CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

Estudio de la microbiota asociada a almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) mediante técnicas de secuenciación masiva

Diego Gerpe Pazos

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL
PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2019

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS

Estudio de la microbiota asociada a almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum)* mediante técnicas de secuenciación masiva.

D. Diego Gerpe Pazos,

Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento y declaro que:

1) La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo
2) En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.
4) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de autores ni trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos

En Santiago de Compostela, 7 de noviembre de 2019

Fdo. Diego Gerpe Pazos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR / TUTOR DE LA TESIS

Estudio de la microbiota asociada a almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) mediante técnicas de secuenciación masiva.

D. Jesús López Romalde

INFORMA:

Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por D. ***Diego Gerpe Pazos****, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

En Santiago de Compostela, 7 de noviembre de 2019

Fdo. Jesús López Romalde

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES

Estudio de la microbiota asociada a almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum)* mediante técnicas de secuenciación masiva.

D. Diego Gerpe Pazos,

Declara:

1) No tener ningún conflicto de intereses relevante en lo que concierne al contenido presentado en la tesis doctoral.
2) Que parte de los estudio aquí presentados se basan en información ya existentes, que no contiene datos de carácter personal, y por tanto el estudio no necesita la evaluación e informe previo del comité de ética de la investigación

En Santiago de Compostela, 7 de noviembre de 2019.

Fdo. Diego Gerpe Pazos

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

A mis abuelas

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Quizás esta parte de la tesis no es la más extensa, pero sin duda es la más importante, donde puedes agradecer a todas esas personas que han sufrido contigo, que se han preocupado, que te han dado ánimos para seguir y que han perdido horas de su vida en ayudarte.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mi director el Dr. Jesús L. Romalde, por darme la oportunidad de hacer algo que me apasiona. Por obligarme a salir de mi zona de confort de vez en cuando y animarme a hacer una exposición oral en algún que otro congreso.

A la Dra Alicia Estévez Toranzo que es todo un ejemplo a seguir, su dedicación a la ciencia, su trayectoria y su capacidad de trabajo es impecable. Gracias por todo.

Al Dr Juan Luis Barja, gracias por alegrarme tantos días en el laboratorio, me encanta el entusiasmo con el que sigues investigando. Nunca me olvidaré aquel día que tuvimos velutinas por todo el laboratorio.

A la Dra Beatriz Magariños, por sus consejos, por darme ánimos todas las mañanas y por preocuparse tanto por mí. Aunque le sigo guardando lo de Rusiñol en Sitges.

A Celsa, qué haría yo sin ella, ¡gracias por todo! Por tu amabilidad, empatía, por ayudarme con los envíos, con los papeles y trámites burocráticos. Muchas gracias.
A Berta, sin ella esta tesis no hubiese sido posible. Gracias por aguantarme y no largarme de la cocina, por tu rapidez y tu buen humor.
A Sol, por enseñarme a moverme dentro de un laboratorio, por tener paciencia conmigo y por hacerme reír tanto.

Por otro lado quería agradecer especialmente a todos mis compañeros del laboratorio todo lo que me han ayudado a lo largo de estos años y durante estas últimas semanas, sois los mejores. A Sabela, no conozco una persona que viva tanto la microbiología, que vea una bacteria y diga: “Qué cosa más bonita”. Nunca te podré agradecer todo el tiempo que has dedicado a mi formación, horas y horas durante el TAD, TFM y tesis. Mil gracias!! Te deseo

lo mejor en esta nueva etapa. Ana, muchísimas gracias por toda tu ayuda, incluso por meterme caña y hacerme espabilar. Gracias por todas tus correcciones, por tus consejos, tus obras de arte y por preocuparte por mi. Con suerte antes de terminar el 2019 vamos al Fogón.
A *Ainé*, creo que sin tu ayuda aún estaría intentando entender los comandos de Linux. Muchas gracias por ayudarme todos estos años con mi tesis, por tu paciencia conmigo y por hacerme ver las cosas de forma más positiva. A Javi, que aunque algunas veces me saque de quicio, nunca paro de reírme con él, por su apoyo y todos sus consejos. A Rubén, por todos los "salseos" y risas en el laboratorio, por animarme cuando lo necesitaba, espero verte algún día en el Europarlamento. A Noe, que aunque no me incluyera en sus ángeles la quiero igual, gracias por preocuparte por mi, por ser como eres y por invitarme a tu boda, un día para recordar. A Bea, por ejercer como mi psicóloga más de un día y no dejarme ir al lado oscuro.
A Quique, mi compitrueno, por todo su apoyo, por ayudarme sobre todo en esta última etapa de tesis a resistir y seguir para delante, por muchos más años de juerga juntos. Gracias a Alberto por tus clases magistrales y tu ayuda con la bioinformática, que haría yo sin ti. A Miguel, por tus consejos para viajar por Tailandia y por tus ánimos. A Sergio, espero que pronto estés de vuelta, se te echa de menos. Al retornado, David, con el que siempre es un placer hablar y tomarse unas cañas.

Por otro lado, le quería dar las gracias a mis bichólogos, que siempre están ahí, para lo bueno y para lo malo, con los que aún tengo mucho que celebrar y a los que le debo un Lameiro.
A mi rubia (Alba), por aguantarme y soportarme, por sufrir conmigo mis pequeños agobios. A Raulito, que también ha aguantado mi humor "pre-tésico" más de una vez. A Óscar, por sus llamadas y wasaps preocupado por mi salud mental. A Ari, por intentar buscarme trabajo y por sus ánimos. A Elio, por todas sus charlas y debates, por todo. A mi compi de cumple Daenerys, que hace los mejores huesitos del mundo. A Esteban, porque aunque se encuentre lejos, siempre está cuando se le necesita. A Caldas y Analía, que son capaces de aparecer en casa con un quinto de cerveza para levantarme el ánimo. A Hulk, porque aunque sea un "toxo" como yo, también se preocupa por mi. A Javi, gracias por tus ánimos y por las cañas despotricando del mundo. A Berna, que por fin va a poder leer mi tesis, que sé que tiene muchas ganas. Y en general a todos mis amigos, por ser como son y por apoyarme siempre.
A Finita y Jose Antonio, porque sé que me echaron de menos este verano. A Reyes, la mejor cuñada del mundo. A las primas de riesgo, nunca cambiéis.

Darle las gracias a mi familia por todo lo que me han apoyado. A mi hermano, ya tienes la excusa para venir con Sandra a celebrar mi tesis a Santiago. A Patri y Juanma, porque me consta que temieron que me voliviese loco estos últimos meses, gracias por preocuparos siempre por mí. A María, mi enana, a la que quiero un montón, no cambies nunca. A Roberto, aunque los hosteleros seáis así, sé que siempre puedo contar contigo. A mis padrinos, por estar siempre y apoyarme incondicionalmente. A mi padre y a mi madre por confiar en mi y por haberme animado a seguir, todo lo que os pueda decir o agradecer siempre será insuficiente. Pedirle perdón a mi madre por no haber estado todo lo que quisiera en estos momentos. Y en general, ¡Gracias a toda mi familia! Sabéis que somos muchos y podría hacer una tesis entera solo de agradeciemientos,

Y por último darle las gracias a Jose, quizás la persona que más ha sufrido esta tesis al soportar mi mal humor y mis bajones. Gracias por estar a mi lado. Te quiero.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

AM:	agar marino.
ANI:	valor medio de identidad nucleotídica (*Average Nucleotide Identityi*).
ANOSIM:	análisis de similitudes (*Analysis of similarities*).
AOD:	disminución aguda del roble (*Acute Oak Decline*).
BBDH:	*bidirectional best hits*.
CLO*:*	organismos tipo *Chlamydia* (*Chlamydia like organisms*).
COG:	agrupamiento de los genes ortólogos (*Cluster of Orthologous Genes*).
eDDH:	hibridación ADN-ADN estimada (*estimated DNA-DNA hybridization*).
EFSA:	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (*European Food Safety Authority*).
FAO:	Organización de la Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura (*Food and Agriculture Organization of United Nations*).
GBDP:	distancia genómica filogenética por BLAST (*Genome BLAST distance Phylogeny*).
GCDC:	calculadora de distancias genoma a genoma (*Genome-to-Genome Distance Calculator*).
HSPs:	pares de segmento de alta puntuación (*High Scoring Segment Pairs*).
JOD:	enfermedad de la ostra juvenil (*Juvenil Oyster Disease*).
MHA-1:	agar Mũller Hinton (Mũller-Hinton agar).
MLSA:	análisis de secuencias multilocus (*Multilocus Sequences Analysis*).
NGS:	secuenciación de próxima generación (*Next generation sequencing*).
NJ:	Neighborg joining.
NMDS:	escalamiento multidimensional no métrico (*Nonmetric Multidimensional Scaling*).
OIE:	Organización mundial de sanidad animal (*World Organisation for Animal Health*).
ONPG:	Orto-nitrofenil-ţ -galactósido.
OrthoMCL:	agrupamiento de ortólogos de Markov (*Orthologous Markov Cluster*).
OTU:	unidad taxonómica operacional (*Operational taxonomical unit*).
PCoA:	análisis de las coordenadas principales (*Principal Coordinates Analysis*).

RLO: Organismos tipo *Rickettsia* (*Rickettsia like organisms)*.

ROD: enfermedad de la ostra por *Roseovarius* (*Roseovarius oyster disease).*

SMRT: moléculas individuales a tiempo real (*Single-molecule real-time*).

TAE: tampon Tris-Acetato-EDTA.

TCBS: Tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE

RESUMEN **21**

RESUMO **23**

SUMMARY **25**

1 INTRODUCCIÓN **29**

1.1 LA ACUICULTURA. **29**

1.1.1 Producción de moluscos 29

1.1.2 Cultivo de almejas 31

1.2 LA ALMEJA **32**

1.2.1 Anatomía. 32

1.2.2 Ciclo biológico 34

1.2.3 Características diferenciales entre la almeja fina y la almeja japonesa 36

1.3 LA MICROBIOTA ASOCIADA A ALMEJA **37**

1.3.1 Microbiota general 37

1.3.2 Microorganismos patógenos 40

1.3.2.1 Parásitos 40

1.3.2.2 Virus 42

1.3.2.3 Bacterias 43

1.3.2 Microorganismos probióticos 50

1.4 NUEVAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN **52**

1.4.1 Secuenciación masiva del gen ARNr 16S 52

1.4.1 Secuenciación del genoma bacteriano 57

1.4.1.1 Análisis comparativo de genomas 57

2 OBJETIVOS **63**

3 ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A ALMEJA FINA Y JAPONESA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GEN ARNr 16S **67**

3.1 MATERIAL Y MÉTODOS **67**

3.1.1 Muestreo y procesado de las muestras 67

3.1.2 Amplificación y secuenciación 68

3.1.3 Análisis bioinformático 69

3.1.3.1 Análisis de las secuencias 69

3.1.3.2 Análisis taxonómico 71

3.1.3.3 Análisis de diversidad. 71

3.2 RESULTADOS **73**

3.2.1 Resultados de la secuenciación 73

3.2.2 Microbiota asociada a *Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus* 74

3.2.2.1 Microbiota de almeja japonesa (R. philippinarum) 75

3.2.2.2 Microbiota de almeja fina (R. decussatus) 78
3.2.2.3 Análisis de la diversidad 82
3.2.3 Estudio de la microbiota asociada a los diferentes órganos de *Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus* 83
3.2.3.1 Microbiota asociada a los órganos de almeja japonesa (R. philippinarum). 86
3.2.3.2 Microbiota asociada a los órganos de almeja fina (R. decussatus). 92
3.2.3.3 Comparativa entre la microbiota asociada a los diferente órganos de almeja fina y japonesa 97
3.2.3.4 Análisis de diversidad entre órganos. 98

3.3 DISCUSIÓN 102

4 ESTUDIO DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE ASOCIADA A ALMEJA FINA Y JAPONESA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN A EXTINCIÓN 111

4.1 MATERIAL Y MÉTODOS 112
4.1.1 Muestreo 112
4.1.2 Procesado de las muestras 112
4.1.2.1 Técnica de dilución a extinción. 112
4.1.2.2 Metodología clásica. 113
4.1.3 Extracción de ADN cromosómico 113
4.1.4 Amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr. 114
4.1.5 Análisis filogenético 115

4.2 RESULTADOS 115
4.2.1 Dilución a extinción 115
4.2.2 Metodología clásica 118
4.2.3 Géneros comunes 119

4.3 DISCUSIÓN 120

5 DESCRIPCIÓN DE NUEVOS TAXONES BACTERIANOS DEL GÉNERO *RAHNELLA* A PARTIR DE ALMEJA FINA Y JAPONESA 127

5.1 MATERIAL Y MÉTODOS. 128
5.1.1 Origen aislados y condiciones de cultivo 128
5.1.2 Caracterización bioquímica. 128
5.1.2.1 Metodología clásica. 128
5.1.2.2 Sistemas miniaturizados 133
5.2.1 Análisis del gen 16S ARNr 134
5.2.1.1 Extracción y amplificación y secuenciación 134
5.2.1.2 Análisis Filogenético. 134
5.2.2 Secuenciación del genoma completo. 135
5.2.2.1 Extracción del ADN. 135
5.2.2.2 Ensamblaje y análisis de los genomas 135

5.3 RESULTADOS 137
5.3.1 Caracterización bioquímica. 137
5.3.2 Análisis del gen ARNr 16S 143
5.3.3 Análisis de genomas completos 144
5.3.3.1 MLSA a partir de los genomas 144

5.3.3.2 Comparación con especies del género Rahnella 146
5.3.4 Descripción de especies del género *Rahnella* 149
5.3.4.1 Descripción de Rahnella conchicola sp nov. 149
5.3.4.2 Description of Rahnella gallaica sp. nov. 150
5.4 DISCUSIÓN 151
6 DISCUSIÓN GENERAL 155
7 CONCLUSIONES/CONCLUSIONS 159
8 EXTENDED SUMMARY 167
9 BIBLIOGRAFÍA 175
10 ANEXO I 223

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Estudio de la microbiota asociada a almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum)* mediante técnicas de secuenciación masiva.

RESUMEN

El cultivo de almejas supone un recurso de alto valor gastronómico y comercial en Galicia. La importación de semilla alóctona en las rías gallegas como consecuencia de la sobreexplotación de los bancos naturales de almeja introdujo nuevos patógenos en el ambiente, provocando una reducción drástica de la producción de las principales especies de almeja en las últimas décadas. El estudio de la microbiota asociada a la almeja cultivada permite ampliar el conocimiento sobre la composición de la comunidades bacterianas, conocer su estado sanitario y describir nuevos taxones que nos ayuden a diseñar nuevas estrategias de control ante la aparición de enfermedades o frente a episodios de mortalidades.

En esta memoria se ha realizado un estudio de la microbiota asociada a almeja fina y japonesa (*Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*) mediante la secuenciación masiva del gen ARNr 16S, comparando la microbiota presente en diferentes órganos y localizaciones en dos príodos del año (finales de invierno-principios de primavera y finales de verano-principios de otoño). Los resultados obtenidos muestran la gran diversidad de géneros presentes en ambas especies de almeja, observándose un mayor número OTUs en las muestras de primavera. Por lo general, los grupos de bacterias predominantes en la mayoría de las muestras se asignaron a bacterias no cultivables pertenecientes a diferentes familias como *Propionibacteriaceae, Spirochaetaceae, Francisellaceae* y *Chlamidiaceae* y a los géneros *Mycoplasma, Methylobacterium, Psychrobacter, Endozoicomonas y Vibrio*. La mayoría de estos grupos de bacterias mostraron una clara estacionalidad y especificidad de especies y/o tejido como es el caso de *Methylobacterium* que aparece con una abundancia relativa elevada en las gónadas de ambas especies en otoño, o el género *Endozoicomonas* que se detecta en las branquias de almeja fina con abundancias relativas superiores al 1%.

Por otro lado, se realizó un estudio de la microbiota de almeja fina y japonesa mediante la técnica dependiente de cultivo denominada “dilución a extinción”, reduciendo la concentración de nutrientes de los medios y aumentando los tiempos de incubación. De esta forma se detectaron géneros hasta el momento no identificados mediante técnicas

convencionales de cultivo en estudios anteriores, como *Rahnella, Brachybacterium, Janthinobacterium* o *Brevudimonas*.

Además, en esta memoria se llevó a cabo a la descripción de dos nuevas especies pertenecientes al género *Rahnella,* mediante el análisis comparativo de los genomas de cinco aislados de almeja y las cepas tipo de las especies del género *Rahnella.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Estudo da microbiota asociada a ameixa fina (*Ruditapes decussatus*) e ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*) mediante técnicas de secuenciación masiva.

RESUMO

O cultivo de ameixas supón un recurso de alto valor gastronómico e comercial en Galicia. A importación de semente alóctona nas rías galegas como consecuencia da sobreexplotación dos bancos naturais de ameixa introduciu novos patóxenos no ambiente, provocando unha redución drástica da produción das principais especies de ameixa nas últimas décadas. O estudo da microbiota asociada á ameixa cultivada permite ampliar o coñecemento sobre a composición da comunidades bacterianas, coñecer o seu estado sanitario e describir novos taxons que nos axuden a deseñar novas estratexias de control ante a aparición de enfermidades ou fronte a episodios de mortalidades.

Nesta tese realizouse un estudo da microbiota asociada a ameixa fina e xaponesa (*Ruditapes decussatus* e *R. philippinarum*) mediante a secuenciación masiva do xene ARNr 16S, comparando a microbiota presentes en diferentes órganos e localizacións durante dous períodos do ano (finais de inverno-principios de primavera e finais de verán-principios de outono). Os resultados obtidos mostran a gran diversidade de xéneros presentes en ambas as especies de ameixa, observándose un maior número OTUs nas mostras de primavera. Polo xeral, os grupos de bacterias predominantes na maioría das mostras asignáronse a bacterias non cultivables pertencentes a diferentes familias como *Propionibacteriaceae*, *Spirochaetaceae*, *Francisellaceae* e *Chlamidiaceae* e aos xéneros *Mycoplasma*, *Methylobacterium*, *Psychrobacter*, *Endozoicomonas* e *Vibrio.* A maioría destes grupos de bacterias mostraron unha clara estacionalidade e especificidade de especies e/ou tecido como é o caso de *Methylobacterium* que aparece cunha abundancia relativa elevada nas gónadas de ambas as especies en outono, ou o xénero *Endozoicomonas* que se detecta nas branquias de ameixa fina con abundancias relativas superiores ao 1%.

Doutra banda, realizouse un estudo da microbiota de ameixa fina e xaponesa mediante a técnica dependente de cultivo denominada " dilución a extinción", reducindo a concentración de nutrientes dos medios e aumentando os tempos de incubación. Desta forma detectáronse xéneros ata o momento non identificados mediante técnicas convencionais de cultivo en estudos anteriores, como *Rahnella*, *Brachybacterium*, *Janthinobacterium* ou *Brevudimonas*.

Ademais, nesta memoria levouse a cabo á descrición de dúas novas especies pertencentes ao xénero *Rahnella*, mediante a análise comparativa dos xenomas de cinco illados de ameixa e as cepas tipo das especies do xénero *Rahnella*.

.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Study of grooved carpet shell (*Ruditapes decussatus*) and manila clam (*Ruditapes philippinarum*) microbiota by means of high throughput sequencing.

SUMMARY

The culture of clams is a resource of high gastronomic and commercial value in Galicia. The overexploitation of natural clam beds has resulted in the importation of allochthonous seed into the Galician estuaries. This practice has led to the introduction of new pathogens into the environment, reducing drastically the production of the main clam species in recent decades. The study of the microbiota associated to reared clam allows us to expand the knowledge about the composition of the bacterial communities, to know their health status, and to describe new taxa that might help us to design new control strategies to prevent diseases or mortality events.

A study of the microbiota associated to grooved carpet shell and Manila clams (*Ruditapes decussatus and R. philippinarum*) has been carried out in this thesis using high-throughput sequencing of the 16S rRNA gene, comparing the microbiota present in different organs and locations in two sampling periods (late winter-early spring and late summer-early autum). The obtained results showed the great diversity of genera present in both species of clams, being spring the period in which higher number of genera has been observed. Uncultured bacteria that belong to different families *Propionibacteriaceae, Spirochaetaceae, Francisellaceae* and *Chlamidiaceae* and OTUs belonging to *Mycoplasma, Methylobacterium, Psychrobacter, Endozoicomones* and *Vibrio* genera were the predominant bacterial groups in most samples.

Most of these bacterial groups showed a clear seasonality as well as species and/or tissue specificity such as the case of *Methylobacterium* which was detected with relative high abundance in the gonads of both species in autum, or the genus *Endozoicomonas* detected in grooved carpet shells gills with relative abundance higher than 1%.

On the other hand, a study of the grooved carpet shell and Manila clam microbiota was carried out using the culture-dependent technique known as 'dilution to extinction', reducing the nutrient concentration of media and increasing incubation times. Thus, genera hitherto unidentified using standard culture techniques in previous studies were detected here associated to clam microbiota, such as *Rahnella, Brachybacterium, Janthinobacterium* or *Brevudimonas*.

In addition, two new species that belong to the genus *Rahnella* were described in this dissertation, using comparative analysis of the genomes of five clam isolates and the type strains of species within the genus *Rahnella.*

1.
INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA ACUICULTURA

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), define a la acuicultura como el cultivo de organismos acuáticos animales o vegetales, tanto en zonas costeras como en aguas continentales, que implica un control en el proceso de cría para aumentar la tasa de producción (FAO, 2008). Los orígenes de la acuicultura datan del año 3.800 a.C. en China donde se cultivaban carpas. En España, los primeros registros son del año 1.129 cuando el arzobispo Gelmírez mandó construir un criadero de peces en Galicia. No es hasta el siglo XX cuando aparece en España la acuicultura tal y como la conocemos hoy en día, con la creación en 1973 de las empresas privadas Finisterre Mar y Tinamenor, S.A., que iniciaron el cultivo de moluscos.

Se estima que, debido al ritmo actual de crecimiento, a mediados del siglo XXI la población mundial superará los 9.000 millones de personas. Los efectos del cambio climático, así como la escasez de recursos debido a la sobreexplotación de los recursos naturales, supondrán un gran reto para alimentar a toda la población mundial. Debido a todo esto, desde hace décadas se está intensificado la producción acuícola mundial para poder suplir las necesidades alimentarias futuras ya que, la acuicultura no solo supone un método sostenible de producción y suministro de alimento para la población, si no que también ayudaría a la protección tanto de ecosistemas como de bancos naturales hoy en día sobreexplotados.

Según la FAO, la producción acuícola mundial en 2017 fue de alrededor de 111,9 millones de toneladas de organismos acuáticos de los cuales el 47,7% correspondió a peces, 28,4% algas, 15,5% a moluscos, 7,5% a crustáceos y un 0,8% a otros animales acuáticos o productos no alimentarios derivados de animales (FAO, 2019)

1.1.1 Producción de moluscos

La producción global de moluscos corresponde a unos 17,4 millones de toneladas estimadas, con un valor estimado de venta inicial de unos 27.450 millones de euros. Asia ocupa el primer puesto en producción de moluscos con un total de 16 millones de toneladas (92,15%), seguido de Europa, con 632.695 toneladas (3,63%), donde gran parte de la

producción de moluscos se corresponde al mejillón con 498.164 toneladas (78,3%), seguido de la ostra japonesa con 79.259 toneladas (12,5%), almeja japonesa con 35.113 toneladas (5,5%) y almeja fina con 5.363 toneladas (0,84%) (FAO, 2019).

España es el primer productor europeo de moluscos con un 38% de la producción total (244.233 t), seguido de Francia (124.845 t) e Italia (100.345 t)(Fig. 1.1). En España la producción de moluscos se basa principalmente en mejillones (99%) seguido de almejas (0,5%) y ostras (0,4%), siendo Galicia la principal región productora (FAO, 2019).

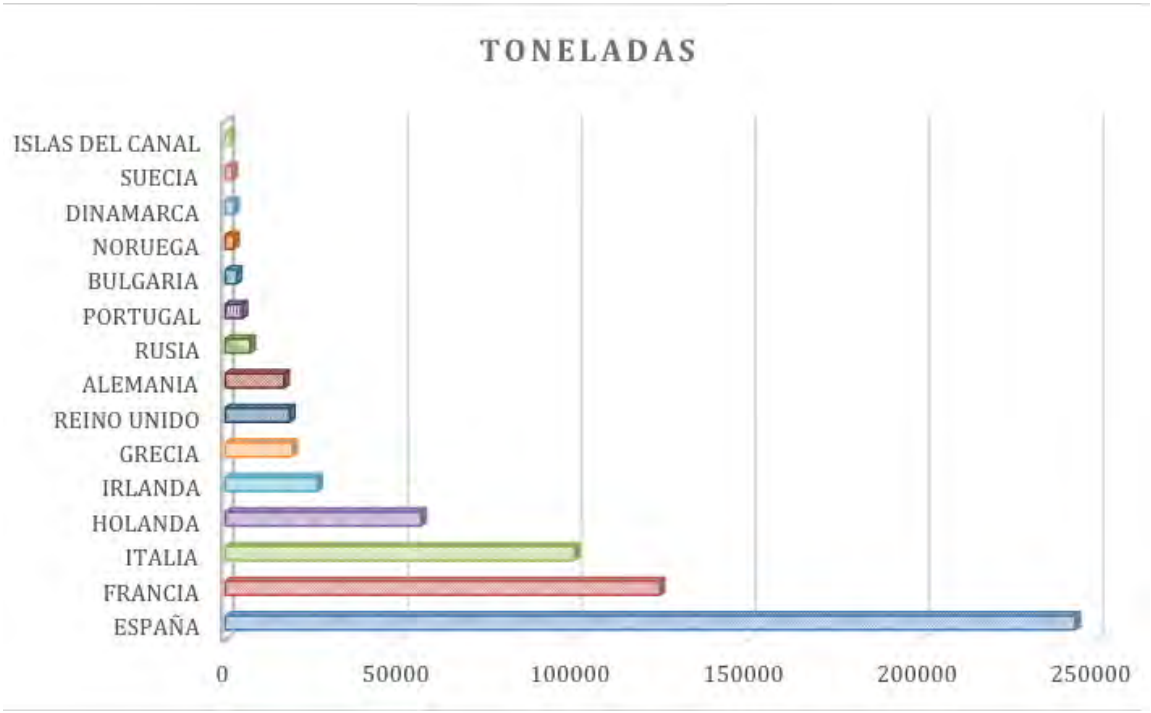

Figura 1.1: Producción total de toneladas de moluscos en los diferentes países de Europa. Fuente: FAO-FIGIS (2019). Figura original.

En los últimos 20 años la producción global de moluscos ha ido descendiendo desde unas 827 mil toneladas en el año 1999, hasta las 632 mil toneladas en el año 2017, por lo que es necesario intensificar la producción, así como realizar estudios que ayuden a mejorar el cultivo y producción de moluscos en todo el mundo y poder así suplir las necesidades alimentarias de la población en aumento.

1.1.2 Cultivo de almejas

El cultivo de almejas a nivel mundial supuso alrededor de 5.584.802 toneladas en el año 2017, acaparando Asia el 98,6% de la producción mundial. En Europa la producción de las tres especies principales de almeja cultivada, almeja fina (*Ruditappes decussatus*), almeja japonesa (*Ruditappes philippinarum*) y almeja babosa (*Venerupis pullastra*), fue de 40.659 toneladas en 2017. En España la producción total de estas especies alcanzó las 1.184 toneladas con un valor en el mercado en primera venta de 12,7 millones de euros, de las cuales 943 toneladas se corresponde a almeja japonesa, con un valor en primera venta de 7,9 millones de euros, seguida de la almeja babosa con 178 toneladas y un valor 2,2 millones de euros y de la almeja fina que ha sufrido un descenso de la producción en los últimos años, alcanzado en el 2017 una producción de solo 63 toneladas con un valor en primera venta de 1,3 millones de euros (FAO, 2019).

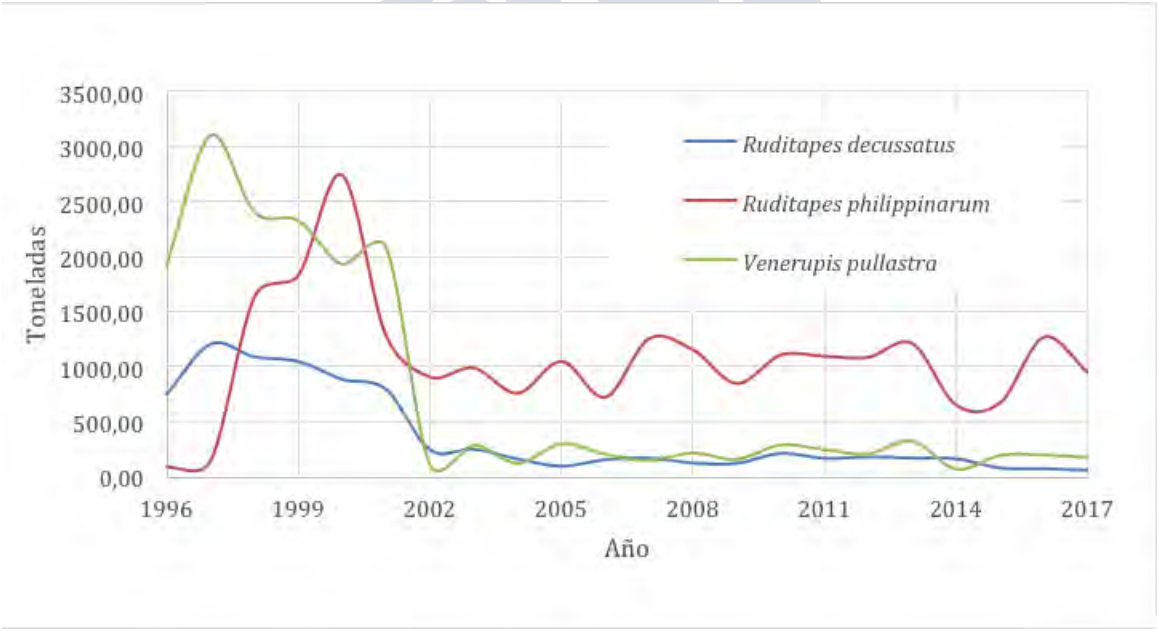

Figura 1.2. Producción de almeja fina, japonesa y babosa en España. Fuente: FAO-FIGIS (2019). Figura original.

Desde finales de los 90 y principios de los 2000 la producción de almeja en España ha sufrido un gran descenso (Fig. 1.2). Esta tendencia negativa puede estar relacionada con la contaminación y la degradación de los ambientes marinos, al marisqueo incontrolado,

furtivismo, condiciones adversas del clima debido al cambio climático o a enfermedades. Además, la sobreexplotación de los bancos naturales dio lugar a la importación de semillas de otros países, introduciendo de esta forma nuevos patógenos en el ecosistema.

1.2 LA ALMEJA

1.2.1 Anatomía

Las almejas se encuentran dentro del Filo *Mollusca*, y pertenecen a la clase *Bivalvia*. Una de las características principales de los moluscos bivalvos es que presentan una valva izquierda y otra derecha articuladas dorsalmente por una charnela y carecen de esqueleto interno. El color, tamaño y forma de las valvas es variable según la especie de almeja y su exterior se encuentra formado por estrías lineales y concéntricas más o menos profundas dependiendo de la especie. La valvas están compuestas principalmente por carbonato cálcico y se diferencian 3 capas; una capa exterior conocida como periostraco, una capa intermedia que supone la mayoría del cuerpo de la concha y una capa interior formada por nácar (FAO, 2004).

Las valvas se pueden abrir y cerrar por acción de la musculatura. Las almejas son organismos dimiarios, presentan dos músculos; el aductor anterior y el aductor posterior que son los encargados de cerrar las valvas. Las dos valvas están unidas por el ligamento, que se estira cuando las valvas se cierran por acción de los músculos aductores y se contrae al abrirse.

En la cara interna de las conchas se encuentra la línea paleal (impresiones del manto) y el seno paleal (generado por la presencia de sifones) y la impresión de los de los dos músculos aductores.

Las conchas protegen el cuerpo de la almeja constituido principalmente por el manto, las branquias, la masa visceral y el pie. En la cara interna de las conchas se encuentra el manto, que se une a la concha por la zona de la charnela. El manto presenta unas prolongaciones tubulares en la zona posterior denominadas sifones; uno superior, exhalante y otro inferior, inhalante. Ambos son retráctiles y presentan pequeños tentáculos en el extremo (Fig. 1.3). El manto tiene como funciones la segregación de la concha, así como una función sensorial, pudiendo iniciar el cierre de las valvas como respuesta a condiciones desfavorables

del entorno. Además, controla la entrada de agua en la cavidad corporal y dirige las partículas hacia las branquias (Ojea, 2013). En la zona posterior se encuentra un músculo desarrollado denominado pie y que el animal usa para enterrarse y desplazarse.

A cada lado del manto están las branquias, dos a cada lado. Las branquias son estructuras formadas por multitud de cilios que van a permitir el intercambio de oxígeno y la captura del alimento. Son las responsables de seleccionar el alimento que entra por el sifón inhalante y transferirlo a la boca.

La masa visceral se encuentra formada por el aparato circulatorio, excretor, digestivo y reproductor. Las almejas presentan un par de riñones y glándulas pericárdicas que conforman el sistema excretor, si bien, la superficie del cuerpo y las branquias también emiten productos de excreción (Bayne y col., 1976).

El sistema circulatorio es un sistema simple y muy difícil de localizar. El corazón se encuentra localizado dorsalmente en el interior de la cavidad pericárdica. Está formado por dos aurículas y un ventrículo. La hemolinfa se distribuye por todo el animal por un sistema de arterias que terminan en senos o lagunas sanguíneas. La sangre pasa a través de las arterias del manto cerca de la superficie, donde se oxigena y vuelve al corazón.

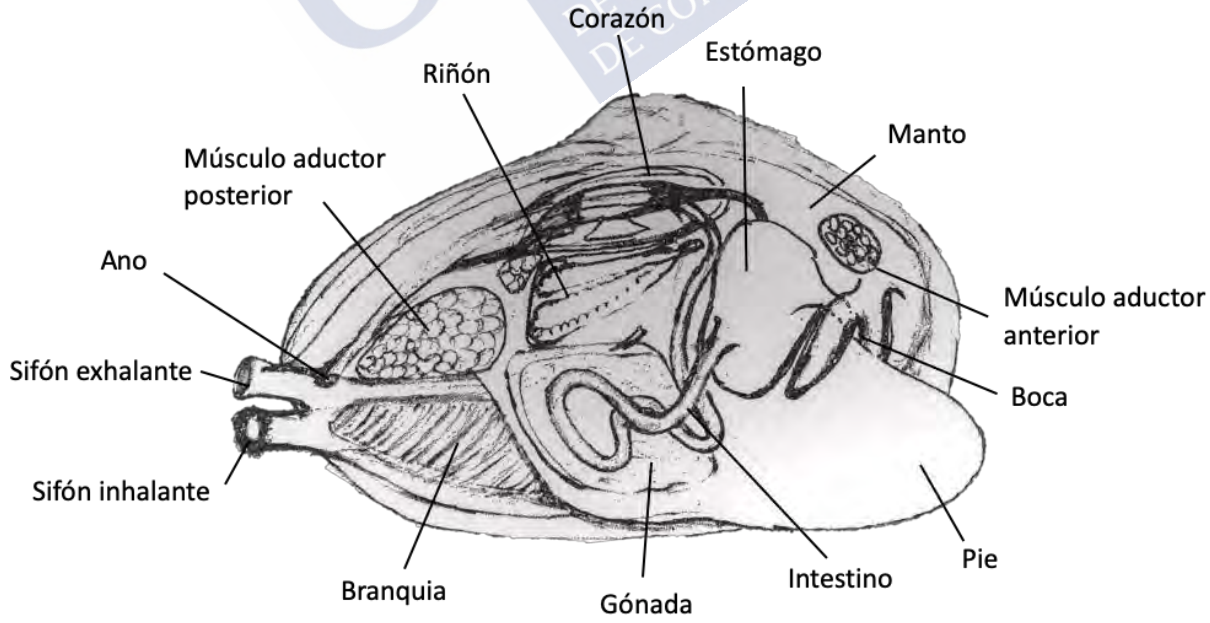

Figura 1.3. Anatomía interna de la almeja. Figura original.

En cuanto al sistema digestivo, el alimento recogido por las branquias entra por la boca y pasa a través de un esófago corto al estómago. El estómago está formado por una parte anterior donde se encuentran las glándulas digestivas que digieren partículas intracelularmente; y una zona posterior denominada saco del estilo, donde se encuentra un estilete cristalino formado por partículas proteicas y enzimas digestivas que van a triturar el alimento qué posteriormente pasará a las glándulas digestivas. El estómago se abre a un intestino que desemboca en el ano, situado al lado del sifón exhalante.

El sistema nervioso de las almejas es muy simple y presenta simetría bilateral. Está formado por tres pares de ganglios (cerebropleurales, pedios y viscerales) unidos por dos pares de conectivos longitudinales. Los ganglios cerebropleurales se encuentran en la zona anterior, cerca de la boca; los ganglios pedios inervan el pie y la parte posterior del manto y los viscerales controlan los órganos de la masa visceral y las branquias (Cerviño, 2011).

Tanto la almeja fina como la japonesa son organismos dioicos, sin dimorfismo sexual y que se reproducen sexualmente de forma externa. Los órganos reproductores están formados por un par de gónadas conectadas cada una por un gonoducto simple que desemboca en la cavidad paleal.

1.2.2 Ciclo biológico

Como ya se ha mencionado, las almejas tienen fecundación externa, de forma que los gametos son expulsados al agua mediante los sifones exhalantes. La liberación de ovocitos y espermatozoides es estacional, dependiendo de la especie (Ojea y col., 2004; Rodríguez-Moscoso y col., 1992). La fecundación se realiza en el medio marino y tiene lugar al azar (Grassé, 1976). Los ovocitos fecundados quedan flotando en la columna de agua, donde se produce un desarrollo indirecto de la larva. El tiempo para que se produzca el desarrollo embrionario y larvario varía según la especie, siendo de unos 35-40 días tras el desove en el caso de la almeja fina y de 30-35 días en el caso de la almeja japonesa (Fig 1.4).

