

RESUMEN DE TESIS DOCTORAL

Estudio comparativo de la microbiota asociada a vieira (*Pecten maximus*) en diferentes sistemas de cultivo intensivo en criadero

Ana López Diéguez

Directores:

Dr. Jesús L. Romalde

Dra. Sabela Balboa

Defendida el 24 de noviembre de 2017 en la Universidade de Santiago de Compostela

Realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Biología (USC)

Mención *cum laude*

Resumen

La acuicultura ha experimentado en las últimas décadas un gran crecimiento contribuyendo al aporte de casi el 50% de los productos pesqueros destinados al consumo humano. El 16% de esta producción correspondió, en el año 2014, al cultivo de moluscos, siendo Europa el segundo productor mundial después de Asia. La vieira, *Pecten maximus*, es una especie de bivalvo de alto valor comercial y alto potencial en acuicultura. Uno de los principales factores limitantes de este cultivo es la obtención de una semilla de calidad. Esta semilla se obtiene a partir de reproductores capturados en el medio marino, lo cual supone la sobreexplotación de los bancos naturales y la inestabilidad en el abastecimiento de los mercados. Otro factor limitante es la falta de desarrollo e innovación en los sistemas de producción, ya que los sistemas de cultivo usados tradicionalmente son los sistemas estáticos, en los que se realiza un cambio de agua cada 3 o 4 días y es frecuente la adición de antibióticos, para evitar las mortalidades que se producen regularmente. El diseño y experimentación de otros sistemas para el cultivo de moluscos es, consecuentemente, un punto fundamental en el desarrollo de una industria productora. En los últimos años se han desarrollado cultivos con sistemas de flujo continuo de agua (FTS, por sus siglas en inglés: *Flow-Through System*) en los que se renueva continuamente el agua del sistema. En estos el manejo de las larvas es reducido y el ambiente más estable, aunque la cantidad de agua y energía necesaria hacen que presente un elevado coste de producción. Otro sistema en estudio es el sistema de recirculación de agua (RAS, por sus siglas en inglés: *Recirculation Aquaculture System*) en los que sólo se renueva un porcentaje del agua que entra al sistema. La cantidad de agua y energía necesaria se reduce considerablemente respecto a los sistemas de flujo continuo además de que proporcionan un mejor control de la calidad del agua, por lo que el coste de producción disminuye.

Los criaderos de moluscos bivalvos constituyen ecosistemas completos, en los que se producen numerosas interacciones físicas, químicas y microbiológicas entre los distintos nichos (compartimentos). Son, por lo tanto, sistemas complejos pero, a pesar de ello, la

mayoría de los estudios realizados se han centrado, desde el punto de vista microbiológico, en la detección y prevención de patógenos, a pesar de que un estudio microbiológico en profundidad no sólo proporciona información acerca del estatus sanitario del animal, sino que permite también optimizar los sistemas de cultivo mediante un control y optimización de su microbiota.

Este trabajo se ha realizado en el marco de un proyecto europeo cuyo principal objetivo era la obtención de semilla de calidad y mejora de los sistemas de producción. En esta tesis doctoral se estudió comparativamente la microbiota asociada a dos sistemas de producción diferentes, un sistema de flujo continuo de agua (FTS) y otro de recirculación de agua (RAS) en un criadero de *P. maximus* en Noruega.

Los resultados obtenidos en estos estudios mostraron que los géneros mayoritarios en el criadero en ambos sistemas eran *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Neptuniibacter* y *Shewanella*. Estos se han distribuido a lo largo de casi todos los compartimentos, mostrando un comportamiento ubicuo, con pocas excepciones como la ausencia de vibrios en el agua tratada con luz ultravioleta o la de *Pseudoalteromonas*, *Neptuniibacter* y *Shewanella* en las muestras de microalgas. Las gónadas de los reproductores analizadas antes y después de la puesta, mostraron una gran diversidad bacteriana. Muchos de estos taxones fueron exclusivos de reproductores como *Kordia*, *Microbulbifer* o *Sinobacterium*, mientras que otros como *Vibrio* o *Shewanella* presentaron un patrón de distribución desde los reproductores hasta el agua y larvas, lo que nos lleva a pensar en una posible transmisión vertical de los mismos. La microbiota de las larvas parece estar fuertemente vinculada a la del agua y las biopelículas, ya que presentan microorganismos comunes. Además, las poblaciones asociadas al agua y las larvas sufren la misma evolución, siendo esta relación más evidente en el sistema FTS. Debido al carácter filtrador de estos animales, la correlación entre la microbiota de las larvas y el agua se entiende fácilmente. Siguiendo este razonamiento, las comunidades bacterianas que encontramos en las muestras de microalgas deberían influir en la microbiota presente en las larvas, pero los únicos microorganismos comunes en ambos compartimentos pertenecían a los géneros *Alteromonas* y *Vibrio*. Las comunidades que colonizaron el biofiltro, analizado en el sistema de recirculación, fueron variadas y de función heterogénea. Además, con el tiempo estas poblaciones aumentaron su diversidad. Al principio del experimento solamente se detectó el género *Vibrio*, el cual fue desplazado por géneros como *Alteromonas*, *Neptuniibacter* o *Aestuariibacter* a lo largo del ciclo de producción.

