al.* (1985) determinaron que solamente el 51% de los aislamientos provenientes del medio TCBS realmente pertenecían a este género.

Para hacer frente a esta problemática, se han desarrollado y perfeccionado otro tipo de técnicas de detección y recuento que no requieren cultivo. Técnicas basadas en el uso de sondas prediseñadas en el laboratorio que hibridan con ARN han demostrado ser de gran utilidad para la detección y discriminación de microorganismos. Estas sondas son secuencias específicas y conocidas de una especie, género o grupo determinado que, al ser marcadas con moléculas cromógenas o fluorogénicas, permiten identificar, distinguir y discriminar entre especies, géneros o grupos de microorganismos de interés (Di Pinto *et al.*, 2011). En concreto, las sondas que hibridan con el ARN ribosómico han resultado exitosas (Amann *et al.*, 1995; Atlas y Bartha, 1998; Pace, 1996) debido a la baja tasa de evolución de sus dianas.

Una de estas técnicas para la detección y recuento de bacterias basada en el uso de sondas es el método FISH (Fluorescence *In situ* Hybridization) que permite diferenciar entre microorganismos (identificación filogenética) y realizar estudios cuantitativos de poblaciones específicas en muestras naturales sin necesidad de cultivo (Amann *et al.*, 1990, 1996; DeLong *et al.*, 1999; Giovannoni *et al.*, 1988; Hoshino *et al.*, 2008). Esta técnica utiliza células fijadas (manteniendo intactas sus características) e implica un proceso de hibridación con oligonucleótidos, marcados con fluorocromos, que son complementarios a regiones del ARNr

16S. De esta forma, las bacterias que hibriden con la sonda emitirán fluorescencia y podrán ser posteriormente observadas y enumeradas mediante microscopía de epifluorescencia.

No obstante, el método FISH presenta limitaciones. En el ambiente, las bacterias se encuentran expuestas a situaciones de estrés como escasez o ausencia de nutrientes en las cuales el crecimiento bacteriano sería muy lento incluso nulo y presentando un número de ribosomas reducido (Cabral, 2010; DeLong *et al.*, 1999). En estas condiciones, la fluorescencia emitida por estas bacterias podría estar por debajo del nivel de detección del método FISH a pesar de las mejoras que se han propuesto, como empleo de fluorocromos más intensos (Alfreider *et al.*, 1996) o sondas polinucleotídicas que porten un gran número de fluorocromos (Amann *et al.*, 1996; Trebesius *et al.*, 1994).

La técnica CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *In situ* Hybridization) (Pernthaler *et al.*, 2002, 2004) supone una mejora al FISH convencional que permite la enumeración de bacterias en muestras ambientales. En el CARD-FISH, a la sonda se le unen peroxidasas de rábano picante (HorseRadish Peroxide, HRP) y la muestra se incuba con una solución de tiramida marcada con un fluorocromo mediante actividad peroxidasa. La HRP, en presencia de peróxido de hidrógeno, convierte la tiramida en un radical intermedio el cual reacciona con compuestos aromáticos, como los residuos de tirosina de las células (Kubota, 2013). Cada HRP cataliza la deposición de un gran número de tiramidas aumentando la sensibilidad del FISH en comparación con las sondas de un único fluorocromo, por lo que su empleo puede aumentar hasta 20 veces la fluorescencia emitida por las células respecto al FISH estándar (Schonhuber *et al.*, 1997). La sencillez del CARD-FISH, sumada a la disponibilidad comercial de las soluciones necesarias y al incremento de la fluorescencia en bacterias con bajo contenido en ribosomas, hace del CARD-FISH un método ideal para el estudio de microorganismos marinos como *Vibrio* spp., que suelen presentar problemas de detección con la técnica FISH convencional (Oberbeckmann *et al.*, 2011). Sin embargo, la capacidad de detectar microorganismos del método es dependiente de la especificidad de la sonda respecto a las células diana. El CARD-FISH depende de un diseño adecuado y específico de la sonda y esto es, en muchas ocasiones, difícil de conseguir, como es en el caso del género *Vibrio*, dada su diversidad (Thompson *et al.*, 2004a, b). Así, en la bibliografía se describen diversas sondas con diferente especificidad (Girard *et al.*, 2017; Giuliano *et al.*, 1999; Heidelberg *et al.*, 2002; Hugget, 2008; Kim y Jeong, 2001; Moreno *et al.*, 1999; Oberbeckmann *et al.*, 2011; Sussman *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2015a).

4. Supervivencia de *Vibrio* spp.

Las condiciones óptimas de crecimiento no suelen ocurrir de manera habitual en ambientes los sistemas naturales y, menos aún, mantenerse de forma continuada; de manera que las poblaciones bacterianas suelen encontrarse expuestas a condiciones ambientales cambiantes y estresantes. En estas condiciones, la capacidad de adaptación bacteriana a las variables condiciones ambientales determina su supervivencia (Dorman, 1996; Kramer *et al.*, 2006).

En su ambiente, *Vibrio* está continuamente expuesto a cambios ambientales de parámetros físico-químicos (temperatura, salinidad, radiación luminica, disponibilidad de nutrientes etc.) y/o interacciones con otros organismos (competición, parasitismo y, especialmente, depredación) (Li *et al.*, 2014; Oliver, 2010; Parada, 2016; Roszak y Colwell, 1987; Vattakaven *et al.*, 2006). Entre las estrategias que las bacterias del género *Vibrio* pueden adoptar para adaptarse al ambiente, destacan la entrada en el estado VNC, la adhesión a superficies bióticas y abióticas y/o la reducción del tamaño celular.

En el caso de numerosas especies bacterianas, la variación en las condiciones ambientales induce la expresión del fenotipo VNC (Oliver, 2010; Roszak y Colwell, 1987). Este fenotipo se relaciona con una mayor resistencia al ambiente (Signoretto *et al.*, 2000) y las poblaciones que lo adoptan pueden incluso conservar su virulencia (Baffone *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2014; Oliver, 2010). Además, varios estudios indican que el estado VNC es reversible, pudiendo recuperarse las células y reanudar el crecimiento cuando las condiciones ambientales vuelven a ser favorables (Oliver, 2010; Ramamurthy *et al.*, 2014). En cualquier caso, este proceso de recuperación denominado resucitación, no parece un fenómeno universal aplicable a todas las bacterias que adoptan el estado VNC (Arana *et al.*, 2007; Kolling y Matthews, 2001; Ziprin *et al.*, 2003).

Se ha descrito que diversas especies del género *Vibrio* adoptan el estado VNC (Amel *et al.*, 2008; Biosca *et al.*, 1996; Jiang y Chai, 1996; Johnston y Brown, 2002; Lutz *et al.*, 2013; Oliver *et al.*, 1995; Ramaiah *et al.*, 2002; Stretton *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 2008; Wolf y Oliver, 1992; Wong y Wang, 2004; entre otros). De hecho, varios miembros del género *Vibrio* se han estudiado como modelos para determinar las características principales de este estado y modelizar el tránsito al mismo (Oliver, 2015, 2016; Xu *et al.*, 1982); así como, establecer las condiciones ambientales que lo inducen (Jiang y Chai, 1996; Oliver, 2010; Vattakaven *et al.*, 2006). Además, para *Vibrio* spp. existen múltiples referencias que ponen de manifiesto su capacidad de resucitación sea tras el cambio de las condiciones ambientales (Bates y Oliver, 2004; Nilsson *et al.*, 1991; Oliver *et al.*, 1995; Whitesides y Oliver, 1997; Wong *et al.*, 2004) o la exposición a determinados estímulos (Gupte *et al.*, 2003; Lleo *et al.*, 2001; Magariños *et al.*, 1997).

Por otra parte, diversos estudios han descrito, en bacterias sometidas a estrés, cambios morfológicos como la disminución de tamaño y adquisición de una morfología cocoide que se asocia al fenotipo VNC (Chen y Chen, 2014; Jiang y Chai, 1996; Smith y Oliver, 2006; Vattakaven *et al.*, 2006). Sin embargo, otros autores han comprobado que esta variación morfológica es independiente de la entrada en el estado VNC (Kaberdin *et al.*, 2015; Orruño *et al.*, 2019) y ocurre, incluso, en poblaciones sometidas a estrés, fundamentalmente ayuno, y que no pierden su cultivabilidad. En cualquier caso, este cambio morfológico se considera una estrategia de supervivencia que permite minimizar los requerimientos del metabolismo de mantenimiento e incrementar la toma de nutrientes al aumentar la relación superficie/volumen (Biosca *et al.*, 1996; Jiang y Chai, 1996).

La capacidad de adherirse a superficies bióticas o abióticas se ha relacionado estrechamente con la respuesta al estrés (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; Landini, 2009) estando ésta capacidad influenciada por la temperatura, la escasez/ausencia de nutrientes o la salinidad (Karunasagar y Otta, 1996). Diversos autores han demostrado que las bacterias del género *Vibrio* tienen capacidad de adherirse a superficies abióticas (Nakhamchik *et al.*, 2008; Watnick *et al.*, 1999; Yip *et al.*, 2006), incluso a plásticos, acero o losas de cemento (Karunasagar y Otta, 1996). Del mismo modo, los microorganismos son capaces de adherirse a superficies bióticas como otros organismos vivos en condiciones de estrés ambiental (Hall-Stoodley *et al.*, 2004; O'Brien y Sizemore, 1979), proceso que también realizan bacterias del género *Vibrio* (Castro-Rosas y Escartin, 2002). Se considera que la adhesión a superficies podría incrementar la probabilidad de supervivencia al facilitar la toma de nutrientes en condiciones de escasez de los mismos (Dawson *et al.*, 1981; Kjelleberg y Hermansson, 1984), hacer frente a la depredación (Sun *et al.*, 2013, 2015b) o establecer relaciones comensales con algunas poblaciones de zooplancton (Colwell y Huq 1994; Pruzzo *et al.*, 2008).

Estas estrategias (observables) de adaptación son desencadenadas por procesos moleculares de respuesta al estrés. Estos cambios moleculares pueden basarse en variaciones en la expresión de proteínas en respuesta al entorno (Madigan *et al.*, 2015). Así, se ha demostrado síntesis de nuevas proteínas, por ejemplo asociadas al mantenimiento de la cultivabilidad (Heim *et al.*, 2002; Kvint *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 1998), de respuesta al estrés térmico u oxidativo, al ayuno, a cambios de pH, etc. (Groat *et al.*, 1986; Jaan *et al.*, 1986; Jones *et al.*, 1987; Perrot *et al.*, 2000), y se han descrito descensos significativos en la síntesis de proteínas en células sometidas a estrés osmótico o ayuno (Abdallah *et al.*, 2009, 2012; Roth *et al.*, 1988).

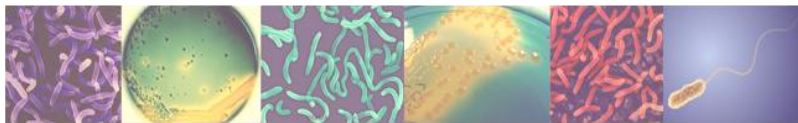
Dada la complejidad del estudio del proteoma bacteriano completo, es habitual el análisis de únicamente estructuras subcelulares (Andersen *et al.*, 2003; Josic *et al.*, 2008; Pasquali *et al.*, 1999). Las envueltas celulares están en contacto con el medio circundante (siendo la membrana externa la primera barrera entre la célula y las condiciones medioambientales cambiantes) y determinan la estructura celular. Diversos autores indican que el estudio de las variaciones en el subproteoma de estas envueltas es una herramienta útil para estudiar los procesos de adaptación al estrés ambiental (Abdallah *et al.*, 2009, 2012; Citterio *et al.*, 2004; Darcan *et al.*, 2009; Gayoso *et al.*, 2014; Kao *et al.*, 2009; Lai *et al.*, 2009; Nikaido y Vaara, 1985; Özkanca y Flint, 2002; Xu *et al.*, 2005).

Entre los factores ambientales abióticos que condicionan la persistencia de *Vibrio* en los sistemas acuáticos y que promueven las respuestas fenotípicas y moleculares descritas, destaca la temperatura. Para gran parte de los vibrios, las bajas temperaturas reducen la capacidad de cultivo (induciendo la entrada en el estado VNC) (Abia *et al.*, 2016; Asakura *et al.*, 2007; Kaberdin *et al.*, 2015; Montánchez *et al.*, 2014; Nowakowska y Oliver, 2013; Parada *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2008), mientras que las temperaturas más elevadas aumentan la abundancia de las poblaciones (Vezzulli *et al.*, 2013) o mejoran su persistencia (Montánchez *et al.*, 2019). La salinidad es otro factor influyente (Di *et al.*, 2017; Johnson, 2013; Takemura *et al.*, 2014). *Vibrio* spp. ha sido generalmente considerado un grupo bacteriano halófilo (Soto *et al.*, 2010); no obstante, las altas salinidades que pueden encontrarse en el océano abierto (35‰) pueden inhibir el crecimiento de *Vibrio* spp. (Davis *et al.*, 2017; Oliver, 2015). Del mismo modo, las bajas concentraciones de sal tienen un efecto negativo en la capacidad de supervivencia de muchos vibrios, comprometiendo su cultivabilidad (Armada *et al.*, 2003; Eguchi *et al.*, 2000). En los sistemas acuáticos naturales, la concentración de nutrientes es escasa y variable, intercalándose breves períodos de abundancia de nutrientes con largos períodos de escasez (Atlas y Bartha, 1998). El efecto de la concentración de nutrientes en las comunidades bacterianas ha sido estudiada por diversos autores (Fuhrman *et al.*, 2006; Gilbert *et al.*, 2009; Morris *et al.*, 2005) ya que la disponibilidad y distribución de recursos nutricionales puede determinar la estructura de las comunidades (Church, 2008). De hecho, la composición y estructura de las comunidades de *Vibrio* spp. está determinada entre otros factores, por la disponibilidad de recursos en el medio ambiente (Eiler *et al.*, 2007; Fierer *et al.*, 2007; Hibbing *et al.*, 2010; Roller y Schmidt, 2015; Wong *et al.*, 2019). Además, en las zonas más superficiales de los sistemas acuáticos, la incidencia de la luz solar podría condicionar la supervivencia de *Vibrio* spp. En los océanos, las radiaciones ultravioleta e infrarroja, componentes del espectro de la radiación solar, apenas pueden penetrar el primer metro de agua, mientras que la radiación visible puede descender hasta profundidades de 200 m determinando la zona fótica. El efecto de la radiación solar y sus componentes sobre la supervivencia/permanencia de las poblaciones microbianas en los sistemas acuáticos ha sido estudiado (Coohill y Sagripanti, 2009; Lipovsky *et al.*, 2008; Muela *et al.*, 2002). Diversos autores (Arana *et al.*, 2007; Coohill y Sagripanti, 2009; Hernroth *et al.*, 2009; Pommepuy *et al.*, 1992, 1996) han demostrado la inducción de la pérdida de cultivabilidad y/o viabilidad bacteriana, incluidas bacterias del género *Vibrio* (Abboudi *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2011; Booth *et al.*, 2001; Malara *et al.*, 2017; Nakahashi *et al.*, 2014).

Por otra parte, la supervivencia y persistencia de las bacterias en sus hábitats naturales depende también de las complejas interacciones que se producen entre las comunidades microbianas (Hibbing *et al.*, 2010; Sherr y Sherr, 2002; Sime-Ngando, 2014). Los bacteriófagos y los protistas heterotrófos resultan clave para controlar la diversidad y la abundancia de las bacterias marinas (Fuhrman, 1999; Sun *et al.*, 2013; Wommack y Colwell, 2000). Esta depredación equilibra la densidad bacteriana del sistema (Sanders *et al.*, 1992; Sherr *et al.*, 1989) y contribuye al proceso de regeneración de nutrientes que utilizarán las propias bacterias (Caron *et al.*, 1988; Fenchel y Harrison, 1976; Jürgens y Sala, 2000) promoviendo así la producción bacteriana (Posch *et al.*, 1999). A su vez, la presencia, la actividad y el comportamiento de los depredadores también están influenciados por variaciones en parámetros ambientales como la temperatura (Atkinson *et al.*, 2003).

En la Comunidad Autónoma Vasca no existen estudios centrados en el análisis de la distribución de *Vibrio* spp., a pesar de que puede suponer un riesgo a nivel sanitario, económico y ambiental, más aun considerando los previsibles cambios en el medio marino derivados del cambio climático (http://coastalwarming.com/data_global.html). El efecto de la variación de los parámetros ambientales que previsiblemente acontecerán en las décadas futuras es incierto. Así como su efecto sobre las poblaciones y comunidades microbianas y las consecuencias medioambientales de mas mismas. Por ello, resulta necesario conocer las características de las poblaciones de *Vibrio* spp., estudiar su comportamiento ante la exposición a distintos parámetros ambientales y conocer las bases moleculares de estos procesos adaptativos. De este modo, sería posible establecer la dinámica temporal de *Vibrio* spp., que permitiría el desarrollo de modelos predictivos para la monitorización de los ambientes costeros y, así, poder anticipar y prevenir los riesgos para la salud (humana y animal) y las pérdidas económicas ligadas a la presencia de *Vibrio* spp. (Tall *et al.*, 2012; Vezzulli *et al.*, 2013).

OBJETIVOS



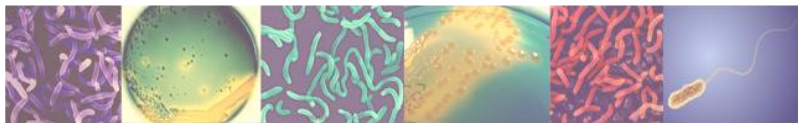
A tenor de lo anteriormente expuesto se plantearon los siguientes objetivos:

- 1.** Establecer la distribución y dinámica espacio-temporal de *Vibrio* spp. en aguas costeras del golfo de Vizcaya.
 - 1.1. Adecuar el método CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In situ* Hybridization) para la detección de *Vibrio* spp. en muestras de agua de mar y verificar su idoneidad.
 - 1.2. Enumerar las comunidades bacterianas totales y de *Vibrio* spp. en la costa vasca a lo largo de un ciclo anual.
- 2.** Establecer el efecto de factores ambientales abióticos y bióticos en la permanencia de *Vibrio* spp. en los sistemas acuáticos
 - 2.1. Caracterizar las estrategias de adaptación de las bacterias del género *Vibrio* a la variación de los factores ambientales abióticos.
 - 2.2. Determinar el efecto de las comunidades microbianas del agua de mar sobre la supervivencia de *Vibrio*.
- 3.** Caracterizar los cambios moleculares que, a nivel del subproteoma de las envueltas celulares, experimenta *V. harveyi* durante la adaptación a condiciones adversas.

OBJETIVO 1

Distribución y dinámica espacio-temporal de *Vibrio* spp. en aguas costeras del golfo de Vizcaya.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Adecuación de la técnica CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In situ* Hybridization) para la detección de *Vibrio* spp.

La enumeración de *Vibrio* spp. en muestras de agua del golfo de Vizcaya se realizó utilizando el protocolo CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In situ* Hybridization) descrito por Pernthaler *et al.* (2004) con algunas modificaciones. En un primer paso, se realizó la selección de una sonda específica para la detección y enumeración de *Vibrio* spp. Posteriormente, se llevó a cabo la estandarización del protocolo CARD-FISH. Y finalmente, se examinó la validez del protocolo para la detección específica de bacterias del género *Vibrio* en suspensiones microbianas generadas en el laboratorio a partir de microorganismos de colección y/o ambientales.

1.1. Elección de las sondas para la detección y enumeración de *Vibrio* spp.

Se realizó una búsqueda sistemática en bases de datos de literatura científica (Science Direct, Springer, Google Scholar, NCBI) utilizando combinaciones de palabras clave como “*Vibrio*”, “detection”, “specific probe”, “CARD-FISH” y “environmental”. No se consideraron los artículos publicados hace más de 20 años. Las sondas mencionadas en los artículos encontrados en la búsqueda bibliográfica se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Sondas de oligonucleótidos dirigidas a ARNr 16S de bacterias del género *Vibrio* recogidas en la literatura científica de los últimos 20 años. Se muestra la secuencia, la posición de referencia en *Escherichia coli* (<https://www.arb-silva.de/search/testprobe/>), la población con la que hibridan y referencias para cada sonda.

SONDA	SECUENCIA (5'→3')	Gen ARNr 16S	HIBRIDA CON	REFERENCIA
GV841	AGGCCACAACCTCCAAGTAG	822	Género <i>Vibrio</i> (excepto <i>V. cholerae</i> y <i>V. mimicus</i>)	Giuliano <i>et al.</i> , 1999; Eilers <i>et al.</i> , 2000; Arboleda y Reidchart, 2009; Tada <i>et al.</i> , 2009; Oberbeckmann, 2012; Girard <i>et al.</i> , 2017
MS6	AGTTTACATTGCGACC	893	<i>V. shiloi</i>	Sussman <i>et al.</i> , 2003
Vchomin 1276	ACTTTGTGAGATTCGCTCCACCTCG	1266	<i>V. cholerae</i> , <i>V. mimicus</i>	Heidelberg <i>et al.</i> , 2002 Schauer <i>et al.</i> , 2012
VIB	ACAGTACTCTAGTCTGCCAG	642	Género <i>Vibrio</i>	Moreno <i>et al.</i> , 1999; Cañigral, 2011
Vib 1	GTGGTAGTGTTAATAGCACT	453	<i>V. vulnificus</i>	Kim y Jeong, 2001
Vib 2	TCTAGCGGAGACGCTGGA	1005		
Vib 3R	GCTCACTTTCGCAAGTTGGCC	1256		
Vib-16S-1	AGGAGCTTCGCTTGC	181	Género <i>Vibrio</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2015a
VIB572a	ACCACCTGCATGCGCTTT	571	Género <i>Vibrio</i> (ocasionalmente <i>Photobacterium</i> y <i>Listonella</i>)	Hugget <i>et al.</i> , 2008; Pereira <i>et al.</i> , 2011; Bellés-Garulera <i>et al.</i> , 2016; Girard <i>et al.</i> , 2017
VIB572b	ACCGCTGCATGCGCTTT	571	<i>Vibrio Photobacterium</i>	Hugget, 2008
Vib749	TCGCATCTGAGTGTCAGT	748	<i>Vibrio Aliivibrio</i>	Girard <i>et al.</i> , 2017
Vvul3	TCCTCAGACTGAAAG	435	<i>V. vulnificus</i>	Heidelberg <i>et al.</i> , 2002

Se realizó una selección entre las sondas de oligonucleótidos dirigidas a secuencias específicas ubicadas en diferentes posiciones en el gen ARNr 16S. Se priorizaron aquellas sondas pudieran hibridar con la mayoría de las especies pertenecientes al género *Vibrio* y no limitadas a la detección de 1 o pocas especies. En base a este criterio, se seleccionaron tres sondas: GV841 (Giuliano *et al.*, 1999), Vib-16S-1 (Zhang *et al.*, 2015a) y VIB572a (Hugget *et al.*, 2008) (Tablas 2 y 3). El resto de sondas fueron descartadas por su baja especificidad o por no abarcar la diversidad del género *Vibrio*.

La cobertura y especificidad de cada una de las sondas seleccionadas se estimó utilizando la base de datos SILVAref104 ARNr 16S (a partir de ahora SILVA), sección TestProbe (<https://www.arb-silva.de/search/testprobe/>) (Pruesse *et al.*, 2007) (Tabla 2); y la herramienta informática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Tabla 3).

Tabla 2. Cobertura (Cob) y especificidad (Esp), expresados como porcentajes, para las sondas GV841, Vib-16S-1 y VIB572a (base de datos SILVA). Se muestran aquellos taxones cuyos valores superan el 75% para ambas características en alguna de las tres sondas analizadas.

TAXÓN	GV 841		Vib-16S-1		VIB572a	
	Cob (%)	Esp (%)	Cob (%)	Esp (%)	Cob (%)	Esp (%)
Alteromonadales; Alteromonadaceae; Gayadomonas	0	0	100	99,3	0	0
Alteromonadales; Gallaecimonadaceae; Gallaecimonas	0	0	100	99,3	0	0
Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; endosymbionts10	0	0	100	99,3	0	0
Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Candidatus</i> Photodesmus	50	99,3	100	99,3	25	99,3
Aeromonadales; Aeromonadaceae; Oceanisphaera	0	0	94,4	99,3	0	0
Pasteurellales; Pasteurellaceae; <i>Avibacterium</i>	0	0	94,1	99,3	0	0
Alteromonadales; Alteromonadaceae; <i>Catenovulum</i>	0	0	92,3	99,3	0	0
Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Vibrio</i>	89,9	99,9	92,1	99,9	94	100
Vibrionales	78	100	76,1	99,9	78,9	100
Vibrionales; Vibrionaceae	78	100	76,1	99,9	78,9	100
Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Aliivibrio</i>	60,2	99,4	1,4	99,3	95,6	99,4
Vibrionales; Vibrionaceae; <i>Catenococcus</i>	93,8	99,3	56,3	99,3	93,8	99,3

Tabla 3. Cobertura (QC, query cover %), identidad (Iden, identity %), coincidencia (Match, matches) y valor E (E value, probabilidad de encontrar la secuencia - entre todos los organismos - dentro de esta base de datos), para las sondas GV841, Vib-16S-1 Y VIB572a (base de datos BLAST). Se muestran aquellos taxones cuyos valores superan el 75% en cobertura e identidad en alguna de las tres sondas analizadas.

TAXÓN	GV 841				Vib-16S-1				VIB572a			
	QC (%)	IDEN (%)	Match	E	QC (%)	IDEN (%)	Match	E	QC (%)	IDEN (%)	Match	E
Alteromonadales; Alteromonadaceae; <i>Gayadomonas</i>	75	100	8/20	0,53	43	100	7/16	2,7	94	88,24	15/18	0,11
Alteromonadales; Gallaeicimonadaceae; <i>Gallaecimonas</i>	70	92,86	13/20	25	43	100	7/16	774*	77	92,86	13/18	19*
Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; endosymbionts10	100-90	100	20/20 - 18/20	-0,025 - 0,40	87	100	14/16	100*	77	100	14/18	99*
Vibionales; Vibrionaceae; <i>Candidatus Photodesmus</i>	100	100	20/20	4 10 ⁻⁷ *	62	100	7/16	13	100	100	18/18	5 10 ⁻⁶ *
Aeromonadales; Aeromonadaceae; <i>Oceanisphaera</i>	45	100	9/20	138	100	100	12/16	0,029*	77	92,86	13/18	30*
Pasteurellales; Pasteurellaceae; <i>Avibacterium</i>	40	100	8/20	449*	100	100	12/16	1*	44	100	10/18	385*
Alteromonadales; Alteromonadaceae; <i>Catenovulum</i>	40	100	8/20	497*	100	100	8/16	0,3*	94	88,24	15/18	108*
Vibionales; Vibrionaceae; <i>Vibrio</i>	100	100	20/20	0,004	100	100	16/16	0,49*	100	100	18/18	0,031
Vibionales	100	100	20/20	0,004	100	100	16/16	0,51*	100	100	18/18	0,033
Vibionales; Vibrionaceae	100	100	20/20	0,004	100	100	16/16	0,51*	100	100	18/18	0,033
Vibionales; Vibrionaceae; <i>Allivibrio</i>	100	100	20/20	1 10 ⁻⁴	100	100	13/16	0,92*	100	100	18/18	0,002
Vibionales; Vibrionaceae; <i>Catenococcus</i>	100	100	20/20	2 10 ⁻⁷	50	100	7/16	6,7	100	100	18/18	2 10 ⁻⁶

* La sonda es complementaria a regiones del genoma no pertenecientes al ARNr 16S.

De acuerdo con la información aportada por SILVA, y aunque la especificidad de las 3 sondas era similar, la sonda Vib-16S-1 mostraba una cobertura completa y una especificidad del 99,3% con los géneros *Gayadomonas*, *Gallaecimonas* y *Candidatus Photodesmus* y grupo enterosimbiontes¹⁰ e índices de cobertura muy elevados con los géneros *Avibacterium* y *Oceanisphoera*, entre otros. Estos resultados no se obtuvieron para las sondas GV841 y VIB572a. De un modo similar, los datos obtenidos con la base de datos BLAST, indicaron que la sonda Vib-16S-1 podía ser complementaria de regiones del genoma no pertenecientes al ARNr 16S de especies del género *Vibrio*. Además, para los géneros *Oceanisphoera*, *Avibacterium* y *Catenovulum* mostraba una cobertura e identidad completas.

Por tanto, dada su escasa idoneidad y especificidad *in silico* (bases de datos SILVA y BLAST), hacia el género *Vibrio* se descartó la sonda Vib-16S-1 (Zhang *et al.*, 2015a). Se seleccionaron las sondas GV841 (Giuliano *et al.*, 1999) y VIB572a (Hugget *et al.*, 2008).

1.2. Procedimiento estandarizado

El procedimiento CARD-FISH estandarizado, que se esquematiza en la Figura 2, se desarrolló en varios pasos. El protocolo se testó inicialmente con suspensiones de *Escherichia coli* utilizando la sonda Colinsitu (Regnault *et al.*, 2000).

1.2.1. Fijación y filtración de muestras (Paso 1)

Con el fin de preservar la morfología y conformación espacial de los microorganismos durante el proceso de marcaje, las suspensiones celulares y las muestras de agua de mar (descritas más adelante, la Tabla 6 (Objetivo 1, Materiales y Métodos, apartado 1.3) se sometieron a fijación con paraformaldehído (PFA) al 4% (v/v) (Anexo 1). En el caso de las experiencias realizadas con suspensiones celulares preparadas en el laboratorio, se fijaron volúmenes de 25 mL con 25 mL de PFA. En el caso de las muestras de agua de mar, se mezclaron 200 mL de muestra con 100 mL de PFA. En ambos casos, las mezclas se preservaron a 4°C durante 24 h.

Posteriormente, las muestras se filtraron a través de un filtro de policarbonato de 47 mm de diámetro y de 0,2 µm de diámetro de poro (GTTP, Millipore). Los filtros se lavaron 2 veces con agua MilliQ estéril para eliminar el PFA y se dejaron secar a temperatura ambiente en cabina de bioseguridad. Los filtros secos se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento.

1.2.2. Protección de las células mediante embebido en agarosa (Paso 2)

Para evitar la pérdida de células durante los procesos de permeabilización y de hibridación, los filtros se impregnaron por ambas caras con una solución de agarosa al 0,1% (p/v) mantenida a temperatura de 35-40°C. Posteriormente, se dejaron secar sobre un soporte de cristal, durante 20-30 min.

1.2.3. Desactivación de peroxidasas endógenas (Paso 3)

Las peroxidasas endógenas (pseudoperoxidasas) al igual que las peroxidasas de rábano (HPR) pueden reaccionar con la tiramida utilizada en el Paso 7 (Figura 2) y emitir fluorescencia, incluso sin adición de sonda; por tanto, sin hibridación, y propiciar la aparición de falsos positivos. Para evitar esta situación, la aparición de falsos positivos, las peroxidasas endógenas se desactivaron sumergiendo los filtros en HCl 0,01 M durante 10 min. Posteriormente, los filtros se lavaron con tampón fosfato salino 1X estéril (Phosphate Buffered Saline, PBS) y agua MilliQ y se dejaron secar a temperatura ambiente.

1.2.4. Permeabilización con lisozima (Paso 4)

Para favorecer la entrada de la sonda-HRP, que el tamaño de HPR podría dificultar, es preciso permeabilizar la pared celular bacteriana. Para ello, los filtros se incubaron, a 37°C durante 1 h, en 2 mL de solución, recién preparada, de lisozima (10 g/L) (Anexo 1). Este volumen de solución de lisozima, doble del recomendado por Pernthaler *et al.* (2004), resultó más adecuado para el procesamiento de las muestras estudiadas en este trabajo.

A continuación, los filtros se lavaron con agua MilliQ y etanol absoluto y se dejaron secar a temperatura ambiente. Tras este paso, los filtros se almacenaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

En el caso de las suspensiones que contenían bacterias Gram positivas, tras el tratamiento con lisozima, los filtros se sumergieron en solución de acromopeptidasa (concentración final de 60 U/mL) (Anexo 1) a una temperatura de 37°C durante 30 min. Posteriormente, los filtros se lavaron con agua MiliQ (2 veces) y etanol absoluto, se dejaron secar al aire y se almacenaron a -20°C hasta su posterior procesamiento.

1.2.5. Hibridación (Paso 5)

Para favorecer la hibridación, los filtros se recortaron en 16 secciones triangulares y se sumergieron en 900 µL de tampón de hibridación (Anexo 1) junto con 3 µL de sonda-HRP (50 ng/µL) (proporción 300:1) para filtros provenientes de suspensiones de cultivos axénicos; y 9 µL de la sonda-HRP (50 ng/µL) (proporción 300:3) para muestras compuestas por mezclas de microorganismos o agua de mar. Las sondas marcadas con HRP (Biomers.net GmbH) se diluyeron con agua MilliQ estéril hasta una concentración final de 50 ng/µL, se dividieron en alícuotas de 30 µL y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

El filtro seccionado se hibridó durante 2 h a la temperatura adecuada para la hibridación de las sondas testadas: 46°C para la sonda VIB572a (Huggett *et al.*, 2008) y, 49°C en el caso de la sonda GV 841 (Giuliano *et al.*, 1999). Para la sonda Colinsitu utilizada para testar el protocolo, la temperatura fue de 52°C (Regnault *et al.*, 2000).

A pesar de que para la sonda VIB572a se indica que el tampón de hibridación requiere formamida al 40% (8 mL de formamida + 6 mL de agua MiliQ), se comprobó que se obtenían resultados similares con formamida al 30% (6 mL de formamida + 8 mL de agua MiliQ). Por ello, en este trabajo se utilizó formamida al 30%.

Las condiciones de hibridación específicas para cada una de las dos sondas seleccionadas se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones para CARD-FISH específicas para las sondas GV841 (Giuliano *et al.*, 1999) y VIB572a (Huggett *et al.*, 2008). Se muestran los volúmenes y porcentajes de formamida (FA), agua MiliQ y NaCl indicados en la bibliografía y los finalmente utilizados en este estudio; así como, las temperaturas de hibridación y de lavado.

Sonda	Tª hibridación (°C)	Tª lavado (°C)	%FA		Volumen FA (mL; hibridación)		Volumen MiliQ (mL; hibridación)		NaCl 5M (µL; lavado)	
			Teórico	Utilizado	Teórico	Utilizado	Teórico	Utilizado	Teórico	Utilizado
GV841	49	42	30%	30%	6	6	8	8	640	640
VIB572a	46	48	40%	30%	8	6	6	8	270	640

1.2.6. Lavado (Paso 6)

Los filtros se introdujeron en tampón de lavado (Anexo 1) durante 5 min con el fin de eliminar fragmentos de sonda no hibridados y evitar uniones inespecíficas. La temperatura del tampón de lavado condiciona la eficiencia de la hibridación y es específica de cada sonda, por tanto, para la sonda VIB572a se precalentó a 48°C, para la sonda GV 841, a 42°C y, para la sonda Colinsitu, a 37°C. Además, la cantidad de NaCl en el tampón de lavado determina la eficacia de la hibridación. Se verificó que la adicción de 640 µL de NaCl 5 M ofrecía resultados óptimos. Por último, los filtros se lavaron en PBS 1X durante 10-15 min a temperatura ambiente.

1.2.7. Reacción CARD (Paso 7)

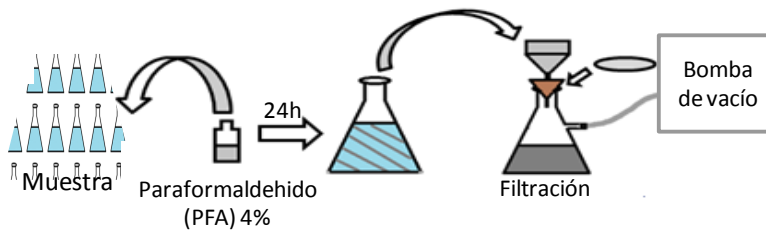
Con la finalidad de aumentar la emisión de fluorescencia, los filtros se introdujeron en tubos Eppendorf que contenían 1 mL de tampón de amplificación (Anexo 1), 10 µL del stock de 100X de H₂O₂ (30% v/v) y 4 µL de tiramida reconstituida marcada con el fluoróforo ALEXA Fluor 488 (0,5 mg/mL) (Thermo Fisher Scientific) y se incubaron, en oscuridad, a 42°C durante 15 min. Todos los pasos posteriores se realizaron en oscuridad.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los filtros se lavaron con PBS 1X durante 10 min y, posteriormente, bajo un flujo constante de agua destilada estéril durante 6 min. A continuación, se sumergieron en agua MilliQ estéril y etanol absoluto y se dejaron secar a temperatura ambiente, en oscuridad, sobre papel absorbente. Las secciones se almacenaron a -20°C hasta su observación al microscopio de epifluorescencia.

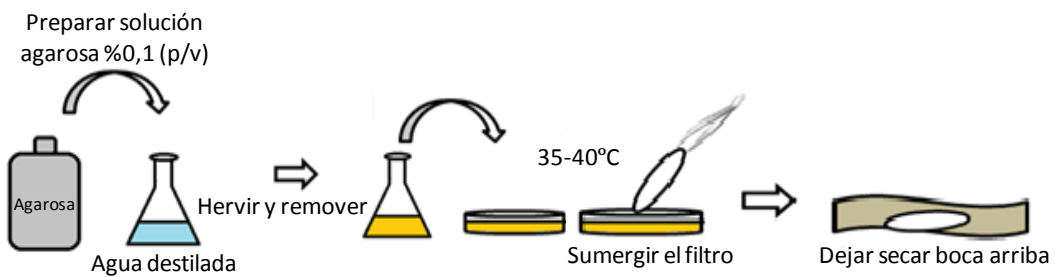
1.2.8. Montaje para microscopía (Paso 8)

Para la detección de microorganismos en las secciones del filtro, éstas se tiñeron con DAPI-Mix (1 µg/mL, Thermo Fisher Scientific; Anexo 1). Este fluorocromo se une a las regiones enriquecidas en adeninas y timinas del ADN, siendo una técnica de tinción especialmente adecuada para la enumeración de células. Los filtros se examinaron con un microscopio de epifluorescencia Eclipse E-400 (Nikon), equipado con un bloque de filtros formado por un filtro B-2A (filtro de excitación EX 450-490, espejo dicróico DM 505 y filtro barrera BA 520). De este modo se permite la detección únicamente de las células que hayan hibridado con la sonda y que están, por tanto, marcadas con el fluoróforo ALEXA Fluor 488 (máximo de absorción a 488 nm y máximo de emisión a 520 nm). Las células marcadas con el fluoróforo ALEXA Fluor 488 emiten fluorescencia verde y un filtro UV-2A (filtro de excitación EX 330-380, espejo dicróico DM 400 y filtro barrera BA 420) permite observar los microorganismos totales, teñidos con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, máximo de absorción a 359 nm y máximo de emisión a 461 nm) que emiten fluorescencia azul. Se enumeraron las bacterias que emitían fluorescencia verde en 50 campos y se extrapó al número de bacterias totales/mL.

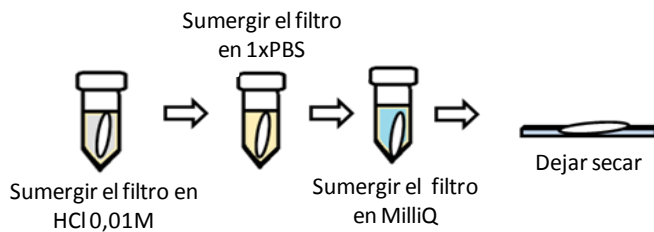
1- Fijación de la muestra



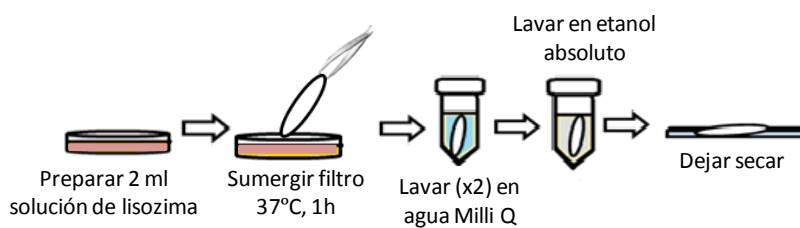
2- Embebido en agarosa



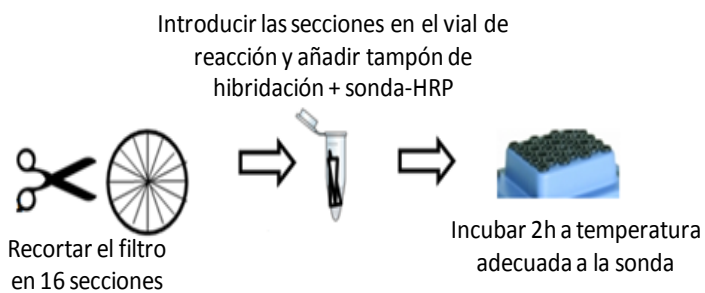
3- Inactivación de peroxidasa endógenas



4- Permeabilización con lisozima



5- Hibridación



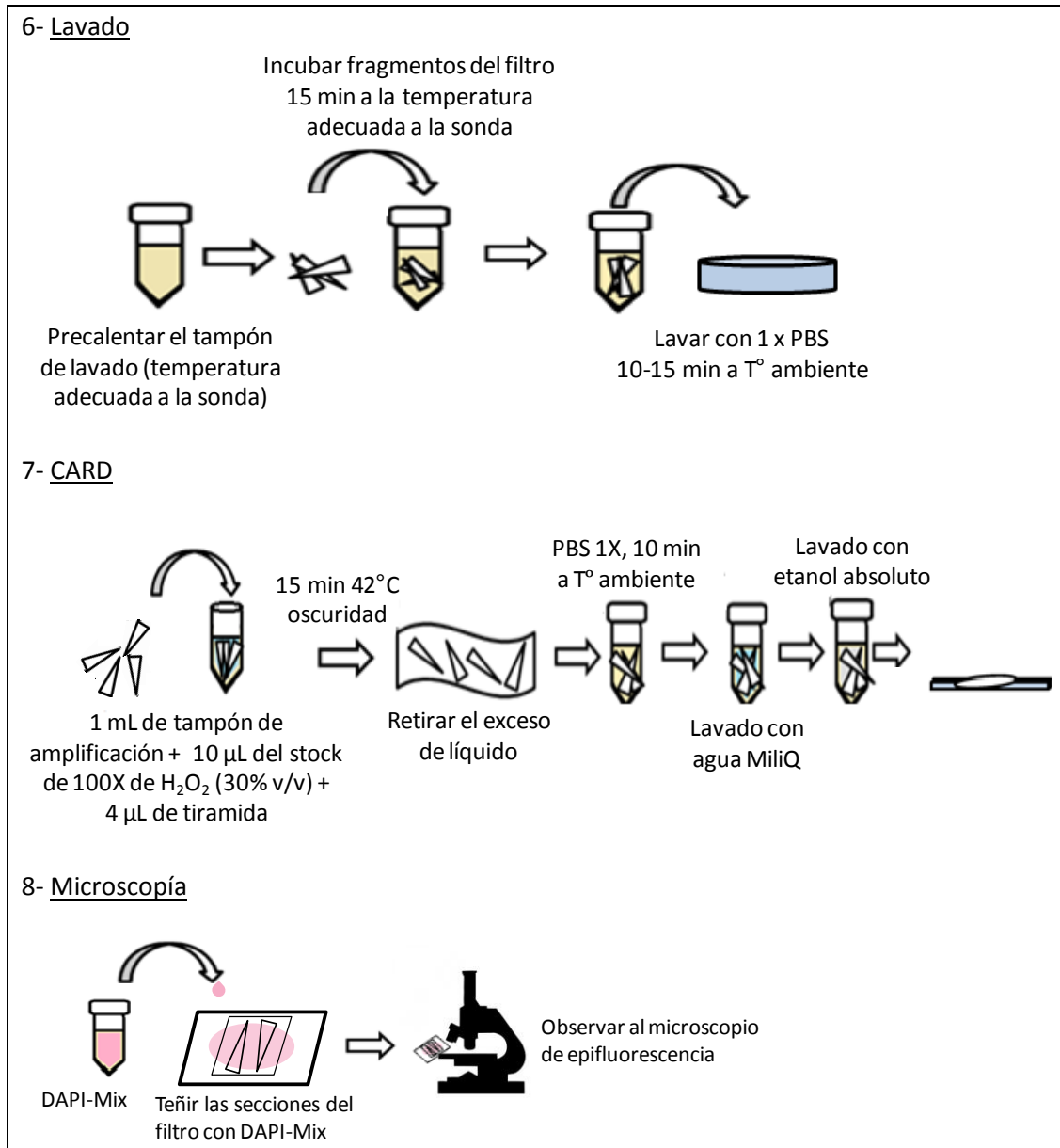


Figura 2. Esquema de CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In situ* Hybridization) aplicado a bacterias planctónicas.

1.3. Verificación de la idoneidad de las sondas

Para verificar la idoneidad de las sondas seleccionadas (GV841 y VIB572a) se comprobó la capacidad de hibridar de las mismas con diferentes tipos bacterianos y un hongo unicelular (Tabla 5). Las cepas utilizadas se conservaron a -80°C mediante el sistema Pro-lab Diagnostics™ Microbank™. Las condiciones de recuperación y crecimiento se ajustaron al tipo de microorganismo (Tabla 5). Así, las diferentes especies de *Vibrio* se crecieron en Caldo Marino (CM, AppliChem) incubado a 26°C; *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus* en Caldo Triptona Soja (TSB, Panreac) a 30°C; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter freundii* y *Staphylococcus aureus* en TSB a 37°C y *Saccharomyces cerevisiae* en Caldo Dextrosa y Patata (Pronadisa) a 20°C. Los cultivos se incubaron durante 24 h y las células se recogieron mediante centrifugación (4.000 g, 20 min).

Tabla 5. Microorganismos utilizados para preparar las suspensiones.

Microorganismo	Tipo	Morfología
<i>Vibrio harveyi</i> CECT 525	Bacteria Gram negativa	Forma de coma
<i>V. harveyi</i> ambiental*	Bacteria Gram negativa	Forma de coma
<i>V. cyclitrophicus</i> ambiental*	Bacteria Gram negativa	Forma de coma
<i>V. kanaloae</i> ambiental*	Bacteria Gram negativa	Forma de coma
<i>V. tubiashii</i> ambiental*	Bacteria Gram negativa	Forma de coma
<i>Escherichia coli</i> CECT 416	Bacteria Gram negativa	Cocobacilo
<i>Serratia marcescens</i> CECT 159	Bacteria Gram negativa	Bacilo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CECT 108	Bacteria Gram negativa	Bacilo
<i>Citrobacter freundii</i> CECT 401	Bacteria Gram negativa	Bacilo
<i>Bacillus subtilis</i> CECT 40	Bacteria Gram positiva	Bacilo
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 240	Bacteria Gram positiva	Coco
<i>Micrococcus luteus</i> CECT 245	Bacteria Gram positiva	Coco
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CECT 1383	Hongo unicelular	Ovalada

*Aislados e identificados a partir de muestras de agua de mar según se describe en el Objetivo 1, Materiales y Métodos, apartado 3.

A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones microbianas (Tabla 6) dirigidas a testar la idoneidad de las sondas seleccionadas para la detección y la cuantificación diferenciadas de *Vibrio* spp.

Tabla 6. Suspensiones de microorganismos y finalidad de su utilización.

Tipo de muestra		Objetivo
Nombre	Suspensión de microorganismos	
A	<i>V. harveyi</i> CECT 525	Control positivo (colección)
B	<i>V. harveyi</i> ambiental*	Control positivo (ambiental)
C	<i>E. coli</i> CECT 416 <i>S. marcescens</i> CECT 159 <i>P. aeruginosa</i> CECT 108 <i>C. freundii</i> CECT 401	Control negativo (bacterias Gram negativas)
D	<i>V. harveyi</i> CECT 525 <i>E. coli</i> CECT 416 <i>St. aureus</i> CECT 240 <i>B. subtilis</i> CECT 40 <i>M. luteus</i> CECT 245	Detección selectiva de <i>Vibrio</i>
E	<i>V. harveyi</i> CECT 525 <i>V. harveyi</i> ambiental* <i>V. cyclitrophicus</i> ambiental* <i>V. kanaloae</i> ambiental* <i>V. tubiashii</i> ambiental*	Detección de distintas especies del género <i>Vibrio</i>
F	<i>V. tubiashii</i> ambiental* <i>V. kanaloae</i> ambiental* <i>V. cyclitrophicus</i> ambiental*	Detección de distintas especies de género <i>Vibrio</i>
G	<i>Sac. Cerevisiae</i> CECT 1383	Control negativo

*Aislados e identificados a partir de muestras de agua de mar según se describe en el Objetivo 1, Materiales y Métodos, apartado 3.

Las suspensiones se realizaron en agua de mar recogida de la estación de muestreo del puerto de Armintza (Bizkaia [UTMX UTM Y, 508469 4808997]) y sometida a filtraciones secuenciadas (filtros con un diámetro de poro de 8; 0,8; 0,45 y 0,22 μm ; membranas de mezcla de ésteres, Merck Millipore) y, posteriormente, esterilizada en autoclave (121°C durante 20 min). Para obtener las suspensiones A, B y G, controles positivos y negativo (Tabla 6), 25 μL de agua de mar tratada se inocularon con 25 μL de suspensión microbiana. La densidad microbiana final para estas suspensiones fue de 10^6 células/mL. Para realizar las mezclas de microorganismos, suspensiones C, D, E y F (Tabla 6), 25 μL de agua de mar se inocularon con volúmenes iguales de cada suspensión individual de microorganismo, siendo la densidad final de cada uno de ellos de aproximadamente 10^5 células/mL.

2. Enumeración de *Vibrio* spp. en la costa vasca a lo largo de un ciclo anual

2.1. Área de muestreo

Para determinar la presencia del género *Vibrio* en las costas vizcaínas se recogieron muestras de agua de mar superficial de tres puntos de muestreo: playa de Laida (UTMX UTM Y, 525727 4805277); bahía de Astondo (UTMX UTM Y, 504468 4807543) y puerto de Armintza (UTMX UTM Y, 508469 4808997) (Figura 3). Las recogidas se realizaron mensualmente a partir de octubre de 2014 hasta julio de 2015 (exceptuando los meses de enero y junio) utilizando botellas de vidrio esterilizadas en autoclave a 121°C durante 20 min. Durante las mismas se determinó la temperatura del agua utilizando un termómetro y consultando en la página web de Euskalmet (www.euskalmet.euskadi.eus).

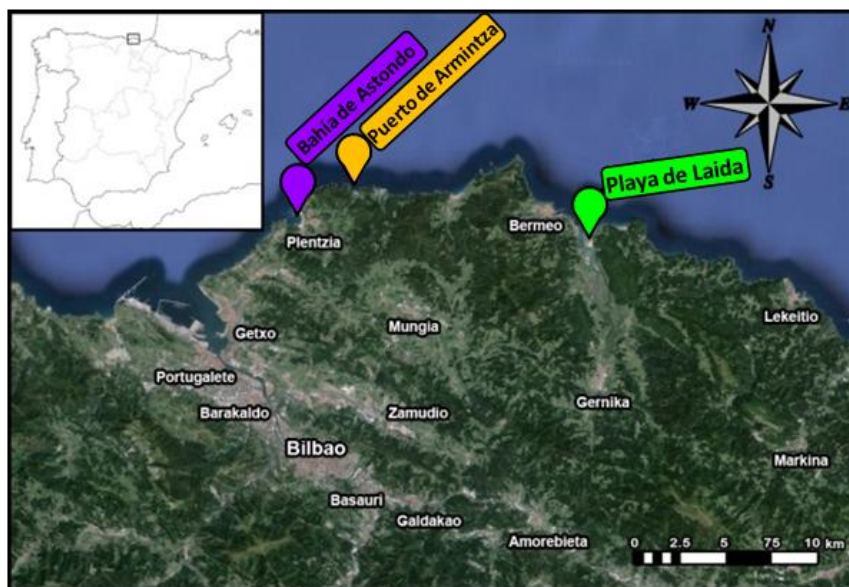


Figura 3. Mapa aéreo de la costa vizcaína donde se muestran las zonas de muestreo. Imagen modificada de Google Maps (maps.google.es). Playa de Laida (●), puerto de Armintza (●) y bahía de Astondo (●).

Además, a lo largo de un año, de mayo de 2018 a febrero de 2019, trimestralmente se recogieron muestras de agua de mar procedentes de 15 estaciones de muestreo de la “Red de seguimiento del estado ecológico de las aguas de transición y costeras de la Comunidad Autónoma del País Vasco” (Figura 4, Tabla 7). Las estaciones de muestreo fueron clasificadas en tres grupos dependiente a la proximidad a la costa: aguas costeras, aguas de mar abierto y aguas de transición. Las recogidas fueron llevadas a cabo por AZTI siguiendo sus protocolos habituales de trabajo.



Figura 4. Mapa aéreo de la costa vasca donde se muestran las zonas de muestreo. Imagen modificada de Google Maps (maps.google.es). Aguas costeras (●), mar abierto (●) y aguas de transición, salida estuario (●).

Tabla 7. Estaciones de muestreo (Sistema de Coordenadas: European Datum 1950, UTM zona 30N). Se muestra el nombre de la estación, unidad hidrológica, localización de la estación y coordenadas.

Estación	Tipo de estación	Unidad hidrológica	Localización de la estación	COORDENADAS	
				UTMX	UTMY
L-N10	Aguas costeras	Ibaizabal	Litoral del Abra (frente al superpuerto)	493466	4803512
E-N30	Aguas costeras	Ibaizabal	Abra Exterior	496435	4801048
L-N20	Aguas costeras	Ibaizabal	Litoral de Sopelana	498434	4805360
L-B20	Aguas costeras	Butroe	Litoral de Bakio	516022	4810728
L-RF30	Mar abierto	Butroe	Litoral frente a Bakio	516170	4816448
L-OK10	Aguas costeras	Oka	Litoral de Mundaka	524251	4810031
L-L10	Aguas costeras	Lea	Litoral de Elantxobe (Kai Arri)	533700	4805814
L-RF20	Mar abierto	Deba	Litoral frente a Deba	556687	4805561
L-U10	Aguas costeras	Urola	Litoral de Zumaia	561520	4796532
L-O20	Aguas costeras	Oria	Litoral de Getaria	566590	4796395
L-UR20	Aguas costeras	Urumea	Litoral de Mompás	584831	4799191
L-OI20	Aguas costeras	Oiartzun	Litoral de Pasaia (Asabaratzta)	589907	4801608
L-RF10	Mar abierto	Oiartzun	Plataforma continental-referencia	587651	4811946
L-BI10	Aguas costeras	Bidasoa	Litoral de Hondarribia	597114	4805780
E-BI20	Aguas de transición	Bidasoa	Hondarribia (Txingudi)	598131	4802793

Para cada recogida se anotaron las temperaturas de cada estación de muestreo (<http://www.meteociel.fr/observations-meteo/temperature-de-la-mer.php?region=sp>).

Las muestras se conservaron refrigeradas (4°C) hasta su procesamiento en las 24 h inmediatas a su recogida.

2.2. Procesamiento y análisis de las muestras

Las muestras se procesaron para determinar el número total de bacterias (Total Direct Count, TDC) en alícuotas teñidas con naranja de acridina (concentración final 0,01% [p/v]) y filtradas a través de membranas de policarbonato de 0,22 µm de diámetro de poro (GE Osmonics™). Los filtros se examinaron con un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400 (Objetivo 1, Materiales y Métodos, apartado 1.2) (Hobbie *et al.*, 1977). Para cada muestra se determinó el número de bacterias en 20 campos y se extrapoló el número de bacterias totales/mL.

Las bacterias del género *Vibrio* se enumeraron con el método CARD-FISH empleando la sonda Vib572a según se describe en el Objetivo 1, Materiales y métodos, apartado 1.1. Se enumeraron las bacterias que fluorecían en verde en 50 campos y se extrapoló al número de *Vibrio* totales/mL.

El número de bacterias quimioorganotrofas cultivables se estimó mediante siembra en Agar Marino (AM, AppliChem) y el número de *Vibrio* spp. presuntivos cultivables mediante siembra por extensión y por concentración en Agar Thiosulphate Citrate Bile salts Sucrose (TCBS, Fluka). Las placas se incubaron a 26°C durante 96 h. Como diluyente, en todos los casos, se utilizó solución salina estéril (NaCl, 1,94% [p/v]).

3. Aislamiento e identificación de vibrios

A partir de las placas de Agar TCBS sembradas para cada una de las recogidas realizadas en los 3 puntos de muestreo del litoral vizcaíno, se seleccionaron y aislaron 8 colonias de apariencia típica; 4 colonias verdes y 4 amarillas. Los aislamientos se realizaron en AM y tras 24 h de incubación a 26°C, se realizaron el test de la oxidasa utilizando una solución de N,N-dimetil-p-fenilendiaminadihidrocloruro (Fluka) y la tinción de Gram. Posteriormente, 161 aislamientos Gram negativos y oxidasa positivos se identificaron utilizando galerías API 20E (BioMerieux) usando como diluyente solución salina estéril (NaCl, 1,94% [p/v]). Tras la incubación de las galerías durante 24 h a 26°C, el perfil bioquímico obtenido se comprobó mediante el software APIweb (<https://apiweb.biomerieux.com>). Los aislados identificados como *Vibrio* spp. mediante las galerías API 20E se conservaron a -80°C utilizando el sistema de preservación de bacterias Microbank™ (Pro-Lab Diagnostics).

Para posteriores estudios, 12 cepas de *Vibrio* aisladas sobre Agar TCBS, procesadas con el sistema API 20E, se identificaron mediante secuenciación de 8 genes, el gen ARNr 16S y análisis MLSA de 7 genes *housekeeping* (*gapA*, *ftsZ*, *topA*, *mreB*, *gyrB*, *pyrH* y *recA*) previamente estudiados por otros autores (Sawabe *et al.*, 2007, 2013; Thompson *et al.*, 2005). La extracción del ADN de estas cepas ambientales se llevó a cabo utilizando el Kit #GeneJET Genomic DNA Purification (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de cultivos de 2 mL de Caldo Marino (CM, Sigma Aldrich) incubados a 26°C durante 24 h. Los pares de primers específicos para la amplificación de PCR (análisis de la reacción en cadena de la polimerasa) se tomaron de estudios previos (Mao *et al.*, 2012; Sawabe *et al.*, 2007, 2013;

Thompson *et al.*, 2005) (Anexo 2). La PCR se llevó a cabo con una concentración de primers de 0,5 μ M y concentración de ADN de 5 μ M. Las condiciones de la PCR se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Programa térmico de la reacción PCR para la amplificación de una secuencia parcial del gen ARNr 16S y los 7 genes *housekeeping*.

ARNr 16S			
Número de ciclos	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	
1	10	95	
30	30	95	
	30	53	
	60	72	
1	600	72	
7 genes <i>housekeeping</i>			
Número de ciclos	Tiempo (s)	Temperatura (°C)	Observaciones
1	60	98	
35	30	98	
		56	Pareja de primers: <i>gapA</i> , <i>gyrB</i> , <i>pyrH</i> , <i>recA</i>
		62	Pareja de primers: <i>ftsZ</i> , <i>topA</i>
		59	Pareja de primers: <i>mreB</i>
	30	72	
1	600	72	

La calidad de los productos amplificados fue examinada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% agarosa, 1X TBE (AppliChem) y 0,5X GelRed (Biotium). Se hicieron correr 5 μ L de cada una de las muestras, mezclados con 1 μ L de 6x ADN Gel Loading Dye (Thermo Scientific), con un voltaje constante de 125 V durante 1 h. Como marcador de peso molecular se utilizó Gene Ruler 1 Kb ADN Ladder Plus (Thermo Scientific). Los fragmentos de ADN fueron visualizados en el gel utilizando un equipo de transiluminación UV G:Box (Syngene). Las amplificaciones que produjeron bandas claras y del tamaño esperado en el gel de electroforesis se tomaron por válidas.

A continuación, los productos de PCR se purificaron utilizando el Kit #GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La concentración de ADN se estimó con el sistema de cuantificación de alta precisión Nanodrop ND-8000 (Thermo Fisher Scientific) y la pureza del producto amplificado se estableció mediante Bioanalyzer 2100 (Agilent). Las muestras se remitieron para su secuenciación a la Unidad SGIker de Secuenciación y Genotipado (UPV/EHU).

Las secuencias de los genes se analizaron mediante la herramienta informática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Tras la identificación presuntiva realizada mediante el análisis de la secuencia ARNr 16SA, todas las cepas identificadas como *Vibrio* spp., así como aquellas que resultaron en una identificación negativa, fueron analizadas para la determinación de grupo y especie. Para ello se realizó el análisis de las secuencias de los 7 genes *housekeeping*.

4. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos se analizaron con el programa Microsoft Excel. Para la determinación de la presencia del género *Vibrio* en las costas vizcaínas en la campaña 2014-2015, los resultados obtenidos (densidades celulares) se transformaron a logaritmos decimales. Además, se realizaron medias de los resultados de los muestreos realizados en la misma época (época cálida o época fría).

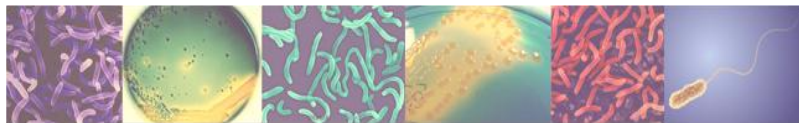
Para las experiencias dirigidas a testar la idoneidad de las sondas seleccionadas para la detección y la cuantificación diferenciadas de *Vibrio* spp. las densidades celulares se transformaron a porcentajes.

En ambos casos, las experiencias se realizaron por triplicado siendo los coeficientes de variación entre réplicas menores del 12%. Las diferencias entre medias se determinaron mediante análisis de la varianza: probabilidades menores o iguales a 0,05 se consideraron significativas.

OBJETIVO 1

Distribución y dinámica espacio-temporal de *Vibrio* spp. en aguas costeras del golfo de Vizcaya.

RESULTADOS



1. Adecuación de la técnica CARD-FISH (Catalyzed Reporter Deposition-Fluorescence *In situ* Hybridization) para la detección de *Vibrio* spp.

En la Tabla 9 se muestran los porcentajes de hibridación obtenidos para las sondas GV841 y ViB572a cuando se probaron con diferentes poblaciones microbianas.

Tabla 9. Porcentaje (\pm DE) de células que hibridaron con las sondas para las suspensiones de microorganismos testadas.

Suspensión		Porcentaje de células que hibridaron o hibridación positiva/negativa	
Nombre	Microorganismos en la suspensión	Sonda GV841	Sonda ViB572a
A	<i>V. harveyi</i> CECT 525	100	100
B	<i>V. harveyi</i> ambiental	100	100
C	<i>E. coli</i> CECT 416 <i>S. marcescens</i> CECT 159 <i>P. aeruginosa</i> CECT 108 <i>C. freundii</i> CECT 401	ND*	ND
D	<i>V. harveyi</i> CECT <i>E. coli</i> CECT 416 <i>St. aureus</i> CECT 240 <i>B. subtilis</i> CECT 40 <i>M. luteus</i> CECT 245	7,5 (\pm 0,1)	21,0 (\pm 0,9)
E	<i>V. harveyi</i> CECT 525 <i>V. harveyi</i> ambiental <i>V. cyclitrophicus</i> ambiental <i>V. kanaloae</i> ambiental <i>V. tubiashii</i> ambiental	18,2 (\pm 0,2)	100
F	<i>V. tubiashii</i> ambiental <i>V. kanaloae</i> ambiental <i>V. cyclitrophicus</i> ambiental	ND	100
G	<i>S. cerevisiae</i> CECT 1383	ND	ND

* ND, no detectados.