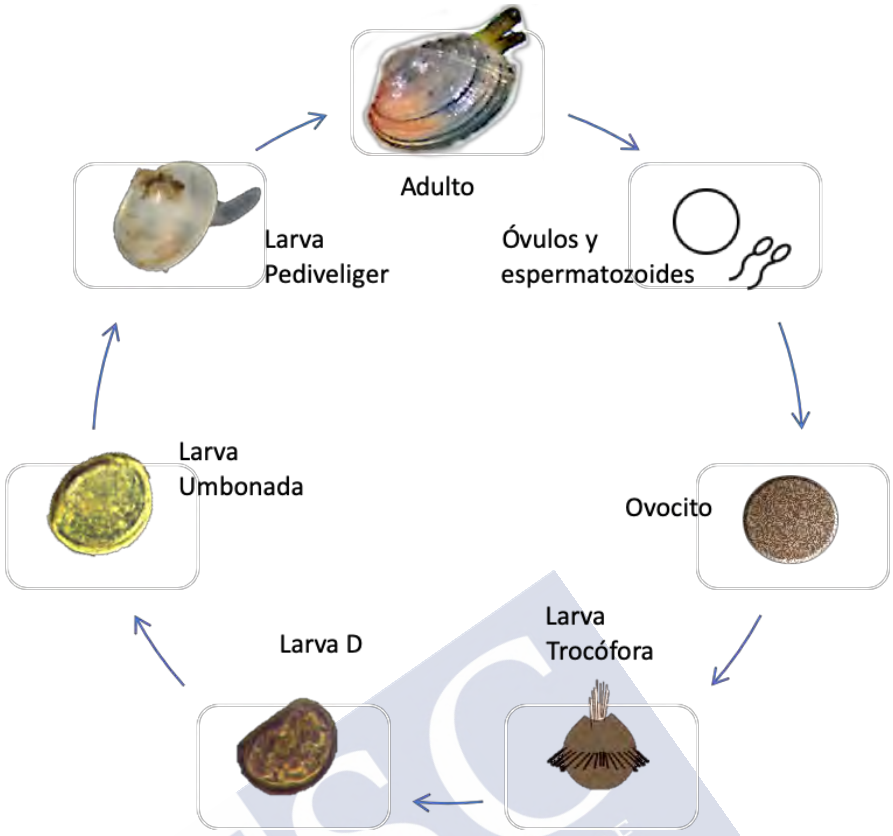

Figura 1.4. Ciclo biológico de la almeja. Figura original.

La división del ovocito fecundado dará lugar a la formación de la fase multicelular de blástula, que se divide y forma la gástrula en las primeras 24 h. Pasadas 12 h se convertirá en larva trocófora. Esta larva se encuentra rodeada de cilios, presenta un flagelo en la zona apical que le permite el movimiento y tiene un tamaño de entre 60-80 µm. Será esta larva trocófora la que secrete 2 estructuras simétricas (prodisoconcha I) que la envuelvan y se forma la larva D o velíger. El tamaño de la larva velíger varía entre 90-100 µm tanto en almeja fina como japonesa.

Durante este periodo la larva se desplaza y alimenta mediante el velo, aumentado de tamaño hasta formar la prodisoconcha II. La charnela entonces se curva y forma el umbo, dando lugar a la larva umbonada con un tamaño entre 130-160 µm. Esta larva, aún con el velo, empieza a formar el pie dando lugar a la larva pedivelíger, la cual se fijará al sustrato pasando de una vida planctónica a bentónica.

Una vez fijada al sustrato el velo va a ser reabsorbido, se forman las branquias y empieza la metamorfosis. Pasados 30-40 días tras el desove, la almeja alcanza el estadio de

postlarva o semilla, alcanzando tallas de entre 260-350 μm. Estas adquieren nutrientes del agua y crece hasta tener la forma adulta.

El crecimiento de las almejas va a depender no solo de la especie, sino también de diversos factores como el clima, la zona geográfica o la zona de cultivo (submareal o intermareal). En las zonas de clima templado hay una clara estacionalidad en el crecimiento, siendo este más rápido en primavera-verano debido a la temperatura del agua y a la mayor disponibilidad de alimento en el medio durante este periodo.

1.2.3 Características diferenciales entre la almeja fina y la almeja japonesa

La almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y la almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) van a presentar características morfológicas diferenciales tanto en la anatomía externa como en la interna.

La almeja fina posee unas estrías concéntricas y radiales marcadas que se entrecruzan formando una cuadrícula característica, el área de inserción del ligamento es asimétrica y no es visible en la valva derecha. La concha tiene forma cuadrangular y tiene una lúnula incolora poco diferenciada. La concha presenta una coloración igual en ambas valvas que varía entre blanco y marrón claro. La coloración interna de las valvas es blanquecina o amarillo claro (Gofas, 2011). Presenta unos sifones largos separados desde la base hasta el final y el sifón inhalante tiene 2 filas de tentáculos en el extremo. Se encuentran tanto en bancos intermareales como submareales y, debido a longitud de sus sifones, las almejas van a poder estar enterradas a 15-30 cm de profundidad en el sedimento, lo que le permite soportar mejor la desecación y las bajadas de salinidad.

La almeja japonesa presenta unas estrías radiales más marcadas y el área de inserción del ligamento es asimétrica y visible en las dos valvas. Tiene una concha totalmente ovalada y una lúnula de color oscuro bien pronunciada. La concha puede tener diferente color en cada valva variando entre marrón, gris y negro, incluso presentando manchas oscuras irregulares. En el margen ventral de la concha, las impresiones de los músculos y del seno paleal presentan unas manchas púrpuras características (Quero y Vayne, 1998). El seno paleal se encuentra menos marcado que el de almeja fina, ya que este se forma en función de la longitud de los sifones (Gosling, 2003). Los sifones están soldados en la mayor parte de su longitud y se separan al final. El sifón inhalante tiene 3 filas de tentáculos. Al igual que la

almeja fina, se encuentra en zonas mareales e intermareales, pero enterradas a menor profundidad. Tiene un crecimiento mayor que la almeja fina, alcanzando la talla mínima comercial en 2 años (JACUMAR, 2014)

En cuanto a la distribución geográfica, *R. decussatus* se extiende por toda la costa europea del océano Atlántico y por la cuenca del Mediterráneo. En África se encuentra desde la costa de Marruecos hasta Senegal (FAO, 2019; Breber, 1985; Fischer-Piette, 1971). Los mayores productores de esta especie de almeja son España, Portugal, e Italia (FAO, 2019). En el caso de *R. philippinarum*, posee una gran distribución por todo el océano Índico y Pacífico. Se introdujo accidentalmente en Norteamérica y posteriormente fue importada a Europa. Aunque países como España, Italia o Francia son los mayores productores en Europa, la producción mundial de almeja japonesa se concentra principalmente en China (FAO, 2019).

1.3 LA MICROBIOTA ASOCIADA A ALMEJA

1.3.1 Microbiota general

Al ser organismos filtradores, las almejas presentan una microbiota abundante y diversa microbiota con efectos directos o indirectos tanto beneficiosos como perjudiciales en estos animales (Mchenery y Birkbeck, 1985; Prieur y col., 1990; Seguineau y col., 1996; Romalde y col., 2013, 2014). Por lo tanto, el estudio de la microbiota asociada a la almeja, no solo va a ayudar a tener una idea de cómo se encuentran las poblaciones desde un punto de vista sanitario, sino que también ayudará a aumentar el conocimiento sobre eventos de patogenicidad y a diseñar nuevas estrategias de control.

El primer estudio sobre la microbiota asociada a moluscos bivalvos fue elaborado en los años 60 por Colwell y Liston (1960). El estudio se centró en la microbiota de la ostra del pacífico (*Crassostrea gigas*) y concluyó que la mayoría de la microbiota asociada estaba formada por bacterias Gram negativas, pertenecientes a los géneros *Pseudomonas* y *Vibrio*, seguidos de *Achromobacter* y *Flavobacterium*. Otro estudio realizado en *C. gigas* y *C. virginica* obtuvo resultados muy parecidos, donde los géneros más abundantes también fueron *Pseudomonas y Vibrio* (Lovelace y col., 1968).

En los años 80, Sugita y col., (1981) elaboraron un estudio más completo de la microbiota de diferentes especies de moluscos bivalvos (*R. philippinarum*, *Mactra*

veneriformis, *Mytilus coruscus*, *C. gigas*, *Phacosoma japonicum* y *Scapharca broughtonii*). Analizaron la microbiota en diferentes etapas de su ciclo vital, en diferentes órganos, además de la microbiota presente en los sedimentos y el agua. Los resultados que obtuvieron pusieron de manifiesto que la microbiota de moluscos bivalvos se encuentra influenciada por el medio, ya que los géneros mayoritarios encontrados en los moluscos (*Vibrio*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Moraxella* y *Micrococcus*), se encontraron en porcentajes semejantes en agua y sedimentos.

En otro estudio sobre las variaciones a lo largo de un año de la microbiota asociada a *Ostrea edulis* y agua del Mediterráneo, Pujalte y col. (1999), determinaron que las bacterias halófilas anaerobias fermentativas fueron dominantes desde Marzo a Octubre, destacando el género *Vibrio* en el agua y en la ostra. Por otro lado, observaron que en los meses fríos predominó un grupo de bacterias oxidativas no identificadas pertenecientes a las α-proteobacterias.

Montilla y col. (1995) elaboraron un comparativa entre la microbiota de almeja fina y japonesa y ostras (*C. gigas* y *O. edulis*), observando una mayor incidencia de bacterias del género *Vibrio* en almejas que en ostras.

Existen pocos estudios recientes sobre la composición y distribución de la microbiota asociada a moluscos bivalvos y generalmente están centrados en la identificación de nuevas especies con potencial patógeno (Paillard y col., 2004; Romanenko y col., 2008). En cuanto a la microbiota asociada a almejas, el estudio más completo hasta la fecha fue elaborado por nuestro grupo de investigación (Romalde y col., 2014) en el cual se estudió la microbiota presente en almeja fina y almeja japonesa en 4 localizaciones diferentes haciendo muestreos cada 2 meses durante 5 años. La diversidad microbiana encontrada fue semejante en todas las localizaciones y, al igual que en un estudio realizado por Arias y col. (1999), se observó un aumento en la abundancia de algunos taxones bacterianos durante los meses más cálidos. *Vibrio* fue el género más abundante en todas las muestras, constituyendo el 60% de la microbiota total. Por otro lado, se identificaron un total de 800 aislados de bacterias oxidativas, de las cuales un 52,7% pertenecían al género *Pseudoalteromonas* seguido del género *Shewanella* (16%) y otros géneros con porcentajes menores del 5% como *Tenacibaculum*, *Psychrobater*, *Polaribacer*, *Marinomonas* o *Alteromonas*. Además, durante este estudio se encontraron organismos tipo *Rickettsia* (RLO, del inglés *Rickettsia*-like

organisms), que se observaron en inclusiones en branquias, palpos labiales y glándulas digestivas.

La mayoría de los estudios realizados sobre la microbiota de moluscos se centran en bacterias cultivables. Esta aproximación es insuficiente ya que se calcula que las bacterias identificadas dependientes de cultivo solo explicarían alrededor de un 0,01-1% de la microbiota total presente en una muestra (Green y Keller, 2006).

Recientemente, se han desarrollado nuevas técnicas de secuenciación masiva que permiten el estudio de la microbiota, cultivable y no cultivable, presente en una muestra. Los resultados obtenidos de la microbiota asociada a moluscos bivalvos mediante el uso de estas técnicas, difieren bastante de los obtenidos con anterioridad donde las γ-proteobacterias eran la clase más abundante, y *Vibrio* y *Pseudomonas* los géneros predominantes.

Trabal y col. (2014) realizaron un estudio sobre la microbiota asociada a tres especies de ostra (*Crassostrea corteziensis*, *C. gigas* y *C. sikamea*) durante su fase adulta y sus estadios postlarvarios. Utilizaron la técnica de la pirosecuenciación, amplificando las regiones V3 y V4 del gen 16S ARNr. Identificaron 243 géneros y 13 filos diferentes. El filo mayoritario fue *Proteobacteria* seguido de *Bacteroidetes, Actinobacteria* y *Firmicutes*. La diversidad bacteriana en los estadios postlarvarios fue mucho mayor a la encontrada en los ejemplares adultos. Mientras en las postlarvas se encontraba formada por varios géneros, siendo *Neptuniibacter*, *Marinicella*, *Rhodovulum* y *Oceanicola* los géneros más abundantes, en ostras adultas la microbiota estaba compuesta principalmente por los géneros *Burkholderia* y *Escherichia/Shigella*. Además, al contrario que estudios anteriores sobre la microbiota de esta y otras especies de ostras (Harris, 1993; Pujalte y col., 1999; Najiah y col., 2008; Green y Barnes, 2010; Zurel y col., 2011; Fernández-Piquer y col., 2012), los géneros *Vibrio* y *Pseudomonas* fueron minoritarios en las etapas postlarvares y prácticamente inexistentes en ostras adultas.

En un estudio centrado en las gónadas de *Pecten maximus*, Lasa y col. (2016) tuvieron resultados semejantes identificando 13 filos diferentes, donde *Proteobacteria* fue el mayoritario. Se identificaron un total de 110 géneros, siendo los más abundantes *Delftia*, *Acinetobacter*, *Hydrotalea*, *Aquabacterium*, *Bacillus*, *Sediminibacterium*, *Sphingomonas* y *Pseudomonas*. Cabe destacar que en este estudio no encontraron secuencias del género *Vibrio* y las secuencias del género *Pseudoalteromonas* fueron poco abundantes.

Vezzulli y col. (2017) estudiaron la microbiota de la hemolinfa y de la glándula digestiva de *Mytilus galloprovincialis* y *C. gigas*. El filo *Proteobacteria* volvió a ser el mayoritario con los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* como predominantes, al contrario de lo que sucedió en los estudios citados anteriormente.

1.3.2 Microorganismos patógenos

Uno de los mayores problemas que se encuentran los acuicultores y mariscadores son las mortalidades repentinas de los moluscos tanto en sus fases larvarias en el criadero como en sus fases juveniles y adultas en el medio natural. En Galicia, inicialmente las semillas utilizadas para el cultivo procedían de la recolección en el medio natural, pero debido a la sobreexplotación de los bancos naturales, a mediados del siglo XX se empezaron a importar masivamente juveniles de otros países. Todo esto propició la entrada de nuevos agentes causales de enfermedades.

La mayoría de las mortalidades se producen en los criaderos durante las fases larvarias y postlarvarias, causando muchas veces la pérdida total de la producción. La mayor parte de estas mortalidades están asociadas con bacterias patógenas del género *Vibrio* (Beaz-Hidalgo y col., 2010a; Paillard y col., 2004). Muchas de estas bacterias forman parte de la microbiota de los propios moluscos y, bajo condiciones de estrés como la variaciones de salinidad y pH o temperatura, la susceptibilidad del hospedador aumenta pudiendo desarrollar enfermedades. Por lo tanto, mantener unas condiciones idóneas durante el cultivo larvario va a ser esencial para controlar la aparición de agentes patógenos y evitar altas mortalidades durante este periodo (Tubiash y Otto, 1986; DiSalvo y col., 1978).

1.3.2.1 Parásitos

Los parásitos afectan a diferentes especies de moluscos bivalvos. La mayoría de los parásitos que afectan a moluscos bivalvos se encuentran dentro de los géneros *Perkinsus*, *Haplosporidium*, *Martelia* y *Bonamia*. Además, el calentamiento global y la exportación e importación de bivalvos han favorecido la expansión de enfermedades parasitarias en diferentes países (Short y col., 2017).

El género *Perkinsus* se encuentra asociado con mortalidades tanto en almeja fina como almeja japonesa (Figueras y col., 1992, 1996). Las especies *P. marinus* y *P. olseni* tienen un gran impacto en moluscos bivalvos y están incluidas en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de animales acuáticos por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE; http://www.oie.int).

Hay diversos estudios que analizan las elevadas mortalidades de *R. philippinarum* causadas por *Perkinsus spp* en Japón (Hamaguchi y col., 1998; Maeno y col., 1999), Corea (Choi y Park, 1997; Park y Choi, 2001) así como en la costa atlántica y mediterránea de la Península Ibérica (Rodríguez y Navas, 1995; Sagristá y col.,1996; Figueras y col., 1992). Además, estudios recientes están asociando mortalidades de almeja japonesa a la acción conjunta de *P. olseni* y el aumento de la temperatura del mar (Nam y col., 2018). Existen estudios sobre cómo la almeja fina cultivada en España y Portugal también se ve afectada por esta especie del género *Perkinsus* (de la Herrán y col., 2000; Montes y col., 2001; Casas y col. 2002; Villalba y col., 2005).

Perkinsus chesapeaki es otra de las especies de *Perkinsus* que afecta a almeja en Europa, donde en los últimos años se han descrito co-infecciones de esta especie y *P. olseni* en almeja fina y japonesa en Francia (Arzul y col., 2012) y Galicia (Ramilo y col., 2015).

Cuando una población de almejas se encuentra infectada por organismos del tipo *Perkinsus* aumenta el número de individuos con las valvas abiertas y no muy enterrados en el sustrato. Una de las lesiones que se pueden observar en los hospedares son unos granulomas blancos de gran tamaño incrustados en las laminillas branquiales, manto y pie (Park y Choi, 2001). Estos granulomas son las lesiones que más afectan al hospedador ya que pueden cubrir más de la mitad de la superficie comprometiendo la funcionalidad respiratoria de las branquias (Ruano, 1989). Además, Montes y col. (2001) y Figueras y col. (1996) observaron que el parásito utiliza las reservas energéticas del hospedador haciéndolo más susceptible a otros patógenos oportunistas y a cambios ambientales bruscos.

La haplosporidiosis es otra de las enfermedades que afectan a moluscos bivalvos y está causada sobre todo por las especies *Haplosporidium nelsoni y H. costales.* Estas especies han provocado grande mortalidades en *C. viriginica* desde la década de los 50 en Norteamérica (Andrews, 1996), pero también en otras especies de ostras como *C. gigas* en Norteamérica, Francia, Japón o Corea (Bower y col, 1994; Friedman y col., 1991a; Burreson y col., 2000; Renault y col., 2000) o en *O. edulis* en Galicia (Azevedo y col., 1999). Este

género también afecta a *R. decussatus* (Navas y col., 1992) pudiendo causar lesiones importantes en glándula digestiva y branquias.

Otra enfermedad que afecta a moluscos bivalvos y que también está en la lista de declaración obligatoria de la OIE es la Marteiliosis. Está causada por parásitos del género *Marteilia* y está presente en diferentes países del continente europeo donde afecta sobre todo a ostra plana, *O. edulis* (Berthe y col., 2000). En el 2012 esta enfermedad causó una mortalidad masiva en el berberecho (*Cerastoderma edulis*) de la ría de Arousa (Villalba y col., 2014). En Galicia también afecta al mejillón, *Mytilus galloprovincialis* y *M. edulis*, y a la navaja, *Solen marginatus* (Villalba y col., 1993; Ruiz y col., 2016). Lee y col. (2001). Itoh y col. (2005) describieron la presencia de parásitos de este género en *R. phlippinarum* pero sin ningún efecto perjudicial destacable, aunque abreieron la posibilidad de que al igual que en ostras, este parásito pueda afectar a las gónadas femeninas de almeja (Park y Chun, 1989).

Otra enfermedad de declaración obligatoria es la bonamiosis, que está producida principalmente por las especies *Bonamia ostreae* y *B. exitosa*. Consiste en una infección letal que afecta a los hemocitos, produciendo lesiones en manto y branquias. En Europa producen mortalidades desde los años 80 cuando *B. ostreae* fue detectada en Francia (Pichot y col., 1980) y de ahí se extendió a Holanda, España y Reino Unido (Cochennec y col., 2000). *B. exitiosa* fue detectada en Galicia por primera vez en 2007 (Abollo y col., 2008) y luego se propagó por países cercanos (http://www.oie.int).

1.3.2.2 Virus

Los virus causan mortalidades masivas en moluscos bivalvos debido a que se transmiten rápidamente y a su alta infectividad. Además, los bivalvos al ser filtradores pueden acumular rápidamente virus que se encuentran dispersos en el medio.

Se han detectado diversas familias de virus en diferentes especies de moluscos bivalvos, si bien la mayoría están asociadas a virus pertenecientes a las familias *Herperviridae* y *Picornaviridae*. Otras virus pertenecientes a las familias *Birnaviridae*, *Picornaviridae*, *Papovaviridae*, *Retroviridae*, *Reoviridae* y *Togaviridae* también pueden infectar a moluscos bivalvos (Renault y Novoa., 2004; Suffredini y col., 2014).

Debido a la falta de líneas celulares específicas, hasta el momento hay pocos estudios que hayan caracterizado a estos virus o confirmado su patogenicidad. Todo esto puede

cambiar debido a las nuevas técnicas de secuenciación masiva que nos ayudarán a tener una visión más amplia sobre este tipo de infecciones en moluscos bivalvos.

La neoplasia diseminada es una de las enfermedades virales letales en bivalvos se encuentra causada por retrovirus y afecta al sistema circulatorio. Afecta a diversas especies como *Cerastoderma edule*, *Venerupis aurea* y *Mya arenaria* (Oprandy y col., 1981 y 1983; Romalde y col., 2007; Manso y col., 2012). En la actualidad la implicación de los virus en la neoplasia diseminada está siendo cuestionada ya que se ha observado que la trasmisión de células cancerígenas entre los bivalvos podría estar detrás de esta patología (Metzger y col., 2016).

Novoa y Figueras (2000) fueron los primeros en describir la infección de almeja fina por un virus., causante de un episodio de mortalidad en Galicia durante un episodio de mortalidades. Se encontraron partículas víricas en el citoplasma del tejido conectivo, que se identificaron como virus pertenecientes a la familia *Picornaviridae*. Bateman y col. (2012) detectaron partículas víricas de esta familia en las branquias y glándula digestiva de almeja japonesa en Inglaterra

En cuanto a infecciones producidas por virus tipo Herpes, encontramos la primera detección en *C. virginica* (Farley y col., 1972). Este tipo de virus se han asociado a altas mortalidades en larvas de *C. gigas* tanto en Nueva Zelanda como en Francia (Hine y col., 2007; Le Deuff y col., 1994). Afecta a diversas especies de moluscos bivalvos, entre ellas a larvas de almeja japonesa (Renault y col., 2001 a-c).

1.3.2.3 Bacterias

Las bacterias están entre los principales agentes causales de mortalidades en moluscos bivalvos tanto en criaderos como en el medio natural. Muchas de estas bacterias patógenas forman parte de la microbiota de moluscos bivalvos que, debido a malas prácticas en el cultivo o condiciones de estrés como la variación de pH, temperatura o salinidades, hace que aumente la susceptibilidad del hospedador a bacterias patógenas oportunistas, pudiendo desarrollar enfermedades.

Como ya he mencionando anteriormente, la mayoría de los estudios sobre la microbiota de almeja se han centrado en la identificación de bacterias patógenas que puedan explicar las mortalidades repentinas. Hacen falta más estudios sobre la composición de la

microbiota de las almejas así como de los sistemas de cultivo que nos permitan identificar nuevos patógenos y que no solo se centren en la fracción cultivable de la microbiota.

I- Infecciones larvarias

En los estudios realizados hasta el momento, la mayoría de las mortalidades están asociadas a especies del género *Vibrio*. Este género está presente tanto en agua como en numerosas especies de moluscos bivalvos. La primera mortalidad asociada al género *Vibrio* en moluscos bivalvos fue descrita en 1959, denominando a la enfermedad "necrosis bacilar" (Guillard, 1959). Fue detectada en larvas de *Mercenaria mercenaria* que presentaban el velo dañado y movilidad reducida. Tubiash y col. (1965) realizaron ensayos en diferentes especies de moluscos bivalvos: *M. mercenaria*, *C. virginica*, *O. edulis*, *Aequipecten irradians* y *Teredo navalis*, y observaron cómo se producía un agrupamiento de bacterias en los bordes de las larvas o "swarming bacteriano" que terminaba con una necrosis bacilar, matando a las larvas a las 8 horas. No encontraron ningún signo de enfermedad en los ensayos realizados en ejemplares adultos.

Posteriormente se realizaron estudios en los que se incluyeron especies del género *Pseudomonas* como agente causal de la necrosis bacilar, pudiendo causar infecciones conjuntas con el género *Vibrio* (Lodeiros y col., 1987). Otros estudios con larvas de moluscos bivalvos también detectaron necrosis causadas por especies del género *Pseudomonas* (Sutton y Garrick, 1993).

La necrosis bacilar fue posteriorme renombrada como Vibriosis, ya que los principales agentes causales de esta enfermedad son especies del género *Vibrio*. Las especies responsables fueron descritas en un principio como *V. anguillarum, V. alginoliticus* y *V. tubiashii* (Tubiash y col., 1970; Brown y Losee 1978; DiSalvo y col., 1978). Desde entonces, se han publicado numerosos estudios de infección, así como descripciones de nuevas especies patógenos de moluscos bivalvos.

En un principio, muchos de los estudios identificaron a *V. splendidus* y *V. harveyi* como los principales responsables de estas vibriosis (Pujalte y col., 1999; Arias y col., 1999; Montilla y col., 1995; Castro y col., 2002) pero con el avance de las técnicas moleculares, muchas de estas especies han sido reclasificadas, como es el caso de *V. campbellii*, anteriormente identificado dentro de *V. harveyi* (Gómez-Gil y col., 2004; Thompson y col., 2007) o de *V. kanaloae*, *V. pomeroyi* y *V. chagasii* que se encontraban englobadas dentro de

V. splendidus y fueron reclasificadas por Thomson y colaboradores en 2003 (Thomson y col., 2003, a-d).

Muchas especies pertenecientes al género *Vibrio* como *V. splendidus*, *V. alginoyiticus*, *V. neptunius, V. ostreicida, V. coralliilyticus o V. pectenicida* han sido descritas como patógenos de larvas de diversas especies de moluscos bivalvos.

Vibrio splendidus está asociado con mortalidades larvarias en almeja fina y japonesa (Gómez-León y col., 2005; Saulnier y col., 2010). *V. alginoyiticus,* especie perteneciente al clado Harveyi, se ha descrito como patógeno de *Ruditapes decussatus* (Gomez-León y col., 2005), *M. mercenaria*, *O. edulis*, *A. irradians T. navalis* (Tubiash y col., 1965), *Argopecten ventricosus* y *Nodipecten subnodosus* (Luna-González y col., 2002).

Vibrio neptunius y *V. ostreicida* han sido identificados como patógenos de larvas de ostra (Prado y col., 2005, 2014). *V. coralliilyticus* también se ha asociado con mortalidades y ha sido descrito como patógeno de *C. gigas* y *C. virginica*. *V. pectenicida* se encuentra asociado con mortalidades de larvas de vieiras (Lambert y col., 1998).

Vibrio europaeus y *V. bivalvicida* son dos especies que actualmente están causando vibriosis en España (Dubert y col., 2016) y en Francia (Travers y col., 2014) y que pueden afectar al cultivo en fase larvaria de almejas (*R. decussatus* y *R. philippinarum*), ostras (*O. edulis, C. gigas*) o coquina (*Donax* trunculus) (Dubert y col., 2017). *V. celticus* también se ha descrito como patógeno de almeja fina y japonesa a partir de ensayos en el laboratorio (Beaz-Hidalgo y col., 2010b).

Puntualmente otros géneros bacterianos han estado vinculados con mortalidades larvarias, como por ejemplo, especies del género *Alteromonas* que han sido descritas como los responsables de mortalidades en larvas de *C. gigas* (Garland y col., 1983) o *Aeromonas hidrophila* que se ha detectado en larvas moribundas de *A. purpuratus.* (Riquelme y col, 1996).

II- Infecciones de juveniles y adultos.

En las fases adultas, los moluscos bivalvos son más resistentes a la vibriosis ya que su sistema inmunológico está ya desarrollado. Se conocen pocos patógenos asociados a mortalidades de juveniles y adultos. La enfermedad del anillo marrón, causada por *Vibrio tapetis*, y la mortalidad de verano, causada por otras especies de este género, son las principales enfermedades conocidas en adultas y juveniles. Otros géneros bacterianos se

asocian con enfermedades, como es el caso de *Aliiroseovarius*, que causa la enfermedad de ostra juvenil (JOD), o el género *Nocardia,* causante de la nocardiosis. Por otro lado, existen inclusiones intracelulares a que normalmente se asocian *Rickettsia* y que se relacionan con mortalidades masivas de moluscos

A) Enfemedad del anillo marrón

En 1996, Borrego y col identificaron a *V. tapetis* como el agente causal de la enfermedad del anillo marrón, la única enfermedad de etiología bacteriana conocida hasta el momento que afecta a almeja adulta. La enfermedad recibe este nombre debido a los depósitos de color marrón de conquiolina localizados en la línea paleal y por todo el borde interior de las valvas.

Como respuesta al ataque, la almeja excreta una matriz oscura, formada principalmente por conquiolina, en el que queda embebido el patógeno y donde se encuentra inhibido el proceso normal de biomineralización (Borrego y col., 1996; Paillard y col., 2004; Balboa, 2012). Una vez en el interior, el patógeno puede entrar en el sistema circulatorio y producirle la muerte a la almeja por una septicemia (Allam y col., 1998, 2002).

Esta enfermedad es uno de los factores limitantes para el cultivo de almeja en Europa, sobre todo para almeja japonesa, *R. philippinarum*. La primera vez que se describió la enfermedad fue en 1987 en la Bretaña francesa. Posteriormente, se extendió por el Noroeste y sur España, Norte de Portugal, Italia, Reino Unido y Noruega (Paillard y Maes, 1990; Castro y col., 1992; Figueras y col., 1996; Allam y col., 2000; Drummond y col., 2007; Paillard y col., 2009). En 2004 se detecta por primera vez en almeja japonesa en Asia, en las costas de Corea del Sur (Park y col., 2006) y más tarde, en el año 2008, en Japón (Matsuyama y col., 2010).

Por otro lado, en estudios con *R. philippinarum* se ha visto una diferente susceptibilidad a la enfermedad según el origen de la almeja. Drummond y col. (2007) observaron una mayor tasa de mortalidad en almejas gallegas con respecto a almejas irlandesas al inocularle el patógeno. Otro estudio con almeja japonesa procedente de Francia y Estados Unidos demostró una menor prevalencia de esta enfermedad en las almejas americanas en comparación a las francesas (Allam y col., 2001). Otros estudios experimentales han demostrado la mayor susceptibilidad de *R. philippinarum* (entre el 60-100%) a la infección en comparación con *R. decussatus* (entre el 20-40%) (Allam y col.,

2001; Paillard y col., 1997). Además de almeja japonesa, se han podido encontrar signos de la enfermedad en poblaciones naturales de otras especies de almejas (*R. decussatus*, *V. aurea* y *T. romboides*) (Paillard, 2004).

Maes y Paillard (1992) realizaron infecciones experimentales con *V. tapetis* en diferentes especies de moluscos bivalvos, incluyendo ostras (*O. edulis*, *C. gigas* y *C. virginica*), almeja (*M. mercenaria*), berberecho (*C. edulis*) y vieira (*P. maximus*), pero no encontraron ningún signo de la enfermedad en ninguna de las especies ensayadas (Maes y Paillard, 1992; Paillard y col., 1996).

La enfermedad del anillo marrón puede ser considerada una enfermedad de aguas frías debido a que su incidencia es mucho mayor en aguas como la de las costas gallegas, Portugal, Inglaterra, el Norte de Francia e Irlanda (Novoa y col., 1998; Paillard y col., 1994, 1997) y que *V. tapetis* tiene una temperatura óptima de crecimiento de15ºC (Paillard, 2004).

B) Mortalidad de verano

Esta enfermedad afecta sobre todo a juveniles de ostra del pacífico (*C. gigas*) en aguas con temperaturas superiores a los 18ºC. La primera vez que se detectó la mortalidad de verano fue en los años 40 en Japón. Después de esto se han descrito numerosas mortalidades masivas en otros países como Francia, Estados Unidos o Irlanda (EFSA, 2010), que ha llegado a causar pérdidas en la producción de hasta un 80%.

Al igual que en la enfermedad del anillo marrón y en las infecciones de larvas, el agente causal de estas mortalidades pertenece al género *Vibrio*. En un primer momento se identificó *V. splendidus* como el agente causal de estas mortalidades (Lacoste y col., 2001; Waechter y col., 2002; Gay y col., 2004). Aunque estudios posteriores en los que se analizaron ostras enfermas mediante técnicas moleculares, identificaron otras especies del género *Vibrio* (*V. aestuarianus* y *V. harveyi*) como posibles causantes de la enfermedad (Garnier y col., 2007; Allain y col., 2009; Azandégbé y col., 2010).

Hoy en día la hipótesis que tiene más fuerza es que la mortalidad de verano no sea causada por un único agente etiológico, sino que se deba a una interacción entre diferentes factores. El ambiente (temperatura, salinidad, concentración de nutrientes, baja cantidad de oxígeno disuelto y contaminantes) puede alterar las condiciones fisiológicas del hospedador, haciéndolo más susceptible a diferentes especies bacterianas oportunistas del género *Vibrio* y a virus de la familia *Herpesviridae* (Romalde y col., 2016).

C) Enfermedad de la ostra juvenil o Enfermedad de la ostra causada por Roseovarius.

Como su propio nombre indica, es una enfermedad que también afecta a ostra juvenil. En 1980 se detectaron mortalidades en juveniles de *C. virginica*. Las ostras presentaban una reducción del crecimiento, retracción del manto y depósitos de conquiolina, observándose mortalidades de hasta el 90% en ejemplares con un tamaño por debajo de los 25 mm (Bricelj y col., 1992; Davis y Barber, 1994; Lee y col., 1996; Lewis y col., 1996; Ford y col., 1996). El depósito de materia orgánica que se produce en el interior de las valvas se asemeja bastante a los que se encuentran en la enfermedad del anillo marrón.

En 2005 se identificó *Roseovarius crassostreae* como posible agente causal de la enfermedad (Boettcher y col., 2005). Será en 2007 cuando Maloy y col, demuestren que esta especie es la causante de la misma, y la denominen como enfermedad de la ostra causada por *Roseovarius* (ROD, *Roseovarius oyster disease*). Recientemente, esta especie se reclasificó como *Aliiroseovarius crassostreae* (Park y col., 2015).

Hasta el momento, esta enfermedad solo se ha detectado en *C. virginica*, afectando sobre todo a ostras juveniles cuando la temperatura del agua se encuentra por encima de los 20ºC (Bricelj y col., 1992, Davis y Barber, 1994; Ford y Borrero, 2001).

D) Nocardiosis

Al contrario que las anteriormente descritas en este capítulo, la nocardiosis está causada por bacterias Gram positivas pertenecientes al género *Nocardia*. Este género se encuentra asociado con mortalidades de ostra del pacífico, *C. gigas* en Japón, Estados Unidos, Canadá y Europa (Fujita y col., 1953, 1955; Koganezawa, 1975; Katkansky y col., 1974; Elston, 1993; Friedman y col., 1998; Engelsma y col., 2008). Además, también se han descrito mortalidades en ostra plana (*O. edulis*)(Engelsma y col., 2008, Bower et al., 2005, Lauckner, 1983) y recientemente, se ha detectado la presencia de *N. crassostreae* en mejillón (*M. galloprovincialis*) en el Golfo de Nápoles (Carella y col., 2013).

N. crassostreae es el causante de la nocardiosis, suele provocar la enfermedad a temperaturas por encima de los 20ºC, por lo tanto, suele estar asociados con mortalidades de verano (Friedman y col., 1991, 1998). Durante la enfermedad se pueden observar abscesos de color amarillo-verdoso en manto y branquia, aunque estos signos no se pueden considerar específicos de la nocardiosis (Bower y col., 2005; Carella y col 2013).

E) Patógenos intracelulares

Los patógenos intracelulares suelen encontrarse formando colonias incrustados principalmente en las branquias. Muchos estudios han asociado estos organismos con eventos de patogenicidad y mortalidades en moluscos a lo largo del planeta. Debido a que no suelen ser cultivables, este tipo de microorganismos está poco estudiado, pero la llegada de las nuevas técnicas de secuenciación hace posible aumentar el conocimiento sobre estas bacterias y conocer su abundancia en la microbiota general de moluscos bivalvos.

Las primeras bacterias intracelulares que se describieron fueron los RLO, detectados a finales de los años 70 (Harshbarger y col., 1977). Posteriormente se han observado infecciones y mortalidades en diferentes moluscos, incluyendo ostras y almejas (Zhu y col., 2012). Son bacilos Gram negativos intracelulares obligados, capaces de dividirse únicamente en las células del hospedador y que se transmiten a través del agua (Fournier y col., 2009).

Este tipo de microorganismos producen la muerte del hospedador mediante la destrucción celular y sin producir ningún tipo de toxina (Romero y col., 2000). Villalba y col. (1999) vieron como *Rickettsia* causaba hipertrofia y la lisis de las células epiteliales de *Venerupis rhomboides,* originando finalmente la muerte. No siempre se producen mortalidades, sino que muchas veces causan infecciones asintomáticas (Carballal y col., 2001; Jones, 2007; Sabry y col., 2011).

Los RLOs se han asociado con mortalidades de *Crassostrea ariankensis* desde 1992 en China, que solían producirse desde febrero a mayo y desde noviembre a diciembre cada año (Wu y Pan, 2000; Sun y Wu, 2004). También se han asociado con la pérdida de toda la producción de *Tegillarca granosa* en este mismo país durante los meses de marzo y septiembre (Zhu y col., 2012). En *Pinctada máxima* se han descrito mortalidades asociadas a *Ricketssia* en ejemplares de 4-6 meses (Wu y col., 2003). En otros moluscos bivalvos como abalones (*Haliotis cracherodii*, *H. rufescens* y *H. diversicolor*)(Gardner y col 1995; Moore y col 2000; Wu, 2003a) y almeja gigante (*Tridacna gigas*) (Norton y col., 1993a, 1993b) también se han descrito mortalidades asociadas a RLOs. En Galicia, se detectaron mortalidades en almeja (*V. rhomboides*) en la ría de Arousa (Villaba y col., 1999). En otro estudio realizado en Galicia de la microbiota de almeja fina (*R. decussatus*) y almeja japonesa (*R. philippinarum*) también se encontró una alta prevalencia de este tipo de microorganismos aunque no se asoció a mortalidades (Romalde y col., 2013).

