

Microbiota de moluscos

Jesús López Romalde

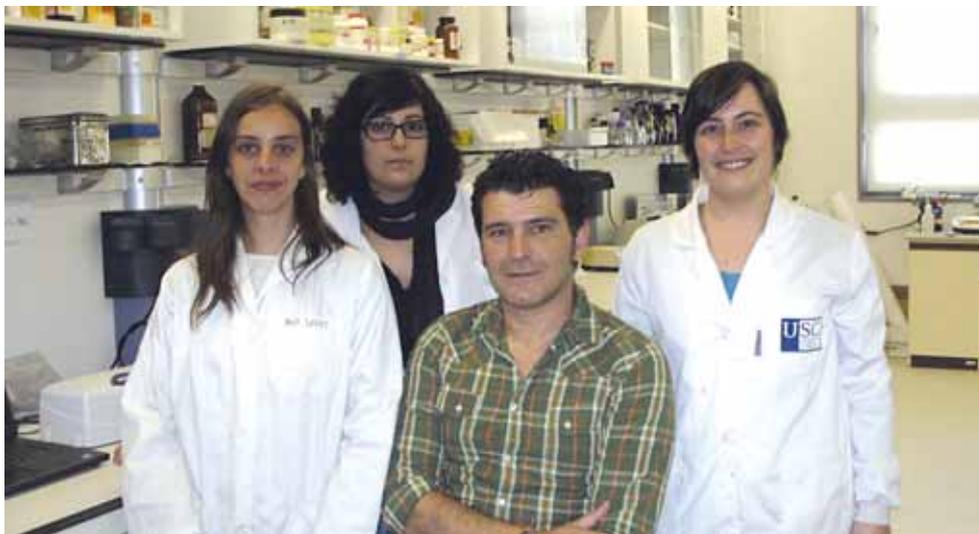
Departamento de Microbiología y Parasitología. CIBUS-Facultad de Biología,
Universidad de Santiago de Compostela

El cultivo de moluscos bivalvos en Galicia tiene gran importancia económica, ya que es una de las actividades de producción primaria esenciales en la región y presenta un mercado consolidado. Durante mucho tiempo la semilla necesaria procedía de la captación natural, pero en los últimos años el cultivo de ostra y almeja se enfrenta a una importante disminución de los bancos naturales, achacable a la sobreexplotación y a la entrada de moluscos de importación, tanto en fase larvaria como incluso de ejemplares adultos. Por otro lado, la producción de semilla en criaderos no está

garantizada debido a mortalidades fulminantes que pueden acabar con la producción en pocos días. Además, la introducción de importaciones, difíciles de controlar, aumenta el riesgo de entrada de nuevas enfermedades. De hecho, en las poblaciones en cultivo son también frecuentes los episodios de mortalidad, afectando principalmente a la almeja fina, más susceptible que otras especies de bivalvos.

Aunque se han realizado estudios sobre el estado sanitario de las poblaciones de moluscos bivalvos, la mayoría de estos trabajos se han centrado en enfermedades parasita-

Algunos de los miembros del Grupo (de izquierda a derecha: Ana L. Diéguez (investigadora contratada), Alejandra Doce (Becaria María Barbeito [Xunta de Galicia]), Jesús L. Romalde (Catedrático), Sabela Balboa (Becaria FPI).



rias. En el caso de las enfermedades bacterianas, los trabajos son escasos consistiendo, muchas veces, en la búsqueda específica de la enfermedad del anillo marrón mediante la observación macroscópica de los bivalvos. Cabe destacar la ausencia de estudios sobre la presencia de otras bacterias potencialmente patógenas en las poblaciones de bivalvos, en cultivo o naturales, en las diferentes zonas productoras de nuestro país, a excepción de unos estudios preliminares llevados a cabo en Andalucía en cultivos de almeja fina por el grupo del Dr. Borrego y la Dra. Castro.