Ambas sondas (GV841 y ViB572a) hibridaron con las cepas *V. harveyi* CECT 525 y *V. harveyi* ambiental, obteniéndose un 100% de células marcadas en las suspensiones A y B (control positivo) (Figuras 5 y 6). Para ambas cepas, el número de células determinado utilizando el filtro UV-2A, que permite observar las células totales teñidas con DAPI, y el de células que habían hibridado con la sonda fueron similares. Además, la emisión de fluorescencia atribuible a ALEXA Fluor 488 (verde) fue intensa.

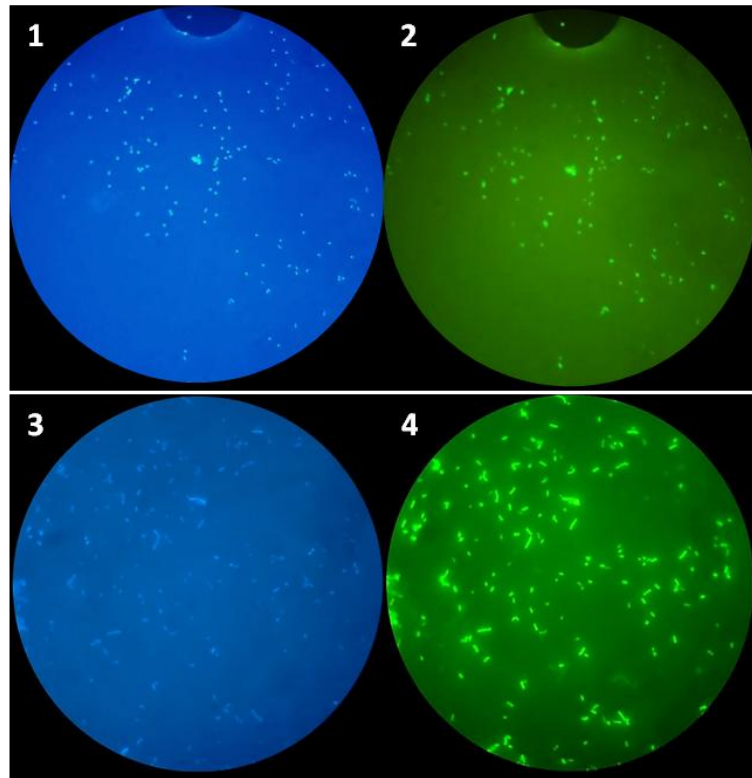


Figura 5. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión A (*V. harveyi* CECT 525) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000.

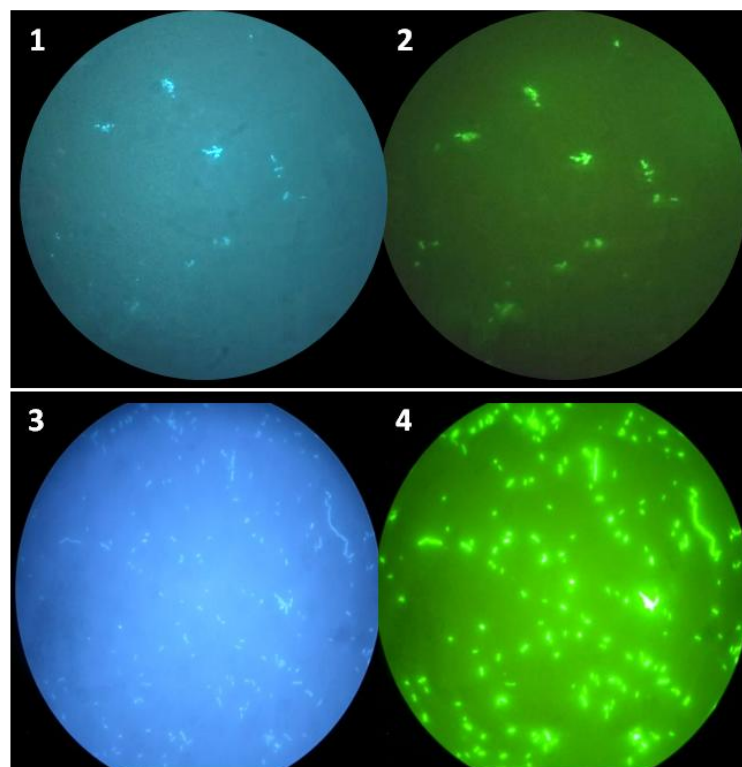


Figura 6. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión B (*V. harveyi* ambiental) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000.

La especificidad de las sondas se verificó utilizando las suspensiones C y D (Tabla 6). Para la suspensión C, compuesta por microorganismos no pertenecientes al género *Vibrio* (control negativo) no se detectaron células marcadas con ninguna de las sondas utilizadas (Figura 7, Tabla 9). En cambio, para la suspensión D, compuesta por una mezcla de microorganismos no pertenecientes género *Vibrio* y *V. harveyi* CECT 525, el 7,5% ($\pm 0,1$) y el 21% ($\pm 0,9$) de las células hibridaron con las sondas GV841 y VIB572a, respectivamente, y por tanto emitieron fluorescencia verde (Figura 8). Tanto las características morfológicas de estas células como su densidad concordaban con las de la población de *V. harveyi* CECT 525 inoculada.

En las suspensiones C y D, utilizando el filtro UV-2A (células teñidas con DAPI) (imágenes 1 y 3 de las Figuras 7 y 8) se observaron claramente distintas morfologías celulares (cocos, bacilos y cocobacilos).

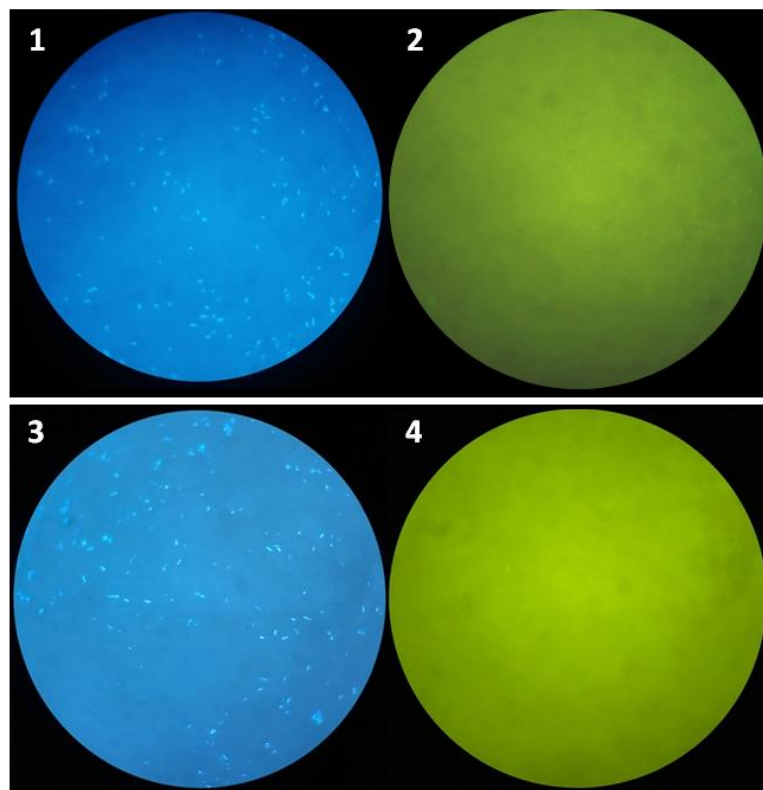


Figura 7. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión C (*E. coli* CECT 416, *S. marcescens* CECT 159, *P. aeruginosa* CECT 108, *C. freundii* CECT 401) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000.

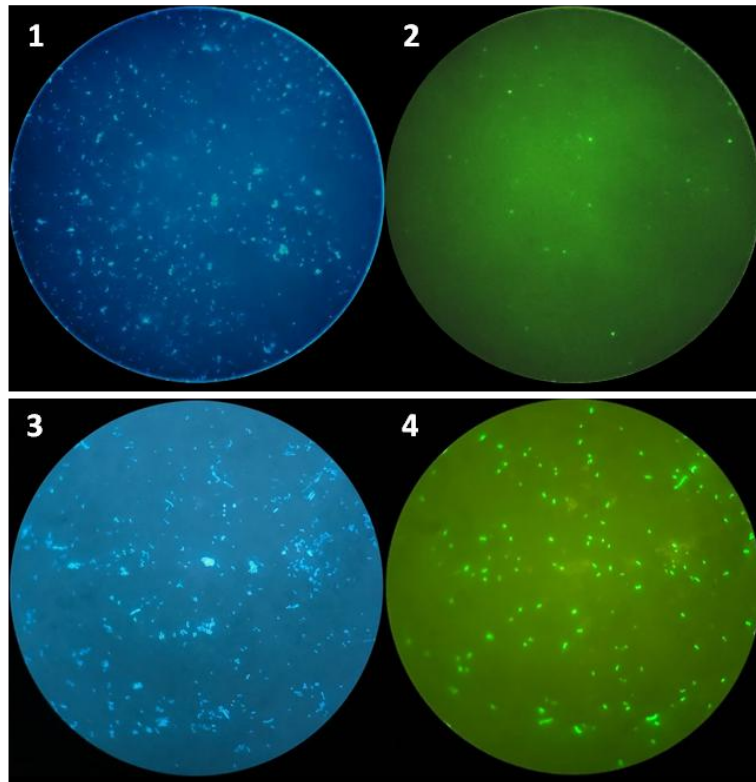


Figura 8. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión D (*V. harveyi* CECT 525, *E. coli* CECT 416, *St. aureus* CECT 240, *B. subtilis* CECT 40, *M. luteus* CECT 245) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000.

La detección de distintas especies del género *Vibrio* se testó utilizando las suspensiones E y F (Tabla 6). La suspensión E, compuesta por dos especies previamente testadas y que mostraban hibridación positiva (*V. harveyi* CECT 525 y *V. harveyi* ambiental) y tres aislados no testados (*V. cyclitrophicus*, *V. kanaloae*, *V. tubiashii*), rindió un porcentaje de hibridación del 100% con la sonda VIB572a, pero de únicamente 18,2% con la sonda GV841 (Figura 9).

La suspensión F, compuesta únicamente por tres especies de *Vibrio* ambiental (*V. cyclitrophicus*, *V. kanaloae* y *V. tubiashii*) rindió nuevamente un porcentaje de hibridación del 100% con la sonda VIB572a. En el caso de la sonda GV841, la hibridación fue negativa, no detectándose células con fluorescencia verde bajo el filtro B-2A (Figura 10).

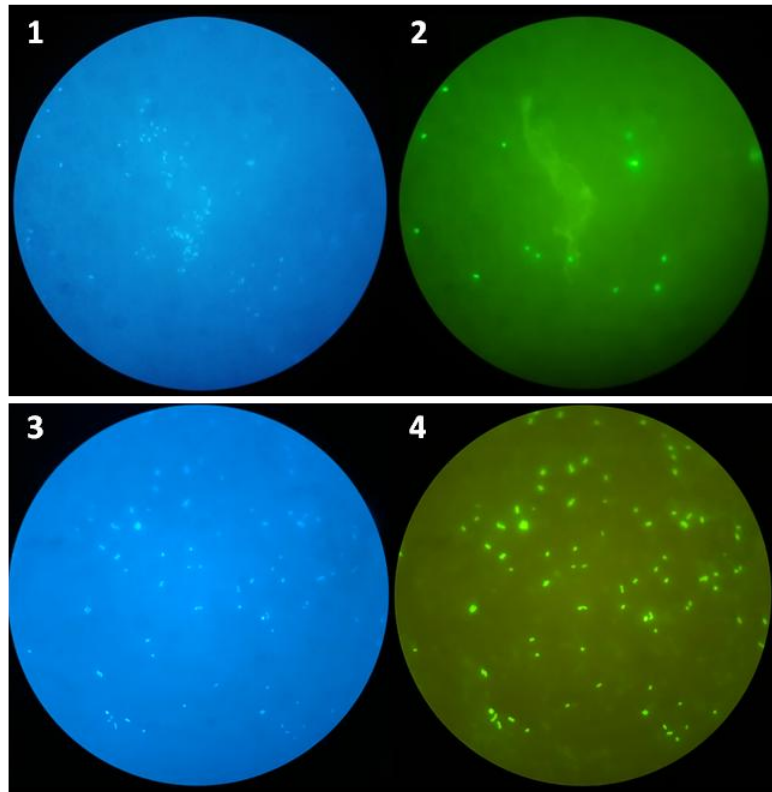


Figura 9. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión E (*V. harveyi* CECT 525 y vibrios ambientales: *V. harveyi*, *V. cyclitrophicus*, *V. kanaloae*, *V. tubiashi*) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000.

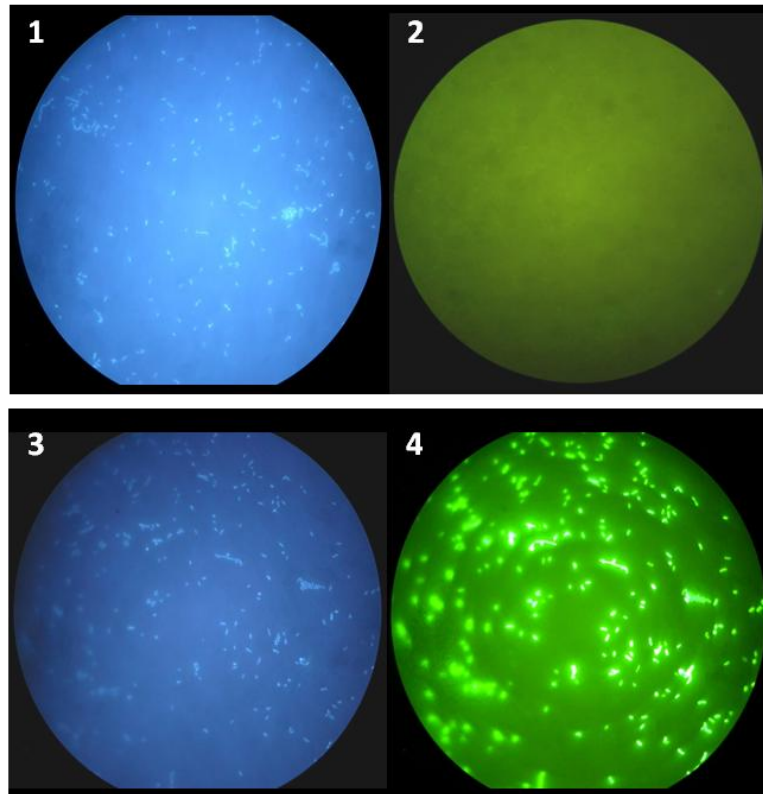


Figura 10. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la suspensión F (vibrios ambientales: *V. cyclitrophicus*, *V. kanaloae*, *V. tubiashi*) obtenidas tras CARD-FISH con las sondas GV841 (1 y 2) y VIB572a (3 y 4). Imágenes 1 y 3, células totales teñidas con DAPI (filtro UV-2A); imágenes 2 y 4, células que han hibridado con las sondas utilizadas (filtro B-2A). Aumento x1000.

Por último, y para descartar hibridación con células eucariotas, se prepararon y procesaron suspensiones de *Sac. cerevisiae* (suspensión H) no detectándose células que emitieran fluorescencia verde con ninguna de las sondas testadas (Tabla 9) (imágenes no mostradas).

En todos los casos que se detectó hibridación, la emisión de fluorescencia verde (células teñidas con ALEXA Fluor 488 y visualizables con el filtro B-2A), fue más intensa utilizando la sonda VIB572a respecto a la observada para la sonda GV841.

2. Enumeración de las comunidades bacterianas totales y de *Vibrio* spp. en la costa vasca a lo largo de un ciclo anual

2.1. Determinación de la presencia del género *Vibrio* en las costas vizcaínas (CAMPAÑA 2014-2015)

La variación, a lo largo del periodo de estudio, de la temperatura media del agua de mar de los tres puntos de muestreo se muestra en la Figura 11.

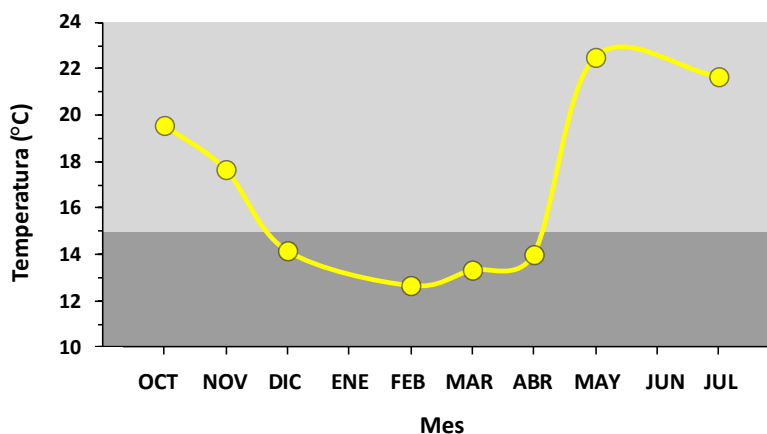


Figura 11. Variación de la temperatura del agua en los tres puntos a lo largo del periodo de estudio. Se diferencia la época cálida (gris claro) y época fría (gris oscuro).

Las variaciones en la temperatura del agua de mar permitieron diferenciar dos épocas: una época cálida (Mayo-Septiembre), en la cual las temperaturas superaron el umbral de los 15°C y se alcanzaron temperaturas máximas de 23°C, y una época fría (Diciembre-Julio), donde las temperaturas se situaron por debajo de los 15°C.

Atendiendo a las densidades bacterianas, obtenidas con cada uno de los métodos de enumeración utilizados, se obtuvieron resultados similares para los tres puntos de muestreo (Figura 12). Las densidades de bacterias totales, de bacterias quimioorganotrofas cultivables y de *Vibrio* spp. presuntivos obtenidas para las muestras recogidas en los meses correspondientes a la época cálida fueron ligeramente superiores ($p > 0,05$) a las determinadas para las muestras correspondientes a los meses de la época fría (Figura 13 y Tabla 10).

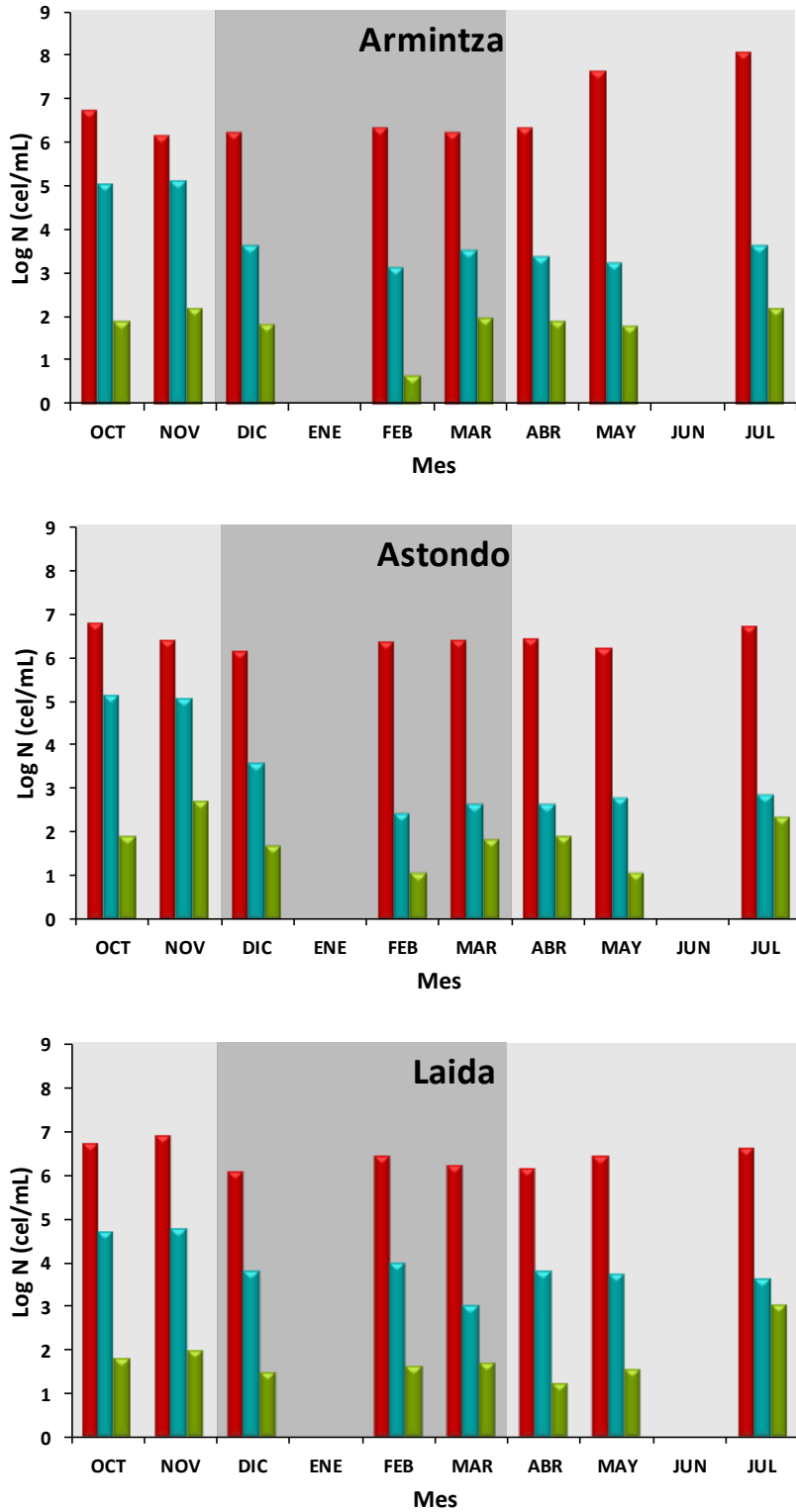


Figura 12. Distribución estacional de las poblaciones bacterianas determinadas en los 3 puntos de muestreo. Se indica la densidad de bacterias totales (■), bacterias quimioorganotrofas cultivables (■), y *Vibrio* spp. presuntivos (■). Se diferencian las épocas cálida (gris claro) y fría (gris oscuro).

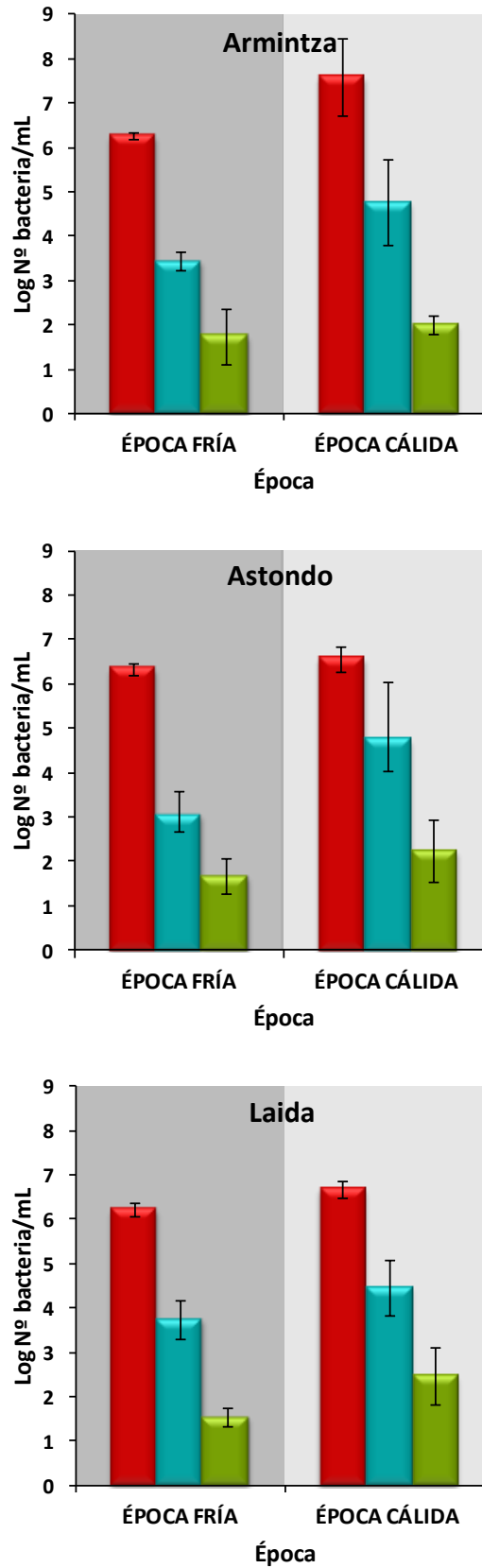


Figura 13. Distribución estacional de las poblaciones bacterianas determinadas en los 3 puntos de muestreo. Se indica la densidad de bacterias totales (■), bacterias quimioorganotrofas cultivables (■) y *Vibrio* spp. presuntivos (■). Se diferencian las épocas cálida (gris claro) y fría (gris oscuro).

La densidad de bacterias totales fue más elevada en la época cálida, casi 1 unidad logarítmica en el punto de muestreo de Armitza ($p > 0,05$). Sin embargo, en los otros dos puntos no se detectaron diferencias significativas.

Los valores de bacterias quimioorganotrofas cultivables fueron 2 o 3 unidades logarítmicas inferiores respecto a los de bacterias totales para los tres puntos estudiados, registrándose densidades más elevadas en la época cálida ($2,88 - 5,77 \cdot 10^4$ cel/mL) que en la fría ($1,17 - 5,67 \cdot 10^3$ cel/mL) ($p > 0,05$). El porcentaje de bacterias quimioorganotrofas cultivables respecto a las totales fue similar a lo largo del año en los puntos de muestreo de Armitza (aproximadamente de un 0,15%) y Laida (entre 0,34% y 0,60%). En cambio, para el punto de muestreo de Astondo, este valor fluctuó, obteniendo valores de 1,5% en la época cálida y 0,05% en la fría.

Como era de esperar, los recuentos en Agar TCBS de *Vibrio* spp. cultivables presuntivos arrojaron valores notablemente inferiores a los obtenidos en AM, no superando en ningún caso el 4% de las bacterias quimioorganotrofas cultivables. La densidad de vibrios presuntivos cultivables fue ligeramente superior en la época cálida ($1,02 - 2,98 \cdot 10^2$ cel/mL) que en la fría ($3,44 - 5,63 \cdot 10^1$ cel/mL).

Una parte de las colonias aisladas en Agar TCBS se sometió a un proceso de identificación bioquímica mediante el sistema API 20E. Como resultado, de los 161 aislados estudiados únicamente 47 fueron identificados como vibrios. Además, el porcentaje de identificaciones positivas fue el doble en la época cálida respecto a la fría (Tabla 10). Entre las bacterias identificadas como *Vibrio* spp. mediante API 20E, el 74% correspondían a la especie *V. vulnificus*, el 15% a *V. alginolyticus* y el 11% a *V. fluvialis* (11%).

Tabla 10. Distribución estacional del porcentaje de *Vibrio* spp. identificados respecto a *Vibrio* spp. presuntivos en época cálida y época fría, determinada en los 3 puntos de muestreo.

Punto de muestreo	Época cálida	Época fría
Armitza	18,75	35,71
Astondo	25	50
Laida	18,75	33,33

Entre las cepas identificadas positivamente como *Vibrio* spp., se seleccionaron 12 aislados para realizar una identificación molecular más precisa, primero mediante secuenciación parcial del gen ARNr 16S y posteriormente mediante análisis MLSA (Tabla 11). En la Figura 14 se muestran los resultados de la amplificación de las secuencias parciales del gen ARNr 16S (492 pb aproximadamente) obtenidos para los aislados seleccionados. En todos los casos se observó una correcta amplificación de dichas secuencias.

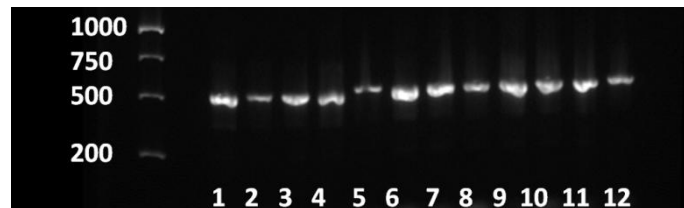


Figura 14. Resultados de las migraciones de la electroforesis en gel de agarosa de los amplicones de la secuencia parcial del gen ARNr 16S. Cada banda corresponde a una cepa seleccionada (cepas 1-12).

Tabla 11. Resultados obtenidos mediante los distintos sistemas de identificación utilizados (API 20E, ARNr 16S y MLSA) para las 12 cepas aisladas.

CEPA	API 20E			ARNr 16S	MLSA	
	Especie	Probabilidad (%)	Clado	Género	Especie	Clado
1	<i>V. vulnificus</i>	99,7	<i>Vulnificus</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. harveyi</i>	<i>Harveyi</i>
2	<i>V. vulnificus</i>	99,7	<i>Vulnificus</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. splendidus</i> <i>V. lentus</i> <i>V. crassostreae</i> <i>V. cyclitrophicus</i> <i>V. gigantis</i>	<i>Splendidus</i>
3	<i>V. vulnificus</i>	99,7	<i>Vulnificus</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. splendidus</i>	<i>Splendidus</i>
4	<i>V. fluvialis</i> <i>Pasteurella</i> spp.	32,8 62,1	<i>Cholerae</i>	<i>Oceanimonas</i> spp.	<i>V. campbelli</i>	<i>Harveyi</i>
					<i>V. crosai</i> <i>V. brasiliensis</i> <i>V. orientalis</i> <i>V. tubiashii</i>	<i>Orientalis</i>
5	<i>V. vulnificus</i>	92,2	<i>Vulnificus</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. tubiashii</i> <i>V. orientalis</i>	<i>Orientalis</i>
					<i>V. campbellii</i>	<i>Harveyi</i>
6	<i>V. vulnificus</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. mimicus</i>	49,8 22,9 15,2	<i>Vulnificus</i> <i>Cholerae</i> <i>Cholerae</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. crassostreae</i> <i>V. splendidus</i> <i>V. lentus</i> <i>V. gigantis</i>	<i>Splendidus</i>
					<i>V. tubiashii</i> <i>V. orientalis</i>	<i>Orientalis</i>
					<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>Splendidus</i>
7	<i>V. vulnificus</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. mimicus</i>	49,8 22,9 15,2	<i>Vulnificus</i> <i>Cholerae</i> <i>Cholerae</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. cyclitrophicus</i>	<i>Splendidus</i>
8	<i>V. vulnificus</i>	92,2	<i>Vulnificus</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. crassostreae</i> <i>V. splendidus</i> <i>V. lentus</i> <i>V. gigantis</i>	<i>Splendidus</i>
9	<i>V. fluvialis</i>	-	<i>Cholerae</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. tubiashii</i> <i>V. orientalis</i>	<i>Orientalis</i>
10	<i>V. fluvialis</i> <i>V. alginolyticus</i>	- 63,6	<i>Cholerae</i> <i>Harveyi</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. kanaloae</i>	<i>Splendidus</i>
11	<i>V. fluvialis</i>	-	<i>Cholerae</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. lentus</i> <i>V. splendidus</i> <i>V. crassostreae</i>	<i>Splendidus</i>
12	<i>V. vulnificus</i>	97	<i>Vulnificus</i>	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. tubiashii</i>	<i>Orientalis</i>

En cuanto a las identificaciones a nivel de género, los tres métodos coincidieron en el resultado para 11 de las 12 cepas analizadas, asignándolas al género *Vibrio*. En el caso de la cepa 4, tras la secuenciación del gen ARNr 16S se identificó como *Oceanimonas* spp., mientras que tanto la galería API 20E como el análisis MLSA la adscribieron al género *Vibrio*. En el caso de la identificación bioquímica, varios de los aislados no resultaron asignados a una única especie, si no que el método ofrecía más de una posible identificación.

Las galerías API 20E identificaron principalmente como especies pertenecientes al clado *Vulnificus* y, en menor medida, a *Cholerae*; no existiendo coincidencia con las adscripciones obtenidas mediante el análisis MLSA que rindió identificaciones pertenecientes a los clados *Splendidus* (7 cepas), *Orientalis* (4 cepas) y *Harveyi* (1 cepa).

Mediante MLSA, fue posible identificar 5 especies: *V. harveyi* (cepa 1), *V. splendidus* (cepa 3), *V. cyclitrophicus* (cepa 7), *V. kanaloae* (cepa 10) y *V. tubiashii* (cepa 12). Las cepas restantes no pudieron asignarse a una especie concreta.

2.2. Determinación de la presencia del género *Vibrio* en las aguas de transición y costeras de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAMPAÑA 2018-2019)

Durante la campaña 2018 – 2019 se llevó a cabo un estudio estacional en 15 puntos de muestreo situados a lo largo de la costa vasca. Además de constatar la presencia de *Vibrio* spp. en nuestras aguas costeras, también se determinaron las variaciones espacio-temporales en la distribución tanto de vibrios como de bacterias totales y quimioorganotrofas cultivables (Figura 15).

Las temperaturas medidas mostraron una evolución de época cálida (21 - 23°C) y época fría (11°C en invierno y, aproximadamente, 14°C en primavera y otoño) para todas las estaciones de muestreo estudiadas. Aunque los resultados obtenidos para las poblaciones bacterianas estudiadas variaban entre estaciones de muestreo y con la época del año, la densidad de bacterias totales (bacterias/mL) se situó en el rango de valores logarítmicos de 4,9 - 6,7, con unos valores máximos registrados en el muestreo de verano (6 - 6,7 log) (Figura 15). Las densidades de bacterias quimioorganotrofas cultivables (UFC/mL) experimentaron importantes variaciones tanto espaciales como estacionales, fluctuando entre un máximo de 6,3 log, registrado en otoño, y un mínimo de 2,4 log en verano. Igualmente, las densidades de *Vibrio* (*Vibrio* spp./mL), determinadas mediante CARD-FISH, fueron muy variables en función de época del año y estación de muestreo, con valores logarítmicos comprendidos entre 0,6 y 4,6. En este caso, los valores más bajos se determinaron en invierno (0,6 - 3,3). A su vez, las densidades de *Vibrio* spp. presuntivos cultivables (UFC/mL) oscilaron entre <1 y 3,7 unidades logarítmicas, con valores más elevados en otoño (1 - 3,7) y más bajos en primavera (<1 - 2,3).

Los porcentajes de bacterias cultivables en AM respecto a las bacterias totales se mostraron muy variables (0,01 - >60%), obteniéndose los porcentaje de cultivabilidad más bajos durante el verano (0,01 - 0,54%). En el caso de las poblaciones de *Vibrio* estimadas mediante CARD-FISH, este género representa un pequeño porcentaje del total de bacterias (No detectable - 1,5%, con un valor puntual de 6,3%). En cuanto a la población de bacterias cultivables en medio selectivo TCBS (vibrios presuntivos), esta supuso entre el 0,14 y el 84,88% de los vibrios totales.

Analizando los resultados por estaciones de muestreo, destacaron las estaciones de muestreo E-N 30, L-N 20 y E-BI 20 (Figura 15) por las elevadas densidades de bacterias quimioorganotrofas cutivables detectadas a lo largo del año. Las tres estaciones de muestreo de mar abierto (L-RF30, L-RF20 y L-RF10) rindieron los valores más bajos en cuanto a número de bacterias pertenecientes al género *Vibrio*.

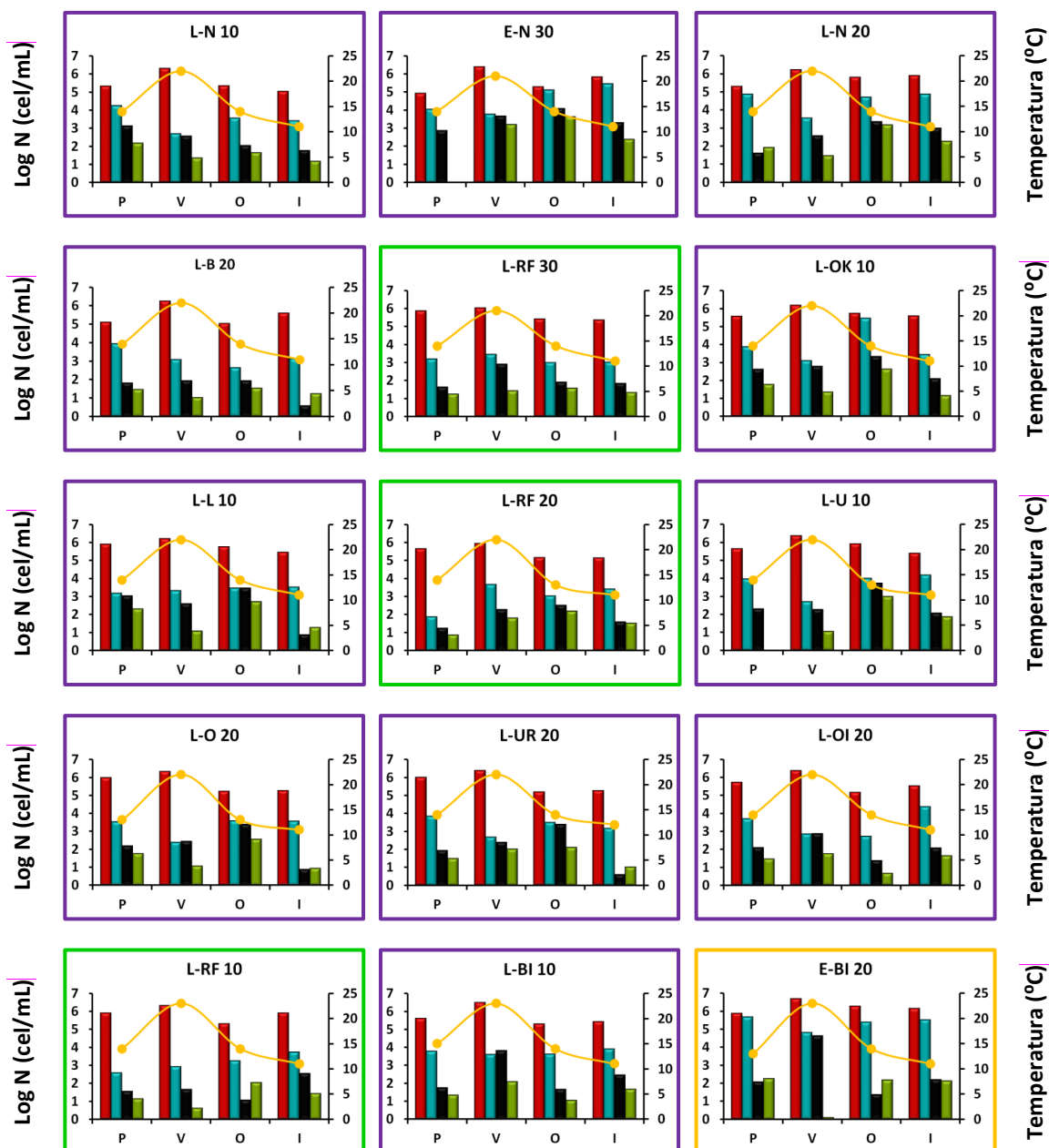


Figura 15. Distribución estacional de poblaciones bacterianas estudiadas en las 15 estaciones muestreadas, ordenadas de oeste a este según su ubicación en el mapa mostrado en la Figura 4. Primavera (P), verano (V), otoño (O) e invierno (I). Se indica la densidad de bacterias totales (■), bacterias quimioorganotrofas cultivables (■), *Vibrio* spp. totales (■), *Vibrio* spp. presuntivos cultivables (■) y la temperatura (°C) (●). Las estaciones de muestreo se dividen en aguas costeras (recuadro morado), mar abierto (recuadro verde) y aguas de transición, salida estuario (recuadro amarillo).

En las estaciones más cercanas a la costa, las densidades de bacterias cultivables en las muestras estivales fueron menores a las obtenidas el resto del año y, en general, los valores más altos se registraron en el muestreo de invierno. Las diferencias estacionales entre los valores de bacterias cultivables dentro de la misma estación de muestreo fueron de entre 1 y 1,5 log, llegando incluso a 2 log en algunos casos. En cambio, las estaciones de mar abierto L-RF30 y L-RF20 no siguieron este patrón. En estas dos estaciones la densidad de bacterias cultivables fue superior en la recogida de verano. Además, mientras que la estación L-RF30 el porcentaje de bacterias cultivables no varió significativamente a lo largo del año, la estación L-RF20 mostró variaciones superiores a 1,5 log.

El ratio bacterias cultivables/bacterias totales fue variable dependiendo del tipo de estación de muestreo. Los ratios significativamente más bajos se correspondieron con las muestras de mar abierto, mientras que el más alto se obtuvo en la única estación de muestreo de aguas de transición. Para las estaciones de muestreo de costa y transición, el ratio bacterias cultivables/bacterias totales más bajo se registró durante el verano, con resultados comprendidos entre 0,38 y 0,72 (datos no mostrados).

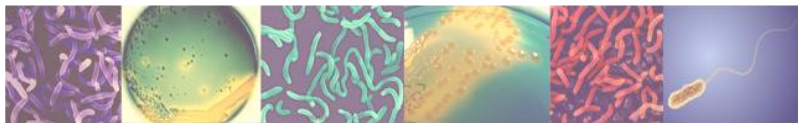
El recuento de *Vibrio* spp. (CARD-FISH) rara vez superó el 1% del total de bacterias y los valores más altos se obtuvieron en muestras de la única estación de aguas de transición, concretamente en el muestreo de verano. El número total de *Vibrio* spp. aumentó durante el verano (hasta alcanzar valores de 2,9 a 4,6 unidades logarítmicas) en las estaciones de muestreo (aguas costeras y de transición) ubicadas en el extremo oriental de la costa. Para el resto de las zonas de muestreo costeras, se registraron pocas fluctuaciones estacionales, aunque en la mayoría de ellas se obtuvieron los valores más elevados en otoño. Además, el porcentaje de bacterias *Vibrio* spp. enumeradas respecto al número de bacterias totales obtenido también fue menor (datos no mostrados).

En general, el número de *Vibrio* spp. presuntivo (cultivables en agar TCBS) fue 3-4 unidades logarítmicas menor que el número total de bacterias (TDC), y 1 - 2 órdenes menor al número de bacterias quimioorganotrofas cultivables. En general, el número de bacterias cultivables *Vibrio* spp. presuntivos fue inferior al número de bacterias pertenecientes al género *Vibrio* enumeradas mediante técnica CARD-FISH, con una diferencia aproximada de 1 log. Rara vez los recuentos de *Vibrio* spp. presuntivos superaron el número total de *Vibrio* spp. enumerados (puntos de muestreo L - N 20 en la recogida de primavera; L-B20, L-L10, L-O20, L-UR20 en la recogida de invierno; L-RF 10 en la recogida de otoño y E-BI20 en las recogidas de primavera y otoño).

OBJETIVO 2

Efecto de los factores ambientales en la supervivencia de *Vibrio* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Cepas de *Vibrio* y obtención de inóculos

En este trabajo se utilizaron 4 cepas de *Vibrio*, la cepa de colección *V. harveyi* CECT 525, esta misma cepa modificada para que exprese la proteína GFP (en adelante, *V. harveyi gfp*) y 2 cepas ambientales de las especies *V. harveyi* y *V. cyclitrophicus* (Objetivo 1, Resultados, apartado 2.1). Para seleccionar las cepas ambientales se consideró la fiabilidad de su identificación (Anexo 3) y su clasificación en distintos clados del género *Vibrio* (Sawabe *et al.*, 2013). Además, se priorizó la selección de una cepa *V. harveyi* ambiental, para realizar comparaciones entre una cepa de colección (*V. harveyi* CECT 525) y una cepa ambiental.

La cepa *V. harveyi gfp* fue obtenida por Parada (2016) mediante conjugación triparental de las cepas *E. coli* DH5 α λ pir y *E. coli* CC118 λ pir portadoras de los plásmidos pEVS102 y pEVS104, respectivamente (suministradas por el profesor Eric V. Stabb de la Universidad de Georgia, EEUU) y *V. harveyi* CECT 525. Se constató que los valores de la fase lag, la constante específica de velocidad de crecimiento (μ) y la densidad celular en fase estacionaria no difieren significativamente entre ambas cepas ($p > 0,05$) (Parada, 2016).

Para obtener los inóculos de las diferentes cepas utilizadas (*V. harveyi* CECT, *V.harveyi gfp*, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental), las poblaciones se hicieron crecer en CM a 26°C con agitación (120 rpm) hasta alcanzar la fase estacionaria. Posteriormente, las células se recogieron mediante centrifugación (4.000 g, 20 min.) y se lavaron en solución salina estéril al 1,94% [p/v]. Este proceso se realizó por triplicado. Finalmente, las pastillas celulares se resuspendieron en 25 mL de solución salina estéril (NaCl, 1,94% [p/v]).

2. Experiencias de supervivencia

Las experiencias de supervivencia se realizaron en matraces Erlenmeyer previamente lavados con ácido sulfúrico (H₂SO₄, 96% [v/v]), aclarados 10 veces con agua destilada estéril y calentados en estufa a 200°C durante 24 h.

Los matraces se llenaron con 200 mL de agua de mar recogida de la estación de muestreo del puerto de Armintza (UTMX UTM, 508469 4808997), tratada como se describe en el Objetivo 1 (Materiales y Métodos, apartado 1.3), o sin tratar. También se realizaron experiencias de supervivencia utilizando agua de mar artificial (Farmer y Hickman-Brenner, 2006) (Anexo 4) diluida o no con el fin de obtener muestras de diferente salinidad (0,5‰; 15‰, 30‰ y 35,5‰). La medición de la salinidad se llevó a cabo con un conductivímetro ProfiLine Cond 197i (WTW). El agua de mar artificial se esterilizó en autoclave (121°C durante 20 min.).

Las temperaturas seleccionadas para realizar los experimentos de supervivencia fueron 4°C, 12°C, 20°C y 30°C. Esta selección se realizó considerando referencias bibliográficas que indican que temperaturas inferiores a 6°C inducen la entrada en el estado VNC para la mayoría de especies del género *Vibrio* (Jiang y Chai, 1996; Vattakaven *et al.*, 2006; Oliver, 2010) y que 12°C y 20°C corresponden a las temperaturas media de las aguas costeras en la Comunidad Autónoma del País Vasco en época fría y cálida, respectivamente. Por último, la temperatura de 30°C sería el posible escenario en previsión al incremento futuro de la temperatura del agua, debido al calentamiento global.

Para comprobar el efecto de la radiación lumínica sobre la supervivencia de *Vibrio* spp. se realizaron experiencias a 20°C y 30°C bajo radiación visible continua. Las experiencias se realizaron utilizando cinco lámparas Sylvania Standard F25W/30", 15,93 W/m², que emiten

radiación visible en un rango de 400-700 nm y con picos de emisión a 410, 440 y 550 nm. Los resultados se compararon con los obtenidos en las experiencias realizadas a las mismas temperaturas en condiciones de oscuridad.

Para determinar el efecto de la salinidad se realizaron experiencias de supervivencia en oscuridad a 12°C, 20°C y 30°C con poblaciones mantenidas a salinidades de 0,5‰, 15‰, 30‰ y 35,5‰. Las concentraciones salinas seleccionadas reflejaron los diferentes entornos acuáticos: agua dulce o continental (0,5‰), aguas de transición (15‰), agua de mar mesohalina (30‰) y agua de mar polihalina (35,5‰).

Las diferentes combinaciones de condiciones estudiadas se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12. Combinaciones de las condiciones analizadas en los estudios de supervivencia.

CONDICIONES DE EXPERIMENTACIÓN						Microorganismos
Microbiota natural	Nutrientes	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Radiación luminosa	Agua de mar	
Ausencia	Escasez	4, 12, 20, 30	37*	Oscuridad	Natural tratada	<i>V. harveyi</i> CECT 525 <i>V. harveyi</i> ambiental <i>V. cyclitrophicus</i> ambiental
Ausencia	Escasez	20, 30	37*	Luz visible	Natural tratada	<i>V. harveyi</i> CECT 525 <i>V. harveyi</i> ambiental <i>V. cyclitrophicus</i> ambiental
Ausencia	Ausencia	12, 20, 30	0,5; 15, 30, 35,5	Oscuridad	Artificial estéril	<i>V. harveyi</i> CECT 525 <i>V. harveyi</i> ambiental <i>V. cyclitrophicus</i> ambiental
Presencia	Escasez	12, 30	37*	Oscuridad	Natural no tratada	<i>V. harveyi gfp</i>

*Salinidad de agua de mar recogida en Armintza (UTMX UTM Y, 508469 4808997).

Los matraces que contenían agua de mar natural o artificial tratadas, que se emplearon para el estudio del efecto de factores abióticos, se inocularon con las suspensiones bacterianas previamente obtenidas hasta alcanzar una densidad aproximada de 10^8 bacterias/mL. Los matraces se incubaron bajo las distintas condiciones con agitación (120 rpm). Periódicamente se recogieron alícuotas para enumerar vibrios totales, viables y cultivables. Además, se determinó la capacidad de resucitación de las poblaciones sometidas a variaciones de la salinidad, así como la capacidad de adhesión a superficies abióticas y bióticas y la variación la longitud celular y en la distribución de tamaños.

Para determinar el efecto de los factores bióticos, los matraces que contenían agua de mar no tratada, se inocularon hasta alcanzar una densidad aproximada de 10^6 *V. harveyi gfp*/mL y se incubaron, con agitación (120 rpm) y en oscuridad, a 12°C y 30°C. Estos experimentos complementaron los realizados previamente por Parada (2016), que determinó la supervivencia de poblaciones de *V. harveyi gfp* en presencia de la microbiota de agua de mar en experiencias realizadas a 4°C y 20°C. Periódicamente se tomaron alícuotas para realizar recuentos de *V. harveyi gfp* y bacterias totales, bacterias quimioorganotrofas y *V. harveyi gfp* cultivables y del número total de protozoos ciliados y flagelados (Objetivo 2, Materiales y Métodos, apartado 3).

En poblaciones de *V. harveyi* en estado VNC tras la permanencia en agua de mar artificial estéril con baja salinidad (0,5‰), siguiendo el protocolo descrito por Parada (2016), se

determinó la capacidad de la población de recuperar la cultivabilidad (resucitación). Los ensayos se realizaron, inoculando 0,1 mL de las diluciones 0 y 10^{-1} , preparadas a partir de las alícuotas recogidas en las experiencias de supervivencia, en series de 3 tubos que contenían 5 mL de agua de mar natural estéril. Los tubos se incubaron a 20°C o 26°C en oscuridad y con agitación (120 r.p.m.) durante al menos 7 días. Diariamente, se tomaron alícuotas para enumerar las bacterias totales (el incremento en la densidad bacteriana total se considera indicativo de crecimiento) y cultivables en AM incubado 24 h a 26°C (el incremento en la cultivabilidad, en ausencia de incremento del número total de células, es indicativo de la reversión del estado VNC) (Arana *et al.*, 2007; Parada *et al.*, 2016).

3. Parámetros microbianos estimados

En todos los casos, el número total de bacterias (Total Direct Count, TDC) se estimó siguiendo el protocolo descrito por Hobbie *et al.* (1977) (Objetivo 1, Materiales y Métodos, apartado 2.2). En el caso de las experiencias realizadas con la cepa *V. harveyi gfp*, las muestras no se tiñeron, si bien se filtraron, montaron y contaron tal y como se ha descrito previamente. Los filtros se observaron en un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400 (Objetivo 1, Materiales y Métodos, apartado 1.2). En el caso de las experiencias realizadas en presencia de la microbiota natural, se estimó la densidad de la comunidad bacteriana autóctona sustrayendo la densidad de *V. harveyi gfp* de la densidad de bacterias totales determinada en muestras teñidas con naranja de acridina.

La longitud celular se determinó de acuerdo con Massana *et al.* (1997), para ello se utilizaron los filtros preparados para la enumeración de TDC. En estas preparaciones se capturaron imágenes utilizando una cámara de alta resolución Hamamatsu 2400 (Hamamatsu Photonics). Las imágenes se digitalizaron y se analizaron con el software Scion Image 1.62^a. Para cada muestra se determinó la longitud de 200 células bacterianas. El valor medio de longitud (X_L) y la correspondiente desviación estándar (DE, obtenidos a partir de los tamaños bacterianos determinados para cultivos de fase estacionaria de crecimiento, se utilizaron para establecer 3 rangos de tamaño ($\leq X_L - DE$, $> X_L - DE$ — $< X_L + DE$ y $\geq X_L + DE$) que se utilizaron a lo largo de este trabajo.

La determinación del número de bacterias viables del género *Vibrio* se realizó utilizando el kit LIVE/DEAD® BacLight™ (Life Technologies), que permite enumerar por separado la fracción de células que mantienen íntegra la membrana citoplasmática (MEMB+) (Joux *et al.*, 1997). Para la preparación de las muestras se siguieron las instrucciones del fabricante. La observación de las células viables (MEMB+, células que fluorescen en verde) y no viables (MEMB-, células que fluorescen en rojo) se realizó utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400 equipado como se ha descrito previamente. Se enumeraron las bacterias viables presentes en 20 campos y se extrapolaron el número de bacterias viables/mL.

La densidad de bacterias cultivables totales (UFC/mL) se determinó mediante siembra por microgota y/o por extensión en medio de cultivo AM e incubación a 26°C durante 24 h-96 h. En el caso de *V. harveyi gfp*, las siembras se realizaron por extensión en medio AM suplementado con kanamicina (100 µg/mL; Sigma-Aldrich). Las colonias de *V. harveyi gfp* se enumeraron iluminando las placas con una lámpara UV-A (UVGL-58) y verificando la emisión de fluorescencia. En las experiencias con presencia de microbiota autóctona, las bacterias quimioorganotrofas naturales cultivables se determinaron contando las colonias no fluorescentes formadas en AM no suplementado con kanamicina tras incubación a 26°C durante 48 h.

En las experiencias llevadas a cabo en presencia de poblaciones microbianas, se utilizó el método descrito por Sherr *et al.* (1988) para determinar la densidad de protozoos ciliados y flagelados. Las alícuotas se fijaron con lugol (concentración final 0,5% [v/v]) y formalina tamponada (concentración final 3% [v/v]) y se tiñeron con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol [concentración final 0,2 µg/mL]) (Thermo Fisher Scientific) durante 30 minutos en oscuridad. Posteriormente, las muestras teñidas se filtraron a través de filtros de membrana de policarbonato (Whatman®) con tamaño de poro de 0,8 µm para la enumeración de protozoos flagelados y 3 µm para la enumeración de protozoos ciliados. Las muestras se visualizaron mediante microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400 equipado con un bloque de filtros DAPI (filtro de excitación EX340-380, espejo dicróico DM400 y filtro barrera BA435-485). Se examinó la totalidad de la superficie de los filtros, se enumeraron los protozoos presentes y se calculó su densidad.

A lo largo de las experiencias de supervivencia, se determinó la capacidad de adhesión a superficies abióticas de acuerdo con el protocolo descrito por O'Toole y Kolter (1998) con ligeras modificaciones. Alícuotas de 1 mL, recogidas periódicamente en los ensayos de supervivencia, se añadieron a una placa de poliestireno de 24 pocillos estéril (Corning Incorporated). Para estandarizar los resultados, se realizaron controles con agua de mar natural y artificial estériles. Las placas se incubaron durante 48 h a 26°C. Posteriormente los pocillos se lavaron 3 veces con agua destilada estéril y las poblaciones adheridas se visualizaron mediante tinción con cristal violeta (0,5 % [p/v]) (Sigma Aldrich). Posteriormente, se añadió etanol (95 % [v/v]) (Panreac AppliChem) para disolver el colorante retenido en las células adheridas y se midió la densidad óptica de cada uno de los pocillos a 595 nm (OD₅₉₅) en un espectrofotómetro Synergy™ HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, Inc.).

Las poblaciones de *Vibrio* spp. se clasificaron, en base a su capacidad de adherirse, de acuerdo con Stepanovic' *et al.* (2004). Se calculó la media de la densidad óptica (OD) obtenida de los pocillos control más tres veces su desviación estándar, para definir el punto de corte (OD_c). Se establecieron las diferentes categorías celulares en base a este valor (Tabla 13).

Tabla 13. Categorías establecidas por Stepanovic' *et al.* (2004) y utilizadas en este estudio para la clasificación de las poblaciones en función de su capacidad de adhesión.

Valor de OD _{595 nm}	Categoría
OD ≤ OD _c	No adherentes
OD _c < OD ≤ (2 x OD _c)	Ligeramente adherentes
(2 x OD _c) < OD ≤ (4 x OD _c)	Moderadamente adherentes
(4 x OD _c) < OD	Fuertemente adherentes

Adicionalmente, se determinó la capacidad de adherencia sobre superficies bióticas de poblaciones de *V. harveyi* mantenidas en oscuridad a 20°C en agua de mar estéril (escasez de nutrientes) utilizando para ello la cepa homóloga *V. harveyi gfp*.

La capacidad de adhesión a superficies bióticas se comprobó utilizando como soporte pieles de pescado de uso comercial, *Brama brama* (palometa) y *Thunnus alalunga* (atún blanco), que fueron donadas por el comercio EROSKI S.COOP. Estos pescados se eligieron debido a su color oscuro que facilita la visualización de *V. harveyi gfp* mediante microscopía de epifluorescencia.

Las pieles se cortaron en cuadrados de 2,25 cm² de área y se conservaron a -20°C hasta su uso. Cada porción de piel fue lavada repetidas veces con solución salina estéril (NaCl 1,94% [p/v]) antes y después de ser tratada para eliminar restos de músculo, etc. Toda la adecuación y manipulación de las pieles se realizó utilizando materiales desinfectados con etanol 95%.

Estas experiencias de adhesión se realizaron en placas multipocillo para cultivo celular de 12 pocillos (Corning Inc.). Muestras de cultivos de fase estacionaria y de experiencias de supervivencia realizadas en agua de mar estéril (escasez de nutrientes) en condiciones de oscuridad se diluyeron en agua de mar natural estéril y se utilizaron como inóculo (4 mL en cada pocillo). Las experiencias se realizaron con 3 densidades celulares distintas: 10⁴, 10⁵ y 10⁶ células/mL (se utilizaron al menos 4 pocillos por densidad celular). Posteriormente, se introdujeron segmentos de piel (previamente preparadas) en cada uno de los pocillos y se incubaron de 2 a 48 h a 12°C, 20°C o 26°C. Periódicamente, se recogieron las pieles, se lavaron con solución salina estéril (NaCl 1,94% [p/v]) y se montaron para su observación utilizando un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E-400 (Objetivo 1, Materiales y Métodos, apartado 1.2), y se realizaron fotografías de, al menos, 15 campos. Para comparar la adhesión de *V. harveyi gfp* en las diferentes condiciones analizadas, se utilizó como criterio el porcentaje de piel de pescado con bacterias adheridas. Se superpuso a cada fotografía una cuadrícula de 900 x 1600 píxeles (utilizando el software Adobe Photoshop CS6) y el porcentaje de cobertura de adhesión bacteriana se calculó mediante el recuento de píxeles ocupados por células de *Vibrio* en cada fotografía. Además, para cada pocillo se recogieron 2 mL de la fase líquida para la enumeración de bacterias planctónicas (Objetivo 1, Materiales y Métodos, apartado 2.2). Simultáneamente, como control se prepararon pocillos con 4 mL de agua de mar estéril y segmentos de piel sin inocular a los que se dio el mismo tratamiento.

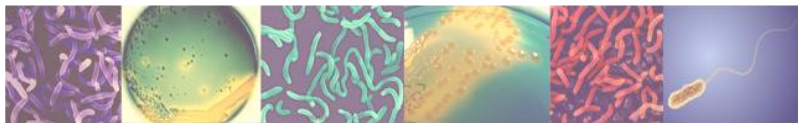
4. Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos se analizaron con el programa Microsoft Excel, transformándose las densidades celulares a logaritmos decimales. Las experiencias se realizaron por triplicado siendo los coeficientes de variación entre réplicas menores del 12%. Las diferencias entre medias se determinaron mediante análisis de la varianza: probabilidades menores o iguales a 0,05 se consideraron significativas.

OBJETIVO 2

Efecto de los factores ambientales en la supervivencia de *Vibrio* spp.

RESULTADOS



1. Influencia de factores abióticos en la supervivencia de *Vibrio* spp.

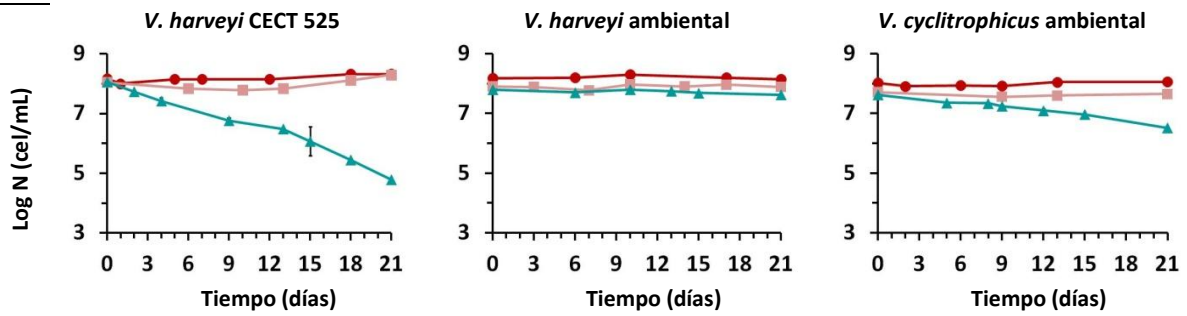
El efecto de la temperatura en la supervivencia de las tres cepas de *Vibrio* utilizadas en este estudio (Figura 16) se determinó con poblaciones mantenidas bajo condiciones de escasez de nutrientes, en oscuridad, y sometidas a temperaturas de 4°C, 12°C, 20°C y 30°C.

En el caso de la cepa de colección *V. harveyi* CECT 525, a lo largo de la supervivencia a distintas temperaturas, los números de células totales y viables (células con la membrana citoplasmática intacta) se mantuvieron constantes. Sin embargo, la cultivabilidad varió en función de la temperatura de exposición. Así, para poblaciones mantenidas a 4°C se observó una disminución de aproximadamente 3,5 unidades logarítmicas en el número de UFC/mL al finalizar el periodo de incubación; no detectándose descensos significativos para las poblaciones expuestas a 20°C. Por último, al finalizar las experiencias a 12°C y 30°C se observó un descenso inferior a 1 log en la densidad de células cultivables.

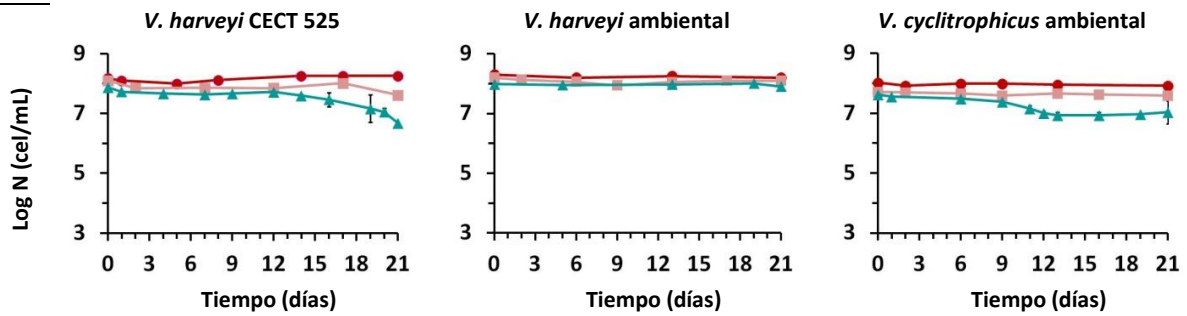
Para la cepa *V. harveyi* ambiental no se observaron variaciones en el número de células totales, viables y cultivables en las poblaciones expuestas a 4°C, 12°C y 20°C. Sin embargo, a 30°C se detectó un ligero descenso de la viabilidad, mientras que la cultivabilidad disminuyó progresivamente a partir del décimo día, siendo este descenso de 1,5 unidades logarítmicas al finalizar las experiencias ($p \leq 0,05$).