El género *Rickttessia* ha sido descrito junto otros géneros como *Chlamydia* (CLO , del inglés *Chlamydia*-like organism) en vieiras (Morrison y Shum, 1982; Hine y Diggles, 2002) y mejillones (Cajaraville y Angulo, 1991; Svärd, 1999). Este tipo de infecciones, debido al parecido morfológico de los RLOs y CLOs, en la mayoría de los casos se han descrito como co-infecciones de ambos géneros.

Cano y col (2018) detectaron infecciones intracelulares de bacterias del género *Endozoicomonas* en vieiras. Los autores proponen la hipótesis de que ELOs (del inglés, *Endozoicomonas*-like organisms) se encuentren como simbionte cuando está en bajas proporciones pero que al aumentar la temperatura del agua se produzca un incremento de la población bacteriana afectando a las vieiras y pudiéndole causar la muerte.

1.3.2 Microorganismos probióticos

El cultivo de moluscos bivalvos está sujeto a muchos factores y uno de los más importante es el control de enfermedades y la aplicación de tratamientos contra patógenos. Al tratarse de organismos filtradores, la dispersión de patógenos a través del agua, así como la proliferación de bacterias oportunistas en el interior de los bivalvos, se produce con bastante rapidez.

El uso de antibióticos no siempre es válido para el control de bacterias patógenas ya que su uso se considera un riesgo debido a la dispersión de antibióticos en el ambiente y a la aparición de cepas con resistencias que puedan ser transmitidas a patógenos humanos (Verschuere et al., 2000). Por lo tanto, la alternativa para el control se puede realizar mediante dos vías: (I) Limitar en la medida de lo posible la entrada de microorganismos en el sistema de cultivo mediante diferentes métodos como por ejemplo el uso de biofiltros y ultravioleta, y (II) el uso de probióticos que ayuden a controlar los diferentes microorganismos patógenos.

Los probióticos son la alternativa más prometedora al uso de antibióticos y quimioterápicos. La definición más reciente de probiótico referente a la acuicultura fue definida por Lazado y Caipang (2014a, b) como “un microorganismo vivo o muerto o incluso un componente de un microorganismo, que a través de diferentes modos de acción confiere efectos beneficiosos al hospedador o a su entorno”. Anteriormente, Verschuere y col. (2000) lo había definido como “un aditivo microbiano vivo con efectos beneficiosos en el hospedador, que modifica la microbiota asociada al hospedador o el medio ambiente,

asegurando el uso óptimo de la alimentación o mejorando su valor nutricional, mejorando la repuesta del hospedador contra una enfermedad, o mejorando la calidad de su medio ambiente".

Existen pocos estudios sobre probióticos de moluscos bivalvos ya que la mayoría se centran en probióticos de peces y crustáceos. Lodeiros y col realizaron en 1989 el primer estudio de probióticos en moluscos bivalvos en el cual probaron en *Pecten ziczac* la eficacia de una cepa de *Flavobacterium* contra *V. anguillarum.*

Douillet y Langdon (1993) comprobaron el beneficio de una cepa de *Alteromonas sp.* en el cultivo larvario de *C. gigas*. Riquelme y col. (1996, 1997) ensayaron el efecto de *Pseudoalteromonas haloplanktis* y *Pseudomonas sp* en larvas de *Argopecten pupuratus* y demostraron la actividad antimicrobiana frente a diferentes especies del género *Vibrio.* Posteriormente, lograron mejorar el cultivo larvario de *A. pupuratus* mezclando especies del género *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Bacillus,* sin necesidad de usar antibióticos (Riquelme, 2001).

Hoy en día muchos probióticos han demostrado ser eficaces contra infecciones de diferentes bacterias patógenas o favorecer la supervivencia de diferentes moluscos bivalvos en estados larvarios. Géneros como *Aeromonas* se han probado con éxito en el cultivo de *C.* gigas contra infecciones de *V. tubiashii* (Gibson y col., 1998) y *Pseudoalteromonas* sp. se testó con éxito en el cultivo larvario de *P. maximus*. (Longeon y col., 2004). Estudios con bacterias lácticas y bacterias del género *Bacillus* demostraron el efecto beneficioso de estas en el cultivo larvario de *C. corteziensis* (Campa-Córdoba y col., 2011). *Phaeobacter gallaeciensis* es una de las especies con la que se han realizado diversos experimentos, demostrado su gran eficacia inhibiendo diferentes patógenos presentes en acuicultura (Prado y col., 2009) y en patógenos que afectan a *P. maximus* (Ruiz-Ponte y col., 1999) y *O. edulis* (Prado y col., 2006). Kesarcodi-Watson y col. (2012) observaron cómo cepas del clado *Roseobacter* proporcionaron protección a larvas de ostras y vieiras expuestas a patógenos.

Hay pocos estudios en los que se hayan ensayado probióticos contra patógenos de almejas o que afectan a la supervivencia de las almejas. Castro y col. (2002) aislaron diferentes especies de *Vibrio* y testaron su efecto inhibitorio. Encontraron 5 aislados pertenecientes a *V. tubiashi* que causaba efectos inhibitorios sobre *V. tapetis*, *V. anguillarum*, *V. fischeri* y *V. splendidus II*. Longeon y col (2004) realizaron un ensayo con *Pseudoalteromonas* para ver su actividad antimicrobiana en cultivos de larvas de *R. philippinarum* y *P. maximus,* sin tener resultados muy prometedores en la almeja japonesa.

Bourouni y col. (2007) aislaron de un muestreo de almeja fina (*R. decussatus)* diferentes cepas pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas, Vibrio*, *Serratia* y *Lactobacillus*, en los que encontraron efectos antagónicos contra especies del género *Aeromonas* (*A. hydrophila* y *A. salmonicida*) y *Vibrio* (*V. alginolíticus* y *V. anguillarum*), los cuales son patógenos comunes de peces y moluscos en acuicultura.

Sonh y col. (2016) realizaron ensayos con cepas de *Phaeobacter inhibens* y *Bacillus pumilus* contra vibriosis en ostra (*C. virginica),* vieira (*Argopecten irradians*), almeja americana (*M. mercenaria*), mejillón (*Mytilus edulis*) y navaja (*Ensis directus*). Solo obtuvieron resultados positivos contra la vibriosis en larvas de ostra y vieira.

1.4 NUEVAS TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN

Las nuevas técnicas de secuenciación han supuesto un avance muy importante en el mundo de la biología, y en especial en la microbiología, al universalizar una tecnología que permite obtener una gran cantidad de información de forma rápida y a bajo coste. Estas nuevas tecnologías han permitido ampliar el conocimiento de las comunidades microbianas presentes en diferentes ambientes, pudiendo estudiar las bacterias cultivable y acceder a la fracción no cultivable.

Por otro lado, mediante la metabolómica, metatranscriptómica y otras técnicas "ómicas" podemos analizar la expresión proteica y génica de las comunidades microbioanas y como interactúan entre ellas, como afectan a diferentes hospedadores y sus funciones metabólicas.

1.4.1 Secuenciación masiva del gen ARNr 16S

El gen de la subunidad ribosomal pequeña 16S fue seleccionado por Carl Woese en 1977 como un buen marcador genético para la identificación, clasificación filogenética y evolutiva de los organismos procariotas. Uno de los principales obstáculos al estudio de la comunidad bacteriana de un ambiente era la limitación de las técnicas de secuenciación (técnicas de primera generación), como el método de Sanger, que solo permitía el estudio de aquellos microorganismos cultivables y aislados. Esta tecnología fue desarrollada por Fred Sanger y su equipo y por la cual recibieron el premio Nobel en el año 1980. Posteriormente,

este método se automatizó y mejoró, permitiendo secuenciar diferentes fragmentos de nucleótidos, haciendo posible secuenciar el genoma humano entre 1990 y 2003. Además, esta tecnología fue la que sentó las bases para poder desarrollar las nuevas técnicas de secuenciación o técnicas de segunda generación, NGS (del inglés, *Next Generation Sequencing*). La ventaja principal de estas técnicas de segunda generación, es que pueden realizar millones de reacciones de secuenciación de alto rendimiento de forma paralela y secuenciar todo el ADN de un conjunto de muestras en un solo esfuerzo de secuenciación. Cabe destacar que hasta el momento ninguna de las técnicas desarrolladas (2ª y 3ª generación) presenta una tasa de error igual o menor que la obtenida por el método de Sanger. Sin embargo, la cantidad de información obtenida es mucho mayor con respeto a las tecnologías anteriores.

El primer secuenciador de segunda generación se desarrolló en 2004, empleando la ténica de la pirosecuenciación y fue rápidamente relevado por su sucesor 454 Life Science en 2005. Estos primeros secuenciadores ofrecían lecturas de 100 a 150 pares de bases y ofrecían 20 mb por esfuerzo de secuenciación. La plataforma 454 (Roche) ha ido mejorando durante años hasta que en 2009 obtuvo un resutlado alrededor de 600 mb con lecturas de hasta 1000 pares de bases con el 454 GS FLX+. Por otro lado, Solexa en 2006 desarrollo otra plataforma basada en la tecnología Sanger con la que lograba obtener 1 Gb en un solo esfuerzo de secuenciación, pero con fragmentos muy cortos de unos 35 pares de bases. Posteriormente Illumina, usando el método desarrollado por Solexa, mejorando la técnica, desarrolló diferentes tipos de secuenciadores a lo largo de los años, siendo la plataforma más utilizada hasta momento, capaces de obtener lecturas de 2 × 150 y 2 × 300 pb (utilizando diferencias estrategias de secuenciación, "paired end" o "singled end"), rindiendo múltiples Gb de información en pocas horas. El secuenciador más potente que tiene Illumina en la actualidad es NovaSeq, en menos de 2 días obtiene con un solo esfuerzo de secuenciación 1000 Gb de información a partir de lecturas de 2 x 150 pb (www.illumina.com)

El gen ARNr 16S tiene una longitud de 1542 nucleótidos y está compuesto por 9 regiones hipervariables intercaladas por regiones más conservadas (Baker y col., 2003). Estas regiones hipervariables, proporcionan mucha información, desde un punto de vista taxonómico y filogenético, permitiendo diferenciar mejor los taxones bacterianos entre ellos. A la hora de realizar un estudio de la microbiota a partir del la secuenciación masiva del gen 16S ARNr es necesario realizar la amplificación de 1 o 2 de estas regiones hipervariables, ya

que una de las limitaciones de la NGS es que genera lecturas muy cortas de forma que tras los ensamblajes obtendremos amplicones de entre 250 y 500 pb (www.illumina.com). Por este motivo, la elección de la región a amplificar es uno de los factores clave para realizar un estudio y así poder analizar la variabilidad presente en una muestra. El origen de la muestras, así cómo el objetivo del estudio, también es importante a la hora de seleccionar unas regiones u otras. Klindworth y col. (2013) determinaron en sus estudios que las regiones V3-V4 proporcionan más información y por lo tanto el uso de una pareja de cebadores degenerados ayudaría a obtener mejores resultados. Chakravorty y col. (2007), vieron que la región V1 era útil para diferenciar entre bacterias patógenas del género *Streptoccocus y* entre especies de *Staphylococcus.* Por otro lado, Liu y col. (2007, 2008) observaron que las regiones V4/V5 eran las que aportaban más información para estudiar la microbiota presente en el intestino. Huse y col (2008) compararon muestras del intestino y de las fumarolas marinas y observaron que la región hipervariable V3 aportaba mucha más información que la región V6.

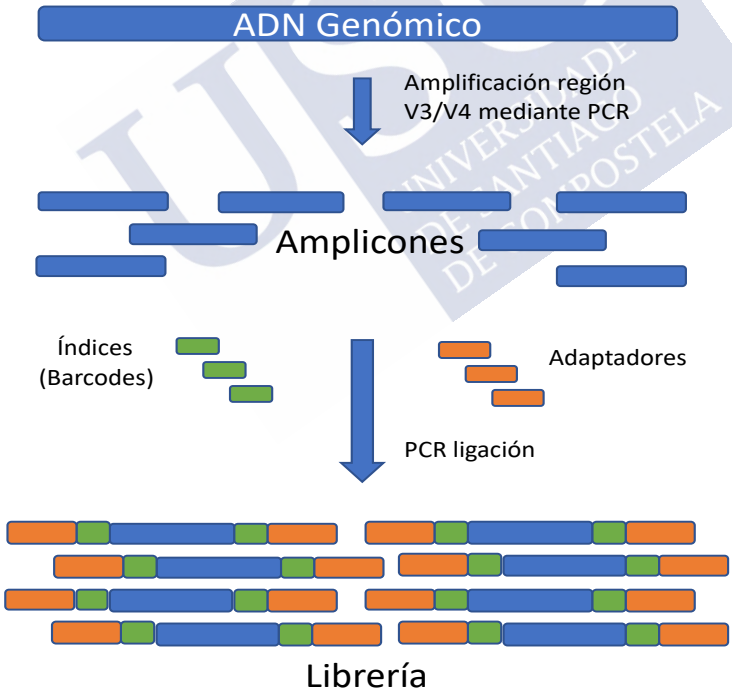

Figura 1.5. Esquema elaboración de librerías para la secuenciación masiva del gen ARNr 16S. Figura adaptada de www.illumina.com.

Una vez que se selecciona la región de amplificación y los cebadores correspondientes, se realiza una amplificación para así obtener amplicones de la región o

regiones hipervariables seleccionadas. A estos amplicones se les inserta a cada lado los adaptadores, que son secuencias oligonucleotídicas iguales para todas las muestras, que serán los que hibriden luego en una matriz de oligos específica para cada plataforma de secuenciación. Posteriormente se insertan los índices o "barcodes", oligonucleótidos con secuencias diferentes para cada muestra, permitiendo diferenciar de que muestra proviene cada secuencia. Este último paso permite reducir el tiempo y la cantidad de reactivos al poder realizar la secuenciación de varias muestras en un solo esfuerzo de secuenciación, y por tanto abaratar costes. De esta forma ya tenemos preparada nuestra librería, que consiste en el conjunto de fragmentos de ADN que ya están preparados para ser secuenciados.

Una vez creada la librería, dependiendo de la plataforma que utilicemos, va ser necesario realizar un paso previo a la secuenciación que consiste en una amplificación de las diferentes secuencias, de forma que se obtienen varios clones de cada secuencia de las librerías . La secuenciación correspondiente puede realizarse mediante diferentes plataformas (Morey y col., 2013) aunque hoy en día la más utilizada es Illumina.

En el caso de Illumina, se introducen las secuencias desnaturalizadas en una superficie que contiene oligos a los que se van a unir los adaptadores. Una vez unido se realizan copias de cada una de las secuencias mediante una PCR puente (del inglés, *bridge*-PCR). Se agregan dNTP y la polimerasa, se alargan las secuencias y se vuelven a desnaturalizar, repitiendo el ciclo hasta generar clusters formados por millones de copias de cada secuencia.

El segundo paso es la secuenciación, que consiste en unas secuenciación por síntesis a la cual se van añadiendo nucleótidos marcados con fluróforos. Cuando que un nucleótido se une, se para la reacción y se obtiene una señal del color emitido por el nucleótidos más el fluoróforo correspondiente y así sucesivamente de forma que solo se añade una base de cada vez. Una vez realizada la secuenciación de toda la secuencia, esta se elimina y se vuelve a empezar el proceso.

Hoy en día existen ya "Tecnologías de secuenciación de tercera y cuarta generación" en las que se obtiene grandes cantidades de información, pero donde el error de secuenciación es mucho mayor. Una de las mayores ventajas que ofrece con respecto a las plataformas anteriores es que no es necesario una amplificación previa de las secuencias ya que su tecnología se basa en la secuenciación de una única molécula, SMRT (del inglés, *Single-molecule real-time*). Las plataformas de Pacific Biosciences (Pac-Bio) (3ª generación) y de Oxford Nanopore (4ª generación) serían dos ejemplos. La plataforma Pac-Bio consiste en

chips formados por multitud de pocillos en el cual se encuentran enzimas polimerasas modificadas, donde se van incorporar nucleótidos con fluoróforos unidos al grupo fosfato (Liu y col., 2012). La secuenciación se basa en la detección óptica de la señal al incorporarse los nucleótidos marcados formando imágenes de la secuenciación a tiempo real (Timp y col., 2010). En el caso de Oxford Nanopore, la secuenciación se basa en la detección del cambio en la corriente iónica como consecuencia del paso de los nucleótidos de la molécula de ADN a través de un poro. Esta porina se encuentra embebida en una membrana a través de la cual pasa una corriente iónica

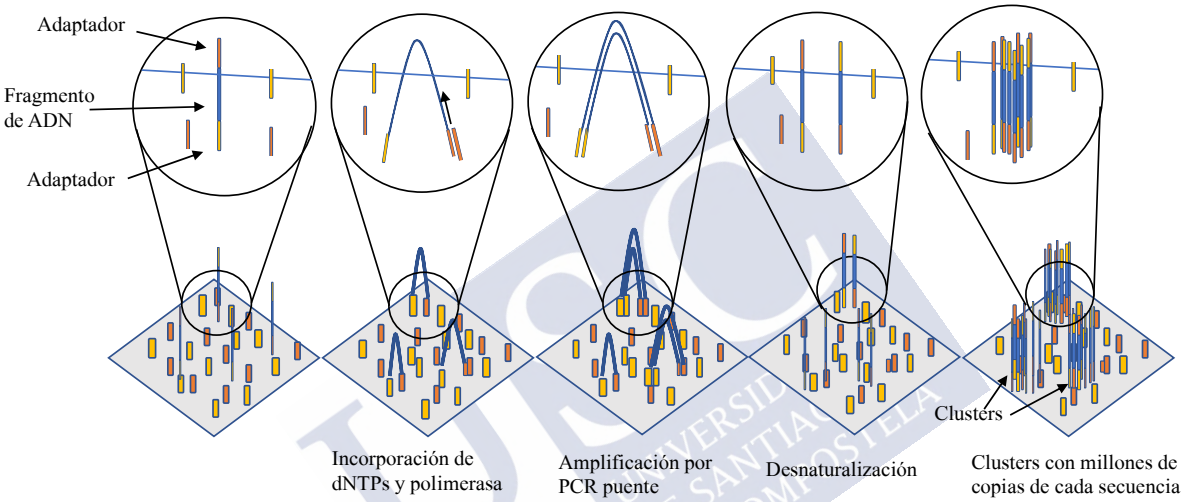

Figura 1.6. Esquema amplificación de las secuencias de las librerías generadas y secuenciación mediante la tecnología illumina. Figura adaptada de www.illumina.com

El número de publicaciones en las que se han utilizado tecnología NGS ha ido en aumento desde su aparición, apareciendo múltiples aplicaciones de estas técnicas en diferentes campos de investigación. Hoy en día existen otros métodos a parte del análisis del gen ARNr 16S que nos ayudan a obtener gran información sobre la microbiota presente en un ambiente, como son el análisis del metagenoma y del metatranscriptoma

La metagenómica consiste en el estudio de todos los genomas con sus correspondientes genes presentes en una muestra que nos permite identificar los microorganismos presentes en un ambiente sin necesidad de obtener un cultivo puro. Se puede realizar una aproximación estructural, en la cual se estudia la composición de una comunidad microbiológica, pudiendo estudiar las rutas metabólicas de un microbioma para así intentar entender las funciones biológicas y ecológicas que pueden cumplir los miembros

de la comunidad. Por otro lado, se puede realizar una aproximación funcional mediante el análisis de las secuencias codificante para proteínas, CDS (del inglés, *protein coding sequences*). En este caso se trata de estudiar la funcionalidad de los genes presentes en un metagenoma, pudiendo detectar en el metagenoma genes que estén involucrados en alguna función específica de interés para el estudio.

La metatranscriptómica consiste en el estudio de la expresión de los genes y su función dentro de la comunidad microbiana. Permite un análisis funcionarial de la microbiota presente en un estudio mediante el estudio del ARN de la muestra, de forma que se analicen qué genes se expresan o cuales se expresan más dentro de un una comunidad o la expresión diferencial bajo diferentes condiciones.

Todas estas nuevas herramientas están permitiendo un estudio más profundo de las comunidades microbianas en diferentes ambientes, el descubrimiento de nuevos genes, enzimas, productos naturales, compuestos bioactivos y bioprocesos con grandes aplicaciones industriales, biotecnológicas, biomédicas, etc. (Chaugan, 2019).

1.4.1 Secuenciación del genoma bacteriano

El desarrollo de las nuevas plataformas de secuenciación ha hecho posible la reducción de los costes y el tiempo de secuenciación de genomas y metagenomas, haciendo posible que actualmente tengamos a nuestro alcance un gran volumen de datos e información. El número de genomas depositados en bases de datos públicas ha aumentado de manera exponencial en los últimos años desde 4.434 genomas bacterianos secuenciados en el 2009 hasta más de 150.000 en la actualidad (GOLD, 2019).

Debido a la gran cantidad y complejidad de datos generada por estas nuevas tecnologías, a lo largo de estos últimos años también se han ido han desarrollando nuevas plataformas y herramientas que ayudan a manejar y analizar todos los datos generados.

1.4.1.1 Análisis comparativo de genomas

En el campo de la taxonomía, sistemática y filogenia, la secuenciación del gen ARNr 16S junto a otros genes conservados se sigue usando como una aproximación preliminar para la definición de nuevos taxones y establecer su relación evolutiva, aunque en muchas

ocasiones la información que proporcionan estos genes a nivel de especie es de baja resolución. Las nuevas técnicas de secuenciación y el aumento del número de genomas bacterianos han sido una verdadera revolución en este campo debido a la gran información que se obtiene a través de los genomas completos. Además, hoy en día se han elaborado diferentes herramientas y algoritmos que permiten una mejor comparación entre diferentes microorganismos mediante la comparación de sus genomas.

Antes de la aparición y el aumento en las bases de datos de secuencias de genomas completos una de las técnicas más utilizadas para la comparación o descripción de nuevos taxones bacterianos era la hibridación ADN-ADN *in situ*. Tras la aparición de las nuevas técnicas de secuenciación, esta técnica fue sustituida por la comparación *in silico* de los genomas, la cual proporciona una información equivalente a la obtenida mediante la técnica clásica *in situ*. Konstantinidis y Tiedje (2005) desarrollaron la primera herramienta para realizar la comparación entre genomas, lo denominaron Promedio de Identidad Nucleotídica (ANI, del inglés *Average Nucleotide Identity*), en la cual se realiza una comparación entre los genes conservados de un par de genomas. Posteriormente, Goris y col. (2007) y Richter y Roselló (2009) propusieron dos nuevos algoritmos, ANIm y ANIb respectivamente, en los cuales se realiza una simulación de la fragmentación del genoma tal y como ocurría en la hibridación en *in situ*. Estos algoritmos calculan los valores ANI mediante una especificidad direccional, lo cual supone que el valor de ANI calculado entre dos genomas varía según se escoja uno u otro genoma como el de referencia, aunque con diferencias poco relevantes en la mayoría de los casos. El límite establecido, tanto para el ANIm como para el ANIb, para la definición de nueva especie fue establecido entre el 95-96%. Lee y col. (2016) desarrollaron otro algoritmo de forma que se obtiene un único valor para dos genomas, más rápido que el ANI original. En este caso también se produce la fragmentación de los genomas y solo se utilizan para el cálculo aquellos pares de fragmentos ortólogos (que provienen de un mismo gen, son homólogos, y cuya divergencia se debe a un proceso de especiación)

Existen otras herramientas para comparar genomas en los que no se produce la fragmentación de los genomas sino que se basan en el alineamiento de sus secuencias mediante BLAST (Alstchul y col., 1990) o BLAST+ (Camacho y col., 2009) generándose unos HSPs (del inglés, *High Scoring Segment Pairs*), que se emplean para el cálculo de las distancias. Este algoritmo fue desarrollado por Henz y col., (2005) a partir del cual se obtiene el índice GBDP (*Genome* BLAST *distance Phylogeny*), posteriormente mejorado por Meier-

Kolthoff (2013) quién añadió intervalos de confianza al algoritmo. El valor de delimitación de especie usado en este método es el mismo que se usaba para la hibridación clásica (70%).

Hoy en día existen ya herramientas online que permiten realizar estos análisis de manera rápida y sencilla como son el JSpecies (ANIm y ANIb) (http://jspecies.ribohost.com), OAT (OrtoANI) (https://www.ezbiocloud.net/tools/orthoani) o el GGDC (GBDP) (https://ggdc.dsmz.de), facilitando el trabajo a los investigadores.

Por otro lado, el aumento de la secuenciación de genomas ha hecho que se desarrollen unos requerimientos mínimos a la hora de hacer un deposito en las bases de datos públicas, con el fin de mejorar las calidad de los genomas depositados (Kottman y col, 2009).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2.
OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2 OBJETIVOS

El cultivo de moluscos bivalvos constituye una actividad de gran importancia económica para Galicia y en especial el cultivo de almeja a pie de playa, que supone una actividad socioecómica muy importante, al ser una de las principales fuentes de ingresos para muchas familias de las rías gallegas.. La gran demanda de este producto tanto en Galicia como en el resto de España ha tenido como consecuencia la sobreexplotación de los bancos naturales de los cuales se extraían la semillas, lo que ha llevado a la importación de almejas de otros países, introduciendo nuevos patógenos en el ambiente.

El estudio de la microbiota asociada a almejas es de vital importancia para tratar de conocer nuevo patógenos que puedan afectar a estos moluscos bivalvos, aumentar nuestro conocimiento sobre la interacción de diferentes grupos de bacterias y el hospedador, conocer el estado sanitario de una población y desarrollar estrategias de control o prevención ante la aparición de una enfermedad.

Todos los estudios que existen hasta el momento sobre la microbiota de almeja están centrados en la búsqueda de patógenos y especies del género *Vibrio* pero la llegada de las nuevas técnicas de secuenciación hace posible realizar nuevos estudios que nos permitan obtener una idea más profunda de la diversidad microbiana presente en las almejas, pudiendo no estudiar tanto los organismos cultivables como los no cultivables.

El presente trabajo se centra en el estudio de la microbiota asociada a almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*). Bajo estas premisas se han establecido como objetivos específicos:

1. Analizar comparativamente la diversidad taxonómica de la microbiota asociada a poblaciones adultas de almeja fina y japonesa mediante de secuenciación masiva del gen 16S ARNr.
2. Aislamiento y cultivo in vitro mediante la técnica "dilución a extinción" de aquellos microorganismos no cultivables mediante metodología clásica y que puedan jugar un papel clave en el hospedador.
3. Secuenciación y análisis del genoma completo de aislados de almeja para la identificación de nuevos taxones bacterianos.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A ALMEJA FINA Y JAPONESA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GEN ARNr 16S.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3 ESTUDIO DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A ALMEJA FINA Y JAPONESA MEDIANTE SECUENCIACIÓN MASIVA DEL GEN ARNr 16S.

El desarrollo de las técnicas de secuenciación de segunda generación (NGS) ha supuesto una revolución en el estudios de la comunidad microbiana en diferentes organismos y ambientes. Algunos de los estudios de la microbiota de moluscos bivalvos realizados empleando estas técnicas se han centrado en el estudio de la microbiota total presente en el hospedador o un órgano en concreto (Trabal y col., 2014; Lokmer y col., 2015; Roterma y col., 2015; Lasa y col., 2016), mientras que otros han estudiado la variación de la microbiota entre diferentes órganos y tejidos (Lokmer y col., 2016, Vezzulli y col., 2017). En todos ellos se ha puesto de manifiesto la gran diversidad bacteriana presente en los moluscos bivalvos.

Todos los estudios realizados hasta el momento de la microbiota asociada a la almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y japonesa (*Ruditapes philippinarum*) se han centrado en las bacterias cultivables, donde los géneros predominante eran *Vibrio* y *Psuedoalteromonas* (Romalde y col., 2013; Balboa y col., 2016; Leite y col., 2017).

La aplicación de las nuevas técnicas de secuenciación puede ayudar a tener un visión más profunda y real sobre la microbiota asociada a las almejas. En el presente capitulo hemos realizado un estudio de la microbiota asociada a almeja fina y almeja japonesa, durante los meses de abril y octubre, en dos localizaciones de la costa gallega (Redondela y Carril) mediante la secuenciación masiva de las regiones hipervariables V3 y V4 del gen ARNr 16S.

3.1 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.1 Muestreo y procesado de las muestras

Los muestreos de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) se realizaron en las localizaciones de Redondela (42°17'40.4" N 8°36'57.2" W) y Carril (42°36'50.4" N 8°46'39.1" W) en dos períodos del año 2015 (finales de invierno-principios de primavera y finales de verano-principios de otoños). Durante los muestreos, la temperatura registrada del agua en abril fue alrededor de 14ºC en Carril y de 13 ºC en

Redondela, mientras que en el mes de octubre se registraron temperatura más elevadas tanto en Carril (16.5ºC) como en Redondela (15ºC). Se muestrearon un total de 25 ejemplares de cada especie en cada localización y en cada tiempo. A cada uno de los ejemplares se les extrajo asépticamente el manto, hepatopáncreas, gónada y branquia. Cada órgano de los 25 ejemplares de cada muestreo se homogenizó conjuntamente en PBS. Las muestras se conservaron a -20ºC hasta la extracción del ADN.

Antes de la extracción de ADN, se realizó una concentración de las células bacterianas presentes en cada muestra con el fin de separar las células eucariotas de las procariotas. Se realizó mediante la creación de un gradiente usando OptiPrep (Sigma), un medio de densidad de gradiente compuesto por una solución de iodixanol al 60%. Para la creación del gradiente se diluyó el optiprep en una solución de: 0,25 M sacarosa, 6 mM EDTA, 60 mM Tris-HCl a pH 7,4. De esta forma se obtuvieron soluciones con iodixanol al 14%, 25% y 55% (v/w). Se inocularon 4 ml de cada solución en un tubo de ultracentrífuga, inoculando primero la solución de 55% de iodixanol, la de mayor densidad, seguido del iodixanol al 25% y al 14%. Por ultimo, se inocularon 10 ml de cada muestra y se centrifugó a 3800 rpm durante 60 min a 4-10ºC. Una vez realizada esta centrifugación, se recolectó la capa superior y se centrifugó otros 60 min a 5300 rpm a 4ºC. Se eliminó el sobrenadante y se realizó un lavado del pellet con 2 ml de PBS mediante una centrifugación a 13000g durante 30 min. Por último, el pellet resultante se resuspendió en 1 ml de PBS.

Para la extracción del ADN genómico se utilizó el kit Masterpure Complete DNA and RNA purification (Epicentre Biotechnology) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y calidad del ADN se determinó mediante electroforesis en un gel de agarosa (agarosa al 1% p/v en un buffer de Trisacetato-EDTA [TAE]). El ADN extraído se conservó a -20ºC hasta su amplificación.

3.1.2 Amplificación y secuenciación

Para la amplificación de las regiones hipervariables V3 y V4, se utilizaron los cebadores diseñados por Lee y col. (2012),
338F (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') y 806R (5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Las condiciones de la PCR utilizadas para la amplificación se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Condiciones de la PCR para la amplificación de las regiones V3 y V4 del gen ARNr 16S con los cebadores 338F y 806R

Ciclos		**Temperatura**	**Tiempo**
Desnaturalización inicial		94ºC	2 minutos
Desnaturalización	30 ciclos	94ºC	20 segundos
Hibridación		52ºC	30 segundos
Elongación		72ºC	30 segundos
Elongación final		72ºC	7 minutos

Mediante un gel de agarosa al 2% (p/v) en TAE y usando el marcador GreenSafe DirecLoad (NZytech) se verificó la producción de los amplicones. La cuantificación de la concentración del ADN se realizó con el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher).

Una vez obtenidos los amplicones, la creación de librerías y secuenciación de la muestra se realizó en el servicio de secuenciación de Sistemas Genómicos (Valencia, España) usando la plataforma Miseq de Illumina, generando lecturas de secuencias *paired end* 250 pp x 2, obteniéndose tras el ensamblado secuencias de unas 450 pares de bases.

3.1.3 Análisis bioinformático

3.1.3.1 Análisis de las secuencias

La calidad de las lecturas obtenidas en la secuenciación se analizó con el programa FASTQC (Brabaham Bioinformatics), que genera un informe sobre el número, calidad y longitud de las secuencias, la presencia de adaptadores y cebadores. La eliminación de los adaptadores, cebadores y bases de baja calidad se realizó con el programa informático Trimmomatic 0.32 (Bolger y col., 2014). Para ello hizo falta configurar diferentes parámetros dentro del programa:

ILLUMINACLIP: Elimina de las lecturas los adaptadores y secuencias especificas de Illumina.

SLIDINGWINDOW: realiza una limpieza mediante el método "ventana deslizante". Se seleccionó el parámetro 4:15, de forma que si el promedio de calidad de los primeros 4 nucleotidos del extremo 5´ tiene una calidad por debajo del umbral 15, esta secuencia será eliminada.

LEADING: Corta las bases del inicio de las lecturas que se encuentren por debajo del umbral de calidad seleccionado. Fue seleccionado el umbral de calidad 3

TRAILING: Corta las bases del final de la lectura que se encuentre por debajo del umbral de calidad. Se seleccionó el umbral de calidad 3.

MINLEN: Elimina las secuencias que sean menores a la longitud seleccionada. Se seleccionó eliminar aquellas secuencias menores de 200 pb

En nuestro caso, al tratarse de lecturas "paired-end", el programa Trimmomatic realiza un análisis en el cual verifica que cada par de lectura este presente tanto en la lectura en sentido 5´→ 3´ como en sentido 3´→ 5´. Se generan 2 archivos *paired* (*forward* y *reverse*) en los cuales están presente los dos pares de lecturas y 2 archivos *unpaired* en las que no están presente un par de una de las lecturas.

El siguiente paso consistió en unir (en inglés, *Merging*) mediante el programa Fastq-join las lecturas que se encuentran en los archivos *paired*, de forma que se obtuvo un único archivo con todas las lecturas ensambladas. Los parámetros utilizados en el Fastq-join fueron:

p: indica el porcentaje máximo de diferencia que tienen que tener los nucleótidos para que se unan las dos lecturas. El valor de p en los análisis fue 2.

m: que indica el número mínimo de nucleótidos que tienen que superponerse para realizar la unión de las dos lecturas. El valor de m en los análisis fue 33.

Posteriormente se procedió a la localizar y eliminar aquellas secuencias quiméricas originadas en las muestras. Estas secuencias son fallos producidos durante la amplificación, de forma que se obtiene una secuencia formada con dos secuencias de orígenes diferentes. Para ello se utilizó el programa vsearch (Rognes, 2016)

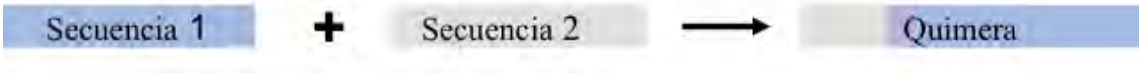

Fig 3.1. Esquema formación de quimeras. Figura original.

3.1.3.2 Análisis taxonómico

Una vez ensambladas y limpias las secuencias se procedió a su análisis mediante la herramienta online Silva (Quast y col., 2013). Mediante esta herramienta se realizó un control de calidad en el que se eliminaron todas aquellas lecturas con más del 2% de ambigüedad o homopolímeros y aquellas lecturas con menos de 50 nucleótidos alineados. También se excluyeron aquellas lecturas con una baja calidad de alineamiento, eliminando de esta forma cualquier artefacto o contaminación en el análisis. Para realizar el agrupamiento de las secuencias se seleccionó un umbral de similitud del 98%, de forma que todas aquellas lecturas que fueron similares en un 98% conformaron una Unidad Taxonómica Operacional, OTU (del ingles, *Operational Taxonomic Unit*). Además, la herramienta Silvangs, mediante cd-hit-est (version 3.1.2; http://www. bioinformatics.org/cd-hit) (Li and Godzik, 2006), identifica las lecturas idénticas (dereplication) y agrupa las lecturas únicas (OTUs). Para la clasificación de las OTUs se empleó la base de datos Silva (versión 132; http://www.arb-silva.de).

Una vez obtenida la asignación taxonómica de las muestras, se eliminaron aquellas lecturas asignadas a mitocondrias, cloroplastos, así como las no asignadas a ningún grupo taxonómico. Todos aquellos grupos taxonómicos que presentaron menos del 1% de abundancia relativa sobre el total de la muestra, no se tuvieron en cuenta para el análisis de los resultados.

3.1.3.3 Análisis de diversidad

Existen diferentes índices que nos permiten analizar la diversidad presente en una muestra e incluso comparar la diversidad entre varias muestras o ambientes. Por lo general, microbiología, la diversidad se describe en términos de la diversidad en una muestra (diversidad Alfa) y la diversidad entre muestras (diversidad Beta).

Diversidad Alfa: se define como la riqueza de especies (número de taxones) que se encuentran dentro de un hábitat determinado o ambiente (Whittaker, 1960). La diversidad alfa puede asociarse con las curvas de rarefacción, que en nuestro caso se obtuvieron a partir de la herramienta online Silvangs (https://ngs.arb-silva.de/silvangs). El análisis de rarefacción consiste en una normalización de los datos que nos permite visualizar la diversidad presente entre diferentes comunidades cuando el tamaño de la muestra no es igual, midiendo el número

de OTUs que se encuentra en cada muestra. En las curvas de rarefacción se representa el número de lecturas frente el número de OTUs esperado.

$$E(S) = \sum_{i-1}^{S} \left(1 - \left[\frac{\binom{N - N_i}{n}}{\binom{N}{n}} \right] \right)$$

E(S) = numero esperado de especies u OTUs.
N= número total de individuos en la muestra o lecturas.
Ni= número de individuos de la iésima especie o OTU.
n= tamaño de la muestra estandarizado.