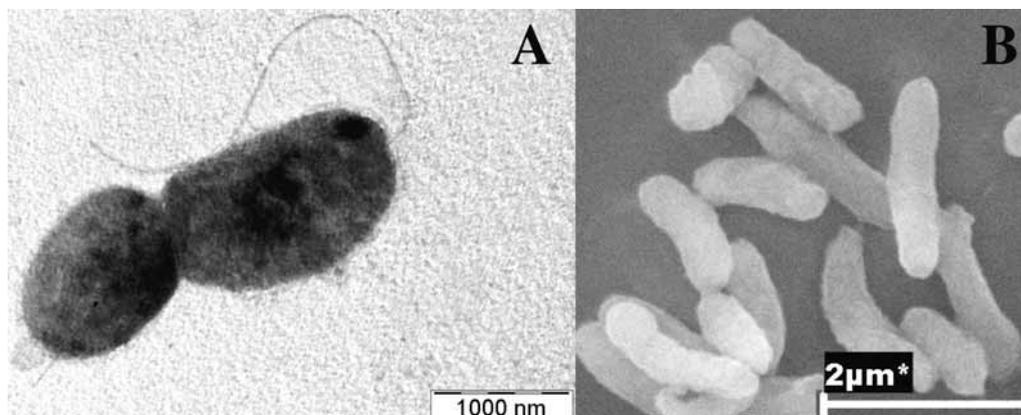
En la naturaleza no existen moluscos libres de bacterias, pero la distinción entre especies o cepas no patógenas y las verdaderamente patógenas no suele ser fácil, así como no lo es el análisis de los factores determinantes de la capacidad de virulencia de una especie o cepa determinada. En algunos casos hay evidencias de que pueda ser más un aspecto cuantitativo, ya que concentraciones altas de una cepa pueden provocar la muerte de los moluscos, mientras que concentraciones bajas son toleradas sin producir la muerte ni síntomas de enfermedad. El estrés parece ser otro factor importante en el control de la susceptibilidad de bivalvos a infecciones bacterianas.

El equipo de la Universidad de Santiago comenzó sus trabajos de patología de moluscos en la década de los 80, con el análisis de vibrios patógenos para ostra. A partir de los años 90 comienza su colaboración con el equipo de la Universidad de Málaga para el análisis genético de *V. tapetis*, agente causal de la enfermedad del anillo marrón en la almeja. Durante los últimos años, con el apoyo de diferentes cofradías gallegas, y gracias a la obtención de diferentes proyectos del Plan Nacional, nos hemos centrado en el estudio de la microbiota de bivalvos, tanto de bancos naturales como en cultivo, incluyendo fases larvianas, juveniles y adultas. Para ello hemos aplicado aproximaciones polifásicas que correlacionen fenotipo y genotipo de patógenos potenciales, así como la evaluación de factores de virulencia. Estos estudios nos están permitiendo conocer el estado sanitario actual, desde el punto de vista bacteriológico, de estas pobla-

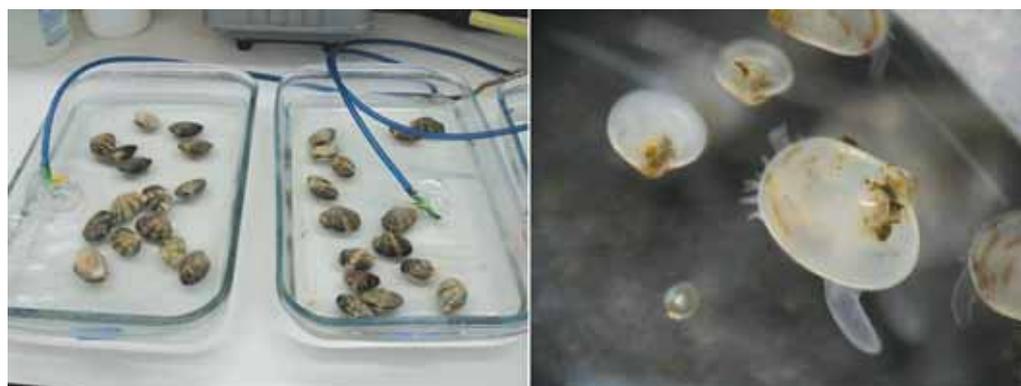
ciones, lo que redundará en el desarrollo de métodos de detección de los principales patógenos y el establecimiento de medidas preventivas de mortalidad. En este sentido, estamos estudiando de forma paralela la capacidad probiótica de bacterias asociadas a dichos cultivos.