Por último, las poblaciones de *V. cyclitrophicus* ambiental no experimentaron cambios en los números de células totales y viables. Se detectó una evolución similar para todos los parámetros celulares determinados para las cuatro temperaturas estudiadas, con ligeras diferencias en la evolución de la cultivabilidad a lo largo de las experiencias. En el caso de *V. cyclitrophicus* mantenido a 4°C y 12°C se detectó un descenso en la cultivabilidad a partir de 5-6 días de exposición, de 1,1 y 0,6 unidades logarítmicas, respectivamente. Para las experiencias realizadas a 20°C y 30°C, la disminución de la cultivabilidad comenzó al inicio de las mismas, obteniendo un descenso de 0,8 y 1,1 log.

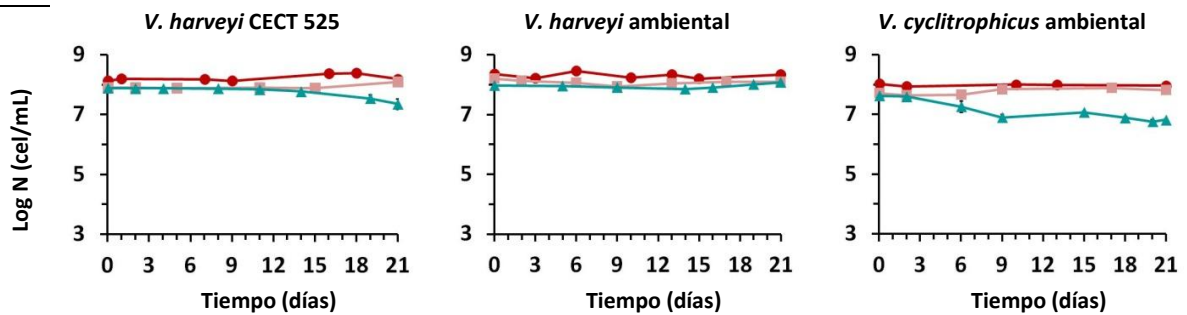
4°C



12°C



20°C



30°C

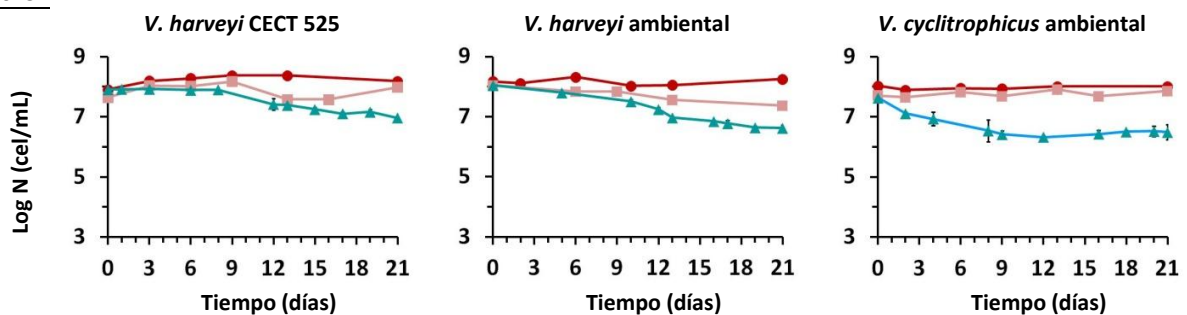


Figura 16. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas en agua de mar estéril en oscuridad a 4°C, 12°C, 20°C y 30°C. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

El efecto de la radiación visible en la supervivencia de *V. harveyi* CECT 525 y *V. harveyi* y *V. cyclitrophicus* ambientales se determinó en poblaciones mantenidas bajo condiciones de escasez de nutrientes, incubadas a 20°C o 30°C de temperatura y expuestas a radiación visible (Figura 17). Las tres cepas mantuvieron la integridad celular y viabilidad a lo largo de los 21

días de experimentación (Figura 17); sin embargo, se registraron descensos significativos en el número de células cultivables, superiores a los detectados en condiciones de oscuridad.

En el caso de *V. harveyi* CECT 525, tras un periodo inicial de 6-9 días en el que las células retuvieron su cultivabilidad, ésta comenzó a caer, acumulando un descenso de 1 log y 2,5 log a 20°C y 30°C, respectivamente. Los resultados obtenidos para la cepa de *V. harveyi* ambiental fueron similares. En el caso de la cepa ambiental *V. cyclitrophicus*, se adelanta el inicio del proceso pérdida de cultivabilidad respecto a *V. harveyi*; además, a 30°C acumula una caída de 4 log al final del periodo de experimentación.

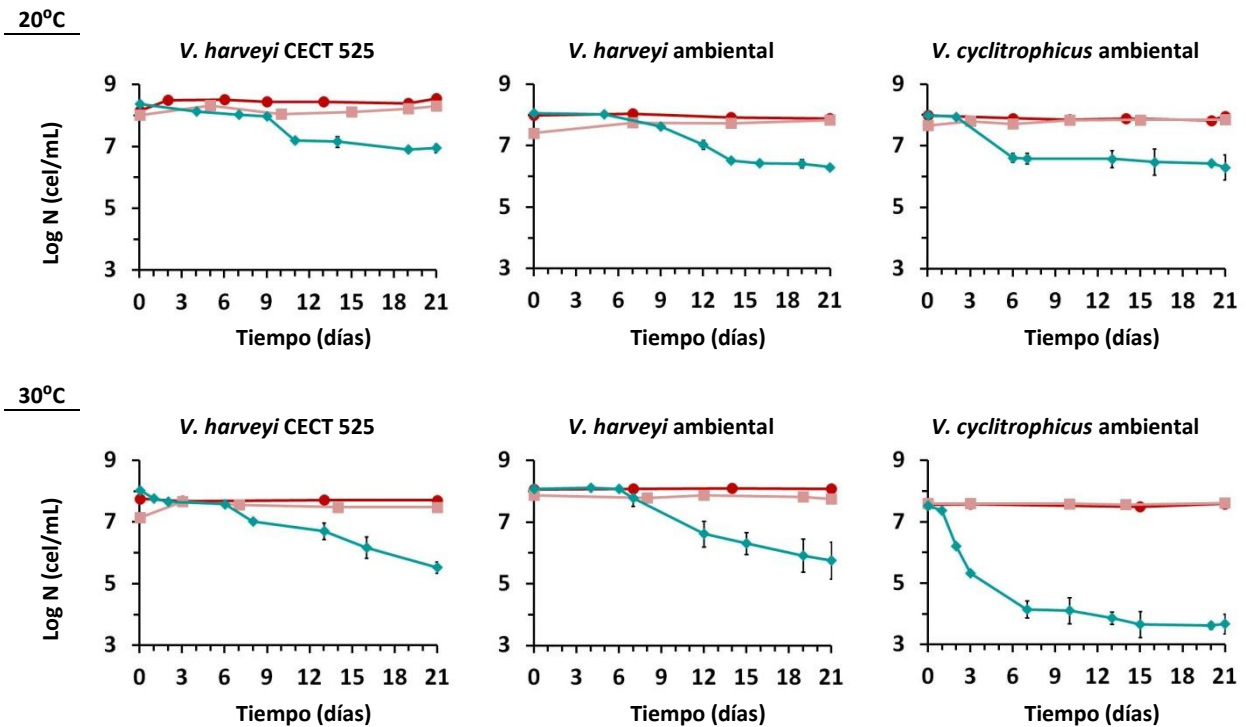


Figura 17. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas en agua de mar estéril bajo radiación visible a 20°C y 30°C. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

El efecto de la salinidad en la supervivencia de *Vibrio* spp. se determinó utilizando poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental mantenidas en oscuridad, en agua de mar artificial con salinidades de de 0,5‰, 15‰ y 30‰ incubada a 12°C, 20°C y 30°C (Figuras 18, 19 Y 20). Además, para las 3 cepas se realizaron experiencias con agua de mar artificial a 20°C y salinidad 35,5‰ y se compararon con los resultados obtenidos en las experiencias realizadas en agua de mar natural a 20°C (Figura 21).

En estas experiencias, para todas las condiciones y cepas estudiadas, el número de células totales se mantuvo constante a lo largo del periodo de experimentación. Los números de células con la membrana citoplasmática intacta tampoco experimentaron variaciones significativas; si bien, se situaron por debajo de los valores obtenidos para poblaciones mantenidas en agua de mar natural y en muchos casos por debajo de las células cultivables, incluso, al inicio del experimental. Esto evidencia que este método no es apropiado para determinar viabilidad celular cuando se utiliza agua de mar artificial.

La evolución de la cultivabilidad a lo largo del tiempo de experimentación varió en función de la cepa y las condiciones de exposición. Para las tres cepas y temperaturas estudiadas, salinidades de 0,5‰, provocaron una rápida pérdida de cultivabilidad, iniciada ya minutos después de la inoculación y que condujo a la no detección de células cultivables (<3,3 UFC/mL) antes de 24 h.

En el caso de la cepa *V. harveyi* CECT 525, no se observó pérdida significativa de la cultivabilidad para poblaciones expuestas a salinidades de 30‰. Sin embargo, la exposición a aguas con un 15‰ de salinidad provocó reducciones de 1 log (Figuras 18 a 20). La cepa *V. harveyi* ambiental exhibió un comportamiento diferente; así las poblaciones expuestas a 12°C mantuvieron la cultivabilidad a salinidades del 15‰ y el 30‰ (Figura 18). Las poblaciones incubadas a 20°C y expuestas a salinidades del 15‰ redujeron su cultivabilidad en 1 log (Figura 19), pero no experimentaron cambios significativos a salinidades más elevadas. Sin embargo, a 30°C, la pérdida de cultivabilidad fue significativa para poblaciones expuestas a salinidades del 15‰ o del 30‰ (Figura 20) sufriendo una disminución de 2,5 log a partir del quinto día y de 1,79 log a partir del octavo día de exposición, respectivamente. Por último, la cepa *V. cyclitrophicus* ambiental, experimentó los mayores descensos de cultivabilidad por el efecto combinado de la salinidad y la temperatura. Salinidades de 15‰ (Figuras 18, 19 y 20), provocaron descensos del número de UFC/mL para todas las temperaturas estudiadas, siendo mayor esta disminución para poblaciones incubadas a 20°C y 30°C. Así, para poblaciones de *V. cyclitrophicus* expuestas a un 15‰ de salinidad se registraron pérdidas de 1 log en el número de UFC/mL a 12°C (Figura 18), y de 2 log a 20°C y 30°C ($p \leq 0,05$) (Figuras 19 y 20, respectivamente). En el caso de exposición a 30‰ de salinidad, las temperaturas de 20°C y 30°C (Figuras 19 y 20) tuvieron un efecto negativo en la cultivabilidad, obteniéndose descensos de 0,5 y 2 log, respectivamente.

Por último, las poblaciones de *V. harveyi* CECT 525 y ambiental, mantenidas a 20°C en agua de mar natural, obtuvieron patrones de cultivabilidad similares a los obtenidos en las experiencias realizadas en agua de mar artificial (35,5‰) (Figura 21). Para la cepa *V. cyclitrophicus* ambiental, en cambio, el descenso que experimentó la cultivabilidad fue diferente en las dos condiciones. En agua de mar artificial, la pérdida de la cultivabilidad comenzó más tarde (día 13 en agua de mar artificial y día 2 en agua de mar natural) y fue menos acusada.

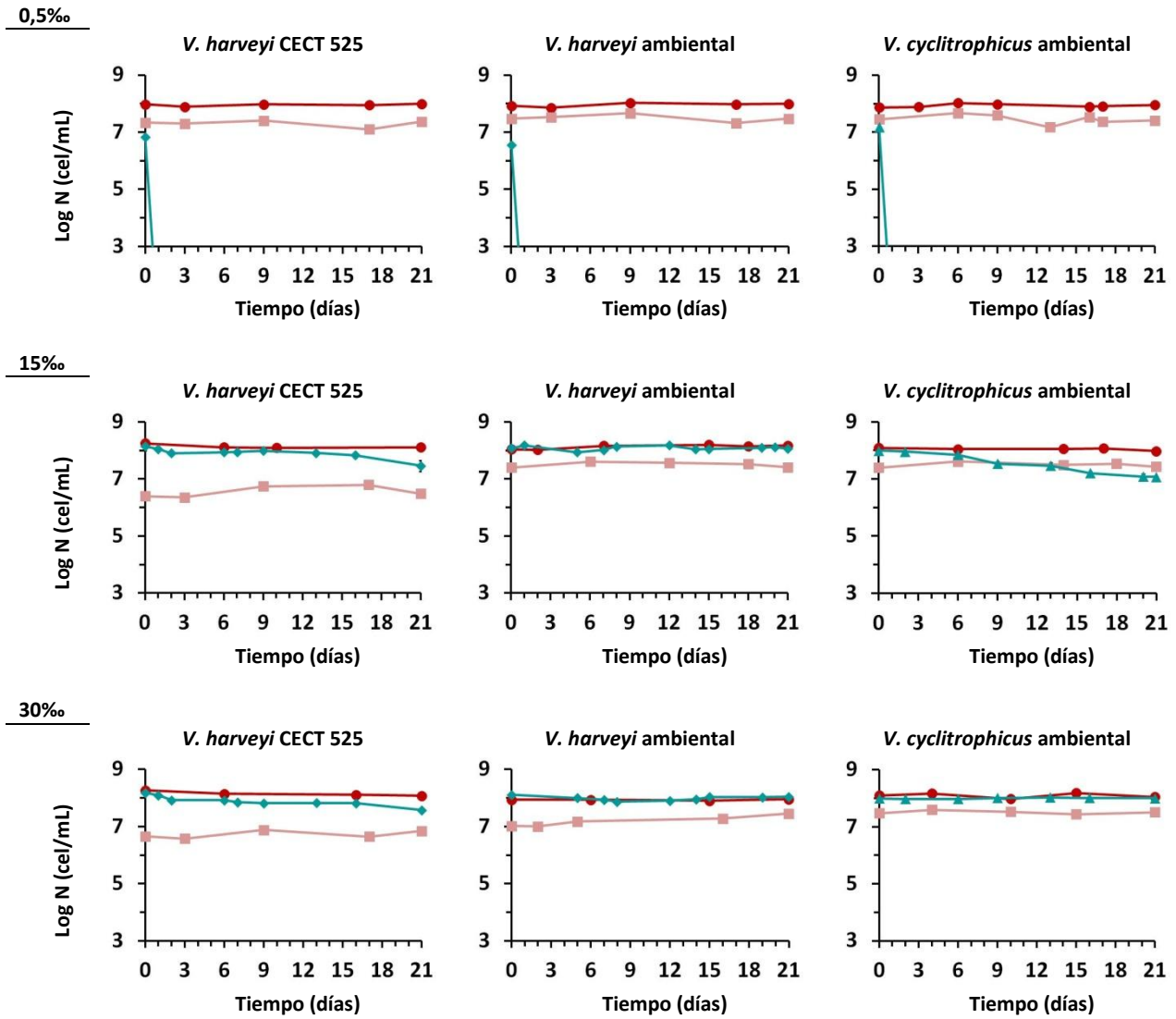
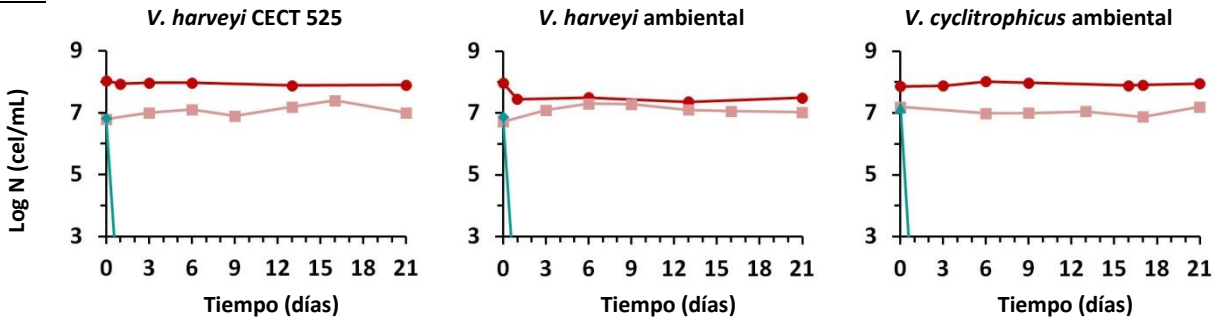
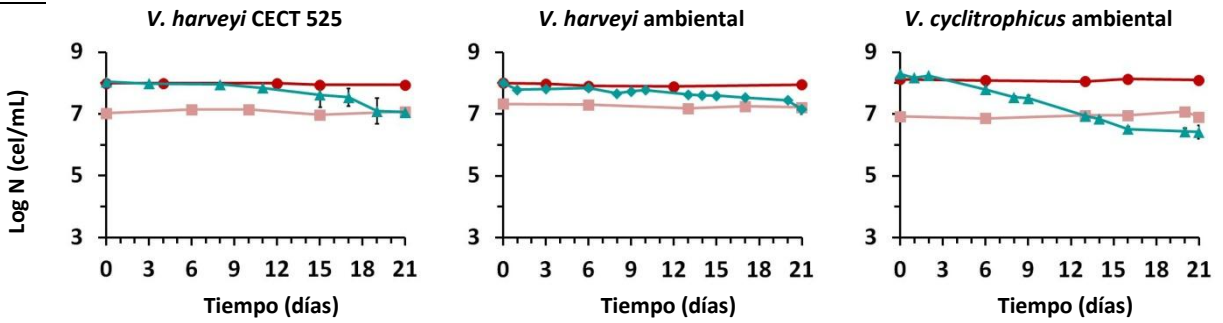


Figura 18. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas a 12°C en agua de mar artificial estéril. 0,5‰, 15‰ y 30‰. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

0,5‰



15‰



30‰

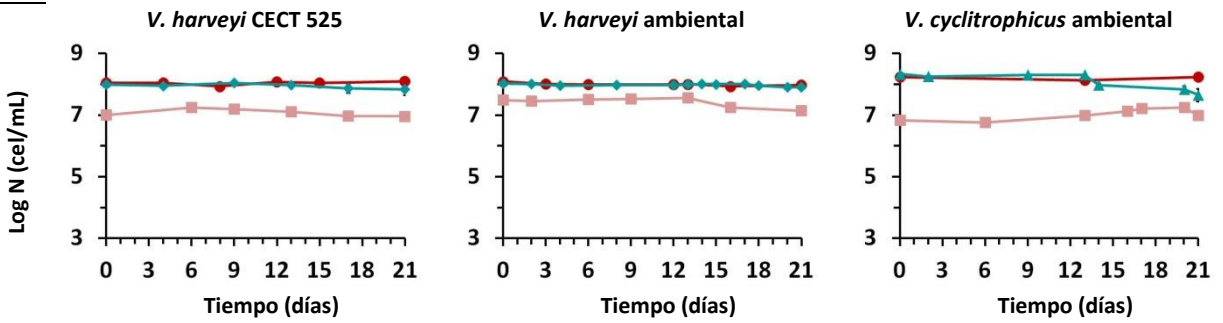


Figura 19. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas a 20°C en agua de mar artificial estéril. 0,5‰, 15‰ y 30‰. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (\pm DE).

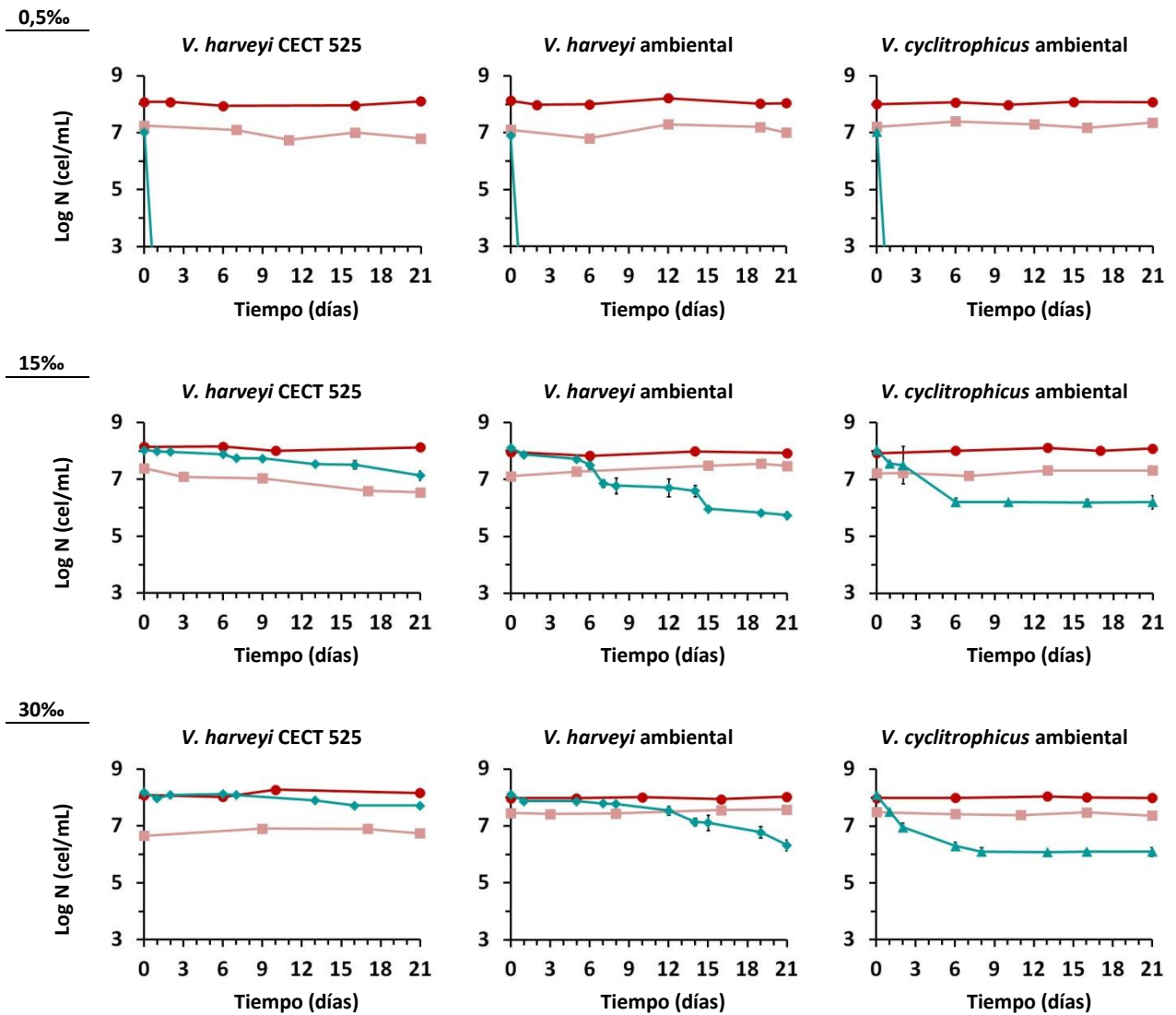


Figura 20. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas a 30°C en agua de mar artificial estéril, 0,5‰, 15‰ y 30‰. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (\pm DE).

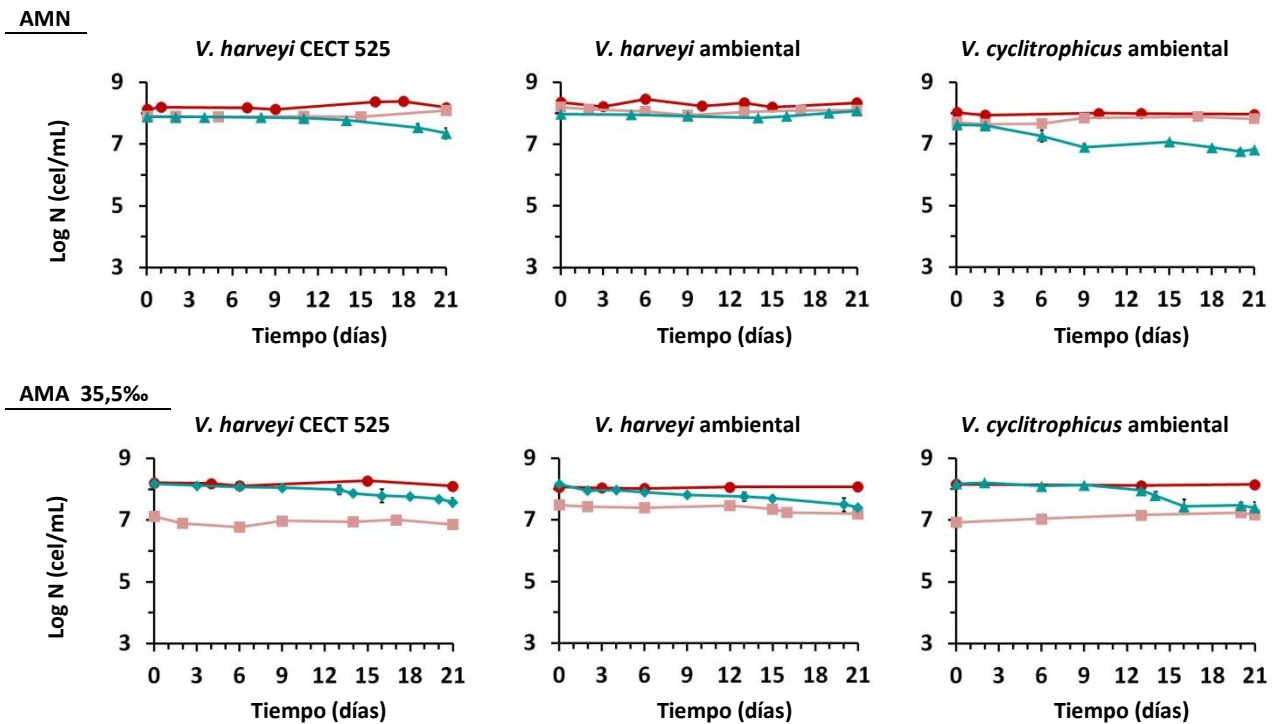


Figura 21. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas a 20°C en agua de mar natural estéril (AMN) y agua de mar artificial estéril (AMA) con salinidad 35,5‰. Bacterias totales (●), viables (■) y cultivables (▲). Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (\pm DE).

Debido a los destacables resultados obtenidos en cuanto a la abrupta pérdida de cultivabilidad experimentada en salinidades de 0,5‰, se procedió a determinar la capacidad de resucitación de la cepa *V. harveyi* CECT 525 expuesta a dichas condiciones. Para ello, alícuotas recogidas a partir de los ensayos de supervivencia a salinidades de 0,5‰ mantenidas a 20°C se diluyeron en agua de mar natural y se incubaron a 20°C o 26°C. En ninguno de los casos estudiados se detectó un incremento significativo del número total de bacterias, no detectándose crecimiento de la población. De igual modo, la densidad de bacterias cultivables no aumentó durante el transcurso de las experiencias (datos no mostrados).

Para las cepas *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental se estudió del efecto de los factores abióticos en la distribución de las poblaciones de acuerdo con su longitud celular a partir de las experiencias de supervivencia en agua de mar natural, mantenidas en oscuridad a 4°C, 12°C, 20°C y 30°C. El estudio del efecto de la radiación visible a 20°C y 30°C y el efecto de la salinidad (agua de mar artificial, en oscuridad y a 20°C con salinidad de 0,5‰, 15‰, 30‰, y 35,5‰) se realizó para las cepas *V. harveyi* CECT 525 y *V. harveyi* ambiental (Tabla 12). Los rangos de tamaño celular de las distintas cepas se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Rangos de longitud celular (μm) para *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental. Se muestran el valor medio de longitud (X_L) y la correspondiente desviación estándar (DE).

RANGO DE LONGITUD	CATEGORÍA	CEPAS		
		<i>V. harveyi</i> CECT 525	<i>V. harveyi</i> ambiental	<i>V. cyclitrophicus</i> ambiental
$\leq X_L - DE$	Corto	$\leq 0,90 \mu\text{m}$	$\leq 0,85 \mu\text{m}$	$\leq 0,95 \mu\text{m}$
$> X_L - DE - < X_L + DE$	Medio	$0,90 - 1,4 \mu\text{m}$	$0,85 - 1,25 \mu\text{m}$	$0,95 - 1,5 \mu\text{m}$
$\geq X_L + DE$	Largo	$\geq 1,4 \mu\text{m}$	$\geq 1,25 \mu\text{m}$	$\geq 1,5 \mu\text{m}$

El valor medio de longitud inicial fue similar para las 3 cepas, $1,14 (\pm 0,25) \mu\text{m}$ para *V. harveyi* CECT 525; $1,05 (\pm 0,20) \mu\text{m}$ para *V. harveyi* ambiental y $1,22 (\pm 0,27) \mu\text{m}$ para *V. cyclitrophicus* ambiental. Además, también se detectaron similitudes en la distribución inicial de células en base a los rangos de longitud establecidos. Al inicio de las experiencias las poblaciones analizadas presentaban un porcentaje de 15-17% de células con longitudes propias del rango inferior, un 65-70% de las células en el rango intermedio y un 15-18% en el rango superior.

En las Figuras 22, 23 y 24 se muestra la variación de las longitudes medias y de la distribución de las subpoblaciones por rangos de longitud a lo largo de las experiencias de supervivencia realizadas en este estudio. Para las tres cepas se observó una tendencia similar, con algunas excepciones. Así, a lo largo de la supervivencia, las poblaciones experimentaron una disminución del tamaño medio celular que se correspondía a un incremento de las subpoblaciones de células de menor longitud.

La disminución de la longitud celular que experimenta *V. harveyi* CECT 525, en oscuridad, fue mayor a temperaturas elevadas que a 4°C (Figura 22). Bajo condiciones de exposición a radiación lumínica, el efecto de la temperatura fue más evidente, reduciéndose el tamaño celular medio a $0,6 \mu\text{m}$ tras 21 días a 30°C , y la totalidad de las células con longitud inferior a $0,90 \mu\text{m}$ (Figura 23).

En el caso de *V. harveyi* ambiental, a pesar de observarse la misma tendencia general a la miniaturización, el efecto modulador de la temperatura sobre la reducción del tamaño celular se evidenció fundamentalmente en condiciones de oscuridad, mientras que apenas se observaron diferencias entre las poblaciones que permanecieron bajo iluminación a 20°C y 30°C (Figuras 22 y 23).

V. cyclitrophicus ambiental también experimentó una reducción de tamaño, con la excepción de las poblaciones mantenidas a 4°C en condiciones de oscuridad (Figura 22). En estas condiciones, no se observaron descensos del tamaño medio celular, llegando incluso a detectarse un ligero aumento. Del mismo modo, no se obtuvieron valores crecientes de la subpoblación de menor tamaño a lo largo de los 21 días de experimentación.

Si analizamos el efecto de la salinidad sobre el tamaño de *V. harveyi*, para las dos cepas de estudiadas, en salinidades de 15‰ a $35,5\text{‰}$ (Figura 24) se repitió el patrón previamente descrito, es decir, un incremento de las subpoblaciones de células de menor longitud a lo largo del tiempo de exposición. En cambio, para la salinidad de $0,5\text{‰}$, la tendencia fue diferente. Para *V. harveyi* ambiental, el aumento de las subpoblaciones de menor tamaño a lo largo del tiempo no fue acusado y, en el caso de *V. harveyi* CECT 525, no se detectaron cambios significativos en la distribución de tamaños a lo largo del tiempo, incluso la longitud media celular incrementó ligeramente.

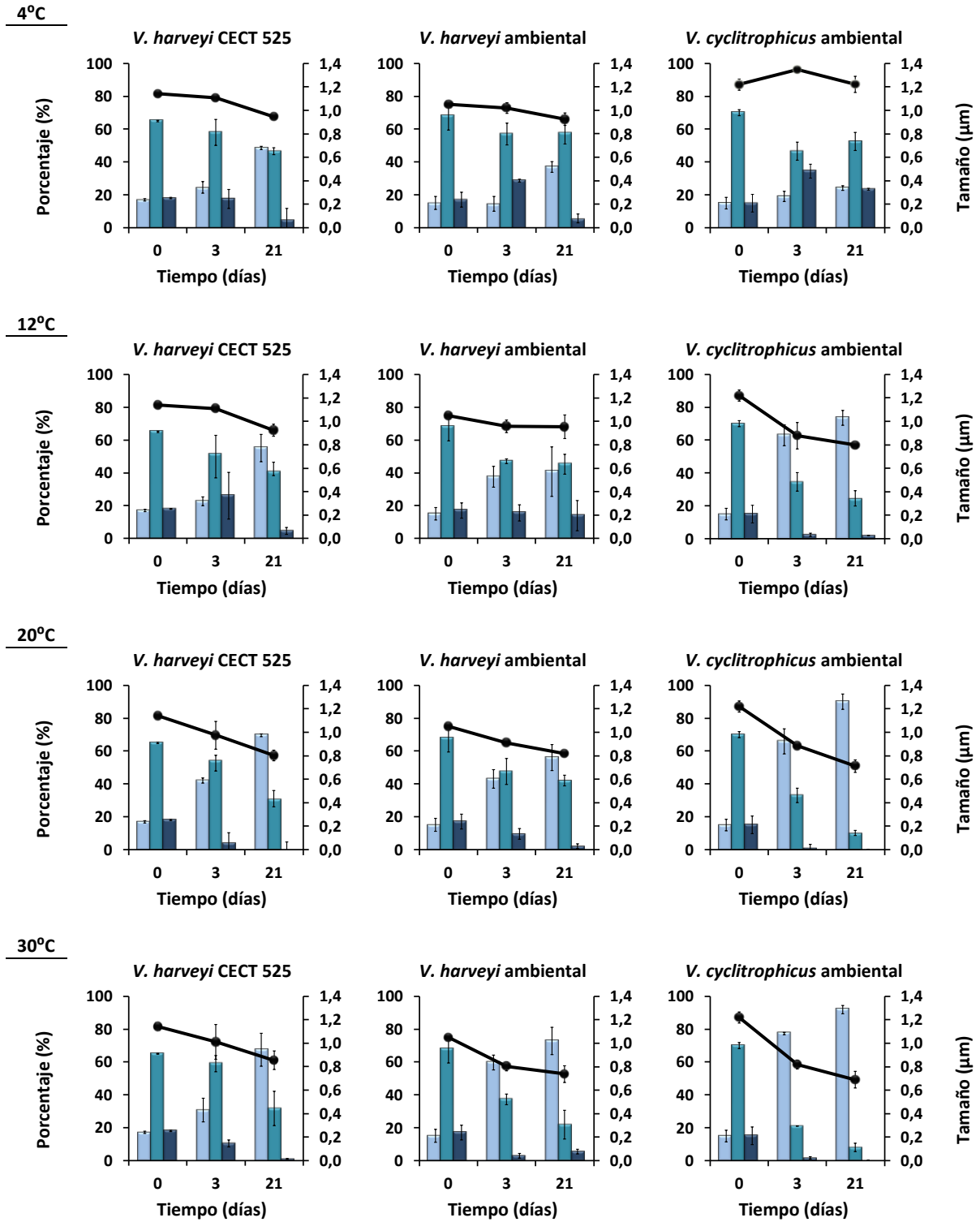


Figura 22. Variación del tamaño celular obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar estéril en oscuridad a 4°C, 12°C, 20°C y 30°C. Se muestran el porcentaje de células (%) con longitud corta (■), media (■) y larga (■), y el tamaño celular medio (µm) (●) en los días 0, 3 y 21. Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

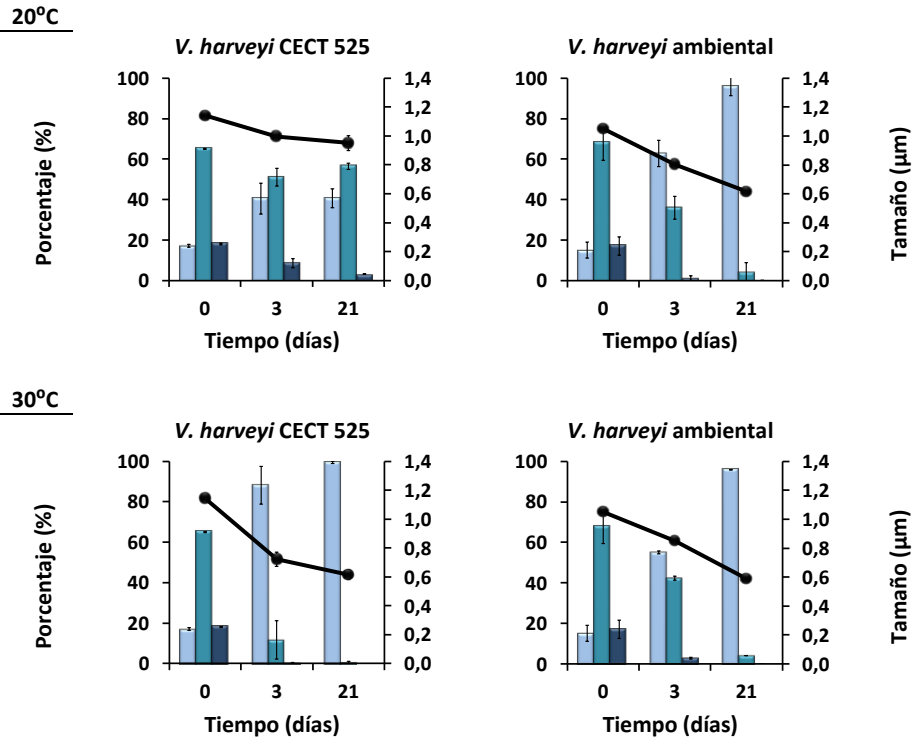


Figura 23. Variación del tamaño celular obtenida para poblaciones de *V. harveyi* CECT 525 y *V. harveyi* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar estéril bajo radiación visible a 20°C y 30°C. Se muestran el porcentaje de células (%) con longitud corta (■), media (■) y larga (■), y el tamaño celular medio (●) en los días 0, 3 y 21. Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

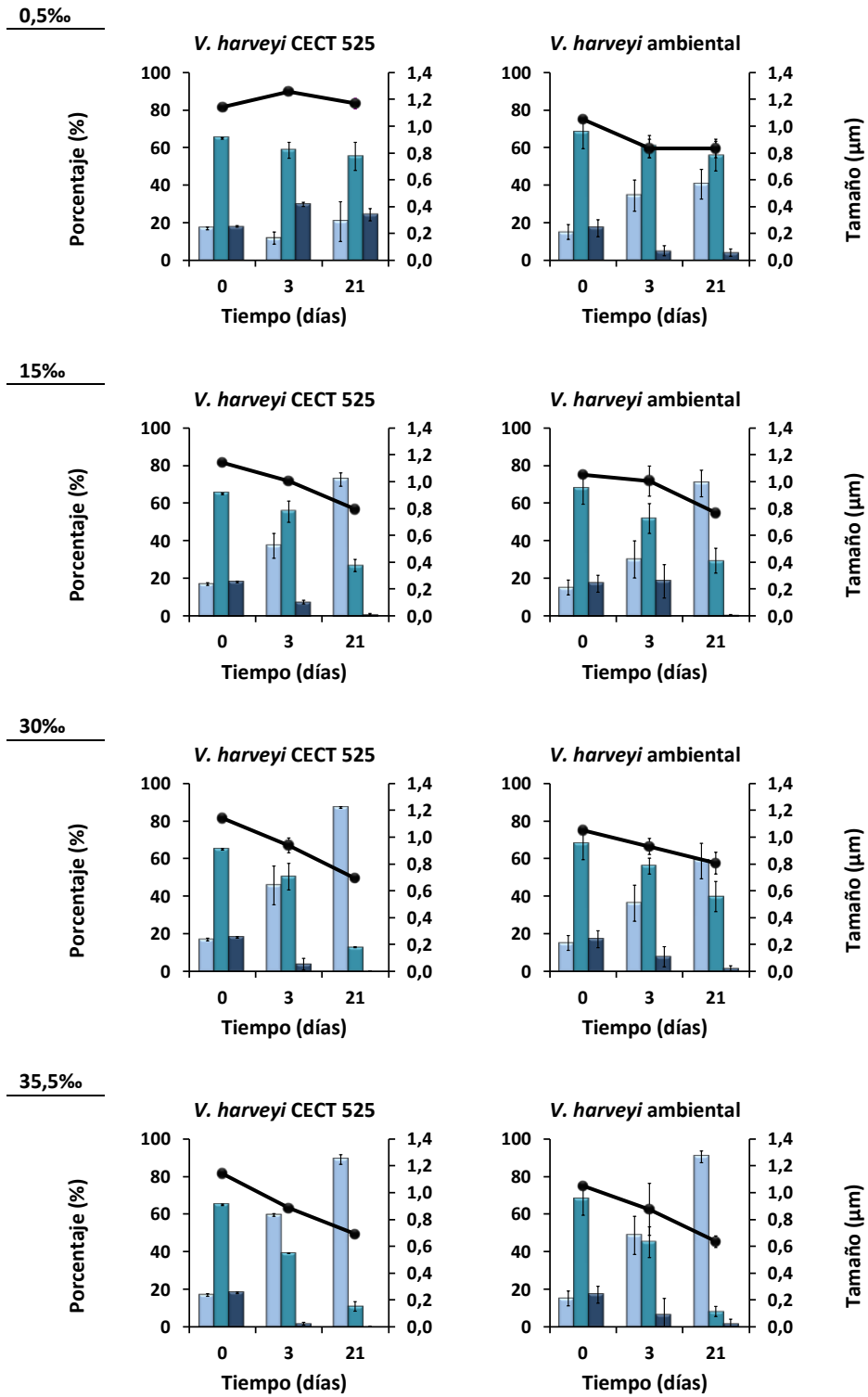


Figura 24. Variación del tamaño celular obtenida para poblaciones de de *V. harveyi* CECT 525 y *V. harveyi* ambiental, mantenidas durante 21 días a 20°C en agua de mar artificial, salinidades de 0,5‰, 15‰, 30‰ y 35,5‰. Se muestran el porcentaje de células (%) con longitud corta (■), media (■) y larga (■), y el tamaño celular medio (●) en los días 0, 3 y 21. Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

2. Influencia de factores bióticos en la supervivencia de *Vibrio* spp.

La Figura 25 muestra la evolución de *V. harveyi gfp* y de las poblaciones microbianas autóctonas en agua de mar no tratada (AMN). Resultados previos obtenidos por Parada (2016) y confirmados en este trabajo mostraron que *V. harveyi gfp* presentaba un patrón de supervivencia similar al de *V. harveyi* CECT 525 cuando ambas cepas permanecían en agua de mar estéril (escasez de nutrientes), en oscuridad a 20°C. Parada (2016) observó mantenimiento en la integridad (células totales) y cultivabilidad durante un periodo de 21 d (datos no mostrados). Además, a lo largo del periodo de estudio, no se observó pérdida en la fluorescencia de *V. harveyi gfp* por efecto de las condiciones de estrés.

Para establecer el efecto de la temperatura, se muestran los resultados combinados de las experiencias realizadas por Parada (2016) y en este estudio. Para las 4 temperaturas estudiadas (4°C, 12°C, 20°C y 30°C), en presencia de la microbiota autóctona, las poblaciones de *V. harveyi gfp* experimentaron descensos de células totales y cultivables a lo largo del periodo de estudio (Figura 25). Así, el número total de *V. harveyi gfp* disminuyó hasta 4 log tras 21 días de de incubación y la cultivabilidad se redujo ≥ 5 log, situándose este valor por debajo del límite de detección en los ensayos realizados a 4°C, 20°C y 30°C ($p < 0,05$). Las diferencias entre los recuentos de células de *V. harveyi gfp* totales y cultivables al final del período de incubación serían indicativas de la entrada en el estado VNC de la fracción de la población que permanece en el sistema. Así, la fracción de células en estado VNC de *V. harveyi gfp* supuso entre el 83% y el 98% de las células de *V. harveyi gfp* totales.

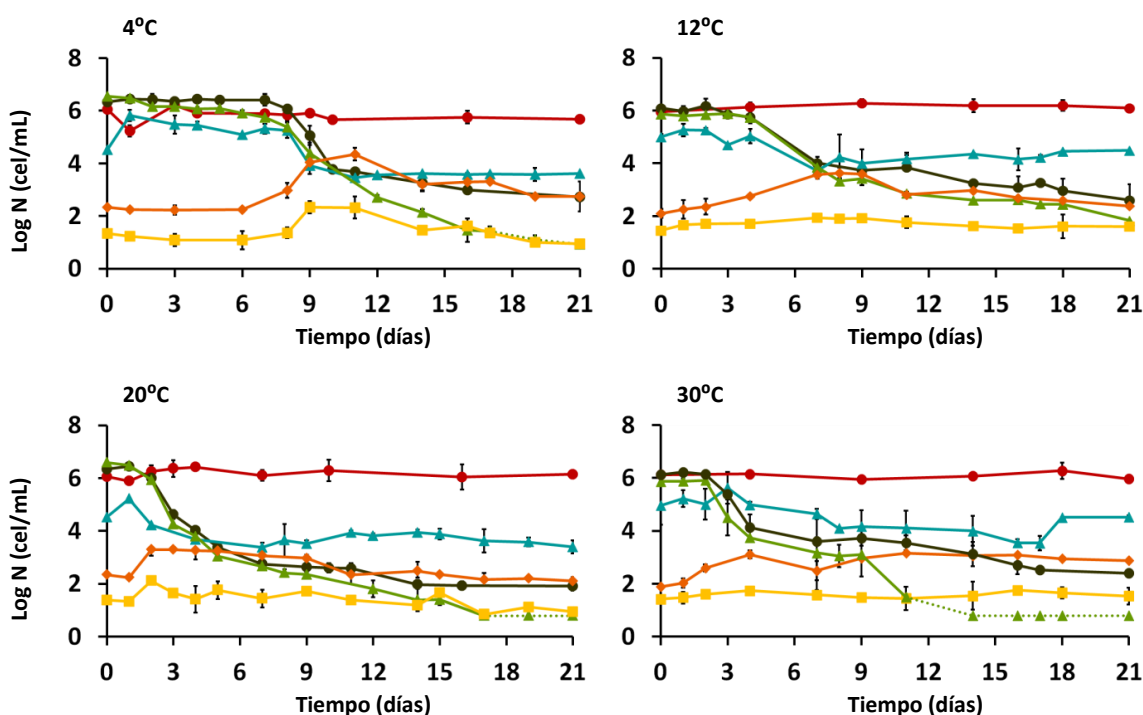


Figura 25. Supervivencia de poblaciones de *V. harveyi gfp* en presencia de la microbiota de agua de mar en experiencias realizadas a 4°C (Parada, 2016), 12°C (Parada, 2016) y 30°C. Se muestran los números de bacterias totales del agua de mar (●), *V. harveyi gfp* totales (●), bacterias cultivables quimioorganotrófas (▲), *V. harveyi gfp* cultivables (▲), protozoos flagelados (◆) y protozoos ciliados (■). Las líneas discontinuas indican recuentos de células cultivables por debajo del límite de detección del método de enumeración. Los datos son valores medios de 3 experimentos independientes (\pm DE).

Los números de *V. harveyi gfp* totales y cultivables disminuyeron a medida que incrementaba el tiempo de exposición. La temperatura de incubación influyó en el inicio del descenso de la población; así, a 4°C, fueron necesarios entre 9 y 10 días para detectar un descenso significativo ($p \leq 0,05$) mientras que a 12°C se requirieron de 4 a 6 días; a 20°C, 3 días y a 30°C, entre 2 y 4 días. Este efecto negativo temperatura-dependiente, se relacionó con los incrementos detectados en la densidad de protozoos, fundamentalmente flagelados que incrementaron significativamente ($p \leq 0,05$) su densidad ya en los 2 primeros días de estudio en las experiencias realizadas a 20°C y 30°C; en los 3-4 días a 12°C y tras 8 días a 4°C.

Las bacterias autóctonas mostraron un comportamiento netamente diferente en comparación con *V. harveyi gfp*. Mientras que el recuento total de bacterias de agua de mar permaneció constante al menos durante los 21 días de experimentación en todos los casos estudiados, la cultivabilidad de estas bacterias incrementó durante los primeros días de experimentación para decrecer posteriormente hasta densidades similares o ligeramente inferiores a las iniciales ($< 1 \log$). Al finalizar los ensayos, el número de bacterias quimioorganotrofas cultivables fue 3-4 logaritmos más elevada que el número de bacterias *V. harveyi gfp* cultivables.

3. Variación en la capacidad de adhesión de *Vibrio* spp.

3.1. Variación en la capacidad de adhesión de *Vibrio* spp. a superficies abióticas

Para el estudio del efecto de los factores abióticos sobre la capacidad de adhesión de *Vibrio* spp. bajo condiciones de estrés, se establecieron 4 categorías según lo descrito anteriormente (Tabla 13). Los valores que delimitan estas categorías, que se calcularon de forma independiente para las experiencias realizadas con agua de mar natural y artificial, se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Rangos de valores para cada categoría establecidas de acuerdo con Stepanovic' *et al.* (2004), para la clasificación de poblaciones en función de su capacidad de adhesión para agua de mar natural y agua de mar artificial.

Categoría	Valor de OD _{595 nm} Agua mar natural	Valor de OD _{595 nm} Agua mar artificial
No adherentes	OD \leq 0,085	OD \leq 0,112
Ligeramente adherentes	0,085 < OD \leq 0,171	0,112 < OD \leq 0,224
Moderadamente adherentes	0,171 < OD \leq 0,341	0,224 < OD \leq 0,448
Fuertemente adherentes	OD > 0,341	OD > 0,448

El efecto de las condiciones adversas sobre la adherencia de las poblaciones de *V. harveyi* CECT, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental fue limitado, sin variaciones reseñables en ninguno de los casos (Figuras 26 a 30). Las poblaciones, que fueron clasificadas inicialmente como *no adherentes*, no mostraron cambios significativos en la capacidad de adhesión.

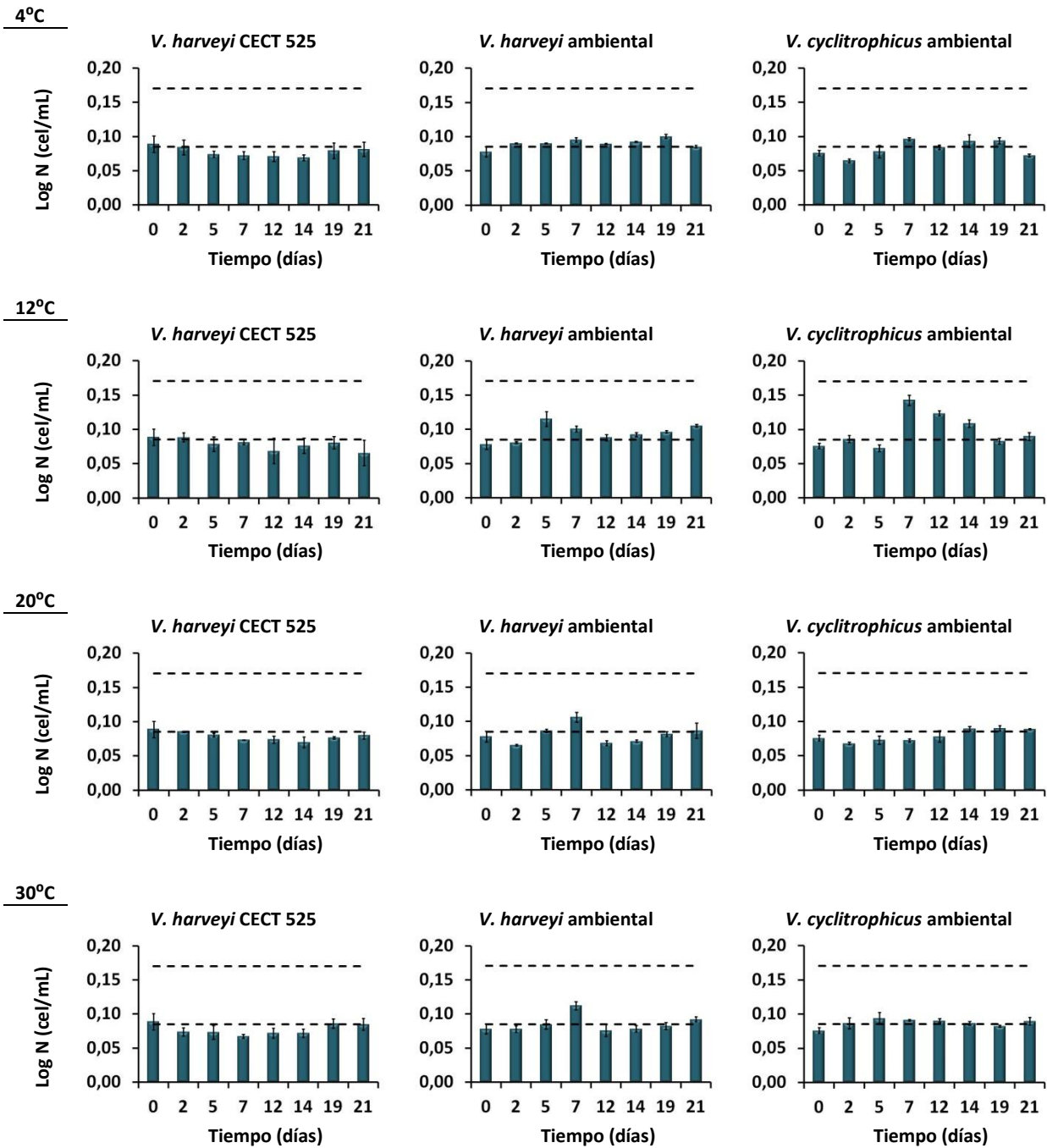


Figura 26. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus*, mantenidas durante 21 días en agua de mar estéril en oscuridad a 4°C, 12°C, 20°C y 30°C. La línea discontinua inferior indica el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y, la superior, el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

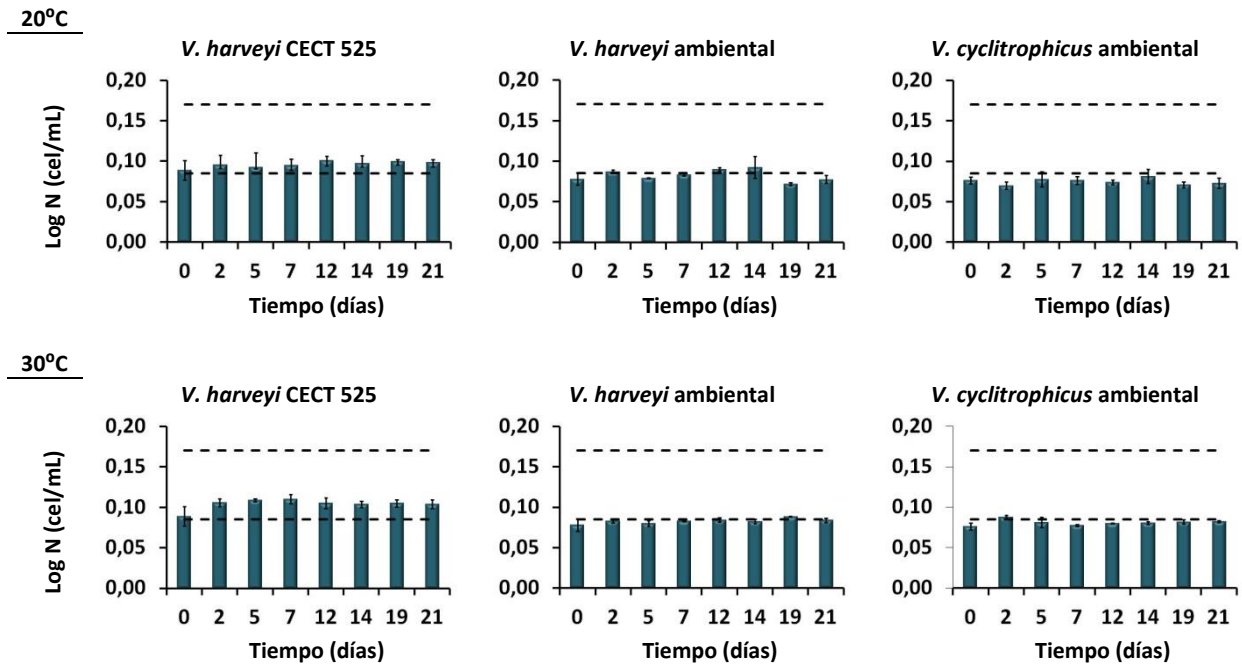


Figura 27. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar estéril bajo radiación visible a 20°C y 30°C. La línea discontinua inferior marca el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y la línea superior el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (\pm DE).

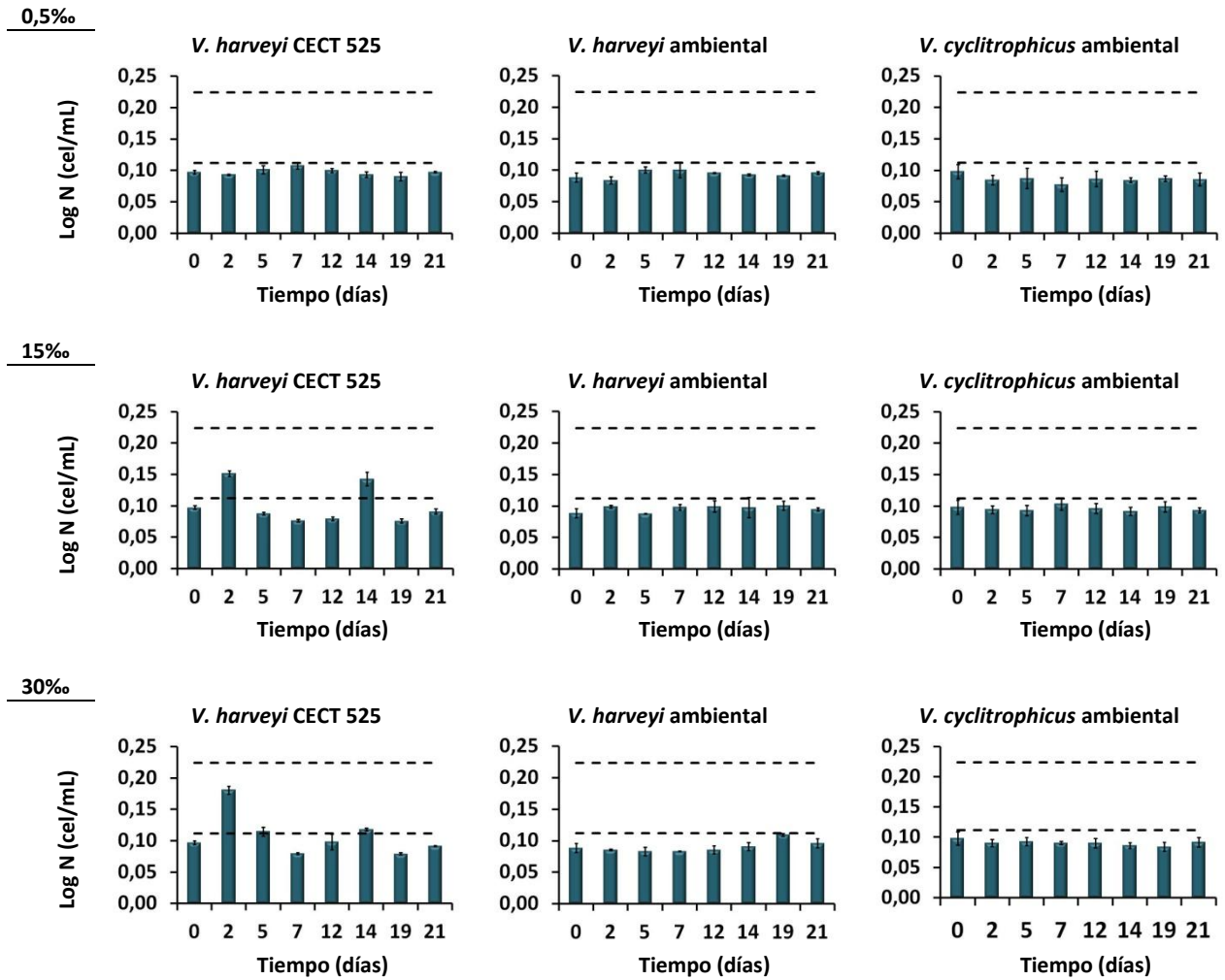


Figura 28. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar artificial y a 10°C en salinidades de 0,5‰, 15‰ y 30‰. La línea discontinua inferior marca el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y la línea superior el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (\pm DE).