Los resultados de este estudio pusieron de manifiesto que un criadero, con todos sus compartimentos, es un sistema altamente complejo en el que las interacciones entre los distintos nichos biológicos son esenciales para el buen 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.

Por otro lado, de los más de 200 aislados obtenidos en este ciclo de producción, se seleccionaron cuatro grupos que, por secuenciación del gen 16S ARNr, sólo pudieron asignarse a nivel de género con *Sinobacterium*, *Neptuniibacter* y *Arcobacter*. Se realizó un análisis filogenético de las secuencias del gen 16S ARNr que situaba a estos grupos en ramas independientes dentro de sus respectivos géneros. Para una mejor caracterización filogenética se realizó el análisis de una serie de genes esenciales como el *rpoB* y *gyrB* junto con los genes *atpA*, *hsp60* y *gyrA* en el caso de *Arcobacter*, que confirmaron los resultados obtenidos con el gen 16S ARNr. Los análisis de hibridación ADN-ADN en todos los casos presentaron unos valores inferiores al 70%. En los grupos

de *Neptuniibacter* y *Arcobacter* se seleccionó una cepa tipo a la que se le realizó la secuenciación del genoma completo, la cual nos permitió realizar la hibridación ADN-ADN *in silico* (eDDH) y el estudio del promedio de identidad nucleotídica (ANI, por sus siglas en inglés *Average Nucleotide Identity*), que en ambos casos presentó valores inferiores a los establecidos como umbral para la identificación de especies (70% y 95-96%, respectivamente). Estos datos, apoyados en las características fenotípicas diferenciales encontradas en todos los grupos, nos permitieron describir cuatro nuevas especies para las que propusimos los nombres de *Sinobacterium norvegicum* sp. nov., *Neptuniibacter pectenicola* sp. nov., *Neptuniibacter marinus* sp. nov. y *Arcobacter lekithochrous* sp. nov.

Los genomas completos obtenidos para *N. pectenicola*, *N. marinus* y *A. lekithochrous* se anotaron mediante el servidor RAST. Este análisis reveló posibles aplicaciones biotecnológicas para ambas especies de *Neptuniibacter* en biodegradación de compuestos aromáticos. El genoma de la cepa tipo de *A. lekithochrous* presentó genes de resistencia a antibióticos y a compuestos tóxicos como el arsénico, numerosos genes implicados en el metabolismo del nitrógeno así como en la codificación de hemoglobinas y flavohemoglobinas, que aportan protección frente al estrés nitrosativo.

Además, se estudiaron otros 5 aislados procedentes de gónada de reproductores que se identificaron como *Neptunomonas phycophila*, una especie descrita con anterioridad en muestras procedentes de Puerto Rico. Las diferencias encontradas entre la cepa tipo de la especie y nuestros aislados dieron lugar a una corrección de la descripción de la especie, además de ampliar el rango de hospedador y la distribución geográfica de la misma. El estudio del genoma completo de estas bacterias abrió la puerta a un estudio en profundidad de sus posibles aplicaciones biotecnológicas ya que, al igual que en los aislados de *Neptuniibacter*, estas cepas mostraron genes implicados en la degradación de compuestos aromáticos.

Palabras clave: microbiota, vieira, sistema de flujo continuo (FTS), sistema de recirculación (RAS), acuicultura.

Publicaciones de la Tesis

Enlace al documento completo: <http://hdl.handle.net/10347/16342>

- Diéguez A. L., Jacobsen A., Magnesen T., Romalde J. L. (2015). *Sinobacterium norvegicum* sp. nov., isolated from Great scallop (*Pecten maximus*) broodstock and emended description of *Sinobacterium caligoides*. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 108: 983-991.
- Diéguez A. L., Balboa S., Magnesen T., Romalde J. L. (2017). *Neptuniibacter pectenicola* sp. nov. and *Neptuniibacter marinus* sp. nov., two novel species isolated from a Great scallop (*Pecten maximus*) hatchery in Norway and emended description of the genus *Neptuniibacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, 40: 80-85.
- Diéguez A. L., Romalde J. L. (2017). Draft genome sequences of *Neptuniibacter* sp. strains LFT 1.8 and ATR 1.1. *Genome announcement*, 5(5): e01541-16.
- Diéguez A. L., Balboa S., Magnesen T., Romalde J. L. (2017). *Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67: 1327-1332.
- Diéguez A. L., Romalde J. L. (2017). Complete genome sequence of *Arcobacter* sp. strains LFT 1.7 isolated from Great scallop (*Pecten maximus*). *Genome announcement*, 5(6): e01617-16.
- Diéguez A. L., Pichon P., Balboa S., Magnesen T., Romalde J. L. (2017). Complete characterization of new isolates of *Neptunomonas phycophila* leads to emend its description and opens possibilities of biotechnological applications. *Microbiology Open*, 6(6): e00519.