Además, la curva de rarefacción nos da una estimación del éxito de la secuenciación, de forma que si la curva no llega a la fase estacionaria, significa que no se ha alcanzado el número máximo de OTUs presente en la muestra y aumentando el esfuerzo de secuenciación obtendríamos más información de la diversidad presente en la muestra. Por otro lado, si la curva llega hasta la fase estacionaria, no haría falta realizar una secuenciación más profunda puesto que ya hemos alcanzado el número máximo de OTUs que están presentes en la muestra.

Otro índice generado a través de la herramienta Silvangs fue el índice Chao-1, que es otra forma de calcular la diversidad alfa de una muestra. Mediante Chao-1, se estima el número de taxones en una comunidad en base al número de especies raras (Taxones que aparecen 1 o 2 veces) en las muestras (Chao, 1984; Chao y lee, 1992; Smith y Van Belle 1984).

$$Chao\ 1 = S + \frac{a^2}{2b}$$

S= número de especies en una muestra.
a= número de especies en la muestra que están representadas solamente por un único individuo.
b= número de especies en la muestra representa por 2 individuos.

Diversidad Beta: se define como la diversidad a lo largo de un gradiente o entre distintos hábitats (Whittaker, 1960). Consiste en la comparación de la diversidad de las comunidades microbianas entre diferentes ambientes, o dicho de otra forma, las diferencias entre los perfiles de abundancia taxonómicos de diferentes ambientes o muestras. Para calcular la diversidad beta utilizó la herramienta CLC Genomics Workbench 10.1.1 (CLC Bio, QUIAGEN Company, Aarhus, Dinamarca). En primer lugar se obtuvo una matriz de

distancias entre las muestras usando la distancia de Bray-Curtis, analizando de esta forma las diferencias en la composición (OTUs) entre las muestras. El segundo paso consistió en calcular la diversidad beta y generar el análisis de las coordenadas principales, PCoA (del inglés, *Principal Coordinates Analysis).*

Utilizando el Paquete R VEGAN (Clarke, 1993; Oksanen 2017) se realizaron análisis con otros parámetros para determinar si las muestras se agrupaban de la misma forma que lo observado con el PCoA y así definir mejor las diferencias entre las comunidades microbianas. Por un lado, se elaboró una matriz de similitud aplicando las distancia de Bray-Curtis a partir de la cual se realizó el escalamiento multidimensional no métrico, NMDS (del inglés, *Nonmetric Multidimensional Scaling*). Por otro lado, se realizó el análisis de similitudes ANOSIM (del inglés, *Analysis of similarities*), con el cual comprobamos estadísticamente si existen diferencias significativas entre dos o más grupos de unidades de muestreo. Para ello se comparan los rangos de distancias entre los grupos con los rangos de distancia dentro de los mismos. Posteriormente se comparan las medias de ambos tipos de rangos, el valor resultante del test estadístico (R) mide si existe una separación entre ellos, de forma que un valor cercano a 0 indica que las comunidades microbianas son semejantes, mientras que un valor cercano a 1 indica que esa comunidad es diferente. Por otro parte, un valor $p<0,05$ indica que los resultados obtenidos mediante este análisis son significativos

Finalmente, se elaboró un diagrama de VENN utilizando la aplicación Venny (http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html), para determinar el número de OTUs compartidos entre las muestras, a nivel de género.

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Resultados de la secuenciación

Una vez limpiadas las secuencias crudas de adaptadores, cebadores, quimeras y secuencias repetitivas a través de los programas Trimmomatic y Vsearch y tras el ensamblaje con el programa fastq-join, se obtuvieron un total de 441.672 lecturas de las muestras de almeja fina (*R. decussatus*) y almeja japonesa (*R. philippinarum*) con una longitud entre 453 y 460 pares de bases.

3.2.2 Microbiota asociada a *Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus*

Se obtuvieron un total de 22.044 OTUs entre todas las muestras y el porcentaje de las secuencias agrupadas que fueron asignadas taxonómicamente fue del 96,24% (425.047 secuencias). Las curvas de rarefacción mostraron que el esfuerzo de secuenciación fue suficiente para la mayoría de las muestras, exceptuando las muestras del mes de abril de las almejas de Redondela (RJ1 y RF1) y de almeja fina de Carril (CF1)(Fig. 3.2).

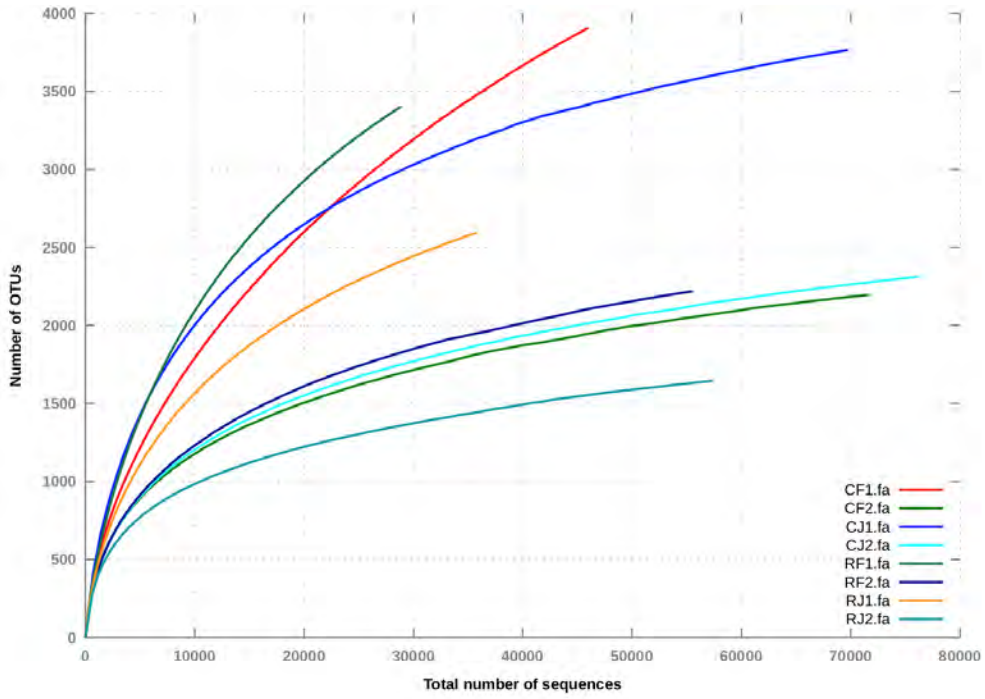

Figura. 3.2. Curva de rarefacción de almeja fina y almeja japonesa representando el número de OTUs frente al número de secuencias analizadas. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa,1= Abril y 2= Octubre.

La asignación taxonómica obtenida muestra una gran número de taxones en todas las muestras, identificándose más de 30 filos. Sin embargo, la mayoría de la microbiota de las muestras puede ser explicada con 14 filos, encontrándose entre los más abundantes los filos *Proteobacteira*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Tenericutes* y *Firmicutes* (Fig. 3.3). A nivel de género, aún analizando solo aquellos géneros que se encuentran por encima del 1% de abundancia total, la diversidad fue muy elevada, estando representada por más de 50 géneros diferentes.

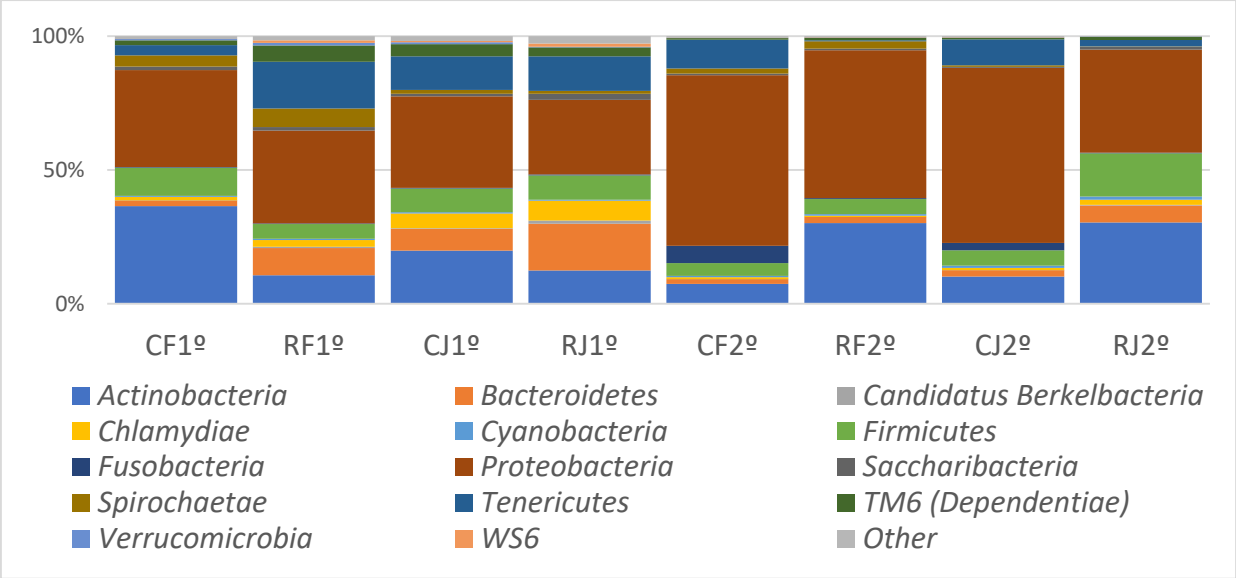

Figura 3.3. Abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en almeja fina y japonesa. El gráfico muestra los porcentajes de aquellos filos (>1%) asignados a partir de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas mediante Illumina. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa,1= Abril y 2= Octubre.

3.2.2.1 Microbiota de almeja japonesa (*R. philippinarum*)

Al analizar los filos presentes en almeja japonesa (*R. philippinarum*), se observó que el filo *Proteobacteria* fue el más abundante en todas las muestras. Se encontró una abundancia relativa mayor de este filo en las muestras de otoño, constituyendo más del 60% en las muestras de Carril y el 40% en la muestras de Redondela. En primavera, las abundancias relativas de este filo fue del 34,2% en Carril y del 27,8% en Redondela. El filo *Actinobacteria* también aparece con abundancias relativas elevadas, encontrándose con mayor abundancia en abril (19,8%) que en octubre (10,1%) en las muestras de Carril. En Redondela, este filo fue menos abundante en abril (12,5%) que en octubre (30,3%). Los filos *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Chlamydiae* y *Tenericutes* también aparecen representados en Redondela y Carril. Los filos *Bacteroidetes, Tenericutes* y *Chlamydiae* disminuyen su abundancia relativa en ambas localizaciones en el mes de octubre. En Carril, estos filos mostraron abundancias relativas en abril del 8,1%, 12,6% y 5,4%, mientras que en octubre su abundancia relativa disminuyó al 2,3%, 9,7% y 0,8%, respectivamente. En Redondela, el filo *Bacteroidetes*

disminuyó su abundancia relativa del 17,4% al 6,4%, *Chlamydiae* del 7,4% al 1,9% y *Tenericutes* 12,9% y 2,4%. (Tabla 3.2)

Tabla 3.2. Porcentajes de abundancia relativa de los filos más abundantes en las muestras de almeja japonesa. C= Carril, R= Redeondela, J= almeja japonesa, 1= Abril y 2= Octubre.

	CJ1	**RJ1**	**CJ2**	**RJ2**
Actinobacteria	19,9	12,5	10,2	30,3
Bacteroidetes	8,1	17,4	2,3	6,4
Chlamydiae	5,5	7,4	0,8	1,9
Firmicutes	8,8	9,2	5,7	16,2
Proteobacteria	34,2	27,9	65,5	38,5
Tenericutes	12,6	13,0	9,8	2,4
TM6 (Dependentiae)	4,5	3,3	0,6	1,2

En función de la época de muestreo, se observó un cambio en la composición de los géneros más abundantes. El género *Mycoplasma* fue el género mayoritario en el muestreo de primavera en ambas localizaciones. Se encontró en porcentajes muy semejantes en Carril en ambos períodos (12,7% en abril y 10,6% en octubre), mientras que en Redondela este género descendió de un 12,8% en abril a un 2,8% en octubre. Durante el mes de octubre, los taxones más abundantes en Redondela fueron un grupo de bacteria no cultivables pertenecientes a la familia *Propionibacteriaceae* (19,7%) y el género *Methylobacterium* (18,2%). En Carril, los géneros principales en el mes de octubre fueron *Methylobacterium*, *Vibrio* y *Psychrobacter*. El género *Vibrio* aumentó su abundancia relativa durante el mes de octubre en ambas localizaciones, mientras que el género *Formosa* se encontró en menor abundancia en Carril (del 4,4% a menos 1%) y Redondela (del 7,3% a menos del 1%) durante este mes (Figura 3.4)(Tabla 3.3; Fig. 3.4)

Al analizar las muestras a nivel de género, el diagrama de Venn mostró que las 4 muestras de almeja japonesa comparten un gran número de géneros entre ellas (26,5%). Además, se pudo observar que el número OTUs comunes entre las muestras de Carril en los dos meses (5,1%) fue mucho mayor que el encontrado en las muestras de Redondela (1,6%) (Fig. 3.5).

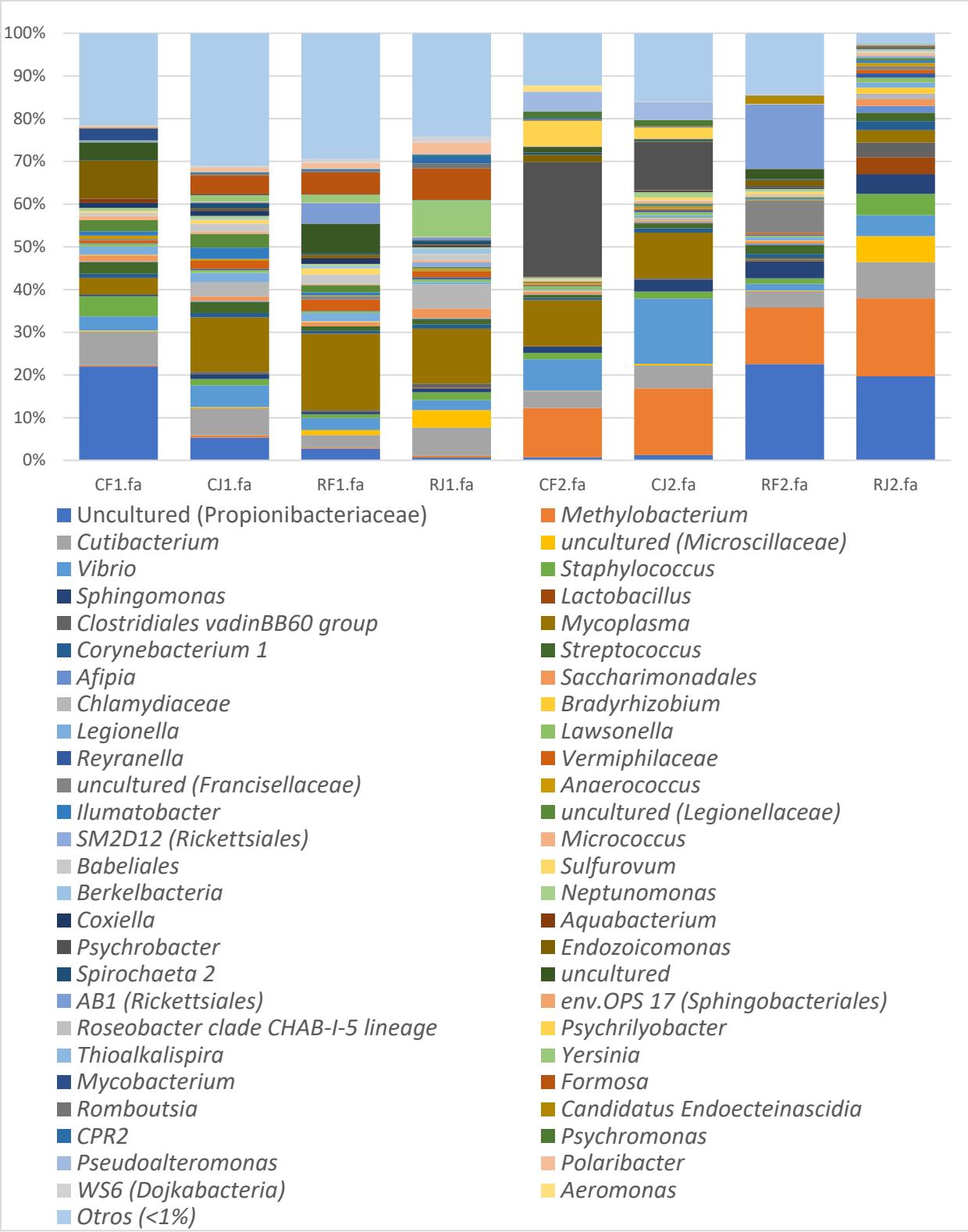

Figura 3.4. Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en *R. decussatus* y *R. philippinarum*. El gráfico muestra los porcentajes de aquellos géneros (>1%) asignados a partir de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas a partir de Illumina. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= almeja japonesa,1= Abril y 2= Octubre.

Tabla 3.3. Porcentajes de abundancia relativa de los filos más abundantes en las muestras de almeja japonesa. C= Carril, R= Redeondela, J= almeja japonesa, 1= Abril y 2= Octubre.

	CJ2	**RJ2**	**CJ1**	**RJ1**
Chlamydiaceae	0,5	1,1	3,3	5,8
Formosa	0,0	0,0	4,4	7,4
Lactobacillus	0,2	3,3	0,0	0,2
Methylobacterium	15,6	15,3	0,5	0,4
Mycoplasma	10,6	2,4	12,8	13,0
Propionibacterium	5,4	7,1	6,3	6,7
Pseudoalteromonas	4,2	0,0	0,1	0,2
Psychrobacter	11,3	0,1	0,2	0,0
Sphingomonas	3,1	3,9	1,2	0,9
Staphylococcus	1,7	4,1	1,5	1,8
TM6 (Dependentiae)	0,7	1,2	4,7	3,4
Uncult. *Cytophagaceae*	0,3	5,1	0,3	4,1
Uncult. *Propionibacteriaceae*	1,2	16,5	5,4	0,7
Vibrio	15,2	4,2	5,3	2,3
Yersinia	0,1	0,0	1,4	8,7

3.2.2.2 Microbiota de almeja fina (*R. decussatus*)

En almeja fina, el filo *Proteobacteria* también fue el más abundante en todas las muestras, aumentando tanto en Carril como en Redondela durante el período otoñal, llegando a abundancias relativas de más del 60% del total de las muestras. Por otro lado, el filo *Spirochaetae* disminuye en el mes de octubre en ambas localizaciones. *Firmicutes* aparece con porcentajes muy parecidos en todas las muestras de almeja fina (alrededor de 5%), excepto en Carril durante el mes de abril donde se observó una abundancia del 10,4%. El filo *Fusobacteria* solo aparece con una abundancia superiores al 1% en Carril durante el mes de octubre (6,5%), apareciendo en el resto de muestras de almeja fina en porcentajes menores del 1%. El candidato a filo *Dependentiae*, conocido anteriormente como *TM6*, al igual que pasaba en las muestras de almeja japonesa, solo aparece en primavera con porcentajes del 1,7% en

Carril y 6% en Redondela. Por otro lado, el filo *Actinobacteria*, al igual que pasaba con las muestras de almeja japonesa, fue más abundante en abril que en octubre (36,4% vs 7,3%) en Carril. En Redondela, la abundancia relativa de este fuer menor en abril que en octubre (10,6% vs 30,1%) (Fig. 3.3).

Tabla 3.4. Porcentajes de abundancia relativa de los filos más abundantes en las muestras de almeja fina. C= Carril, R= Redondela, F= almeja fina, 1= Abril y 2= Octubre.

	CF1	**RF1**	**CF2**	**RF2**
Actinobacteria	36,4	10,7	7,3	30,2
Bacteroidetes	2,1	10,1	1,8	2,2
Firmicutes	10,4	5,5	4,8	5,7
Fusobacteria	0,3	0,2	6,5	0,3
Proteobacteria	36,2	34,7	63,7	55,3
Spirochaetae	4,2	7,0	1,9	2,8
Tenericutes	3,9	17,5	10,8	0,4
TM6 (Dependentiae)	1,8	6,1	0,6	0,9

El género *Methylobacterium* fue más abundante en las muestras de otoño, tanto en Carril (11,5%) como en Redondela (13,2%), mientras que en primavera su abundancia relativa fue menor al 1%. El género *Mycoplasma* fue más abundante en octubre (10.7%) que en abril (3.8%) en la localización de Carril, mientras que en Redondela disminuyó del 17,8% en abril al 1% en octubre. El género más abundante en octubre en Carril fue *Psychrobacter* (26.8%), mientras que otros géneros como *Psychrilyobacter* y *Pseudoalteromonas* solo aparecen con porcentajes mayor al 1% (5.9% y 4.7%, respectivamente). El género *Formosa* se encuentra con una abundancia significativa en las muestras de abril en Redondela (5.1%), mientras que en las demás muestras se encuentran con valores inferiores al 1%. El orden *Ricketssiales* AB1 solo apareció en las muestras de Redondela, y fué más abundante en el muestreo de otoño (15%) que en el de primavera (4,7%). Un grupo de bacterias no cultivables de la familia *Propionibacteriaceae* apareció con porcentajes alrededor del 20% en muestras de Carril en Abril (CF1) y de Redondela en Octubre (RF2)(Fig. 3.4; Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Porcentajes de abundancia relativa de los géneros más abundantes en las muestras de almeja fina. C= Carril, R= Redondela, F= almeja fina, 1= Abril y 2= Octubre.

	CF1	**RF1**	**CF2**	**RF2**
Borrelia	3,7	6,8	1,3	2,0
Caedibacter	0,3	0,7	0,0	7,6
Endozoicomonas	8,8	0,6	1,6	1,4
Formosa	0,0	5,1	0,0	0,0
LWSR-14 (Rickettsiales)	0,0	4,8	0,1	15,1
Methylobacterium	0,3	0,2	11,5	13,2
Mycoplasma	3,9	17,9	10,7	0,3
Propionibacterium	7,8	2,9	3,9	3,8
Pseudoalteromonas	0,1	0,1	4,7	0,1
Psychrilyobacter	0,0	0,0	6,0	0,0
Psychrobacter	0,1	0,0	26,8	0,3
Staphylococcus	4,7	0,8	1,5	1,3
TM6 (Dependentiae)	1,9	6,3	0,6	0,9
Uncult. *Propionibacteriaceae*	22,0	2,8	0,7	22,5
Vibrio	3,4	2,8	7,3	1,5

Como se puede observar en el diagrama de Venn (Fig. 3.5), el porcentaje de OTUs compartidos entre las diferentes muestras de almeja fina supone un 23% del total de la comunidad.

Además, se observa que las muestras de cada localización comparten un 2,6% de OTUs entre ellas (CF1º vs CF2º y RF1º vs RF2º). Al analizar la variación mensual entre la muestras se observó que el número de OTUs que comparten las muestras del mes Abril fue del 6,1%, mientras que las muestras de octubre solo comparten un 1.6% del total de los OTUs (Figura 3.5).

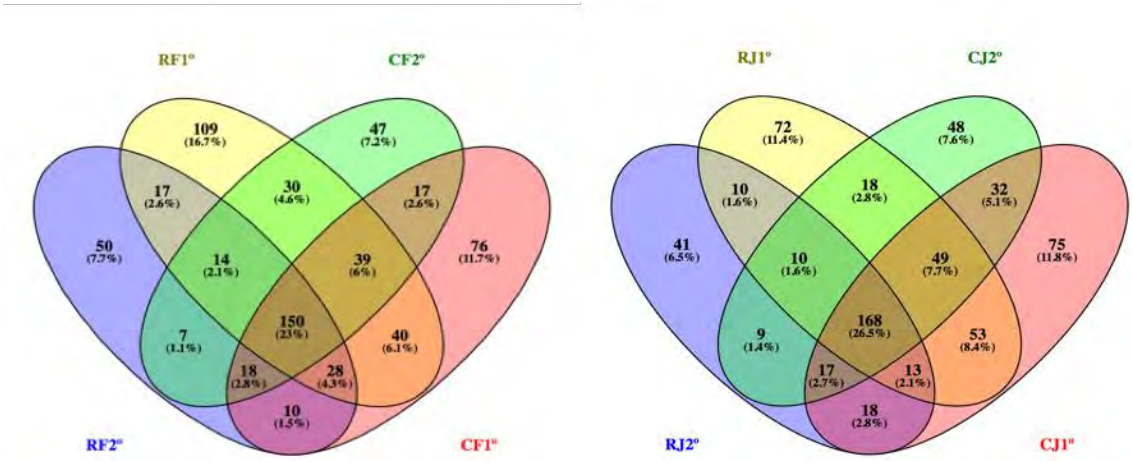

Figura 3.5. Diagrama de Venn representado el porcentaje de OTUs a nivel de género compartidos por las diferentes especies de almejas en las diferentes localizaciones y meses. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= almeja japonesa, 1= Abril y 2= Octubre.

Tabla 3.6. Resumen de las características de todas las muestras de almeja fina y japonesa: análisis de las secuencias, índices de diversidada/riqueza C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa, 1= Abril y 2= Octubre

Muestra	**Nº secuencias**	**Longitud promedio**	**Nº OTUs**	**% Clasificados**	**Nº secuencias observadas una vez**	**Nº secuencias observadas dos veces.**	**Chao-1**
CF1	46036	457	3908	99.02	1817	685	6313.01
CF2	71785	461	2196	92.94	615	254	2936.41
CJ1	69785	460	3765	94.95	856	467	4546.92
CJ2	76376	458	2313	99.41	618	266	3027.06
RF1	28904	460	3403	97.09	1336	623	4832.13
RF2	55553	453	2219	99.45	642	288	2930.98
RJ1	35823	460	2595	94.16	863	413	3493.44
RJ2	57410	455	1645	93.21	456	169	2255.24

3.2.2.3 Análisis de la diversidad

Todas las muestras mostraron una gran riqueza de OTUs, observándose un mayor número de OTUs en las muestras de almeja fina y almeja japonesa del período primaveral. El índice Chao-1 también indica una mayor diversidad en las muestras de abril, es decir, las muestras de Redondela y Carril de primavera tienen una mayor diversidad alfa que las muestras de Redondela y Carril en octubre (Tabla 3.6).

Al realizar el análisis de coordenadas principales (PCoA) de las muestras de almeja fina y japonesa, se observó cómo las muestras del mes de octubre, sin importar la especie o la localización, se agrupan juntas, mientras que las muestras de abril se encuentran mucho más alejadas las unas de las otras. Algo muy parecido se observa en análisis NMDS, donde las muestras de octubre se agrupan más cerca entre ellas, lo que muestra una mayor divergencia existente entre las comunidades de abril que entre las muestras de octubre. (Figura 3.6).

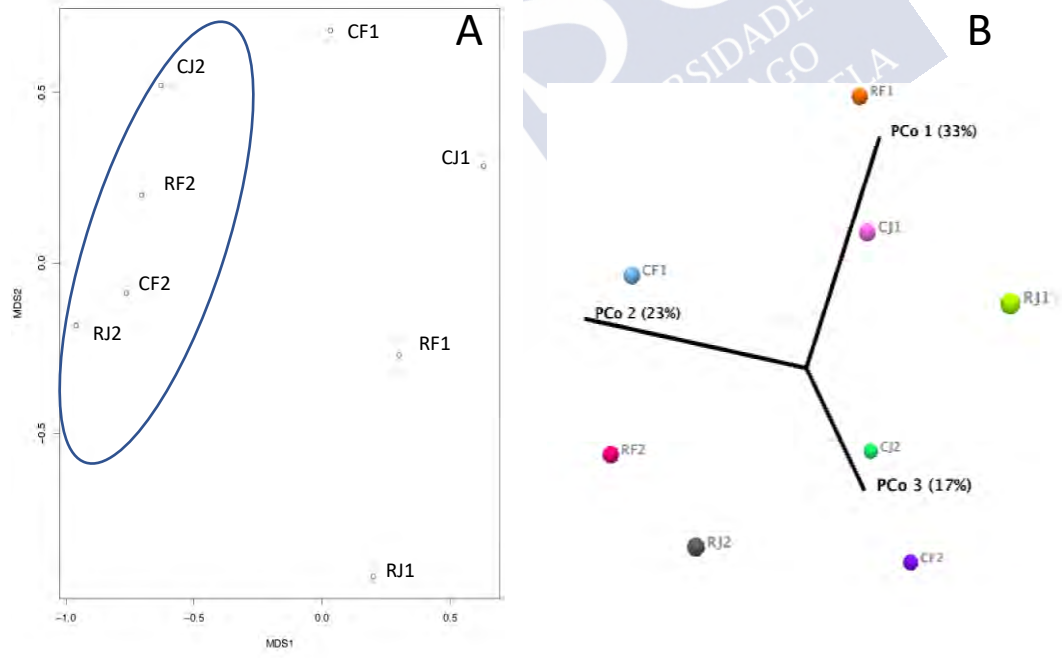

Figura 3.6. Representación del escalamiento multidimensional no métrico(NMDS) aplicando la matriz de distancia Bray-Curtis (A) y representación 3D del análisis de las coordenadas principales aplicando la matriz de distancias Bray-Curtis (B).

EL análisis de los gráficos y valores obtenidos a partir de análisis de similitudes (ANOSIM), muestra diferencias significativas entre los perfiles de la comunidad bacteriana de los muestras de almeja fina. Por otro lado, las diferencias en la composición de la comunidad de las muestras de almeja japonesa no fueron significativas (Fig. 3.7). Los valores obtenidos al comparar las muestras por localizaciones no indicaron diferencias significativas entre las comunidades bacterianas de la localización de Carril ni de Redondela.

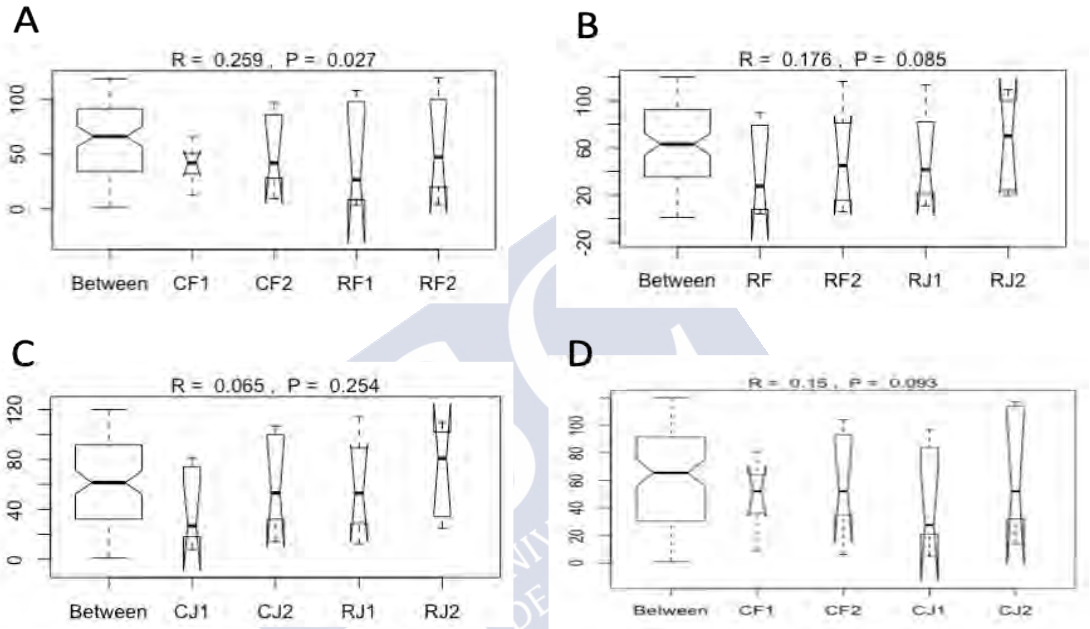

Figura 3.7. Diagramas de caja del análisis de similaridad (ANOSIM) entre las muestras de almeja fina (A) y japonesa (C) y entre las muestras de Redondela (B) y Carril (D).

3.2.3 Estudio de la microbiota asociada a los diferentes órganos de *Ruditapes philippinarum* y *Ruditapes decussatus*

El número total de secuencias fue de 411.411 (93,15%) y se obtuvieron un total de 26.868 OTUs entre todas las muestras de los órganos de las dos especies. Las secuencias que pertenecen a los órganos de almeja fina fue de un total 202.278 y con una longitud entre 451 y 466 pares de bases. Aunque el número de secuencias obtenidas fue mayor en las muestras de hepatopáncreas y gónada, el número de OTUs observadas fue mucho en general en las muestras de gónada (ver Tabla 3.14). Entre el 94,04 y el 99,9% de las secuencias pudieron

asignarse taxonómicamente, excepto en la muestra de hepatopáncreas de Carril del mes de octubre (CFHP2) donde solo un 72% de las secuencias fueron asignadas taxonómicamente. La mayoría de las curvas de rarefacción de las muestras llegó a la fase de saturación. Las muestras RFM1 (manto de almeja fina de Redondela del mes abril), RFM2 (manto de almeja fina de Redondela del mes de octubre), RFG1 (gónada de almeja fina de Redondela del mes de abril) y CFM1 (Manto de almeja fina de Carril del mes de abril) no llegaron a la fase de saturación, por lo que el esfuerzo de secuenciación no fue suficiente para obtener todos los OTUs presentes en las muestras. (Fig. 3.8)

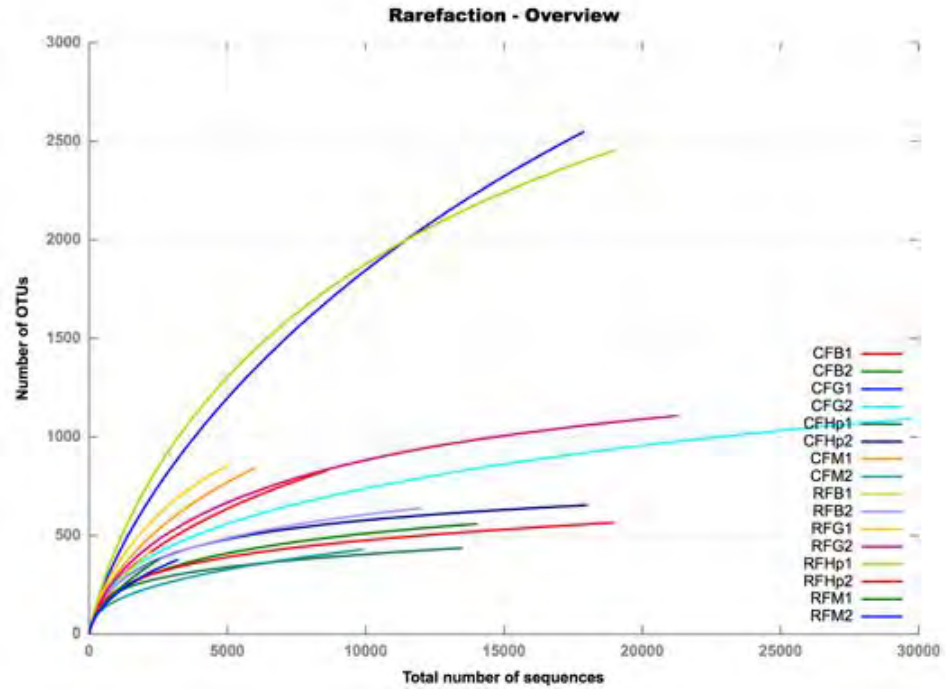

Figura 3.8 Curva de rarefacción de los órganos de almeja fina representando el número de OTUs frente al número de secuencias analizadas. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

Por otro lado, el número de secuencias obtenidas en los órganos de almeja japonesa fue de 239.394 y con una longitud entre 453 y 460 pares de base. Se obtuvieron un total de 12.670 OTUs y en la mayoría de las muestras el porcentaje de secuencias taxonómicamente asignadas osciló entre 88,04 y 99,88%. Las muestras de branquias fueron en general las que rindieron un menor número de secuancias asignadas (44,01-99,63%)(ver Tabla 3.14). Las

muestras de gónada y hepatopáncreas se encuentran en la fase asintótica de la curva de rarefacción (CJHp1, RJHp1, CJGo1, RJHp2, CJGo2, RJGo2 y CJHp2), mientras que en los demás órganos las curva de rarefacción todavía se encuentra en la fase logarítmica, por lo que probablemente al aumentar el esfuerzo de secuenciación se podría estudiar la diversidad presente en la muestra (Fig. 3.9).

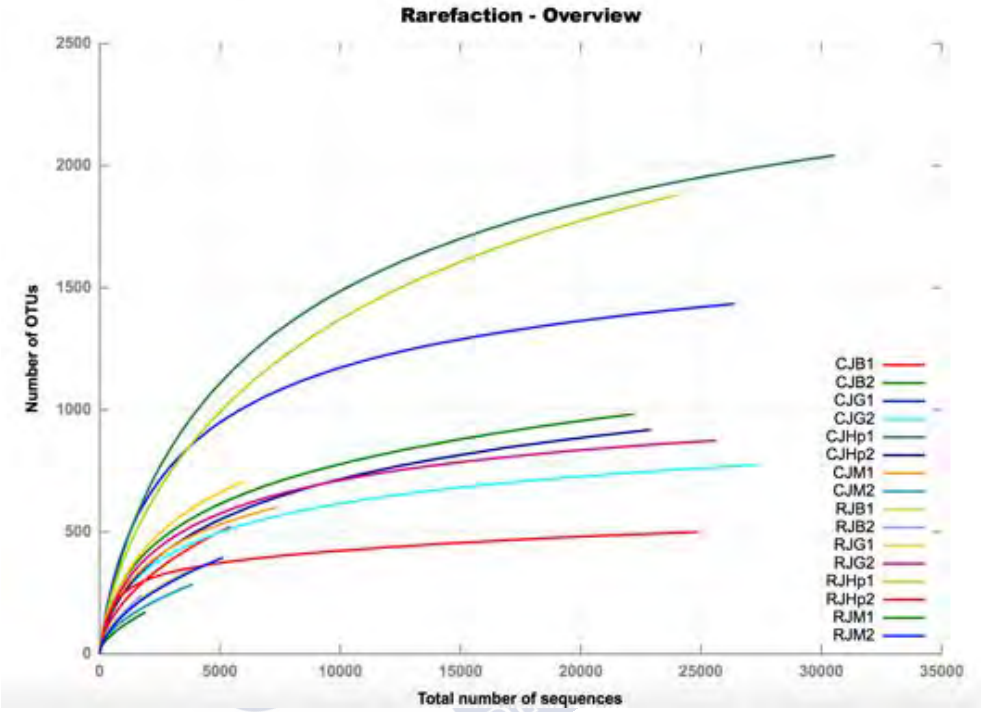

Figura 3.9. Curva de rarefacción de los órganos de almeja japonesa representando el número de OTUs frente al número de secuencias analizadas. R= Redondela, C= Carril, J= almeja japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

La asignación taxonómica de las secuencias, muestra un gran número de filos y géneros en todos los órganos. La mayoría de la microbiota encontrada en los órganos de almeja fina puede explicarse a partir de los filos *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroides*, *Tenericutes, Firmicutes*, *Fusobacteria* y *Spirochaetae*. En el caso de almeja japonesa el 90% de la diversidad puede ser explicado mediante estos mismo filos, además del filo *Chlamydiae*. El número de géneros encontrados en los órganos de ambas almejas fue elevado, ya que, aún centrándonos en aquellos taxones que se encontraban con una abundancia mayor del 1%, la microbiota se encuentra formada por más de 60 géneros.