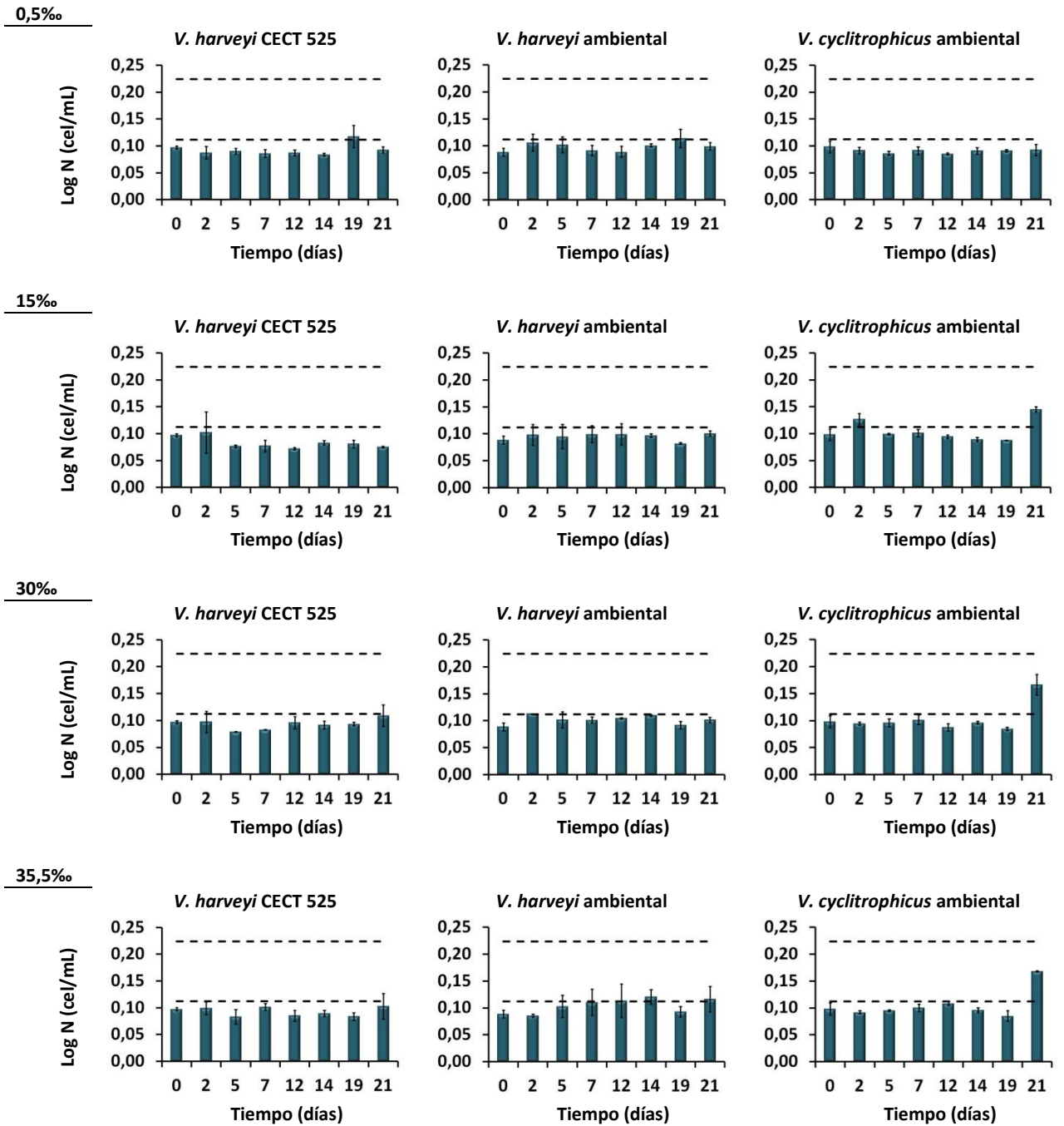


Figura 29. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar artificial y a 20°C en salinidades de 0,5‰, 15‰, 30‰ y 35,5‰. La línea discontinua inferior marca el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y la línea superior el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

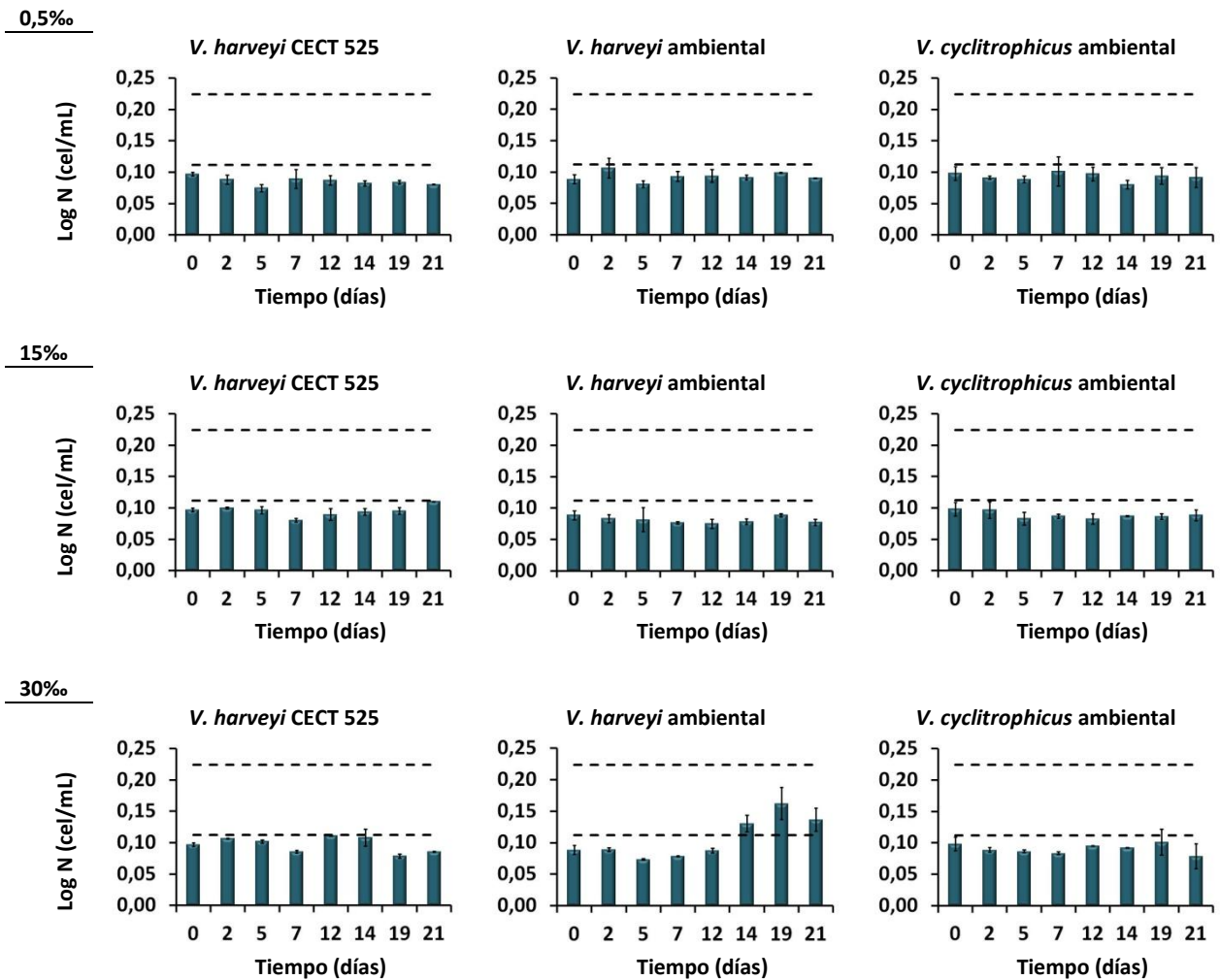


Figura 30. Variación en la adherencia, expresada como OD_{595nm} obtenida para poblaciones de *V. harveyi* CECT 525, *V. harveyi* ambiental y *V. cyclitrophicus* ambiental, mantenidas durante 21 días en agua de mar artificial y a 30°C en salinidades de 0,5‰, 15‰ y 30‰. La línea discontinua inferior marca el límite entre células no adherentes y ligeramente adherentes y la línea superior el límite entre células ligera y moderadamente adherentes. Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (\pm DE).

3.2. Variación en la capacidad de adhesión de *Vibrio* spp. a superficies bióticas

Para determinar la capacidad de adhesión a superficies bióticas, previamente se comprobó la capacidad de adhesión de la cepa *V. harveyi gfp* a superficies abióticas, clasificándose como no adherente, según los criterios especificados en la Tabla 15. Se seleccionaron dos soportes biológicos (pieles de *Brama brama* y *Thunnus alalunga*) para considerar su uso en estas experiencias. La piel de *T. alalunga*, de color más oscuro y más opaca ofrecía un mayor contraste y, por tanto, una mejor visualización de las células mediante microscopía de epifluorescencia (Figura 31). No obstante, a lo largo del periodo de experimentación (incubación con la suspensión de microorganismos), la degradación de la piel fue mayor que en el caso de *B. brama*, dificultando su manipulación. Por ello, se eligió la piel de *B. brama* como soporte ya que permite una buena visualización y resulta un soporte más rígido y manejable.

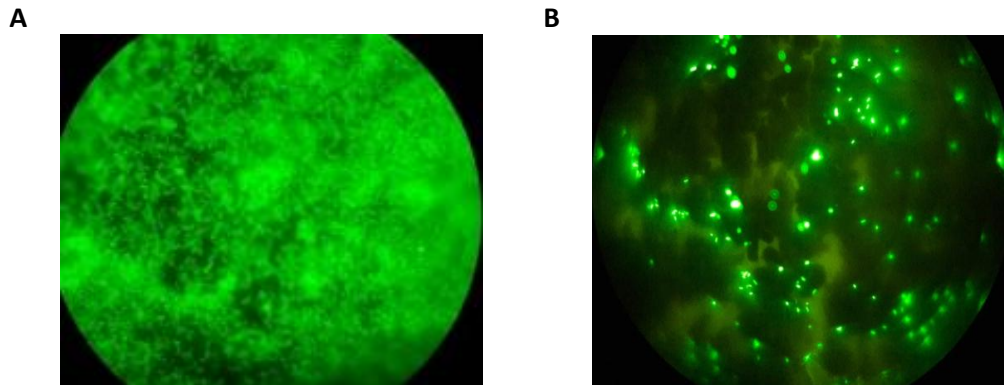


Figura 31. Adhesión de *V. harveyi gfp* sobre piel de *B. brama* (A) y sobre piel de *T. alalunga* (B).

En las Figuras 32, 33, 34 y 35 se muestra la evolución de la adherencia de *V. harveyi gfp* a piel de *B. brama* a diferentes temperaturas durante un periodo de incubación de 48 h. En todos los casos analizados (densidades bacterianas iniciales de 10^4 , 10^5 y 10^6 células/mL) se observó un claro efecto de la temperatura de incubación tanto sobre la cantidad de bacterias adheridas como sobre el crecimiento de las células en suspensión.

La capacidad de adhesión, estimada como porcentaje de cobertura (Objetivo 2, Materiales y Métodos, apartado 3), fue menor para las poblaciones mantenidas a 12°C (Figuras 32 y 35). Los valores obtenidos fueron prácticamente constantes a lo largo del periodo de incubación. Se precisaron al menos 8 h para alcanzar un 1% de cobertura. Únicamente en los ensayos realizados con inóculos de 10^6 cel/mL se obtuvieron coberturas superiores al 4%, tras 48 h de incubación. Cuando se estimó el crecimiento de las poblaciones planctónicas a 12°C , no se detectó un aumento significativo en el número de bacterias en suspensión (Figura 35).

En el caso de las experiencias realizadas a 20°C (Figuras 33 y 35), se obtuvieron porcentajes de cobertura superiores al 60% para densidades iniciales de 10^4 cel/mL, 10^5 cel/mL y 10^6 cel/mL tras 24 h, 18 h y 12 h de incubación, respectivamente. En el caso de las experiencias realizadas a 26°C (Figuras 34 y 35), estos porcentajes de cobertura se obtuvieron en tiempos de incubación menores, 12 h y 8 h para densidades iniciales de 10^5 cel/mL y 10^6 cel/mL. En ambos casos (experiencias realizadas a 20°C y 26°C), se detectó crecimiento (incremento de al menos 3 log) de la población bacteriana planctónica con respecto a la densidad inicial para todas las densidades estudiadas

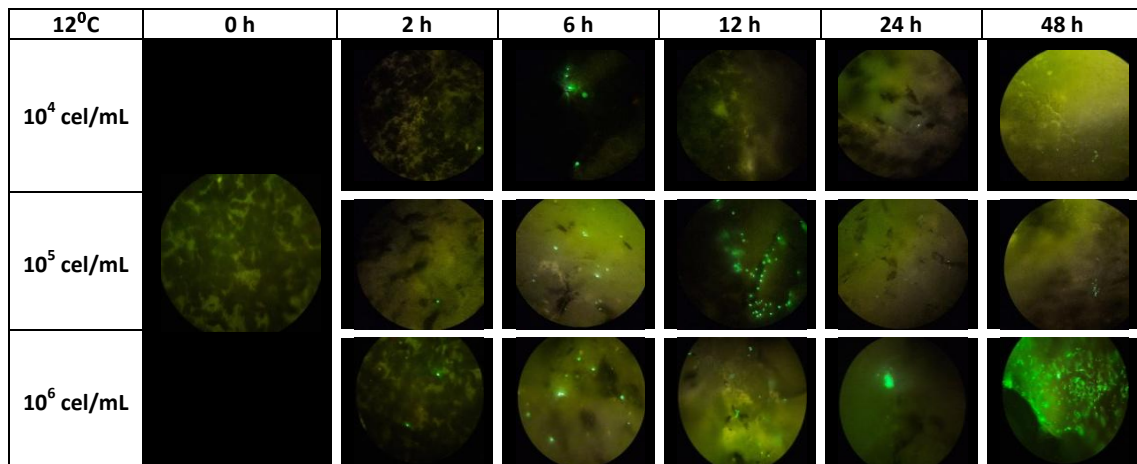


Figura 32. Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* durante 48 h. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas a 12°C con densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL.

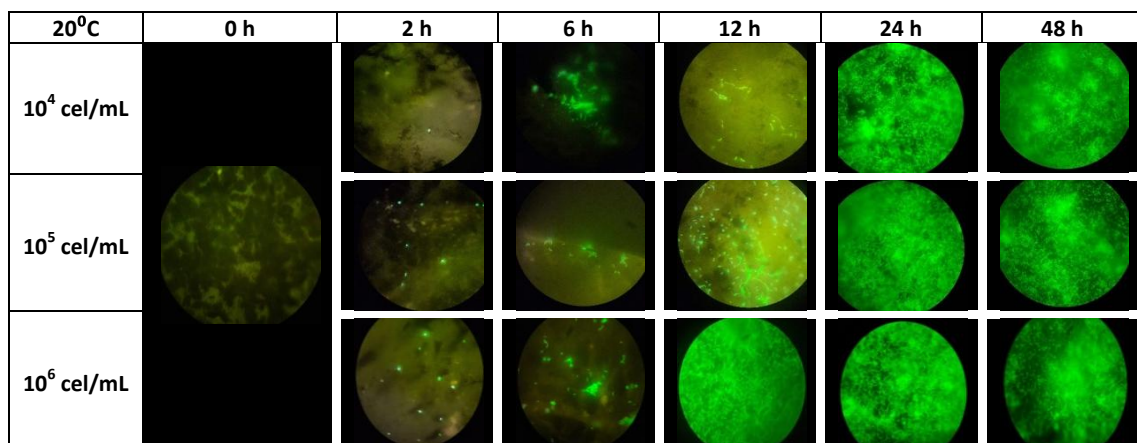


Figura 33. Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* durante 48 h. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas a 20°C con densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL.

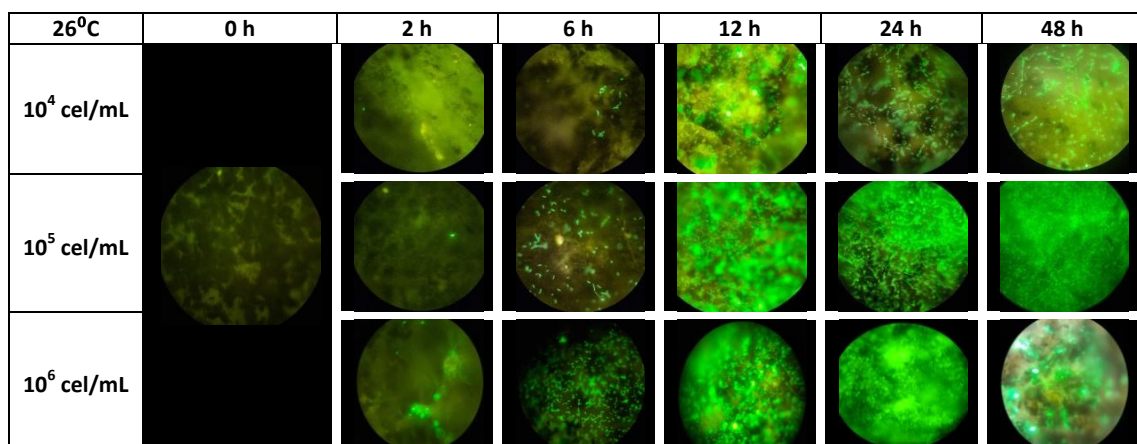


Figura 34. Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* durante 48 h. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas a 26°C con densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL.

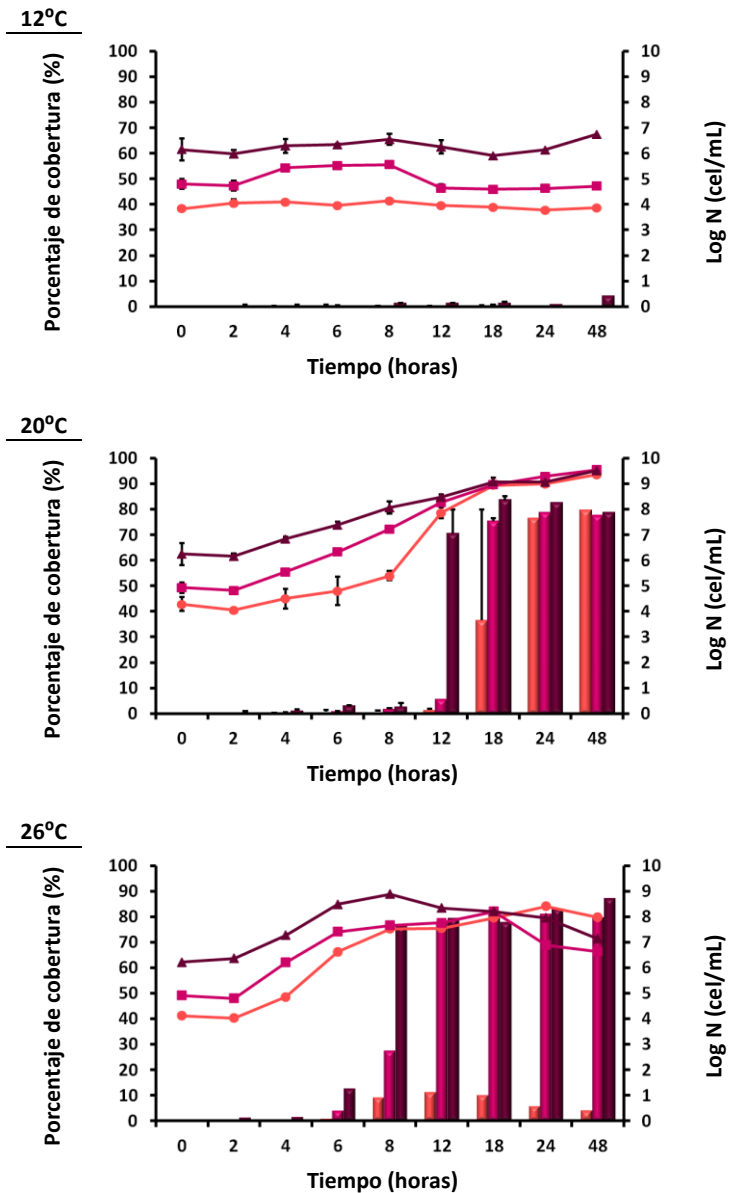


Figura 35. Porcentaje de cobertura de *V. harveyi gfp* sobre piel de *B. brama* (columnas) y densidad de las poblaciones planctónicas (líneas) de las muestras incubadas a 12°C, 20°C y 26°C. Densidades celulares iniciales de 10⁴ cel/mL (●, ■), 10⁵ cel/mL (■, ■) y 10⁶ cel/mL (▲, ■). Se muestran valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

Se analizó la capacidad de adherencia a la piel de *B. brama* para poblaciones de *V. harveyi gfp* obtenidas tras 0, 3, 6 y 14 días de permanencia a 20°C en agua de mar natural estéril (inóculos de 10⁴ a 10⁶ cel/mL) (Figuras 36 a 40). A lo largo de las incubaciones en contacto con el soporte biológico (8 h), la densidad de las poblaciones planctónicas bacterianas aumentó respecto a los valores iniciales (Figura 40), tanto en poblaciones no sometidas a estrés y mantenidas a 20°C (Figuras 36 y 40) como en poblaciones sometidas a estrés por determinado tiempo (Figuras 37 a 40). Estos incrementos además, fueron dependientes del tiempo transcurrido bajo condiciones de estrés antes de la inoculación de las pieles. Así, tras 6 y 14 días de exposición a estrés, el crecimiento bacteriano y porcentaje de cobertura fueron menores.

El incremento en la densidad bacteriana planctónica (Figuras 36 a 40) fue menor con densidades iniciales de inóculo de 10^4 cel/mL (1 logaritmo) que con densidades iniciales de inóculo de 10^5 y 10^6 cel/mL (hasta 2 logaritmos). Además, este crecimiento de la población bacteriana planctónica con respecto a la densidad inicial fue dependiente al tiempo de exposición al estrés, disminuyendo al prolongarse la permanencia bajo condiciones de estrés (Figura 40).

Los porcentajes de cobertura variaron dependiendo de la densidad inicial y el tiempo de permanencia de las poblaciones bajo condiciones de escasez de nutrientes en agua de mar. Para inóculos de 10^4 cel/mL no se detectaron coberturas superiores al 2%. En inóculos de 10^5 cel/mL, los valores de cobertura más elevados fueron del 3%. Para inóculos de 10^6 cel/mL se obtuvieron los valores más elevados, hasta 4% (tras 6-8 h de incubación con el soporte biológico) con poblaciones recogidas tras 0 y 3 días de exposición a estrés.

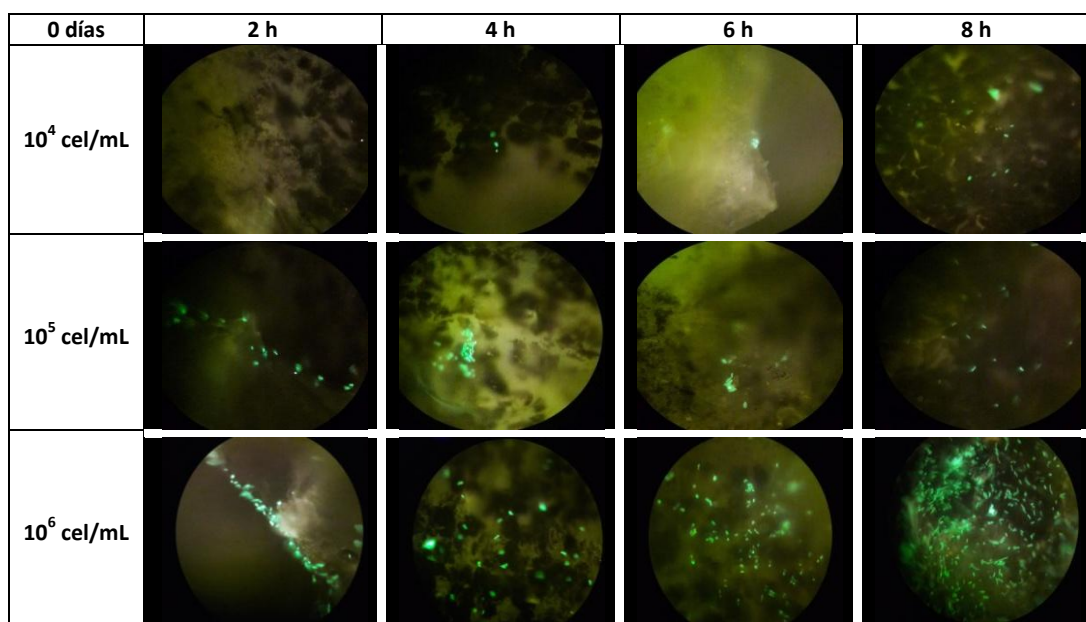


Figura 36. Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* en experiencias realizadas a 20°C. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas con poblaciones recogidas tras 0 días de permanencia en agua de mar incubada a 20°C. Densidades iniciales de 10^4 cel/mL, 10^5 cel/mL y 10^6 cel/mL.

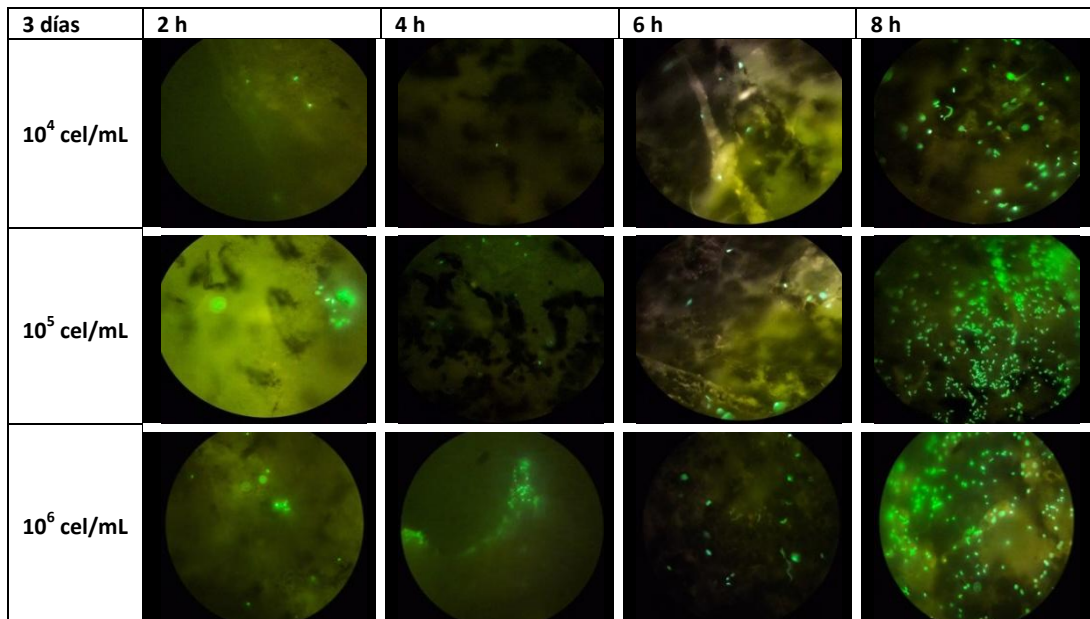


Figura 37. Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* en experiencias realizadas a 20°C. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas con poblaciones recogidas tras 3 días de permanencia en agua de mar incubada a 20°C. Densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL.

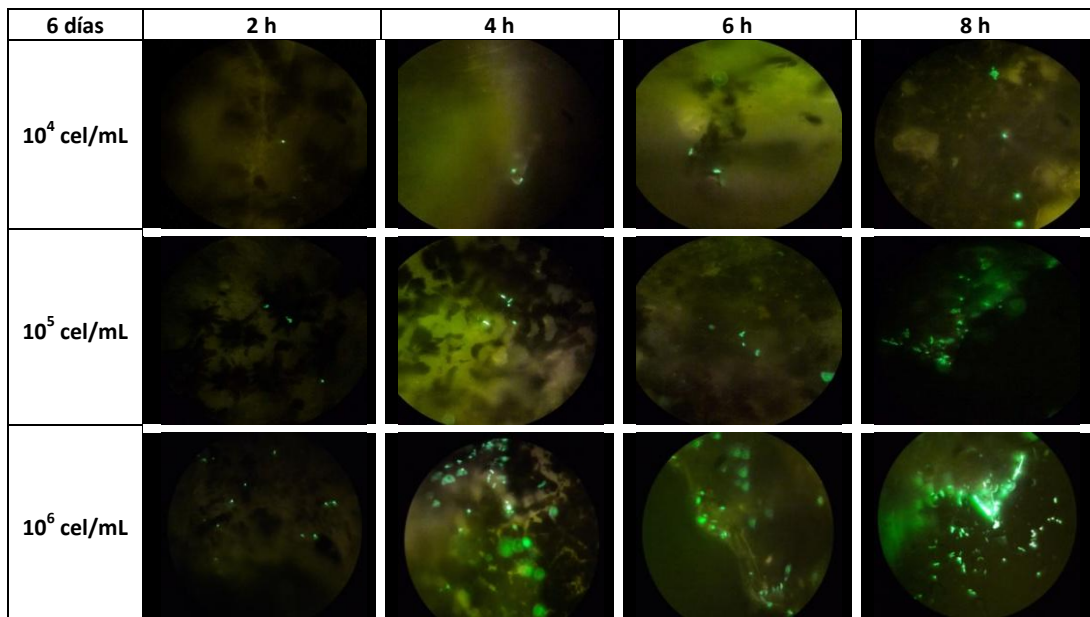


Figura 38. Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* en experiencias realizadas a 20°C. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas con poblaciones recogidas tras 6 días de permanencia en agua de mar incubada a 20°C. Densidades iniciales de 10⁴ cel/mL, 10⁵ cel/mL y 10⁶ cel/mL.

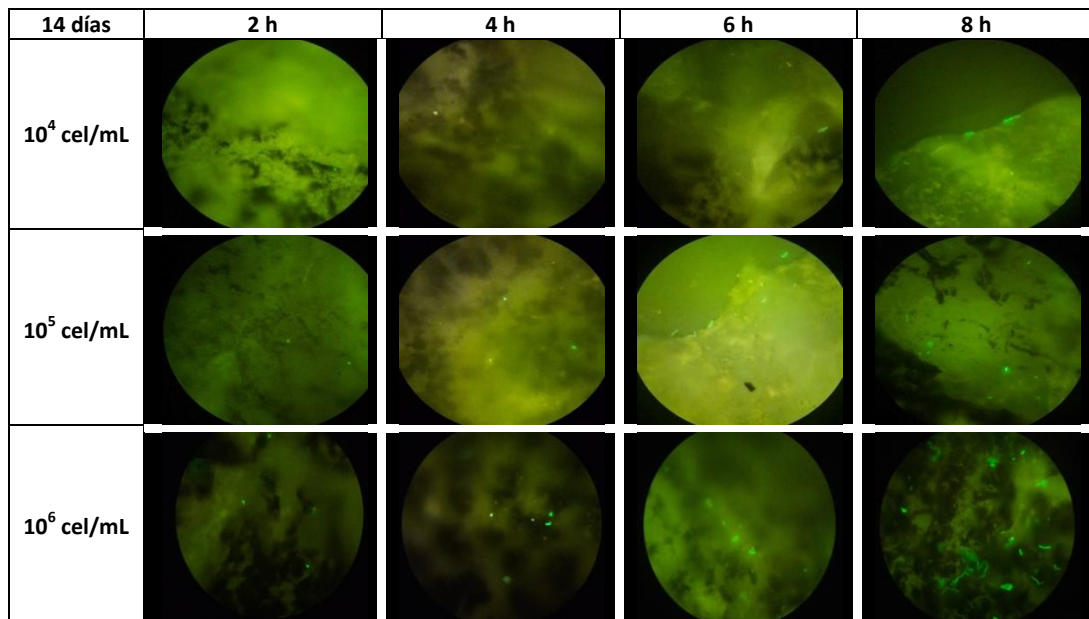


Figura 39. Evolución de la adhesión a piel de *B. brama* de *V. harveyi gfp* en experiencias realizadas a 20°C. Imágenes obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia (1000x). Experiencias realizadas con poblaciones recogidas tras 14 días de permanencia en agua de mar incubada a 20°C. Densidades iniciales de 10^4 cel/mL, 10^5 cel/mL y 10^6 cel/mL.

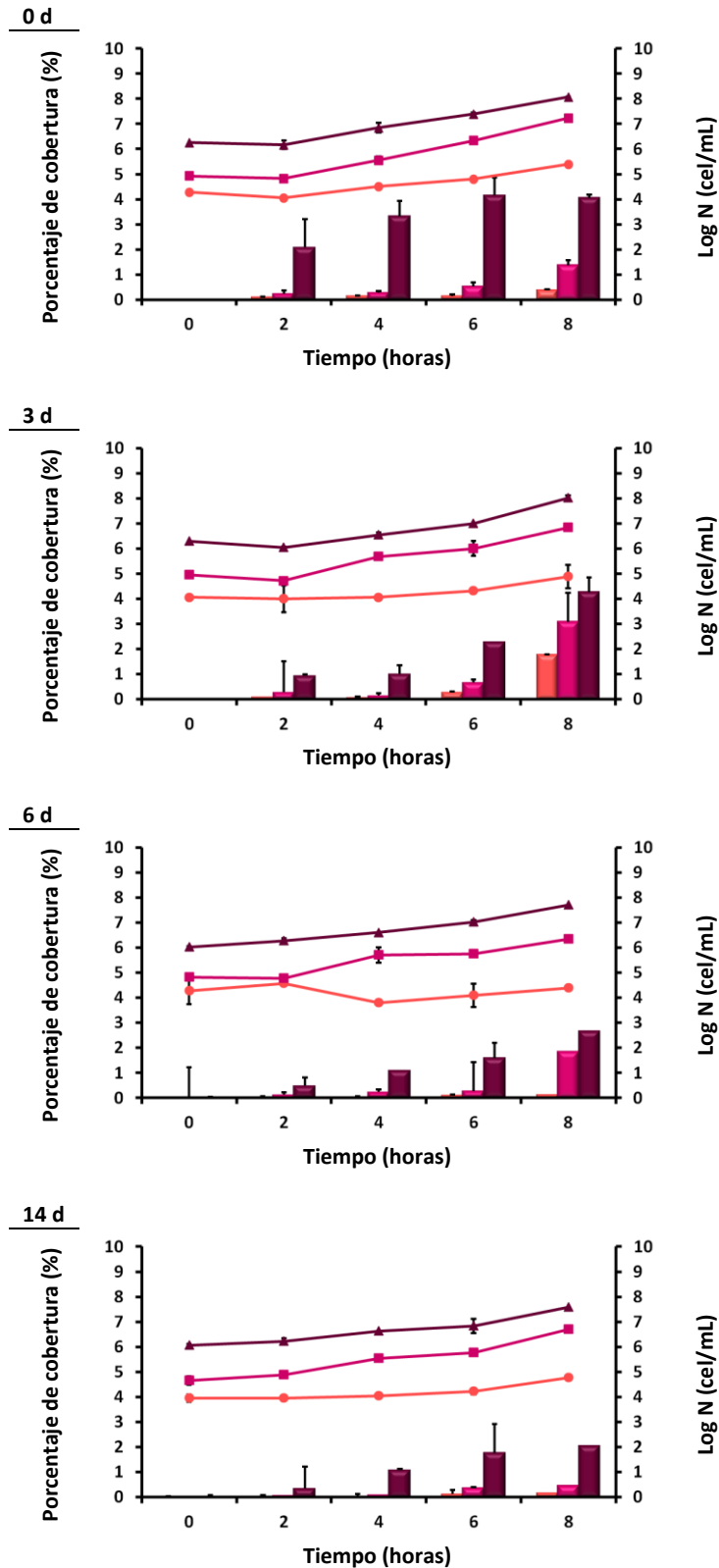
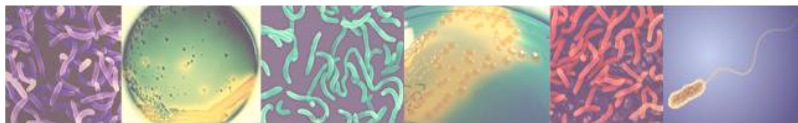


Figura 40. Variación de la capacidad de adhesión a piel de *B. brama* de poblaciones de *V. harveyi gfp* mantenidas en agua de mar a 20°C. Porcentaje de cobertura de *V. harveyi gfp* sobre piel de *B. brama* (columnas) y densidad celular de la población planctónica (líneas). Poblaciones obtenidas tras 0, 3, 6 y 14 días de permanencia en agua de mar estéril e incubada a 20°C. Densidades celulares iniciales de 10⁴ cel/mL (●, ■, ▲), 10⁵ cel/mL (■, ■, ■) y 10⁶ cel/mL (▲, ■, ■). Se muestran los valores medios de 3 experimentos independientes (±DE).

OBJETIVO 3

Caracterización de los cambios moleculares que, a nivel del subproteoma de las envueltas celulares, experimenta *V. harveyi* durante la adaptación a condiciones adversas.

MATERIALES Y MÉTODOS



Tras establecer los patrones de supervivencia de las diferentes especies de *Vibrio* se realizó un análisis proteómico de las envueltas celulares con el fin de establecer los cambios moleculares (cuantitativos y cualitativos) relacionados con la adaptación a las condiciones ambientales.

Para ello, se realizaron extracciones de las proteínas de las envueltas celulares de poblaciones de *V. harveyi* ambiental mantenidas en agua de mar estéril (condiciones de escasez de nutrientes) a 4°C y 20°C. Se recogieron alícuotas tras 0, 3 y 21 días

1. Obtención de extractos proteicos durante los ensayos de supervivencia

Se realizaron ensayos de supervivencia (Objetivo 2, Materiales y Métodos, apartado 2) en condiciones de escasez de nutrientes en matraces con 2 L de agua de mar natural estéril. Los matraces se inocularon con las suspensiones bacterianas previamente obtenidas según se indica en el Objetivo 2 (Materiales y Métodos, apartado 2) hasta alcanzar una densidad aproximada de 10^8 bacterias/mL. Los matraces se incubaron por 21 días a 4 y 20°C con agitación (90 rpm). Las extracciones se realizaron los días 0, 3 y 21. Las experiencias se realizaron por triplicado.

Para la obtención de extractos de envueltas externas, las bacterias se recogieron mediante centrifugación (8.000 g, 45 min, 4°C) en una centrífuga Beckman Coulter Avanti J-26 XPI, equipada con un rotor JLA 9.1000. El pellet resultante que contiene las bacterias, se resuspendió con 10 mL de tampón salino Tris-HCl 1x (TBS 1X) (mantenido a 4°C) (Anexo 5). Las células se lavaron por centrifugación (8.000 g, 20 min, 4°C), se retiró el sobrenadante y el pellet obtenido se volvió a resuspender en 10 mL de TBS 1X. Además se añadieron los inhibidores de proteasas *Protease Inhibitor Cocktail* (Sigma-Aldrich) (250 µL por gramo de pastilla celular) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, AppliChem) (concentración final 2 mM).

2. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se llevó a cabo mediante el método descrito por Molloy *et al.* (2000) con algunas modificaciones. Las suspensiones celulares se sonicaron (SONICS VibraCell™ VCX130 Ultrasonic Cell Disrupter, USA) utilizando una sonda de 6 mm de diámetro, al 65% de amplitud y durante 6 pulsos (pulsos de 15 s con descansos de 45 s). Posteriormente las muestras se centrifugaron (6.000 g, 20 min, 4°C) para la eliminación de células íntegras y otros restos celulares. Los sobrenadantes obtenidos se preservaron en hielo mientras que las pastillas celulares se resuspendieron en 10 mL de TBS y se volvieron a sonicar. El proceso se repitió tres veces. Los sobrenadantes obtenidos después de los tres procesos, se mezclaron y se diluyeron con carbonato sódico 0,2 M (1:1). Las muestras se incubaron en hielo y en agitación (60 rpm) durante 1 h para así evitar la agregación de las proteínas, la posible formación de micelas u otros restos celulares.

3. Aislamiento de proteínas de la envuelta celular

Tras la incubación de los extractos proteicos, las muestras se centrifugaron (115.000 g, 1 h, 4°C) en una centrífuga Beckman Coulter, Optima™ L-100 XP Ultracentrifuge, equipada con el

rotor TFT 50.38, en el Instituto de Biofísica de la UPV/EHU-CSIC. El pellet obtenido se resuspendió en 1 mL de TBS 1X (que permite la posterior identificación proteica mediante espectrometría de masas). Los sobrenadantes fueron desechados.

4. Cuantificación proteica

La cantidad total de proteína extraída se cuantificó utilizando el kit Thermo Scientific Pierce BCA Protein Assay Kit, basado en el método colorimétrico descrito por Lowry *et al.* (1951), utilizando seroalbúmina bovina (Thermo Scientific) como estándar proteico. Se añadieron 25 μ L de cada muestra a 200 μ L de reactivo BCA (ácido bicínico) y se incubaron durante 30 minutos a 37°C en oscuridad. A continuación, se determinó la absorbancia a 562 nm utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-2100. Para transformar la absorbancia a concentración de proteína, se construyó una recta patrón con seroalbúmina bovina. El límite de detección del método es de 5 μ g/mL.

5. Procesamiento de las muestras para la identificación proteica: espectrometría de masas

Tras la extracción de las proteínas, la identificación de las mismas se realizó en la Unidad de Proteómica de los Servicios Generales de Investigación de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la UPV/EHU, mediante cromatografía y espectrometría de masas.

5.1. Digestión de proteínas

La digestión de proteínas se realizó utilizando el método de digestión en solución. Se precipitaron 17 μ g de proteína de cada una de las muestras, utilizando para ello el kit 2-D Clean-up Kit (GE Healthcare). El precipitado obtenido se resuspendió en 25 μ L del tampón de solubilización RapiGest SF (Waters) al 0,2% en bicarbonato amónico 50 mM, para lo cual se incubaron las muestras a 85°C durante 15 min a 1.400 rpm en un termociclador con agitación Thermomixer compact (Eppendorf). Una vez solubilizadas las proteínas, se incubaron con ditiotretol (DTT, Sigma-Aldrich, concentración final 5 mM) durante 25 min a 60°C y 1.400 rpm, y a continuación con iodoacetamida (GE Healthcare, concentración final 15 mM) durante 30 min a temperatura ambiente y oscuridad. Para la digestión de las proteínas se añadió tripsina (Roche) en una proporción enzima:proteína de 1:50, y se incubó durante 16 h. Tras precipitación con ácido clorhídrico (25%) e incubación a 37°C durante 30 min, se eliminó el RapiGest SF mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 15 min. Finalmente, se limpiaron y desalaron las muestras utilizando las columnas C18 Micro SpinColumn (Harvard Apparatus).

5.2. Análisis LC-MS/MS

El análisis LC-MS/MS se realizó en un espectrómetro de masas Q Exactive HF-X (Thermo Scientific) operado en modo *data dependent acquisition* (DDA) acoplado a un sistema cromatográfico Easy-nLC 1200 nanoUPLC System (Thermo Scientific).

Los péptidos digeridos se resuspendieron en 0,1% ácido fórmico a una concentración final de 1 μ g/ μ L. 1,25 μ g de mezcla de péptidos se cargaron en una precolumna Acclaim PepMap100 (75 μ m x 2 cm, Thermo Scientific) conectada a una columna analítica Acclaim PepMap RSLC (75 μ m

x 25 cm, Thermo Scientific). Los péptidos se eluyeron directamente al nanoES Emitter (Thermo Scientific) mediante un gradiente lineal de 2,4% a 24% de acetonitrilo en 0,1% de ácido fórmico durante 120 min y de 24% a 32% durante 2 min a un flujo de 300 nL/min.

Los espectros MS se adquirieron a una resolución de 60.000 (m/z 200) y los espectros de fragmentación a 15.000 (m/z 200). Para la selección de los péptidos se utilizó una ventana de 1,4 th y para la fragmentación de los péptidos se aplicó una energía de colisión normalizada de 28. El tiempo máximo de inyección fue de 50 ms para las adquisiciones MS y 100 ms para las MS/MS y se utilizaron valores de AGC de 3E6 para las adquisiciones MS y de 5E5 para las MS/MS. Se aplicó un tiempo de exclusión dinámica de 20 s y los iones cargados con una carga o sin asignación de cargas se excluyeron de la fragmentación.

5.3. Procesamiento de datos

Los espectros fueron procesados con MaxQuant¹ (versión 1.6.0.16). Se utilizó una base de datos UniProtKB restringida a *V. harveyi* (versión 2018_12, 24281 entradas). Se seleccionaron 8 ppm y 20 ppm como tolerancia para los precursores y fragmentos respectivamente y se permitió un máximo de 2 omisiones de corte para la tripsina. Se seleccionó la oxidación de metioninas y la acetilación N-terminal de proteínas como modificaciones variables y la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija. La ratio de falsos positivos (FDR) se limitó al 1% para péptidos y proteínas. Las intensidades normalizadas de cada proteína (LFQ) se calcularon mediante el algoritmo MaxLFQ integrado en el programa MaxQuant.

Los resultados obtenidos con el programa MaxQuant se importaron a la plataforma Perseus² (versión 1.6.2.3). Se eliminaron las proteínas contaminantes y las identificadas únicamente con péptidos modificados. Se imputaron los “missing values” con los parámetros por defecto del programa Perseus. Para determinar la expresión diferencial de las proteínas entre condiciones se utilizó la prueba t de Student. Se consideraron proteínas presentes en cada punto analizado aquellas proteínas que se detectaron en dos o más réplicas de la tres existentes. Para considerar que una proteína estaba diferencialmente expresada en cada comparación se siguió el criterio: t-test<0.05 y ratio de expresión $\geq \pm 2$.

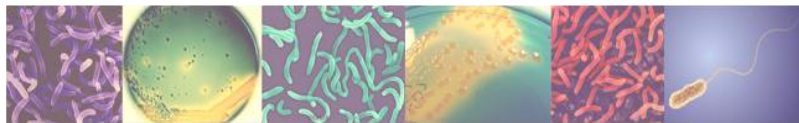
Con la finalidad de verificar la identificación realizada en la Unidad de Proteómica de los Servicios Generales de Investigación, y asignar la posible función de cada proteína, se realizó una búsqueda en la base de datos UniProt (<https://www.uniprot.org/>), linaje taxonómico “*Vibrio harveyi* group”, seleccionando la base de *Vibrio harveyi* (*Beneckea harveyi*) (Strain: BSW5). En base a la información recogida de la base de datos UniProt y una búsqueda bibliográfica de artículos científicos relacionados en bases bibliográficas (Science Direct, Springer, Google Scholar, NCBI y otras), se anotó la localización celular de las proteínas. Se analizaron preferiblemente las proteínas de las envueltas celulares o las proteínas asociadas a las mismas.

Siguiendo estos criterios, se obtuvieron las diferentes tablas para cada condición estudiada. Las proteínas se agruparon en diversos grupos funcionales (GF) en base a su función biológica principal y a los cambios experimentados a lo largo de la supervivencia.

OBJETIVO 3

Caracterización de los cambios moleculares que, a nivel del subproteoma de las envueltas celulares, experimenta *V. harveyi* durante la adaptación a condiciones adversas.

RESULTADOS



Se detectaron 2323 proteínas, de las cuales 1951 se confrontaron en la base de datos UniProt con la base *Vibrio harveyi* (*Benecke harveyi*) (Strain: BSW5). Se descartaron 200 proteínas detectadas al no poder caracterizarse en cuanto a nomenclatura, localización y/o función. Durante el análisis del subproteoma de las envueltas celulares, además de proteínas de membrana, se identificaron proteínas citoplasmáticas sin relación funcional o estructural con las envueltas celulares que no se consideraron en este estudio (datos no mostrados). Además, se descartaron 34 proteínas de membrana, 2 periplásmicas y 1 asociada a peptidoglicano de funciones desconocidas.

Las proteínas seleccionadas para un análisis más detallado se clasificaron en 8 grupos funcionales (estructura, transporte, bioenergética, síntesis y degradación de proteínas, división celular, sensores y movimiento, estrés y otras proteínas) y se analizó y comparó la evolución de las proteínas seleccionadas para cada condición de supervivencia y se compararon las diferentes condiciones estudiadas.

La variación del subproteoma de las envueltas celulares de *V. harveyi* ambiental en condiciones de escasez de nutrientes (agua de mar natural estéril) y bajo el efecto de distintas temperaturas de incubación (4°C y 20°C) se muestra en las Tablas 16 a 31. Para *V. harveyi* ambiental se analizaron 571 proteínas que cumplían los requisitos establecidos, de las cuales 403 se detectaron en todas las condiciones estudiadas y no experimentaron cambios al cabo de 21 días de experimentación. Asimismo, 168 proteínas experimentaron variaciones significativas a lo largo de la permanencia en agua de mar natural (aumento o disminución e incluso detección de proteínas inicialmente no detectadas).

La proteína más abundante al inicio de las experiencias fue la porina A0A0D0HS40_VIBHA que supuso el 10,34% ($\pm 0,55$) del total proteico. La porina A0A0D0JCS3_VIBHA, el factor de elongación EFTU (A0A0D0I8Y9_VIBHA) y la porina OmpW (A0A0D0IHK1_VIBHA) la siguieron en orden de abundancia, con porcentajes de 4,21 ($\pm 0,82$); 2,76 ($\pm 0,17$) y 2,01 ($\pm 0,20$), respectivamente. Todas ellas continuaron presentes, sin variaciones significativas en su expresión, tras 21 d de incubación a ambas temperaturas, manteniéndose como proteínas mayoritarias al finalizar las experiencias.

1. Proteínas relacionadas con el mantenimiento de la estructura celular

De las 63 proteínas relacionadas con el mantenimiento de la estructura celular, 48 no experimentaron cambios a lo largo de las experiencias (Tabla 16). Entre ellas, proteínas relacionadas con la síntesis, reparación y degradación del peptidoglicano como las proteínas reguladoras LpoA (A0A0D0JD55_VIBHA) y LpoB (A0A0D0J272_VIBHA), proteína DedD (A0A0D0JBJ6_VIBHA) o mureínas transglicosilasas (A0A0D0J0U6_VIBHA, A0A0D0JG35_VIBHA y A0A0D0J787_VIBHA) entre otras; diversas lipoproteínas como LolB (A0A0D0HP50_VIBHA) e YcfL (A0A0D0IBV2_VIBHA), MetQ (A0A0D0J0Y7_VIBHA) o Nlpl (A0A0D0J4T4_VIBHA). También se encontraron proteínas relacionadas con el ensamblaje de lipopolisacáridos (A0A0D0IM99_VIBHA, A0A0D0J8D0_VIBHA, entre otras) o la biosíntesis de la cápsula (A0A0D0IKG6_VIBHA, A0A0D0JD78_VIBHA). Se detectaron la porina OmpA (A0A0D0JEW4_VIBHA); así como, varias porinas inespecíficas y el complejo Bam encargado del ensamblaje de proteínas de membrana externa (A0A0D0J9Y4_VIBHA, A0A0D0J1A4_VIBHA, A0A0D0IKU0_VIBHA, A0A0D0JCY6_VIBHA, A0A0D0HIK0_VIBHA) y la chaperona SurA (A0A0D0JDD2_VIHAB). Las proteínas relacionadas con el mantenimiento de la forma bacilar MreB (A0A0D0HQK3_VIBHA) y MreC (A0A0D0IHR6_VIBHA) tampoco experimentaron cambios para ninguna de las condiciones estudiadas.

Tabla 16. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas estructurales** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0IZK5	Mureína endopeptidasa penicilina-insensible	ME/P
A0A0D0JD55	Activador de proteína de unión a penicilina LpoA	ME
A0A0D0J272	Activador de proteína de unión a penicilina LpoB	ME
A0A0D0J6Y1	DD-transpeptidasa	MC
A0A0D0J0U6	Mureína transglicosilasa lítica F unida a membrana	ME/P
A0A0D0JG35	Mureína transglicosilasa lítica	P
A0A0D0J787	Mureína transglicosilasa endolítica	MC
A0A0D0JB16	Proteína DedD	MC
A0A0D0J2Z6	Proteína AsmA de ensamblaje de las envueltas	MC/P
A0A0D0ILV6	N-acetilmurámico 6-fosfato eterasa	C
A0A0D0J939	N-acetil-D-glucosamina quinasa	C
A0A0D0J6W2	Proteína de la familia MipA que interactúa con MltA	ME
A0A0D0HJW6 A0A0D0HTP8 A0A0D0J1H7 A0A0D0J3M5	Lipoproteínas	IN
A0A0D0HP50	Lipoproteína LolB	ME
A0A0D0IBV2	Lipoproteína Ycfl	ME
A0A0D0J0Y7	Lipoproteína MetQ	P
A0A0D0J4T4	Lipoproteína Nlpl	MC
A0A0D0J8K4	Lipoproteína de la familia YgdI/YgdR putativa	MC
A0A0D0J281	Subunidad transportadora de lipoproteínas específica de la membrana externa LoIE	MC
A0A0D0IBT5	Similar a lipoproteína	IN
A0A0D0J407	Proteína clasificadora de lipoproteínas de la membrana externa putativa	IN
A0A0D0HV37	Lauroiltransferasa de biosíntesis de lípido A	MC
A0A0D0IM99	Proteína LptD de ensamblaje de LPS	ME
A0A0D0J8D0	Lipoproteína LptE de ensamblaje de LPS	ME
A0A0D0J1G0	Proteína A probablemente de ensamblaje de LPS	MC/P
A0A0D0HKN4	Proteína B probablemente de ensamblaje de LPS	MC
A0A0D0HV11	Proteína de biosíntesis de LPS	MC
A0A0D0JCH5	Proteína LptC del sistema de exportación de lipopolisacáridos	MC
A0A0D0IKG6 A0A0D0JD78	Proteínas de biosíntesis de la cápsula	IN
A0A0D0J6M0	Factor ElyC de biogénesis de envueltas putativo	MC
A0A0D0JEW4	Proteína de la familia OmpA	ME
A0A0D0ILC6	Dominio transmembrana de tipo OmpA putativo	ME
A0A0D0IEH6	Porina conteniendo dominio _b-brl	ME
A0A0D0J9Y4	Factor de ensamblaje BamA	ME
A0A0D0J1A4	Factor de ensamblaje BamB	ME
A0A0D0IKU0	Factor de ensamblaje BamC	ME
A0A0D0JCY6	Factor de ensamblaje BamD	ME
A0A0D0HIK0	Factor de ensamblaje BamE	ME
A0A0D0JDD2	Chaperona SurA	P
A0A0D0HQK3	Proteína MreB	C
A0A0D0IHR6	Proteína MreC	MC/P
A0A0D0HUT9	Factor de translocación TamA	ME
A0A0D0J7S9	Insertasa de proteínas de membrana YidC	MC
A0A0D0JCE6	Ligasa	MC

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

Dentro de este grupo funcional, se detectaron 15 proteínas cuya expresión varió durante la permanencia en agua de mar; de ellas únicamente la porina A0A0D0IYD5_VIBHA y la proteína YjbG relacionada con la síntesis de polisacáridos A0A0D0HV15_VIBHA experimentaron

sobreexpresión y 3 proteínas no detectadas al inicio de las experiencias se detectaron en alguna de las condiciones estudiadas (Tabla 17).

Se observaron diferencias en la expresión proteica para ambas temperaturas. Así, para las poblaciones mantenidas a 20°C se detectaron descensos en la expresión de lipoproteínas A0A0D0IAI4_VIBHA y A0A0D0HNM9_VIBHA, de la transglicosilasa A0A0D0J0Z5_VIBHA o de la proteína citoesquelética formadora de polímeros A0A0D0HHF8_VIBHA; llegando en algunos casos a ser indetectables (lipoproteínas A0A0D0J047_VIBHA y A0A0D0ILC0_VIBHA).

Tabla 17. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas estructurales** que sí varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	P0	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0IYD5	Proteína de membrana (porina)	ME	D	3,18↑	D	3,71↑	D
A0A0D0J5F3	Proteína de membrana (porina)	ME	D	D	0,30↓	0,43↓	D
A0A0D0IAI4	Lipoproteína	IN	D	D	D	0,46↓	D
A0A0D0HNM9	Lipoproteína de membrana externa Blc	ME	D	D	D	D	0,41↓
A0A0D0J0Z5	Peptidoglicano transglicosilasa endolítica RlpA	IN	D	D	D	D	0,12↓
A0A0D0HHF8	Proteína citoesquelética formadora de polímeros	IN	D	D	D	D	0,12↓
A0A0D0J047	Lipoproteína	IN	D	D	D	D	N
A0A0D0IDQ9	Proteína YcjF Putativa	MC	D	D	D	D	N
A0A0D0HV15	Proteína relacionada con la síntesis de polisacáridos YjbG	P	D	D	D	D	2,28↑
A0A0D0J3U2	Proteína conteniendo dominio LysM putativa	ME	D	D	D	D	N
A0A0D0ILC0	Lipoproteína	IN	D	D	D	N	N
A0A0D0IYQ8	Proteína de unión a penicilina 1B	MC	D	D	D	0,25↓	2,61↑
A0A0D0JDV1	Proteína de biogénesis de la envoltura celular OmpA	MC	N	N	N	N	D
A0A0D0J9H3	Proteína biosíntesis de la cápsula	MC	N	D	N	N	N
A0A0D0HKD4	Peptidoglicano glicosiltransferasa MrdB	MC	N	D	D	D	N

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

2. Proteínas relacionadas con el transporte

De las 251 proteínas adscritas al grupo funcional de transporte, 181 no experimentaron cambios a lo largo de las experiencias de supervivencia (Tabla 18). Entre ellas, se encontraron sistemas de transporte de nutrientes al interior de la célula (porinas, proteínas relacionadas con sistemas ABC o fosfotransferasas de transporte primario, o antiportadores y simportadores de transporte secundario; así como, de exportación de componentes de las envueltas (p.e. LptA y LptB o varios sistemas de secreción, Sec y Gsp). Los sistemas detectados permiten el transporte de azúcares (p.e. maltosa), aminoácidos (p.e. metionina) o péptidos o iones sodio o fosfato, etc.

Entre las porinas destacan las porinas A0A0D0HS40_VIBHA y OmpW (A0A0D0IHK1_VIBHA) por su abundancia y la estabilidad de su expresión a lo largo del tiempo. Además otras porinas,

como OmpR (A0A0D0JDV4_VIBHA), OmpU (A0A0D0JA53_VIBHA), OmpK (A0A0D0JC50_VIBHA) o maltoporina (A0A0D0HRY1_VIBHA), no variaron su expresión. Se mantuvieron igualmente constantes, a lo largo de las experiencias realizadas, la proteína BtuB transportadora de vitamina B12, la proteína TolC (secreción de proteínas y bomba de eflujo) y proteínas de resistencia a acriflavina (bombas de eflujo) (Tabla 18).

Tabla 18. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de transporte** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0IHK1	OmpW	ME
A0A0D0JDV4	OmpR	ME
A0A0D0JA53	OmpU	ME
A0A0D0JC50	OmpK putativa	ME
A0A0D0JDM8	WbfE	ME
A0A0D0HRY1	Maltoporina	ME
A0A0D0ILF9 A0A0D0HGH7 A0A0D0JAZ2 A0A0D0HS40 A0A0D0JCS3 A0A0D0J6P8 A0A0D0HK32 A0A0D0J943	Porinas	ME
A0A0D0JOE9 A0A0D0J5A8	Porinas putativas	ME
A0A0D0IZQ9	Proteína BtuB transportador Vitamin B12	ME
A0A0D0IH10 A0A0D0IJH4	Transportadores	MC
A0A0D0HHY9	Nucleósido permeasa	MC
A0A0D0HTH8 A0A0D0HJE0 A0A0D0HKF7 A0A0D0IYT3	Permeasas	MC
A0A0B4IRM4	Proteína de sistema de transporte dependiente de proteínas de unión	MC
A0A0D0HJY0	Subunidad LolC de la permeasa del transportador ABC liberadora de lipoproteínas	MC
A0A0D0I9R9 A0A0D0IB19	Proteínas de unión a sustrato, sistema ABC	MC
A0A0D0J6B5 A0A0D0IFG8	Proteínas de unión a sustrato, sistema ABC	P
A0A0D0HK07	Transportador ABC	MC
A0A0D0J8A4 A0A0D0JDC9 A0A0D0HHG3 A0A0D0J3H5 A0A0D0HKK7	Proteínas de unión a ATP, sistema ABC	MC
A0A0D0IYC4 A0A0D0I9R5 A0A0D0HRN5	Permeasas del sistema ABC	MC
A0A0D0J903	Proteína del sistema ABC	MC
A0A0D0J8A2	Permeasa MlaF de transporte intermembrana de fosfolípidos, sistema ABC	MC
A0A0D0JAK1 A0A0D0IMB3	Proteínas de unión a sustrato, sistema ABC C4-dicarboxilato	MC
A0A0D0JFU9	Permeasa sistema ABC de transporte de C4-dicarboxilato	MC

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma.

Tabla 18. Continuación.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0IBP0 A0A0D0J215 A0A0D0JDE6	Proteínas del sistema ABC de transporte de C4-dicarboxilato	MC
A0A0D0J717	Proteína DcuC	MC
A0A0D0IJ73	Porina transportadora de azúcares	ME
A0A0D0J911 A0A0D0J9C0	Proteínas de unión a sustrato, sistema ABC de transporte de azúcares	MC/P
A0A0D0J9H5	Proteína de unión a maltodextrina	MC
A0A0D0JEY9	Proteína de unión a ATP Malk, transporte maltosa/maltodextrina	MC
A0A0D0IZE1 A0A0D0J5M5 A0A0D0IBY8 A0A0D0I927 A0A0D0ID69	Permeasas, sistema ABC de transporte de aminoácidos	MC
A0A0D0J7T7 A0A0D0J1F2 A0A0D0HGI6	Proteínas de unión a sustrato, sistema ABC de transporte de aminoácidos	MC
A0A0D0J936	Proteína del sistema ABC de transporte de aminoácidos	MC
A0A0D0ICB2	Proteína de unión a ATP MetN, sistema ABC de transporte de metionina	MC
A0A0D0IFD6	Proteína de la familia LysO putativa, exportadora de lisina	MC
A0A0D0IIZ4	Transportador SstT para serina/treonina	MC
A0A0D0J1V3	Proteína de unión a ATP GlnQ, transporte glutamina	MC
A0A0D0J7V9 A0A0D0HNC8 A0A0D0IMD3	Permeasas del sistema ABC de transporte de péptidos	MC
A0A0D0J015 A0A0D0J4B2	Proteínas de unión a sustrato, sistema ABC de transporte de péptidos	MC
A0A0D0J9C8	Proteína de unión a ATP, transporte de péptidos	MC
A0A0D0JDI9	Proteína PotA de unión al ATP de importación de espermidina/putrescina	MC
A0A0D0J068 A0A0D0IJT6	Proteínas de la familia de proteínas de fusión de membrana (MFP)	MC
A0A0D0JCH8	Proteína de unión a sustrato, sistema ABC de transporte de tolueno	MC
A0A0D0JDC0	Proteína de unión a sustrato, sistema ABC t de transporte de unguento	MC
A0A0D0IYJ4	Proteínas de unión a sustrato, sistema ABC de transporte de hidroxamato de hierro	MC
A0A0D0J4N4	Transportador de bicarbonato BicA	MC
A0A0D0J024	Proteína de unión Hcalcio	MC
A0A0D0JBP9	Transportador de iones	MC
A0A0D0JDT9	Receptor TonB-dependiente	ME
A0A0D0IGC5	Sideróforo TonB-dependiente	ME
A0A0D0J8Y4	Permeasa, sistema ABC de transporte de sulfato	MC
A0A0D0HKL7	Sulfato permeasa (familia SulP)	MC
A0A0D0IEE9	Proteína CysZ transportadora de sulfato	MC
A0A0D0JCS3	Proteína aceptora de azufre CsdL	MC
A0A0D0IZJ8	Permeasa, sistema ABC de transporte de fosfato	MC
A0A0D0IBC7 A0A0D0J613	Proteínas de unión a sustrato, sistema ABC de transporte de fosfato	MC
A0A0D0J5L4	Permeasa PstA de sistema de transporte de fosfato	MC
A0A0D0IAY7	Proteína PhoU reguladora transporte de fosfato	C
A0A0D0JAW8	Transportador de fosfato	MC
A0A0D0JBK0	Proteína reguladora transporte de fosfato	IN
A0A0D0JF18 A0A0D0J793	Proteínas transportadoras de potasio	MC

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

Tabla 18. Continuación.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0J8T6 A0A0D0HKY4	Proteínas KtrA, transportadoras de potasio	MC
A0A0D0I1K3	Proteína KefA, transportadora de potasio	MC
A0A0D0IXE0	Proteína KefB del sistema de transporte de potasio regulada por glutatión	MC
A0A0D0HM33	Proteína Keff, transportadora de potasio	MC
A0A0D0J9K9	Proteína KefG, transportadora de potasio	MC
A0A0D0ID44	Proteína transportadora de potasio sistema Trk	MC
A0A0D0IKN8 A0A0D0HQL3	Proteínas MgtE, transporte de magnesio	MC
A0A0D0JG63	Proteína de unión a cationes	IN
A0A0D0J6M9	Regulador de respuesta del sistema de dos componentes de detección de cobre CusR	C
A0A0D0J505	Proteína CopA	MC
A0A0D0HN34	Transportador RND	MC
A0A0D0HLR8	Proteína FieF	MC
A0A0D0JC45	Transportador MFS	MC
A0A0D0J6I7	Transportador multidrogas MFS	MC
A0A0D0IFH6 A0A0D0IFH6	Simportadoras	MC
A0A0D0J6L7 A0A0D0J9B3 A0A0D0HPX1	Sodio/protón antiportadoras	MC
A0A0D0HQM4	Calcio/sodio:protón antiportador	MC
A0A0D0ICN3	Sodio:protón antiporterador NhaB	MC
A0A0D0IEX4 A0A0D0J958	Sodio/glutamato simportadoras	MC
A0A0D0JEE4	Sodio/prolina simportador	MC
A0A0D0ILY9	Sodio/alanina simportador	MC
A0A0D0J7H4	Subunidad G del complejo oxidoreductasa de translocación de iones	MC
A0A0D0ID19	Canal de iones mecanosensitivo	MC
A0A0D0J9F5 A0A0D0JBL4 A0A0D0J7P8 A0A0D0IIF2	Canales de iones mecanosensitivos, proteínas MscS	MC
A0A0D0J209	Transportador BCCT (Betaína/carnitina/colina)	MC
A0A0D0J641	Proteína de unión a biotina/lipoil	MC
A0A0D0J8Y1	Proteína de unión a ATP sistema ABC de transporte de multidrogas	MC
A0A0D0J0J8 A0A0D0J5Q1	Transportadores multidrogas AcrB	MC
A0A0D0HRM3	Proteína de la familia AcrB/AcrD/AcrF	MC
A0A0D0IDU5 A0A0D0IFW3	Transportadores de membrana externa de ácidos grasos de cadena larga	ME
A0A0D0HJY5	Proteína de unión a ATP / Permeasa de exportación de lípido A, proteína MsbA	MC
A0A0D0J6S5	Permeasa del sistema de exportación de lipopolisacáridos, LptF	MC
A0A0D0HQP2	Permeasa LptG del sistema ABC de exportación de LPS	MC
A0A0D0J312	Subunidad IIBC del sistema PTS transportador de glucosa (EIICB-Glc)	MC
A0A0D0J0Z0	Subunidad IIBC del sistema PTS transportador específico de trehalosa (maltosa)	MC
A0A0D0HIX7	Subunidad IIBC del sistema PTS transportadora de fructosa	MC
A0A0D0J5M8	EIII-Fru. Subunidad EIII del sistema PTS transportadora de fructosa	C
A0A0D0JAY2	EIICBA-Mtl. Subunidad EIICBA del sistema PTS transportadora de manitol	MC
A0A0D0JGB6	Proteína TolC	ME
A0A0D0J5H1	Proteína de la familia TolC	ME
A0A0D0J6Q9	Proteína de secreción	MC

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

Tabla 18. Continuación.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
AOA0D0J192	Proteína putativa de la familia de secreción HlyD	MC
AOA0D0J898	Sistema de exportación de lipopolisacáridos proteína LptA	P
AOA0D0IH59	Sistema de exportación de lipopolisacáridos, proteína de unión a ATP LptB	MC
AOA0D0HTU4	Proteína putativa de la familia YjiH	MC
AOA0D0IMK3	Proteína OtnA	MC
AOA0D0J4A8 AOA0D0J511 AOA0D0J4R7	Proteínas de resistencia a acriflavina	MC
AOA0D0J984	Transportador putativo de la familia AI-2E	MC
AOA0D0IMS2	Ruta de secreción general, proteína GspC (Tipo II)	MC
AOA0D0HV79	Ruta de secreción general, proteína GspD (Tipo II)	ME
AOA0D0JBF8	Ruta de secreción general, proteína GspE (Tipo II)	MC
AOA0D0JGW2	Ruta de secreción general, proteína GspF	MC
AOA0D0JDW7	Proteína central G del sistema de secreción de Tipo II	MC
AOA0D0IMR7	Ruta de secreción general, proteína H	MC
AOA0D0JE26	Ruta de secreción general, proteína Gspl	MC
AOA0D0JBF3	Proteína K del sistema de secreción de Tipo II	MC
AOA0D0JGV9	Proteína L del sistema de secreción de Tipo II	MC
AOA0D0JDW3	Proteína M del sistema de secreción de Tipo II	MC
AOA0D0J5S6	Aquaporina Z	MC
AOA0D0IM15	Subunidad SecA de translocación de proteínas	MC
AOA0D0J2R4	Proteína SecB de exportación de proteínas	C
AOA0D0IAZ6	Subunidad SecD de translocación de proteínas	MC
AOA0D0HIU5	Proteína de membrana SecF exportadora de proteínas	MC
AOA0D0HHW8	Preproteína translocasa subunit SecG.	MC
AOA0B4IMU4	Subunidad SecY translocasas de proteínas	MC
AOA0D0IAX8	Subunidad YajC accesoria del complejo Sec de translocación	MC
AOA0D0JB23	Módulo TamB de translocación/ensamblaje putativa	MC
AOA0D0JACO	Proteína D de secreción de hemolisina	MC
AOA0D0IGJ0	Proteína de péptido señal	IN
AOA0D0J4Z7	Proteína UshA	P
AOA0D0HL41 AOA0D0J969	Alfa amilasas	P

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

Los resultados obtenidos para aquellas proteínas que variaron su expresión durante la permanencia a 4 y 20°C (Tabla 19) mostraron 14 proteínas con similares patrones o tendencias de variación por efecto de la temperatura. Así, la proteína TraF (AOA0D0IG65_VIHBA) aparecía sobreexpresada tras 3 d de permanencia a 4 y 20°C y las proteínas simportadoras de sodio-soluto (AOA0D0J8Q0_VIHBA), translocasas TatA y TatC Sec-independientes (AOA0D0JBJ0_VIHBA y AOA0D0JDZ8_VIHBA), OppB (AOA0D0J455_VIHBA), Exb (AOA0D0JBD4_VIHBA y AOA0D0HV52_VIHBA), TonB (AOA0D0JGT5_VIHBA), proteínas de unión a ATP transportadoras de glicina/betaína y de péptidos (sistema ABC), transportador de L-cisteína TcyP (AOA0D0HN13_VIHBA), L-lactato permeasa (AOA0D0JBW2_VIHBA) disminuyeron su expresión, llegando incluso a no detectarse. A su vez, las proteínas NorM, permeasa transportadora MFS y una proteína de unión a ATP pasaron de no detectarse al inicio de las experiencias a detectarse a 3 o 21 d.