Durante varios años se han realizado muestreos mensuales de almejas procedentes de cuatro cofradías gallegas, caracterizándose los principales grupos bacterianos detectados. Los muestreos han dado lugar a una colección de más de 3.000 cepas bacterianas. En la caracterización de las cepas fermentativas se observó una gran prevalencia de diferentes especies del género *Vibrio*. Así, del total de cepas fermentativas, el 77,67 % pertenecían al género *Vibrio*, el 17,35 % al género *Aeromonas* y el 4,98 % fueron aislados fermentativos aún no identificados. La caracterización polifásica, incluyendo métodos fenotípicos, genético-moleculares (AFLP, secuenciación, hibridación DNA-DNA) y quimiotaxonómicos mostró una gran diversidad entre los aislados estudiados. La mayoría de las cepas se identificaron como pertenecientes a especies conocidas dentro de la familia *Vibrionaceae*, como *V. alginolyticus*, *V. cyclitrophicus*, *V. diabolicus*, *V. kanaloae*, *V. pacinii*, *V. splendidus*, *V. tapetis* y *Aliivibrio (Vibrio) fischeri*. *Vibrio splendidus* formó un grupo muy heterogéneo, agrupándose algunos de nuestros aislados en varios *clusters* diferenciados que constituyeron nuevas especies. Así, hemos descrito cinco nuevas especies dentro del género *Vibrio*: *V. breoganii*, *V. gallaecicus*, *V. artaborum*, *V. atlanticus* y *V. celticus*, esta última con potencial patogénico para almeja, y una nueva especie dentro del género *Aliivibrio*: *A. finisterrrensis*, algunas de ellas en colaboración con el equipo del Dr. De Vos de la BCCM/LMG. Por otro lado, hemos descrito *V. ostreicida* como agente responsable de mortalidad en larvas de ostra en criadero.

Con respecto a los aislados con metabolismo respiratorio, la identificación de los grupos obtenidos en una caracterización preliminar en base a pruebas fenotípicas fue bastante complicada debido a la carencia en la literatura de claves apropiadas, hecho posiblemente relacionado con la elevada



Fotografías electrónicas de transmisión (A) y de barrido (B) de la cepa tipo de *Aliivibrio finistrensis* CMJ 11.1^T.



Fotografías electrónicas de transmisión (A) y de barrido (B) de la cepa tipo de *Aliivibrio finistrensis* CMJ 11.1^T.

diversidad de estas bacterias, incluso dentro de un mismo género o especie. Se sometió a los aislados de los distintos grupos a experimentos de secuenciación del gen del RNA ribosómico 16S, con el fin de determinar correctamente la adscripción de los mismos a especies bacterianas concretas. Los resultados obtenidos, indican que los géneros predominantes son *Pseudoalteromonas* (55 %) y *Alteromonas* (15 %). De los aislados asignados al género *Pseudoalteromonas* sólo un 36 % pudieron ser asignados a una especie concreta, como *P. haloplanktis*, *P. espejiana*, *P. issachenkonii* o *P. citrea*, quedando el resto de aislados identificados como *Pseudoalteromonas* sp. En el caso del género *Alteromonas*, ninguna de las secuencias obtenidas se relacionó con especies ya conocidas del género.

Otros géneros detectados en menor proporción son *Tenacibaculum* (*T. mesophilum*, *Tenacibaculum* sp.), *Psychrobacter* (*Ps. aquimaris*, *Ps. nivimaris*), *Shewanella* (*S. colwelliana*, *S. fidelia*, *S. halifaxensis*), *Polaribacter*, *Luteimonas*, *Kopriimonas*, *Lacitrix*, *Marinomonas*, o *Cobetia*. Asimismo se han detectado algunos aislados pertenecientes a géneros de bacterias Gram positivas como *Arthrobacter* o *Nesterenkonia*.