3.2.3.1 Microbiota asociada a los órganos de almeja japonesa (*R. philippinarum*)

Existen diferencias en la abundancia relativa de los filos entre las localizaciones de Carril y Redondela. En la mayoría de lo órganos de Carril, el filo más abundante fue *Proteobacteria*, siendo más abundante en manto, branquia y gónada correspondientes al muestreo de otoño. En las muestras de Redondela, el filo *Proteobacteria* solo fue el más abundante en gónada durante el muestreo de otoño, mientas que otros filos como *Bacteroidetes*, *Chlamydiae* o *Actinobacteria* fueron los taxones más abundantes las muestras de lo demás órganos (Fig. 3.10).

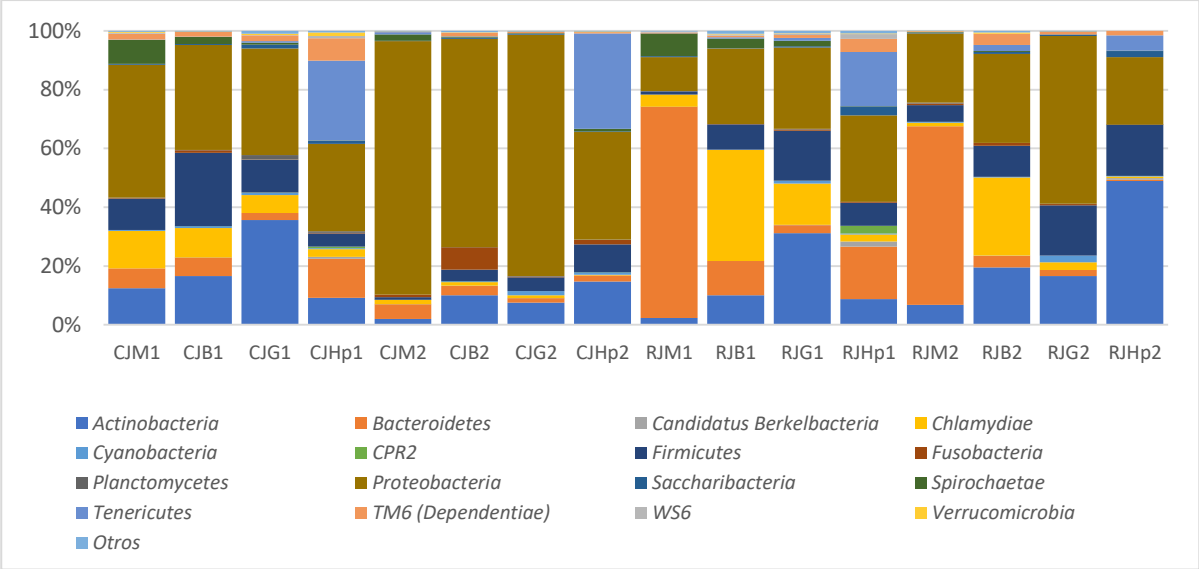

Figura 3.10. Abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en los órganos de almeja japonesa. El gráfico muestra los porcentajes de aquellos filos (>1%) asignados a partir de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas a partir de Illumina. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

⇒ Carril

Analizando más profundamente la microbiota asociada a los órganos en Carril, se observó que existe un mayor diversidad en las muestras del mes abril que de octubre. Los filos más abundantes en el manto en primavera fueron *Proteobacteria* (43,5%), *Actinobacteria* (12,5%), *Chlamydiae* (12,7%) y *Firmicutes* (10,6%), mientras que en el mes de octubre la mayoría de la microbiota se encuentra representada por el filo *Proteobacteria* (86,3%). Lo mismo observamos en branquias, donde el filo *Proteobacteria* se encuentra con abundancias relativas

del 70,9% en el mes de octubre, mientras que en el mes de abril los filos principales fueron *Proteobacteria* (35,7) , *Firmicutes* (24,9%), *Actinobacteria* (16,6%) y *Chlamydiae* (10%). En la gónada del mes de abril, el 71,9% de la microbiota se encuentra representada por los filos *Proteobacteria* (36,3%) y *Actinobacteria* (35,6%), mientras que durante el mes de octubre el filo *Proteobacteria* constituye el 82% del total de la microbiota. El filo *Tenericutes*, aparece en el hepatopáncreas con abundancias relativas elevadas en el mes de abril (27%) y octubre (32,4%) y con porcentajes menores al 1% en los demás órganos en ambos meses. Al igual que en los otros órganos, el filo *Proteobacteria* fue el más abundante en el hepatopáncreas, tanto en abril (29,7%) como en octubre (36,6%)(Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Porcentajes de abundancia relativa de los filos más abundantes en los órganos de almeja japonesa de Carril. C= Carril, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

	CJM1	**CJM2**	**CJB1**	**CJB2**	**CJG1**	**CJG2**	**CJHp1**	**CJHp2**
Actinobacteria	12,5	2,0	16,6	10,1	35,6	7,6	9,2	14,7
Bacteroidetes	6,7	5,0	6,3	3,2	2,4	1,5	13,3	2,0
Chlamydiae	12,7	1,5	10,0	1,2	6,1	1,0	2,6	0,2
Firmicutes	10,6	0,9	24,9	3,9	11,1	4,7	4,5	9,5
Proteobacteria	45,3	86,3	35,7	70,9	36,3	82,0	29,7	36,6
Fusobacteria	0,3	0,9	0,9	7,6	0,1	0,3	0,2	1,5
Spirochaetae	8,2	2,2	2,4	0,3	0,6	0,2	0,2	0,9
Tenericutes	0,0	0,8	0,1	0,2	0,5	0,0	27,0	32,5
Saccharibacteria	0,2	0,1	0,3	0,5	1,3	0,3	1,1	0,3
TM6	2,0	0,1	1,6	1,1	2,0	0,4	7,6	0,4

En un nivel taxonómico más profundo (Tabla 3.8; Fig. 3.11), se observó que el género mayoritario en el hepatopáncreas fue *Mycoplasma* tanto en el mes de abril (28,9%) como en octubre (45,4%). El género *Formosa* aparecen con abundancias relativas del 10% en el hepatopáncreas del mes de abril. En el manto, el género *Psychrobacter* representa el 75,5% de la microbiota total durante el otoño, mientras que en primavera, los taxones mayoritarios fueron el género *Vibrio* (26%) y bacterias de la familia *Chlamydiaceae* (11,4%). En las

branquias, durante el mes de octubre, los géneros mayoritarios fueron *Psychrobacter* (20,7%), *Vibrio* (16,6%) y *Pseudoalteromonas* (12,3%). En el mes de abril, el género mayoritario fue *Streptococcus* con un 16,2%, seguido de bacterias de la familia *Chlamydiaceae* (9,1%) y los géneros *Vibrio* (8,8%) y *Cutibacterium* (8,8%). El género *Methylobacterium* fue el más abundante en gónada en el muestreo de otoño (39,1%), seguido del género *Vibrio* con un 23,9%. Por otro lado, en gónada del muestreo de primavera, los taxones predominantes fueron dos grupos de bacterias no cultivables pertenecientes a las familias *Propionibacteriaceae* (10,1%) y *Legionellaceae* (5,6%) (Fig. 3.11).

Tabla 3.8. Porcentajes de abundancia relativa de los géneros más abundantes en los órganos de almeja japonesa de Carril. C= Carril, J= almeja japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

	CJM1	**CJM2**	**CJB**	**CJB2**	**CJHp**	**CJHp2**	**CJG**	**CJG2**
Chlamydiaceae	11,4	1,3	9,1	0,5	0,1	0,0	3,5	0,6
Cutibacterium	6,1	1,0	8,8	4,0	1,9	12,1	11,0	3,2
Formosa	0,0	0,2	0,0	0,0	10,1	0,1	0,0	0,0
Ilumatobacter	0,8	0,2	0,0	0,5	0,8	0,1	5,6	0,3
Methylobacterium	0,6	0,0	0,3	0,3	0,3	0,4	0,6	39,1
Mycoplasma	0,0	0,7	0,1	0,1	28,9	45,5	0,0	0,0
Pelagicola	0,0	0,0	5,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pseudoalteromonas	0,5	1,4	0,1	12,3	0,1	0,2	0,1	0,3
Psychrilyobacter	0,0	0,7	0,0	6,4	0,1	1,5	0,0	0,2
Psychrobacter	1,2	75,6	0,1	20,7	0,1	0,0	0,1	1,3
Staphylococcus	2,0	0,2	3,2	1,0	0,4	3,6	2,3	1,3
Streptococcus	2,5	0,2	16,2	0,7	0,9	1,9	2,5	1,3
Sphingomonas	0,8	0,1	0,4	1,0	0,6	0,3	2,0	6,9
Spirochaeta 2	7,9	1,0	2,3	0,1	0,0	0,1	0,6	0,0
Vibrio	26,0	1,6	8,9	16,6	0,9	1,7	3,7	24,0
Uncult. *Legionellaceae*	1,2	0,2	0,4	0,2	1,9	0,1	5,7	0,7
Uncult. *Propionibacteriaceae*	0,2	0,1	0,6	2,5	3,2	1,1	10,2	0,5

Se observó una mayor diversidad de géneros bacterianos en todos los órganos correspondientes al muestreo de primavera con respecto al de otoño. Mientras que en los órganos analizados en el mes octubre, 1 o 2 géneros conforman el 50% de la microbiota total

(o incluso, en el caso del manto, un único género conforma el 75% de la microbiota total), en órganos correspondientes al muestreo de primavera se observa una microbiota mucho más heterogénea.

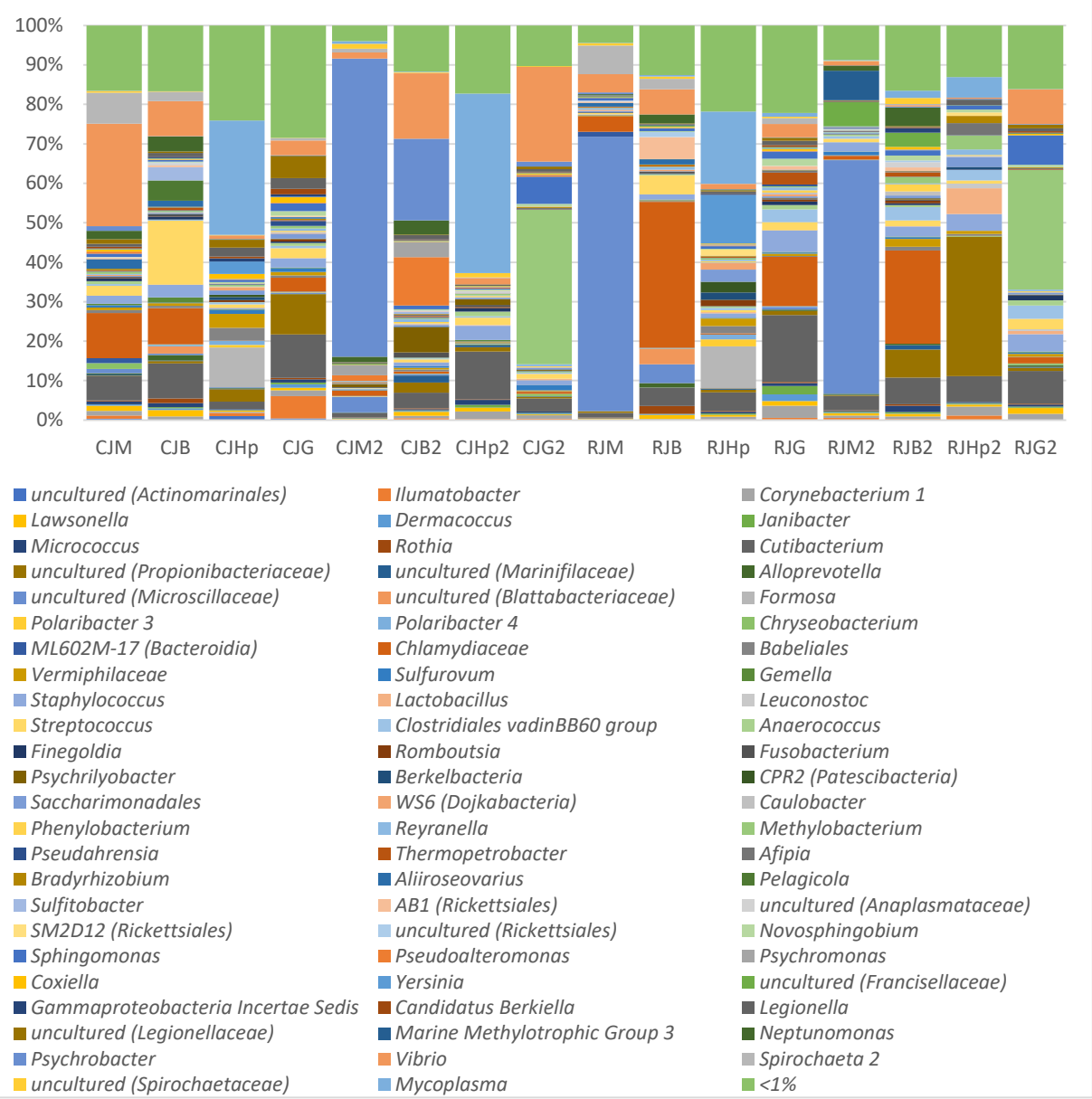

Figura 3.11. Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en los órganos de almeja japonesa. El gráfico muestra los porcentajes de aquellos géneros (>1%) asignados a partir de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas a partir de Illumina. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

⇒ Redondela

Al contrario que en Carril, en Redondela el filo *Proteobacteria* no fue predominante en todos los órganos (Tabla 3.9). En las muestras de manto, el filo más abundante fue *Bacteroidetes,* encontrándose con porcentajes del 70,8% en abril y del 60,7% en octubre. En las muestras de branquias, los filos *Chlamydiae* y *Proteobacteria* fueron los más abundantes en ambos períodos (37,7% y 55,7% en abril / 26,5% y 30,2% en octubre). En el hepatopáncreas del mes de abril, los filos más abundantes fueron *Proteobacteria* (29,3%), *Tenericutes* (18,3%), *Bacteroidetes* (17,8%), *Actinobacteria* (8,7%) y *Firmicutes* (7,8%), mientras que en octubre, el filo *Actinobacteria* se encuentra representado en un 48,8% de la microbiota total de la muestra, seguido de *Proteobacteria* con 22,9% y *Firmicutes* con un 17,3%. El filo *Proteobacteria* fue el grupo más abundante en gónada en otoño (57%) seguido de *Firmicutes* (17,1%) y *Actinobacteria* (16,5%). En primavera, el 90% de la microbiota de este mismo órgano se encontraba representado por los filos *Proteobacteria* (27,6%), *Actinobacteria* (31,2%), *Firmicutes* (17,5%) y *Chlamydiae* (14,04%).

Tabla 3.9. Porcentajes de abundancia relativa de los filos más abundantes en los órganos de almeja japonesa de Redondela. R= Redondela, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

	RJM1	**RJM2**	**RJB1**	**RJB2**	**RJG1**	**RJG2**	**RJHp1**	**RJHp2**
Actinobacteria	2,3	6,8	10,1	19,6	31,2	16,6	8,8	48,9
Bacteroidetes	71,9	60,8	11,6	3,9	2,8	2,1	17,8	0,5
Chlamydiae	4,1	1,1	37,8	26,6	14,0	2,6	2,4	0,6
Firmicutes	1,1	5,7	8,7	10,6	17,1	17,1	7,8	17,3
Proteobacteria	11,5	23,5	25,7	30,2	27,7	57,1	29,4	23,0
Fusobacteria	0,0	0,5	0,1	1,0	0,4	0,4	0,3	0,0
Spirochaetes	7,8	0,2	3,2	0,4	1,8	0,1	0,1	0,0
Tenericutes	0,1	0,1	0,4	2,1	1,0	0,0	18,4	5,2
Saccharibacteria	0,3	0,2	0,1	0,6	0,4	0,4	3,1	2,2
TM6	0,3	0,2	0,6	3,8	1,0	0,9	4,5	1,6

Analizando los datos a nivel de género (Fig. 3.11), en las muestras de manto de ambos períodos, la microbiota se encuentra constituida en su gran mayoría por un grupo de bacterias no cultivables de la familia *Microscillacea*. Durante el mes de abril, este grupo de bacterias se

encuentra con una abundancia relativa del 69,5%, seguido del género *Spirochaetae* (7,2%) y *Vibrio* (4,6%). En el manto del mes de octubre, el 59,1% de la microbiota se corresponde con las bacterias no cultivables de la familia *Microscillacea*, seguido de otras bacterias no cultivables pertenecientes a la familia *Francisellaceae* (6,1%) y bacterias marinas metilotrofas de la familia *Methylophagaceae* (7,4%). En las muestras de branquias, el grupo de bacterias predominante pertenecen a la familia *Chlamydiaceae* en abril y en octubre (36,9% y 23,6%). En el caso del hepatopáncreas, la microbiota varía bastante dependiendo de la estación del año. En abril los géneros más abundantes fueron *Mycoplama* (18,2%), *Formosa* (10,6%) y *Yersinia* (12,2%), mientras que en octubre, el 35,7% de la microbiota se encuentra formada por un grupo de bacterias no cultivables de la familia *Propionibacteriaceae*. En la gónada del mes de octubre, al igual que ocurría en las muestras de Carril (CJG2), el género *Methylobacteirum* fue el más abundante (30,3%), seguido de los géneros *Vibrio* (8,7%) y *Sphingomonas* (7,4%). En la gónada del mes de abril, los taxones con una abundancia relativa más abundante fueron bacterias de la familias *Chlamidiaceae* (12,4%) y los géneros *Cutibacterium* (12,4%) y *Staphyloccocus,* (5,4%).

Tabla 3.10. Porcentajes de abundancia relativa de los géneros más abundantes en los órganos de almeja japonesa de Redondela. R= Redondela, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

	RJM	**RJM2**	**RJB**	**RJB2**	**RJHp**	**RJHp2**	**RJG**	**RJG2**
Chlamydiaceae	4,0	1,0	36,9	23,7	0,3	0,0	12,5	1,5
Cutibacterium	1,2	3,6	4,5	6,8	4,7	6,5	16,9	8,3
Methylobacterium	0,1	0,1	0,2	1,6	0,4	3,5	0,3	30,3
Mycoplasma	0,1	0,1	0,4	1,8	18,2	5,2	0,9	0,0
Staphylococcus	0,1	2,4	1,3	2,5	1,1	4,2	5,5	4,4
Streptococcus	0,4	0,9	4,7	1,4	0,6	0,8	2,1	2,6
Sphingomonas	0,7	0,3	0,7	1,3	0,6	1,1	1,9	7,5
Spirochaetae	7,3	0,1	2,7	0,2	0,1	0,0	1,5	0,1
Vibrio	4,6	1,0	6,4	0,4	1,3	0,3	3,4	8,7
Yersinia	0,0	0,2	0,1	0,0	12,3	0,0	0,2	0,0
Uncult. Francisellaceae	0,2	6,2	0,3	3,6	0,0	0,0	0,2	0,2
Uncult. *Microscillaceae*	69,6	59,1	4,8	0,0	0,1	0,0	0,7	0,1
Uncult. *Propionibacteriacea*	0,4	0,1	0,1	7,1	0,7	35,4	1,0	0,8

3.2.3.2 Microbiota asociada a los órganos de almeja fina (*R. decussatus*)

Al analizar los datos de la abundancia de los filos en los órganos, lo primero que se observa es un aumento del filo *Proteobacteria* en otoño en las muestra de Redondela y Carril, a excepción de las muestras de hepatopáncreas de las dos localizaciones y de branquias de almeja en Carril que reduce su abundancia en dicho muestreo. En todas las muestras del manto, el filo *Spirochaetae* se encuentra como el segundo filo más abundante. En la mayoría de las muestras el filo más abundante fue *Proteobacteria,* aunque otros filos como *Actinobacteria* se encontraron como los mayoritarios en varios órganos (CFG1, CFHP1, RHP2), o *Tenericutes* que fue más abundante en el hepatopáncreas de las almejas de Carril en el mes de octubre (CFHP2)(Figura 3.12).

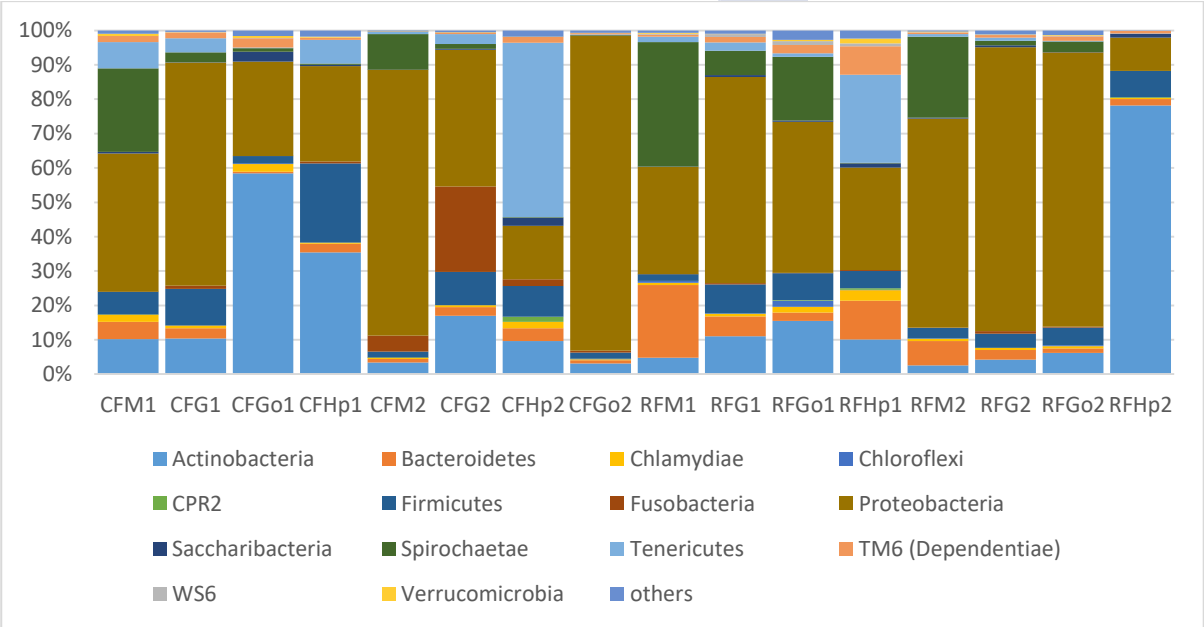

Figura 3.12. Abundancia relativa de los filos bacterianos presentes en los órganos de almeja fina. El gráfico muestra los porcentajes de aquellos filos (>1%) asignados a partir de las secuencias del gen 16S ARNr obtenidas a partir de Illumina. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

⇒ Carril

El filo más abundante en las muestras de manto fue *Proteobacteria* (Tabla 3.11). En el mes de abril, los filos más abundantes del manto fueron *Proteobacteria* (40,2%), *Spirochaetae* (24,3%) y *Actinobacteria* (10,2%), mientras que octubre, el filo predominantes fue *Proteobacteria* (77,4%) seguido de *Spirochaetes* (10,3%). En branquias, los filos más abundantes durante el mes de abril fueron *Proteobacteria* (64,9%), seguido de *Firmicutes*

(10,6%) y *Actinobacteria*. En el manto del mes de octubre la microbiota se encontró formada principalmente por los filos *Proteobacteria* (39,8%), *Fusobacteria* (24,8%) y *Actinobacteria* (17%). En la gónada los filos mayoritario en abril fueron *Actinobacteria* (58,4%) y *Proteobacteria* (27,4%), mientras que en el mes de octubre filo *Proteobacteria* constituyó el 91,6% de la microbiota. En el hepatopacreas, los filo *Proteobacteria*, *Fimicutes* y *Actinobacteria* fueron más abundantes durante el mes de abril (27,8%, 23% y 35,4%) %) que en octubre (15,6%, 8,9% y 9,5%). Por el contrario, *Tenericutes* se encontró con una abundancia del 50,8% en el hepatopáncreas en el mes de octubre, mientras que en abril solo se representaba un 6,9% de la microbiota total. (Fig. 3.12; Tabla 3.11).

Tabla 3.11. Porcentajes de abundancia relativa de los filos más abundantes en los órganos de almeja fina de Carril. C= Carril, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

	CFM1	**CFB1**	**CFG1**	**CFHp1**	**CFM2**	**CFB2**	**CFHp2**	**CFG2**
Actinobacteria	10,2	10,3	58,4	35,4	3,4	17,0	9,6	3,1
Bacteroidetes	5,0	3,0	0,5	2,6	1,1	2,5	3,8	0,9
Firmicutes	6,6	10,6	2,0	23,0	1,7	9,7	8,9	1,8
Fusobacteria	0,1	0,9	0,0	0,5	4,7	24,8	1,9	0,5
Proteobacteria	40,2	64,9	27,4	27,8	77,4	39,8	15,6	91,6
Spirochaetae	24,3	2,9	0,9	0,4	10,3	1,4	0,1	0,2
Tenericutes	7,7	4,1	0,2	6,9	0,7	2,9	50,8	0,2
TM6	1,7	1,7	2,7	0,6	0,1	0,5	1,7	0,4

A nivel de género, se observaron bastante diferencias en la composición de la microbiota de los diferentes órganos de una estación a otra (Tabla 3.12; Fig. 3.13). En el manto, los géneros principales fueron *Psychrobacter, Vibrio* y bacterias no cultivables de la familia *Spirochaetaceae*. El género *Psychrobacter* aparece con mayor abundancia relativa en el mes de octubre (66,8%) que en el mes de abril (<1%). Por el contrario, el género *Vibrio* y las bacterias no cultivables de la familia *Spirochaetaceae* fueron más abundante en el mes abril (10,9% y 24%) que en el mes de octubre (2,2% y 7%). En las branquias, gran parte de la microbiota se encuentra representada por el género *Endozoicomonas* (43 %) durante el mes de abril. Este género solo aparece en branquias, descendiendo su abundancia en otoño (7,8%), donde adquieren importancia otros géneros como *Psychrilyobacter* (22,9%), *Cutibacterium*

(11,4%), *Aeromonas* (6,7 %) o *Psuedoalteromonas* (6%). Por otro lado, al igual que se observó en el manto, el género *Vibrio* se encuentra con mayor abundancia relativa en primavera (6,6%) que en otoño (3,1%). En el hepatopáncreas, el género principal durante el mes de abril fue *Cutibacterium,* con una abundancia relativa del 22,1%, seguido de *Staphylococcus* (13,9%) y de bacterias no cultivables de la familia *Propionibacteriaceae* (10,4%). En el mes de octubre, ambos géneros se reducen al 2,2%, 1,5% y 2,7%, respectivamente y el género *Mycoplasma* aumenta su abundancia relativa de un 8,1% en abril al 51% en octubre. (Fig. 3.13).

Tabla 3.12. Porcentajes de abundancia relativa de los géneros más abundantes en los órganos de almeja fina de Carril. C= Carril, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

	CFM1	**CFM2**	**CFB**	**CFB2**	**CFHp**	**CFHp2**	**CFG**	**CFG2**
Cutibacterium	5,3	1,7	4,7	11,5	22,2	3,4	0,9	1,3
Endozoicomonas	0,4	0,0	43,1	7,4	0,0	0,0	1,0	0,1
Methylobacterium	0,3	0,1	0,1	0,3	0,8	0,8	0,1	25,3
Mycoplasma	7,2	0,7	3,6	2,5	8,1	51,0	0,1	0,1
Psychrobacter	0,4	66,8	0,1	3,7	0,0	0,0	0,0	36,2
Vibrio	10,9	2,2	6,6	3,1	1,2	2,1	0,7	13,3
Uncult.(*Propionibacteriaceae*)	0,3	0,1	1,1	0,2	10,4	2,7	46,7	0,3
Uncult.(*Spirochaetaceae*)	24,0	7,0	2,7	1,2	0,0	0,1	0,9	0,1
Staphylococcus	3,1	0,6	2,2	4,4	13,9	1,6	0,3	0,5

En las muestras de gónada, los géneros bacterianos dominantes en el mes de octubre fueron *Psychrobacter* (36,1%), *Methylobacterium* (25,3%) y *Vibrio* (13,3), mientras que en el mes de abril el 46,7% de la microbiota estaba representada por bacterias no cultivables de la familia *Propionibacteriaceae*.

⇒ Redondela

El filo *Proteobacteria* fue más abundante en todos los órganos excepto en hepatopáncreas donde su abundancia relativa en octubre fue del 9,6%. En primavera, los filos predominantes en el manto fueron *Spirochaetae* (36,2%), *Proteobacteria* (31,2%) y *Bacteroidetes* (21,2%), mientras que en octubre el 60% de la microbiota estaba representada por el filo

Proteobacteria y el 23,6% por el filo *Spirochaetes*. En las branquias, la abundancia relativa de *Proteobacteria* fue del 60% en abril y del 82,6% en octubre. En las gónadas del mes de abril los filos mayoritarios fueron *Proteobacteria* (43,9%), *Spirochaetes* (18,5%) y *Actinobaceteria* (15,5), mientras que en octubre el 79,8% de la microbiota estaba representada por el filo *Proteobacteria*. En primavera, los filos con una abundancia relativa más elevada en el hepatopáncreas fueron *Proteobacteria* (29,8%), *Tenericutes* (25,6%), *Bacteroidetes* (11,3%), y *Actinobacteria* (10,1%), mientras que en octubre, el filo *Actinobacteria* representaba el 78,2% de la muestra.(Tabla 3.13).

Tabla 3.13. Porcentajes de abundancia relativa de los filos más abundantes en los órganos de almeja fina de Redondela.R= Redondela, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

	RFM1	**RFB1**	**RFG1**	**RFHp1**	**RFM2**	**RFB2**	**RFG2**	**RFHp2**
Actinobacteria	4,8	11,0	15,5	10,1	2,6	4,2	6,2	78,2
Bacteroidetes	21,2	5,8	2,4	11,3	7,0	2,8	1,3	1,9
Firmicutes	1,9	8,4	7,8	5,0	3,0	4,1	5,2	7,7
Fusobacteria	0,0	0,4	0,1	0,3	0,1	0,7	0,3	0,0
Proteobacteria	31,2	60,0	43,9	29,8	60,8	82,6	79,8	9,6
Spirochaetes	36,2	7,1	18,5	0,2	23,6	1,3	3,0	0,0
Tenericutes	1,6	2,4	1,0	25,6	0,7	1,0	0,2	0,1
TM6	0,5	1,6	2,4	8,3	0,5	0,7	1,3	0,7

Al analizar la composición de la microbiota a nivel de género, se observó que en la mayoría de las muestras los grupos mayoritarios de bacterias estaban formados por bacterias no cultivables de distintas familias (Tabla 3.14).

En las muestras del manto del mes de abril, bacterias no cultivables de la familia *Spirochaetaceae, Microscillaceae* y *Flavobacteriaceae* se encontraron con porcentajes del 36%, 18,5% y 7,3%, respectivamente, descendiendo su abundancia relativa en el mes de octubre al 11,3%, 0,3% y 0,6%, respectivamente. Por otro lado, en el mes de octubre los taxones predominantes fueron bacterias del orden *Ricketssiales* (AB1) (17,4%) y bacterias no cultivables de la familia *Francisellaceae* (20,4%). En otoño, la mayoría de la microbiota de las branquias, estaba constituida por bacterias del orden *Ricketssiales* (33,3%) y un grupo de bacterias no cultivables de la familia *Francisellaceae* (22,4%). En el mes de abril, el taxón

más abundante también fue el orden *Rickettsiales* (23,3%). El género *Endozoicomonas* aparece con porcentajes cercanos al 6% en las branquias de ambos meses.(Figura 3.13).

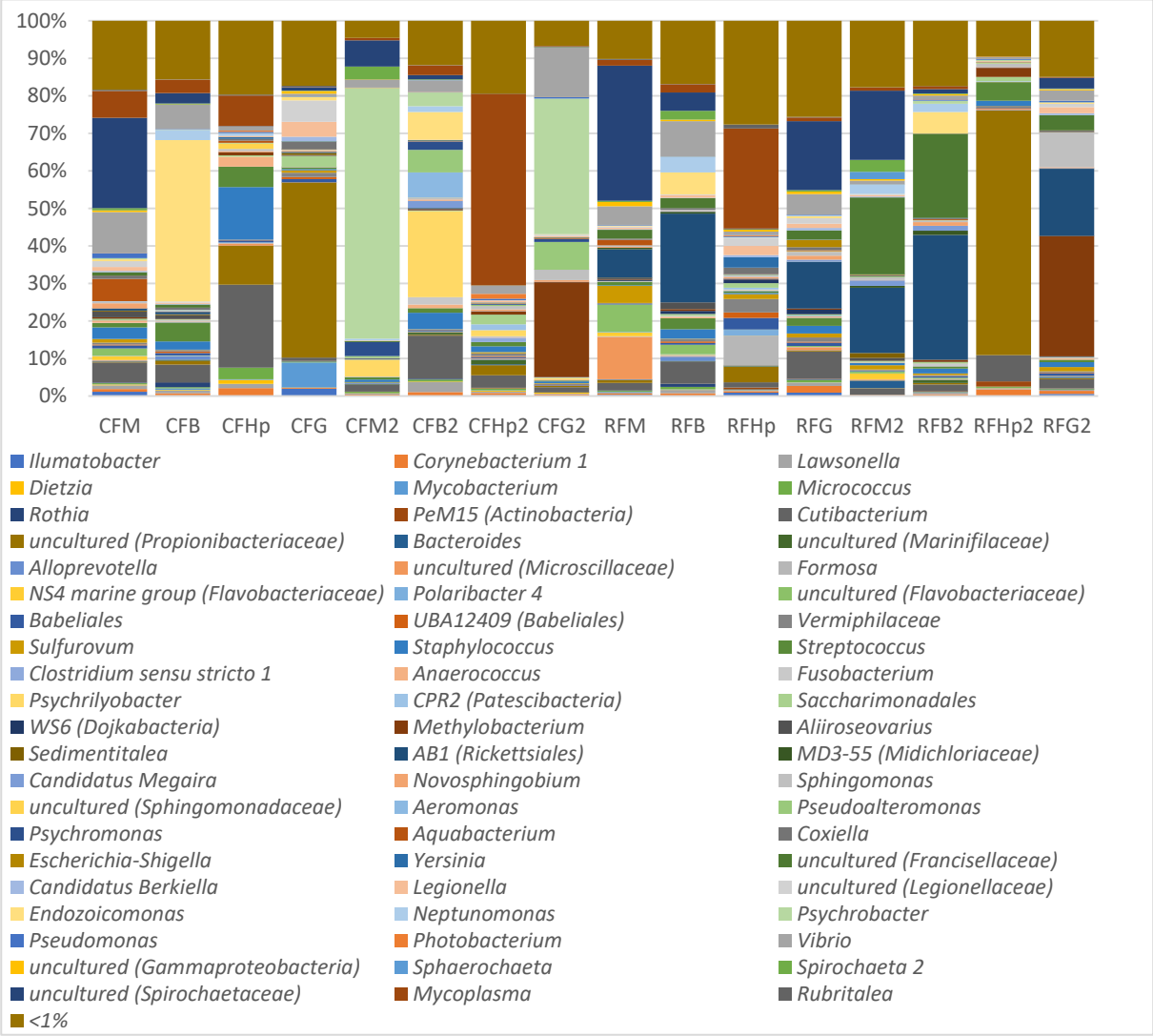

Fig. 3.13. Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en los órganos de almeja fina. El gráfico muestra los porcentajes de aquellos géneros (>1%) asignados a partir de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas a partir de Illumina. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= abril y 2= octubre.

En la gónada del mes de abril, el porcentaje de bacterias no cultivables de la familia *Spirochaetaceae* fue mayor (18,3%). que en el mes de octubre (2,9%). Al igual que pasaba en Carril, el género *Methylobacterium* fue más abundantes en las gónadas del mes de octubre (32,1%), mientras que en el mes de abril, su abundancia relativa fue menor del 1%. El orden

Rickettsiales, aparece con porcentajes elevados en las gónadas del mes octubre (17,9%) y abril (12,3%).