Varias proteínas, entre ellas varias relacionadas con sistemas ABC y una porina, estaban sobreexpresadas o mantenían su expresión en las poblaciones mantenidas a 20°C mientras que para las poblaciones mantenidas a 4°C o bien no se detectaba variación o esta disminuía respecto a los valores iniciales. También se detectó la situación inversa, mayor expresión en

poblaciones mantenidas a 4°C respecto a aquellas mantenidas a 20°C (TatB Sec- independiente, varias proteínas de sistemas ABC, una porina, etc.).

Tabla 19. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de transporte** que si varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	PO	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0IG65	Proteína TraF	P	D	2,12↑	D	2,38↑	D
A0A0D0J812	Simportador de sodio/dicarboxilato	MC	D	4,13↑	D	3,25↑	N
A0A0D0J6R1	Proteína de tolerancia al tolueno	IN	D	D	D	2,48↑	D
A0A0D0J3G1	Proteína de unión a sustrato transportadora de aminoácidos del sistema de transporte ABC	MC	D	D	D	4,38↑	D
A0A0D0J0Q1	Transportador de níquel	P	D	D	D	D	2,12↑
A0A0D0JAL5	Transportador ABC de oligopéptidos, proteína de unión a oligopéptidos periplásmicos	MC	D	D	D	D	3,06↑
A0A0D0HRH4	Proteína periplásmica de unión a putrescina	P	D	D	D	D	2,16↑
A0A0D0J755	Proteína de unión a C4-dicarboxilato del sistema de transporte ABC	MC	D	D	D	D	2,90↑
A0A0D0J770	Proteína de unión a sustrato del sistema de transporte ABC	MC	D	D	D	D	2,32↑
A0A0D0IET7	ATPasa del sistema de transporte ABC	MC	D	D	0,37↓	3,09↑	D
A0A0D0J4Y6	Permeasa del sistema de transporte ABC	MC	D	D	0,31↓	2,80↑	D
A0A0D0J6I4	Transportador de aminoácidos	MC	D	D	0,45↓	D	D
A0A0D0IC53	Permeasa de guanina	MC	D	D	0,33↓	D	D
A0A0D0HV47	Permeasa transportadora de péptidos del sistema de transporte ABC	MC	D	D	0,30↓	D	D
A0A0D0ID94	Proteína de unión a ATP transportadora de aminoácidos del sistema de transporte ABC	MC	D	D	0,38↓	D	D
A0A0D0J760	Transportador	MC	D	D	D	0,07↓	D
A0A0D0JA59	Transportador de aniones	MC	D	D	D	0,19↓	D
A0A0D0IA51	Proteína de unión al sustrato transportadora de péptidos del sistema de transporte ABC	MI	D	D	D	0,31↓	D
A0A0D0HUV6	Transportador de lisina LysM	MC	D	D	D	D	0,47↓
A0A0D0J589 A0A0D0HPC7	Proteína de unión a ATP del sistema de transporte multidroga ABC	MC	D	D	D	D	0,17↓
A0A0D0J7J5	Permeasa PstA del sistema de transporte de fosfato	MC	D	D	D	D	0,47↓
A0A0D0J006	Permeasa transportadora de péptidos del sistema de transporte ABC	MC	D	D	D	D	0,21↓
A0A0D0I9L6	Proteína OppD	MC	D	D	D	D	0,14↓
A0A0D0JBA4	Proteína ProX	MC	D	D	D	D	0,10↓

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

Tabla 19. Continuación.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	PO	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0IH14	Proteína de unión a ATP PstB de Importación de fosfato	MC	D	D	D	D	0,42↓
A0A0D0HLL9	Permease del sistema de transporte ABC	MC	D	D	D	D	0,48↓
A0A0D0IAT0	Sodio:alanina simportador	MC	D	D	D	D	0,26↓
A0A0D0JGZ2	Proteína translocasa TatB, Sec-independiente	MC	D	D	D	D	0,23↓
A0A0D0IMR2	Ruta de secreción general, proteína GspN	MC	D	D	D	D	0,50↓
A0A0D0J4H5	Subunidad IIBC del transportador de ácido N-acetilmurámico del sistema PTS	MC	D	D	D	D	0,47↓
A0A0D0J1E4	Porina	ME	D	D	D	D	N
A0A0D0J5D8	Permeasa transportadora de glicina/betaína del sistema de transporte ABC	MC	D	D	D	D	N
A0A0D0ICH2	Permeasa UgpA transportadora de sn-glicerol-3-fosfato del sistema de transporte ABC	MC	D	D	D	D	N
A0A0D0IH35	Putativa proteína transmembrana EcT transportadora de factor de acoplamiento de energía	MC	D	D	D	D	N
A0A0D0HHG6	Permeasa del sistema de transporte ABC	MC	D	D	D	0,45↓	N
A0A0D0J6Z5	Transportador de membrana de bomba de eflujo	MC	D	D	D	0,39↓	0,27↓
A0A0D0J8Q0	Simportador de sodio/soluto	MC	D	D	0,17↓	D	0,13↓
A0A0D0JBJ0	Proteína translocasa TatA Sec-independiente	MC	D	D	0,27↓	D	0,35↓
A0A0D0J455	Proteína OppB	MC	D	D	0,33↓	D	0,13↓
A0A0D0JBD4	ExbB, transportadores de biopolímeros	MC	D	D	0,47↓	0,25↓	0,20↓
A0A0D0JGT5	Transductor de energía TonB	ME	D	D	0,44↓	0,15↓	N
A0A0D0HPP8	Proteína de unión a ATP transportadora de glicina / betaína del sistema de transporte ABC	MC	D	D	N	0,35↓	N
A0A0D0HH94	Proteínas de unión a ATP transportadoras de péptidos	MC	D	D	0,26↓	D	N
A0A0D0J5R4							
A0A0D0JDZ8	Proteína translocasa TatC Sec-independiente	MC	D	D	0,42↓	D	N
A0A0D0JDU5	Proteína de unión al sustrato transportadora de azúcares del sistema de transporte ABC	MC	D	D	0,19↓	N	N
A0A0D0JBS6	Permeasa del sistema de transporte de fosfato	MC	D	D	N	D	D
A0A0D0HN13	TcyP, transportador de L-cisteína	MC	D	D	N	D	N
A0A0D0JBW2	L-lactato permeasa	MC	D	0,37↓	N	0,17↓	N
A0A0D0J2W3	Subunidad Tim44 de translocasa de preproteínas	MC	D	0,38↓	0,17↓	0,27↓	D
A0A0D0J6I8	Porina	ME	D	N	N	D	D

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "_VIBHB". Localización subcelular: MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa.

Tabla 19. Continuación.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	P0	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0J2T2	Permeasa UgpE transportadora de sn-glicerol-3-fosfato del sistema de transporte ABC	MC	D	N	N	D	N
A0A0D0HJ76	Proteína periplásmica ArtI de unión a la arginina, transporte de arginina del sistema de transporte ABC	P	D	D	D	N	N
A0A0D0HP18	Porina putativa	ME	D	D	D	D	N
A0A0D0JGC3	Ruta de secreción general, proteína GspA	MC	D	D	D	N	N
A0A0D0JA95	Subunidad IIABC del transportador de 2-O-a-manosil-D-glicerato del sistema PTS	MC	D	D	D	N	N
A0A0D0J9H6	Subunidad IICB del transportador de maltosa del sistema PTS	MC	D	D	D	N	N
A0A0D0HLW3	Transportador de azúcares	MC	D	D	D	N	N
A0A0D0J6S9	Componente IIC de permeasa	MC	D	N	D	0,25↓	N
A0A0D0J734	Permeasa multidrogas del sistema de transporte ABC	MC	D	N	D	D	D
A0A0D0J470	Proteína NorM de resistencia a multidrogas	MC	N	N	D	N	D
A0A0D0J6H1	Proteína de unión a ATP	MC	N	N	D	N	D
A0A0D0JOZ1	Permeasa transportadora MFS	MC	N	D	D	D	D
A0A0D0HKC4	Proteína Syd	MC/C	N	N	N	N	D
A0A0D0J1Q6	Transportador BCCT	MC	N	N	N	D	N
A0A0D0IKC5	Proteína de unión a calcio	MC	N	D	N	D	D
A0A0D0JDN1	Proteína de la familia del simportador de H ⁺	MC	N	D	D	D	N
A0A0D0JB28	Proteína de unión a zinc	IN	N	N	N	N	D

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización "_VIBHB". Localización subcelular: MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

3. Proteínas relacionadas con la bioenergética celular

De las 83 proteínas relacionadas con la bioenergética celular, 60 no experimentaron cambios a lo largo de las experiencias de supervivencia (Tabla 20). Entre ellas, se encontraron componentes de cadena de transporte de electrones y ATPasas (Tabla 20).

Entre las proteínas que varían su expresión a lo largo de la permanencia en agua de mar, se encontraba una isoforma de citocromo c que incrementó su expresión en poblaciones mantenidas a ambas temperaturas. Proteínas presentes al inicio de las experiencias aumentaron a lo largo del tiempo de experimentación, mayoritariamente citocromos de la cadena de transporte de electrones. En cambio, varias proteínas disminuyeron o resultaron indetectables en el transcurso de las experimentaciones; 2 de ellas en ambas temperaturas, y 9, únicamente a 20°C. Por último, 2 proteínas no detectadas inicialmente fueron posteriormente detectadas, azurina y una isoforma de citocromo c (Tabla 21).

En ocasiones, para un mismo tipo de proteína, se observaron patrones distintos. Así, distintas subunidades del citocromo c o ATPasas, presentes inicialmente, aumentaron o decrecieron, o

se mantuvieron constantes; e incluso pasaron de no detectadas a detectadas a lo largo de los días.

Tabla 20. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de bioenergética** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0J4E3	Nitrato reductasa periplásmica, subunidad de transferencia de electrones	P
A0A0D0IYE7	Nitrato reductasa periplásmica	P
A0A0D0JBN3	NAD(P)H nitrorreductasa putativa	MC/C
A0A0D0IXI1	Nitrito reductasa	P/MC
A0A0D0J438	Subunidad de flavoproteína fumarato reductasa	MC
A0A0D0J966 A0A0D0HRG8	Formato deshidrogenasas	P
A0A0D0J8N0	Fumarato reductasa subunidad hierro-azufre	MC
A0A0D0J8Z6	Succinato deshidrogenasa subunidad hidrofóbica de anclaje a membrana	MC
A0A0D0J4G0	Subunidad de flavoproteína succinato deshidrogenasa	MC
A0A0D0HP52	NAD(P) transhidrogenasa subunidad beta	MC
A0A0D0IED5	Oxidorreductasa	IN
A0A0D0HT69 A0A0D0J4H0	Flavodoxinas	MC
A0A0D0HKL4	Proteína portadora de agrupación de hierro-azufre	MC/C
A0A0D0HPY0	Subunidad B del complejo oxidorreductasa de translocación de iones	MC
A0A0D0HQH5	Subunidad catalítica de trimetilamina N-óxido reductasa I	P
A0A0D0JAV8	Citocromo b	MC
A0A0D0JGA3	Citocromo c1	MC
A0A0D0JDK3	Citocromo C	MC
A0A0D0HH43	Citocromo C hemo liasa	MC
A0A0D0HHI9 A0A0D0J6K7 A0A0D0J5S7	Proteínas tipo citocromo C	MC
A0A0D0J7S0	Subunidad de citocromo c oxidasa de tipo cbb3	MC
A0A0D0J9A0 A0A0D0J014	Citocromo c oxidasas	MC
A0A0D0IIN1	Citocromo c oxidasa putativa, subunidad CcoO	MC
A0A0D0IIA2	Citocromo d terminal oxidasa subunidad 1	MC
A0A0D0HR41	Citocromo d ubiquinol oxidasa subunidad 2	MC
A0A0D0JOH7	Citocromo c-552	P
A0A0D0HHQ4	NADPH:quinona reductasa	MC/C
A0A0D0JC33	FAD:proteína FMN transferasa	MC
A0A0D0J422	Proteína putativa de unión de FAD	MC
A0A0D0HJ23	Quinona oxidorreductasa	MC/C
A0A0D0JFD7	Translocador de Na(+)NADH-quinona reductasa subunidad A	MC/C
A0A0D0JC39	Translocador de Na(+)NADH-quinona reductasa subunidad B	MC
A0A0D0IL19	Translocador de Na(+)NADH-quinona reductasa subunidad C	MC
A0A0D0HTP5	Translocador de Na(+)NADH-quinona reductasa subunidad D	MC
A0A0B4ITP0	Translocador de Na(+)NADH-quinona reductasa subunidad E	MC
A0A0D0JFD4	Translocador de Na(+)NADH-quinona reductasa subunidad F	MC/C
A0A0D0HLL4	Proteína CcdA de biogénesis de citocromo c	MC
A0A0D0IZS6	Proteína CcmA de sistema ABC de biogénesis de citocromo c	MC
A0A0D0IZV8	Proteína CcmF de biogénesis de citocromo tipo c	MC
A0A0D0JAR2	ATPasa	MC

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma.

Tabla 20. Continuación.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0HNM4 A0A0D0HT25 A0A0D0IZY5 A0A0D0JAC4 A0A0D0J5R0 A0A0D0J955	ATPasas AAA	MC
A0A0D0ID75	ATP sintasa subunidad alfa	MC/C
A0A0D0J1X8	ATP sintasa subunidad beta	MC/C
A0A0D0J1Y3	ATP sintasa subunidad c	MC
A0A0D0J3G6	ATP sintasa subunidad delta	MC/C
A0A0D0HLO5	ATP sintasa cadena gamma	MC/C
A0A0D0J992	ATPasa P	MC
A0A0D0IFR6	D-lactato deshidrogenasa quinona-dependiente	MC
A0A0D0HGK6	Dihidrorotato deshidrogenasa (quinona)	MC
A0A0D0JB71	IMP deshidrogenasa	MC

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma.

Tabla 21. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de bioenergética** que **si** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	P0	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0IMU3	Citocromo C	MC	D	4,69↑	D	3,50↑	D
A0A0D0JDX8	Citocromo C	MC	D	2,42↑	0,39↓	D	D
A0A0D0IY37	Proteína de biogénesis de tipo citocromo c	MC	D	D	0,45↓	D	N
A0A0D0J1P1	Flavoproteína-ubiquinona oxidoreductasa transferidor de electrones	MC	D	D	1,57↑	D	D
A0A0D0J297	Citocromo B6	MC	D	D	D	5,91↑	D
A0A0D0HJA3	Citocromo C	MC	D	D	D	2,09↑	D
A0A0D0IJG8	Citocromo c oxidasa subunidad 2	MC	D	D	D	2,59↑	D
A0A0D0HUK1	Subunidad hierro-azufre de ubiquinol-citocromo c reductasa	MC	D	D	D	2,06↑	D
A0A0D0HL08	ATP sintasa subunidad a	MC	D	D	D	1,95↑	D
A0A0D0I9K1	Citocromo tipo deca-hemo c	IN	D	D	D	D	19,16↑
A0A0D0IF18	ATPasa	MC	D	D	D	0,17↓	D
A0A0D0JCG6	ATPasa	MC	D	D	D	0,22↓	2,47↑
A0A0D0I9H8	Proteína de biogénesis de tipo citocromo c CcmE	MC	D	D	D	D	0,43↓
A0A0D0IBQ6	Nitrito reductasa	MC/P	D	D	D	D	0,23↓
A0A0D0IB85	Transportador de electrones RnfB	MC/C	D	D	D	D	0,30↓
A0A0D0HJ66	Subunidad beta de flavoproteína de transferencia de electrones	MC/C	D	D	D	D	0,35↓
A0A0D0JBL6	Ubiquinol-citocromo C reductasa	MC	D	N	N	N	N
A0A0D0IBR0	Citocromo C	MC	D	D	D	D	N

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma.

Tabla 21. Continuación.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	PO	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0JF94	Acil-coenzima A deshidrogenasa	MC	D	D	D	D	N
A0A0D0J1R2	Putativa subunidad I de Citocromo o ubiquinol oxidasa	MC	D	D	D	N	N
A0A0D0IJ81	Proteína tipo SURF1	MC	D	D	D	N	N
A0A0D0IKD6	Azurina	P	N	N	N	D	N
A0A0D0J350	Citocromo c	MC	N	D	N	D	4,01↑

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma.

4. Proteínas relacionadas con la síntesis y degradación proteica

21 proteínas relacionadas con la síntesis y degradación de proteínas no variaron a lo largo de las experiencias realizadas, entre las que se encuentran varias proteasas, proteasas ATP-dependientes (entre ellas la proteasa FtsH) y peptidasas (Tabla 22).

2 proteínas experimentaron sobreexpresión en poblaciones mantenidas a 20°C, las fosfatasas alcalinas (A0A0D0HJ57_VIBHA y A0A0D0J7D4_VIBHA). En cambio, 9 proteínas disminuyeron o desaparecieron: 3 de ellas (las peptidasas A0A0D0HMT8_VIBHA, A0A0D0IGF5_VIBHA y A0A0D0J6B8_VIBHA) lo hicieron en ambas condiciones; 3 proteasas (A0A0D0IHP1_VIBHA, A0A0D0HTL0_VIBHA y A0A0D0IC03_VIBHA) y 3 peptidasas (A0A0D0HQI0_VIBHA, A0A0D0J0D1_VIBHA y A0A0D0IYT8_VIBHA) lo hicieron únicamente tras exposición a 20°C (Tabla 23).

Tabla 22. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de síntesis y degradación proteica** que no varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0J2M9	Proteasa Zn-dependiente	IN
A0A0D0IBJ2	Proteína HflC	MC
A0A0D0JOA0	GTPasa HflX	C
A0A0D0HM57	Proteasa. Proteína QmcA	CM
A0A0D0HQB1	Serina proteasa	CM
A0A0D0IGX0	Proteasa 4	MC
A0A0D0J4G3	Proteasa HtpX	MC
A0A0D0HGW9	Serina proteasa intramembrana GlpG	MC
A0A0D0IE42	Proteasa ATP-dependiente Clp, subunidad de unión al ATP ClpX	C
A0A0D0J533 A0A0D0J2E1	Zn proteasas ATP-dependientes	MC
A0A0D0J0K5	Zinc metaloproteasa ATP-dependiente FtsH	MC
A0A0D0J1F4 A0A0D0JBE6 A0A0D0HQE1	Peptidasas	MC
A0A0D0J2D7	Peptidasa señal I	MC
A0A0D0JFN8	Proteína que contiene el dominio peptidasa M14	C
A0A0D0IZX0	Pitrilisina	IN
A0A0D0J9T8	Peptidasa M16	IN
A0A0D0J3I2	Proteína PepN / Aminopeptidasa N	MC
A0A0D0HUK4	Serina endoproteasa periplasmática tipo DegP	P

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

Tabla 23. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de síntesis y degradación proteica** que **si** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	PO	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
AOA0D0HJ57	Fosfatasa alcalina	C	D	D	D	2,04↑	D
AOA0D0J7D4	Fosfatasa alcalina	C	D	D	D	3,53↑	D
AOA0D0HMT8	Peptidasa	MC	D	D	0,43↓	0,10↓	0,12↓
AOA0D0IGF5	Peptidasa S41	IN	D	D	0,07↓	D	N
AOA0D0HTL0	Metaloproteasa de zinc	MC	D	D	D	D	0,39↓
AOA0D0IC03	ClpA proteína proteasa	IN	D	D	D	D	0,31↓
AOA0D0J0D1	Peptidasa M16	IN	D	D	D	D	0,30↓
AOA0D0HQI0	Peptidasa C69	IN	D	D	D	0,14↓	N
AOA0D0IHP1	Proteasa Zn-dependiente	IN	D	D	D	0,19↓	D
AOA0D0J6B8	Peptidasa	MC	D	N	N	D	N
AOA0D0IYT8	Peptidasa M23	MC	D	D	D	N	N

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

5. Proteínas relacionadas con la división celular

22 proteínas relacionadas con el proceso de división celular se mantuvieron constantes durante la permanencia de las poblaciones a 4 y 20°C (Tabla 24), entre ellas, proteínas del sistema Tol-Pal (AOA0D0HR36_VIBHA y AOA0D0I198_VIBHA), proteínas relacionadas con el peptidoglicano (AOA0D0J8R4_VIBHA y AOA0D0JH07_VIBHA) o proteínas relacionadas con la segregación del cromosoma: ParA (AOA0D0JEH4_VIBHA, AOA0D0IGH6_VIBHA y AOA0D0J7S5_VIBHA) y ParB (AOA0D0J0D6_VIBHA). Además, una proteína del sistema Tol-Pal (AOA0D0JCX2_VIBHA) aumentó tras exposición a 20°C (Tabla 25).

Todas las modificaciones en la expresión ocurrieron para poblaciones mantenidas a 20°C. Así, 2 proteínas adscritas al grupo de división celular disminuyeron tras exposición a 20°C: las proteínas ADN translocasa FtsK (AOA0D0HNI8_VIBHA) y de división celular FtsZ (AOA0D0JAU7_VIBHA). 2 proteínas, una formadora de septo (AOA0D0J8F0_VIBHA) y MinD (AOA0D0J4D7_VIBHA) resultaron indetectables tras 21 días de permanencia a 20°C (Tabla 25).

Tabla 24. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de división celular** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0HR36	Proteína del sistema Tol-Pal TolR	MC
A0A0D0II98	Proteína del sistema Tol-Pal TolQ	MC
A0A0D0II93	Coordinador de división celular CpoB	P
A0A0D0JB74	Proteína de división celular ZapB	C
A0A0D0HI89	Proteína de división celular ZapD	C
A0A0D0JGA8	Proteína de división celular ZapE	C
A0A0D0HM63	Proteína de división celular ZipA	MC
A0A0D0HUJ0	Proteína de división celular FtsA	MC/C
A0A0D0I9D7	Proteína de unión a ATP de división celular FtsE	MC
A0A0D0JB69	Proteína de división celular FtsN	MC
A0A0D0IM19	Proteína de división celular FtsQ	MC
A0A0D0HS21 A0A0D0IZN7	Proteínas de división celular FtsX	MC
A0A0D0HGW4	Proteína de división celular FtsY	MC
A0A0D0J8R4	Proteína asociada al peptidoglicano	ME/P
A0A0D0JH07	Peptidoglicano D,D-transpeptidasa FtsI	MC
A0A0D0ICD1	Proteína de división celular DamX	MC
A0A0D0JO87	Proteína de división celular DedD	MC
A0A0D0JEH4 A0A0D0IGH6 A0A0D0J7S5	Proteínas de segregación cromosómica ParA	MC/C
A0A0D0JOD6	Proteína de segregación cromosómica ParB	MC/C

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma.

Tabla 25. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de división celular** que **si** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	PO	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0JXC2	Proteína del sistema Tol-Pal TolB	P	D	D	D	D	3,47↑
A0A0D0HNI8	ADN translocasa FtsK	MC	D	D	D	D	0,34↓
A0A0D0JAU7	Proteína de división celular FtsZ	C	D	D	D	0,41↓	0,08↓
A0A0D0J8F0	Proteína formadora del septo	MC	D	D	D	D	N
A0A0D0J4D7	Inhibidor de la división celular MinD	MC	D	D	D	0,11↓	N

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma.

6. Proteínas sensoras y relacionadas con el movimiento

Entre las 42 proteínas relacionadas con recepción de señales extracelulares y movimiento celular, 21 fueron detectadas al inicio de las experiencias y no variaron a lo largo del tiempo de experimentación en ninguna de las condiciones estudiadas (Tabla 26). Por ejemplo, la proteína EnvZ (sensora de osmolaridad, A0A0D0IMQ2_VIBHA), una histidina quinasa transductora de señales (A0A0D0J1M8_VIBHA), isoformas de la proteína CheY, o proteínas aceptoras de metilos, no experimentaron variaciones; al igual que proteínas del motor flagelar MotB y PomA; entre otras (Tabla 26).

17 proteínas presentes al inicio de las experiencias variaron a lo largo de las mismas dependiendo de la temperatura de incubación. De ellas, solo 1 proteína quimiotáctica aceptora de metilo aumentó su expresión a los 3 d de incubación a 4°C; el resto disminuyeron o dejaron de detectarse tras 21 d; como por ejemplo CheA y CheW o PilT y PilZ y CpaF para poblaciones mantenidas a 20°C. Por último, 4 no detectadas inicialmente pasaron a detectarse al menos temporalmente, p.e. FlgE o la proteína fimbrial A0A0D0J9T4_VIBHA (Tabla 27).

Tabla 26. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas sensoras y de movimiento** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0IMQ2	Histidina quinasa sensora de osmolaridad EnvZ	MC
A0A0D0J1M8	Histidina quinasa de transducción de señales	MC
A0A0D0J462	Sensor histidina quinasa	MC
A0A0D0HUF4 A0A0D0IFD1	Histidina quinasa	MC
A0A0D0IGA9 A0A0D0JB1 A0A0D0JBN4	Proteínas quimiotácticas CheY	C
A0A0D0J5W8 A0A0D0J8E7 A0A0D0IY42	Proteínas quimiotácticas aceptoras de metilo	P/MC/C
A0A0D0J8P1	Proteína CpxA	MC
A0A0D0JGE0	Proteína sensora	MC
A0A0D0JOY1	MotB, motor flagelar	MC/P
A0A0D0J6U7	PomA, motor flagelar	MC
A0A0D0J6L8	Proteína flagelar FlgP	ME
A0A0D0J5S9 A0A0D0J4T3	Proteínas de biogénesis MSHA MshA	EX/P/MC
A0A0D0HQJ8	Proteína de biogénesis MSHA MshE	C
A0A0D0IHQ8	Proteína de biogénesis MSHA MshG	MC
A0A0D0J871	Proteína de biogénesis MSHA MshL	ME

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; EX, extracelular.

Tabla 27. Proteínas de envolturas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas sensoras y de movimiento** que **si** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	PO	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0HGI1	Proteína quimiotáctica aceptora de metilo	MC	D	4,11↑	0,14↓	D	N
A0A0D0J6N0	Proteína de biogénesis MSHA MshA	MC	D	0,46↓	D	0,36↓	N
A0A0D0JCW9	MotA, motor flagelar	MC	D	D	0,38↓	0,38↓	D
A0A0D0JDW0	Proteína quimiotáctica	MC	D	D	0,28↓	0,24↓	N
A0A0D0HH02	Proteína quimiotáctica CheW	C	D	D	D	0,37↓	D
A0A0D0J0M8	Proteína de ensamblaje del pilus PilZ	C	D	D	D	0,35↓	N
A0A0D0HQJ3	Proteína de biogénesis MSHA MshJ	ME/P	D	D	D	D	0,40↓
A0A0D0J6M3	Proteína de biogénesis MSHA MshI	MC	D	D	D	D	0,48↓
A0A0D0IDH2	Proteína PilT de motilidad	MC/C	D	D	D	D	0,48↓
A0A0D0J3N7	Proteína PilT de motilidad	MC/C	D	D	D	D	N
A0A0D0J4W6	Proteína de ensamblaje del pilus CpaF	C	D	D	D	D	N
A0A0D0HM28	Proteína tipo prepilina putativa que contiene el dominio de escisión/metilación	MC	D	D	D	D	N
A0A0D0J6F9 A0A0D0JB76	Proteínas quimiotácticas	MC	D	D	D	D	N
A0A0D0HG85	Proteína quimiotáctica CheA	MC/C	D	D	D	D	N
A0A0D0IM47	Proteína quimiotáctica	MC	D	D	N	D	D
A0A0D0IJA4	Proteína quimiotáctica CheC	C	D	N	N	N	N
A0A0D0IG60	Proteína del gancho flagelar FlgE	EX	N	D	N	N	N
A0A0D0HP38	Proteína flagelar del cuerpo basal	IN	N	D	D	D	N
A0A0D0J9T4	Proteína fimbrial	EX	N	D	N	D	N
A0A0D0JA17	Proteína de ensamblaje del pilus CpaC	ME	N	D	D	D	N

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; EX, extracelular; IN, indeterminada.

7. Proteínas relacionadas con la respuesta al estrés

9 proteínas relacionadas con la respuesta al estrés no experimentaron cambios en su expresión o detección (Tabla 28). Entre ellas, una proteína de respuesta a la escasez de nutrientes (A0A0D0J4E0_VIBHA), catalasa (A0A0D0IKF6_VIBHA) relacionada con la respuesta al estrés oxidativo, o con la adquisición y metabolismo del hierro (A0A0D0HIH7_VIBHA).

Dentro de este grupo de proteínas, la bacterioferritina (A0A0D0IZB5_VIBHA) incrementó significativamente su expresión en ambas condiciones, mientras que la proteína asociada a gránulos de PHA (polihidroxialcanoato) (A0A0D0J092_VIBHA) disminuyó en ambas temperaturas. Dos proteínas relacionadas con la respuesta al estrés dejaron de detectarse en ambas temperaturas: una proteína homóloga a la proteína de estrés universal (USP) B (A0A0D0IIW1_VIBHA) y la proteína CstA de respuesta a la escasez de carbono (A0A0D0JAR1_VIBHA). La proteína ZntA (A0A0D0HJV8_VIBHA) disminuyó únicamente a 4°C, mientras que la proteína A0A0D0J9W0_VIBHA de resistencia a iones lo hizo únicamente a 20°C (Tabla 29).

Tabla 28. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de estrés** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
A0A0D0IM38	Proteasa DegS de la membrana externa sensora de estrés	ME
A0A0D0IFG0	Proteína de estrés calórico HslJ	ME
A0A0D0J4E0	Proteína de ayuno inducible	ME
A0A0D0JFJ3	Proteína de resistencia al arsenito ArsB (antiportador)	MC
A0A0D0HNG7	Proteína de lisogenización de alta frecuencia homóloga de HflD	MC/C
A0A0D0IFI4	PspB	MC
A0A0D0IKF6	Catalasa	P
A0A0D0HIH7	Proteína de biosíntesis de hemo HemY	MC
A0A0D0J963	Regulador transcripcional de la familia TetR	C

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma.

Tabla 29. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Proteínas de estrés** que **si** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	P0	4°C		20°C	
				P3	P21	P3	P21
A0A0D0IZB5	Bacterioferritina	IN	D	3,58↑	4,24↑	11,09↑	D
A0A0D0J092	Proteína asociada a gránulos de PHA	IN	D	0,32↓	D	0,05↓	0,08↓
A0A0D0IHW1	Homóloga a la proteína de estrés universal (USP) B	MC	D	0,36↓	N	0,36↓	N
A0A0D0JAR1	Proteína de ayuno carbono A (CstA)	MC	D	N	N	N	N
A0A0D0HJV8	ZntA	MC	D	D	N	D	D
A0A0D0J9W0	Proteína de resistencia a iones tóxicos	IN	D	D	D	D	0,17↓

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; IN, indeterminada.

8. Otras proteínas

58 proteínas sin adscripción clara a los grupos funcionales anteriormente establecidos se agruparon dentro de *Otras proteínas*. Dentro de este grupo, los factores de elongación EF-4 (A0A0D0J8A3_VIBHA) y EF-Tu (A0A0D0I8Y9_VIBHA) se mantuvieron constantes durante la permanencia de las poblaciones a 4 y 20°C. El mismo comportamiento se observó para diversas hemolisinas (A0A0D0J0J5_VIBHA, A0A0D0JCA0_VIBHA, A0A0D0ILFO_VIBHA, A0A0D0J6A0_VIBHA y A0A0D0HUJ8_VIBHA) y otras proteínas relacionadas con la patogenicidad (LemA, WbfB entre otras), u otras proteínas de funciones diversas como enzimas extracelulares (lipasas, alfa-amilasas y pululanasa) (Tabla 30).

Si bien, las proteínas LuxO (LUXO_VIBHA), LuxP (A0A0D0J8K9_VIBHA), LuxQ (A0A0D0J9Q7_VIBHA) y LuxR (A0A0D0HLJ1_VIBHA), relacionadas con la bioluminiscencia/quórum sensing, se mantuvieron constantes a lo largo de la permanencia a 4 y 20°C (Tabla 30), la proteína LuxU (A0A0D0J4Q3_VIBHA) disminuyó significativamente tras 21 días de permanencia a 20°C (Tabla 31).

Del mismo modo, algunas proteínas relacionadas con del sistema de secreción Tipo VI y relacionadas con la patogenicidad bacteriana se mantuvieron constantes (o incluso aumentaron su expresión) mientras que otras disminuyeron, llegando en algunos casos a ser indetectables. Entre los factores de virulencia, las proteínas PspA y PspC (AOA0D0J5Q8_VIBHA y AOA0D0HNC3_VIBHA) aumentaron su expresión a 20°C. Por otro lado, dos proteínas de aglutinación se mantuvieron constantes durante las experiencias, mientras que una disminuyó tras 21 días de exposición a ambas temperaturas, siendo a 4°C indetectable (Tablas 30 y 31). Además, para ambas temperaturas dejó de detectarse el enzima quitinasa (AOA0D0J9Z0_VIBHA).

Tabla 30. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Otras proteínas** que **no** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Grupo	Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
Factores de elongación	AOA0D0J8A3	Factor de elongación 4 (EF-4)	MC
	AOA0D0I8Y9	Factor de elongación Tu (EF-Tu)	C
Factores de virulencia	AOA0D0J0J5 AOA0D0JCA0	Hemolisinas D	MC
	AOA0D0ILF0 AOA0D0J6A0 AOA0D0HUI8	Hemolisinas	MC
	AOA0D0IB68	Proteína VirC intermediaria de la virulencia	IN
	AOA0D0J921	Proteína reguladora transmembrana ToxS	MC
	AOA0D0IBE8	Efactor Tipo III	EX
	AOA0D0J1Q1	Proteína de la familia LemA	MC
	AOA0D0IMK5	WbfB	ME
	AOA0D0I917 AOA0D0HPP8	Proteínas de aglutinación	ME
	AOA0D0ICV1	Fosfolipasa A1	ME
	AOA0D0IA98	Protein PapC de ensamblaje de pili	ME
	AOA0D0JON4	Proteína PapD de ensamblaje de pili	P
	AOA0D0HHR7	Peptidasa/N-metiltransferasa de la señal líder de prepilina	MC
	AOA0D0IGN3 AOA0D0HNV9 AOA0D0J5K9	Lipoproteínas del sistema de secreción Tipo VI TssJ	ME/P
	AOA0D0JBG1 AOA0D0IG06 AOA0D0HPN4	Proteínas del sistema de secreción Tipo VI	C
	AOA0D0J6F8	Proteína del sistema de secreción Tipo VI VgrG	EX
	AOA0D0J4W1	Proteína del sistema de secreción Tipo VI	IN
	AOA0D0HNQ7	Proteína del sistema de secreción Tipo VI VasD	ME
	AOA0D0HKE8	Proteína antígeno de superficie	MC

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; EX, extracelular; IN, indeterminada.

Tabla 30. Continuación.

Grupo	Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular
Funciones diversas	AOA0D0J3Z3 AOA0D0J3A4	Lipasas	IN
	AOA0D0HL41 AOA0D0J969	Alfa amilasas	P
	AOA0D0J849	Pululanasa	EX
	LUXO	Proteína reguladora de luminiscencia LuxO	C
	AOA0D0J8K9	Proteína periplásmica LuxP de unión al autoinductor 2	P
	AOA0D0J9Q7	Proteína LuxQ sensor quinasa/fosfatasa del autoinductor 2	MC
	AOA0D0HLJ1	Regulador transcripcional de la familia LuxR	C
	AOA0D0J357	Hidrolasa de la familia HIT	IN
	AOA0D0JAS7	Proteína de intercambio Tiol-disulfuro	P
	AOA0D0J931	Celulosa sintasa	ME
	AOA0D0JB06	Proteína competente ComFB	C

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; EX, extracelular; IN, indeterminada.

Tabla 31. Proteínas de envueltas celulares obtenidas a partir de poblaciones de *V. harveyi* ambiental adscritas al grupo funcional **Otras proteínas** que **si** varían a lo largo del tiempo de exposición a 4°C y 20°C.

Grupo	Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	PO	4°C		20°C	
					P3	P21	P3	P21
Factores de virulencia	AOA0D0J5Q8	Proteína PspA	C	D	D	D	2,06↑	D
	AOA0D0HNC3	Proteína PspC	MC	D	D	D	1,96↑	D
	AOA0D0J5G6	Proteína de aglutinación	ME	D	D	N	D	0,35↓
	AOA0D0JAT5	Proteína de secreción Tipo VI	IN	D	4,13↑	D	3,25↑	N
	AOA0D0HNX1	Proteína de secreción Tipo VI	IN	D	D	0,49↓	0,19↓	D
	AOA0D0JAU2	Proteína de secreción Tipo VI	IN	D	D	N	N	N
	AOA0D0JBF2	Proteína de secreción Tipo VI lcmF	P	D	D	0,30↓	N	D
	AOA0D0J4W7	Proteínas de secreción Tipo VI lcmF	P	D	D	D	0,29↓	D
	AOA0D0HPM4	Lipoproteína de secreción Tipo VI Tssk	C	D	D	D	D	0,44↓
	AOA0D0JAW2	ATPasa de secreción Tipo VI TssH	C	D	D	D	0,13↓	D
	AOA0B4IR10	Proteína de secreción Tipo VI de la familia EvpB. TssC	C	D	D	D	0,36↓	D
	AOA0D0J6E4	Proteína de secreción Tipo VI ImpG. TssF	C	D	D	D	D	N
	AOA0D0J4X3	Proteína de secreción Tipo VI	IN	D	D	D	0,21↓	D

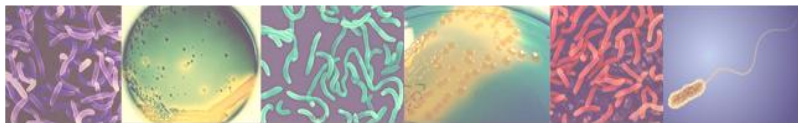
* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; IN, indeterminada.

Tabla 31. Continuación.

Grupo	Acceso a UniProt	Nombre de la proteína	Localización subcelular	PO	4°C		20°C	
					P3	P21	P3	P21
Factores de virulencia	AOA0D0JAV9	Proteína exportadora principal (sistema de secreción de Tipo VI putativo)	Ex/C	D	D	D	D	0,43↓
	AOA0D0J4Q3	Proteína fosforilasa LuxU	C	D	D	D	D	0,39↓
	AOA0D0HLR5	PhaC PHA sintetasa	C	D	D	D	D	0,20↓
Funciones diversas	AOA0D0J9Z0	Quitinasa	E	D	D	N	N	N

* En el número de acceso a UniProt se ha omitido la finalización “_VIBHB”. Localización subcelular: C, citoplasma; MC, membrana citoplasmática; ME, membrana externa; P, periplasma; EX, extracelular; IN, indeterminada.

DISCUSIÓN



1. Distribución y dinámica espacio-temporal de *Vibrio* spp. en aguas costeras del golfo de Vizcaya

En los últimos años se ha establecido una relación directa entre el calentamiento global y el incremento de la detección de especies bacterianas patógenas, como las pertenecientes al género *Vibrio* (Escobar *et al.*, 2015; Izumiya *et al.*, 2017; Thompson *et al.*, 2004a, b), y el aumento a nivel mundial de la incidencia de enfermedades relacionadas con los usos del agua (Paz *et al.*, 2007, Vezzulli *et al.*, 2013). En este contexto, destaca la escasez de estudios que determinen la incidencia de *Vibrio* spp. en el litoral vasco (Martínez-Rienda *et al.*, 2007), a pesar de que Goikoetxea *et al.* (2009) han constatado una tendencia al incremento de la temperatura en las aguas del sudeste de la Bahía de Vizcaya durante el periodo 1997-2007. Esta situación dificulta realizar comparativas o extrapolar los efectos del cambio climático en nuestra área geográfica.

Como paso previo a la determinación de la variación espacio-temporal de *Vibrio* spp. en esta área, se ha puesto a punto un método de enumeración de *Vibrio* spp. en muestras de agua de mar utilizando la técnica CARD-FISH. La utilidad de esta técnica ha sido demostrada en numerosos trabajos de ecología microbiana (Atlas y Bartha, 1998; DeLong *et al.*, 1999; Hoshino *et al.*, 2008). La técnica CARD-FISH corrige la problemática atribuida a la técnica FISH (Amann *et al.*, 1990; DeLong *et al.*, 1989) de bajas estimas en muestras naturales. Esta baja estimación se atribuye a la escasez de ribosomas, puntos de hibridación con la sonda, en poblaciones de sistemas naturales caracterizados por la falta o escasez de nutrientes (Cabral, 2010; DeLong *et al.*, 1999). En este trabajo se modificó el protocolo descrito por Pernthaler *et al.* (2004) aumentando (hasta el doble) la cantidad de lisozima empleada para la permeabilización celular, dado que se obtienen mejores resultados al incrementar la permeabilidad de la pared celular (Kubota, 2013). Esta nueva condición facilitó la accesibilidad del fluorocromo, obteniéndose una mayor fluorescencia y logrando, consecuentemente, una mejor visualización al microscopio, lo que podría contribuir a la mejor detección de *Vibrio* spp. Así, en este trabajo, no se observaron diferencias en la intensidad de la fluorescencia emitida entre los vibrios procedentes de muestras de ambientes oligotrofos y los cultivados en el laboratorio.

Con independencia de las variaciones que se puedan introducir, la idoneidad de esta técnica reside en la especificidad de la sonda respecto a las células diana. En este estudio, se preseleccionaron tres sondas, GV841 (Giuliano *et al.*, 1999), Vib-16S-1 (Zhang *et al.*, 2015a) y VIB572a (Hugget *et al.*, 2008); cuya idoneidad se evaluó primeramente mediante técnicas *in silico* (bases de datos SILVA y BLAST), descartándose la sonda Vib-16S-1 (Zhang *et al.*, 2015a). Esta sonda, Vib-16S-1, además de mostrar una especificidad menor que las sondas GV841 y VIB572a para el género *Vibrio*, presentaba índices de cobertura e identidad muy elevados para varios géneros no *Vibrio* (bases de datos SILVA y BLAST, Tablas 2 y 3). Además, la sonda Vib-16S-1 mostraba complementariedad con regiones de genomas foráneos al ARNr 16S del género *Vibrio* (Tabla 3).

Los resultados obtenidos *in silico* para la sonda GV841 (Giuliano *et al.*, 1999) indicaron que es capaz de complementarse con otros géneros pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* (*Candidatus Photodesmus*, *Aliivibrio* y *Catenococcus*). *Candidatus Photodesmus* comprende las especies de bacterias simbióticas de *Anomalops katoptron* (Hendry y Dunlap, 2011) y, del género *Catenococcus* se ha descrito una única especie, *C. thiocyclus*, aislada de un ambiente marino sulfúrico hidrotermal de Nueva Guinea (Sorokin, 1992). Teniendo en cuenta el hábitat de estos microorganismos, no parecía haber inconvenientes para su utilización en este estudio. No obstante, el género *Aliivibrio* que comparte hábitat con las bacterias del género *Vibrio*, posee una identidad de secuencia del ARNr 16S del 95,5% respecto al género *Vibrio*, lo que dificulta su distinción (Urbanczyk *et al.*, 2007). Además, estudios realizados con la sonda

GV841 indican que no es capaz de hibridar con todas las especies del género *Vibrio*. Aparentemente, la cobertura de la sonda podría estar incompleta (Huggett *et al.*, 2008) y no ser lo suficientemente específica para detectar las diferentes poblaciones de *Vibrio* que pueden aparecer en diferentes etapas del ciclo anual (Thompson *et al.*, 2005). Así, Oberbeckmann *et al.* (2012) señalan que la sonda no hibrida con *V. cholerae* y *V. mimicus*. Farmer y Hickman-Brenner (2006) han demostrado (mediante hibridación ADN-ADN) la estrecha relación existente entre estas dos especies, cuya secuencia ARNr 16S difiere únicamente en 6 de los 1456 nucleótidos que la componen (Schauer *et al.* (2012). Thompson *et al.* (2004a) han propuesto, por ello, clasificar a *V. cholerae* y *V. mimicus* en un taxón diferente al género *Vibrio*.

Por último, los resultados obtenidos *in silico* para la sonda VIB572a (Huggett *et al.*, 2008), además de presentar una cobertura y especificidad adecuadas *in silico*, sugerían capacidad de hibridación *in situ* con las especies de *Vibrio* utilizadas en este estudio. Huggett *et al.* (2008) señalan en su estudio que la sonda es capaz de hibridar con diferentes cepas de *Vibrio*, entre las que se encuentran *V. cholerae* y *V. mimicus*. Si bien, también señalan su capacidad para hibridar con alguna cepa de *Photobacterium* y *Listonella*, debido a su proximidad evolutiva; sin embargo, el análisis *in silico* realizado en este estudio descartó dicha problemática. El análisis *in silico* si ha mostrado la capacidad de hibridación con otros géneros como *Photodesmus*, *Aliivibrio* o *Catenococcus* (al igual que la sonda GV841).

Así, si bien en el análisis *in silico* tanto GV841 como VIB572a mostraron su validez teórica, los resultados obtenidos con diferentes suspensiones bacterianas mostraron que la sonda GV841 no era capaz de hibridar con todas las especies del género *Vibrio* testadas en este estudio. La diferente capacidad de hibridación se atribuye a una incorrecta unión de la sonda GV841 a la diana. Una posible razón de que la hibridación no se produzca es el hecho de que el ARNr 16S presenta algunas zonas más inaccesibles que otras, llegando incluso a impedir la hibridación (Cañigral, 2011; Kumar *et al.*, 2005). Así, Cañigral (2011) indica que las zonas de clase I son las más accesibles, entre un 81 y 100%, y las zonas de clase VI las menos accesibles, entre un 0 y 5% (Figura 41). La sonda GV841 hibrida en zonas de clase IV y V, con una accesibilidad de entre el 6 y el 40%; por tanto, no sería adecuada para la detección de *Vibrio* spp. En cambio, para la sonda VIB572a, la unión se realiza en zonas clase III, con una accesibilidad de entre 41 hasta 60%, lo que la señala como más adecuada para la metodología llevada a cabo en este trabajo.

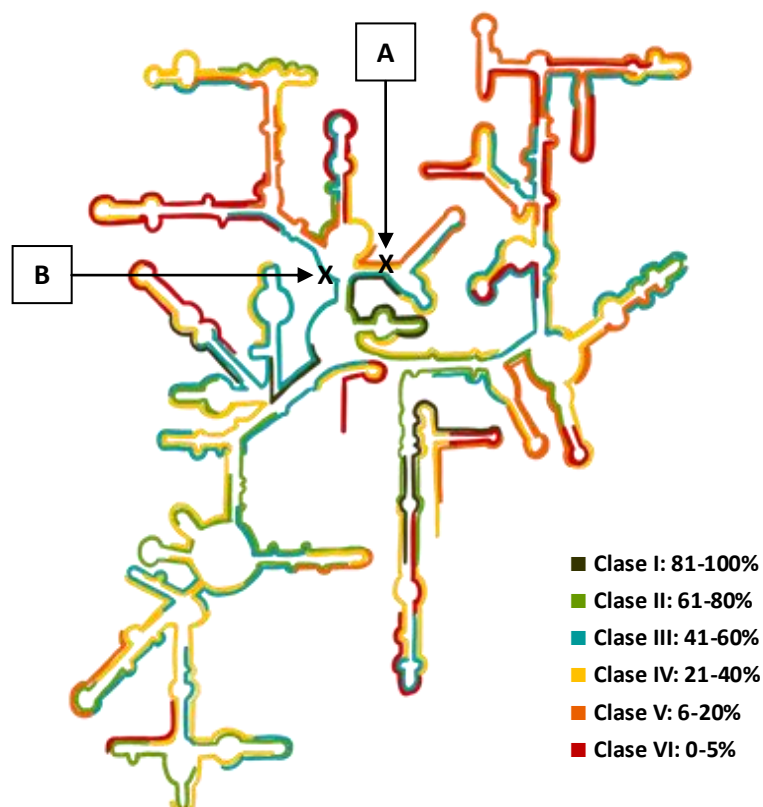


Figura 41. Acceso a las estructuras secundarias del ARNr 16S. Se muestra la clasificación de las zonas del ARNr en función de la accesibilidad de las sondas. Los diferentes colores indican el rango de accesibilidad de las diferentes clases (clases I a VI). Sonda GV841 (A) y sonda VIB572a (B). (Adaptado de Kumar *et al.*, *BMC Bioinformatics* 2005, doi: 10.1186/1471-2105-6-61).

Además, en muestras de agua de mar, caracterizadas por las bajas densidades de *Vibrio* spp. (Thompson y Polz, 2006), la técnica CARD-FISH empleando VIB572a puesta a punto en este trabajo permitió la detección de vibrios totales. En este trabajo, la técnica CAR-FISH ofreció buenos resultados en la detección de *Vibrio* permitiendo la enumeración de densidades inferiores a 10 cel/mL. Así, la técnica CARD-FISH, puesta a punto en este trabajo, resultó adecuada para la determinación de la presencia del género *Vibrio* en las aguas de transición, costeras y de mar abierto de la Comunidad Autónoma del País Vasco (campaña 2018-2019).

En referencia a la determinación de la presencia del género *Vibrio* en las costas vizcaínas realizado en la campaña realizada en 2014-2015, la similitud de resultados obtenidos en los tres puntos de muestreo para los parámetros analizados (densidad de bacterias totales, bacterias quimioorganotrofas cultivables y *Vibrio* spp. presuntivos; así como la variación de la temperatura del agua de mar a lo largo del periodo de estudio) sugiere que no existen grandes diferencias entre las zonas estudiadas. La similitud entre dichos resultados podría atribuirse a la proximidad de los puntos de muestreo, de manera que estarían expuestos a las mismas condiciones ambientales. Además, en todas las muestras estudiadas y coincidiendo con otros autores (Hobbie *et al.*, 1977; Thompson y Polz, 2006; Zweifel y Hagstrom, 1995), la densidad de bacterias totales fue significativamente más elevada que la de bacterias quimioorganotrofas cultivables. Si bien se ha indicado que la temperatura incide en la diferencia estacional existente en la densidad bacteriana entre la época cálida y la época fría (Gilbert *et al.*, 2009; Jannasch y Jones, 1959; Oberbeckmann *et al.*, 2011), otros factores ambientales como salinidad, la concentración e nutrientes, etc. (Sun *et al.*, 2015a; Takemura *et al.*, 2014) o la interacción entre microorganismos podrían afectar a dicha distribución (Orruño *et al.*, 2019). En nuestro caso, durante la campaña 2014-2015 los resultados muestran una

mayor presencia de bacterias del género *Vibrio* (tanto *Vibrio* spp. presuntivos como *Vibrio* spp. identificado) en la época cálida respecto a la fría independiente al número de bacterias quimioorganotrofas cultivables. Estos resultados, que confirman la existencia de una distribución estacional, coinciden con los obtenidos en otros estudios. Kaspar y Tamplin (1993) obtuvieron mayores detecciones de *V. vulnificus* a temperaturas de un rango de 13-22°C, mientras por debajo de este rango de temperatura, su detección decrecía un 90%. Huq *et al.* (1984) llegaron a la conclusión de que para la especie *V. cholerae*, temperaturas superiores a 30°C promovían el crecimiento. Del mismo modo, Kaneko y Colwell (1973) demostraron que a temperaturas superiores a 14°C ocurría un aumento de las poblaciones de *V. parahaemolyticus*.

Los resultados obtenidos durante la campaña 2018-2019 en un área de muestreo amplio fueron bastante variables; si bien, se mantuvieron los patrones observados en la campaña 2014-2015 para un área de muestreo muy restringida. Nuevamente la densidad de bacterias totales fue significativamente mayor que la de bacterias quimioorganotrofas cultivables. Los recuentos de bacterias totales obtuvieron valores más elevados durante el verano en la mayoría de los casos. Por el contrario, el porcentaje de bacterias cultivables quimioorganotrofas fue más bajo durante el muestreo de verano. Los valores de *Vibrio* spp. obtenidos mediante CARD-FISH, rara vez excedieron el 1% del total de bacterias y sus recuentos más altos (ocasionalmente superiores a 10⁴ células/mL) se obtuvieron en muestras provenientes de la única estación de aguas de transición. Este hecho concuerda con estudios anteriores que señalan que las zonas de aguas estuarinas tienden a tener una mayor proporción de *Vibrio* spp. (Neogi *et al.*, 2018; Onarinde y Dixon, 2018). No obstante, al tratarse de un único punto de muestreo, resulta precipitado extrapolar los resultados obtenidos. Por otro lado, el número de vibrios totales aumentó notablemente durante el verano en las estaciones de muestreo ubicadas en los puntos más orientales de la costa. Por el contrario, en zonas de mar abierto (L-RF10, L-RF20 y L-RF30) se detectó una menor proporción de *Vibrio* spp. Estas zonas están más alejadas de los posibles vertidos que se generan desde zonas urbanas que podrían suponer un aporte de nutrientes en las zonas costeras, pero no afectarían a las zonas de mar abierto (Brehm *et al.*, 2020; Grimes *et al.*, 2009).

La población de vibrios presuntivos, que no superó el 0,01% de la población bacteriana total, mostró una cultivabilidad similar a la de las bacterias quimioorganotrofas. Resultados similares han sido indicados por Thompson y Polz (2006).

Varios autores han cuestionado la validez del uso del Agar TCBS para el aislamiento de especies del género *Vibrio* en muestras ambientales (Lotz *et al.*, 1983; West *et al.*, 1982). Por un lado, el Agar TCBS parece ser un medio inhibitorio para muchas de las especies del género *Vibrio* que son halladas con frecuencia en los entornos marinos (Simidu *et al.*, 1980). Por otro lado, la utilización del medio TCBS, si bien resulta adecuada para cepas de tipo clínico, ha sido cuestionada para la identificación de la mayoría de cepas ambientales debido a la diversidad fenotípica de estas bacterias (Tall *et al.*, 2013). Por ello, en este trabajo se asume que en los aislamientos realizados en Agar TCBS, el crecimiento de diversas bacterias pertenecientes al género *Vibrio* podría resultar inhibido. Además, en este trabajo, la identificación mediante el sistema API 20E de los aislados de *Vibrio* spp. presuntivo obtenidos en Agar TCBS mostró que este medio permite el crecimiento de bacterias no pertenecientes a dicho género.

La familia *Vibrionaceae* está formada por más de 140 especies (Sawabe *et al.*, 2013) divididas en varios géneros que muestran metabolismos y comportamientos muy versátiles (WoRMS, <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=393079>); y el género *Vibrio* consta de más de 120 especies (Li *et al.*, 2020) conformadas, a su vez, por una gran diversidad de cepas, biotipos, etc. (Taxonomy Browser, 2020), lo que dificulta la identificación mediante

metodologías bioquímicas. Los resultados obtenidos en este trabajo mediante el uso de metodologías bioquímicas indican una mayor incidencia de *V. vulnificus* respecto a las demás especies del género *Vibrio*. No obstante, estos resultados podrían no ser fiables, dadas las limitaciones, ya comentadas, de las técnicas utilizadas en este estudio (selección y enumeración en medio TCBS e identificación bioquímica mediante galerías API 20E). Además, el sistema API 20E indicaba la adscripción a más de una especie. Diversos autores (Austin *et al.*, 1997; Shikongo-Nambabi *et al.*, 2012) han resaltado las limitaciones del sistema API 20E, originalmente diseñado para la identificación de bacterias entéricas Gram negativas y con una aplicación clínica pudiendo no ser apropiado para identificar bacterias aisladas del entorno (MacDonell *et al.*, 1982).

En este trabajo, cuando aislados identificados como *Vibrio* spp., mediante API 20E, se sometieron a análisis molecular basado en ARNr 16S y a MLSA, los resultados en cuanto a especie difirieron (Tabla 11). Thompson *et al.* (2004a) tras comparar los resultados obtenidos mediante el empleo de un compendio de identificaciones moleculares y la identificación fenotípica recomiendan el uso de la identificación basada en métodos moleculares. No obstante, la identificación mediante sistema API 20E resulta un primer paso idóneo para realizar un cribado de colonias *Vibrio* spp. presuntivas, ya que en los resultados obtenidos en este estudio por la galería API 20E, coincidieron a nivel de género (*Vibrio*) en la mayoría de los casos con la identificación resultante de la metodología molecular (ARNr 16S y MLSA).

Dentro de la familia *Vibrionaceae*, el género *Vibrio*, en particular, presenta una elevada similitud entre genomas que Thompson *et al.* (2005) justifican por la adaptación al nicho. Es por ello que se trata de un género dentro del cual es difícil identificar con seguridad las distintas especies que lo conforman. De hecho, la taxonomía de este género evoluciona constantemente (Alsina y Blanch, 1994; Thompson *et al.*, 2004b; Vandenberghe *et al.*, 2003) y periódicamente se identifican nuevas especies como *V. albus* (Li *et al.*, 2019), *Vibrio coralliirubri* (Poli *et al.*, 2018), *V. galathea* (Giubergia *et al.*, 2016), *V. gangliei* (Meng *et al.*, 2018), *V. japonicus* (Doi *et al.*, 2017), *V. ouci* (Li *et al.*, 2020), *V. profundus* (Zhang *et al.*, 2019) o *V. zhugei* (Guo *et al.*, 2019)

Tall *et al.* (2013) indicaron que la secuenciación del ARNr 16S resulta una herramienta insuficiente a la hora de la identificación a nivel de especie dentro del género *Vibrio*, hecho que Thompson *et al.* (2004a) justificaron en base a que muchas especies de la familia *Vibrionaceae* poseen secuencias del gen ARNr 16S prácticamente idénticas. Los resultados obtenidos en este trabajo ofrecen resultados similares, buena identificación a nivel de género e imposibilidad de establecer la especie debido a incongruencias en las genealogías en determinados clados (Cano-Gomez *et al.*, 2011; Janda y Abbott, 2007; Thompson *et al.*, 2005). Estas incongruencias pueden ser resueltas por el MLSA. Este método, MLSA, emplea los análisis de una secuencia concatenada de varios genes *housekeeping*, con el fin de conseguir identificar géneros e incluso especies. Sawabe *et al.* (2007) desarrollaron un esquema MLSA para la familia *Vibrionaceae* utilizando secuencias de genes *housekeeping* (*ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *recA*, *topA*), siendo los genes seleccionados buenos predictores del genoma completo de *Vibrio* y permitiendo discriminar adecuadamente entre especies. Stackebrandt *et al.* (2002) recomiendan el uso de al menos 5 genes *housekeeping* para evitar problemas topológicos con el MLSA.