La falta de correlación entre los grupos bioquímicos y los resultados de secuenciación, nos indicó la existencia de un número importante de posibles especies nuevas en estos géneros bacterianos. Debido a la imposibilidad de caracterizar en profundidad por métodos moleculares la colección completa de aislados, se hizo una selección de los mismos para el estudio de factores de virulencia que fue realizado en colaboración con el grupo de los Drs. Borrego y Castro

de la Universidad de Málaga. Además, llevamos a cabo con las cepas seleccionadas diferentes ensayos de inoculaciones experimentales en larvas de almeja. En estos experimentos se demostró el potencial patogénico de 6 aislados, uno perteneciente a la especie *Tenacibaculum mesophilum* (descrita hasta ahora como especie ambiental), un aislado relacionado a las especies *Pseudoalteromonas citrea/aurantia*, otro como cercano a la especie *Alteromonas genovensis* y tres identificados sólo a nivel de género como *Pseudoalteromonas* spp., que constituirán nuevas especies dentro del género en función de los resultados obtenidos.

Además, dentro de las especies oxidativas caracterizadas hemos detectado algunas con potencial probiótico (algunas especies de *Pseudoalteromonas*), cuya caracterización polifásica se está abordando en la actualidad, gracias a la obtención de financiación para dos nuevos proyectos, uno del Plan Nacional (AGL2010-18438) y uno dentro del 7º Programa Marco europeo (REPROSEED).

ÚLTIMAS PUBLICACIONES DEL GRUPO INVESTIGADOR

- Beaz-Hidalgo, R., I. Cleenwerck, S. Balboa, M. De Wachter, F. Thompson, J. Swings, P. De Vos & J.L. Romalde. 2008. Diversity of *Vibrios* associated with reared Galician clams. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 215-222.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Doce, J. Pascual, A.E. Toranzo & J.L. Romalde. 2009. *Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in Northwestern Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 111-117.

- Beaz-Hidalgo, R., I. Cleenwerck, S. Balboa, M. De Wachter, F. Thompson, J. Swings, P. De Vos & J.L. Romalde. 2008. Diversity of Vibrios associated with reared Galician clams. *Systematic and Applied Microbiology* 31: 215-222.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Doce, J. Pascual, A.E. Toranzo & J.L. Romalde. 2009. *Vibrio gallaecicus* sp. nov. isolated from cultured clams in Northwestern Spain. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 111-117.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Alperi, M.J. Figueras & J.L. Romalde. 2009. *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and Applied Microbiology* 32: 471-479.
- Prado, S., J. Montes, J.L. Romalde & J.L. Barja. 2009. Marine bacteria from genus *Phaeobacter* with inhibitory activity against aquaculture pathogens. *International Microbiology* 12: 107-114.
- Beaz-Hidalgo, R., A. Doce, S. Balboa, J.L. Barja & J.L. Romalde. 2010. *Aliivibrio finisterrensis* sp. nov. isolated from Manila clam, *Ruditapes philippinarum* and emended description of the genus *Aliivibrio*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 60: 223-228.
- Beaz-Hidalgo, R., S. Balboa, J.L. Romalde & M.J. Figueras. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. *Environmental Microbiology Reports* 2: 34-43.
- Gómez-Gil, B., A. Roque, G. Rotllant, L. Peinado, J.L. Romalde, A. Doce, H. Cabanillas-Beltrán, L. Chimetto, & F.L. Thompson. 2010. *Photobacterium swingsii* sp. nov. isolated from marine organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (En prensa).
- Beaz-Hidalgo, R., Diéguez, A.L., I. Cleenwerck, S. Balboa, A. Doce, P. de Vos & J.L. Romalde. 2010. *Vibrio celticus* sp nov., a new species within the Splendidus clade with pathogenic potential for clam. *Systematic and Applied Microbiology* doi: 10.1016/j.syapm.2010.06.007
- Diéguez A.L., R. Beaz-Hidalgo, I. Cleenwerck, S. Balboa, P. de Vos & J.L. Romalde. 2010. *Vibrio atlanticus* sp. nov. and *Vibrio artabrorum* sp. nov. isolated from clams *Ruditapes philippinarum* and *R. decussatus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (En prensa).