Tabla 3.14. Porcentajes de abundancia relativa de los géneros más abundantes en los órganos de almeja fina de Redondela.R= Redondela, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

	RFM1	**RFM2**	**RFB**	**RFB2**	**RFHp**	**RFHp2**	**RFG**	**RFG2**
AB1 (Rickettsiales)	7,5	17,4	23,6	33,3	0,0	0,0	12,3	17,9
Methylobacterium	0,1	0,1	0,5	0,5	0,2	2,4	0,3	32,1
Mycoplasma	1,6	0,7	2,2	0,8	26,7	0,1	1,0	0,2
Uncult. *Propionibacteriaceae*	0,8	0,1	0,0	0,4	4,1	65,2	0,2	0,3
Uncult. *Spirochaetaceae*	36,0	18,5	4,9	1,1	0,2	0,0	18,4	2,9
Uncult. *Francisellaceae*	2,4	20,4	2,7	22,4	0,0	0,0	2,4	4,0
Uncult. *Microscillaceae*	11,3	0,3	0,2	0,1	0,0	0,4	0,9	0,1
Formosa	0,1	0,1	0,1	0,0	7,8	0,0	0,0	0,0
Sphingomonas	0,4	0,7	0,3	0,5	0,5	0,8	1,1	9,2
Uncult. *Flavobacteriaceae*	7,3	0,6	2,5	0,4	0,0	0,0	0,2	0,0
Cutibacterium	2,0	1,7	5,9	1,8	1,4	7,0	7,3	2,5
Endozoicomonas	0,2	0,1	5,9	5,7	0,1	0,0	0,5	0,4
Vibrio	4,9	1,0	9,4	1,0	0,9	0,5	5,4	2,8

En el hepatopáncreas los géneros más abundantes en abril fueron *Mycoplasma* (24,6%), *Formosa* (7,8%) y bacterias no cultivables de la familia *Propionibacteriaceae* (4,1), mientras que en octubre la mayoría de la microbiota estaba compuesta principalmente por bacterias no cultivables de la familia *Propionibacteriaceae* (65,2%).

3.2.3.3 Comparativa entre la microbiota asociada a los diferente órganos de almeja fina y japonesa

Al analizar las muestras a nivel de género, se observa como ciertos géneros o grupos de bacterias presentaron cierta especificidad en algunos órganos.

El género *Methylobacterium* fue uno de los géneros predominantes en las gónadas del mes de octubre de ambas especies de almeja, mientras en el mes de abril no aparece con

abundancias relativas superiores al 3%. El género *Mycoplasma* aparece asociado a los hepatopáncreas de todas las muestras, en Redondela su abundancia se reduce en octubre, mientras que en Carril ocurre lo contrario.

El género *Psychrobacter* se encuentra en porcentaje muy elevados en el manto de ambas especies de almeja durante el mes de octubre en la localización de Carril (CFM2 y CJM2), mientras que en el resto de muestras de manto aparece con porcentajes inferiores al 1%. Otros grupos de bacterias no cultivables de la familia *Propionibacteriaceae* fueron los microorganismos más abundantes en las muestras de hepatopáncreas de Redondela durante el mes de octubre en ambas especies de almeja (RJHP2, RFHP2). Estas bacterias no cultivables, también se encuentran como el taxón más abundante en las muestras de gónada de ambas especies de almejas en Carril (CJG, CFG) durante primavera. El género *Formosa* aparece en hepatopáncreas durante el mes de abril en Carril y Redondela en ambas especies, con abundancias relativas en las muestras CJHP, RJHP y RFHP del 8-10%. Este género no aparece en ninguna otra muestra de este estudio con valores mayores al 1%. El género *Endozoicomonas* aparece asociado a las branquias de almeja fina de ambas localizaciones, siendo el género mayoritario en branquias en el muestreo de abril en Carril. En almeja japonesa este género no se encuentra con abundancias relativas superiores del 1%. La familia *Chlamydiaceae* se encuentra en las muestras de manto, branquia y gónada de almeja japonesa en Carril y Redondela, descendiendo su abundancia en todas las muestras durante el mes de octubre. (Fig. 3.14).

3.2.3.4 Análisis de diversidad entre órganos

La microbiota de los órganos de almeja fina está compuesta por un gran número de OTUs, siendo las muestras de hepatopáncreas y gónada las que presentan mayor diversidad al analizar tanto el número de OTUs como el índice Chao-1. En las muestras de almeja japonesa también se obtuvieron valores elevados del índice Chao-1, observándose una mayor riqueza en las muestras de abril que en las muestras de octubre, con excepción del hepatopáncreas (Tabla 3.14).

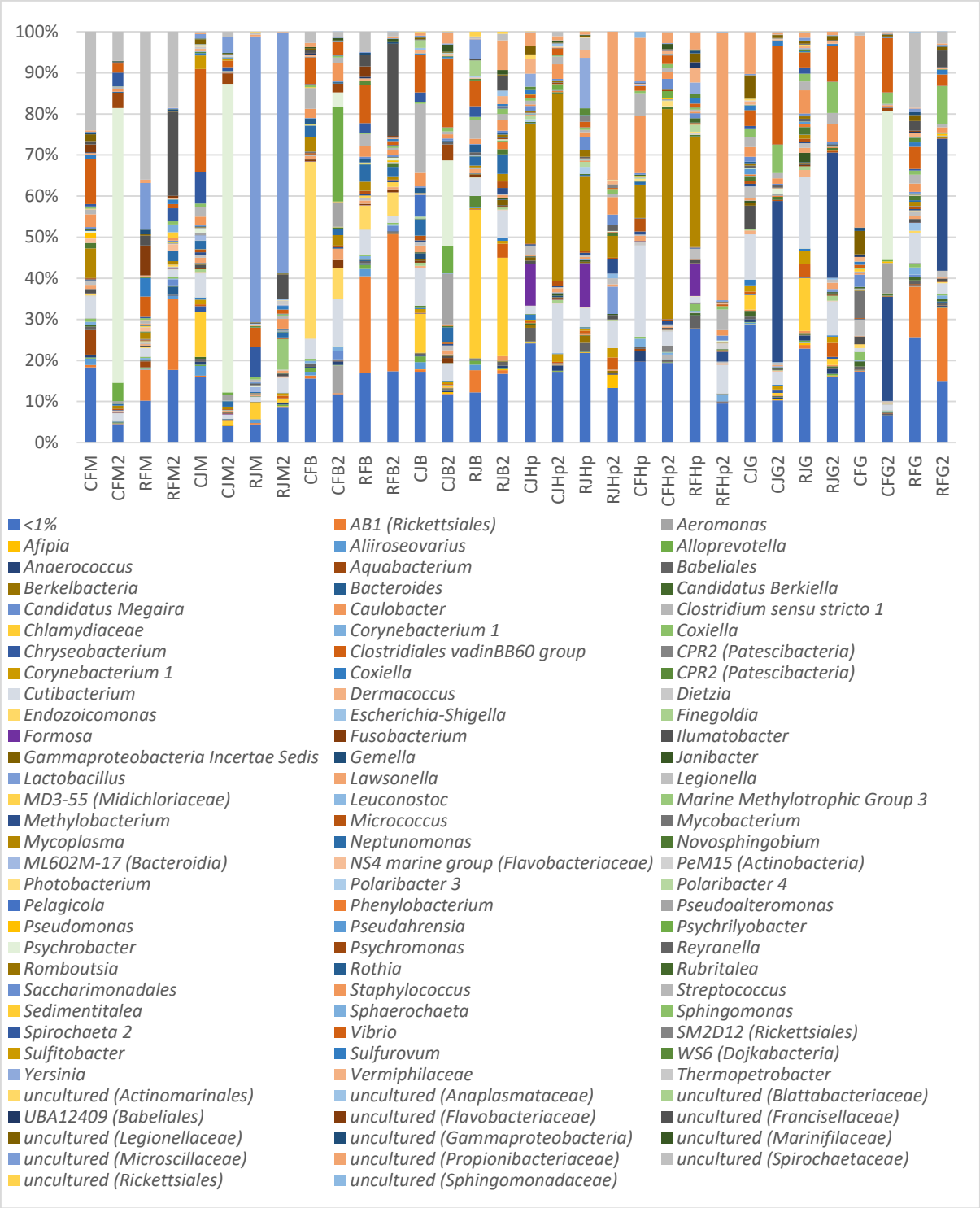

Figura 3.14. Abundancia relativa de los géneros bacterianos presentes en los órganos de almeja fina y japonesa ordenados por órganos. El gráfico muestra los porcentajes de aquellos géneros (>1%) asignados a partir de las secuencias del gen ARNr 16S obtenidas a partir de Illumina. R= Redondela, C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre.

Tabla 3.14. Resumen de las características de todas las muestras de los órganos de almeja fina y japonesa, análiisi de las secuencias, índices de diversidad/riqueza C= Carril, F= almeja fina, J= al japonesa, M= manto, B= branquia, G= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= Abril y 2= Octubre .

Muestra	Nº secuencias	Longitud promedio	Nº OTUs	% Clasificados	Nº secuencias observadas una vez	Nº secuencias observadas dos veces.	Chao-1
CFM 1	6024	463	844	97.44	409	159	1365.48
CFB 1	8583	465	829	99.11	393	143	1363.92
CFG 1	17903	454	2549	98.91	1324	504	4283.31
CFHp 1	13526	454	437	99.65	114	38	602.15
CFM 2	9929	466	429	99.68	164	59	651.77
CFB 2	14102	457	559	99.26	139	83	673.18
CfG 2	29734	460	1092	99.90	356	169	1463.71
CFHp2	18020	464	654	72.79	127	70	766.69
RFM 1	2532	462	381	94.08	227	51	874.29
RFB 1	2231	458	417	94.04	251	60	931.34
RfG 1	5105	458	861	97.90	378	190	1234.05
RFHp 1	19036	460	2455	97.53	902	469	3319.58
RFM 2	3251	459	379	99.14	178	67	610.66
RFB 2	12018	457	639	99.60	179	91	812.16
RfG 2	21290	451	1108	99.50	284	159	1359.16
RFHp 2	18994	451	565	99.58	151	53	774.72
CJM 1	7340	462	599	98.83	178	93	766.59
CJB 1	5462	462	522	72.28	245	103	809.40
CJG 1	26402	457	1434	93.41	252	133	1670.01
CJHp1	30581	461	2042	99.36	441	284	2382.42
CJM 2	3887	466	285	98.56	153	35	608.00
CJB 2	22202	462	982	99.63	272	108	1320.13
CJG 2	27372	454	774	99.88	150	87	900.99
CJHp 2	22915	456	918	98.66	241	125	1147.52
RJM 1	1899	463	171	88.94	103	19	433.65
RJB 1	3912	465	350	68.71	178	49	665.06
RJG 1	6003	456	706	98.23	246	129	937.81
RJHp 1	24009	460	1879	97.62	578	307	2420.41
RJM2	5153	462	395	88.03	206	57	759.05
RJB 2	1738	464	240	47.01	147	36	530.03
RJG 2	25621	454	874	94.02	155	106	985.54
RJHp 2	24898	454	499	96.61	94	39	608.28

El análisis de PCoA de los órganos de las dos especies de almejas, resaltó una mayor similitud entre la diversidad bacteriana de las diferentes muestras de hepatopáncreas. Las muestras del manto se agrupan de manera diferente según la localización, en Redondela las muestras del manto de misma especie se agrupan juntos (RFM con RFM2 y RJM con RJM2), lo cual indica que tienen una diversidad bacteriana similar. En Carril, las muestras del manto se agrupan juntos en el mes de octubre (CJM2 con CFM2) pero no en abril. (Figura 3.15).

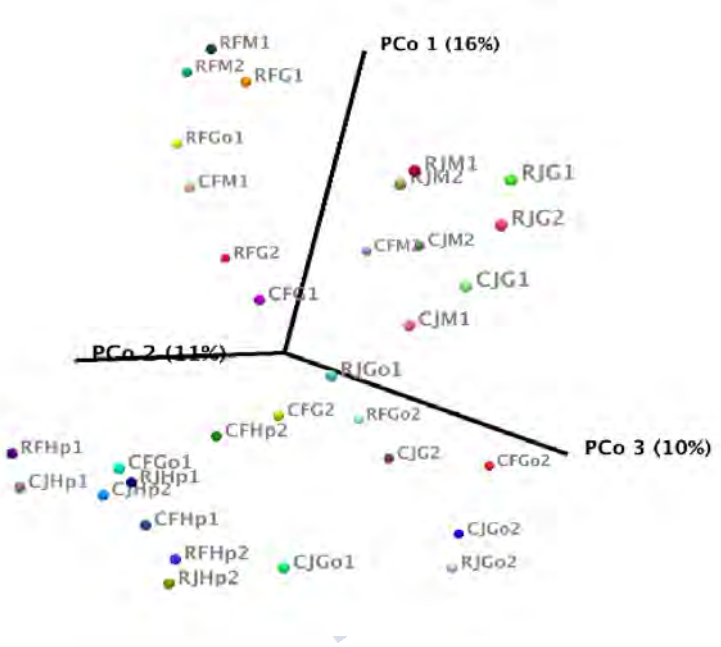

Figura 3.15. Representación 3D del análisis de las coordenadas principales aplicando la matriz de distancias Bray-Curtis (B). C= carril, R= Redondela, M= manto, G= branquia, Go= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= abril y 2= octubre.

Las muestras de gónadas de ambas especies de almejas en otoño se encuentran agrupadas, lo cual indica que presentan un alto nivel de similitud en su diversidad bacteriana. Por el contrario, las gónadas del muestreo de abril son más diferentes entre ellas, ya que se observan bastante alejadas unas muestras de las otras. En el análisis NMDS se visualiza mejor como las muestras del hepatopáncreas se encuentran alejadas una de las otras y de las demás muestras, lo cual indica la gran diferencia en diversidad encontrada en este órgano en ambas especies. (Figura 3.16).

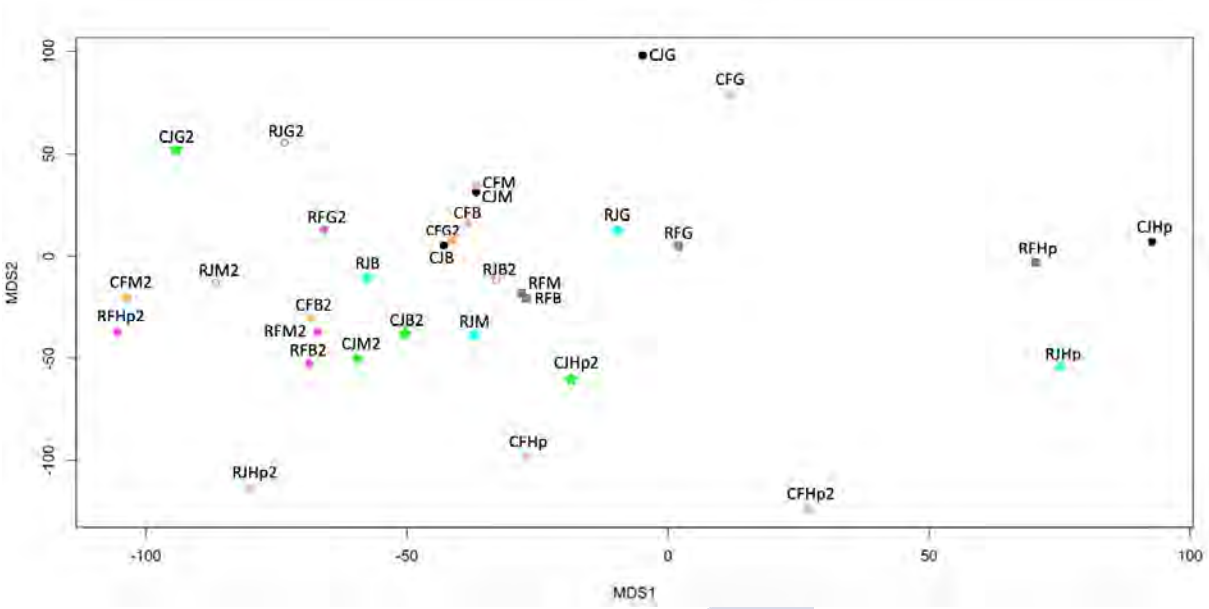

Figura 3.16. Representación del escalamiento multidimensional no métrico(MDS) aplicando la matriz de distancia Bray-Curtis. C= carril, R= Redondela, M= manto, G= branquia, Go= gónada, Hp= hepatopáncreas, 1= abril y 2= octubre.

3.3 DISCUSIÓN

El gran número de lecturas obtenidas después de la limpieza de las lecturas crudas y el ensamblado, así como el gran número de OTUs observados por muestra, indican la alta diversidad presente en la microbiota de almeja fina y japonesa en ambas localizaciones y meses. Además, el número de OTUs y los índices Chao-1 observados en abril, indican una mayor riqueza de especies durante este mes. Los análisis del PCoA y NMDS mostraron una microbiota más similar entre las muestras de otoño que entre las de primavera, ya que estas se encuentran agrupadas más cerca las unas de las otras. Además, al analizar la microbiota de las muestras en cada estación, observamos diferencias entre los taxones presentes en las muestras del mes de abril y las del mes de octubre. Estas diferencias probablemente puedan ser explicadas y relacionadas con la temperatura del agua, que fue 2ºC mayor en el mes de octubre, y el estado fisiológico de las almejas las cuales se encontraban sexualmente maduras en este período. Por otro lado el análisis de similitud (ANOSIM) mostró una mayor diferencia en las comunidades microbianas entre las muestras de almeja fina que entre las muestras de almeja japonesa, por lo que la almeja fina muestra una microbiota mucho más heterogénea

que la almeja japonesa. Al observar las muestras por órganos, las muestras de hepatopáncreas y gónada fueron las que presentaron un mayor número de OTUs y valores más altos del índice Chao-1. Los análisis del PCoA y NMDS muestran una distribución diferente de las muestras según el órgano, aunque las muestras tienen una composición microbiana bastante similar ya que se encuentran agrupadas muy cerca entre ellas. Las muestras del hepatopáncreas presentan una microbiota diferente al resto de los órganos ya que se encuentra más alejadas del resto de las muestras.

El filo más abundante en la mayoría de las muestras fue *Proteobacteria*. Esto ya se había observado en otros estudios acerca de la microbiota de moluscos bivalvos mediante las nuevas herramientas de secuenciación (Trabal y col., 2014; Lasa y col., 2016, Vezulli y col., 2017). Existe un incremento de este filo durante el mes de octubre que podría ser explicado por el aumento de la temperatura, ya que algunos géneros de este filo como puede ser el género *Vibrio*, se ven favorecidos por el aumento de la temperatura del agua. En todos los órganos se produce un aumento de este filo durante el mes de octubre excepto en las muestras de hepatopáncreas. La posible función del filo *Proteobacteria* ya ha sido estudiada en otros invertebrados marinos. Las especies de este filo son capaces de degradar la celulosa y el agar, que son los compuestos mayoritarios que se encuentran en la alimentación de moluscos bivalvos. Además, algunos grupos de bacterias del filo *Proteobacteria* son capaces de fijar el nitrógeno en el tracto gastrointestinal de moluscos bivalvos (Prieur y col., 1990; Harria, 1993; Zehr y col., 2003 y Newell, 2004). El filo *Actinobacteria* mostró una dinámica diferente dependiendo de la localización. Se observó un incremento en octubre en los ejemplares de Redondela y un descenso durante este mismo mes en las muestras de Carril. Este filo aparece con abundancias relativas elevadas en la muestras de hepatopáncreas, siendo el filo más abundante en el hepatopáncreas de Redondela. Se ha detectado en ambiente acuáticos contaminados con metales pesados y en procesos de biorremediación (Chen y col., 2015). Las *Actinobacterias* intervienen en el medio marino ayudando a descomponer materia orgánica y existen estudios en los que han asociado el aumento de diatomeas y dinoflagelados en el medio con un aumento de bacterias de este filo (Eckert y col., 2012; Bunse y col., 2016). Por lo tanto, la elevada presencia de este filo en el hepatopáncreas tendría sentido al ser el órgano que se encarga de la digestión en las almejas. Además, el aumento de este filo en el medio acuático ha sido asociado en las etapas finales de un afloramiento de diatomeas (Zhou y col., 2018), por lo tanto, el aumento de *Actinobacteria* en el hepatopáncreas de ambas especies de

almejas en Redondela en el mes de octubre, también podría explicadarse por la existencia de mareas rojas en la zona del muestreo días previos al muestreo.

Otro filo que se encuentra con bastante abundancia en hepatopáncreas es *Tenericutes*. Diferentes estudios asocian este filo con la microbiota el sistema digestivo de ostras (*C. virginica* y *Saccostrea glomerata*), abalones (*Haliotis discus* subspecies *hannai*) mejillones (*Villosa nebulosa* y *Mytilus spp*) gasterópodos (*Benedictia baicalensis*) (Tanaka y col., 2004; Green y Barnes., 2010; King y col., 2012; Aceves y col., 2018; Rubiolo y col., 2018; Shtykova y col., 2018). La gran mayoría de las OTUs detectadas y que pertenecen a este filo, se corresponden con el género *Mycoplasma* (más del 90%), que también ha sido descrito en moluscos bivalvos anteriormente (Harshbarger y Chang, 1977; Paillard y col. 2004; Loggans y col., 2006; Winters y col., 2011; King y col., 2012; Arfken y col., 2017; Milan y col., 2018). La mayoría de los estudios que existen acerca de este género se centran en su patogenicidad (Bower y col., 1991, 1992, 1994; Azevedo, 1993) pero lo cierto es que su posible papel en el sistema digestivo o su función ecológica están poco estudiados, siendo probablemente comensales no perjudiciales en la mayoría de los casos.

El filo *Bacteroidetes* aparece con mayor abundancia relativa en abril que en octubre, siendo esta diferencia mayor en las muestras de Redondela. La abundancia de este filo en moluscos bivalvos ya había sido descrita en otros estudios (Trabal y col*.,* 2014; Lasa y col., 2016). El filo *Bacteroidetes* se puede encontrar en diferentes ambientes, desde suelos y océanos hasta en el tracto gastrointestinal de animales. Algunos estudios hablan de la importancia de este filo en la degradación de materia orgánica polimérica como la celulosa y pectinas (Thomas y col., 2011) o de su papel clave limitando la colonización de bacterias potencialmente patógenas (Troy y Kasper, 2010). Es posible que las bacterias de este filo se encuentren realizando alguna de estas funciones beneficiosas para las almejas. En las muestras del manto de Redondela, más del 90% de las OTUs detectadas del filo *Bacteroidetes,* fueron identificados como bacterias no cultivables de la familia *Microscillaceae*, sin embargo existe poca información sobre esta familia. En un estudio sobre el intestino de gusanos de tierra se observó un incremento de la representación de esta familia al exponer los gusanos metales pesados como el cromo (Tang y col., 2019) y también se ha encontrado en biopelículas de tanques de cultivo de *Dentex dentex* (Turgay y col., 2019).

El filo *Spirochaetae* se encuentra con una abundancia relativa elevada en el manto de almeja fina procedentes de ambas localizaciones geográficas. Gran parte de las OTUs

asignadas a este filo en estas muestras (más del 70%), se corresponde con un grupo de bacterias no cultivables de la familia *Spirochaetaceae*. La abundancia de esta familia ha sido asociada en otras especies de moluscos bivalvos como indicador de un buen estado sanitario (Lasa y col., 2019, King y col., 2019).

Firmicutes aparece presente en todas la muestras con porcentajes muy semejantes. Este filo es bastante común en moluscos bivalvos y ambiente acuáticos (King y col., 2012; Trabal y col., 2014; Roterman y col., 2015; Lokmer y col ., 2015; Lasa y col 2016).

El género *Formosa* se encuentra con abundancia relativa elevada en el hepatopáncreas de las almejas durante el mes de abril. La mayoría de las especies de este género han sido aisladas a partir de algas (Nedashkovskaya y col. 2006; Ivanova y col.. 2004; Park y col. 2013), pero también se han aislado de abalones y espongas (Tanaka y col., 2015; Yoon y Oh 2011). Una de las funciones que se han descrito sobre especies de este género es la capacidad que tienen para degradar polisacáridos de algas (Man y col., 2013), por lo que su función en el hepatopáncreas podría ser semejante.

El género *Methylobacterium* fue más abundante durante el mes de octubre en la dos localizaciones geográficas y especies de almejas. Este género no aparece en otros estudios de moluscos bivalvos con estas abundancias. Algunas especies dentro de este género tiene la capacidad de sintetizar carotenoides y mevalonato (Van Dien y col., 2003; Liang y col., 2017). También pueden absorber la radiación UV-A, pudiendo actuar como protector para las almejas (Yoshida y col., 2017). *Methylobacterium* se encuentra en octubre como uno de los géneros mayoritarios en gónada, las cuales se encontraban muy desarrolladas durante este período. Este género posiblemente cumpla alguna función protectora o de síntesis de compuestos necesarios durante la maduración sexual de la gónada. El género *Sphingomonas* también aparece con una abundancia relativa elevada en gónadas del mes de octubre. Este género ya se había descrito asociado a gónada en otros bivalvos como *Pecten maximus* (Lasa y col., 2016). Romanenko y col. (2007) demostraron que diferentes especies del género *Sphinogmonas,* aisladas a partir de moluscos bivalvos, poseían actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias patógenas. Sería interesante un estudio más profundo de la función de estos géneros en gónada de almeja.

En el caso de almeja fina, el género *Endozoicomonas* se encuentra con abundancia en primavera, asociado a las branquias de almeja fina. Este género se ha descrito como simbionte en multitud de organismos marinos, como esponjas, cnidarios, moluscos, tunicados y peces

(Neave y col., 2017). Además, se ha descrito en branquias de bivalvos como *Mytilis edulis* (Schill y col*.,* 2017) y *Acesta excavata* (Jensen y col. 2010), y de caracoles de mar del género *Alviniconcha* (Beinart y col., 2014). Hasta hace poco la función de este género era bastante desconocida, pero gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación se está descubriendo la importancia de este género como un simbionte marino de diversos organismos invertebrados. En corales se ha asociado la disminución de este género con la presencia de contaminantes en el medio y ambientes desfavorables para los corales (Morrow y col., 2015; Ziegler y col., 2017). Dentro de las funciones que se han asignado a este género, está su participación en el transporte de proteínas y carbohidratos, la producción de compuestos antimicrobianos o la descomposición de compuestos orgánicos (Neave y col., 2016). Todas estas funciones pueden ser de gran utilidad para las almejas pero habría que realizar estudios más profundos sobre la función que este género puede desempañar en estos animales.

El grupo *Rickketssiales* AB1 aparece con abundancias relativas elevadas en manto, gónada y branquia de almeja fina en la localización de Redondela. Las bacterias del tipo *Rickettsia* (RLO) son organismos intracelulares obligados, que se han detectado con anterioridad en células epiteliales del manto, branquias y glándulas digestivas de moluscos bivalvos. En la mayoría de los casos estas bacterias causan infecciones asintomáticas (Carballal y col., 2001; Jones, 2007; Sabry y col., 2011), aunque también se han asociado con mortalidades en bivalvos (Renault y Cochennec, 1994; Villalba y col., 1999; Wu y Pan, 1999; Sun y Wu, 2004; Delgado y col., 2007; Zhu y col., 2012). Además, en otro estudio previo sobre almeja japonesa y fina de nuestro grupo de investigación, ya se había descrito la mayor especificidad de estas bacterias por la almeja fina (Romalde y col., 2013).

El género *Psychrobacter* se encontró en porcentajes elevados en octubre en ambas especies de almeja, conformando más del 60% de la microbiota del manto. La mayoría de las especies de este género se han aislados en ambientes de baja temperatura (Bowman y col., 1996, 1997; Bakermans y col., 2006; Srinivas y col., 2011; Zeng y col., 2015). Algunas especies del género *Psychrobacter* son capaces de producir antioxidantes (Velho-Pereira y col., 2015), por lo que este género podría combatir el daño que produce el estrés oxidativo en los órganos de las almejas. Algunas especies de este género se han aislado a partir de almejas (Lasa y Romalde, 2017), y se ha visto que tienen genes implicados en la detoxificación de mercurio. Además, hay estudios que asocian la presencia de este género en aguas contaminadas con mercurio y petróleo (Wang y col., 2014; Pepi y col., 2011). Ya que las

temperaturas del agua fueron mayores en octubre que en abril y que este género solo se encuentra en Carril y en mayor abundancia en el mes de octubre, puede ser posible que la prevalencia de este género en las muestras de Carril sea debido a la presencia de metales pesados en el agua de la ría de Arousa.

El género *Cutibacterium*, creado recientemente a partir de la reclasificación del género *Propionibacterium* (Scholz y col., 2016), aparece en todas las muestras. Este género se ha detectado en algunos invertebrados como colémbolos y larvas de avispas (Quinn y col., 2018; Agamennone y col., 2019). Existe algún estudio donde se sugiere la posibilidad de que la presencia de este género sea debida a una contaminación durante la manipulación de las muestras en el laboratorio (Trabal y col., 2014).

Por otro lado, se encontraron con bastante abundancia bacterias no cultivables de las familias *Propionibacteriaceae* y *Francisellaceae* durante el mes de octubre en Redondela. La familia *Propionibacteriacea* se encuentra formada por un total de 22 géneros, la mayoría de ellos compuestos por una o dos especies. Las especies de esta familia se han descrito en ambientes tan variados como suelo, plantas, arañas, humanos, aguas contaminadas, alimentos, ganado o lodos activados (Scholz y Kilian, 2016; Tuo y col., 2016; Iwai y col., 2010;Fan y col., 2014; Zhang y col., 2014; Aubin y col., 2016; Sugawara y col., 2011;). Especies de los géneros *Tessaracoccus*, *Aestuariamicrobium*, y *Mariniluteicoccus* se han detectado en agua marina o arena de playa (Jung y col., 2007; Zhang y col., 2014; Thongphrom y col., 2017; Tak y col., 2018,). El género *Propionibacteirum* también aparece asociado a la microbiota de coral (Santiago-Vázquez y col., 2007; de Castro y col., 2010; Nithyanand y col., 2011) y como endosimbionte de dinoflagelados (Ainsworth y col., 2015).

Dentro de la familia *Francisellaceae*, el género *Francisella* se encuentra asociado con mortalidades en diferentes peces como bacalao, tilapia o salmón (Olsen y col., 2006; Hsieh y col., 2006; Birkbeck y col., 2007; Mauel y col., 2007; Jeffery y col., 2010; Birkbeck y col., 2011; Nylund y col., 2011). También se han descrito mortalidades en abalones (Kamaishi y col., 2010) y vieiras (Meyer y col., 2017), por lo que posiblemente pueda afectar a otros moluscos bivalvos o estos puedan actuar como posibles vectores de la enfermedad a peces.

Los géneros de bacterias, como *Vibrio* y *Psuedoalteromas*, que solían conformar la mayoría de la microbiota en estudios realizados mediante metodologías dependientes de cultivo (Romalde y col., 2013) aparecen también representados en la mayoría de las muestras de este estudio, pero con porcentajes mucho más bajos.

Estos resultados demuestran la sobreestimación de ciertos grupos de bacterias mediante las técnicas dependientes de cultivo. Es necesario realizar más estudios sobre la función ecológica de algunos géneros en los diferentes órganos de almeja, tratando de aumentar nuestro conocimiento sobre el papel metabólico que estos bacterias, cultivables y no cultivables, puedan tener en las almejas y la función que puedan desempeñar en diferentes procesos como la reproducción, digestión o su acción antimicrobiana frente a diferentes agentes patógenos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4. ESTUDIO DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE ASOCIADA A ALMEJA FINA Y JAPONESA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN A EXTINCIÓN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4 ESTUDIO DE LA MICROBIOTA CULTIVABLE ASOCIADA A ALMEJA FINA Y JAPONESA MEDIANTE LA TÉCNICA DE DILUCIÓN A EXTINCIÓN

El desarrollo de las técnicas de secuenciación en los últimos años, ha hecho posible la detección de nuevos géneros bacterianos que no habían sido aislados con anterioridad formando parte de la microbiota de moluscos bivalvos. Por lo tanto, es importante realizar estudios utilizando nuevas técnicas que nos permitan aislar estos taxones y poder estudiar su posible función en el hospedador.

La mayoría de los estudios que han intentado recuperar bacterias no cultivables en ambientes marinos, se han centrado en la técnica de dilución a extinción, modificando la composición de los medios para imitar las condiciones de las bacterias en el agua. Rappé y col. (2002) lograron aislar con éxito bacterias no cultivadas del clado SAR11, a partir de las cuales estudiaron los requerimientos nutricionales de este clado y desarrollaron medios de cultivo que favorecían su crecimiento (Giovannoni y col., 2005; Tripp y col., 2008). Song y col. (2008) además de modificar los medios de cultivo, también modificaron el tiempos y la temperatura de incubación. Collado y col. (2006) adaptaron esta técnica al cultivo de hongos, observando un aumento en la riqueza de especies en comparación con las técnicas convencionales. Esta técnica ha permitido el cultivo y estudio de multitud de taxones antes no cultivables de ambientes marinos y de agua dulce (Page y col., 2004; Stingl y col., 2007; Jang y col., 2011).

En el presente capítulo, hemos estudiado la microbiota asociada a almeja fina (*R. decussatus*) y japonesa (*R. philippinarum*) mediante la técnica de cultivo de dilución a extinción, en la cual se ha tratado de reducir los nutrientes para beneficiar el crecimiento de comunidades de bacterias oligotróficas, estrictas o facultativas, que se encuentran adaptadas a un ambiente escaso en nutrientes y que puedan verse enmascarados en los medios usados por las técnicas convencionales de cultivo. Además, se aumentaron los tiempo de incubación para intentar aislar aquellas bacterias con un crecimiento más lento.

4.1 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1.1 Muestreo

Para la realización de este estudio se seleccionaron 20 ejemplares de almejas del muestreo realizado en el capitulo 3 de la presente tesis. Se analizaron 5 ejemplares de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y 5 ejemplares de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) del mes de octubre de cada una de las localizaciones. Los ejemplares se diseccionaron en condiciones asépticas, separando con la ayuda de unas pinzas y un bisturí estéril cuatro órganos: manto, branquia, hepatopáncreas y gónada. Posteriormente, se homogenizaron las muestras de cada órgano con solución salina al 0,85% en relación 1:1 (p/v).

4.1.2 Procesado de las muestras

4.1.2.1 Técnica de dilución a extinción

A partir de los homogenados obtenidos, se determinó el número de células viables en cada una de las muestras usando el kit Live/Dead BacLight bacterial viability (Invitrogen). En primer lugar, se centrifugó 1 ml de cada muestra a 4000 g durante 2 min y se recogieron 500 τl del sobrenadante. A estos 500 τl se le añadieron 1,5 τl de propidio iodado y 1,5 τl de SYTO9 (reactivos del kit). La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. Transcurrido este tiempo se realizó una centrifugación a 5000 g durante 4 min y se resuspendió el pellet en 100 τl de PBS. El número de células viables se determinó en un microscopio de fluorescencia, de forma que las células viables se visualizarían en verde y las células no viables en rojo. A continuación, se ajustó cada una de las muestras para inocular 1-5 células en cada uno de los 96 pocillos de una placa con Caldo Marino (Difco) diluido 10 y 100 veces. Una vez inoculadas todas las muestras se incubaron durante 60 días en oscuridad a 24±1ºC. Transcurridos los dos meses, se sembraron cada uno de los pocillos en AM (MA, Difco) diluido 10 (AM1/10) o 100 veces (AM1/100), se incubaron 5 días a 24±1ºC y se aislaron las colonias diferentes morfológicamente. Los cultivos puros obtenidos se conservaron a -80ºC en Caldo Marino diluido 10 o 100 veces suplementado con un 15% de glicerol (v/v). (Fig.1)

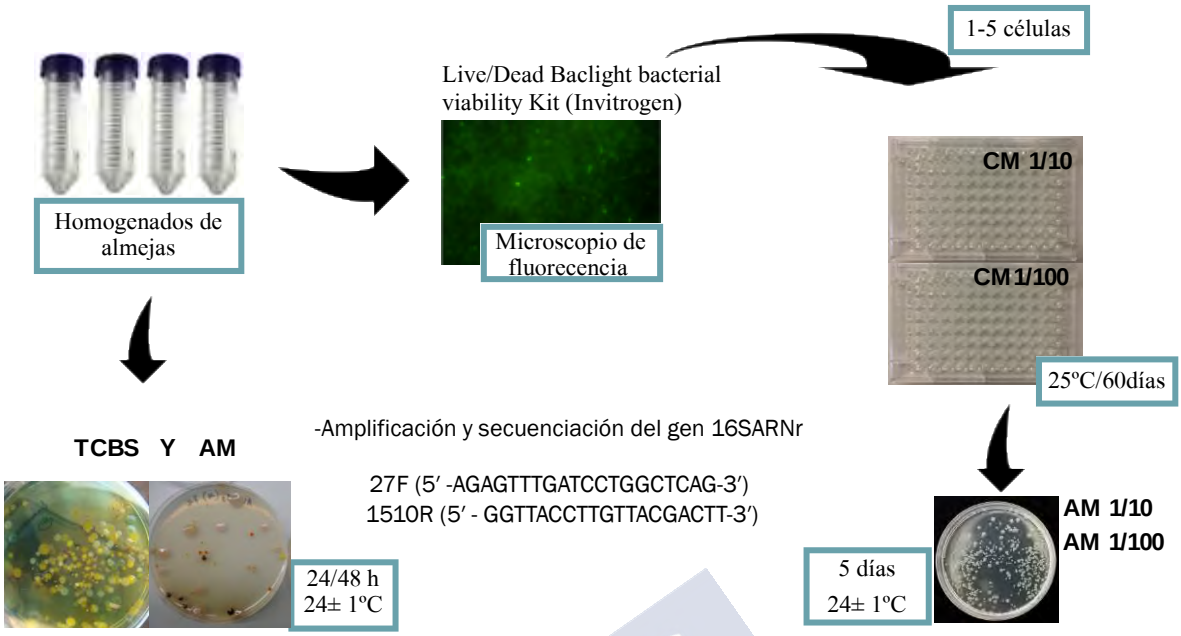

Figura 4.1. Esquema de metodología utilizada en dilución a extinción y siembra directa.

4.1.2.2 Metodología clásica

A partir de los homogenados obtenidos, se realizaron diluciones seriadas y se sembraron 100 ɀl de cada una de las diluciones en placas de Agar Marino (AM, Difco) y de Tiosulfato-Citrato-Bilis-Sacarasa (TCBS, Oxoid). Las placas se incubaron durante 24/48 h a 24± 1ºC. Una vez incubadas, se aislaron las colonias morfológicamente diferentes en AM y se incubaron 24±1ºC durante 24 h. Los cultivos puros obtenidos se conservaron a -80ºC en Caldo Marino (Difco) suplementado con un 15% de glicerol (v/v).