Sin embargo, esta metodología tampoco está exenta de problemas. Cada uno de los genes propuestos resulta más o menos discriminatorio dependiendo de la especie de *Vibrio* y no se ha descrito un gen que permita una buena diferenciación de todas las especies de vibriones. Thompson *et al.* (2005) recomiendan la combinación de varios genes para lograr una identificación lo más robusta posible ya que genes diferentes muestran diferentes grados de

discriminación en función del clado o grupo. Además, las distintas secuencias amplificadas pertenecientes a una misma cepa pueden variar en cuanto a su identificación en la herramienta informática BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Así el gen *rpoA* resulta poco discriminatorio para las cepas de *V. tubiashii* y *V. splendidus* (Thompson *et al.*, 2005) y en el caso de el gen *pyrH* surgen problemas a la hora de discernir entre las especies del clado *Splendidus* o entre ciertas especies del clado *Harveyi* (Tall *et al.*, 2013).

Aunque el método presente limitaciones evidentes para la identificación de especies, sí que es posible distinguir entre los distintos grupos de *Vibrio*. Así, en este trabajo, los aislados fueron identificados como *Vibrio* spp., pertenecientes a diferentes clados y aunque la identificación mediante MLSA en la mayoría de las cepas no fue capaz de ofrecer un resultado único a nivel de especie, sí que fue posible la identificación fiable de 5 de las 12 especies analizadas.

2. Efecto de los factores ambientales en la supervivencia de *Vibrio* spp.

La familia *Vibrionaceae* prevalece en una multitud de hábitats caracterizados por factores bióticos y abióticos fluctuantes y, en consecuencia, ha evolucionado adoptando estrategias que aseguren su permanencia (Li *et al.*, 2014; Oliver, 2010; Roszak y Colwell, 1987; Vattakaven *et al.*, 2006). El género *Vibrio* es autóctono de aguas marinas y costeras (Thompson *et al.*, 2004a) y es capaz de sobrevivir en ambientes estuarinos y aguas continentales (Kokashvili *et al.*, 2015; O'Brien y Sizemore, 1979) en condiciones cambiantes de temperatura, radiación luminosa y salinidad, siendo la inducción del estado VNC una de las respuestas al estrés ambiental más ampliamente estudiada (Abedi-Moghaddam *et al.*, 2004; Arana *et al.*, 2010; Barcina *et al.*, 1997; Coutard *et al.*, 2007; Gauthier, 2000; Gong *et al.*, 2002; Oliver, 2005; Sun *et al.*, 2008). En este estudio se ha podido comprobar dicha capacidad de supervivencia de bacterias del género *Vibrio* ante distintas condiciones, así como la diversidad en la respuesta adaptativa de cada una de las cepas.

La temperatura está considerada como un factor crítico para la supervivencia de las bacterias en general, y del género *Vibrio* en particular (Jiang y Chai, 1996; Johnson, 2015; Oliver, 2010; Vattakaven *et al.*, 2006). Aunque los resultados obtenidos en este trabajo respaldan esta idea, también evidencian que distintas especies del género, incluso cepas de la misma especie, no comparten una respuesta común. Por ejemplo, se ha reportado que en general, especies del género *Vibrio* disminuyen su capacidad de supervivencia a bajas temperaturas (Coutard *et al.*, 2007; Duncan *et al.*, 1993; Jia *et al.*, 2013; Oliver y Bockian, 1995), pero en algunos casos como *V. tasmaniensis*, adaptado a aguas más frías, dicha capacidad de supervivencia no se ve comprometida a bajas temperaturas (Vattakaven *et al.*, 2006).

En el caso de la cepa de colección, *V. harveyi* CECT 525, las condiciones de estrés indujeron la aparición de una subpoblación VNC dentro del rango de temperatura estudiado (4-30°C). La temperatura determinó la rapidez e intensidad de este proceso, siendo la temperatura más baja (4°C) la que tuvo un efecto más acusado. Esta respuesta se ha observado previamente en las cepas de colección *V. harveyi* 1280 (Duncan *et al.*, 1994) y CECT 525 (Parada *et al.*, 2016), que adoptan el estado VNC durante la primera semana de incubación a 4°C. Al aumentar la temperatura, la pérdida de cultivabilidad fue más moderada y retardada en el tiempo; de hecho, a 20°C la mayoría de células preservaron la cultivabilidad al menos durante 14 días. Resultados similares se han descrito para cepas de *V. cholerae* ATCC 14035 (Pruzzo *et al.*, 2003), *V. shiloi* LMG 19703 y *V. tasmaniensis* CC056 (Vattakaven *et al.*, 2006), mantenidas en agua de mar artificial a 20°C en los que se necesitaban más de 40 días la formación de una población de células en estado VNC.

Las poblaciones de *V. harveyi* ambiental, por el contrario, conservaron la cultivabilidad cuando se expusieron a temperaturas inferiores a 30°C, no adoptando el VNC durante los 21 días de incubación. Resultados similares se obtuvieron por Sun *et al.* (2008), que no detectaron la entrada en el estado VNC en cepas de *V. harveyi* aisladas de peces para periodos de exposición inferiores a 65 días a 4°C. A 30°C, la cepa ambiental mantuvo la cultivabilidad durante los primeros días de incubación y, posteriormente, se detectó una fracción de células VNC, mayoritaria al finalizar las experiencias. Estos resultados coinciden con los reportados por Duncan *et al.* (1994), que constataron un descenso progresivo del número de células cultivables con el incremento de las temperaturas más altas de *V. harveyi* 1280.

En el presente estudio se evidencian las diferentes respuestas a la temperatura de las cepas de colección y ambiental de *V. harveyi*. Las diferencias en el modo de afrontar el estrés entre cepas ambientales y de colección han sido descritas para distintas especies, como *E. coli* (Barcina *et al.*, 1992; Topp *et al.*, 2003), *Campylobacter jejuni* (Cools *et al.*, 2003) o *Acinetobacter baumannii* (Bravo *et al.*, 2019); y también en el caso de *Vibrio* spp. (Duncan *et al.*, 1994; Oliver y Bockian, 1995; Wong *et al.*, 2004). Estas diferencias son extensibles a otros procesos como la resistencia a antibióticos o la capacidad toxigénica de *Vibrio harveyi* (Nakayama *et al.*, 2006). Del mismo modo, se han constatado comportamientos dispares entre cepas clínicas y ambientales, como es el caso de *V. parahaemolyticus* expuesto a distintas temperaturas (Mahoney *et al.*, 2010), o entre las cepas procedentes de distintos nichos, como las cepas de vida libre y simbióticas de *V. fischeri* cuya eficiencia de colonización varía en función de los factores abióticos (Soto *et al.*, 2009).

El comportamiento diferencial que se pone de manifiesto en este estudio podría atribuirse a la adaptación a las condiciones ambientales imperantes en los sistemas de los que son autóctonas las cepas ambientales. La combinación de condiciones ambientales (como la escasez de nutrientes o la exposición a temperaturas estresantes) puede causar mutaciones adaptativas (Hall, 1988). Así, Santhya *et al.* (2015) describieron complejas variaciones genotípicas en cepas de *Vibrio* procedentes de ambientes acuáticos tropicales debido a variaciones de las condiciones ambientales que resultan en divergencias (y/o convergencias) en su diversidad genética. De hecho, varios autores han indicado que cepas patógenas *V. cholerae* pueden surgir a partir de cepas no toxigénicas en el medio ambiente acuático (Chakraborty *et al.*, 2000; Brazil *et al.*, 2002) a través de múltiples transferencias horizontales de genes (Heidelberg *et al.*, 2000).

En el caso de la cepa *V. cyclitrophicus* de origen ambiental, el proceso de inducción del fenotipo VNC fue similar en las 4 temperaturas estudiadas, con un descenso de la cultivabilidad en los primeros días de experimentación. Estudios realizados con cepas pertenecientes al mismo *cluster* que *V. cyclitrophicus* (Splendidus) mostraron similitudes con el modelo de supervivencia obtenido en este ensayo. Vattakaven *et al.* (2006) comprobaron que la cepa *V. tasmaniensis* CC056 adoptaba el fenotipo VNC a temperaturas iguales o superiores a 20°C y Vezzulli *et al.* (2015) observaron el desarrollo de una subpoblación VNC en poblaciones de *V. splendidus* LGP32 tras 5 días de incubación a 5°C y 25°C. Estos resultados resaltan nuevamente las diferentes respuestas al estrés que desarrollan estas especies bacterianas ambientales.

Se ha demostrado que la radiación solar (y su componente visible) tiene un efecto negativo sobre la supervivencia bacteriana (Muela *et al.*, 2000, 2002; Pommepuy *et al.*, 1996) que se manifiesta por la pérdida tanto de cultivabilidad como de viabilidad celular (Abboudi *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2011; Arana *et al.*, 2007; Coohill y Sagripanti, 2009; Hernroth *et al.*, 2009; Pommepuy *et al.*, 1996). Estos efectos negativos han sido demostrado en varias especies como *E. coli* (Arana *et al.*, 2007; Muela *et al.*, 2000, 2002) y *Vibrio* spp. (Malara *et al.*, 2017;

Nakahashi *et al.*, 2014). En este estudio, la exposición continuada de poblaciones de *Vibrio* spp. a radiación visible no afectó a la integridad ni a la viabilidad bacteriana; pero, tras un periodo inicial caracterizado por el mantenimiento de la cultivabilidad, indujo la entrada en el estado VNC de todas las cepas estudiadas, con independencia de la temperatura. Los efectos negativos de la radiación solar se atribuyen a la generación de especies reactivas de oxígeno o ROS (peróxidos, superóxidos, radicales hidroxilo y oxígeno singlete) creadas como consecuencias de las reacciones de fotooxidación. Así, la presencia de oxígeno podría incrementar la fotoinactivación bacteriana, afectando tanto la capacidad de crecimiento como a las cadenas de transporte de electrones (Lipovsky *et al.*, 2008; Lubart *et al.*, 2011; Muela *et al.*, 2002).

Lesser (2006) indicó que la producción de ROS es frecuente en todos los océanos, debido a la absorción de la radiación solar por las aguas ricas en materia orgánica disuelta que conduce a la producción fotoquímica de ROS. Los resultados presentados en este trabajo mostraron que las cepas de *Vibrio* estudiadas son más resistentes al efecto negativo de la luz visible que *E. coli* (Arana *et al.*, 1992, 2007; Muela *et al.*, 2000). Resultados similares han sido descritos por Kehoe *et al.* (2004) quienes indican la mayor resistencia de *V. cholerae* a la luz visible respecto a *Shigella flexneri*, *Sh. dysenteriae* y *Salmonella typhimurium*. Estos resultados sugieren la presencia de mecanismos de protección frente a los efectos deletéreos de la radiación visible en bacterias del género *Vibrio*, probablemente habituadas al estrés oxidativo en su entorno natural.

En este estudio *Vibrio* experimentó una pérdida de cultivabilidad mayor tras exposición a radiación visible que en condiciones de oscuridad. Nuevamente se encontraron diferencias entre los distintos patrones de supervivencia desarrollados por las distintas cepas analizadas. Así, en este trabajo, *V. cyclitrophicus*, especie no luminiscente según Farmer *et al.* (2015), resultó más afectada por la radiación lumínica, sobre todo a temperaturas más elevadas, que *V. harveyi*, especie luminiscente (Baumann *et al.*, 1980; Farmer *et al.*, 2015). Wang *et al.* (2013) demostraron que la piomelanina producida por *V. campbellii*, en presencia de peróxido de hidrógeno, confiere a esta bacteria resistencia al estrés oxidativo. Dada la estrecha relación entre *V. campbellii* y *V. harveyi*, no se puede descartar la posibilidad de que éste sea un mecanismo de protección frente a las reacciones de fotooxidación provocadas por la luz visible. Por otra parte, Rees *et al.* (1988) especularon con el papel protector de la luminiscencia bacteriana frente al estrés oxidativo. Otros autores han indicado que la bioluminiscencia bacteriana, caso de *V. harveyi*, puede desempeñar un papel importante en procesos de detoxificación de especies reactivas del oxígeno (Kozakiewicz *et al.*, 2005; Łyzen y Wegrzyn, 2005; Szpilewska *et al.*, 2003) y en la estimulación de la reparación del ADN (Alifano *et al.*, 2011; Czyz *et al.*, 2000). Finalmente, la sobreproducción de catalasa ha sido descrita para diferentes especies de *Vibrio* sometidas a estrés (Lin *et al.*, 2015; Yumoto *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2012); así como la sobreexpresión de enzimas como alquilperoxidasa reductasa, glutarredoxina y catalasa, relacionadas con la protección frente a los efectos tóxicos del H₂O₂ y otras ROS, durante la permanencia en agua de mar a diferentes temperaturas de *V. harveyi* CECT 525 (Kaberdin *et al.*, 2015; Montánchez *et al.*, 2014, 2019) y que podrían promover mayor resistencia a la luz visible de estos microorganismos.

Se han realizado diversos estudios acerca del efecto de la variación de la salinidad en la supervivencia de distintas especies del género *Vibrio*. Ramaiah *et al.* (2002) describieron que la cultivabilidad fue menor en condiciones estuarinas que en condiciones marinas para dos especies de *Vibrio* bioluminiscentes; *V. harveyi* ATCC 14216 (CECT 525) y *V. fischeri* UM7977. Sin embargo, en este estudio se han encontrado variaciones en los patrones de supervivencia dependiendo de la salinidad y del tipo de agua de mar utilizado en los experimentos (natural o artificial). Las salinidades similares a las de las aguas marinas (30-35‰) o estuarinas (15‰) no

parecieron desempeñar un papel crítico en el control de la supervivencia de las cepas patrón y ambiental de *V. harveyi*.

V. cyclitrophicus, en cambio, experimentó mayores modificaciones en su patrón de supervivencia dependiendo de la salinidad y tipo de agua de mar (natural o artificial). Así, en agua de mar artificial con salinidades de 30‰ o 35,5‰ (ausencia de nutrientes) a temperaturas de 12°C y 20°C la pérdida de la cultivabilidad fue menor en comparación con el agua de mar natural (escasez de nutrientes). Singleton *et al.* (1982), analizando el impacto de diferentes salinidades sobre la supervivencia de *V. cholerae*, comprobaron que la cultivabilidad era mayor a salinidades en el rango de 25‰-35‰ (similares a las marinas). Sin embargo, la adición de nutrientes a sistemas con salinidades comprendidas en el rango 15‰-45‰ desencadenaba un aumento de la cultivabilidad similar a las poblaciones mantenidas en agua de mar natural.

La mayoría de las células mantenidas en agua de mar artificial para todas las salinidades estudiadas en este estudio fluorescían en rojo tras la tinción con LIVE/DEAD® BacLight™ (Life technologies). Este hecho podría ser indicativo de daño en las membranas citoplasmáticas, sin embargo, para poblaciones sometidas a salinidades de 15‰-35‰, la cultivabilidad de las células no se vio comprometida durante periodos prolongados de tiempo. Es probable un proceso de adaptación en el que la permeabilidad de la membrana incrementa sin efecto significativo sobre la viabilidad celular. Estas modificaciones se han descrito en otras bacterias Gram negativas y Gram positivas (Kirchhoff y Cypionka 2017; Yang *et al.*, 2015). El aumento de la permeabilidad inducido por el estrés de la membrana celular parece ser una estrategia de supervivencia de las células expuestas a ambientes hostiles, ya que las membranas parcialmente permeables pueden facilitar la comunicación entre las células y el ambiente (Yang *et al.*, 2015). Por lo tanto, y coincidiendo con Orruño *et al.* (2019), aunque el uso del LIVE/DEAD® BacLight™ (Life technologies) puede revelar cambios en la permeabilidad de la membrana, puede no ser apropiado para evaluar la viabilidad de las células en agua de mar artificial.

Por último, aunque las cepas utilizadas pueden preservar la viabilidad celular a salinidades moderadas y altas, las células parecen sufrir daños irreversibles en condiciones oligohalinas (0,5‰), a pesar de que sus membranas citoplasmáticas aparentemente permanecieran intactas y las células conservaran su turgencia. Diversos autores obtuvieron resultados similares estudiando *V. vulnificus* (Kaspar y Tamplin, 1993) o *V. anguillarum* serotipo J-O-1 (Eguchi *et al.*, 2000) en condiciones oligohalinas, y Gómez-Gil *et al.* (2014) indicaron que el ión sodio influye de manera determinante en la supervivencia de las especies del género *Vibrio*. Además, el efecto negativo de la baja salinidad es diferente del efecto de las bajas temperaturas sobre poblaciones mantenidas en agua de mar natural estéril, ya que estas últimas poblaciones son capaces de resucitar, de revertir su estado VNC a cultivable (Parada *et al.*, 2016). La reversión del estado VNC a cultivable ha sido ampliamente discutido por diversos autores. Parada (2016) observó que para *V. harveyi* CECT 525, tras la adopción del estado VNC por efecto de la exposición a bajas temperaturas (4°C), la reversión de las condiciones adversas (incubación a 26°C) provoca un incremento en la población cultivable que también se ha detectado en otras especies del género *Vibrio* (Coutard *et al.*, 2007; Nilsson *et al.*, 1991; Ramaiah *et al.*, 2002; Weichart *et al.*, 1992; Whitesides y Oliver, 1997; Zhong *et al.*, 2009). La reversión del estado VNC o resucitación no ocurrió en el presente estudio para *V. harveyi* CECT 525 expuestas a salinidades de 0,5‰. Es probable que el desequilibrio osmótico provocado por la baja salinidad tenga un efecto perjudicial e irreversible en las poblaciones del género *Vibrio* (Orruño *et al.*, 2019). Por tanto, la resucitación del género *Vibrio* no es un proceso generalizado, siendo dependiente de los condicionantes ambientales y del daño celular provocado por los mismos.

Por otra parte, la permanencia de las poblaciones bajo las diferentes condiciones estudiadas provocó, en todos los casos, una disminución del tamaño celular (Figuras 22 a 24) que ha sido propuesta como una estrategia de supervivencia que permite a la célula minimizar su gasto energético (Kaberdin *et al.*, 2015) y sus requerimientos para el mantenimiento (Chen *et al.*, 2009; Jiang y Chai, 1996; Vattakaven *et al.*, 2006) y mejora la eficacia en la toma de sustratos al elevarse el ratio superficie-volumen (Jiang y Chai, 1996). Esta estrategia, disminución del tamaño celular, ha sido descrita en diferentes especies de *Vibrio* por numerosos autores (Carrol *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2009; Johnston y Brown, 2002; Oliver, 2010; entre otros) y se ha relacionado con la entrada en el estado VNC (Oliver, 2010; Wong y Wang, 2004). Algunos autores (Kjelleberg *et al.*, 1982; Morita, 1990; Nyström *et al.*, 1990) indicaron que esta reducción del tamaño celular se debe al proceso de división reductiva y lo relacionaron con un incremento en las células totales observado para algunas especies de *Vibrio* (Falcioni *et al.*, 2008, Sun *et al.*, 2008). Sin embargo, otros autores han reportado el mantenimiento del número total de células junto a una reducción del tamaño celular a lo largo del proceso de supervivencia bajo condiciones adversas (Amel *et al.*, 2008; Marco-Noales *et al.*, 1999; Wong y Wang, 2004).

Estas consideraciones coinciden con los resultados presentados en este trabajo, ya que no se ha encontrado relación entre la inducción del estado VNC y el proceso de disminución de la longitud celular. Kaberdin *et al.* (2015), tras estudiar el proceso de supervivencia de *V. harveyi* CECT 525 a 20°C obtuvieron resultados similares: no observaron cambios en la viabilidad o la cultivabilidad a lo largo de dos semanas, pero si detectaron una progresiva disminución del tamaño celular, así como cambios en el transcriptoma asociados a procesos de conservación de la energía. Estos resultados serían indicativos de una respuesta temprana específica frente a la escasez de nutrientes en el medio.

El incremento en la longitud celular observado tras la exposición a condiciones hipotónicas (0,5‰) probablemente fue causado por la disminución en la osmolaridad externa que alteró la turgencia celular, provocando absorción de agua (Booth y Blount 2012); es decir, la entrada de agua aparentemente dilató la pared celular y la membrana externa (Rowe *et al.*, 2013), contrarrestando la reducción del tamaño celular observada en las demás condiciones.

Con respecto a la dinámica del proceso de reducción de la longitud celular, ésta fue más pronunciada para las poblaciones mantenidas en ausencia de nutrientes (agua artificial en el rango de 15‰-35,5‰) en comparación con las células incubadas en agua de mar natural a la misma temperatura (20°C). Se han indicado cambios morfológicos similares para cultivos de *V. parahaemolyticus* y *V. angustum* sometidos a condiciones de ausencia de carbono (Chen *et al.*, 2009; Holmquist *et al.*, 1993; Stretton *et al.*, 1997). En los sistemas acuáticos naturales, la concentración de nutrientes varía y, normalmente, tras breves períodos de abundancia se intercalan largos períodos de escasez (Atlas y Bartha, 1998). Por tanto, es bastante común que, en sus hábitats naturales, las bacterias de vida libre presenten un tamaño reducido debido a la escasez de nutrientes (McDougald *et al.*, 2006). Nuestros resultados sugieren que la reducción del tamaño celular de *Vibrio* es un proceso controlado principalmente por la disponibilidad de nutrientes y por la intervención de otros factores abióticos y no estaría necesariamente relacionado con la pérdida de la cultivabilidad y la inducción del estado VNC.

Para el estudio del efecto de los factores bióticos sobre las supervivencia de *V. harveyi*, se empleó la cepa *V. harveyi* CECT 525 modificada que expresa la proteína fluorescente GFP (*V. harveyi gfp*). Esta cepa permite la diferenciación de dicha población diana del resto de las poblaciones bacterianas, no presenta diferencias significativas respecto a la cepa no modificada en cuanto a la duración de la fase lag, la constante específica de velocidad de

crecimiento (μ) o la cosecha máxima y al patrón de supervivencia bajo condiciones de estrés, y la capacidad de emitir fluorescencia no varía a lo largo del periodo de experimentación (Parada, 2016; Orruño *et al.*, 2019).

La supervivencia bacteriana en ambientes acuáticos está influenciada además de por factores abióticos cambiantes, por factores bióticos. Así, la depredación bacteriana por protistas (especialmente nanoflagelados y ciliados) (Sherr y Sherr 2002, Urakawa y Rivera 2006) y la infección por bacteriófagos (Crothers-Stomps *et al.*, 2010; Jacquet *et al.*, 2010) son dos de los factores responsables del control de la abundancia bacteriana, de la composición de las comunidades y del funcionamiento de sistemas bacterianos (Alonso-Sáez *et al.*, 2009; Barcina *et al.*, 1992; Bell *et al.*, 2010; Hahn y Höfle, 2001; Pernthaler, 2005; Saleem *et al.*, 2013; Sherr y Sherr, 2002). Si bien, también se ha descrito que la presencia de protozoos puede incrementar la supervivencia de *Vibrio spp.* (Laskowski-Arce y Orth, 2008) e, incluso, en el caso de *V. cholerae* potenciar su patogenicidad (Espinoza-Vergara *et al.*, 2020; Mitterer *et al.*, 2020).

Los resultados obtenidos en este trabajo cuando se estudió la supervivencia de *V. harveyi* en presencia de las poblaciones microbianas naturales indican que las poblaciones de protistas del agua de mar serían las principales responsables del control de las poblaciones de *Vibrio*. Así, *V. harveyi* fue la presa preferida de las poblaciones de protozoos que incrementaron su población a expensas de la población presa. Jürgens y Matz (2002) indicaron que, en los sistemas naturales, los protozoos mostraban preferencia por bacterias con longitudes superiores a 1 μm respecto a otras de menor tamaño. Al inicio de las experiencias, *V. harveyi* CECT 525 presentaba una longitud media de 1,14 ($\pm 0,25$) μm , lo que podría ser determinante en la elección de la presa por las poblaciones de protozoos en las etapas iniciales de la supervivencia y, la reducción de tamaño que experimenta *Vibrio* en condiciones de escasez de nutrientes podría, a su vez, influir en la disminución de la presión depredadora (Parada, 2016). Además, la depredación ejercida por flagelados pareció ser la responsable de la reducción de la densidad de la población de *V. harveyi* hasta un nivel umbral a partir del cual la densidad de la población presa no es suficiente para soportar el crecimiento de los depredadores y la densidad de los mismos decrece paulatinamente. Resultados similares se han descrito para *E. coli* en presencia de protozoos (Arana *et al.*, 2003). Este comportamiento parece, además, estar condicionado por la temperatura (Delaney, 2003; Ishigaki y Sleigh, 2001). Beveridge *et al.* (2010a, b, c) indicaron que las temperaturas bajas reducen el impacto depredador/consumidor de los protistas sobre las presas al afectar al crecimiento de la población depredadora (y a su metabolismo) y a su velocidad de natación y; por tanto, a su capacidad de captura, al aumentar la viscosidad de los fluidos. Además, aunque la mayoría de las células de *V. harveyi* conservaron la cultivabilidad durante la fase activa de depredación, una subpoblación no cultivable (presumiblemente incluyendo células en estado VNC) emergió al disminuir la presión depredadora. Estos hechos sugieren que la temperatura no afecta únicamente la fisiología del género *Vibrio*, sino que además regula su depredación por la microbiota marina, determinando su tasa de mortalidad en los sistemas acuáticos.

Por tanto, los factores abióticos y bióticos pueden afectar de manera diferenciada a la supervivencia (permanencia) y el estado fisiológico de *V. harveyi* en los sistemas acuáticos. Mientras que la presencia de depredadores (incluidos bacteriófagos) puede prácticamente eliminar de forma irreversible las poblaciones de *V. harveyi*; el efecto de los factores abióticos podría ser reversible y afectar fundamentalmente a la morfología y la fisiología bacteriana.

La formación de biopelículas se ha sugerido como una estrategia de supervivencia alternativa adoptada por vibrios para hacer frente a la depredación y otros factores estresantes al proporcionar protección adecuada en entornos adversos (Sun *et al.*, 2013, 2015). Del mismo modo, *Vibrio spp.* podría aumentar su resistencia al estrés mediante la asociación a superficies

bióticas al establecer relaciones comensales con algunas poblaciones de zooplancton (Colwell y Huq 1994; Pruzzo *et al.*, 2008).

Diversos autores han demostrado que las bacterias del género *Vibrio* tienen capacidad de adherirse (Nakhamchik *et al.*, 2008; Watnick *et al.*, 1999; Yip *et al.*, 2006), incluso a superficies inertes (Karunasagar y Otta, 1996) y se ha indicado que esta capacidad está influenciada por parámetros ambientales como la temperatura, la escasez/ausencia de nutrientes o la salinidad, entre otras. Townsley y Yildiz (2015), en ensayos realizados con la cepa *V. cholerae* O1 El Tor A1552, demostraron que la temperatura afecta a la adherencia. Estos autores encontraron que en poblaciones mantenidas a 15°C, la capacidad y estabilidad de la adhesión era mayor que en poblaciones expuestas a 25°C y 37°C. Belas y Colwell (1982) describieron, para *V. parahaemolyticus*, que la capacidad de adherirse a materiales quitináceos era mayor a 15°C-25°C que a 37°C, siendo nula a 4°C. Resultados similares se obtuvieron en poblaciones de *V. anguillarum* (Bordas *et al.*, 1996) o para bacterias de otros géneros, tanto Gram negativas como Gram positivas: *E. coli*, *Legionella pneumophila* o *St. epidermidis* (Fitzpatrick *et al.*, 2005; Piao *et al.*, 2006; White-Ziegler *et al.*, 2008). Los resultados presentados en este trabajo difieren de los obtenidos por los autores mencionados. Así, las cepas empleadas se clasificaron como no adherentes o ligeramente adherentes y su capacidad de adhesión no varió tras 21 días de exposición a las diversas temperaturas probadas.

Por su parte, Kjelleberg y Hermansson (1984) observaron un incremento de la adhesión, atribuible al efecto de la ausencia de nutrientes, en diversas bacterias de origen ambiental mantenidas a 4°C y Dawson *et al.* (1981) encontraron incrementos en la capacidad de adherirse a superficies en poblaciones de *Vibrio* DW1 expuestas a condiciones de ayuno y disminución de dicha capacidad para poblaciones mantenidas en medios enriquecidos. Nuevamente, en este estudio no se observaron modificaciones en la capacidad de adhesión de las cepas analizadas referentes a la exposición a condiciones de ayuno.

La influencia de la salinidad en la adhesión celular también ha sido estudiada previamente (Laurençin y Germon, 1987). Bordas *et al.* (1996) indicaron que las especies *V. alginolyticus* y *V. anguillarum* aumentaban su capacidad de adherencia conforme se incrementaba la salinidad. No obstante, otros autores obtuvieron resultados diferentes. Así, Belas y Colwell (1982), describieron que la síntesis de flagelos laterales implicados en la adherencia de *V. parahaemolyticus* era máxima a salinidades entre 10‰-20‰ y Amaro *et al.* (1995) describieron, para *V. vulnificus*, que la mayor capacidad de adherencia se producía a salinidades de 15‰. De igual modo al mencionado con anterioridad, en este estudio no se observaron modificaciones en la capacidad de adhesión de las cepas analizadas dependientes a la salinidad.

Estas diferencias de resultados podrían atribuirse a la gran diversidad de especies y cepas dentro del género *Vibrio* (Thompson *et al.*, 2004a, b) que, por tanto, podrían mostrar una gran diversidad de respuestas. Además, no se puede descartar que este género presente una mayor capacidad de adherencia a superficies orgánicas respecto a superficies inorgánicas (Vezzulli *et al.*, 2015). Dicha capacidad de adherirse a superficies orgánicas o formación de biofilms influencia la patogenicidad de los microorganismos (Hamed *et al.*, 2018), siendo la adhesión bacteriana uno de los pasos iniciales en dicha patogénesis (Beachey, 1981). Estudios previos (Castro-Rosas y Escartín, 2002; Hamed *et al.*, 2018; Won y Park, 2008) han demostrado que la adhesión de *V. harveyi* al hospedador es fundamental para la infección. Por otro lado, diversos estudios han demostrado la importancia ecológica de la adherencia, tanto en vibrios simbioses como en patógenos. Además, la adherencia a determinados organismos, como algas, proporciona una gran ventaja nutricional (Myklestad, 2000) a las bacterias adheridas.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el proceso de adhesión a superficies bióticas fue dependiente de la temperatura. Resultados similares sobre la adhesión de *V. harveyi* a la piel de *B. brama* fueron obtenidos por Chen *et al.* (2008) y Laurencin y Germon (1987) quienes establecieron que una mayor temperatura conllevaba una mayor adherencia, así como mayores daños en la piel animal en menor tiempo. Coincidiendo con los mismos, en las experiencias realizadas en este estudio a 12°C, los resultados máximos de cobertura observados fueron inferiores al 5%. En cambio, en las experiencias realizadas a 20°C y 26°C el porcentaje de cobertura fue muy superior ($\geq 60\%$), y los índices de cobertura se mantuvieron a lo largo del tiempo de experimentación (hasta 48 h). La baja cobertura detectada a 12°C podría atribuirse a que las bacterias psicrótrofas sobreviven mejor a temperaturas intermedias entre 15°C -20°C, y su supervivencia podría verse limitada a 12°C (Arana *et al.*, 2010; Baker-Austin *et al.*, 2018, Orruño *et al.*, 2019). Estudios similares realizados con *V. cholerae* O1 en caparazones de cangrejos y camarones obtuvieron resultados similares reduciéndose la adhesión progresivamente con el descenso de la temperatura (Castro-Rosas y Escartín, 2002).

En los sistemas acuáticos naturales, los microorganismos están expuestos a situaciones de estrés (Sundberg *et al.*, 2014), y precisan de distintos mecanismos de adaptación para asegurar su supervivencia (Kaberdin *et al.*, 2015; Orruño *et al.*, 2017, 2019). Dichos mecanismos podrían afectar a su capacidad de adhesión a superficies bióticas. En este trabajo se ha comprobado que *V. harveyi gfp* sometido a condiciones de estrés (escasez de nutrientes y temperaturas variables) es capaz de adherirse a una superficie biótica (piel de *B. brama*); si bien esta capacidad disminuye a medida que se prolonga la permanencia en condiciones adversas. Coincidiendo con trabajos previos el género *Vibrio* bajo condiciones de estrés experimenta cambios fisiológicos y metabólicos que se manifiestan por disminución del tamaño celular y variaciones en la expresión de genes relacionados con la biogénesis de las envueltas celulares y rutas metabólicas asociadas, con el reciclaje de lípidos y de enzimas relacionadas con la búsqueda de fuentes de carbono alternativas (Kaberdin *et al.*, 2015); así como por la pérdida del flagelo y de proteínas relacionadas con la quimiotaxia (Parada, 2016). Estos últimos cambios podrían ser indicativos de la pérdida de movilidad de las células y podría estar relacionado con una tendencia a adherirse a superficies y, por tanto, a formar biofilms. No obstante, a medida que las condiciones estresantes se mantienen en el tiempo, *Vibrio* podría no ser capaz de adaptarse a dichas condiciones desfavorables, y perder así su capacidad de adherencia.

Si bien en este trabajo se ha observado que *Vibrio* no es capaz de adherirse a superficies abióticas, poblaciones sometidas previamente a estrés fueron capaces de adherirse a superficies bióticas. Estos hechos indicarían que los resultados obtenidos mediante métodos tradicionales de determinación de la capacidad de adhesión basados en establecer la capacidad de adhesión a superficies abióticas no podrían extrapolarse a superficies bióticas. Los resultados obtenidos en este estudio indican que *V. harveyi* es capaz de adherirse y, por tanto, podría probablemente infectar a hospedadores como peces y camarones (Austin y Zhang, 2006; Castro-Rosas y Escartín, 2002; O'Toole *et al.*, 2004; Won y Park, 2008), pudiendo tener consecuencias negativas en el sector de la acuicultura.

3. Caracterización de los cambios moleculares que, a nivel del subproteoma de las envueltas celulares, experimenta *V. harveyi* durante la adaptación a condiciones adversas

La capacidad de detectar y responder adecuadamente a cualquier estrés resulta un factor crítico para la supervivencia bacteriana en cualquier entorno, pero es especialmente importante para las bacterias que habitan en ambientes en constante cambio o para aquellas que habitan en más de un nicho biológico como *Vibrio* spp. Los integrantes de este género de organismos acuáticos deben adaptarse a temperaturas, niveles de salinidad y concentraciones de nutrientes en constante cambio (DeAngelis *et al.*, 2018). Los estudios proteómicos ofrecen la imagen de las proteínas expresadas por un organismo en un momento dado y bajo condiciones precisas, construyendo una imagen dinámica. Por lo tanto, el proteoma es capaz de reflejar las características ambientales a las que una célula está expuesta. En este contexto, se han analizado las modificaciones del subproteoma de las envueltas de *E. coli* (Darcan *et al.*, 2009; Orruño *et al.*, 2019; Parada *et al.*, 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Winder *et al.*, 2000), *P. putida* (Moreno y Rojo, 2013), *V. anguillarum* (Kao *et al.*, 2009), *V. harveyi* (Jia *et al.*, 2013; Parada *et al.*, 2016; Orruño *et al.*, 2017), *V. parahaemolyticus* (Lai *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2019), etc.

Comparando el presente estudio con el realizado por Parada (2016), trabajando en las mismas condiciones pero con la cepa de colección *V. harveyi* CECT 525, encontramos diferencias tanto cuantitativas como cualitativas. Así, Parada (2016) encontró 72 proteínas que cumplían los requisitos establecidos, comunes con este trabajo, frente a las 1714 del presente estudio. Esta diferencia puede deberse al origen de las cepas; colección y ambiental y, por tanto, su adaptación al ambiente; y/o a la metodología de digestión, análisis mediante LC-MS/MS y procesado de datos en ambos estudios. Si bien, en ambos casos se utilizó la base de datos UniProtKB, Parada (2016) comparó sus resultados con la base de datos de *V. campbelli* (strain ATCC BAA-1116 / BB120) y, en este trabajo, se utilizó la base restringida a *V. harveyi* (strain BSW5. versión 2018_12).

Además, aproximadamente el 78,95% de las proteínas de membrana estudiadas por Parada (2016) experimentaban variaciones durante 21 días de permanencia en agua de mar (escasez de nutrientes) a 4°C y 20°C. En el caso de *V. harveyi* ambiental; sin embargo, aproximadamente un 70% de dichas proteínas no varió. Esta diferencia en la conservación de la expresión proteica podría relacionarse con el origen de las cepas y los patrones de supervivencia adoptados por ambas. Así, *V. harveyi* ambiental mostró una mejor adaptación a la escasez de nutrientes en las experiencias realizadas a temperatura igual o inferior a 20°C.

De nuevo coincidiendo con Parada (2016), y atendiendo a las proteínas que modificaron su expresión únicamente para una de las situaciones estudiadas, observamos que esta variación ocurrió fundamentalmente para poblaciones mantenidas a 20°C; 63,1% respecto al 7,14% que variaron únicamente a 4°C.

La conservación de un gran número de proteínas estructurales (proteínas relacionadas con la biogénesis, transporte y ensamblaje o de estabilización de las envueltas) a lo largo de la permanencia de *V. harveyi* ambiental bajo condiciones de estrés parece relacionarse con el mantenimiento de la integridad celular observado para estas poblaciones (Objetivo 2, Resultados, apartado 1). El mantenimiento del lipopolisacárido (LPS) con funciones de barrera y control de la permeabilidad del peptidoglicano (Chng *et al.*, 2010; Madigan *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2018; Nikaido, 2003) y con funciones de prevención de la lisis celular (Madigan *et al.*, 2015; Martín *et al.*, 2018; Vollmer *et al.*, 2008) y con su continuo reciclaje (Höltje, 1998; Gronow y Brade, 2001; Madigan *et al.*, 2015; Raetz y Whitfield, 2002) son procesos esenciales para la viabilidad bacteriana. En este trabajo no se detectaron cambios en la expresión de,

entre otras, proteínas Lpt, relacionadas con el correcto ensamblaje del LPS (Chng *et al.*, 2010) ni de diversas proteínas relacionadas con la biogénesis del peptidoglicano (Lpo, DedD o N-acetilmurámico 6-fosfato esterasa) (Park y Uehara, 2008); así como de lipoproteínas que tienen funciones importantes para la célula (Nakayama *et al.*, 2012).

El complejo Bam, encargado del ensamblaje de proteínas de membrana externa (Volokhina *et al.*, 2013), se conforma de BamA, componente principal, y cuatro lipoproteínas asociadas (BamB, BamC, BamD y BamE) (Sklar *et al.*, 2007a; Volokhina *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2005). Este complejo es esencial (especialmente BamA) para evitar que las proteínas de membrana de nueva creación se acumulen en el periplasma (Volokhina *et al.*, 2013), evitando que su integración circunstancial en la membrana interna, desacople la fuerza protón-motriz (Gessmann *et al.*, 2014) y afecte negativamente a la viabilidad celular. Antes de su ensamblaje en la membrana externa, las proteínas a insertar, a medida que atraviesan el periplasma, deben mantenerse en un estado de plegamiento idóneo (Soltes *et al.*, 2016) que se consigue mediante la actividad una red de proteínas chaperonas, proteasas y factores de plegamiento (Merdanovic *et al.*, 2011; Sklar *et al.*, 2007b) entre las que se encuentra la chaperona periplásmica SurA, fundamental para el proceso (Lazar y Kolter, 1996; Soltes *et al.*, 2016). SurA también es importante para el ensamblaje de factores críticos de biogénesis, como la máquina de transporte de lipopolisacárido (LPS) (Ruiz *et al.*, 2010; Vertommen *et al.*, 2009) o el correcto ensamblaje de muchos factores de virulencia de la membrana externa, como el pilus P y las fimbrias de Tipo I (Soltes *et al.*, 2016). En este trabajo, tanto el complejo Bam como la proteína SurA se mantuvieron constantes a lo largo de las experiencias realizadas.

Entre otras proteínas estructurales que se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo, la porina OmpA (y otras) presenta funciones de mantenimiento de integridad de la membrana externa (Asakura *et al.*, 2008; Koebnik *et al.*, 2000; Sonntag *et al.*, 1978). La proteína OmpA contribuye a la tolerancia a condiciones adversas como ambientes ácidos o con alta osmolaridad (Wang, 2002) y participa en la regulación de la resistencia a antibióticos (Hashizume *et al.*, 1993).

Las proteínas relacionadas con el mantenimiento de la forma bacilar MreB y MreC se mantuvieron constantes. La proteína MreB, de acuerdo con los análisis de sus secuencias se trataría de una proteína citoplasmática; sin embargo, hay evidencias de la asociación de esta proteína con la membrana (Chiu *et al.*, 2008; Figge *et al.*, 2004; Mazza *et al.*, 2006; Wachi *et al.*, 1989). Chiu *et al.* (2008) relacionaron el inicio de la reducción del tamaño de *V. parahaemolyticus* con un aumento en la expresión del gen *mreB*. Kruse *et al.* (2003) demostraron que la disminución de la expresión de la proteína MreB en *E. coli* daba lugar a células esféricas y Parada (2016) y Orruño *et al.* (2017) establecieron una relación directa entre el mantenimiento de la concentración de la proteína MreB y del tamaño celular en *E. coli*. En este trabajo, no se encontró dicha relación, ya que, si bien las poblaciones de *V. harveyi* ambiental redujeron su tamaño y adquirieron una forma cocoide (Objetivo 2, Resultados, apartado 1), la detección de MreB no varió. Resultados similares han sido descritos por Parada (2016) para la cepa de *V. harveyi* CECT 525 no pudiendo establecer relación entre la expresión de la proteína MreB y la reducción del tamaño de *V. harveyi*.

Por otra parte, los descensos de la expresión de varias lipoproteínas inespecíficas o de proteínas relacionadas con la biogénesis de las envueltas, fundamentalmente en poblaciones mantenidas a 20°C, parecen compensarse con el mantenimiento descrito para otras proteínas.

Además de OmpA, otras proteínas de membrana externa o porinas como OmpW, OmpU, OmpK y OmpR, entre otras, se mantuvieron constantes a lo largo de las experiencias. Provenzano *et al.* (2001) indicaron que aproximadamente el 2% de la membrana externa está

compuesta por Omps que brindan protección a la célula colaborando en la permeabilidad selectiva (Yen *et al.*, 2002). Además, para ciertos microorganismos, como es el caso de *Vibrio*, se ha indicado que las porinas permitirían la unión a los tejidos del huésped facilitando la colonización (Aeckersberg *et al.*, 2001; Duperthuy *et al.*, 2011; Goo *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2019). Cambios en la osmolaridad (Xu *et al.*, 2004, 2005; Wu *et al.*, 2006) y en la disponibilidad de nutrientes (Abdallah *et al.*, 2010) provocan cambios en la expresión de diversas Omps (p.e. OmpW y OmpU). En el presente estudio, en cambio, no se observaron alteraciones en la expresión de diversas proteínas Omps, situación que podría deberse al origen de la cepa estudiada y la presumible adaptación a los factores del entorno, entre ellos la escasez de nutrientes.

Entre otras proteínas de membrana externa que no variaron su expresión a lo largo de las experiencias se encuentran las proteínas TolC y BtuB. TolC interactúa con AcrAB como la principal bomba de eflujo desempeñando un papel importante en la resistencia bacteriana a tóxicos (Koronakis *et al.*, 2000; Weeks *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015b) y en la secreción de proteínas (Wandersman y Delepelaire, 1990; Zgurskaya *et al.*, 2011). Además, TolC, junto a otras proteínas de membrana, está relacionada con la adhesión a diferentes huéspedes (Zhu *et al.*, 2019). BtuB, por su parte, es un transportador TonB-dependiente implicado en el transporte de vitamina B12 (Balusek y Gumbart, 2016).

En las bacterias, existen dos vías principales de secreción de proteínas a través de la membrana citoplasmática, la ruta de secreción general o vía Sec (Wickner *et al.*, 1991; Osborne *et al.*, 2005) y la vía de translocación de Tipo-arginina o vía Tat (Berks *et al.*, 2005) que translocan proteínas mediante mecanismos fundamentalmente diferentes; si bien se pueden reconocer varios elementos comunes (Natale *et al.*, 2008). El sistema Sec está involucrado tanto en la secreción de proteínas desplegadas a través de la membrana interna (Beckwith, 2013) como en la inserción de proteínas de membrana en la membrana citoplasmática (Luirink *et al.*, 2005). El sistema Tat, por su parte, se considera implicado principalmente en la secreción de proteínas plegadas y/o que contienen cofactores. Además, se encuentran sistemas de secreción de proteínas más específicos, los sistemas de secreción de proteínas de Tipo I-V (Henderson *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2006). Estos sistemas son, principalmente, responsables de la translocación y secreción de proteínas a través de la membrana externa en bacterias Gram negativas (y pueden utilizar las maquinarias Sec o Tat para el transporte a través de la membrana citoplasmática) (Natale *et al.*, 2008). En este estudio, la proteína TraF, relacionada con el sistema de secreción de Tipo IV aumentó su expresión, sugiriendo que procesos bacterianos relacionados con la conjugación y la translocación de sustancias efectoras relacionadas con la patogénesis se mantuvieron activos (Christie *et al.*, 2014).

Para *V. harveyi* ambiental se detectaron numerosos sistemas de transporte relacionados con la adquisición de nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos (sistemas fosfotransferasa [PTS], ABC, antiportadores y simportadores o transportadores inespecíficos); sistemas de secreción Sec y Tat, además de otros sistemas de secreción y bombas de extrusión que se mantuvieron constantes a lo largo de las experiencias. También se detectaron variaciones en la expresión de algunos transportadores, mayoritariamente disminución de la expresión e incluso no detección, fundamentalmente en poblaciones mantenidas a 20°C.

La estabilidad de proteínas y complejos relacionados con la bioenergética celular; p.e., componentes de cadena de transporte de electrones y ATPasas, observada en este trabajo coincide con los resultados obtenidos por Parada (2016) y Parada *et al.* (2016) para la cepa de colección *V. harveyi* CECT 525 quienes encontraron, incluso en poblaciones en estado VNC, indicios del funcionamiento de la cadena de transporte de electrones y de un metabolismo energético activo en condiciones similares a las estudiadas. Sin embargo, a diferencia de los

resultados encontrados por Parada (2016) que destacó la pérdida de las subunidades B y C del complejo NADH:ubiquinona oxidoreductasa coincidiendo con la entrada en el estado VNC; en este trabajo, en el que la cepa ambiental no adoptó dicho estado, se mantuvieron las subunidades del complejo NADH-quinona reductasa. En este contexto de análisis de proteínas implicadas en la bioenergética, Unemoto (2000) resaltó la importancia del sodio para el crecimiento óptimo de las bacterias marinas. Este complejo NADH:ubiquinona oxidoreductasa, encargado de expulsar sodio, genera una fuerza sodio-motriz, que se acopla a la toma activa de nutrientes (p.e. a los antiportadores y simportadores detectados en este trabajo) y a la rotación del flagelo polar. Por otra parte, a pesar de la aparente estabilidad detectada para este grupo de proteínas, se observaron cambios en la expresión de subunidades e isoformas de citocromo c, fundamentalmente en poblaciones mantenidas a 20°C.

Las proteasas son enzimas importantes en la adquisición de nutrientes bacterianos debido a su capacidad para convertir proteínas en formas utilizables por el organismo (Johnson, 2013). Para el género *Vibrio*, varios autores (Gulig *et al.*, 2005; Hasegawa *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2002; Naka y Crosa, 2011; Shinoda y Miyoshi, 2011; Ye *et al.*, 2008) han indicado la necesidad de la actuación de dichas enzimas; por ejemplo, Zn-metaloproteasa, serina proteasas, cisteína proteasas, etc. Además, diversas proteasas como HflC o la proteína zinc-metaloproteasa ATP-dependiente FtsH están implicadas en el control de la calidad de las proteínas integrales de membrana. A su vez, HflC colabora en la estabilidad celular degradando proteínas dañadas o innecesarias para la célula que podrían inhabilitar determinadas funciones de la propia membrana (Ito y Akiyama, 2005; Narberhaus *et al.*, 2009). La metaloproteasa ATP-dependiente FtsH, por su parte, es una proteasa que *in vivo* forma un complejo con el heterodímero HflKC, modulador de FtsH, anclado a la membrana y expuesto hacia el periplasma. Entre sus funciones destaca la participación en el correcto ensamblaje y exportación de proteínas de membrana o degradación de proteínas (Kihara *et al.*, 1996, 1998; Schumann, 1999).

La mayoría de las cepas bacterianas, especialmente las bacterias Gram negativas privadas de fosfato inorgánico, producen fosfatasa alcalinas, hidrolasas inespecíficas, (Wanner, 1993), entre ellas, varias cepas del género *Vibrio* (Roy *et al.*, 1982; Woolkalis y Baumann, 1981). Hauksson *et al.* (2000) indicaron una mayor afinidad de estas proteínas por su sustrato a bajas temperaturas; así como, una mayor tasa de producción de las mismas en medios con escasez de fosfato inorgánico. Coincidiendo con estos autores, la expresión de fosfatasa alcalina en poblaciones de *V. harveyi* ambiental mantenida en agua de mar natural a 4°C se mantuvo constantes e incrementó para poblaciones mantenidas a 20°C.

A pesar de que las condiciones imperantes en este estudio; escasez de nutrientes, temperaturas subóptimas y elevada densidad bacteriana, pueden impedir o retardar la división celular y el crecimiento poblacional en *Vibrio* spp. (Chase y Harwood, 2011; Parada, 2016; Soto-Rodríguez *et al.*, 2019), se detectaron varias proteínas relacionadas con dichos procesos que se mantuvieron constantes; por ejemplo, componentes del sistema Tol-Pal. Las proteínas que forman el complejo Tol-Pal están involucradas en el mantenimiento de la estructura y función adecuadas de la envoltura celular (Godlewska *et al.*, 2009) o en la biogénesis y/o transporte de componentes del lipopolisacárido (Gaspar *et al.*, 2000; Vines *et al.*, 2005). Diversos autores (Clavel *et al.*, 1996; Lazzaroni *et al.*, 1999; Llamas *et al.*, 2000; Webster, 1991) han indicado que la incorrecta función del sistema Tol-Pal provoca división celular aberrante, cambios fisiológicos, liberación de proteínas periplásmicas de la célula, motilidad alterada, etc. Este sistema también parece jugar un papel importante en la patogénesis de ciertas bacterias Gram negativas, como es el caso de *V. cholerae* (Godlewska *et al.*, 2009). Además, las proteínas Lpo que facilitan la síntesis del septo en el peptidoglicano y el sistema Tol-Pal se coordinan física y funcionalmente a través de la proteína CpoB que interactúa con ambos

complejos regulándolos y contribuyendo al mantenimiento de la integridad de la envoltura celular durante la división (Gray *et al.*, 2015). En este trabajo, el mantenimiento de las proteínas pertenecientes a estos sistemas, podría estar relacionado con su papel en el mantenimiento de la estructura y funciones de la envoltura celular más que en procesos de división.

Otras proteínas y/o complejos relacionados con el proceso de división celular como proteínas relacionadas con la segregación de cromosomas (proteínas Par) o proteínas que modulan la polimerización de la proteína FtsZ y reclutan otras proteínas del divisoma (proteínas Zap) se mantuvieron constantes. La mayoría de proteínas Fts también siguieron este patrón, menos la proteína de división celular FtsZ formadora del anillo (Egan y Vollmer, 2013) y la proteína formadora del septo a 20°C. *V. harveyi* ambiental bajo condiciones adversas mantendría la maquinaria necesaria para llevar a cabo la división celular, pero o bien el ambiente desfavorable no facilite dicho proceso o bien se utilice para la renovación de una parte de la población, no detectándose variación del número de células (Objetivo 2, Resultados, apartado 1).

La capacidad de una bacteria para sobrevivir en un ambiente hostil o variable radica en la correcta detección de las características del ambiente y en la capacidad de responder a los cambios. Con esta finalidad, las bacterias han desarrollado sistemas de transducción de señales que transforman dichas señales en respuestas intracelulares (Mascher *et al.*, 2006). Los gradientes químicos provocan el proceso de quimiotaxis bacteriano (Ferris *et al.*, 2014) que recae en una cascada de receptores y transmisores (proteínas Che, histidina quinasa, etc.) que terminan generando movimiento, ya que la señal es finalmente transmitida hasta el cuerpo basal del flagelo, el cual cambia su rotación (Alexandre y Zhulin, 2003; Karatan *et al.*, 2001) dependiendo de la atracción o repulsión de la bacteria por el estímulo. En este trabajo, para *V. harveyi* ambiental, se observó mantenimiento en sólo algunas proteínas quimiotácticas y flagelares, mientras que otras disminuyeron e incluso dejaron de detectarse. Así, los resultados obtenidos en este trabajo podrían indicar pérdida y/o reducción de movilidad, tal y como describieron Dawson *et al.* (1981), Lutz *et al.* (2013), Parada (2016) y Wai *et al.* (1999) para poblaciones de *Vibrio* spp., relacionando la pérdida de la motilidad con la capacidad para sobrevivir en condiciones de escasez de nutrientes. Chen y Chen (2014) demostraron que, en condiciones de escasez de nutrientes, la motilidad de *V. vulnificus* disminuía con el tiempo. Este hecho supondría para las células un ahorro energético (adicional al de la reducción del tamaño) ya que la fuerza sodio-motriz utilizada para potenciar la rotación del flagelo (Häse y Barquera, 2001) se emplearía en procesos celulares más rentables para la supervivencia.

Por otro lado, entre las proteínas relacionadas con la biogénesis de pilus de hemaglutinina manosa-sensitivo Tipo IV (MSHA) se encontró un comportamiento variable. El pilus de hemaglutinina manosa-sensitivo Tipo IV ha sido reportado como necesario para la adherencia y formación de biofilms (Marsh *et al.*, 1996; Mascher *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en este trabajo debieran revisarse atendiendo a la nula o escasa adherencia obtenida para la cepa *V. harveyi* ambiental durante las experiencias de supervivencia (Objetivo 2, Resultados, apartado 3).

La supervivencia en entornos inestables y/o adversos requiere de una amplia gama de rápidas respuestas adaptativas que son desencadenadas por proteínas reguladoras. Estos reguladores responden a señales ambientales y celulares específicos que modulan la transcripción, traducción o algún otro evento en la expresión génica, de modo que las respuestas fisiológicas se modifican de manera apropiada (Cases *et al.*, 2003; Henikoff *et al.*, 1998; Ramos *et al.*, 2001). TetR es una de las familias de reguladores de la transcripción que está bien representada y ampliamente distribuida entre las bacterias (Levy, 1988; Levy *et al.*, 1999;

Mendez *et al.*, 1980; Orth *et al.*, 2000). Estas proteínas controlan genes cuyos productos están implicados en la resistencia a múltiples fármacos, enzimas implicadas en diferentes vías catabólicas, biosíntesis de antibióticos, respuesta a estrés osmótico y patogenicidad tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas (Ramos *et al.*, 2005). *V. harveyi* ambiental mantuvo constante el regulador transcripcional de la familia TetR, sugiriendo que la capacidad de generar respuestas se mantuvo a lo largo de las experiencias.

El hierro que se encuentra en concentraciones limitantes en aguas superficiales en zonas de mar abierto (Johnson *et al.*, 1997) es uno de los nutrientes más necesarios para el crecimiento y la supervivencia de *Vibrio* (Johnson, 2013). Las bacterias desarrollan mecanismos diferentes para la adquisición de hierro como la inducción o la sobreexpresión de proteínas implicadas en el proceso (Alice *et al.*, 2008; Mey *et al.*, 2005; Thode *et al.*, 2015). La adquisición de hierro reviste importancia durante la supervivencia de *V. harveyi* ambiental, al igual que para *V. harveyi* CECT 525 (Parada, 2016). Los resultados obtenidos mostraron que la proteína bacterioferritina, implicada en el almacenamiento de hierro (Chen y Morse, 1999), detectable al inicio de los experimentos, aumentó su expresión para ambas temperaturas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kaberdin *et al.* (2015) y Montánchez *et al.* (2014) quienes demostraron una fuerte regulación positiva de los genes que codifican ferredoxinas asociadas a la bacterioferritina y proteínas transportadoras de hierro para *V. harveyi* CECT 525. Así, nuestros resultados parecen confirmar que la adaptación y supervivencia de *V. harveyi* en microcosmos de agua de mar están ligadas, entre otros, a la homeostasis del hierro.

Dentro del grupo de proteínas no adscritas directamente a un grupo funcional, los factores de elongación EF-4 y EF-Tu detectados desde el inicio de las experiencias se mantuvieron constantes. EF-4 se requiere para una precisa y eficiente síntesis de proteínas bajo condiciones de estrés (Pech *et al.*, 2011) y se almacena en la membrana y se libera en el citoplasma bajo condiciones de estrés (Pech *et al.*, 2011). EF-Tu ha sido descrito como una chaperona citoplasmática implicada en la síntesis proteica, la regulación del crecimiento celular y la respuesta al estrés (Caldas *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1986). Sin embargo, Parada (2016) detectó EF-Tu en el pool de proteínas de membrana tanto para *E. coli* como para *V. harveyi* CECT 525 desde el inicio de la exposición a estrés. Parada (2016) encontró diferencias en la expresión de EF-Tu dependientes de temperatura (incremento a baja temperatura) que podrían estar relacionadas con la adquisición del estado VNC por parte de la cepa de colección mantenida a 4°C. Resultados similares han sido descritos por Lai *et al.* (2009) para poblaciones de *V. parahaemolyticus* ST550 en estado VNC. Sin embargo, Jia *et al.* (2013) encontraron que esta proteína estaba negativamente regulada en células de *V. harveyi* SF1 en estado VNC. En este estudio, para la cepa de *V. harveyi* ambiental no se encontraron diferencias en cuando a la expresión de la proteína EF-Tu; si bien, tampoco adoptó el estado VNC a las temperaturas estudiadas.

En cuanto a los factores relacionados con la virulencia bacteriana, aunque varias proteínas del sistema de secreción Tipo VI disminuyeron su expresión, la mayoría de las proteínas relacionadas con la patogenicidad se mantuvieron constantes, como la proteína ToxS, que estimula la actividad de la proteína ToxR (DiRita *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1989), la cual es el mayor activador de la expresión génica relativa a la virulencia en *V. cholerae* (Miller *et al.*, 1987). Otro ejemplo es el efector de Tipo III, relacionado con la patogenicidad mediada por los sistemas de secreción de Tipo III (T3SS) (Zhang *et al.*, 2012). Este mecanismo de patogenicidad ha sido descrito en muchas especies de bacterias Gram negativas (Troisfontaines y Cornelis, 2005). El T3SS es una estructura compleja compuesta por varias proteínas estructurales y relacionada con proteínas adicionales translocadoras que trasladan proteínas efectoras al citoplasma de la célula huésped. Estas proteínas efectoras son los factores de virulencia que efectúan los cambios en las células del hospedador, permitiendo la colonización, multiplicación

e incluso la persistencia crónica del patógeno en el hospedador (Coburn *et al.*, 2007). Este sistema T3SS se ha descrito en varias especies del género *Vibrio* (Dziejman *et al.*, 2005; Grimes *et al.*, 2009; Henke y Bassler, 2004a; Makino *et al.*, 2003; Naka *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2008; Shin *et al.*, 2011; Tam *et al.*, 2007; Vora *et al.*, 2005).

Por otro lado, las fosfolipasas constituyen un subgrupo diverso de enzimas lipolíticas que comparten la capacidad de hidrolizar uno o más enlaces éster en fosfolípidos, con actividad fosfodiesterasa y acil hidrolasa (Vance y Vance, 1996). Se ha indicado que es probable que las fosfolipasas estén involucradas en los procesos de ruptura de la membrana que a menudo ocurren durante la invasión de la célula huésped (Vance y Vance, 1996). Brok *et al.* (1994) sugirieron que, aun no siendo necesarias para la célula bacteriana en condiciones de laboratorio, podría ser esencial para el crecimiento en el entorno natural.

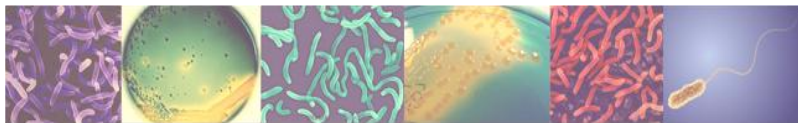
Otro de los factores de virulencia asociado con *Vibrio* spp. son las hemolisinas (Mizuno *et al.*, 2019). Estas toxinas juegan un papel importante en el proceso de infección iniciado por estas bacterias (Iida y Honda, 1997; Shinoda, 1999). Por ejemplo, se consideran los principales factores de virulencia de *V. parahaemolyticus* (Mizuno *et al.*, 2019). En este estudio, diferentes hemolisinas o isoformas se mantuvieron constantes para las dos situaciones estudiadas.

Manefield *et al.* (2000) han sugerido que la producción de toxinas en *V. harveyi* está regulada por quorum sensing. Este proceso de comunicación química permite evaluar la densidad de población y cambiar su comportamiento en respuesta al ambiente (Bagert *et al.*, 2016). Quorum sensing en *V. harveyi* implica varios sistemas de señales que regulan positivamente la bioluminescencia (Henke y Bassler, 2004b; Milton, 2006) y la producción de metaloproteasas (Mok *et al.*, 2003), sideroforos, y exopolisacárido (Lilley y Bassler, 2000) y negativamente al sistema de secreción de Tipo III (Henke and Bassler, 2004a) en función de la densidad celular. Estas modificaciones han sido revisadas recientemente por Bagert *et al.* (2016). En este trabajo, proteínas relacionadas con dicho mecanismo de detección de quórum; como las proteínas Lux, se mantuvieron constantes a lo largo de las experiencias, lo que podría relacionarse con el mantenimiento de funciones relacionadas y ya discutidas.

En el caso de *V. harveyi* ambiental se observaron ligeros cambios de expresión en proteínas estructurales y de transporte; en general, hacia una disminución de la expresión, junto con la sobreexpresión en proteínas relacionadas con la bioenergética celular. Su estrategia parece ajustarse a la satisfacción de necesidades energéticas incrementadas por el proceso de adaptación al medio. La composición proteica mostrada por esta cepa parece muy estable, sin pérdidas destacables tras exposición a las condiciones desfavorables estudiadas. Además, la sobreexpresión que se observa en algunas proteínas podría, de algún modo, compensar la pérdida de otras y así mantener la viabilidad celular, ya que se ha demostrado que, para contrarrestar las limitaciones de nutrientes en el medio ambiente, *Vibrio* es capaz de producir proteínas de estrés y activar vías que permiten la supervivencia a largo plazo (Abdallah *et al.*, 2012).

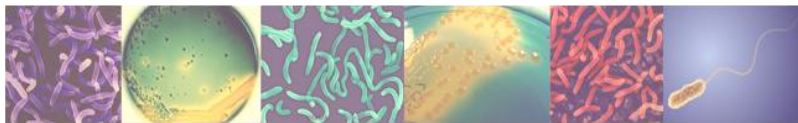
El conjunto de los resultados presentados en este apartado para *V. harveyi* ambiental, indicaría una gran estabilidad del subproteoma de las envueltas celulares con cambios que aparentemente serían reorganizaciones de isoformas o variantes de proteínas que se mantienen constantes, de manera que las funciones de mantenimiento de la estructura, el transporte y la bioenergética no parecen estar comprometidas por la permanencia a 4°C y 20°C en condiciones de escasez de nutrientes. Los principales cambios ocurren en proteínas sensoras y de movimiento que disminuyen su expresión, fundamentalmente a 20°C y en la sobreexpresión de bacterioferritina, probablemente como adaptación a las características del agua de mar.

