

Taxonomía y diversidad de microorganismos asociados a moluscos

Sabela Balboa, Ana L. Diéguez y Jesús L. Romalde



Dpto. Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia, Univ. de Santiago de Compostela



Algunos miembros del grupo de investigación. De izquierda a derecha: Ana L. Diéguez, Jesús L. Romalde, Sabela Balboa, Diego Gerpe y Rubén Barcia.

El Grupo de Ictiopatología de la Universidad de Santiago de Compostela comenzó sus investigaciones en microbiología del medio acuático con estudios de *Vibrios* patógenos para ostra y rodaballo en la década de los años 1980. Desde entonces, y con la incorporación de nuevos miembros, las investigaciones del grupo se han ido diversificando y, en concreto, la línea dedicada al estudio de la microbiota de moluscos ha crecido enormemente gracias a diferentes proyectos tanto del Plan Nacional, como Europeos y autonómicos.

Así, a lo largo de estos años, nuestro grupo ha participado en la descripción de más de 30 nuevas especies, más de la mitad pertenecientes al género *Vibrio* que incluye conocidos patógenos oportunistas de organismos acuáticos, y ha desarrollado estudios de diversidad microbiana en diferentes ambientes relacionados con la acuicultura proponiendo mejoras para optimizar el estatus sanitario de los cultivos.

DIVERSIDAD MICROBIANA ASOCIADA A MOLUSCOS GALLEGOS

Una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo ha sido el estudio de la microbiota asociada a moluscos cultivados en Galicia. El estudio más exhaustivo llevado a cabo hasta la fecha se centró en el análisis de la microbiota asociada a los cultivos de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) y almeja fina (*R. decussatus*) en diferentes zonas geográficas de nuestra costa. Fruto de estos muestreos recopilamos más de 3000 aislados, describiéndose diversas nuevas especies de los géneros *Vibrio*, *Allivibrio*, *Marinomonas*, *Lacinutrix* y *Kiloniella*.

La aparición de las técnicas de secuenciación masiva (NGS) nos permitió realizar un estudio más completo de la microbiota asociada a estos moluscos. Así, mediante secuenciación masiva de la región V3-V4 del gen 16S rRNA analizamos la microbiota asociada a las mismas poblaciones de almeja en dos épocas

del año diferentes. Se detectaron más de 15 phyla bacterianos diferentes, además de numerosos taxones que no pudieron ser identificados, sugiriendo que las almejas, y todos los moluscos en general, constituyen un “almacén bacteriano” que es necesario estudiar.

La mayor parte de taxones pertenecieron a las Proteobacteria, Actinobacteria y Bacteroidetes. Cabe destacar que aquellos grupos que han sido clásicamente descritos asociados al cultivo de la almeja y otros moluscos como *Vibrio*, *Allivibrio* o *Pseudoalteromonas* aparecieron como grupos minoritarios, o incluso estaban ausentes en alguno de los órganos estudiados.

Se estudió además la fracción de bacterias cultivables minoritarias utilizando el método de dilución a extinción usando medios oligotrofos. De los más de 130 aislados, la mayoría se identificaron como pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Shewanella*, y, en menor medida, *Rhanella* y *Micrococcus*. Actualmente estamos trabajando en la des-

cripción de nuevas especies de esta fracción de la microbiota.

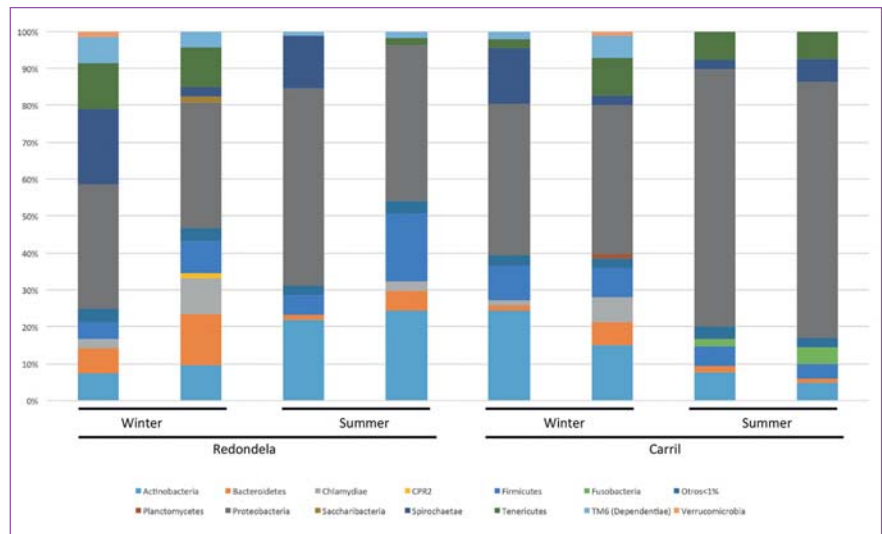
APLICACIONES POTENCIALES EN ACUICULTURA Y BIOTECNOLOGÍA

En los últimos años y en el marco del proyecto europeo “Reproseed”, llevamos a cabo un estudio comparativo de la microbiota asociada a dos sistemas de producción diferentes en un criadero de vieira (*Pecten maximus*) en Noruega, un sistema de flujo continuo de agua y otro de recirculación.

Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto la importancia de la interacción entre los nichos biológicos que suponen los distintos compartimentos del criadero para el correcto funcionamiento del mismo. Según los resultados obtenidos en nuestro estudio, las diferencias en la microbiota asociada a los distintos sistemas de producción no son importantes, por lo que el sistema de recirculación podría considerarse como una buena alternativa de cultivo para esta especie en aguas noruegas.

A nivel diversidad biológica, los géneros mayoritarios fueron *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Neptuniibacter* y *Shewanella* que aparecieron en casi todos los compartimentos. Se encontraron además algunos géneros exclusivos de reproductores, *Kordia*, *Microbulbifer* o *Sinobacterium*, mientras que otros como *Vibrio* y *Shewanella* presentaron un patrón de distribución desde los reproductores hasta agua y larvas, indicando una posible transmisión vertical. El estudio de la microbiota asociada a reproductores se realizó también aplicando técnicas de secuenciación masiva. Mediante esta técnica pudimos identificar un total de 13 filos incluyendo Proteobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria o Spirochaetes, y hasta 110 géneros diferentes. A diferencia de la fracción cultivable, los géneros dominantes incluyeron *Delftia*, *Acinetobacter*, *Hydrotalea*, *Aquabacterium*, *Bacillus*, *Sediminibacterium* o *Shingomonas*.

Por otro lado, la caracterización polifásica de los diferentes aislados obtenidos en los distintos compartimentos del criadero permitió la descripción de cuatro nuevas especies: *Sinobacterium norvegicum*, *Neptuniibacter marinus*, *Neptuniibacter pectenicola* y *Arco-bacter lekithochrous*.



2.- Análisis metagenómico de las poblaciones microbianas asociadas a almeja cultivada.

La identificación y el análisis del genoma completo de cepas identificadas como *Neptunomonas phycophila* ha dado lugar, no solo a la ampliación del rango geográfico y de hospedador de esta especie, sino que ha revelado el potencial biotecnológico de estas bacterias para la degradación de compuestos aromáticos. Por otro lado, el análisis genómico de los aislados de *Neptuniibacter* mostró la capacidad de estas bacterias para la degradación de compuestos aromáticos y su uso potencial en biorremediación.

VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA Y POTENCIAL PATOGENICO

Otra de las líneas de investigación actuales del grupo se centra en el estudio de la diversidad de una de las especies de *Vibrio* descritas por nuestro grupo, *V. toranzoniae*. Esta especie bacteriana se consideró parte de la microbiota habitual de la almeja, hasta que dos años después de su descripción, se detectó como el responsable de una mortalidad de congrio rojo chileno. Mediante un análisis polifásico se confirmó la afiliación de estos aislados a esta especie incluyendo estudios fenotípicos y filogenéticos. Decidimos además comparar los genomas de las diferentes cepas de la especie, incluyendo los aislados patógenos de congrio, las cepas aisladas de almeja y aislados ambientales obtenidos de agua de mar. Los diferentes aislados de la especie mostraron marcadas diferencias relacionadas con la capacidad patógena de estos aislados.

Así, algunos de los factores de virulencia diferenciales fueron la capacidad de síntesis de cápsula, los sistemas de adquisición de hierro mediante sideróforos y determinadas toxinas con actividad citotóxica. Pudimos determinar también diferencias en el estilo de vida de la bacteria, como su capacidad de sintetizar flagelo y, por lo tanto, de moverse.

Actualmente se está llevando a cabo un estudio de la importancia de estos factores de virulencia mediante la construcción de mutantes marcados con proteína verde fluorescente.

Por último se encontraron diferencias en la capacidad de adaptarse a condiciones adversas. Encontramos que la cepa aislada de almeja es capaz de alcanzar el estado viable no cultivable y resucitar cuando las condiciones son favorables mientras que la cepa aislada de congrio necesita períodos más largos. Observamos además un claro descenso en la transcripción de los genes necesarios para la generación del divisoma, *ftsZ* y para el mantenimiento de la forma bacilar, *mreB* mientras que el osmosensor *envZ* se encuentra sobreexpresado.

OTROS PROYECTOS Y COLABORACIONES

Son numerosos los grupos con los que hemos establecido colaboraciones a lo largo de estos años y que han cristalizado en la publicación de artículos compartidos, intercambio