4.1.3 Extracción de ADN cromosómico

El ADN cromosómico de las células bacterianas se extrajo a partir de los cultivos puros obtenidos utilizando el kit comercial InstaGene matrix (Bio-Rad). Las células bacterianas de los cultivos puros, obtenidos en AM, AM1/10 o AM/100, se resuspendieron en 1 ml de agua destilada esterilizada 3 veces y se centrifugaron a 12000 rpm durante 1 min, desechando el sobrenadante. El pellet se resuspedió en 200 ɀl de la matriz InstaGene y se incubó a 56ºC durante 30 min. A continuación, las muestras se agitaron en un vórtex durante 10 segundos, se incubaron a 100ºC durante 8 minutos, y se agitaron otros 10 segundos. Por

último, las muestras se centrifugaron a 12000 rpm durante 2 min. La concentración de ADN de cada muestra se calculó utilizando el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher), ajustando el ADN a 1000 ng/ɀl. Este ADN extraído de cada muestra se conservó a -20ºC hasta su uso.

4.1.4 Amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr

Para la amplificación del gen ARNr 16S se utilizó el kit comercial DreamTaq PCR MasterMix (Thermo Scientific) que contiene: la enzima polimerasa DreamTaq, Buffer DreamTaq, MgCl2 y dNTPs). Los cebadores utilizados para amplificar el gen ARNr 16S fueron el cebador directo 27F (5'–AGAGTTTGATCCTGGCTCAG–3') y el cebador reverso 1510R (5'–GGTTACCTTGTTACGACTT–3') que flanquean un fragmento de unos 1540 pares de base (Hutson y col., 1993). Para la realización de la PCR se añadieron: 12.5 ɀl de la Dreamtaq MasterMix, 9.5 ɀl de agua triestéril y 1 ɀl del cebador 27F y 1 ɀl del cebador 1510R y 1 ɀl de ADN de la muestra ajustada a una concentración de 1000 ng/ɀl. Las condiciones de PCR utilizadas para amplificación son la que se muestras en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Condiciones de la PCR para la amplificación del gen ARNr16S.

Ciclos		**Temperatura**	**Tiempo**
Desnaturalización inicial		94ºC	2 minutos
Desnaturalización	35 ciclos	94ºC	1 minuto
Hibridación		56ºC	1 minuto
Elongación		72ºC	1 minuto
Elongación final		72ºC	5 minutos

Los productos de la amplificación se analizaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa a una concentración del 1% (p/v) en tampón Tris–Acetato–EDTA (TAE) 1X (Sambrook et al. 1989), a los que se adicionó una dilución 1:10000 del reactivo GelRed Nucle Acid Gel Stain 10000X (Biotium) diluyendo el reactivo en la solución de agarosa. Las condiciones de electroforesis fueron de 120 V durante 20 min y los geles se visualizaron en

un transiluminador de ultravioleta (GelDoc 100, Bio–Rad). El marcador de referencia utilizado fue FastRuler Low Range DNA (Thermo Scientific) que permite determinar peso molecular de fragmentos entre los entre los 50 pb y 1500 pb.
Las muestras amplificadas se enviaron al laboratorio STAB VIDA, Investigaçao e Serviços en Ciências Biológicas, donde fueron secuenciadas mediante el método Sanger.

4.1.5 Análisis filogenético

El análisis de las secuencias obtenidas se llevó a cabo usando el paquete de programas DNASTAR Lasergene. Las secuencias se corrigieron manualmente mediante el programa SeqMan (Lasergene, USA). La identificación de cada una de las secuencias se realizó a través de la base de datos EZBiocloud (https://www.ezbiocloud.net)(Yoon y col., 2017)
Para los estudios filogenéticos de las secuencias se utilizó el programa Mega versión 7 (Kumar y col., 2016) mediante el cual se alinearon las secuencias usando la herramienta CLUSTAL W (Larkin y col., 2007) y se construyeron los árboles filogenéticos utilizando el algoritmo de Neighbour–joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987), aplicando el modelo evolutivo Kimura-2-parametros (Kimura, 1980).

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Dilución a extinción

Se obtuvieron un total de 132 aislados mediante la técnica de dilución. De ellos, 41 se corresponden con las muestras de *R. philippinarum* de Carril, de las cuales 13 se asilaron a partir de AM 1/10 (CJ1/10) y 28 de AM1/100 (CJA1/100). A partir de *R. decussatus* se obtuvieron 34 aislados, 13 de AM1/10 (CF1/10) y 21 de AM 1/100 (CF1/100). En Redondela, se identificaron 30 aislados de *R. philippinarum*, 17 de AM1/10 (RJ1/10) y 13 de AM1/100 (RJ1/100). A partir de las muestras de *R. decussatus* se obtuvieron un total 28 aislados, 16 a partir de AM1/10 (RF1/10) y 12 de AM1/100 (RF1/100)(Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Número de aislados obtenidos en cada muestreo mediante las técnicas clásica y de dilución a extinción..

	Carril			Redondela		
	AM	**AM1/10**	**AM1/100**	**AM**	**AM1/10**	**AM1/100**
R. decussatus	21	13	21	35	16	12
R. philippinarum	26	13	28	13	17	13

Tras la identificación mediante la base de datos Ezbiocloud, analizando las secuecnias a nivel de filo, se observó que el filo *Gammaproteobacteria* fue el más abundante en todas las muestras. Además, el filo *Actinobacteria* aparece con mayor abundancia en las muestras de AM1/100 de almeja japonesa y fina de Carril, CJA1/100 (29,6%) y CFA1/100 (42,9%). El filo *Betaproteobacteria* solo aparece representado en las muestras de Carril de almeja japonesa con porcentajes del 7,7% (CJ1/10) y 3,7% (CJ 1/100) (Fig. 2).

A nivel de género, se observó una alta prevalencia del género *Pseudomonas* en todas las muestras de AM1/100, siendo más abundante en las almejas de Redondela. En las muestras de AM1/10 los géneros predominantes fueron *Pseudomonas* y *Shewanella,* con porcentajes muy semejantes entre ambos, constituyendo más del 50% de los aislados. Por otro lado, al analizar los géneros presentes en las muestras, se observó una mayor diversidad de géneros en las muestras de Carril que en las muestras de Redondela. Además, en Carril el número de géneros diferentes encontrado en las muestras de AM1/100 fue más elevado que en AM1/10. (Fig. 4.2).

En la localización de Carril, en las muestras de almeja japonesa de AM1/10 (CJA1/10) los géneros predominantes fueron *Pseudomonas* (30%), *Shewanella* (23%) y *Aeromonas* (23%). Otros géneros como *Janthinobacterium, Citrobacter* y *Rahnella*, fueron menos abundantes con alrededor de un 7% cada uno. En el caso de los aislados de almeja fina obtenidos de AM1/10 (CFA1/10), los géneros más abundantes fueron *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y *Brachybacterium* (30%, 23%, 15% y 15%, respectivamente). Otros géneros como *Micrococcus* y *Rahnella* aparecieron con abundancias alrededor del 7%. Como ya hemos mencionado previamente, el número de géneros encontrados en las muestras de AM1/100 fue mayor que en las muestras de AM1/10. En las muestras de CJA1/100, los géneros *Pseudomonas* y *Micrococcus* consituyen el 40% del total de los aislados, el otro 60%

se encuentra formado por varios géneros: *Shewanella*, *Aeromonas*, *Rahnella*, *Janthinobacterium,* *Lelliottia*, *Microbacterium*, *Brachybacterium*, *Brevudimonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacterium* y *Serratia* (con porcentajes entre el 3 y 7%). El 50 % de los aislados de almeja fina de AM1/100 (CFA1/100) se identificaron como especies de los géneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Gordonia*. Los géneros *Micrococcus* y *Microbacterium* se encuentra los dos con porcentajes cercanos al 10%, mientras que el otro 28% de los aislados se encuentra formado por especies de los géneros *Shewanella*, *Lelliotia*, *Brevundimonas*, *Sphingomonas* y *Janibacter*.

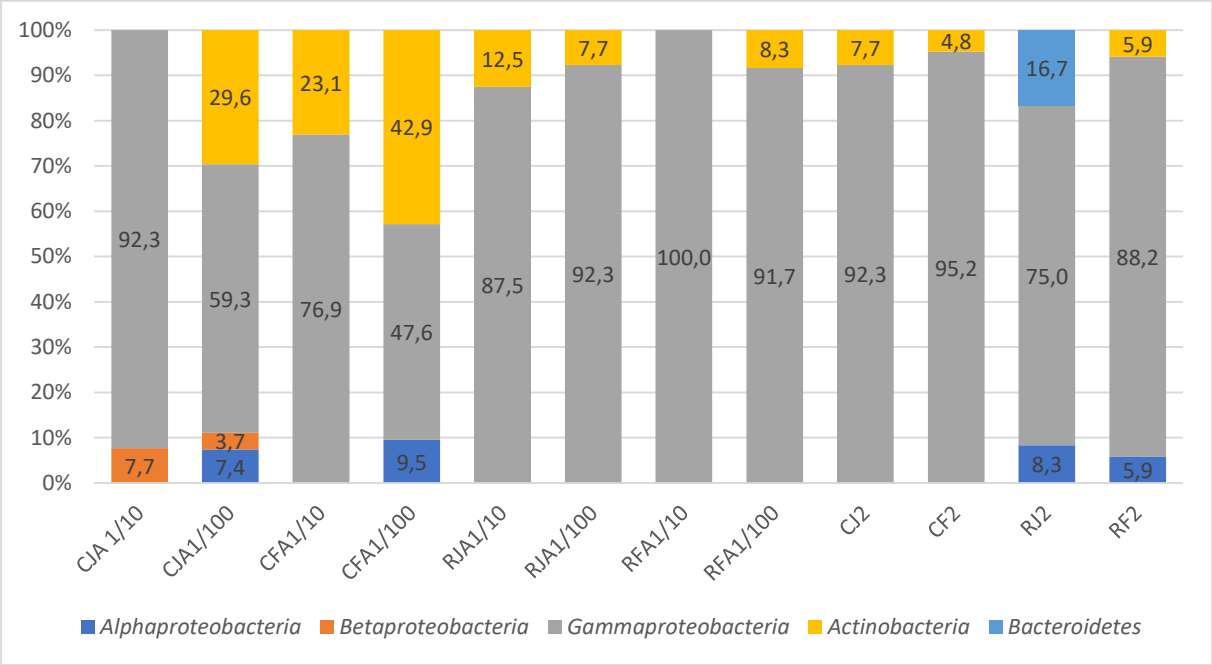

Figura 4.2. Abundancias relativas a nivel de filo obtenidas de *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*. El gráfico muestra los porcentajes de aislados asociados a cada filo mediante la identificación en la base de datos EzBiocloud de los fragmentos amplificados del gen ARNrv16S. RF= *R. decussatus* de Redondela, RJ= *R. philippinarum* de Redondela, CF= *R. decussatus* de Carril y CJ= *R. philippinarum* de Carril. 2= Siembra directa, 1/10= Agar Marino diluido 10 veces y 1/100= Agar Marino diluido 100 veces.

En Redondela, los aislados recuperados mediante dilución a extinción están representados por menor número de géneros que en las muestras de almejas de Carril. En las muestras de almeja fina y japonesa de Redondela obtenidas a partir de AM1/10 (RJA1/10 y RFA1/10), los géneros más abundantes fueron *Pseudomonas* y *Shewanella*, representando el 60% de los aislados de RJ1/10 y el 80% de RF1/10. En las muestras de AM1/100 el género

Pseudomonas fue el más abundante tanto en almeja japonesa (77%) como en almeja fina (42%). El género *Serratia* se encuentra con porcentajes del 15-16% en ambas especies de almejas y el género *Rahnella* aparece representando el 25% de los aislados en las muestras de almeja fina de AM1/100. Este género solo se encontró en las muestras de dilución a extinción y la mayoría de los aislados fueron identificados como *Rahnella victoriana* y *Rahnella aquatilis* (Anexo 1).

4.2.2 Metodología clásica

A partir de las muestras de siembra directa en AM y TCBS se obtuvieron un total de 95 aislados. De los 48 que se obtuvieron a partir de las almejas procedentes de Redondela, 35 de fueron de las muestras de *R. decussatus* y 13 de *R. philippinarum*. De las muestras de Carril se aislaron un total de 47 aislados, de los cuales 21 se obtuvieron a partir de *R. decussatus* y 26 de *R. philippinarum*. El filo mayoritario fue *Gammaproteobacteria*, con porcentajes superiores al 88% en la mayoría de las muestras, excepto en la muestra de almeja japonesa de Redondela (RJ2), donde constituye un 75% de los aislados. El filo *Bacteroidetes* representa casi un 17% y *Alphaproteobacteria* un 8,3% (Fig. 4.3). El género mayoritario en todas las muestras fue *Vibrio*, con porcentajes entre el 42% y 57% del total de la microbiota. En Carril, el género *Pseudomonas* fue el segundo género mas abundante tanto la almeja fina (24%) como en almeja japonesa (27%). El género *Shewanella* se encontró en las muestras de almeja japonesa de Carril y de almeja fina de Redondela, con porcentajes del 19% y 20%, respectivamente. Otros géneros detectados con menor proporción fueron *Bacillus*, *Tenacibaculum*, *Photobacterium*, *Aliiroseovarius*, *Agarovorans*, *Cellulophaga*, *Endozoicomonas*, *Pseudomonas*, *Kiloniella*, *Acinetobacter* y *Aliivibrio*. Las muestras procedentes de Redondela presentaron una mayor diversidad bacteriana que las de Carril.

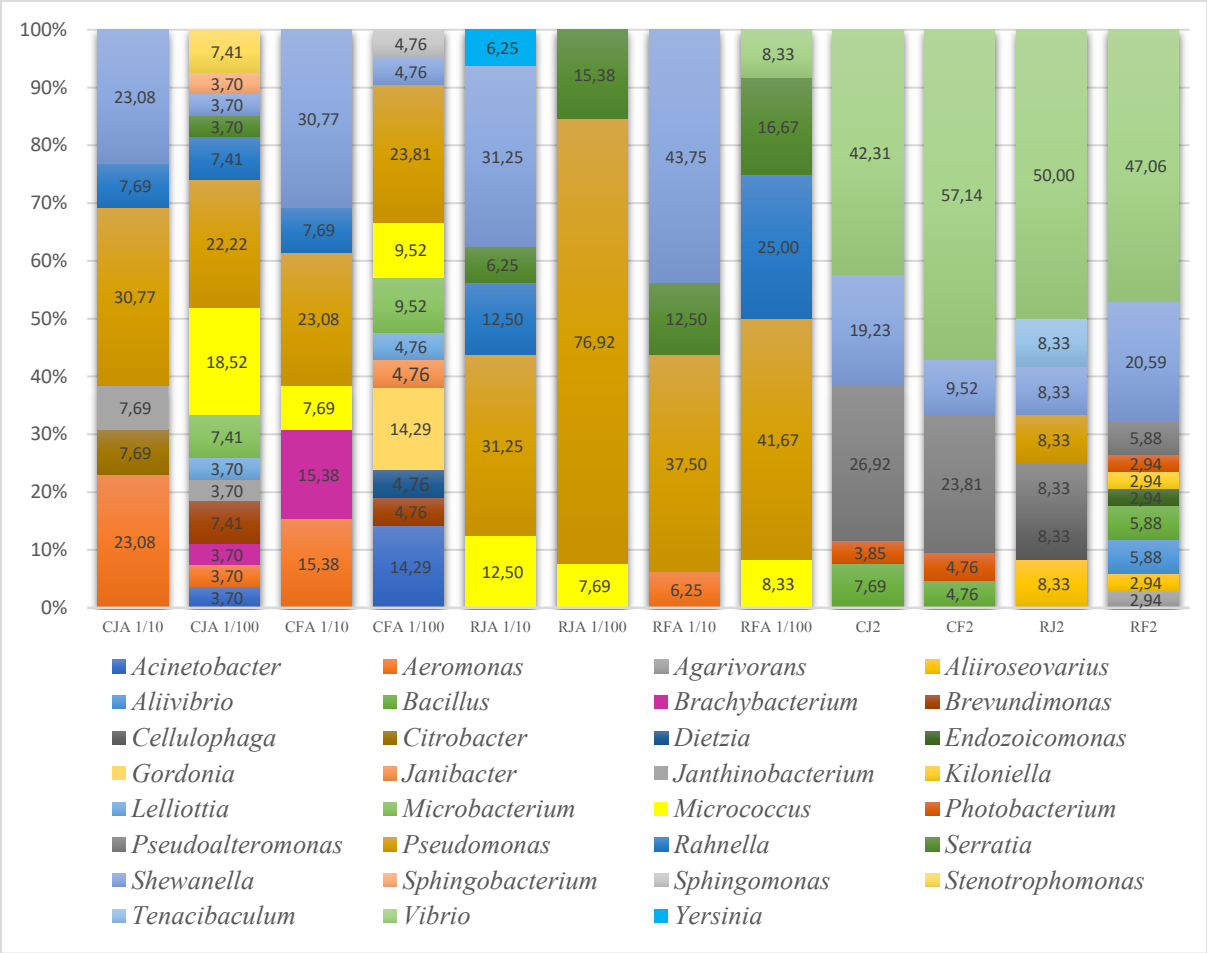

Figura 4.3. Abundancias relativas a nivel de género obtenidas de *Ruditapes decussatus* y *Ruditapes philippinarum*. El gráfico muestra los porcentajes de aislados asociados a cada género mediante la identificación en la base de datos EztBioCloud de los fragmentos amplificados del gen ARNr 16S. RF= *R. decussatus* de Redondela, RJ= *R. philippinarum* de Redondela, CF= *R. decussatus* de Carril y CJ= *R. philippinarum* de Carril. 2= Siembra directa, A1/10= Agar Marino diluido 10 veces y A1/100= Agar Marino diluido 100 veces.

4.2.3 Géneros comunes

Las muestras procedentes de siembra directa y de dilución a extinción comparten solamente 3 géneros: *Vibrio*, *Pseudomonas* y *Shewanella*. El género *Vibrio* se encuentran representado por un único aislado en las muestras de dilución a extinción. Por el contrario, en siembra directa solo se detectó un aislado identificado como *Pseudomonas*. Aunque el número de aislados del género *Shewanella* en las muestras fue elevado, al comparar los aislados a nivel de especie, en dilución a extinción la gran mayoría fueron identificados como *Shewanella hafniensis,* mientras que ninguno de los aislados obtenidos en siembra directa se

identificaron próximos a esta especie. Las especies detectadas mediante siembra directa en AM y TCBS (*S. electrodiphila*, *S. sairae*, *S. aestuarii*, *S. pneumatophori*, *S. colwelliana*, *S. echelgeliana* y *S. algidipiscicola*) no fueron detectados a partir de los aislados de las muestras de dilución a extinción. Al realizar un análisis filogenético del género *Shewanella*, los aislados de dilución a extinción se encontraban agrupados, cercanos a la especie *S. hafniensis*, mientras que los aislados de siembra directa, se encontraban distribuidos en diferentes linajes dentro del género Shewanella, alejados de los aislados de dilución a extinción (Fig. 4.4).

4.3 DISCUSIÓN

Los géneros identificados mediante siembra directa en AM y TCBS, son muy semejantes a los obtenidos en un estudio anterior realizado por nuestro grupo (Romalde y col., 2013), donde los géneros *Vibrio y Pseudoalteromonas* fueron los géneros mayoritarios asociados a la microbiota de la almeja fina (*R. decussatus*) y japonesa (*R. philippinarum*). Sin embargo, los géneros identificados en las muestras de dilución a extinción difirieron bastante de los de siembra directa. El género *Vibrio,* solo estaba representado por un aislado en la muestra diluida de almeja fina de Carril (CFA1/100), mientras que el género *Pseudoalteromonas* no apareció en ninguna de las muestras de dilución a extinción. Muchos de los géneros descritos mediante la técnica de dilución a extinción no habían sido detectados con anterioridad formando parte de la microbiota de almeja fina y japonesa (Balboa y col., 2016).

Además, en este estudio, fueron muy pocos los géneros comunes aislados con ambas técnicas simultáneamente. Uno de estos géneros es el género *Shewanella* que se asocia habitualmente a la microbiota de bivalvos (Romalde y col., 2013), aunque la especie detectada en este trabajo con mayor frecuencia, *S. hafniensis*, nunca se había aislado a partir de moluscos.

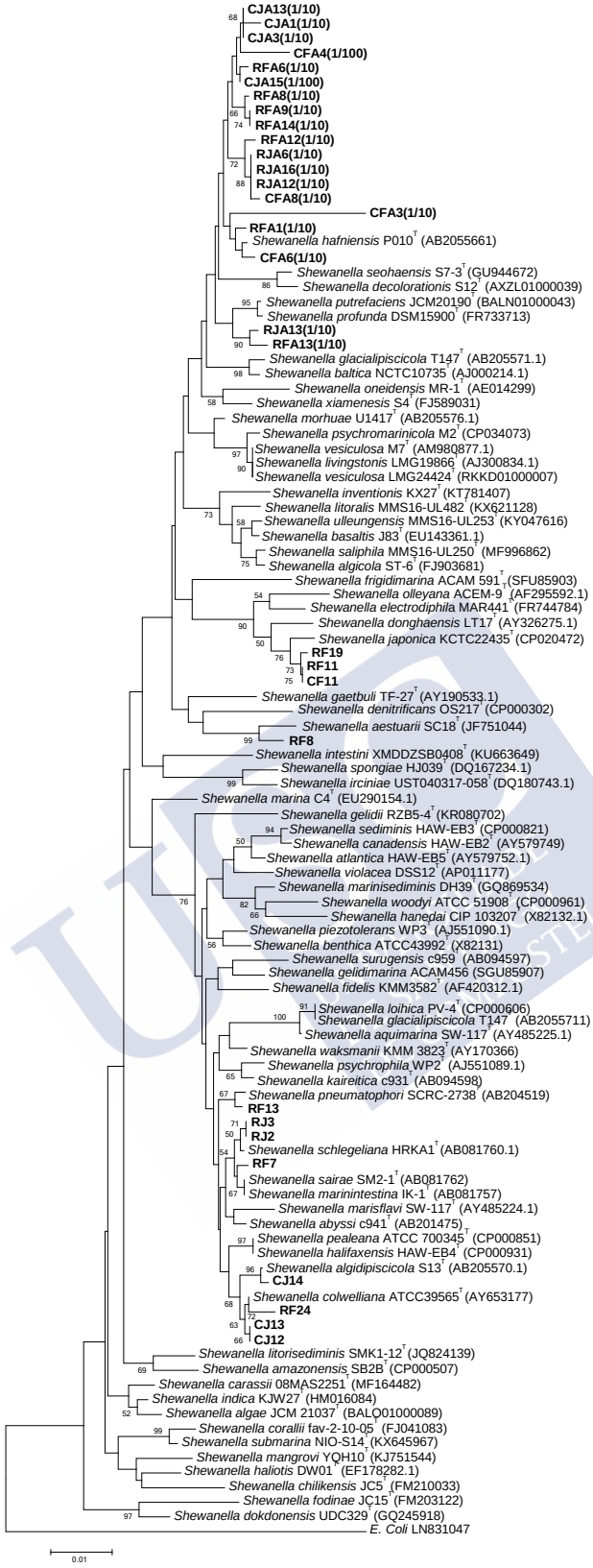

Figura 4.4. Árbol filogenético obtenido medialte el método NJ basado en las secuencias del gen ARNr 16S de, los aislados pertenecientes al género *Shewanella* obtenidos mediante la siembra directa (en AM y TCBS) y dilución a extinción, y las especies del género *Shewanella* más próximas a nuestros aislados. Barra, el número se corresponde con el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de boostrap iguales o mayores del 50% como porcentaje de 1000 peudoréplicas.

Otros géneros detectados en las muestras de Carril de dilución a extinción como *Gordonia, Acinetobacter* o *Brachybacterium*, aparecen habitualmente asociados a ambientes marinos. Así, el género *Gordonia* se ha encontrado formando parte de la microbiota de distintos organismos invertebrados como las esponjas, pudiendo tener una función protectora al producir compuestos antimicrobianos y bioactivos (Sowani y col., 2018). El género *Acinetobacter* ya había sido descrito con anterioridad en moluscos bivalvos, incluyendo almejas, ostras y mejillones (Kueh y Chang, 1985; Hatha y col., 2005; Beaz-Hidalgo y col., 2010). Las especies del género *Brachybacterium* más cercanas a nuestros aislados, *B. paraconglomeratum* y *B. rhamnosum*, se han detectado formando parte de la microbiota de diversas especies de esponjas (Montalvo y col., 2004) y en diferentes macroalgas (Kiran y col., 2014; Leiva y col., 2015; Alvarado y Leiva, 2016). Ambas especies presentan actividad antimicrobiana (Leiva y col., 2015; Rizzo y col., 2018) y algunas cepas de *B. paraconglomeratum* son capaces de degradar antraceno y por lo tanto, son buenas candidatas para su uso en la biorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Lily y col., 2013). Por todo esto, sería interesante estudiar la función que este género pueda tener sobre la microbiota o el cultivo de almeja.

El género *Micrococcus* se encontró representado solo en la técnica de dilución a extinción. Las especies de este género han sido aisladas de diferentes ambientes como desechos lácteos (Chittpurna y col., 2011), de la superficie de la piel humana (Kloos y col., 1974), suelo y plantas (Zhao y col., 2009; Liu y col., 2007; Zhang y col., 2010). Este género ya había sido detectado en anteriores estudios de moluscos bivalvos, pero en porcentajes muy bajos (Murchelano y Brown, 1970; Rajagopalan y Sivalingham, 1978; Sugita y col., 1981).

El género *Microbacterium* solo se encontró en las muestras de Carril de AM1/100. Este género ya se encontró con anterioridad en almeja japonesa, observándose actividad antimicrobiana de algunos cepas de este género contra *V. corallilyticus* (Leite y col., 2017). Alguna de las especies con las que nuestros aislados presentaron porcentajes de similitud más elevados fueron *Microbacterium insulae,* aislado a partir de muestras de suelo y cultivado en agar marino diluido (Yoon y col., 2009) o *Microbacterium aurantiacum* (Takeuchi y Hatano, 1998) y *M. kitamiensis* (Matsuyama y col., 1999) que fueron descritas a partir de aguas residuales.

Otro género que nunca había sido aislado a partir de almeja es el género *Rahnella*. Este género solo se encontró en las muestras de dilución a extinción y la mayoría de los

aislados fueron identificados como *Rahnella victoriana* y *Rahnella aquatilis* (Anexo 1). La especie *R. victoriana* se ha asociado con la enfermedad de disminución aguda del roble, AOD (del inglés *Acute Oak Decline*) (Brady y col., 2014). Por otro lado, *R. aquatilis* se ha detectado causando infecciones en humanos (Chang y col., 1999; Tash, 2005), en carpas y peces tropicales (Lũ y col., 2017; Lamb y col, 2018) e incluso en infecciones de cebollas (Asselin y col., 2019). Un estudio más profundo de las especies de este género puede ser interesante, ya que, al estar asociado con lesiones de peces de aguas templadas, debido al calentamiento global, en un futuro podría ser un riesgo potencial en el cultivo de peces u otros organismos.

Géneros como *Microbacterium*, *Janibacter* o *Sphingomonas*, identificados a partir de la secuenciación masiva del gen ARNr 16S (ver capitulo 3), pudieron ser recuperados mediante la técnica de dilución a extinción. Ninguno de estos géneros fueron detectados mediante siembre directa en AM y TCBS. Por lo tanto, esta técnica nos permite estudiar más profundamente determinados taxones que se detectan mediante las nuevas técnicas de secuenciación masiva, permitiendo obtener información sobre el papel que estos géneros pueden desempeñar dentro de la almeja.

La gran diferencia entre los géneros detectados mediante las técnicas convencionales de siembra directa y la técnica de dilución a extinción, muestra la necesidad de incluir más medios de cultivo y modificar los protocolos de incubación en futuros estudios debido a los requerimientos nutricionales de algunos grupos de bacterias, así como la diferente abundancia encontrada para algunos géneros en los medios oligotróficos en comparación con los medios clásicos. Además, debido a que muchos géneros bacterianos se ven enmascarados por otros grupos de bacterias que tienen un mejor crecimiento en los medios convencionales, la inclusión de nuevos medios con diferente composición, haría posible la identificación de nuevas especies bacterianas patógenas o beneficiosas.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DESCRIPCIÓN DE NUEVOS TAXONES BACTERIANOS DEL GÉNERO *RAHNELLA* A PARIT DE ALMEJA FINA Y JAPONESA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5 DESCRIPCIÓN DE NUEVOS TAXONES BACTERIANOS DEL GÉNERO *RAHNELLA* A PARTIR DE ALMEJA FINA Y JAPONESA

El género *Rahnella* fue propuesto en el año 1979 a partir de muestras de agua dulce, describiéndose la primera especie con el nombre de *R. aquatilis* (Izard y col., 1979). Posteriormente, en 2014, Brady y colaboradores describieron otras 5 nuevas especies de este género (*R. victoriana*, *R. variigena*, *R. inusitata*, *R. bruchi* y *R. woolbedingensis*) a partir de aislados obtenidos de muestras de robles con síntomas de la enfermedad de disminución aguda del roble, AOD (del inglés *Acute Oak Decline*), alisos, nogales, escarabajos, muestras de quemaduras humanas y algunas muestras de origen desconocido (Brady y col., 2014). Algunas especies de este género se han asociado además con infecciones en humanos, peces, y cebollas.

R. aquatilis se ha descrito como un patógeno oportunista en infecciones urinarias, cardiovasculares y respiratorias en humanos (Chang y col., 1999; Ruimy y col., 2010; Tash, 2005). En 2017, Lũ y colaboradores realizaron experimentos de infección en carpas (*Carassius auratus*) con un aislado identificado como *R. aquatilis*, demostrando la patogenicidad para carpas de esta bacteria. Diferentes aislados de *R. victoriana* se han asociado con robles enfermos (Brady y col., 2014; Denma y col., 2018).

Lamb y col. (2018) obtuvieron dos aislados identificados como *R. inusitata* a partir de úlceras de peces tropicales (*Stegastes beebei* y *Holacanthus passer*) que presentaban signos de enfermedad como movimientos erráticos, pérdidas de escamas y letargo. Estos autores asociaron la aparición de estos signos con el fenómeno el Niño, que debido al aumento de las temperaturas del agua podría estar provocando la emergencia de nuevas especies patógenas.

En un estudio de 2019, se detectaron diferentes aislados pertenecientes al género *Rahnella* como agentes causales de enfermedad en bulbos de cebollas, estando la mayoría de estos aislados más cercanos a la especie *R. aquatilis* (Asselin y col., 2019).

En el presente trabajo se describen dos nuevas especies del género *Rahnella* en base a la secuenciación del genoma completo de un grupo de aislados de almeja fina (*Ruditapes decussatus)* y japonesa (*Ruditapes philippinarum*) en Galicia obtenidos de muestreos en octubre de 2015.

5.1 MATERIAL Y MÉTODOS.

5.1.1 Origen aislados y condiciones de cultivo

Para la realización de este estudio se seleccionaron un total de 5 aislados obtenidos mediante la técnica de dilución a extinción (ver capítulo 4), a partir de muestras de almeja fina (*R. decussatus*) y almeja japonesa (*R. philippinarum*) procedentes de Redondela (42°17'40.4" N 8°36'57.2" W) y Carril (42°36'50.4" N 8°46'39.1" W). Las cepas utilizadas se muestran en la Tabla 5.1, especificando cuales se aislaron a partir de AM diluido 10 veces y de AM dilucido 100 veces.

Tabla 5.1. Aislados seleccionados para el estudio. 1/10= aislados obtenidos de AM diluido 10 veces y 1/100= aislados obtenidos de AM diluido 100 veces.

Origen	Especie de almeja	Código aislado
Carril	Almeja fina	CFA14(1/10)
Carril	Almeja japonesa	CJA9(A1/10), CJA17(1/100)
Redondela	Almeja fina	RFA10(1/100), RFA1(1/10)

Todos los aislados se cultivaron a 24±1ºC durante 24/48 h en AM y se conservaron congeladas a -80ºC en caldo marino con 15% (v/v) de glicerol.

5.1.2 Caracterización bioquímica

5.1.2.1 Metodología clásica

Para el estudio fisiológico y bioquímico de los diferentes aislados, se realizó una caracterización fenotípica siguiendo los protocolos descritos por Mac Faddin (1993) y Romalde y col. (1990) descritos a continuación:

- Morfología y movilidad.

  Se determinó a partir de una suspensión en solución salina de una colonia de un cultivo puro y su visualización directa a 40X en un microscopio óptico (Leica DM750)

- Carácter Gram.

Para la determinación del carácter Gram de los aislados se utilizó el método desarrollado por Buck (1989) con KOH. Con la ayuda de un palillo se coge una colonia de un cultivo puro y se dispersa sobre una gota de KOH al 3% sobre un portaobjetos limpio y se observa si se produce viscosidad o no. El KOH reacciona con la membrana fosfolipídica externa de las bacterias Gram negativa produciendo viscosidad en la gota, en caso contrario no se observa ningún cambio en la textura

- Oxidasa

Esta prueba consiste en la detección de la enzima citocromo-oxidasa mediante el método de Kovacs (1956). Para ello se preparó una solución acuosa de tetrametil–parafenil–diamina-dihidrocloridio al 1% y se impregnó un papel de filtro Whatman Nº1. Con la ayuda de un palillo estéril se extendió sobre el filtro una porción de cultivo fresco. Las bacterias que contengan la enzima oxidasa producen un color violáceo al entrar en contacto con el reactivo. Las bacterias oxidasa negativas no producen cambio alguno.

- Catalasa

Para la detección de la enzima catalasa se puso sobre un portaobjetos una gota de peróxido de hidrógeno y con la ayuda de un asa de siembra o un palillo estéril se extiendió un poco de cultivo fresco. La formación de burbujas indica la presencia de la enzima catalasa que está convirtiendo el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

- Oxidación-Fermentación de la glucosa

Para la determinación de metabolismo oxidativo o fermentativo de los aislados se utilizó el medio basal O/F de Hugh y Leifson (1953) y ZOFT (Lemos y col., 1985) suplementados con un 1% de glucosa. A partir de un cultivo líquido en Caldo Marino, se inocularon dos tubos de cada medio, uno de ellos se cubrió con parafina líquida para así mantener condiciones de anaerobiosis y el otro se dejó en condiciones de aerobiosis. Se incubaron a 24±1ºC durante una semana. Si se produce un cambio de color del medio a amarillo solo en los tubos en aerobiosis, indica que la bacteria tiene un metabolismo oxidativo. Si cambia de color tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, tendrán un metabolismo fermentativo.

- Crecimiento en TCBS

El medio TCBS (tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa) es un medio selectivo-diferencial para vibrios. Se inoculó la bacteria en la placa de TCBS (Oxoid) y se incubó a 24±1ºC

durante 24/48h horas. Si la bacteria crece y fermenta sacarosa el color de las colonias será amarillo, mientras que sí crece y no fermenta sacarosa, el color será de color verde.

- Sensibilidad al agente vibriostático 0/129

Para ver la resistencia o sensibilidad a la pteridina (agente vibriostático 0/129) se empleó medio Agar Müller–Hinton (Oxoid) con NaCl al 1% (MHA–1) y los discos comerciales de 150 μg de 0/129 (Oxoid). A partir de una suspensión de bacteria en caldo marino y con la ayuda de un hisopo estéril se sembró en una placa de MHA-1, se colocó un disco comercial y se dejó incubando 24/48h a 24±1ºC. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la resistencia o sensibilidad según los halos de inhibición formados.

- Decarboxilación/dihidrólisis de aminoácidos.

Con esta prueba testamos la capacidad de las bacterias para la decarboxilación o dihidrólisis enzimática de arginina, lisina y ornitina, produciendo aminas y alcalinizando el medio. Esta reacción se produce en anaerobiosis. El medio utilizado fue Moẽller (Difco) suplementado con L-arginina, L-lisina o L-ornitina con una concentración final del 1% (p/v). A partir de un cultivo líquido, se inoculó la bacteria y se cubrieron los tubos con parafina líquida. Se dejó incubar a 24±1ºC durante 1 o 2 semanas. Si se produce la alcalinización del medio, los tubos se vuelven de color violeta, debido al indicador de pH púrpura de bromocresol.

- Reacción del indol

Este método consiste en determinar la producción del metabolito indol debido a la degradación del aminoácido triptófano por acción de la enzima triptofanasa. Para determinar la liberación del indol se utilizaron tubos de Caldo triptona (Difco) suplementado con 1% de Nacl. Se inoculó unas gotas de bacteria resuspendida en Caldo Marino y se incubó durante 24/48 h a 24±1ºC. Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron unas gotas del reactivo de Kovacs (Kovacs, 1956). La aparición de un anillo color rosa en la parte superior del tubo indica la liberación de indol.

- Prueba Voges Proskauer

Mediante esta prueba se determinó la capacidad de los microorganismos de fermentar la glucosa por medio de la ruta butanodiólica, que tiene como producto intermedio la acetoína. Se inocularon las bacterias en caldo rojo de metilo-Voges Proskauer (MR-VP, Difco). Tras 48h de incubación, se le añadieron los reactivos alfa–naftol (5%) y KOH

(40%). La aparición de una coloración marrón–rojiza en la parte superior del tubo indica la producción de acetoína por parte del microorganismo.

- Reducción de Nitratos

Esta prueba consiste en determinar la capacidad de ciertos microorganismos de reducir los nitratos a nitritos. Para ello se inoculó la bacteria en un tubo con medio líquido con extracto de carne 0,3%, peptona 0,5%, nitrato potásico 0,1% y NaCl 1%. Después de incubarlo 24/48 h a 24±1ºC, los tubos se revelaron añadiendo a partes igual los reactivos 5 g de α–naftilamina en 1000 ml de ácido acético 5N (30%) y 8 g de ácido acético sulfanílico en 1000 ml de ác. acético 5N (30%). La aparición de un color granate indica que el microrganismo es capaz de reducir nitratos a nitritos.