CONCLUSIONES



1. El protocolo de CARD-FISH, utilizando la sonda VIB572a, aplicado en este trabajo resulta adecuado para la detección de diferentes especies del género *Vibrio*, incluso en presencia de otros microorganismos, en muestras de agua de mar naturales. Además, resulta una metodología idónea para establecer la distribución y dinámica espacio-temporal de *Vibrio* spp. en aguas costeras.
2. Bacterias pertenecientes a diferentes especies del género *Vibrio* muestran patrones de supervivencias distintos ante condiciones desfavorables. En general, la exposición a factores ambientales adversos genera la formación de una subpoblación de células en estado viable no cultivable, aunque las condiciones que promueven este proceso difieren para cada bacteria.
3. Al menos para el género *Vibrio*, el uso de cepas modelo no parece adecuado para predecir el comportamiento de cepas ambientales bajo condiciones de estrés.
4. Independientemente de la cepa y de su patrón de supervivencia, las bacterias del género *Vibrio* expuestas a condiciones de escasez de nutrientes reducen su tamaño celular como una estrategia para aumentar la relación superficie/volumen. El patrón de disminución varía con la exposición a temperatura, salinidades variables y a radiación visible.
5. *V. harveyi* ambiental durante permanencia bajo condiciones adversas mantiene gran parte de sus proteínas de las envueltas; si bien se detectó un incremento en la fracción relacionada con bioenergética y disminución de proteínas sensoras y de movimiento.

BIBLIOGRAFÍA



- Abboudi, M., Surget, S.M., Rontani, J., Sempéré, R. & Joux, F. 2008**, "Physiological alteration of the marine bacterium *Vibrio angustum* S14 exposed to simulated sunlight during growth", *Current Microbiology*, vol. 57, no. 5, pp. 412-417.
- Abdallah, F.B., Ellafi, A., Lagha, R., Bakhrouf, A., Namane, A., Rousselle, J., Lenormand, P. & Kallel, H. 2010**, "Identification of outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* altered in response to γ -irradiation or long-term starvation", *Research in Microbiology*, vol. 161, no. 10, pp. 869-875.
- Abdallah, F.B., Kallel, H. & Bakhrouf, A. 2009**, "Enzymatic, outer membrane proteins and plasmid alterations of starved *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* cells in seawater", *Archives of Microbiology*, vol. 191, no. 6, pp. 493-500.
- Abdallah, F.B., Lagha, R., Ellafi, A., Namane, A., Rousselle, J., Lenormand, P. & Kallel, H. 2012**, "Identification of outer membrane proteins altered in response to UVC-radiation in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*", *Indian Journal of Microbiology*, vol. 52, no. 4, pp. 660-665.
- Abedi-Moghaddam, N., Bulic, A., Herderson, L. & Lam, E. 2004**, "Survival of *Escherichia coli* to UV irradiation during exponential and stationary phases of growth", *Journal of Experimental Microbiology and Immunology*, vol. 5, pp. 44-49.
- Abia, A.L.K., Ubomba-Jaswa, E. & Momba, M.N.B. 2016**, "Competitive survival of *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella typhimurium* and *Shigella dysenteriae* in riverbed sediments", *Microbial Ecology*, vol. 72, no. 4, pp. 881-889.
- Aeckersberg, F., Lupp, C., Feliciano, B. & Ruby, E. 2001**, "*Vibrio fischeri* outer membrane protein OmpU plays a role in normal symbiotic colonization", *Journal of Bacteriology*, vol. 183, no. 22, pp. 6590-6597.
- Alexandre, G. & Zhulin, I.B. 2003**, "Different evolutionary constraints on chemotaxis proteins CheW and CheY revealed by heterologous expression studies and protein sequence analysis", *Journal of Bacteriology*, vol. 185, no. 2, pp. 544-552.
- Alfreider, A., Pernthaler, J., Amann, R., Sattler, B., Glockner, F., Wille, A. & Psenner, R. 1996**, "Community analysis of the bacterial assemblages in the winter cover and pelagic layers of a high mountain lake by *in situ* hybridization", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 6, pp. 2138-2144.
- Alice, A.F., Naka, H. & Crosa, J.H. 2008**, "Global gene expression as a function of the iron status of the bacterial cell: influence of differentially expressed genes in the virulence of the human pathogen *Vibrio vulnificus*", *Infection and Immunity*, vol. 76, no. 9, pp. 4019-4037.
- Alifano, P., Nassisi, V., Siciliano, M., Talà, A. & Tredici, S. 2011**, "Unexpected photoreactivation of *Vibrio harveyi* bacteria living in ionization environment", *Journal of Applied Physics*, vol. 109, no. 10, pp. 104703.
- Alonso-Sáez, L., Unanue, M., Latatu, A., Azua, I., Ayo, B., Artolozaga, I. & Iriberry, J. 2009**, "Changes in marine prokaryotic community induced by varying types of dissolved

organic matter and subsequent grazing pressure", *Journal of Plankton Research*, vol. 31, no. 11, pp. 1373-1383.

Alsina, M. & Blanch, A.R. 1994, "Improvement and update of a set of keys for biochemical identification of *Vibrio* species", *Journal of Applied Bacteriology*, vol. 77, no. 6, pp. 719-721.

Alves, E., Faustino, M.A., Tome, J.P., Neves, M.G., Tome, A.C., Cavaleiro, J.A., Cunha, A., Gomes, N.C. & Almeida, A. 2011, "Photodynamic antimicrobial chemotherapy in aquaculture: photoinactivation studies of *Vibrio fischeri*", *PLoS One*, vol. 6, no. 6, pp. e20970.

Amann, R., Snaidr, J., Wagner, M., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1996, "In situ visualization of high genetic diversity in a natural microbial community", *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 12, pp. 3496-3500.

Amann, R.I., Krumholz, L. & Stahl, D.A. 1990, "Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology", *Journal of Bacteriology*, vol. 172, no. 2, pp. 762-770.

Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1995, "Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation", *Microbiological Reviews*, vol. 59, no. 1, pp. 143-169.

Amaro, C., Biosca, E.G., Fouz, B., Alcaide, E. & Esteve, C. 1995, "Evidence that water transmits *Vibrio vulnificus* biotype 2 infections to eels", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 3, pp. 1133-1137.

Amel, B.K., Amine, B. & Amina, B. 2008, "Survival of *Vibrio fluvialis* in seawater under starvation conditions", *Microbiological Research*, vol. 163, no. 3, pp. 323-328.

Andersen, C., Maier, E., Kemmer, G., Blass, J., Hilpert, A.K., Benz, R. & Reidl, J. 2003, "Porin OmpP2 of *Haemophilus influenzae* shows specificity for nicotinamide-derived nucleotide substrates", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 27, pp. 24269-24276.

Arana, I., Irizar, A., Seco, C., Muela, A., Fernández-Astorga, A. & Barcina, I. 2003, "gfp-tagged cells as a useful tool to study the survival of *Escherichia coli* in the presence of the river microbial community", *Microbial Ecology*, vol. 45, no. 1, pp. 29-38.

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 Microbiology Ecology*, vol. 74, no. 3, pp. 500-509.

Arana, I., Orruño, M., Pérez-Pascual, D., Seco, C., Muela, A. & Barcina, I. 2007, "Inability of *Escherichia coli* to resuscitate from the viable but nonculturable state", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 62, no. 1, pp. 1-11.

- Arana, I., Muela, A., Iriberry, J., Egea, L. & Barcina, I. 1992**, "Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a freshwater ecosystem", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, no. 12, pp. 3903-3907.
- Arboleda, M. & Reichardt, W. 2009**, "Epizotic communities of prokaryotes on healthy and diseased scleractinian corals in Lingayen Gulf, Philippines", *Microbial Ecology*, vol. 57, no. 1, pp. 117-128.
- Armada, S.P., Farto, R., Pérez, M.J. & Nieto, T.P. 2003**, "Effect of temperature, salinity and nutrient content on the survival responses of *Vibrio splendidus* biotype I", *Microbiology*, vol. 149, no. 2, pp. 369-375.
- Asakura, H., Ishiwa, A., Arakawa, E., Makino, S., Okada, Y., Yamamoto, S. & Igimi, S. 2007**, "Gene expression profile of *Vibrio cholerae* in the cold stress-induced viable but non-culturable state", *Environmental Microbiology*, vol. 9, no. 4, pp. 869-879.
- Asakura, H., Kawamoto, K., Haishima, Y., Igimi, S., Yamamoto, S. & Makino, S. 2008**, "Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 corresponds to the viable but non-culturable state", *Research in Microbiology*, vol. 159, no. 9-10, pp. 709-717.
- Atkinson, D., Ciotti, B.J. & Montagnes, D.J. 2003**, "Protists decrease in size linearly with temperature: ca. 2.5% C⁻¹", *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, vol. 270, no. 1533, pp. 2605-2611.
- Atlas, R. & Bartha, R. (eds). 1998**, "Quantitative ecology: numbers, biomass, and activities", *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Benjamin/Cummings Science Publishing, Menlo Park, USA, pp. 218-263.
- Austin, B., Austin, D., Blanch, A., Cerda, M., Grimont, F., Grimont, P., Jofre, J., Koblavi, S., Larsen, J. & Pedersen, K. 1997**, "A comparison of methods for the typing of fish-pathogenic *Vibrio* spp.", *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 20, no. 1, pp. 89-101.
- Austin, B. & Zhang, X. 2006**, "*Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 43, no. 2, pp. 119-124.
- Baffone, W., Citterio, B., Vittoria, E., Casaroli, A., Campana, R., Falzano, L. & Donelli, G. 2003**, "Retention of virulence in viable but non-culturable halophilic *Vibrio* spp.", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 89, no. 1, pp. 31-39.
- Bagert, J.D., Van Kessel, J.C., Sweredoski, M.J., Feng, L., Hess, S., Bassler, B.L. & Tirrell, D.A. 2016**, "Time-resolved proteomic analysis of quorum sensing in *Vibrio harveyi*", *Chemical Science*, vol. 7, no. 3, pp. 1797-1806.
- Baker-Austin, C., Oliver, J.D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M.K., Qadri, F. & Martinez-Urtaza, J. 2018**, "*Vibrio* spp. infections", *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 4, no. 1, pp. 1-19.
- Balusek, C. & Gumbart, J.C. 2016**, "Role of the native outer-membrane environment on the transporter BtuB", *Biophysical Journal*, vol. 111, no. 7, pp. 1409-1417.

- Barcina, I., Lebaron, P. & Vives-Rego, J. 1997**, "Survival of allochthonous bacteria in aquatic systems: a biological approach", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 23, no. 1, pp. 1-9.
- Barcina, I. & Arana, I. 2009**, "The viable but nonculturable phenotype: a crossroads in the life-cycle of non-differentiating bacteria?", *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 8, no. 3, pp. 245-255.
- Barcina, I., Ayo, B., Unanue, M., Egea, L. & Iriberry, J. 1992**, "Comparison of rates of flagellate bacterivory and bacterial production in a marine coastal system", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, no. 12, pp. 3850-3856.
- Bates, T.C. & Oliver, J.D. 2004**, "The viable but nonculturable state of Kanagawa positive and negative strains of *Vibrio parahaemolyticus*", *Journal of Microbiology*, vol. 42, no. 2, pp. 74-79.
- Baumann, P. & Schubert, R. 1984**, "Section 5. Facultatively anaerobic gram-negative rods, Family II. *Vibrionaceae*", *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Holt, G., Krieg, N.R. (eds), Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA, pp. 516-550.
- Baumann, P., Baumann, L., Bang, S.S. & Woolkalis, M.J. 1980**, "Reevaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckea*, and *Photobacterium*: Abolition of the genus *Beneckea*", *Current Microbiology*, vol. 4, no. 3, pp. 127-132.
- Beachy, E. 1981**, "Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface", *Journal of Infectious Diseases*, vol. 143, pp. 641-644.
- Beckwith, J. 2013**, "The Sec-dependent pathway", *Research in Microbiology*, vol. 164, no. 6, pp. 497-504.
- Belas, M.R. & Colwell, R.R. 1982**, "Adsorption kinetics of laterally and polarly flagellated *Vibrio*", *Journal of Bacteriology*, vol. 151, no. 3, pp. 1568-1580.
- Bell, T., Bonsall, M.B., Buckling, A., Whiteley, A.S., Goodall, T. & Griffiths, R.I. 2010**, "Protists have divergent effects on bacterial diversity along a productivity gradient", *Biology Letters*, vol. 6, no. 5, pp. 639-642.
- Bellés-Garulera, J., Vila, M., Borrull, E., Riobó, P., Franco, J.M. & Sala, M.M. 2016**, "Variability of planktonic and epiphytic vibrios in a coastal environment affected by *Ostreopsis* blooms", *Scientia Marina*, vol. 80, no. S1, pp. 97-106.
- Berks, B.C., Palmer, T. & Sargent, F. 2005**, "Protein targeting by the bacterial twin-arginine translocation (Tat) pathway", *Current Opinion in Microbiology*, vol. 8, no. 2, pp. 174-181.
- Bernstein, L., Bosch, P., Canziani, O., Chen, Z., Christ, R. & Riahi, K. 2008**, "IPCC, 2007: climate change 2007: synthesis report". Disponible en <https://www.ipcc.ch/report/ar4/syr/> [actualización continua; citado 6 abril 2020]

- Beveridge, O.S., Humphries, S. & Petchey, O.L. 2010a**, "The interacting effects of temperature and food chain length on trophic abundance and ecosystem function", *Journal of Animal Ecology*, vol. 79, no. 3, pp. 693-700.
- Beveridge, O.S., Petchey, O.L. & Humphries, S. 2010b**, "Direct and indirect effects of temperature on the population dynamics and ecosystem functioning of aquatic microbial ecosystems", *Journal of Animal Ecology*, vol. 79, no. 6, pp. 1324-1331.
- Beveridge, O.S., Petchey, O.L. & Humphries, S. 2010c**, "Mechanisms of temperature-dependent swimming: the importance of physics, physiology and body size in determining protist swimming speed", *The Journal of Experimental Biology*, vol. 213, no. Pt 24, pp. 4223-4231.
- Biosca, E.G., Amaro, C., Marco-Noales, E. & Oliver, J.D. 1996**, "Effect of low temperature on starvation-survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 2, pp. 450-455.
- Booth, M., Jeffrey, W. & Miller, R. 2001**, "RecA expression in response to solar UVR in the marine bacterium *Vibrio natriegens*", *Microbial Ecology*, vol. 42, no. 4, pp. 531-539.
- Booth, I.R. & Blount, P. 2012**, "The MscS and MscL families of mechanosensitive channels act as microbial emergency release valves", *Journal of Bacteriology*, vol. 194, no. 18, pp. 4802-4809.
- Bordas, M.A., Balebona, M.C., Zorrilla, I., Borrego, J.J. & Morinigo, M.A. 1996**, "Kinetics of adhesion of selected fish-pathogenic *Vibrio* strains of skin mucus of gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.)", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 10, pp. 3650-3654.
- Bravo, Z., Orruño, M., Navascues, T., Ogayar, E., Ramos-Vivas, J., Kaberdin, V. & Arana, I. 2019**, "Analysis of *Acinetobacter baumannii* survival in liquid media and on solid matrices as well as effect of disinfectants", *Journal of Hospital Infection*, vol. 103, no. 1, pp. e42-e52.
- Brehm, T.T., Berneking, L., Rohde, H., Chistner, M., Schlickewei, C., Martins, M.S. & Schmiedel, S. 2020**, "Wound infection with *Vibrio harveyi* following a traumatic leg amputation after a motorboat propeller injury in Mallorca, Spain: a case report and review of literature", *BMC Infectious Diseases*, vol. 20, no. 1, pp. 104.
- Brok, R.G., Brinkman, E., van Boxtel, R., Bekkers, A.C., Verheij, H.M. & Tommassen, J. 1994**, "Molecular characterization of enterobacterial *pldA* genes encoding outer membrane phospholipase A", *Journal of Bacteriology*, vol. 176, no. 3, pp. 861-870.
- Cabral, J.P. 2010**, "Water microbiology. Bacterial pathogens and water", *International Journal of Environmental Research and Public Health*, vol. 7, no. 10, pp. 3657-3703.
- Caldas, T.D., El Yaagoubi, A., Kohiyama, M. & Richarme, G. 1998**, "Purification of elongation factors EF-Tu and EF-G from *Escherichia coli* by covalent chromatography on thiol-sepharose", *Protein expression and purification*, vol. 14, no. 1, pp. 65-70.

- Cañigral Cárcel, I. 2011**, "Desarrollo de métodos moleculares para la detección y caracterización de bacterias patógenas emergentes del género *Vibrio* en aguas y alimentos". Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia.
- Cano-Gomez, A., Bourne, D.G., Hall, M.R., Owens, L. & Høj, L. 2009**, "Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: current methods and future prospects", *Aquaculture*, vol. 287, no. 1-2, pp. 1-10.
- Cano-Gomez, A., Goulden, E.F., Owens, L. & Høj, L. 2010**, "*Vibrio owensii* sp. nov., isolated from cultured crustaceans in Australia", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 302, no. 2, pp. 175-181.
- Cano-Gomez, A., Høj, L., Owens, L. & Andreakis, N. 2011**, "Multilocus sequence analysis provides basis for fast and reliable identification of *Vibrio harveyi*-related species and reveals previous misidentification of important marine pathogens", *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 34, no. 8, pp. 561-565.
- Caron, D.A., Goldman, J.C. & Dennett, M.R. 1988**, "Experimental demonstration of the roles of bacteria and bacterivorous protozoa in plankton nutrient cycles", *Hydrobiologia*, vol. 159, no. 1, pp. 27-40.
- Cases, I., De Lorenzo, V. & Ouzounis, C.A. 2003**, "Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria", *Trends in Microbiology*, vol. 11, no. 6, pp. 248-253.
- Castro-Rosas, J. & Escartin, E. 2002**, "Adhesion and colonization of *Vibrio cholerae* O1 on shrimp and crab carapaces", *Journal of Food Protection*, vol. 65, no. 3, pp. 492-498.
- Chakraborty, S., Mukhopadhyay, A.K., Bhadra, R.K., Ghosh, A.N., Mitra, R., Shimada, T., Yamasaki, S., Faruque, S.M., Takeda, Y., Colwell, R.R. & Nair, G.B. 2000**, "Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 9, pp. 4022-4028.
- Chase, E. & Harwood, V.J. 2011**, "Comparison of the effects of environmental parameters on growth rates of *Vibrio vulnificus* biotypes I, II, and III by culture and quantitative PCR analysis", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 77, no. 12, pp. 4200-4207.
- Chen, C. & Morse, S.A. 1999**, "*Neisseria gonorrhoeae* bacterioferritin: structural heterogeneity, involvement in iron storage and protection against oxidative stress", *Microbiology*, vol. 145, no. 10, pp. 2967-2975.
- Chen, H. & Chen, C. 2014**, "Starvation induces phenotypic diversification and convergent evolution in *Vibrio vulnificus*", *PLoS One*, vol. 9, no. 2, pp. e88658.
- Chen, Q., Yan, Q., Wang, K., Zhuang, Z. & Wang, X. 2008**, "Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus", *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 80, no. 3, pp. 181-188.
- Chen, S., Jane, W., Chen, Y. & Wong, H. 2009**, "Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses", *International journal of food microbiology*, vol. 129, no. 2, pp. 157-165.

- Chiu, S.W., Chen, S.Y. & Wong, H.C. 2008**, "Dynamic localization of MreB in *Vibrio parahaemolyticus* and in the ectopic host bacterium *Escherichia coli*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 21, pp. 6739-6745.
- Chng, S., Gronenberg, L.S. & Kahne, D. 2010**, "Proteins required for lipopolysaccharide assembly in *Escherichia coli* form a transenvelope complex", *Biochemistry*, vol. 49, no. 22, pp. 4565-4567.
- Christie, P.J., Whitaker, N. & González-Rivera, C. 2014**, "Mechanism and structure of the bacterial type IV secretion systems", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, vol. 1843, no. 8, pp. 1578-1591.
- Church, M.J. 2008**, "Resource control of bacterial dynamics in the sea", *Microbial Ecology of the Oceans*, vol. 1, pp. 335-382.
- Chust, G., Caballero, A., Marcos, M., Liria, P., Hernández, C. & Borja, Á. 2010**, "Regional scenarios of sea level rise and impacts on Basque (Bay of Biscay) coastal habitats, throughout the 21st century", *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 87, no. 1, pp. 113-124.
- Citterio, B., Casaroli, A., Pierfelici, L., Battistelli, M., Falcieri, E. & Baffone, W. 2004**, "Morphological changes and outer membrane protein patterns in *Helicobacter pylori* during conversion from bacillary to coccoid form", *The New Microbiologica*, vol. 27, no. 4, pp. 353-360.
- Clavel, T., Lazzaroni, J.C., Vianney, A. & Portalier, R. 1996**, "Expression of the *tolQRA* genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis", *Molecular Microbiology*, vol. 19, no. 1, pp. 19-25.
- Cleland, D., Thomas, M., Strickland, D. & Oliver, J. 1985**, "A comparison of media for the isolation of *Vibrio* spp. from environmental sources", *Annual Meeting of the American Society for Microbiology*, vol. 16, pp. 220.
- Coburn, B., Sekirov, I. & Finlay, B.B. 2007**, "Type III secretion systems and disease", *Clinical Microbiology Reviews*, vol. 20, no. 4, pp. 535-549.
- Colwell, R.R. & Huq, A. 1994**, "Environmental reservoir of *Vibrio cholerae* the causative agent of Cholera", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 740, no. 1, pp. 44-54.
- Coohill, T.P. & Sagripanti, J. 2009**, "Bacterial inactivation by solar ultraviolet radiation compared with sensitivity to 254 nm radiation", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 85, no. 5, pp. 1043-1052.
- Cools, I., Uyttendaele, M., Caro, C., D'Haese, E., Nelis, H. & Debevere, J. 2003**, "Survival of *Campylobacter jejuni* strains of different origin in drinking water", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 94, no. 5, pp. 886-892.
- Coutard, F., Crassous, P., Droguet, M., Gobin, E., Colwell, R.R., Pommepuy, M. & Hervio-Heath, D. 2007**, "Recovery in culture of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*: regrowth or resuscitation?", *The ISME Journal*, vol. 1, no. 2, pp. 111-120.

- Crothers-Stomps, C., Høj, L., Bourne, D. G., Hall, M. R., & Owens, L. 2010**, "Isolation of lytic bacteriophage against *Vibrio harveyi*", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 108, no. 5, pp. 1744-1750.
- Czyz, A., Wróbel, B., & Węgrzyn, G. 2000**, "*Vibrio harveyi* bioluminescence plays a role in stimulation of DNA repair.", *Microbiology*, vol. 146, no. 2, pp. 283-288.
- Darcan, C., Ozkanca, R., Idil, O. & Flint, K.P. 2009**, "Viable but non-culturable state (VBNC) of *Escherichia coli* related to EnvZ under the effect of pH, starvation and osmotic stress in sea water", *Polish Journal of Microbiology*, vol. 58, no. 4, pp. 307-317.
- Davis, B.J.K., Jacobs, J.M., Davis, M.F., Schwab, K.J., DePaola, A. & Curriero, F.C. 2017**, "Environmental determinants of *Vibrio parahaemolyticus* in the Chesapeake Bay", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 83, no. 21, pp. e01147-17
- Dawson, M.P., Humphrey, B.A. & Marshall, K.C. 1981**, "Adhesion: a tactic in the survival strategy of a marine *Vibrio* during starvation", *Current Microbiology*, vol. 6, no. 4, pp. 195-199.
- DeAngelis, C.M., Saul-McBeth, J. & Matson, J.S. 2018**, "*Vibrio* responses to extracytoplasmic stress", *Environmental Microbiology Reports*, vol. 10, no. 5, pp. 511-521.
- Del Gigia-Aguirre, L., Sanchez-Yebra-Romera, W., Garcia-Munoz, S. & Rodriguez-Maresca, M. 2017**, "First description of wound infection with *Vibrio harveyi* in Spain", *New Microbes and New Infections*, vol. 19, pp. 15-16.
- Delaney, M. 2003**, "Effects of temperature and turbulence on the predator—prey interactions between a heterotrophic flagellate and a marine bacterium", *Microbial Ecology*, vol. 45, no. 3, pp. 218-225.
- DeLong, E.F., Taylor, L.T., Marsh, T.L. & Preston, C.M. 1999**, "Visualization and enumeration of marine planktonic archaea and bacteria by using polyribonucleotide probes and fluorescent *in situ* hybridization", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 12, pp. 5554-5563.
- DeLong, E.F., Wickham, G.S. & Pace, N.R. 1989**, "Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells", *Science*, vol. 243, no. 4896, pp. 1360-1363.
- Di Pinto, A., Terio, V., Novello, L. & Tantillo, G. 2011**, "Comparison between thiosulphate-citrate-bile salt sucrose (TCBS) agar and CHROMagar *Vibrio* for isolating *Vibrio parahaemolyticus*", *Food Control*, vol. 22, no. 1, pp. 124-127.
- Di, D.Y.W., Lee, A., Jang, J., Han, D. & Hur, H.G. 2017**, "Season-specific occurrence of potentially pathogenic *Vibrio* spp. on the southern coast of South Korea", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 83, no. 3, pp. e02680-16
- Díez, I., Muguerza, N., Santolaria, A., Ganzedo, U. & Gorostiaga, J. 2012**, "Seaweed assemblage changes in the eastern Cantabrian Sea and their potential relationship to climate change", *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, vol. 99, pp. 108-120.

- DiRita, V.J. & Mekalanos, J.J. 1991**, "Periplasmic interaction between two membrane regulatory proteins, ToxR and ToxS, results in signal transduction and transcriptional activation", *Cell*, vol. 64, no. 1, pp. 29-37.
- Doi, H., Osawa, I., Adachi, H. & Kawada, M. 2017**, "*Vibrio japonicus* sp. nov., a novel member of the *Nereis* clade in the genus *Vibrio* isolated from the coast of Japan", *PLoS One*, vol. 12, no. 2, pp. e0172164.
- Doney, S.C., Ruckelshaus, M., Duffy, J.E., Barry, J.P., Chan, F., English, C.A., Galindo, H.M., Grebmeier, J.M., Hollowed, A.B. & Knowlton, N. 2012**, "Climate change impacts on marine ecosystems". *Annual Review of Marine Science*, vol. 4, pp. 11-37.
- Dorman, C.J. 1996**, "Flexible response: DNA supercoiling, transcription and bacterial adaptation to environmental stress", *Trends in Microbiology*, vol. 4, no. 6, pp. 214-216.
- Dorsch, M., Lane, D. & Stackebrandt, E. 1992**, "Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 42, no. 1, pp. 58-63.
- Duncan, S., Glover, L.A., Killham, K. & Prosser, J.I. 1994**, "Luminescence-based detection of activity of starved and viable but nonculturable bacteria.", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 4, pp. 1308-1316.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzon, E., Caro, A., Rosa, R.D., Le Roux, F., Lautredou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., de Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachere, E. & Destoumieux-Garzon, D. 2011**, "Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 108, no. 7, pp. 2993-2998.
- Dziejman, M., Serruto, D., Tam, V.C., Sturtevant, D., Diraphat, P., Faruque, S.M., Rahman, M.H., Heidelberg, J.F., Decker, J., Li, L., Montgomery, K.T., Grills, G., Kucherlapati, R. & Mekalanos, J.J. 2005**, "Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 9, pp. 3465-3470.
- Egan, A.J. & Vollmer, W. 2013**, "The physiology of bacterial cell division", *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1277, no. 1, pp. 8-28.
- Eguchi, M., Fujiwara, E. & Miyamoto, N. 2000**, "Survival of *Vibrio anguillarum* in freshwater environments: adaptation or debilitation?", *Journal of Infection and Chemotherapy*, vol. 6, no. 2, pp. 126-129.
- Eiler, A., Gonzalez-Rey, C., Allen, S. & Bertilsson, S. 2007**, "Growth response of *Vibrio cholerae* and other *Vibrio* spp. to cyanobacterial dissolved organic matter and temperature in brackish water", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 60, no. 3, pp. 411-418.
- Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F.O. & Amann, R. 2000**, "Culturability and *In situ* abundance of pelagic bacteria from the North Sea", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 7, pp. 3044-3051.

- Escobar, L.E., Ryan, S.J., Stewart-Ibarra, A.M., Finkelstein, J.L., King, C.A., Qiao, H. & Polhemus, M.E. 2015, "A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions", *Acta Tropica*, vol. 149, pp. 202-211.
- Espinoza-Vergara, G., Hoque, M.M., McDougald, D. & Noorian, P. 2020, "The impact of protozoan predation on the pathogenicity of *Vibrio cholerae*", *Frontiers in Microbiology*, vol. 11, pp. 17.
- Fadel, H.M. & El-Lamie, M.M.M. 2019, "Vibriosis and *Aeromonas* infection in shrimp: Isolation, sequencing, and control", *International Journal of One Health*, vol. 5, pp. 38-48.
- Falcioni, T., Papa, S., Campana, R., Manti, A., Battistelli, M. & Baffone, W. 2008, "State transitions of *Vibrio parahaemolyticus* VBNC cells evaluated by flow cytometry", *Cytometry Part B: Clinical Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, vol. 74, no. 5, pp. 272-281.
- Farmer III, J. & Hickman-Brenner, F. 2006, "The genera *Vibrio* and *Photobacterium*", *The Prokaryotes*. Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackenbrandt, E. (eds), Springer, New York, USA, pp. 508-563.
- Farmer III, J., Michael Janda, J., Brenner, F.W., Cameron, D.N. & Birkhead, K.M. 2015, "*Vibrio*", *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Trujillo, M.E., Dedysh, S., DeVos, P., Hedlund, B., Kämpfer, P., Rainey, F.A., Whitman, W.B. (eds). John Wiley & Sons, New York, USA, pp. 1-79.
- Farmer, J. 2005, "Genus I. *Vibrio* Pacini 1854, 411[^]", *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. (eds). Springer, East Lansing, USA, vol. 2, pp. 494-546.
- Fenchel, T. & Harrison, P. 1976, "The significance of bacterial grazing and mineral cycling for the decomposition of particulate detritus", *The Role of Terrestrial and Aquatic Organisms in Decomposition Processes*. Anderson, J.M., Macfadyen, A. (eds), Blackwell, Oxford, UK, pp 285-299.
- Ferris, H.U., Zeth, K., Hulko, M., Dunin-Horkawicz, S. & Lupas, A.N. 2014, "Axial helix rotation as a mechanism for signal regulation inferred from the crystallographic analysis of the *E. coli* serine chemoreceptor", *Journal of Structural Biology*, vol. 186, no. 3, pp. 349-356.
- Fierer, N., Bradford, M.A. & Jackson, R.B. 2007, "Toward an ecological classification of soil bacteria", *Ecology*, vol. 88, no. 6, pp. 1354-1364.
- Figge, R.M., Divakaruni, A.V. & Gober, J.W. 2004, "MreB, the cell shape-determining bacterial actin homologue, co-ordinates cell wall morphogenesis in *Caulobacter crescentus*", *Molecular Microbiology*, vol. 51, no. 5, pp. 1321-1332.
- Fitzpatrick, F., Humphreys, H. & O'Gara, J.P. 2005, "Evidence for low temperature regulation of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*", *Journal of Medical Microbiology*, vol. 54, no. 5, pp. 509-510.

- Fuhrman, J.A. 1999**, "Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects", *Nature*, vol. 399, no. 6736, pp. 541-548.
- Fuhrman, J.A., Hewson, I., Schwalbach, M.S., Steele, J.A., Brown, M.V. & Naeem, S. 2006**, "Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 35, pp. 13104-13109.
- Gaspar, J.A., Thomas, J.A., Marolda, C.L. & Valvano, M.A. 2000**, "Surface expression of O-specific lipopolysaccharide in *Escherichia coli* requires the function of the TolA protein", *Molecular Microbiology*, vol. 38, no. 2, pp. 262-275.
- Gauthier, M.J. 2000**, "Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state", *Nonculturable microorganisms in the environment*. Colwell, R.R., Grimes, D.J. (eds). American Society for Microbiology Press, Boston, USA, pp. 87– 112.
- Gayoso, C.M., Mateos, J., Méndez, J.A., 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*", *Journal of Proteome Research*, vol. 13, no. 2, pp. 460-476.
- Gessmann, D., Chung, Y.H., Danoff, E.J., Plummer, A.M., Sandlin, C.W., Zaccai, N.R. & Fleming, K.G. 2014**, "Outer membrane beta-barrel protein folding is physically controlled by periplasmic lipid head groups and BamA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 111, no. 16, pp. 5878-5883.
- Gilbert, J.A., Field, D., Swift, P., Newbold, L., Oliver, A., Smyth, T., Somerfield, P.J., Huse, S. & Joint, I. 2009**, "The seasonal structure of microbial communities in the Western English Channel", *Environmental Microbiology*, vol. 11, no. 12, pp. 3132-3139.
- Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J. & Pace, N.R. 1988**, "Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells", *Journal of Bacteriology*, vol. 170, no. 2, pp. 720-726.
- Girard, L., Peuchet, S., Servais, P., Henry, A., Charni-Ben-Tabassi, N. & Baudart, J. 2017**, "Spatiotemporal dynamics of total viable *Vibrio* spp. in a NW Mediterranean coastal area", *Microbes and Environments*, vol. 32, no. 3, pp. 210-218.
- Giubergia, S., Machado, H., Mateiu, R.V. & Gram, L. 2016**, "*Vibrio galathea* sp. nov., a member of the family *Vibrionaceae* isolated from a mussel", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 66, no. 1, pp. 347-352.
- Giuliano, L., De Domenico, M., De Domenico, E., Höfle, M. & Yakimov, M. 1999**, "Identification of culturable oligotrophic bacteria within naturally occurring bacterioplankton communities of the Ligurian Sea by 16S rRNA sequencing and probing", *Microbial Ecology*, vol. 37, no. 2, pp. 77-85.
- Godlewska, R., Wiśniewska, K., Pietras, Z. & Jagusztyn-Krynicka, E.K. 2009**, "Peptidoglycan-associated lipoprotein (Pal) of Gram-negative bacteria: function, structure, role in

pathogenesis and potential application in immunoprophylaxis", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 298, no. 1, pp. 1-11.

- Goikoetxea, N., Borja, Á., Fontán, A., González, M. & Valencia, V. 2009**, "Trends and anomalies in sea-surface temperature, observed over the last 60 years, within the southeastern Bay of Biscay", *Continental Shelf Research*, vol. 29, no. 8, pp. 1060-1069.
- Gomez-Gil, B., Thompson, C., Matsumura, Y., Sawabe, T., Iida, T., Christen, R., Thompson, F. & Sawabe, T. 2014**, "The family *Vibrionaceae*", *The Prokaryotes*. Rosenberg, E., DeLong, E.F., Thompson, F.L., Lory, S., Stackebrandt, E. (eds). Springer, Berlin, Germany, pp. 659-747.
- Gomez-Gil, B., Thompson, F., Thompson, C. & Swings, J. 2003**, "*Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 53, no. 1, pp. 239-243.
- Gomez-Gil, B., Soto-Rodriguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vazquez-Juarez, R., Thompson, F.L. & Swings, J. 2004**, "Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms", *Microbiology*, vol. 150, no. 6, pp. 1769-1777.
- Gong, L., Takayama, K. & Kjelleberg, S. 2002**, "Role of *spoT*-dependent ppGpp accumulation in the survival of light-exposed starved bacteria", *Microbiology*, vol. 148, no. 2, pp. 559-570.
- Goo, S.Y., Lee, H.J., Kim, W.H., Han, K.L., Park, D.K., Lee, H.J., Kim, S.M., Kim, K.S., Lee, K.H. & Park, S.J. 2006**, "Identification of OmpU of *Vibrio vulnificus* as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis", *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 10, pp. 5586-5594.
- Gray, A.N., Egan, A.J., van't Veer, I.L., Verheul, J., Colavin, A., Koumoutsis, A., Biboy, J., Altelaar, A.M., Damen, M.J. & Huang, K.C. 2015**, "Coordination of peptidoglycan synthesis and outer membrane constriction during *Escherichia coli* cell division", *Elife*, vol. 4, pp. e07118.
- Grimes, D.J., Johnson, C.N., Dillon, K.S., Flowers, A.R., Noriega, N.F. & Berutti, T. 2009**, "What genomic sequence information has revealed about *Vibrio* ecology in the ocean—A review", *Microbial Ecology*, vol. 58, no. 3, pp. 447-460.
- Groat, R.G., Schultz, J., Zychlinsky, E., Bockman, A. & Matin, A. 1986**, "Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival.", *Journal of Bacteriology*, vol. 168, no. 2, pp. 486-493.
- Gronow, S. & Brade, H. 2001**, "Lipopolysaccharide biosynthesis: which steps do bacteria need to survive?", *Journal of Endotoxin Research*, vol. 7, no. 1, pp. 3-23.
- Gulig, P.A., Bourdage, K.L. & Starks, A.M. 2005**, "Molecular pathogenesis of *Vibrio vulnificus*", *The Journal of Microbiology*, vol. 43, no. 1, pp. 118-131.

- Guo, Z., Li, W., Wang, Y., Hou, Q., Zhao, H., Sun, Z. & Zhang, Z. 2019**, "*Vibrio zhupei* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from pickling sauce", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 69, no. 5, pp. 1313-1319.
- Gupte, A.R., De Rezende, C.L. & Joseph, S.W. 2003**, "Induction and resuscitation of viable but nonculturable *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 69, no. 11, pp. 6669-6675.
- Hahn, M.W. & Höfle, M.G. 2001**, "Grazing of protozoa and its effect on populations of aquatic bacteria", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 35, no. 2, pp. 113-121.
- Häkkinen, S. 2002**, "Surface salinity variability in the northern North Atlantic during recent decades", *Journal of Geophysical Research: Oceans*, vol. 107, no. C12, pp. SRF 4-1-SRF 4-12.
- Hall, B.G. 1988**, "Adaptive evolution that requires multiple spontaneous mutations. I. Mutations involving an insertion sequence", *Genetics*, vol. 120, no. 4, pp. 887-897.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P. 2004**, "Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases", *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, no. 2, pp. 95-108.
- Hamed, S.B., Ranzani-Paiva, M.J.T., Tachibana, L., de Carla Dias, D., Ishikawa, C.M. & Esteban, M.A. 2018**, "Fish pathogen bacteria: adhesion, parameters influencing virulence and interaction with host cells", *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 80, pp. 550-562.
- Hansen, J., Sato, M., Ruedy, R., Lo, K., Lea, D.W. & Medina-Elizade, M. 2006**, "Global temperature change", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, no. 39, pp. 14288-14293.
- Harwani, D. 2013**, "The great plate count anomaly and the unculturable bacteria", *Microbiology*, vol. 2, no. 9, pp. 350-351.
- Harwood, V.J., Gandhi, J.P. & Wright, A.C. 2004**, "Methods for isolation and confirmation of *Vibrio vulnificus* from oysters and environmental sources: a review", *Journal of Microbiological Methods*, vol. 59, no. 3, pp. 301-316.
- Häse, C.C. & Barquera, B. 2001**, "Role of sodium bioenergetics in *Vibrio cholerae*", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 1505, no. 1, pp. 169-178.
- Hasegawa, H., Lind, E.J., Boin, M.A. & Hase, C.C. 2008**, "The extracellular metalloprotease of *Vibrio tubiashii* is a major virulence factor for pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 13, pp. 4101-4110.
- Hashizume, T., Sanada, M., Nakagawa, S. & Tanaka, N. 1993**, "Alteration in expression of *Serratia marcescens* porins associated with decreased outer membrane permeability", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 31, no. 1, pp. 21-28.

- Hauksson, J.B., Andrésón, Ó.S. & Ásgeirsson, B. 2000, "Heat-labile bacterial alkaline phosphatase from a marine *Vibrio* sp.", *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 27, no. 1-2, pp. 66-73.
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D. & Umayam, L. 2000, "DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*", *Nature*, vol. 406, no. 6795, pp. 477-483.
- Heidelberg, J.F., Heidelberg, K.B. & Colwell, R.R. 2002, "Bacteria of the gamma-subclass *Proteobacteria* associated with zooplankton in Chesapeake Bay", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 11, pp. 5498-5507.
- Heim, S., Lleo, M., Bonato, B., Guzman, C.A. & Canepari, P. 2002, "The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis", *Journal of Bacteriology*, vol. 184, no. 23, pp. 6739-6745.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R.C. & Ala'Aldeen, D. 2004, "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 68, no. 4, pp. 692-744.
- Hendry, T.A. & Dunlap, P.V. 2011, "The uncultured luminous symbiont of *Anomalops katoptron* (Beryciformes: Anomalopidae) represents a new bacterial genus", *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 61, no. 3, pp. 834-843.
- Henikoff, S., Haughn, G.W., Calvo, J.M. & Wallace, J.C. 1988, "A large family of bacterial activator proteins", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 18, pp. 6602-6606.
- Henke, J.M. & Bassler, B.L. 2004a, "Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*", *Journal of Bacteriology*, vol. 186, no. 12, pp. 3794-3805.
- Henke, J.M. & Bassler, B.L. 2004b, "Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*", *Journal of Bacteriology*, vol. 186, no. 20, pp. 6902-6914.
- Hernández, C., Ulloa, J., Vergara, J.A., Espejo, R. & Cabello, F. 2005, "Infecciones por *Vibrio parahaemolyticus* e intoxicaciones por algas: problemas emergentes de salud pública en Chile", *Revista Médica de Chile*, vol. 133, no. 9, pp. 1081-1088.
- Hernroth, B., Lothigius, Å. & Bölin, I. 2009, "Factors influencing survival of enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* (serovar Typhimurium) and *Vibrio parahaemolyticus* in marine environments", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 71, no. 2, pp. 272-280.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Parsek, M.R. & Peterson, S.B. 2010, "Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle", *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 1, pp. 15-25.

- Hobbie, J.E., Daley, R.J. & Jasper, S. 1977**, "Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 33, no. 5, pp. 1225-1228.
- Holmes, B., Willcox, W.R. & Lapage, S.P. 1978**, "Identification of *Enterobacteriaceae* by the API 20E system", *Journal of Clinical Pathology*, vol. 31, no. 1, pp. 22-30.
- Holmquist, L. & Kjelleberg, S. 1993**, "Changes in viability, respiratory activity and morphology of the marine *Vibrio* sp. strain S14 during starvation of individual nutrients and subsequent recovery", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 12, no. 4, pp. 215-223.
- Höltje, J.V. 1998**, "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 62, no. 1, pp. 181-203.
- Hoshino, T., Yilmaz, L.S., Noguera, D.R., Daims, H. & Wagner, M. 2008**, "Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 16, pp. 5068-5077.
- Houghton, J., Dingis, Y., Griggs, D.J., Noguera, M., van der Linden, P.J., Daiis, X., Maskellis, K. & Johnson, C.A. 2001**, "Climate change 2001: The scientific basis". Disponible en <https://www.ipcc.ch/report/ar3/wg1/> [actualización continua; citado 6 abril 2020]
- Huehn, S., Eichhorn, C., Urmersbach, S., Breidenbach, J., Bechlars, S., Bier, N., Alter, T., Bartelt, E., Frank, C. & Oberheitmann, B. 2014**, "Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany", *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 304, no. 7, pp. 843-850.
- Huggett, M.J., Crocetti, G.R., Kjelleberg, S. & Steinberg, P.D. 2008**, "Recruitment of the sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* and the distribution and abundance of inducing bacteria in the field", *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 53, no. 2, pp. 161-171.
- Hughes, L. 2000**, "Biological consequences of global warming: is the signal already apparent?", *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 15, no. 2, pp. 56-61.
- Huq, A., West, P.A., Small, E.B., Huq, M.I. & Colwell, R.R. 1984**, "Influence of water temperature, salinity, and pH on survival and growth of toxigenic *Vibrio cholerae* serovar 01 associated with live copepods in laboratory microcosms", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 48, no. 2, pp. 420-424.
- Iida, T. & Honda, T. 1997**, "Hemolysins produced by vibrios", *Journal of Toxicology: Toxin Reviews*, vol. 16, no. 4, pp. 215-227.
- Ishigaki, T. & Sleigh, M. 2001**, "Grazing characteristics and growth efficiencies at two different temperatures for three nanoflagellates fed with *Vibrio* bacteria at three different concentrations", *Microbial Ecology*, vol. 41, no 3, pp. 264-271.
- Ito, K. & Akiyama, Y. 2005**, "Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FtsH protease", *Annual Review of Microbiology*, vol. 59, pp. 211-231.

- Izumiya, H., Furukawa, M., Ogata, K., Isobe, J., Watanabe, S., Sasaki, M., Ichinose, K., Arakawa, E., Morita, M. & Kurane, I. 2017, "A double-quadratic model for predicting *Vibrio* species in water environments of Japan", *Archives of Microbiology*, vol. 199, no. 9, pp. 1293-1302.
- Jaan, A.J., Dahllof, B. & Kjelleberg, S. 1986, "Changes in protein composition of three bacterial isolates from marine waters during short periods of energy and nutrient deprivation", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 52, no. 6, pp. 1419-1421.
- Jacquet, S., Miki, T., Noble, R., Peduzzi, P. & Wilhelm, S. 2010, "Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology", *Advances in Oceanography and Limnology*, vol. 1, no. 1, pp. 97-141.
- Janda, J.M. & Abbott, S.L. 2007, "16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 9, pp. 2761-2764.
- Janda, J.M., Newton, A.E. & Bopp, C.A. 2015, "Vibriosis", *Clinics in Laboratory Medicine*, vol. 35, no. 2, pp. 273-288.
- Jannasch, H.W. & Jones, G.E. 1959, "Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration 1", *Limnology and Oceanography*, vol. 4, no. 2, pp. 128-139.
- Jia, J., Li, Z., Cao, J., Jiang, Y., Liang, C. & Liu, M. 2013, "Proteomic analysis of protein expression in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio harveyi* SF1", *Current Microbiology*, vol. 67, no. 4, pp. 442-447.
- Jiang, X. & Chai, T.J. 1996, "Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 4, pp. 1300-1305.
- Johnson, C.N. 2013, "Fitness factors in vibrios: a mini-review", *Microbial Ecology*, vol. 65, no. 4, pp. 826-851.
- Johnson, K.S., Gordon, R.M. & Coale, K.H. 1997, "What controls dissolved iron concentrations in the world ocean?", *Marine Chemistry*, vol. 57, no. 3-4, pp. 137-161.
- Johnson, T.L., Abendroth, J., Hol, W.G. & Sandkvist, M. 2006, "Type II secretion: from structure to function", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 255, no. 2, pp. 175-186.
- Johnson, C.N. 2015, "Influence of environmental factors on *Vibrio* spp. in coastal ecosystems", *Microbiology Spectrum*, vol. 3, no. 3, pp. VE-0008-2014.
- Johnston, M. & Brown, M. 2002, "An investigation into the changed physiological state of *Vibrio* bacteria as a survival mechanism in response to cold temperatures and studies on their sensitivity to heating and freezing", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, no. 6, pp. 1066-1077.

- Jones, M.K. & Oliver, J.D. 2009, "*Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis", *Infection and Immunity*, vol. 77, no. 5, pp. 1723-1733.
- Jones, P.G., VanBogelen, R.A. & Neidhardt, F.C. 1987, "Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*", *Journal of Bacteriology*, vol. 169, no. 5, pp. 2092-2095.
- Josic, D., Clifton, J.G., Kovac, S. & Hixson, D.C. 2008, "Membrane proteins as diagnostic biomarkers and targets for new therapies", *Current Opinion in Molecular Therapeutics*, vol. 10, no. 2, pp. 116-123.
- Joux, F., Lebaron, P. & Troussellier, M. 1997, "Succession of cellular states in a *Salmonella typhimurium* population during starvation in artificial seawater microcosms", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 22, no. 1, pp. 65-76.
- Jürgens, K. & Matz, C. 2002, "Predation as a shaping force for the phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria", *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 81, no. 1-4, pp. 413-434.
- Jürgens, K. & Sala, M.M. 2000, "Predation-mediated shifts in size distribution of microbial biomass and activity during detritus decomposition", *Oikos*, vol. 91, no. 1, pp. 29-40.
- Kaberdin, V.R., Montánchez, I., Parada, C., Orruño, M., Arana, I. & Barcina, I. 2015, "Unveiling the metabolic pathways associated with the adaptive reduction of cell size during *Vibrio harveyi* persistence in seawater microcosms", *Microbial Ecology*, vol. 70, no. 3, pp. 689-700.
- Kaneko, T. & Colwell, R.R. 1973, "Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay", *Journal of Bacteriology*, vol. 113, no. 1, pp. 24-32.
- Kao, D., Cheng, Y., Kuo, T., Lin, S., Lin, C., Chow, L. & Chen, W. 2009, "Salt-responsive outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* serotype O1 as revealed by comparative proteome analysis", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 106, no. 6, pp. 2079-2085.
- Karatan, E., Saulmon, M.M., Bunn, M.W. & Ordal, G.W. 2001, "Phosphorylation of the response regulator CheV is required for adaptation to attractants during *Bacillus subtilis* chemotaxis", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 47, pp. 43618-43626.
- Karunasagar, I., Otta, S. & Karunasagar, I. 1996, "Biofilm formation by *Vibrio harveyi* on surfaces", *Aquaculture*, vol. 140, no. 3, pp. 241-245.
- Karunasagar, I., Venugopal, M.N., Karunasagar, I. & Segar, K. 1986, "Evaluation of methods for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 52, no. 3, pp. 583-585.
- Kaspar, C.W. & Tamplin, M.L. 1993, "Effects of temperature and salinity on the survival of *Vibrio vulnificus* in seawater and shellfish", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 59, no. 8, pp. 2425-2429.

- Kehoe, S., Barer, M., Devlin, L. & McGuigan, K. 2004**, "Batch process solar disinfection is an efficient means of disinfecting drinking water contaminated with *Shigella dysenteriae* type I", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 38, no. 5, pp. 410-414.
- Kihara, A., Akiyama, Y. & Ito, K. 1998**, "Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA", *Journal of Molecular Biology*, vol. 279, no. 1, pp. 175-188.
- Kihara, A., Akiyama, Y. & Ito, K. 1996**, "A protease complex in the *Escherichia coli* plasma membrane: HflKC (HflA) forms a complex with FtsH (HflB), regulating its proteolytic activity against SecY", *The EMBO Journal*, vol. 15, no. 22, pp. 6122-6131.
- Kim, M.S. & Do Jeong, H. 2001**, "Development of 16S rRNA targeted PCR methods for the detection and differentiation of *Vibrio vulnificus* in marine environments", *Aquaculture*, vol. 193, no. 3-4, pp. 199-211.
- Kirchhoff, C. & Cypionka, H. 2017**, "Propidium ion enters viable cells with high membrane potential during live-dead staining", *Journal of Microbiological Methods*, vol. 142, pp. 79-82.
- Kjelleberg, S. & Hermansson, M. 1984**, "Starvation-induced effects on bacterial surface characteristics", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 48, no. 3, pp. 497-503.
- Kjelleberg, S., Humphrey, B.A. & Marshall, K.C. 1982**, "Effect of interfaces on small, starved marine bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 43, no. 5, pp. 1166-1172.
- Koebnik, R., Locher, K.P. & Van Gelder, P. 2000**, "Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell", *Molecular Microbiology*, vol. 37, no. 2, pp. 239-253.
- Kokashvili, T., Whitehouse, C.A., Tskhvediani, A., Grim, C.J., Elbakidze, T., Mitaishvili, N., Janelidze, N., Jaiani, E., Haley, B.J. & Lashkhi, N. 2015**, "Occurrence and diversity of clinically important *Vibrio* species in the aquatic environment of Georgia", *Frontiers in Public Health*, vol. 3, pp. 232.
- Kolling, G.L. & Matthews, K.R. 2001**, "Examination of recovery in vitro and in vivo of nonculturable *Escherichia coli* O157:H7", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 9, pp. 3928-3933.
- Koronakis, V., Sharff, A., Koronakis, E., Luisi, B. & Hughes, C. 2000**, "Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export", *Nature*, vol. 405, no. 6789, pp. 914-919.
- Kozakiewicz, J., Gajewska, M., Łyżeń, R., Czyż, A., & Węgrzyn, G. 2005**, "Bioluminescence-mediated stimulation of photoreactivation in bacteria", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 250, no. 1, pp. 105-110.

- Kramer, A., Schwebke, I. & Kampf, G. 2006**, "How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review", *BMC Infectious Diseases*, vol. 6, no. 1, pp. 130.
- Kruse, T., Møller-Jensen, J., Løbner-Olesen, A. & Gerdes, K. 2003**, "Dysfunctional MreB inhibits chromosome segregation in *Escherichia coli*", *The EMBO Journal*, vol. 22, no. 19, pp. 5283-5292.
- Kubota, K. 2013**, "CARD-FISH for environmental microorganisms: technical advancement and future applications", *Microbes and Environments*, vol. 28, no. 1, pp. 3-12.
- Kumar, Y., Westram, R., Behrens, S., Fuchs, B., Glöckner, F.O., Amann, R., Meier, H. & Ludwig, W. 2005**, "Graphical representation of ribosomal RNA probe accessibility data using ARB software package", *BMC Bioinformatics*, vol. 6, no. 1, pp. 61.
- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A. & Nyström, T. 2003**, "The bacterial universal stress protein: function and regulation", *Current Opinion in Microbiology*, vol. 6, no. 2, pp. 140-145.
- Lai, C., Chen, S., Lin, I., Chang, C. & Wong, H. 2009**, "Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 135, no. 2, pp. 118-124.
- Landini, P. 2009**, "Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*", *Research in Microbiology*, vol. 160, no. 4, pp. 259-266.
- Laskowski-Arce, M.A. & Orth, K. 2008**, "*Acanthamoeba castellanii* promotes the survival of *Vibrio parahaemolyticus*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 23, pp. 7183-7188.
- Laurencin, F.B. & Germon, E. 1987**, "Experimental infection of rainbow trout, *Salmo gairdneri* R., by dipping in suspensions of *Vibrio anguillarum*: ways of bacterial penetration; influence of temperature and salinity", *Aquaculture*, vol. 67, no. 1-2, pp. 203-205.
- Lazar, S.W. & Kolter, R. 1996**, "SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins", *Journal of Bacteriology*, vol. 178, no. 6, pp. 1770-1773.
- Lazzaroni, J.C., Germon, P., Ray, M. & Vianney, A. 1999**, "The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the uptake of biomolecules and outer membrane stability", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 177, no. 2, pp. 191-197.
- Lee, C., Cheng, M., Yu, M. & Pan, M. 2002**, "Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 209, no. 1, pp. 31-37.
- Lesser, M.P. 2006**, "Oxidative stress in marine environments: biochemistry and physiological ecology", *Annual Review of Physiology*, vol. 68, pp. 253-278.
- Levy, S. 1988**, "Tetracycline resistance determinants are widespread.", *ASM News*, vol. 54, pp. 418-421.

- Levy, S.B., McMurry, L.M., Barbosa, T.M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M.C., Rood, J.I. & Taylor, D.E. 1999**, "Nomenclature for new tetracycline resistance determinants", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 43, no. 6, pp. 1523-1524.
- Li, B., Li, Y., Liu, R., Xue, C., Zhu, X., Tian, X., Wang, X., Liang, J., Zheng, Y. & Zhang, X. 2020**, "*Vibrio ouci* sp. nov. and *Vibrio aquaticus* sp. nov., two marine bacteria isolated from the East China Sea", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 70, no. 1, pp. 172-179.
- Li, C., Wang, N., Zhou, L., Wang, X., Chen, G. & Du, Z. 2019**, "*Vibrio albus* sp. nov., isolated from marine sediment", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 69, no. 7, pp. 1919-1925.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D. & Faucher, S.P. 2014**, "The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens", *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, pp. 258.
- Lilley, B.N. & Bassler, B.L. 2000**, "Regulation of quorum sensing in *Vibrio harveyi* by LuxO and sigma-54", *Molecular Microbiology*, vol. 36, no. 4, pp. 940-954.
- Lin, L., Lin, G., Wang, Z., Tseng, Y. & Yu, M. 2015**, "Differential expression of catalases in *Vibrio parahaemolyticus* under various stress conditions", *Research in Microbiology*, vol. 166, no. 8, pp. 601-608.
- Lipovsky, A., Nitzan, Y. & Lubart, R. 2008**, "A possible mechanism for visible light-induced wound healing", *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, vol. 40, no. 7, pp. 509-514.
- Llamas, M.A., Ramos, J.L. & Rodriguez-Herva, J.J. 2000**, "Mutations in each of the *tol* genes of *Pseudomonas putida* reveal that they are critical for maintenance of outer membrane stability", *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 17, pp. 4764-4772.
- Lleo, M., Bonato, B., Tafi, M., Signoretto, C., Boaretti, M. & Canepari, P. 2001**, "Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 91, no. 6, pp. 1095-1102.
- Lotz, M.J., Tamplin, M.L. & Rodrick, G.E. 1983**, "Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agar and its selectivity for clinical and marine *Vibrio* organisms", *Annals of Clinical and Laboratory Science*, vol. 13, no. 1, pp. 45-48.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951**, "Protein measurement with the Folin phenol reagent.", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, pp. 265-275.
- Lubart, R., Lipovski, A., Nitzan, Y. & Friedmann, H. 2011**, "A possible mechanism for the bactericidal effect of visible light", *Laser Therapy*, vol. 20, no. 1, pp. 17-22.
- Luirink, J., Heijne, G.v., Houben, E. & Gier, J.d. 2005**, "Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*", *Annual Review of Microbiology*, vol. 59, pp. 329-355.

- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S. & McDougald, D. 2013, "Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*", *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, pp. 375.
- Łyzen, R. & Wegrzyn, G. 2005, "Sensitivity of dark mutants of various strains of luminescent bacteria to reactive oxygen species", *Archives of Microbiology*, vol. 183, no. 3, pp. 203-208.
- MacDonell, M.T., Singleton, F.L. & Hood, M.A. 1982, "Diluent composition for use of API 20E in characterizing marine and estuarine bacteria", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 44, no. 2, pp. 423-427.
- Machado, A. & Bordalo, A. 2014, "Diversity and dynamics of the *Vibrio* community in well water used for drinking in Guinea-Bissau (West Africa)", *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 186, no. 9, pp. 5697-5709.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. & Stahl, D. (eds). 2015, "*Brock. Biología de los Microorganismos*". 14 ed. Pearson. New York, USA.
- Magarinos, B., Romalde, J., Cid, A. & Toranzo, A. 1997, "Viability of starved *Pasteurella piscicida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 24, no. 2, pp. 122-126.
- Mahoney, J.C., Gerding, M.J., Jones, S.H. & Whistler, C.A. 2010, "Comparison of the pathogenic potentials of environmental and clinical *Vibrio parahaemolyticus* strains indicates a role for temperature regulation in virulence", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 76, no. 22, pp. 7459-7465.
- Makino, K., Oshima, K., Kurokawa, K., Yokoyama, K., Uda, T., Tagomori, K., Iijima, Y., Najima, M., Nakano, M. & Yamashita, A. 2003, "Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae*", *The Lancet*, vol. 361, no. 9359, pp. 743-749.
- Malara, D., Mielke, C., Oelgemöller, M., Senge, M.O. & Heimann, K. 2017, "Sustainable water treatment in aquaculture—photolysis and photodynamic therapy for the inactivation of *Vibrio* species", *Aquaculture Research*, vol. 48, no. 6, pp. 2954-2962.
- Manefield, M., Harris, L., Rice, S.A., de Nys, R. & Kjelleberg, S. 2000, "Inhibition of luminescence and virulence in the black tiger prawn (*Penaeus monodon*) pathogen *Vibrio harveyi* by intercellular signal antagonists", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 5, pp. 2079-2084.
- Mao, D., Zhou, Q., Chen, C. & Quan, Z. 2012, "Coverage evaluation of universal bacterial primers using the metagenomic datasets", *BMC Microbiology*, vol. 12, no. 1, pp. 66.
- Marco-Noales, E., Biosca, E.G. & Amaro, C. 1999, "Effects of salinity and temperature on long-term survival of the eel pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2 (serovar E)", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, no. 3, pp. 1117-1126.

- Marsh, J.W., Sun, D. & Taylor, R.K. 1996**, "Physical linkage of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin secretory and structural subunit gene loci: identification of the *mshG* coding sequence", *Infection and Immunity*, vol. 64, no. 2, pp. 460-465.
- Martín, A., Béjar, V., Gutiérrez, J., Llagostera, M. & Quesada, E. (eds). 2018**, "*Microbiología esencial*". Panamericana, México DF, México.
- Martínez-Rienda, M.I., Alkorta-Gurrutxaga, M., López-Soria, L., Hernández-Almaraz, J.L. & Elorriaga, L.F. 2007**, "Infección por *Vibrio vulnificus* en las costas cantábricas", *Gaceta Médica de Bilbao*, vol. 104, no. 1, pp. 27-29.
- Martinez-Urtaza, J., Bowers, J.C., Trinanes, J. & DePaola, A. 2010**, "Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses", *Food Research International*, vol. 43, no. 7, pp. 1780-1790.
- Martinez-Urtaza, J., Lozano-Leon, A., Varela-Pet, J., Trinanes, J., Pazos, Y. & Garcia-Martin, O. 2008**, "Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 1, pp. 265-274.
- Martinez-Urtaza, J., Simental, L., Velasco, D., DePaola, A., Ishibashi, M., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., Carrera-Flores, D., Rey-Alvarez, C. & Pousa, A. 2005**, "Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe", *Emerging infectious diseases*, vol. 11, no. 8, pp. 1319-1320.
- Mascher, T., Helmann, J.D. & Unden, G. 2006**, "Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases", *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, vol. 70, no. 4, pp. 910-938.
- Massana, R., Gasol, J.M., Bjørnsen, P.K., Blackburn, N., Hagstrøm, Å., Hietanen, S., Hygum, B.H., Kuparinen, J. & Pedrós-Alió, C. 1997**, "Measurement of bacterial size via image analysis of epifluorescence preparations: description of an inexpensive system and solutions to some of the most common problems". *Scientia Marina*, vol. 61, no. 3, pp. 397-407.
- Mazza, P., Noens, E.E., Schirner, K., Grantcharova, N., Mommaas, A.M., Koerten, H.K., Muth, G., Flärdh, K., Van Wezel, G.P. & Wohlleben, W. 2006**, "MreB of *Streptomyces coelicolor* is not essential for vegetative growth but is required for the integrity of aerial hyphae and spores", *Molecular Microbiology*, vol. 60, no. 4, pp. 838-852.
- McDougald, D. & Kjelleberg, S. 2006**, "Adaptive responses of Vibrios" *The Biology of Vibrios*. Thompson, F., Austin, B., Swings, J. (eds), American Society of Microbiology, Washington DC, USA, pp. 133-155.
- Meier, W.N., Hovelsrud, G.K., Van Oort, B.E., Key, J.R., Kovacs, K.M., Michel, C., Haas, C., Granskog, M.A., Gerland, S. & Perovich, D.K. 2014**, "Arctic sea ice in transformation: A review of recent observed changes and impacts on biology and human activity", *Reviews of Geophysics*, vol. 52, no. 3, pp. 185-217.
- Mendez, B., Tachibana, C. & Levy, S.B. 1980**, "Heterogeneity of tetracycline resistance determinants", *Plasmid*, vol. 3, no. 2, pp. 99-108.

- Meng, Y., Liu, H., Zhou, Y., Cai, M. & Kang, Y. 2018**, "*Vibrio gangliei* sp. nov., a novel member of *Vibrionaceae* isolated from sawdust in a pigpen", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 68, no. 6, pp. 1969-1974.
- Merdanovic, M., Clausen, T., Kaiser, M., Huber, R. & Ehrmann, M. 2011**, "Protein quality control in the bacterial periplasm", *Annual Review of Microbiology*, vol. 65, pp. 149-168.
- Mey, A.R., Wyckoff, E.E., Kanukurthy, V., Fisher, C.R. & Payne, S.M. 2005**, "Iron and fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of *fur* in virulence", *Infection and Immunity*, vol. 73, no. 12, pp. 8167-8178.
- Miller, V.L., Taylor, R.K. & Mekalanos, J.J. 1987**, "Cholera toxin transcriptional activator ToxR is a transmembrane DNA binding protein", *Cell*, vol. 48, no. 2, pp. 271-279.
- Miller, V.L., DiRita, V.J. & Mekalanos, J.J. 1989**, "Identification of *toxS*, a regulatory gene whose product enhances ToxR-mediated activation of the cholera toxin promoter", *Journal of Bacteriology*, vol. 171, no. 3, pp. 1288-1293.
- Milton, D.L. 2006**, "Quorum sensing in vibrios: complexity for diversification", *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 296, no. 2-3, pp. 61-71.
- Mitterer, F., Pombo, J.P. & Schild, S. 2020**, "*Vibrio cholerae* released by protozoa are hyperinfectious", *Trends in Microbiology*, vol. 28, no. 1, pp. 4-6.
- Mizuno, T., Debnath, A. & Miyoshi, S. 2019**, "Hemolysin of *Vibrio* Species" in *Microorganisms*. Blumenberg, M., Shaaban, M., Elgaml, A. (eds). IntechOpen. London, UK, pp. 87-107
- Mok, K.C., Wingreen, N.S. & Bassler, B.L. 2003**, "*Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincidence detector for two autoinducers controls gene expression", *The EMBO Journal*, vol. 22, no. 4, pp. 870-881.
- Molloy, M.P., Herbert, B.R., Slade, M.B., Rabilloud, T., Nouwens, A.S., Williams, K.L. & Gooley, A.A. 2000**, "Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane", *European Journal of Biochemistry*, vol. 267, no. 10, pp. 2871-2881.
- Montánchez, I., Arana, I., Parada, C., Garaizabal, I., Orruño, M., Barcina, I. & Kaberdin, V.R. 2014**, "Reprogramming of *Vibrio harveyi* gene expression during adaptation in cold seawater", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 87, no. 1, pp. 193-203.
- Montánchez, I., Ogayar, E., Plágaro, A.H., Esteve-Codina, A., Gómez-Garrido, J., Orruño, M., Arana, I. & Kaberdin, V.R. 2019**, "Analysis of *Vibrio harveyi* adaptation in sea water microcosms at elevated temperature provides insights into the putative mechanisms of its persistence and spread in the time of global warming", *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, pp. 1-12.
- Moreno, R. & Rojo, F. 2013**, "The contribution of proteomics to the unveiling of the survival strategies used by *Pseudomonas putida* in changing and hostile environments", *Proteomics*, vol. 13, no. 18-19, pp. 2822-2830.

- Moreno, Y., Arias, C., Meier, H., Garay, E. & Aznar, R. 1999**, "In situ analysis of the bacterial communities associated to farmed eel by whole-cell hybridization", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 29, no. 3, pp. 160-165.
- Morita, R. 1990**, "The starvation-survival state of microorganisms in nature and its relationship to the bioavailable energy", *Experientia*, vol. 46, no. 8, pp. 813-817.
- Morris Jr, J.G. & Acheson, D. 2003**, "Cholera and other types of vibriosis: a story of human pandemics and oysters on the half shell", *Clinical Infectious Diseases*, vol. 37, no. 2, pp. 272-280.
- Morris, R.M., Vergin, K.L., Cho, J., Rappé, M.S., Carlson, C.A. & Giovannoni, S.J. 2005**, "Temporal and spatial response of bacterioplankton lineages to annual convective overturn at the Bermuda Atlantic Time-series Study site", *Limnology and Oceanography*, vol. 50, no. 5, pp. 1687-1696.
- Morris, G.K., Merson, M.H., Huq, I., Kibrya, A.K. & Black, R. 1979**, "Comparison of four plating media for isolating *Vibrio cholerae*", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 9, no. 1, pp. 79-83.
- Muela, A., Garcia-Bringas, J., Arana, I. & Barcina, I. 2000**, "The effect of simulated solar radiation on *Escherichia coli*: the relative roles of UV-B, UV-A, and photosynthetically active radiation", *Microbial Ecology*, vol. 39, no. 1, pp. 65-71.
- Muela, A., Garcia-Bringas, J., Seco, C., Arana, I. & Barcina, I. 2002**, "Participation of oxygen and role of exogenous and endogenous sensitizers in the photoinactivation of *Escherichia coli* by photosynthetically active radiation, UV-A and UV-B", *Microbial Ecology*, vol. 44, no. 4, pp. 354-364.
- Mykkestad, S.M. 2000**, "Dissolved organic carbon from phytoplankton" *Marine Chemistry*. Wangersky, P.J. (ed). Springer, Berlin, Germany, pp. 111-148.
- Nagpal, M.L., Fox, K.F. & Fox, A. 1998**, "Utility of 16S–23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms?", *Journal of Microbiological Methods*, vol. 33, no. 3, pp. 211-219.
- Naka, H. & Crosa, J.H. 2011**, "Genetic determinants of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*", *Fish Pathology*, vol. 46, no. 1, pp. 1-10.
- Naka, H., Dias, G.M., Thompson, C.C., Dubay, C., Thompson, F.L. & Crosa, J.H. 2011**, "Complete genome sequence of the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum* harboring the pJM1 virulence plasmid and genomic comparison with other virulent strains of *V. anguillarum* and *V. ordalii*", *Infection and Immunity*, vol. 79, no. 7, pp. 2889-2900.
- Nakahashi, M., Mawatari, K., Hirata, A., Maetani, M., Shimohata, T., Uebanso, T., Hamada, Y., Akutagawa, M., Kinouchi, Y. & Takahashi, A. 2014**, "Simultaneous irradiation with different wavelengths of ultraviolet light has synergistic bactericidal effect on *Vibrio parahaemolyticus*", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 90, no. 6, pp. 1397-1403.

- Nakayama, H., Kurokawa, K. & Lee, B.L. 2012**, "Lipoproteins in bacteria: structures and biosynthetic pathways", *The FEBS Journal*, vol. 279, no. 23, pp. 4247-4268.
- Nakayama, T., Ito, E., Nomura, N., Nomura, N. & Matsumura, M. 2006**, "Comparison of *Vibrio harveyi* strains isolated from shrimp farms and from culture collection in terms of toxicity and antibiotic resistance", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 258, no. 2, pp. 194-199.
- Nakhamchik, A., Wilde, C. & Rowe-Magnus, D.A. 2008**, "Cyclic-di-GMP regulates extracellular polysaccharide production, biofilm formation, and rugose colony development by *Vibrio vulnificus*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 74, no. 13, pp. 4199-4209.
- Narberhaus, F., Obrist, M., Führer, F. & Langklotz, S. 2009**, "Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents", *Research in Microbiology*, vol. 160, no. 9, pp. 652-659.
- Natale, P., Brüser, T. & Driessen, A.J. 2008**, "Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane—distinct translocases and mechanisms", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1778, no. 9, pp. 1735-1756.
- Neogi, S.B., Lara, R., Alam, M., Harder, J., Yamasaki, S. & Colwell, R.R. 2018**, "Environmental and hydroclimatic factors influencing *Vibrio* populations in the estuarine zone of the Bengal delta", *Environmental Monitoring and Assessment*, vol. 190, no. 10, pp. 565.
- Nerem, R.S., Leuliette, E. & Cazenave, A. 2006**, "Present-day sea-level change: A review", *Comptes Rendus Geoscience*, vol. 338, no. 14-15, pp. 1077-1083.
- Nicholls, R.J. & Cazenave, A. 2010**, "Sea-level rise and its impact on coastal zones", *Science*, vol. 328, no. 5985, pp. 1517-1520.
- Nikaido, H. 2003**, "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 67, no. 4, pp. 593-656.
- Nikaido, H. & Vaara, M. 1985**, "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability", *Microbiological Reviews*, vol. 49, no. 1, pp. 1-32.
- Nilsson, L., Oliver, J.D. & Kjelleberg, S. 1991**, "Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state", *Journal of Bacteriology*, vol. 173, no. 16, pp. 5054-5059.
- Noguerola, I. & Blanch, A. 2008**, "Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 105, no. 1, pp. 175-185.
- Nowakowska, J. & Oliver, J.D. 2013**, "Resistance to environmental stresses by *Vibrio vulnificus* in the viable but nonculturable state", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 84, no. 1, pp. 213-222.
- Nyström, T., Albertson, N.H., Flärdh, K. & Kjelleberg, S. 1990**, "Physiological and molecular adaptation to starvation and recovery from starvation by the marine *Vibrio* sp. S14", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 74, no. 2-3, pp. 129-140.

- Oberbeckmann, S., Fuchs, B.M., Meiners, M., Wichels, A., Wiltshire, K.H. & Gerdtts, G. 2012**, "Seasonal dynamics and modeling of a *Vibrio* community in coastal waters of the North Sea", *Microbial Ecology*, vol. 63, no. 3, pp. 543-551.
- Oberbeckmann, S., Wichels, A., Wiltshire, K.H. & Gerdtts, G. 2011**, "Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus* in the German Bight over a seasonal cycle", *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 100, no. 2, pp. 291-307.
- O'Brien, C.H. & Sizemore, R.K. 1979**, "Distribution of the luminous bacterium *Beneckeia harveyi* in a semitropical estuarine environment", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 38, no. 5, pp. 928-933.
- Oliver, J.D. 2016**, "The viable but nonculturable state for bacteria: status update", *Microbe*, vol. 11, no. 4, pp. 159-164.
- Oliver, J.D. 2010**, "Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria", *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 34, no. 4, pp. 415-425.
- Oliver, J.D. 2005**, "The viable but nonculturable state in bacteria", *The Journal of Microbiology*, vol. 43, no. 1, pp. 93-100.
- Oliver, J.D. & Bockian, R. 1995**, "In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 7, pp. 2620-2623.
- Oliver, J.D. 2015**, "The biology of *Vibrio vulnificus*", *Microbiology Spectrum*, vol. 3, no. 3, pp. VE-0001-2014.
- Oliver, J.D., Hite, F., McDougald, D., Andon, N.L. & Simpson, L.M. 1995**, "Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estuarine environment", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 7, pp. 2624-2630.
- Oliver, J.D., Nilsson, L. & Kjelleberg, S. 1991**, "Formation of nonculturable *Vibrio vulnificus* cells and its relationship to the starvation state", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 9, pp. 2640-2644.
- Onarinde, B.A. & Dixon, R.A. 2018**, "Prospects for biocontrol of *Vibrio parahaemolyticus* contamination in blue mussels (*Mytilus edulus*)—a year-long study", *Frontiers in Microbiology*, vol. 9, pp. 1043.
- Orruño, M., Kaberdin, V. & Arana, I. 2017**, "Survival strategies of *Escherichia coli* and *Vibrio* spp.: contribution of the viable but nonculturable phenotype to their stress-resistance and persistence in adverse environments", *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 33, no. 3, pp. 45.
- Orruño, M., Parada, C., Ogayar, E., Kaberdin, V.R. & Arana, I. 2019**, "Effects of abiotic and biotic factors on *Vibrio harveyi* ATCC 14126^T survival dynamics in seawater microcosms", *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 83, no. 2, pp. 109-118.

- Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. & Hinrichs, W. 2000**, "Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor–operator system", *Nature Structural Biology*, vol. 7, no. 3, pp. 215-219.
- Osborne, A.R., Rapoport, T.A. & van den Berg, B. 2005**, "Protein translocation by the Sec61/SecY channel", *Annual Review of Cell and Development Biology*, vol. 21, pp. 529-550.
- O'Toole, G.A. & Kolter, R. 1998**, "Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis", *Molecular microbiology*, vol. 28, no. 3, pp. 449-461.
- O'Toole, R., Von Hofsten, J., Rosqvist, R., Olsson, P. & Wolf-Watz, H. 2004**, "Visualisation of zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum*", *Microbial Pathogenesis*, vol. 37, no. 1, pp. 41-46.
- Özkanca, R. & Flint, K. 2002**, "The effect of starvation stress on the porin protein expression of *Escherichia coli* in lake water", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 35, no. 6, pp. 533-537.
- Pace, N. 1996**, "New perspective on the natural microbial world: molecular microbial ecology" *ASM News*, vol. 62, pp. 463-470.
- Parada Morais, C.B. 2016**, "Identificación de las proteínas implicadas en la respuesta al estrés en *Escherichia coli* y *Vibrio harveyi*". Tesis doctoral. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.
- Parada, C., Orruño, M., Kaberdin, V., Bravo, Z., Barcina, I. & Arana, I. 2016**, "Changes in the *Vibrio harveyi* cell envelope subproteome during permanence in cold seawater", *Microbial Ecology*, vol. 72, no. 3, pp. 549-558.
- Park, J.T. & Uehara, T. 2008**, "How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan)", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 72, no. 2, pp. 211-227.
- Pascual, J., Macián, M.C., Arahal, D.R., Garay, E. & Pujalte, M.J. 2010**, "Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, *recA*, *pyrH*, *rpoD*, *gyrB*, *rctB* and *toxR* genes", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 60, no. 1, pp. 154-165.
- Pasquali, C., Fialka, I. & Huber, L.A. 1999**, "Subcellular fractionation, electromigration analysis and mapping of organelles", *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, vol. 722, no. 1-2, pp. 89-102.
- Paz, S., Bisharat, N., Paz, E., Kidar, O. & Cohen, D. 2007**, "Climate change and the emergence of *Vibrio vulnificus* disease in Israel", *Environmental Research*, vol. 103, no. 3, pp. 390-396.
- Pech, M., Karim, Z., Yamamoto, H., Kitakawa, M., Qin, Y. & Nierhaus, K.H. 2011**, "Elongation factor 4 (EF4/LepA) accelerates protein synthesis at increased Mg²⁺ concentrations",

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 108, no. 8, pp. 3199-3203.

- Pecl, G.T., Araujo, M.B., Bell, J.D., Blanchard, J., Bonebrake, T.C., Chen, I.C., Clark, T.D., Colwell, R.K., Danielsen, F., Evengard, B., Falconi, L., Ferrier, S., Frusher, S., Garcia, R.A., Griffis, R.B., Hobday, A.J., Janion-Scheepers, C., Jarzyna, M.A., Jennings, S., Lenoir, J., Linnetved, H.I., Martin, V.Y., McCormack, P.C., McDonald, J., Mitchell, N.J., Mustonen, T., Pandolfi, J.M., Pettorelli, N., Popova, E., Robinson, S.A., Scheffers, B.R., Shaw, J.D., Sorte, C.J., Strugnell, J.M., Sunday, J.M., Tuanmu, M.N., Verges, A., Villanueva, C., Wernberg, T., Wapstra, E. & Williams, S.E. 2017**, "Biodiversity redistribution under climate change: Impacts on ecosystems and human well-being", *Science*, vol. 355, no. 6332, pp. eaai9214.
- Pereira, C., Salvador, S., Arrojado, C., Silva, Y., Santos, A.L., Cunha, Â., Gomes, N. & Almeida, A. 2011**, "Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine fish aquaculture: a preliminary study before applying phage therapy", *Journal of Environmental Monitoring*, vol. 13, no. 4, pp. 1053-1058.
- Pernthaler, A., Pernthaler, J. & Amann, R. 2004**, "Sensitive multi-color fluorescence *in situ* hybridization for the identification of environmental microorganisms". *Molecular Microbial Ecology Manual*. Kowalchuk, G.A., de Bruijn, F.J., Head, I.M., Akkermans, A.D., van Elsas, J.D. (eds), Kluwer Academic Publishers, London, UK, pp. 711-726.
- Pernthaler, J. 2005**, "Predation on prokaryotes in the water column and its ecological implications", *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 7, pp. 537-546.
- Pernthaler, A., Preston, C.M., Pernthaler, J., DeLong, E.F. & Amann, R. 2002**, "Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and archaea", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 2, pp. 661-667.
- Perrot, F., Hébraud, M., Junter, G. & Jouenne, T. 2000**, "Protein synthesis in *Escherichia coli* at 4°C", *Electrophoresis: An International Journal*, vol. 21, no. 8, pp. 1625-1629.
- Piao, Z., Sze, C.C., Barysheva, O., Iida, K. & Yoshida, S. 2006**, "Temperature-regulated formation of mycelial mat-like biofilms by *Legionella pneumophila*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 2, pp. 1613-1622.
- Poli, A., Romano, I., Mastascusa, V., Buono, L., Orlando, P., Nicolaus, B., Leone, L., Hong, K.W., Chan, K. & Goh, K.M. 2018**, "*Vibrio coralliirubri* sp. nov., a new species isolated from mucus of red coral (*Corallium rubrum*) collected at Procida island, Italy", *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 111, no. 7, pp. 1105-1115.
- Pommepuy, M., Butin, M., Derrien, A., Gourmelon, M., Colwell, R. & Cormier, M. 1996**, "Retention of enteropathogenicity by viable but nonculturable *Escherichia coli* exposed to seawater and sunlight", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, no. 12, pp. 4621-4626.
- Pommepuy, M., Guillaud, J., Dupray, E., Derrien, A., Le Guyader, F. & Cormier, M. 1992**, "Enteric bacteria survival factors", *Water Science and Technology*, vol. 25, no. 12, pp. 93-103.

- Posch, T., Simek, K., Vrba, J., Pernthaler, J., Sattler, B., Sonntag, B. & Psenner, R. 1999, "Predator-induced changes of bacterial size-structure and productivity studied on an experimental microbial community", *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 18, no. 3, pp. 235-246.
- Provenzano, D., Lauriano, C.M. & Klose, K.E. 2001, "Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence", *Journal of Bacteriology*, vol. 183, no. 12, pp. 3652-3662.
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B.M., Ludwig, W., Peplies, J. & Glöckner, F.O. 2007, "SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB", *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 21, pp. 7188-7196.
- Pruzzo, C., Huq, A., Colwell, R.R. & Donelli, G. 2005, "Pathogenic *Vibrio* species in the marine and estuarine environment", *Oceans and health: Pathogens in the marine environment*. Belkin, S., Colwell, R.R. (eds). Springer, Boston, USA, pp. 217-252.
- Pruzzo, C., Tarsi, R., del Mar Lleò, M., Signoretto, C., Zampini, M., Pane, L., Colwell, R.R. & Canepari, P. 2003, "Persistence of adhesive properties in *Vibrio cholerae* after long-term exposure to sea water", *Environmental Microbiology*, vol. 5, no. 10, pp. 850-858.
- Pruzzo, C., Vezzulli, L. & Colwell, R.R. 2008, "Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin", *Environmental Microbiology*, vol. 10, no. 6, pp. 1400-1410.
- Quilici, M.L., Robert-Pillot, A., Picart, J. & Fournier, J.M. 2005, "Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 spread, France", *Emerging Infectious Diseases*, vol. 11, no. 7, pp. 1148-1149.
- Raetz, C.R. & Whitfield, C. 2002, "Lipopolysaccharide endotoxins", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 71, no. 1, pp. 635-700.
- Rahman, M.H., Biswas, K., Hossain, M.A., Sack, R.B., Mekalanos, J.J. & Faruque, S.M. 2008, "Distribution of genes for virulence and ecological fitness among diverse *Vibrio cholerae* population in a cholera endemic area: tracking the evolution of pathogenic strains", *DNA and Cell Biology*, vol. 27, no. 7, pp. 347-355.
- Ramaiah, N., Ravel, J., Straube, W., Hill, R. & Colwell, R. 2002, "Entry of *Vibrio harveyi* and *Vibrio fischeri* into the viable but nonculturable state", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 93, no. 1, pp. 108-116.
- Ramamurthy, T., Ghosh, A., Pazhani, G.P. & Shinoda, S. 2014, "Current perspectives on viable but non-culturable (VBNC) pathogenic bacteria", *Frontiers in Public Health*, vol. 2, pp. 103.
- Ramos, J.L., Gallegos, M., Marqués, S., Ramos-González, M., Espinosa-Urgel, M. & Segura, A. 2001, "Responses of Gram-negative bacteria to certain environmental stressors", *Current Opinion in Microbiology*, vol. 4, no. 2, pp. 166-171.

- Ramos, J.L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A.J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., Gallegos, M.T., Brennan, R. & Tobes, R. 2005, "The TetR family of transcriptional repressors", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 69, no. 2, pp. 326-356.
- Raper, S.C. & Braithwaite, R.J. 2006, "Low sea level rise projections from mountain glaciers and icecaps under global warming", *Nature*, vol. 439, no. 7074, pp. 311-313.
- Rees, J.F., de Wergifosse, B., Noiset, O., Dubuisson, M., Janssens, B. & Thompson, E.M. 1998, "The origins of marine bioluminescence: turning oxygen defence mechanisms into deep-sea communication tools", *The Journal of Experimental Biology*, vol. 201, no. Pt 8, pp. 1211-1221.
- Regnault, B., Martin-Delautre, S., Lejay-Collin, M., Lefèvre, M. & Grimont, P.A. 2000, "Oligonucleotide probe for the visualization of *Escherichia coli*/*Escherichia fergusonii* cells by *in situ* hybridization: specificity and potential applications", *Research in Microbiology*, vol. 151, no. 7, pp. 521-533.
- Reid, P.C. & Hill, C. 2016, "Ocean warming: setting the scene", *Explaining ocean warming: causes, scale, effects and consequences*. Laffoley, D., Baxter, J.M. (eds). International Union for Conservation of Nature (IUCN), Gland, Switzerland, pp. 17.
- Roller, B.R. & Schmidt, T.M. 2015, "The physiology and ecological implications of efficient growth", *The ISME Journal*, vol. 9, no. 7, pp. 1481-1487.
- Rozsak, D.B. & Colwell, R.R. 1987, "Survival strategies of bacteria in the natural environment", *Microbiological Reviews*, vol. 51, no. 3, pp. 365-379.
- Roth, W.G., Leckie, M.P. & Dietzler, D.N. 1988, "Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *Escherichia coli* by betaine", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, no. 12, pp. 3142-3146.
- Rowe, I., Elahi, M., Huq, A. & Sukharev, S. 2013, "The mechano-electrical response of the cytoplasmic membrane of *Vibrio cholerae*", *Journal of General Physiology*, vol. 142, no. 1, pp. 75-85.
- Roy, N.K., Ghosh, R.K. & Das, J. 1982, "Monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae*", *Journal of Bacteriology*, vol. 150, no. 3, pp. 1033-1039.
- Ruiz, N., Chng, S.S., Hiniker, A., Kahne, D. & Silhavy, T.J. 2010, "Nonconsecutive disulfide bond formation in an essential integral outer membrane protein", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 27, pp. 12245-12250.
- Saleem, M., Fetzer, I., Harms, H. & Chatzinotas, A. 2013, "Diversity of protists and bacteria determines predation performance and stability", *The ISME Journal*, vol. 7, no. 10, pp. 1912-1921.
- Sanders, R.W., Caron, D.A. & Berninger, U. 1992, "Relationships between bacteria and heterotrophic nanoplankton in marine and fresh waters: an inter-ecosystem comparison", *Marine Ecology Progress Series*, vol. 86, no. 1, pp. 1-14.

- Santhya, A.V., Mulloorpeedikayil, R.G., Kollanoor, R.J. & Jeyaseelan, P.M. 2015**, "Molecular variations in *Vibrio alginolyticus* and *V. harveyi* in shrimp-farming systems upon stress", *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 46, no. 4, pp. 1001-1008.
- Sawabe, T., Ogura, Y., Matsumura, Y., Gao, F., Amin, A., Mino, S., Nakagawa, S., Sawabe, T., Kumar, R. & Fukui, Y. 2013**, "Updating the *Vibrio* clades defined by multilocus sequence phylogeny: proposal of eight new clades, and the description of *Vibrio tritonius* sp. nov.", *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, pp. 414.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. & Thompson, F.L. 2007**, "Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis", *Journal of Bacteriology*, vol. 189, no. 21, pp. 7932-7936.
- Schauer, S., Sommer, R., Farnleitner, A.H. & Kirschner, A.K. 2012**, "Rapid and sensitive quantification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* cells in water samples by use of catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization combined with solid-phase cytometry", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 78, no. 20, pp. 7369-7375.
- Schonhuber, W., Fuchs, B., Juretschko, S. & Amann, R. 1997**, "Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 8, pp. 3268-3273.
- Schumann, W. 1999**, "FtsH—a single-chain charonin?", *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 23, no. 1, pp. 1-11.
- Shayegani, M., Maupin, P.S. & McGlynn, D.M. 1978**, "Evaluation of the API 20E system for identification of nonfermentative Gram-negative bacteria", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 7, no. 6, pp. 539-545.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B. & Pedrós-Alió, C. 1989**, "Simultaneous measurement of bacterioplankton production and protozoan bacterivory in estuarine water", *Marine Ecology Progress Series*, vol. 54, no. 3, pp. 209-219.
- Sherr, E.B. & Sherr, B.F. 2002**, "Significance of predation by protists in aquatic microbial food webs", *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 81, no. 1-4, pp. 293-308.
- Sherr, B.F., Sherr, E.B. & Rassoulzadegan, F. 1988**, "Rates of digestion of bacteria by marine phagotrophic protozoa: temperature dependence", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 54, no. 5, pp. 1091-1095.
- Shikongo-Nambabi, M.N., Chimwamurombe, P.M. & Venter, S.N. 2012**, "Identification of putative *Vibrio* species isolated from processed marine fish using Thiosulphate-Citrate-Bile-Sucrose (TCBS) agar", *British Biotechnology Journal*, vol. 2, no. 4, pp. 229-246.
- Shin, O.S., Tam, V.C., Suzuki, M., Ritchie, J.M., Bronson, R.T., Waldor, M.K. & Mekalanos, J.J. 2011**, "Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*", *MBio*, vol. 2, no. 3.

- Shinoda, S. & Miyoshi, S. 2011**, "Proteases produced by vibrios", *Biocontrol Science*, vol. 16, no. 1, pp. 1-11.
- Shinoda, S. 1999**, "Protein toxins produced by pathogenic vibrios", *Journal of Natural Toxins*, vol. 8, no. 2, pp. 259-269.
- Signoretto, C., Lleo, M.M., Tafi, M.C. & Canepari, P. 2000**, "Cell wall chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, no. 5, pp. 1953-1959.
- Sime-Ngando, T. 2014**, "Environmental bacteriophages: viruses of microbes in aquatic ecosystems", *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, pp. 355.
- Simidu, U. & Tsukamoto, K. 1980**, "A method of the selective isolation and enumeration of marine *Vibrionaceae*", *Microbial Ecology*, vol. 6, no. 2, pp. 181-184.
- Singleton, F.L., Attwell, R., Jangi, S. & Colwell, R.R. 1982**, "Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 44, no. 5, pp. 1047-1058.
- Sklar, J.G., Wu, T., Gronenberg, L.S., Malinverni, J.C., Kahne, D. & Silhavy, T.J. 2007a**, "Lipoprotein SmpA is a component of the YaeT complex that assembles outer membrane proteins in *Escherichia coli*", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 15, pp. 6400-6405.
- Sklar, J.G., Wu, T., Kahne, D. & Silhavy, T.J. 2007b**, "Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*", *Genes and Development*, vol. 21, no. 19, pp. 2473-2484.
- Smith, B. & Oliver, J.D. 2006**, "*In situ* and *in vitro* gene expression by *Vibrio vulnificus* during entry into, persistence within, and resuscitation from the viable but nonculturable state", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 2, pp. 1445-1451.
- Soltes, G.R., Schwalm, J., Ricci, D.P. & Silhavy, T.J. 2016**, "The activity of *Escherichia coli* chaperone SurA is regulated by conformational changes involving a parvulin domain", *Journal of Bacteriology*, vol. 198, no. 6, pp. 921-929.
- 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", *Journal of Bacteriology*, vol. 136, no. 1, pp. 280-285.
- Sorokin, D.Y. 1992**, "*Catenococcus thiocyclus* gen. nov. sp. nov.-a new facultatively anaerobic bacterium from a near-shore sulphidic hydrothermal area", *Microbiology*, vol. 138, no. 11, pp. 2287-2292.
- Soto, W., Gutierrez, J., Remmenga, M. & Nishiguchi, M.K. 2009**, "Salinity and temperature effects on physiological responses of *Vibrio fischeri* from diverse ecological niches", *Microbial Ecology*, vol. 57, no. 1, pp. 140-150.

- Soto, W., Lostroh, C.P. & Nishiguchi, M.K. 2010**, "Physiological responses to stress in the *Vibrionaceae*", *Symbioses and Stress, Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology*. Seckback, J., Grube, M. (eds). Springer, New York, USA, pp. 407-426.
- Soto-Rodriguez, S.A., Lozano-Olvera, R., Palacios-Gonzalez, D.A., Bolan-Mejia, C. & Rendon-Aguilar, K.G. 2019**, "Characterization and growth conditions of *Vibrio parahaemolyticus* strains with different virulence degrees that cause acute hepatopancreatic necrosis disease in *Litopenaeus vannamei*", *Journal of the World Aquaculture Society*, vol. 50, no. 5, pp. 1002-1015.
- Srinivasan, S., Ostling, J., Charlton, T., de Nys, R., Takayama, K. & Kjelleberg, S. 1998**, "Extracellular signal molecule(s) involved in the carbon starvation response of marine *Vibrio* sp. strain S14", *Journal of Bacteriology*, vol. 180, no. 2, pp. 201-209.
- Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G.M., Grimont, P.A., Kämpfer, P., Maiden, M.C., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J. & Trüper, H.G. 2002**, "Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 52, no. 3, pp. 1043-1047.
- Stepanovic', S., Ćirković, I., Ranin, L. & Svabic'-Vlahovic', M. 2004**, "Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 38, no. 5, pp. 428-432.
- Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G., Alexander, L.V., Allen, S.K., Bindoff, N.L., Bréon, F., Church, J.A., Cubasch, U. & Emori, S. 2013**, "Technical summary", *Climate change 2013: the physical science basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Stocker, T.F., Qin, D., Plattner, G.-K., Tignor, M., Allen, S.K., Boschung, J., Nauels, A., Xia, Y., Bex, V., Midgley, P.M. (eds). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, pp. 33-115.
- Stretton, S., Danon, S.J., Kjelleberg, S. & Goodman, A.E. 1997**, "Changes in cell morphology and motility in the marine *Vibrio* sp. strain S14 during conditions of starvation and recovery", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 146, no. 1, pp. 23-29.
- Sun, F., Chen, J., Zhong, L., Zhang, X., Wang, R., Guo, Q. & Dong, Y. 2008**, "Characterization and virulence retention of viable but nonculturable *Vibrio harveyi*", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 64, no. 1, pp. 37-44.
- Sun, F., Wang, Y., Wu, M., Sun, C. & Cheng, H. 2015a**, "Spatial and vertical distribution of bacterial community in the northern South China Sea", *Ecotoxicology*, vol. 24, no. 7-8, pp. 1478-1485.
- Sun, S., Tay, Q.X.M., Kjelleberg, S., Rice, S.A. & McDougald, D. 2015b**, "Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms", *The ISME Journal*, vol. 9, no. 8, pp. 1812-1820.
- Sun, S., Kjelleberg, S. & McDougald, D. 2013**, "Relative contributions of *Vibrio* polysaccharide and quorum sensing to the resistance of *Vibrio cholerae* to predation by heterotrophic protists", *PLoS One*, vol. 8, no. 2, pp. e56338.

- Sundberg, L., Kunttu, H.M. & Valtonen, E.T. 2014**, "Starvation can diversify the population structure and virulence strategies of an environmentally transmitting fish pathogen", *BMC Microbiology*, vol. 14, no. 1, pp. 67.
- Sussman, M., Loya, Y., Fine, M. & Rosenberg, E. 2003**, "The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*", *Environmental Microbiology*, vol. 5, no. 4, pp. 250-255.
- Swanson, E.C. & Collins, M.T. 1980**, "Use of the API 20E system to identify veterinary *Enterobacteriaceae*", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 12, no. 1, pp. 10-14.
- Szpilewska, H., Czyż, A. & Wgrzyn, G. 2003**, "Experimental evidence for the physiological role of bacterial luciferase in the protection of cells against oxidative stress", *Current Microbiology*, vol. 47, no. 5, pp. 379-382.
- Tada, Y., Taniguchi, A. & Hamasaki, K. 2009**, "Phylotype-specific productivity of marine bacterial populations in eutrophic seawater, as revealed by bromodeoxyuridine immunocytochemistry combined with fluorescence *in situ* hybridization", *Microbes and Environments*, vol. 24, no. 4, pp. 315-321.
- Takemura, A.F., Chien, D.M. & Polz, M.F. 2014**, "Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level", *Frontiers in Microbiology*, vol. 5, pp. 38.
- Tall, A., Hervio-Heath, D., Teillon, A., Boisset-Helbert, C., Delesmont, R., Bodilis, J. & Touron-Bodilis, A. 2013**, "Diversity of *Vibrio* spp. isolated at ambient environmental temperature in the Eastern English Channel as determined by *pyrH* sequencing", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 114, no. 6, pp. 1713-1724.
- Tall, A., Teillon, A., Boisset, C., Delesmont, R., Touron-Bodilis, A. & Hervio-Heath, D. 2012**, "Real-time PCR optimization to identify environmental *Vibrio* spp. strains", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 113, no. 2, pp. 361-372.
- Tam, V.C., Serruto, D., Dziejman, M., Briehner, W. & Mekalanos, J.J. 2007**, "A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization", *Cell Host and Microbe*, vol. 1, no. 2, pp. 95-107.
- Thode, S.K., Kahlke, T., Robertsen, E.M., Hansen, H. & Haugen, P. 2015**, "The immediate global responses of *Aliivibrio salmonicida* to iron limitations", *BMC Microbiology*, vol. 15, no. 1, pp. 9.
- Thompson, C.C., Thompson, F.L. & Vicente, A.C.P. 2008**, "Identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* by multilocus sequence analysis (MLSA)", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 58, no. 3, pp. 617-621.
- Thompson, C.C., Vicente, A.C.P., Souza, R.C., Vasconcelos, A.T.R., Vesth, T., Alves, N., Ussery, D.W., Iida, T. & Thompson, F.L. 2009**, "Genomic taxonomy of vibrios", *BMC Evolutionary Biology*, vol. 9, no. 1, pp. 258.
- Thompson, J.R. & Polz, M.F. 2006**, "Dynamics of *Vibrio* populations and their role in environmental nutrient cycling", *The Biology of Vibrios*. Thompson, F.L., Austin, B.,

Swings, J. (eds). American Society of Microbiology, Washington DC, USA, pp. 190-203.

Thompson, F.L., Gevers, D., Thompson, C.C., Dawyndt, P., Naser, S., Hoste, B., Munn, C.B. & Swings, J. 2005, "Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 9, pp. 5107-5115.

Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Vasconcelos, A.T. & Sawabe, T. 2007, "Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 13, pp. 4279-4285.

Thompson, F.L., Iida, T. & Swings, J. 2004b, "Biodiversity of vibrios", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 68, no. 3, pp. 403-431.

Thompson, J.R., Randa, M.A., Marcelino, L.A., Tomita-Mitchell, A., Lim, E. & Polz, M.F. 2004a, "Diversity and dynamics of a North Atlantic coastal *Vibrio* community", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 70, no. 7, pp. 4103-4110.

Topp, E., Welsh, M., Tien, Y., Dang, A., Lazarovits, G., Conn, K. & Zhu, H. 2003, "Strain-dependent variability in growth and survival of *Escherichia coli* in agricultural soil", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 44, no. 3, pp. 303-308.

Townsley, L. & Yildiz, F.H. 2015, "Temperature affects c-di-GMP signalling and biofilm formation in *Vibrio cholerae*", *Environmental Microbiology*, vol. 17, no. 11, pp. 4290-4305.

Trebesius, K., Amann, R., Ludwig, W., Mühlegger, K. & Schleifer, K. 1994, "Identification of whole fixed bacterial cells with nonradioactive 23S rRNA-targeted polynucleotide probes", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 60, no. 9, pp. 3228-3235.

Troisfontaines, P. & Cornelis, G.R. 2005, "Type III secretion: more systems than you think", *Physiology*, vol. 20, no. 5, pp. 326-339.

Unemoto, T. 2000, "Bioenergetics of marine bacteria--respiration-coupled Na⁺ pump", *Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, vol. 120, no. 1, pp. 16-27.

Urakawa, H. & Rivera, I.N.G. 2006, "Aquatic environment". *The Biology of Vibrios.*, Thompson, F.L., Austin, B., Swings, J. (eds), American Society of Microbiology, Washington DC, USA, pp. 175-189.

Urbanczyk, H., Ast, J.C., Higgins, M.J., Carson, J. & Dunlap, P.V. 2007, "Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov.", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 57, no. 12, pp. 2823-2829.

Vance, D.E. & Vance, J.E. (eds). 1996, *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. Elsevier. Amsterdam, Netherlands.

- Vandenbergh, J., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B. & Swings, J. 2003**, "Phenotypic diversity amongst *Vibrio isolates* from marine aquaculture systems", *Aquaculture*, vol. 219, no. 1-4, pp. 9-20.
- Vattakaven, T., Bond, P., Bradley, G. & Munn, C.B. 2006**, "Differential effects of temperature and starvation on induction of the viable-but-nonculturable state in the coral pathogens *Vibrio shiloi* and *Vibrio tasmaniensis*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 72, no. 10, pp. 6508-6513.
- Vermeer, M. & Rahmstorf, S. 2009**, "Global sea level linked to global temperature", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 51, pp. 21527-21532.
- Vertommen, D., Ruiz, N., Leverrier, P., Silhavy, T.J. & Collet, J. 2009**, "Characterization of the role of the *Escherichia coli* periplasmic chaperone SurA using differential proteomics", *Proteomics*, vol. 9, no. 9, pp. 2432-2443.
- Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P.C., Colwell, R.R., Höfle, M.G. & Pruzzo, C. 2012**, "Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios", *The ISME Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 21-30.
- Vezzulli, L., Colwell, R.R. & Pruzzo, C. 2013**, "Ocean warming and spread of pathogenic vibrios in the aquatic environment", *Microbial Ecology*, vol. 65, no. 4, pp. 817-825.
- Vezzulli, L., Pezzati, E., Stauder, M., Stagnaro, L., Venier, P. & Pruzzo, C. 2015**, "Aquatic ecology of the oyster pathogens *Vibrio splendidus* and *Vibrio aestuarianus*", *Environmental Microbiology*, vol. 17, no. 4, pp. 1065-1080.
- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P.C., Helaouet, P., Edwards, M., Hofle, M.G., Brettar, I., Colwell, R.R. & Pruzzo, C. 2016**, "Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 34, pp. E5062-71.
- Vines, E.D., Marolda, C.L., Balachandran, A. & Valvano, M.A. 2005**, "Defective O-antigen polymerization in *tolA* and *pal* mutants of *Escherichia coli* in response to extracytoplasmic stress", *Journal of Bacteriology*, vol. 187, no. 10, pp. 3359-3368.
- Vital Brazil, J.M., Alves, R.M., Rivera, I.N., Rodrigues, D.P., Karaolis, D.K. & Campos, L.C. 2002**, "Prevalence of virulence-associated genes in clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 1999", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 215, no. 1, pp. 15-21.
- Vollmer, W., Blanot, D. & De Pedro, M.A. 2008**, "Peptidoglycan structure and architecture", *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 32, no. 2, pp. 149-167.
- Volokhina, E.B., Grijpstra, J., Beckers, F., Lindh, E., Robert, V., Tommassen, J. & Bos, M.P. 2013**, "Species-specificity of the BamA component of the bacterial outer membrane protein-assembly machinery", *PLoS One*, vol. 8, no. 12, pp. e85799.

- Vora, G.J., Meador, C.E., Bird, M.M., Bopp, C.A., Andreadis, J.D. & Stenger, D.A. 2005**, "Microarray-based detection of genetic heterogeneity, antimicrobial resistance, and the viable but nonculturable state in human pathogenic *Vibrio* spp.", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 52, pp. 19109-19114.
- Wachi, M., Doi, M., Okada, Y. & Matsushashi, M. 1989**, "New mre genes *mreC* and *mreD*, responsible for formation of the rod shape of *Escherichia coli* cells", *Journal of Bacteriology*, vol. 171, no. 12, pp. 6511-6516.
- Wai, S.N., Mizunoe, Y. & Yoshida, S. 1999**, "How *Vibrio cholerae* survive during starvation", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 180, no. 2, pp. 123-131.
- Wandersman, C. & Delepelaire, P. 1990**, "TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 87, no. 12, pp. 4776-4780.
- Wang, Y. 2002**, "The function of OmpA in *Escherichia coli*", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 292, no. 2, pp. 396-401.
- Wang, Z., Lin, B., Mostaghim, A., Rubin, R.A., Glaser, E.R., Mittraparp-arthorn, P., Thompson, J.R., Vuddhakul, V. & Vora, G.J. 2013**, "*Vibrio campbellii* hmgA-mediated pyomelanization impairs quorum sensing, virulence, and cellular fitness", *Frontiers in Microbiology*, vol. 4, pp. 379.
- Wang, H., Chen, S., Zhang, J., Rothenbacher, F.P., Jiang, T., Kan, B., Zhong, Z. & Zhu, J. 2012**, "Catalases promote resistance of oxidative stress in *Vibrio cholerae*", *PloS One*, vol. 7, no. 12, pp. e53383.
- Wanner, B. 1993**, "Gene regulation by phosphate in enteric bacteria", *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 51, no. 1, pp. 47-54.
- Watnick, P.I. & Kolter, R. 1999**, "Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm", *Molecular Microbiology*, vol. 34, no. 3, pp. 586-595.
- Webster, R. 1991**, "The *tol* gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*", *Molecular Microbiology*, vol. 5, no. 5, pp. 1005-1011.
- Weeks, J.W., Bavro, V.N. & Misra, R. 2014**, "Genetic assessment of the role of AcrB β -hairpins in the assembly of the TolC-AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*", *Molecular Microbiology*, vol. 91, no. 5, pp. 965-975.
- Weichert, D., Oliver, J.D. & Kjelleberg, S. 1992**, "Low temperature induced non-culturability and killing of *Vibrio vulnificus*", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 100, no. 1-3, pp. 205-210.
- West, P.A., Russek, E., Brayton, P.R. & Colwell, R.R. 1982**, "Statistical evaluation of a quality control method for isolation of pathogenic *Vibrio* species on selected thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose agars", *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 16, no. 6, pp. 1110-1116.

- Whitesides, M.D. & Oliver, J.D. 1997**, "Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, no. 3, pp. 1002-1005.
- White-Ziegler, C.A., Um, S., Perez, N.M., Berns, A.L., Malhowski, A.J. & Young, S. 2008**, "Low temperature (23°C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12", *Microbiology*, vol. 154, no. 1, pp. 148-166.
- Wickner, W., Driessen, A.J. & Haril, F. 1991**, "The enzymology of protein translocation across the *Escherichia coli* plasma membrane", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 101-124.
- Wilkins, S., Millar, M., Hemsworth, S., Johnson, G., Warwick, S. & Pizer, B. 2008**, "*Vibrio harveyi* sepsis in a child with cancer", *Pediatric Blood and Cancer*, vol. 50, no. 4, pp. 891-892.
- Winder, C., Al-Adham, I., Abdel Malek, S., Buultjens, T., Horrocks, A. & Collier, P. 2000**, "Outer membrane protein shifts in biocide-resistant *Pseudomonas aeruginosa* PAO1", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 89, no. 2, pp. 289-295.
- Wolf, P.W. & Oliver, J.D. 1992**, "Temperature effects on the viable but non-culturable state of *Vibrio vulnificus*", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 101, no. 1, pp. 33-39.
- Wommack, K.E. & Colwell, R.R. 2000**, "Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 1, pp. 69-114.
- Won, K.M. & Park, S.I. 2008**, "Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to cultured marine fishes in Korea", *Aquaculture*, vol. 285, no. 1-4, pp. 8-13.
- Wong, H. & Wang, P. 2004**, "Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses", *Journal of Applied Microbiology*, vol. 96, no. 2, pp. 359-366.
- Wong, H., Wang, P., Chen, S. & Chiu, S. 2004**, "Resuscitation of viable but non-culturable *Vibrio parahaemolyticus* in a minimum salt medium", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 233, no. 2, pp. 269-275.
- Wong, Y.Y., Lee, C.W., Bong, C.W., Lim, J.H., Narayanan, K. & Sim, E.U.H. 2019**, "Environmental control of *Vibrio* spp. abundance and community structure in tropical waters", *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 95, no. 11, pp. fiz176.
- Woolkalis, M.J. & Baumann, P. 1981**, "Evolution of alkaline phosphatase in marine species of *Vibrio*", *Journal of Bacteriology*, vol. 147, no. 1, pp. 36-45.
- Wu, L., Lin, X., Wang, F., Ye, D., Xiao, X., Wang, S. & Peng, X. 2006**, "OmpW and OmpV are required for NaCl regulation in *Photobacterium damsela*", *Journal of Proteome Research*, vol. 5, no. 9, pp. 2250-2257.
- Wu, T., Malinverni, J., Ruiz, N., Kim, S., Silhavy, T.J. & Kahne, D. 2005**, "Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*", *Cell*, vol. 121, no. 2, pp. 235-245.

- Xu, C., Ren, H., Wang, S. & Peng, X. 2004**, "Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*", *Research in Microbiology*, vol. 155, no. 10, pp. 835-842.
- Xu, C., Wang, S., Ren, H., Lin, X., Wu, L. & Peng, X. 2005**, "Proteomic analysis on the expression of outer membrane proteins of *Vibrio alginolyticus* at different sodium concentrations", *Proteomics*, vol. 5, no. 12, pp. 3142-3152.
- Xu, H., Roberts, N., Singleton, F., Attwell, R., Grimes, D. & Colwell, R. 1982**, "Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment", *Microbial Ecology*, vol. 8, no. 4, pp. 313-323.
- Yang, Y., Xiang, Y. & Xu, M. 2015**, "From red to green: the propidium iodide-permeable membrane of *Shewanella* decoloration is S12 is repairable", *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, pp. 1-5.
- Ye, J., Ma, Y., Liu, Q., Zhao, D., Wang, Q. & Zhang, Y. 2008**, "Regulation of *Vibrio alginolyticus* virulence by the LuxS quorum-sensing system", *Journal of Fish Diseases*, vol. 31, no. 3, pp. 161-169.
- Yen, M., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y. & Saier Jr, M.H. 2002**, "Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1562, no. 1-2, pp. 6-31.
- Yip, E.S., Geszvain, K., DeLoney-Marino, C.R. & Visick, K.L. 2006**, "The symbiosis regulator RscS controls the *syp* gene locus, biofilm formation and symbiotic aggregation by *Vibrio fischeri*", *Molecular Microbiology*, vol. 62, no. 6, pp. 1586-1600.
- Yoshizawa, S., Wada, M., Yokota, A. & Kogure, K. 2010**, "*Vibrio sagamiensis* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from sea water", *The Journal of General and Applied Microbiology*, vol. 56, no. 6, pp. 499-507.
- Yu, F., Inouye, S. & Inouye, M. 1986**, "Lipoprotein-28, a cytoplasmic membrane lipoprotein from *Escherichia coli*. Cloning, DNA sequence, and expression of its gene", *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, no. 5, pp. 2284-2288.
- Yumoto, I., Ichihashi, D., Iwata, H., Istokovics, A., Ichise, N., Matsuyama, H., Okuyama, H. & Kawasaki, K. 2000**, "Purification and characterization of a catalase from the facultatively psychrophilic bacterium *Vibrio rumoiensis* S-1(T) exhibiting high catalase activity", *Journal of Bacteriology*, vol. 182, no. 7, pp. 1903-1909.
- Zgurskaya, H.I., Krishnamoorthy, G., Ntrel, A. & Lu, S. 2011**, "Mechanism and function of the outer membrane channel TolC in multidrug resistance and physiology of enterobacteria", *Frontiers in Microbiology*, vol. 2, pp. 189.
- Zhang, D., Li, H., Lin, X. & Peng, X. 2015b**, "Outer membrane proteomics of kanamycin-resistant *Escherichia coli* identified MipA as a novel antibiotic resistance-related protein", *FEMS Microbiology Letters*, vol. 362, no. 11, pp. fnv074.

- Zhang, L., Krachler, A.M., Broberg, C.A., Li, Y., Mirzaei, H., Gilpin, C.J. & Orth, K. 2012, "Type III effector VopC mediates invasion for *Vibrio* species", *Cell Reports*, vol. 1, no. 5, pp. 453-460.
- Zhang, N., Zhang, D. & Qiao, N. 2019, "*Vibrio profundus* sp. nov., isolated from a deep-sea seamount", *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 112, no. 11, pp. 1603-1610.
- Zhang, X., Li, K., Wu, S., Shuai, J. & Fang, W. 2015a, "Peptide nucleic acid fluorescence in-situ hybridization for identification of *Vibrio* spp. in aquatic products and environments", *International Journal of Food Microbiology*, vol. 206, pp. 39-44.
- Zhong, L., Chen, J., Zhang, X. & Jiang, Y. 2009, "Entry of *Vibrio cincinnatiensis* into viable but nonculturable state and its resuscitation", *Letters in Applied Microbiology*, vol. 48, no. 2, pp. 247-252.
- Zhong, Q., Wang, B., Wang, J., Liu, Y., Fang, X. & Liao, Z. 2019, "Global proteomic analysis of the resuscitation state of *Vibrio parahaemolyticus* compared with the normal and viable but non-culturable state", *Frontiers in Microbiology*, vol. 10, pp. 1045.
- Zhou, K., Gui, M., Li, P., Xing, S., Cui, T. & Peng, Z. 2012, "Effect of combined function of temperature and water activity on the growth of *Vibrio harveyi*", *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 43, no. 4, pp. 1365-1375.
- Zhu, Z., Dong, C., Weng, S. & He, J. 2019, "Identification of outer membrane protein TolC as the major adhesin and potential vaccine candidate for *Vibrio harveyi* in hybrid grouper, *Epinephelus fuscoguttatus* (♀) × *E. lanceolatus* (♂)", *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 86, pp. 143-151.
- Ziprin, R.L., Droleskey, R.E., Hume, M.E. & Harvey, R.B. 2003, "Failure of viable nonculturable *Campylobacter jejuni* to colonize the cecum of newly hatched leghorn chicks", *Avian Diseases*, vol. 47, no. 3, pp. 753-758.
- Zweifel, U.L. & Hagstrom, A. 1995, "Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts)", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 61, no. 6, pp. 2180-2185.

Referencias web

- blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi [Internet]. [actualización continua; citado 25 marzo 2020]. Disponible en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- coastalwarming.com [Internet]. [actualización continua; citado 25 marzo 2020]. Disponible en http://coastalwarming.com/data_global.html
- e3geoportal [Internet]. [actualización continua; citado 25 marzo 2020]. Disponible en <https://e3geoportal.ecdc.europa.eu/SitePages/Vibrio%20Map%20Viewer.aspx>
- maps.google.es [Internet]. [actualización continua; citado 6 abril 2020]. Disponible en <https://www.google.es/maps>

Taxonomy Browser [Internet]. [actualización continua; citado 25 marzo 2020]. Disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=662>

<https://apiweb.biomerieux.com> [Internet]. [última actualización: 19/03/2019; citado 6 abril 2020]. Disponible en <https://apiweb.biomerieux.com/login>

<https://www.arb-silva.de/search/testprobe/> [Internet]. [actualización continua; citado 6 abril 2020]. Disponible en <https://www.arb-silva.de/search/testprobe/>

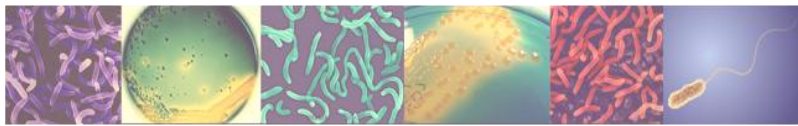
www.euskalmet.euskadi.eus [Internet]. [actualización continua; citado 6 abril 2020]. Disponible en <http://www.euskalmet.euskadi.eus/s07-5853x/es/meteorologia/home.apl?e=5>

<http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=393079> [Internet]. [actualización continua; citado 6 abril 2020]. Disponible en <http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=393079>

<http://www.meteociel.fr/observations-meteo/temperature-de-la-mer.php?region=sp> [Internet]. [actualización continua; citado 6 abril 2020]. Disponible en <http://www.meteociel.fr/observations-meteo/temperature-de-la-mer.php?region=sp>

<https://www.uniprot.org/> [Internet]. [actualización continua; citado 8 abril 2020]. Disponible en <https://www.uniprot.org/>

ANEXOS



ANEXO 1: Composición de soluciones del CARD-FISH.**Paraformaldehído (PFA) 4%** (preparar al momento)

Para preparar 100 mL:

- Calentar 60 mL de MilliQ a 60°C
- Añadir 4 g de PFA y agitar
- Disolver 80 µL de NaOH 2 M
- Añadir 33 mL de 3X PBS
- Ajustar a pH 7,2
- Añadir MilliQ hasta llegar a 100 mL
- Filtrar

Agarosa 0,1% (preparar al momento)

Para preparar 100 mL:

- Calentar 100 mL de MilliQ a 60°C
- Añadir 0,1 g de agarosa (de bajo punto de solidificación)

Solución de lisozima (preparar al momento)

Para preparar 20 mL:

- 2 mL de EDTA 0,5 M
- 2 mL de TRIS/HCl 1 M
- 16 mL de agua MilliQ
- Ajustar a pH 8
- Pesar y añadir 200 mg de lisozima

Solución de acromopeptidasa (preparar al momento). Para preparar 10 mL:

- 10 mL tampón de acromopeptidasa: (4°C)
 - 100 µL NaCl 5 M
 - 500 µL TRIS/HCl 1 M
 - 50 mL MilliQ
 - Ajustar pH 8
- Añadir 20 µL de acromopeptidasa (60 U/mL)

Tampón de hibridación (no necesario preparar al momento. Guardar a -20°C). Para preparar 50 mL:

- 3,6 mL NaCl 5 M (29,22 g NaCl/100 mL)
- 400 µL de TRIS/HCl 1 M (14,18 g TRIS + 100 mL HCl). Ajustar a pH 8
- 20 µL de SDS al 20% (p/v) en MilliQ a T° ambiente
- Añadir 8 mL de MilliQ estéril y mezclar todo
- Añadir 2 g de sulfato de dextrano
- Disolver con 6 mL de formamida
- Añadir 2 mL de blocking reagent 10%:
 - 10 g blocking reagent
 - 100 mL de tampón de ácido maléico:
 - 1,16 g ácido maléico
 - 876,6 mg NaCl
 - 100 mL MilliQ
 - Ajustar a pH 7,5
- Distribuir en 900 µL en eppendorfs

Tampón de lavado (preparar al momento)

Para preparar 50 mL:

- 0,5 mL EDTA
- 1 mL de TRIS/HCl 1 M
- 640 µL de NaCl 5 M
- 25 µL de SDS 20%
- Añadir MilliQ hasta 50 mL

Tampón de amplificación (no necesario preparar al momento. Guardar a 4°C)

Para preparar 50 mL:

- 2 mL de PBS 20X
- 16 mL de NaCl 5M
- 400 µL de blocking reagent 10%:
 - 10 g blocking reagent
 - 100 mL de tampón de ácido maléico:
 - 1,16 g ácido maléico
 - 876,6 mg NaCl
 - 100 mL MilliQ
 - Ajustar a pH 7,5
- 31,6 mL de MilliQ
- Mezclar
- 4 g de sulfato de dextrano
- Calentar a 40-60°C hasta disolver

Tiramida reconstituida (preparar al momento)Stock de tinción activa (ALEXA Fluor 488):

- 1 mg de succinimidyl ester
- 100 µL de dimetilformamida
- Mezclar

Stock de tiramida-HCl:

- 10 µL trietilamina
- 1 mL dimetilformamida
- 10 mg de tiramida HCl
- Mezclar

Reacción:

- 100 µL de stock de tinción activa (ALEXA Fluor 488)
- 25,2 µL de Stock de tiramida HCl
- Incubar durante 6-12 h a temperatura ambiente en oscuridad
- Diluir la solución en etanol absoluto para tener una concentración final de 1 mg/mL (1000 µL - 125,5 µL = 874,8 µL etanol absoluto)
- Guardar en alícuotas de 20 µL en eppendorfs y en oscuridad a -80°C
- Abrir los eppendorf y tapar con parafilm. Hacer agujeros para que se liofilice. Después de liofilizados, guardar a temperatura ambiente o estufa

Uso:

- Reconstruir las tiramidas con 20 µL de dimetilformamida (20 mg de IPBA/mL dimetilformamida) (4°C)

DAPI-Mix

- 5,5 mL de Citifluor
- 1 mL de Vectashield con DAPI (1,5 µg/mL)
- 500 µg de DAPI a 11 µg/mL
- Mantener en oscuridad

ANEXO 2: Primers utilizados para la amplificación de los 7 genes *housekeeping* mediante Multilocus Sequence Analysis (MLSA). Se indica gen, nombre de los primers forward y reverse y la secuencia del primer (5'→3').

Gen	Primer	Secuencia primer (5'→3')
<i>gapA</i>	VgapA150F	AACTCACGGTCGTTTCAAC
	VgapA899R	CGTTGTCGTACCAAGATAC
<i>ftsZ</i>	VftsZ75F	GCTGTTGAACACATGGTACG
	VftsZ800R	GCACCAGCAAGATCGATATC
<i>topA</i>	VtopA400F	GAGATCATCGGTGGTGATG
	VtopA1200R	GAAGGACGAATCGCTTCGTG
<i>mreB</i>	VmreB12F	ACTTCGTGGCATGTTTTTC
	VmreB999R	CCGTGCATATCGATCATTTC
<i>gyrB</i>	VgyrB274F	GAAGTTATCATGACGGTACTTC
	VgyrB1171R	CCTTTACGACGAGTCATTTC
<i>pyrH</i>	VpyrH80F	GATCGTATGGCTCAAGAAG
	VpyrH530R	TAGGCATTTTGTGGTCACG
<i>recA</i>	VrecA130F	GTCTACCAATGGGTCGTATC
	VrecA720R	GCCATTGTAGCTGTACCAAG

ANEXO 3: Especies identificadas mediante los diferentes amplicones secuenciados, número de genes *housekeeping* que coinciden con la identificación e identificación más probable para los 12 aislados y valores *Query* e *Identity* de cada una de las identificaciones (mediante BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Aislado	Especie posible	Número de amplicones de los genes <i>housekeeping</i> coincidentes con la identificación	Identificación de grupo	Query (%)	Identity (%)
1	<i>Vibrio harveyi</i>	7	<i>Vibrio harveyi</i>	100-76	99-90
2	<i>Vibrio splendidus</i>	6	<i>Splendidus</i>	100-99	99-93
	<i>Vibrio lentus</i>			100-91	99-89
	<i>Vibrio crassostreae</i>			100-92	99-96
	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>			100-90	99-93
	<i>Vibrio gigantis</i>			100-95	99-94
3	<i>Vibrio splendidus</i>	6	<i>Splendidus</i>	100-99	98-92
4	<i>Vibrio crosai</i>	5	<i>Harveyi Orientalis</i>	99-91	94-81
	<i>Vibrio campbelli</i>			100-89	94-87
	<i>Vibrio brasiliensis</i>			100-95	94-83
	<i>Vibrio orientalis</i>			100-96	94-89
	<i>Vibrio tubiashii</i>			100-88	97-88
5	<i>Vibrio tubiashii</i>	5	<i>Orientalis Harveyi</i>	100-87	89-89
	<i>Vibrio orientalis</i>			100-97	93-89
	<i>Vibrio campbellii</i>			100-97	89-85
6	<i>Vibrio crassostreae</i>	6	<i>Splendidus</i>	100-88	99-93
	<i>Vibrio splendidus</i>			100-99	95-90
	<i>Vibrio lentus</i>			100-95	99-90
	<i>Vibrio gigantis</i>			100-88	98-92
7	<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	5	<i>Splendidus</i>	100-83	100-92
8	<i>Vibrio splendidus</i>	6	<i>Splendidus</i>	100-99	95-92
	<i>Vibrio lentus</i>			100-97	99-90
	<i>Vibrio crassostreae</i>			100-88	100-94
	<i>Vibrio gigantis</i>			100-98	98-93
9	<i>Vibrio tubiashii</i>	5	<i>Orientalis</i>	100-89	97-90
	<i>Vibrio orientalis</i>			100-96	93-88
10	<i>Vibrio kanaloae</i>	7	<i>Splendidus</i>	100-87	99-87
11	<i>Vibrio splendidus</i>	7	<i>Splendidus</i>	100-97	99-83
	<i>Vibrio lentus</i>			100-95	99-83
12	<i>Vibrio tubiashii</i>	5	<i>Orientalis</i>	100-89	97-89

ANEXO 4: Agua de mar artificial (Farmer III JJ y Hickman-Brenner FW, 2006)

Fórmula MacLeod's

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

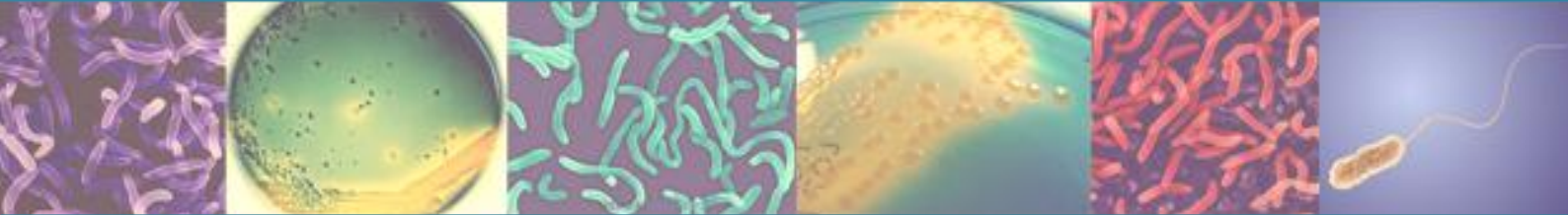
Disolver los compuestos en 1 L de agua destilada, resultando una solución incolora de un pH aproximado a 6,6. Dispensarlo en botellas o tubos con tapón de rosca. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos. La solución final debe ser incolora y libre de cristales sin disolver. Almacenar a temperatura ambiente.

ANEXO 5: TBS 1x: Tampón salino Tris-HCl 1x

Compuestos:

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

Disolver en 1 L de agua destilada. Ajustar el pH a 7,5 con una solución de HCl al 37 %. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos y almacenar a 4°C.



La permanencia de los microorganismos en los sistemas naturales está condicionada por factores ambientales cambiantes. En los últimos años, se ha incrementado la detección de cepas patógenas del género *Vibrio* y la incidencia global de enfermedades relacionadas con usos de agua. En este estudio se ha desarrollado un protocolo CARD-FISH para la detección de *Vibrio* spp. en ambientes naturales y se ha estudiado su distribución estacional en aguas costeras del golfo de Vizcaya. Además, se ha determinado el efecto de la variación de factores ambientales abióticos y bióticos en la supervivencia de las bacterias del género *Vibrio* aisladas en nuestras costas. Se han establecido patrones de supervivencia diferentes entre especies y también entre cepas ambientales y de colección de una misma especie. Por otra parte, se ha realizado un análisis comparativo de las variaciones del subproteoma de las envoltas celulares de *V. harveyi* ambiental mantenido a 2 temperaturas diferentes. A partir de esta información, se cuestiona la adecuación del uso de cepas modelo para profundizar en el conocimiento de la supervivencia y ciclo de vida de *Vibrio* spp.