- Utilización del citrato

En esta prueba se determina la utilización del citrato como única fuente de carbono. Para ello se utilizaron tubos con medio citrato de Simmons (Difco), que contiene citrato de sodio, fostato de amonio y azul de bromotimol, suplementado con un 1% de NaCl. El azul de bromotimol es un indicador de pH, de forma que se vuelve azul a pH básico.
Las bacterias capaces de utilizar citrato como única fuente de carbono, también usan las sales de amonio como única fuente de nitrógeno, basificando medio, de forma que se vuelve azul.

- Hidrólisis del almidón

Para realizar este ensayo se sembró la bacteria en una placa con medio AM suplementado con un 0,4% de almidón y se incubó a 24±1ºC durante 24/48 h. Se añadieron unas gotas de lugol a la placa que reacciona con el almidón tiñéndolo de color azul. La aparición de un halo transparente alrededor de la colonia, indica que el microorganismo está hidrolizando el almidón mediante la enzima α -amilasa.

- Hidrólisis de esculina

Los microorganismos a ensayar se hicieron crecer en una placa de AM con un 1% de esculina y 0,05% de citrato férrico y se incubaron 24/48 h a 24±1ºC. Las bacterias capaces de hidrolizar la esculina van a producir esculetina, que reacciona con el citrato férrico formando sales insolubles de hierro que producen una coloración negra alrededor de la colonia.

- Producción de lipasas

Para determinar la presencia de esta enzima se sembró la bacteria en una placa de AM con una concentración de Tween 20 al 1%. La aparición de un halo opaco alrededor de la colonia indica la producción de la enzima lipasa.

- Urea

Mediante esta prueba se determina la capacidad de la bacteria para romper la urea en dos moléculas de amonio por acción de la enzima ureasa. Las bacterias se inocularon en un medio con glucosa-peptona, urea al 2% y el rojo fenol como indicador de pH. Si el resultado es positivo el medio vira de color amarillo a rojo/rosa debido a la alcalinización del medio provocada por el amonio.

- Producción de ácido y gas a partir de glucosa.

Se empleó un medio Peptona 10 g/l, rojo fenol 0,0018 g/l, con un 1% de glucosa y 1% de NaCL. Además, en cada tubo se introdujo una campana de Durham para determinar la producción de gas. Los tubos se incubaron 24/48 h a 24±1ºC.

Si el del medio cambia a color amarillo indica que la bacteria produce ácido y si se forma una burbuja dentro de la campana indica la producción de gas por parte de la bacteria.

- Crecimiento a diferentes temperaturas

Para establecer un rango de temperatura de crecimiento, los aislados se hicieron crecer en placas de AM a 4ºC, 25ºC, 37ºC y 44ºC. El tiempo de incubación fue de 24/48h. Las placas de 4ºC se incubaron 10 días debido a que el crecimiento de la bacterias a bajas temperaturas suele ser más lento.

- Crecimiento a diferentes salinidades.

El estudio del rango de crecimiento a diferentes salinidades se realizó en placas con un medio basal de agar (1 g/l de extracto de levadura [Oxoid]; 4 g/l neopeptona [Difco]; 15 g/l agar [Pronadisa]) suplementado con sesalts (Sigma), del 0,5% al 10% (p/v).

Por otro lado, también se determinó el rango de crecimiento a diferentes concentración de Nacl. Se realizó en placas con medio basal de agar suplementado con diferentes concentraciones de Nacl, del 0,5% al 10% (p/v). Las placas se incubaron a 24±1ºC durante una semana.

- Crecimiento a diferentes pH.

El rango de crecimiento a diferentes pH se determinó sembrando los aislados en placas de AM con pH del 0,5 a 11. Las placas se incubaron a una temperatura de 24±1ºC durante 7 días.

- Utilización de diferentes azúcares.

Se utilizaron tubos con el medio ZOFT (Lemos y col., 1985) suplementado con diferentes azúcares al 1%. Los azúcares a ensayar fueron arabinosa, sacarosa, maltosa, manosa, manitol y sorbitol. Se incubaron a 24±1ºC durante 24/48h. El cambio de color del medio a amarillo indica que la bacteria es capaz de utilizar el azúcar de estudio.

- Utilización de diferentes fuentes de carbono

Para determinar el uso de diferentes compuestos como única fuente de carbono se siguieron las indicaciones de Baumann y Baumann (1981). Las placas se incubaron a 24±1ºC durante 10 días. Los compuestos utilizados fueron: ácido-γ-aminobutirico, ácido-β-hydroxibutirico, ácido cítrico, ácido fumárico, ácido málico, ácido propiónico, ácido succínico, ácido trans-aconítico, ácido glucónico, acetato de sodio, ácido aspártico, ácido láctico, ácido glutámico, mio-inositol, arabinosa, D-galactosa, glicerol, D-glucosa, celobiosa, D-fructosa, lactosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, melibiosa, pyruvato, D-ribosa, L-ramnosa, sacarosa, D-sorbitol, D-trealosa, D-xilosa, amigdalina, L-citrulina, D-alanina, glicina, L-treonina, L-leucina L-arginina, L-serina, L-lisina, L-histidina, tirosina, ornitina, putrescina y salicina.

5.1.2.2 Sistemas miniaturizados

Además de la metodología clásica en tubo y placa se realizó una caracterización mediante los sistemas miniaturizados API20E y API50CH (bioMerieux). Las bacterias se resuspendieron en un medio liquído y se ajustaron a una densidad óptica de 1,0 a 580 nm.

- API 20E

Consiste en un sistema miniaturizado y estandarizado que se suele usar par la identificación de enterobacterias de origen clínico. Está compuesto por un total de 20 pocillos con diferentes compuestos. Se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante, exceptuando el uso de solución salina (Nacl, 0,85%) para la preparación de los inóculos y la temperatura de incubación a 24±1ºC. La lectura de los resultados se realizó a las 24 h.

- API50CH

Se trata de una prueba mediante la cual se estudió el metabolismo de hidratos de carbono y otros derivados como polialcoholes y ácidos urónicos. Para la inoculación de los 50 pocillos se resuspendieron las bacterias en un medio liquido ZOFT modificado (Lemos y col., 1985; Prado, 2006) en vez del medio comercial API50CHB/E recomendado por el fabricante. Los pocillos se inocularon siguiendo las instrucciones del fabricante y se dejaron incubar a 24±1ºC. Se realizaron lecturas diarias haciendo lecturas diarias durante toda una semana.

5.2.1 Análisis del gen 16S ARNr

Como ya hemos mencionado con anterioridad (ver introducción), el gen ARNr 16S es uno de los genes más utilizados en taxonomía, filogenia y evolución, debido a que posee regiones muy conservadas y regiones hipervariables que permite una identificación taxonómica bastante precisa, discriminando a nivel de género y en la mayoría de los casos a nivel de especie.

5.2.1.1 Extracción y amplificación y secuenciación

La extracción del ADN cromosómico, la amplificación y la secuenciación del gen ARNr 16S de nuestros aislados se realizó de la misma forma descrita en el capitulo 4 de esta tesis.

5.2.1.2 Análisis Filogenético

Para la realización del análisis filogenético se descargaron de la base de datos EzBioCloud todas las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas tipo de las especies del género *Rahnella* (*Rahnella aquatilis*, *R. victoriana*, *R. inusitata, R. wooldbengensis*, *R. bruchi*) y cepas tipo las especies de diferentes géneros próximos al género *Rahnella*. Los análisis se realizaron tal y como se describen en el capítulo 4.

5.2.2 Secuenciación del genoma completo

Para realizar estudio taxonómicos a partir del genoma completo, se seleccionaron 3 de cepas representativas de nuestros aislados: CFA10(1/100), RJA17(1/100) y CFA14(1/10).

5.2.2.1 Extracción del ADN

El ADN genómico se extrajo utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Quiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones en el momento de la elución de la muestra para obtener una mayor concentración de ADN. La muestra se eluyó utilizando agua estéril a una temperatura de 60ºC en vez del tampón AE suministrado por el fabricante. Se inocularon entre 40-50 µl en vez de los 100-200 µl recomendados por el fabricante. Una vez inoculado el agua, se dejó incubando a temperatura ambiente 10 min antes de la elución. El ADN se cuantificó mediante el NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher) y Qubit 3 Fluoremeter (Invitrogen), obteniéndose las concentraciones exigidas por los servicios de secuenciación utilizados.

5.2.2.2 Ensamblaje y análisis de los genomas

La secuenciación del ADN cromosómico se realizó en el servicio de secuenciación de FISABIO (Valencia, España) mediante la plataforma Hiseq de Illumina a partir de la cual se obtienen lecturas pareadas. La limpieza de adaptadores, cebadores y secuencias de baja calidad fue llevada a cabo por FISABIO. El ensamblaje de las lecturas obtenidas se realizó utilizando el programa SPAdes 3.6.1 (Nurk, 2013) y posteriormente se observó la calidad del ensamblado usando el programa Quast (Gurevich y col., 2013).

Para los análisis comparativos y filogenéticos de nuestros aislados con las demás especies del género *Rahnella* se descargaron de las bases de datos EzBiocloud y GenBank, los genomas de las cepas tipo de las especies del género *Rahnella*: *R. aquatilis* CIP 78.65^T (GCA_000241955.1), *R. bruchi* DSM 27398^T(GCA_003614975.1), *R. inusitata* DSM 30078^T(GCA_003602055.1), *R. variigena* CIP 105588^T(GCA_003610915.1) y *R. woolbedingensis* DSM 27399^T(GCA_003602095.1).

- eDDH, ANIm, ANIb y orthoANI.

Se realizó una comparativa ADN-ADN *in silico* a través del programa Genome-to-Genome Distance Calculator (GCDC 2.1) (Auch y col 2010a, b; Meier-Kolthoff y col. 2013).

Además, se realizó un análisis de la similitud entre los genomas usando los algoritmos OrthoANI (Lee y col., 2015), ANIb (Goris y col., 2007) y ANIm (Richter y Roselló, 2009), previamente descritos en la introducción de esta tesis. (Tabla 5.2)

Tabla 5.2. Herramientas bioinformáticas utilizadas para la comparación entre genomas

Método	**Umbral delimitación especie**	**Herramienta**
GBDP	70%	Genome-to-Genome Distance Calculator
ANI	95-96%	JSpecies.
OrthoANI	95-96%	OAT, EzBiocloud.

- Análisis de Secuencias Multigénicas (MLSA).

Esta técnica consiste en la concatenación de las secuencias parciales de varios genes esenciales (housekeeping). Este análisis es útil para los estudios filogenéticos, ya que debido a su alto poder resolutivo, permite una mejor clasificación y/o identificación de los microorganismos,. Los genes esenciales seleccionados para realizar este análisis fueron *gyrB* (subunidad β de la girasa), f*tsZ* (proteína de la división celular ftsZ), *atpD* (subunidad β de la ATPasa) y *rpoB* (subunidad unidad β de la ARN polimerasa). Las secuencias de los genes se descargaron a partir de los genomas depositados de las cepa tipo de las especies del género *Rahnella* depositadas en las bases de datos pública EzBiocloud y Genbank.

Cada gen se alineó de manera individual, y posteriormente se realizó el concatenando de las secuencias. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante el programa MEGA7 (Kumar y col., 2016) utilizando la herramienta CLUSTAL W (Larkin y col., 2007). Para la elaboración del árbol filogenético se utilizó el algoritmo Neighbour–joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987), aplicando el modelo evolutivo Kimura-2-parametros (Kimura, 1980).

- Pangenoma

Por otro lado, se realizó un análisis filogenético con el genoma completo de nuestros aislados y las cepas tipos de todas las especies del género *Rahnella* mediante la elaboración de un árbol pangenómico. El pangenoma fue descrito por Tettelin y col. (2005) para bacterias como el conjunto de todos genes presentes en todas las cepas o especies, el cual se divide en: genoma esencial (contiene los genes presentes en todas las especies o cepas) y genoma

prescindible (compuesto por genes compartidos por algunas cepas o especies y genes que son únicos de cada especie o cepa)

Para la realización del pangenoma se utilizó la herramienta Get_homologues (Contreras y Vinuesa, 2013) para agrupar los genes homólogos de los genomas. Para ello se utilizaron diferentes algoritmos que permitieron agrupar los genes de los diferentes genomas previamente anotados con el programa PROKKA (V1.13.3). El siguiente paso consintió en identificar y agrupar aquellas secuencias de genes ortólogos que compartían nuestros genomas anotados. Para ello se utilizaron los algoritmos BBDH (del inglés, *Bi-Directional Best Hits*) (Overbeek y col., 1999), COGtriangle (del inglés, *Cluster of Orthologous Genes*) (Kristensen y col., 2010) y OrthoMCL (del inglés, *Orthologous Markov Cluster*) (Li y col., 2003). Con estos tres algoritmos se pudo estimar el número de familias génicas compartidas por todos los genomas (genoma esencial), así como el número de familias diferentes acumuladas entre todos los genomas de interés (pangenoma).

El número de familia de genes compartidos se clasificaron en 4 agrupaciones: genoma esencial o "Core genome" (genes presentes en todos los genomas), "Soft-genome" esencial o genoma esencial laxo (genes presentes en ≥ del 95 % de los genomas), "Shell" (presentes en varios genomas, pero por debajo del 95 %) y "Cloud" (presente en solo unos pocos genomas) (Kaas y col., 2012).

A partir del consenso (intersección) entre los algortimos COG y OrthoMCL se halló el número de familias génicas diferentes que conforman el pangenoma. Por último, para la obtención del árbol representativo del pangenoma se elaboró a partir de una matriz de presencia/ausencia de genes en un determinado genoma. Para la realización del árbol pangenómico bajo el criterio de parsimonia se utilizó el programa PARS del Paquete PHYLIP (Felsenstein, 2005)

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Caracterización bioquímica

A) Metodología clásica.

Los aislados CJA17(1/100), RFA10(1/100), RFA1(1/10), CFA14(1/10) y CJA9(1/10) son todos Gram negativos móviles, anaerobios facultativos, catalasa positivos y resistentes al

agente vibriostático O/129. Son capaces de reducir nitratos a nitritos, hidrolizan la esculina, presentan la enzima lipasa, acidifican la glucosa y producen gas. Todas las cepas fueron negativas para las pruebas de la oxidasa, indol, VP, hidrólisis del almidón y para la arginina dihidrolasa, lisina y ornitina descarboxilasa. Crecen a temperaturas entre 4ºC a 37ºC, en rango de pH entre 3 y 9 y con concentración de SeaSalts del 0.5% al 8%, excepto la cepa CJA17(1/100) que crece en un rango de 0.5-7% de SeaSalts. Son capaces de utilizar todos los azúcares ensayados (Tabla 5.3). No hubo diferencias entre los aislados en cuanto a la utilización de las fuentes de carbono (Tabla 5.4). Las cepas CJA17(1/100), RFA10(1/100) y CJA9(1/10) utilizan el citrato como única fuente de carbono.

B) Sistemas miniaturizados.

La mayoría de las resultados obtenidas en el API20E fueron homogéneos para todos los aislados a excepción de la arginina dihidrolasa que fue negativa para todas las cepas excepto para la cepa CJA17 (1/100) y la hidrólisis de la gelatina que solo fue positiva en el aislado CJA17(1/100).

Los resultados obtenidos mediante el API50CH muestran que todos los aislados fermentan: L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-mamnosa, L-rhamnosa, D-manitol, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-melibiosa, D-sacarosa, L-fucosa, 5-cetogluconato potásico.

La cepa CJA17(100) fue la única capaz de fermentar gentiobiosa y D-turanosa. Al contrario que las demás, esta cepa no fue capaz de fermentar dulcitol y D-sorbitol.

Todos resultados obtenidos por metodología clásica y sistemas miniaturizados se encuentran en las Tablas 5.3, 5.4 y 5.6.

C) Comparación con las especies del género.

Al comparar nuestros aislados y las especies descritas del género *Rahnella*, se observó que existen diferencias bioquímicas tanto en las pruebas realizadas por las técnicas convencionales de tubo y placa, como en los sistemas miniaturizados API20E y API50CH. Las diferencias encontradas entre las cepas tipo de las especies del género *Rahnella* y las cepas tipos nuestros aislados se muestran en la Tabla 5.7

Tabla 5.3. Características fenotípicas de los aislados de almejas mediante los métodos convencionales de tubo y placa.

Pruebas	**CJA17 (1/100)**	**RFA10 (1/100)**	**RFA1 (1/100)**	**CFA14 (1/10)**	**CJA9 (1/10)**
Morf/mov	B/M	B/M	B/M	B/M	B/M
Gram	-	-	-	-	-
Oxidasa	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+
O/F	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
TCBS	NC	NC	NC	NC	NC
O/129	R	R	R	R	R
Arginina	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-
Nitratos	+	+	+	+	+
Amilasa	-	-	-	-	-
Esculina	+	+	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	-	-	+
Urea	+	-	-	-	-
Gas/glucosa	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
Azúcares:					
Arabinosa	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+
SeaSalts	0,5-7%	0,5-8%	0,5-8%	0,5-8%	0,5-8%
NaCl	0,5-7%	0,5-7%	0,5-7%	0,5-7%	0,5-7%
Tª	4-37ºC	4-37ºC	4-37ºC	4-37ºC	4-37ºC
pH	3-9	3-9	3-9	3-9	3-9

R, Resistente; NC, no crece.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5.4. Resultados de la utilización de las fuentes de carbono de los aislados de almeja.

Fuentes de carbono	CJA17 (1/100)	RFA10 (1/100)	RFA1 (1/100)	CFA14 (1/10)	CJA9 (1/10)
Mio-inositol	-	-	-	-	-
D-sorbitol	+	+	+	+	+
Glicina	-	-	-	-	-
Ác. aspártico	+	+	+	+	+
Ác.-γ-amnobutírico	((+))	+	+	+	+
Ác-β-hidroxibutírico	-	-	-	-	-
Ác. Fumárico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
L-rhamnosa	+	+	+	+	+
Ác. Cítrico	-	-	-	-	-
Ác. Láctico	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
D-alanina	-	-	-	-	-
Acetato sódico	+	+	+	+	+
Ác. Propiónico	-	-	-	-	-
Ác. Transaconítico	-	-	-	-	-
L-leucina	-	-	-	-	-
L-serina	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
L-treonina	-	-	-	-	-
L-arginina	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+
Ác. Málico	+	+	+	+	+
Trehalosa	+	+	+	+	+
Ác. Succínico	+	+	+	+	+
Putrescina	-	-	-	-	-
Lisina	-	-	-	-	-
Celobiosa	+	+	+	+	+
D-manitol	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+
Glicerol	+	+	+	+	+
Ác-D-sacárico	+	+	+	+	+
Amigdalina	-	-	-	-	-
Melibiosa	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+
D-galactosa	(+)	+	+	+	+
Tirosina	-	-	-	-	-
L-citrulina	-	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-	-
D-ribosa	+	+	+	+	+
D-xilosa	+	+	+	+	+
Glucosa	+	+	+	+	+
D-fructosa	+	+	+	+	+
D- gluconato	+	+	+	+	+
Ác. Pirúvico	+	+	+	+	+
Ác. Galacturónico	+	+	+	+	+

(+), positivo débil

Tabla 5.5. Resultados del API50CH de los aislados de almeja fina y almeja japonesa

API50CH	CJA17 (1/100)	RFA1 (1/100)	CFA14 (1/10)	CJA9 (1/10)	RFA10 (1/10)
Glicerol	+	+	+	(+)	+
Eritritol	-	-	-	-	-
D-arabinosa	-	-	-	-	-
L-arabinosa	+	+	+	+	+
D-ribosa	+	+	+	+	+
D-xilosa	+	+	+	+	+
L-xilosa	-	-	-	-	-
D-adonitol	-	-	-	-	-
Metill-ß-D-xilopiranosida	-	-	-	-	-
D-galactosa	+	+	+	+	+
D-glucosa	+	+	+	+	+
D-fructosa	+	+	+	+	+
D-manosa	+	+	+	+	+
L-sorbosa	-	-	+	-	-
L-rhamnosa	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
D-manitol	+	+	+	+	+
D-sorbitol	-	+	+	+	+
Metil-α-D-manopiranosida	-	-	-	-	-
Metil-α-D-glucopiranosida	-	+	+	-	+
N-acetil-glucosamina	+	-	+	-	+
Amigdalina	-	+	-	+	-
Arbutina	+	+	+	+	+
Esculina	+	+	+	+	+
Salicina	+	+	+	+	+
D-celobiosa	+	+	+	+	+
D-maltosa	+	+	+	+	+
D-lactosa	+	+	+	+	+
D-melibiosa	+	+	+	+	+
D-sacarosa	+	+	+	+	+
D-trehalosa	+	-	+	-	+
Inulina	-	-	-	-	-
D-melezitosa	+	+	-	+	-
D-rafinosa	+	-	+	-	+
Almidón	-	-	-	-	-
Glicógeno	-	-	-	-	-
Xilitol	-	+	-	+	-
Gentiobiosa	+	-	-	-	-
D-turanosa	+	-	-	-	-
D-lixosa	-	-	-	-	-
D-tagatosa	-	-	-	-	-
D-fucosa	-	-	-	-	-
L-fucosa	+	+	+	+	+
D-arabitol	-	-	-	-	-
L-arabitol	-	-	-	-	-
Gluconatopotásico	-	+	+	+	(+)
2-cetogluconatopotasio	(+)	+	+	(+)	(+)
5-cetogluconatopotasio	+	+	+	+	(+)

Tabla 5.6. Resultados del API20E de los aislados de almeja fina y almeja japonesa.

API20E	CJA17 (1/100)	RFA10 (1/100)	RFA1 (1/100)	CFA14 (1/10)	CJA9 (1/10)
ß-galactosidasa (ONPG)	+	+	+	+	+
Arginina deshidrolasa	+	-	-	-	+
Lisina descarboxilasa	-	-	-	-	-
Ornitina descarboxilasa	-	-	-	-	-
Citrato	-	+	+	+	+
Producción de H2S	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-
Triptófano desaminasa	-	-	-	-	-
Producción de indol	-	-	-	-	-
Vogers-Proskauer	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+
Manosa	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	+	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+
Melobiosa	+	+	+	+	+
Amigdalina	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+	+

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5.7. Características diferenciales entre las especies del género *Rahnella* y los aislados de almeja. 1=*R. aquatilis*, 2=*R. victoriana*, 3=*R. variigena*, 4=*R. inusitata*, 5=*R. bruchi* y 6=*R. woolbeldigensis.*

	CJA17́ (1/100)	**CFA14 ́ (1/10)**	***1***	***2***	***3***	***4***	***5***	***6***
Fuentes de Carbono:								
D-Sorbitol	+	+	+	+	+	+	-	+
Ác.-D-Glucurónico	(+)	(+)	+	-	v	+	v	+
Ác. sucinámico	+	+	+	-	v	-	-	+
API20E:								
Citrato (CIT)	-	+	+	-	-	-	-	-
Gelatinasa (GEL)	+	-	-	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
Vogers-Proskauer (VP)	+	+	+	+	+	+	-	-
Arginina dihidrolasa (ADH)	+	-	-	-	-	-	-	-
API50CH:								
5-Cetogluconato potásico	+	+	+	+	-	-	+	-
Gluconato potásico	-	+	+	+	-	-	-	-
D-arabitoL	-	-	-	+	-	+	+	-
D-fucosa	-	-	+	+	-	-	-	-
D-sacarosa	+	+	-	+	+	+	+	-
D-arabinosa	-	-	-	-	-	-	+	-

(+), positivo débil; v, variable.

5.3.2 Análisis del gen ARNr 16S.

Al comparar la secuencia del gen ARNr 16S, nuestros aislados mostraron porcentajes de similitud entre el 99,2% y el 100%, indicando una estrecha relación entre todos ellos. Con la base de datos pública EzBiocloud nuestros aislados se situaron dentro del género *Rahnella*, obteniendo los porcentajes de similitud más elevados con la especie *Rahnella aquatilis* (98,58%-99,64%) (Anexo 1).

Al realizar el árbol filogenético de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados y las cepas tipo de las especies del género *Rahnella* mediante el método Neighbour-Joining, se observa como nuestros aislados se encuentran agrupados en una rama diferenciada junto a *R. aquatilis* (Fig. 5.1). Se observa como los aislados CFA14 (1/10), CJA9(1/10), RFA1(1/100) y RFA10(1/100) forman un grupo definido con valores de "bootstrap" del 99%, mientras que la cepa CJA17(1/100) se encuentra en una rama independiente con *Rahnella aquatilis*^{T} (CIP 78.65).

A partir de los resultados obtenidos en el árbol filogenético, los aislados CJ17(1/100), RF10(1/100) y CF14(1/10) se seleccionaron para secuenciar su genoma completo y realizar un análisis filogenético y comparativo en profundidad.

5.3.3 Análisis de genomas completos

Para realizar estudios con el genoma completo además de las secuencias de nuestros aislados se utilizaron todos los genomas de las cepas tipo de las especies del género *Rahnella* depositadas en las bases de datos EzBiocloud y GenBank. El contenido G+C de los aislados CFA14 (1/10), RFA10 (1/100) y CJA17(1/100) fue de 51,6 mol% G+C, 51.6mol% G+C y 52 mol% G+C respectivamente, encontrándose dentro del rango del género (51 al 56 mol% G+C).

5.3.3.1 MLSA a partir de los genomas

Para la realización del análisis de secuencias multigénicas, se seleccionaron los genes *gyrB*, *ftsZ*, *atpD* y *rpoB* que se obtuvieron a partir de los genomas del género *Rahnella* de las cepas tipo depositadas. Los árboles filogenéticos obtenidos a partir de las secuencias concatenadas de los 4 genes y utilizando el método Neigbour-Joining, muestran resultados muy semejantes a los de los análisis del gen ARNr 16S. Nuestros aislados se encuentran agrupados con *R. aquatilis* en una rama independiente a las demás especies del género *Rahnella*. Los aislados CFA14 (1/10) y RF10 (1/100) aparecen agrupados en una rama bien diferencia del resto de las especies respaldada por un bootstrap del 100%. Por otro lado, la cepa CJA17 (1/100) permanece agrupada junto a la cepa tipo de *R. aquatilis* (Fig. 5.2)

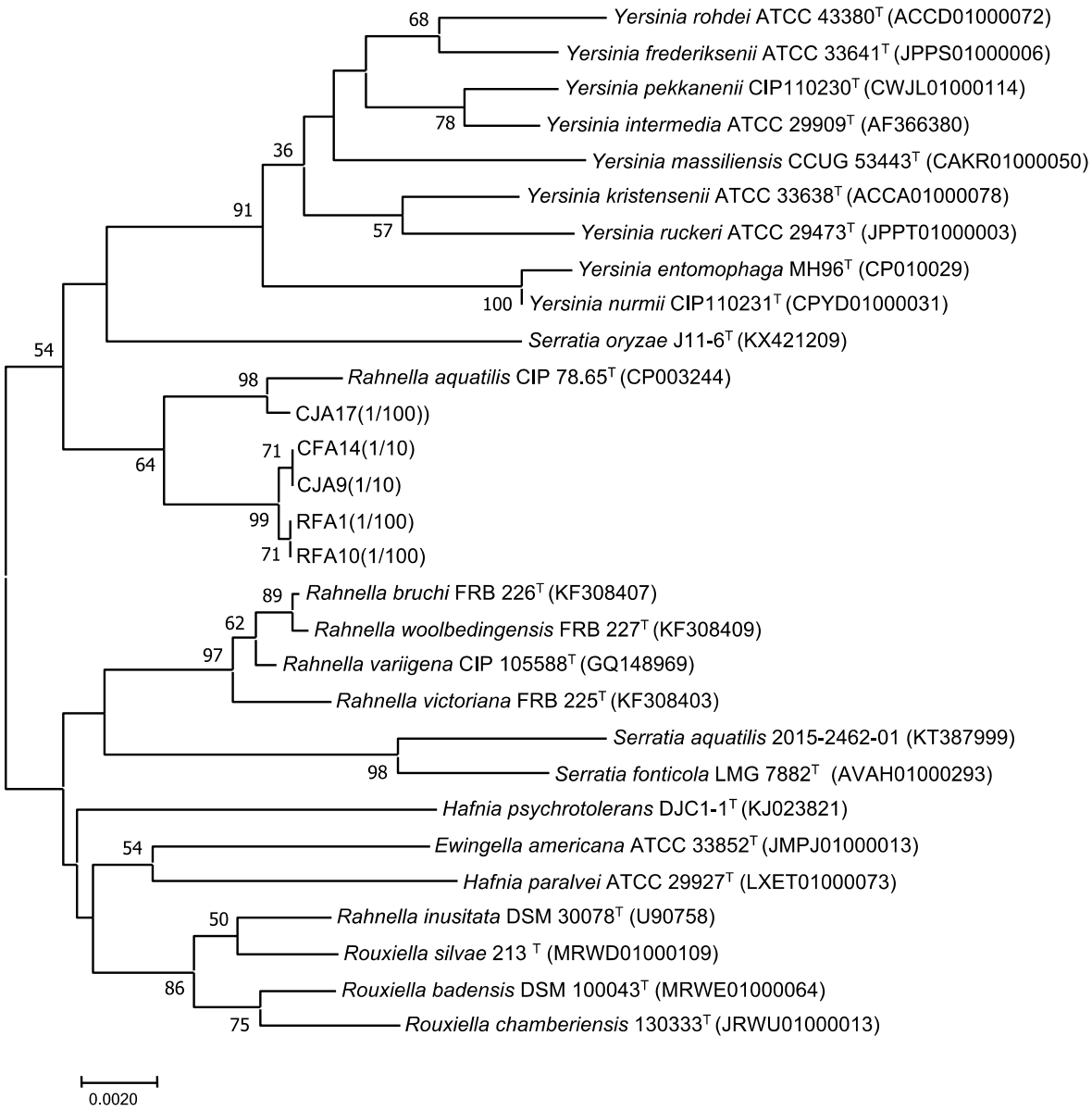

Figura 5.1. Árbol filogenético construido a partir del gen ARNr 16S de los 5 aislados de almeja fina y japonesa, todas las especies del género *Rahnella* y especies de diferentes géneros próximos a nuestros aislados. Barra, el número de sustitución nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de boostrap iguales o mayores del 50% como porcentaje de 1000 peudoréplicas.

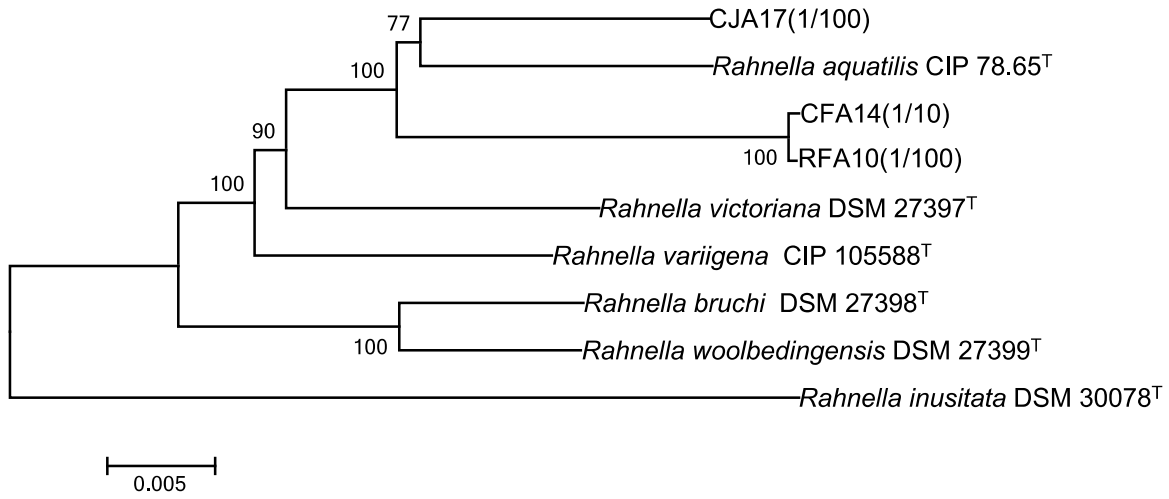

Figura 5.2. Árbol filogenético construido a partir de la concatenación de las secuencias parciales de los genes de 3 de los aislados de almeja fina y japonesa, todas las cepas tipo del género *Rahnella*. Barra, número de sustitución nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de boostrap iguales o mayores del 70% como porcentaje de 1000 peudoréplicas.

5.3.3.2 Comparación con especies del género *Rahnella*

Los análisis comparativos ANIm, ANIb, OrthoANI y eDDH con las especies del género *Rahnella* mostraron que nuestras 3 cepas, se encuentran por debajo del umbral para delimitación de especie (95-96% ANI y 70% eDDH). La especie más próxima fue *R. aquatilis,* que aparece con porcentajes de similitud con nuestros aislados entre el 90% y 92.78% en ANI y porcentajes entre el 44.3% y 48.9% en los análisis de eDDH (Tabla 5.8).

Los análisis comparativos de los genomas también muestran que las cepas RFA10(1/100) y CF14(1/10) formarían una única especie, ya que los valores de ANI y de eDDH obtenidos entre ambos aislados (99% y 95,5%, respectivamente) se encuentran con valores encima del umbral del definición de nueva especie (96% y 70%, respectivamente). Además, el aislado CJA17(1/100) presentó valores en ANI entre el 90,12% y 90,89% con los otros dos aislados de almeja y del 41,7% para la hibridación DNA-DNA *in silico*. Ambos valores se encuentra por debajo del umbral para la definición de una nueva especie.

Tabla 5.8. Comparación de los resultados obtenidos mediante ANI y eDDH entre 3 de nuestros aislados y las cepas tipo de todas las especies del género *Rahnella.*

Índices	**RFA10(1/100)**	**CFA14(1/10)**	**CJA17(1/100)**
ANIb/ANIm			
R. bruchi^T	85.49/87.39	85.54 /87.43	86.42 /88.28
R. insusitata^T	82.68/85.62	82.69 /85.64	83.32/86.09
R. woodlendengensis^T	85.64/87.44	85.64 /87.47	86.64/88.41
R. victoriana^T	87.37/88.48	87.35/88.54	88.60/89.47
R. variigena^T	86.43/87.90	86.40/87.93	87.80/89.04
R. aquatilis^T	90.90/91.65	91.04/91.75	92.22/92.78
RFA10(1/100)	*	99.31/99.48	90.22/90.89
CFA14 (1/10)	99.27/99.48	*	90.12 /90.92
CJA17(1/100)	90.06/90.89	90.10/90.91	*
eDDH			
R. bruchi^T	31	31.1	33
*R. insusita*ta^T	26.5	26.5	27.5
R. woodlendengensis^T	31.2	31.2	33.3
R. victoriana^T	34.3	34.3	37
R. variigena^T	32.3	32.3	35.2
R. aquatilis^T	44.3	44.6	48.9
RFA10(1/100)	-	95.5	41.7
CFA14(1/10)	95.5	-	41.7
CJA17(1/100)	41.7	41.7	-

En la imagen generada con los valores obtenidos del OrthoANI de las secuencias de los genomas, se visualiza claramente como los aislados CFA14(1/10) y RFA10(1/100), con un porcentaje de similitud del 99,4%, constituirían una única especie. La cepa CJA17(1/100) obtuvo un 90% de similitud con los otros dos aislados y un 92,6% con *R. aquatilis*, estando ambos valores por debajo del 96% exigido para la definición de una nueva especie. Los 3 aislados presentaron valores por debajo del 93% con todas las cepas tipo de las especies del género *Rahnella* (Fig. 5.3)

En el árbol del pangenoma obtenido, al igual que pasaba con el MLSA, *R. aquatilis* se encuentra agrupada con nuestros aislados consituyendo dos grupos, uno formado únicamente por el aislado CJA17(1/100) y otro por los aislados CFA14 y RFA10 (Fig. 5.4).

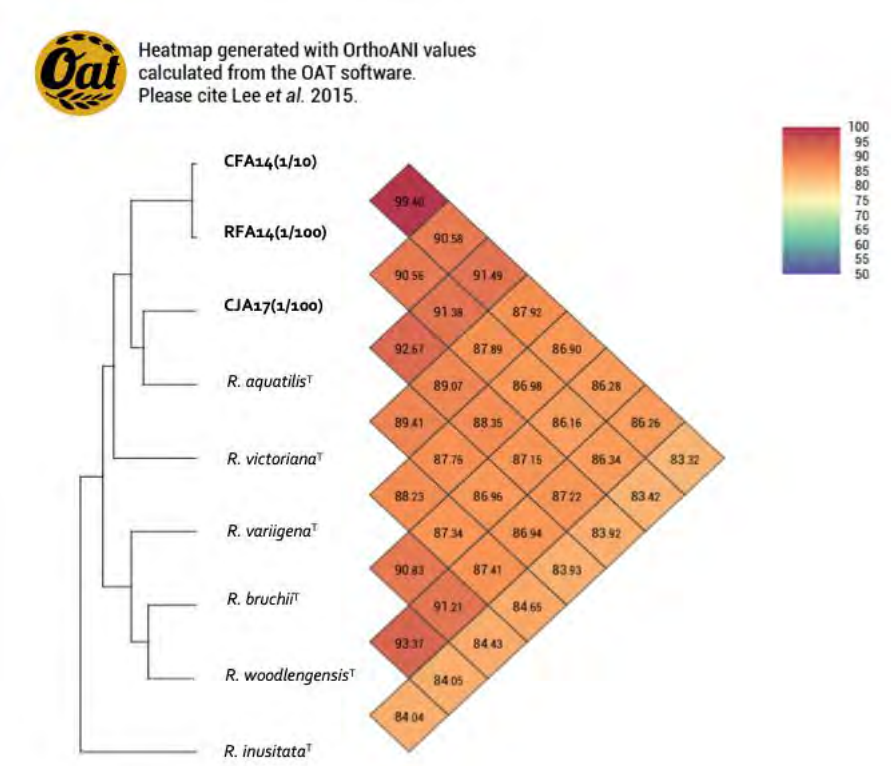

Figura 5.3. Resultados del orthoANI de los 3 aislados de almeja fina y japonesa y las cepas tipos de todas las especies del género *Rahnella*.

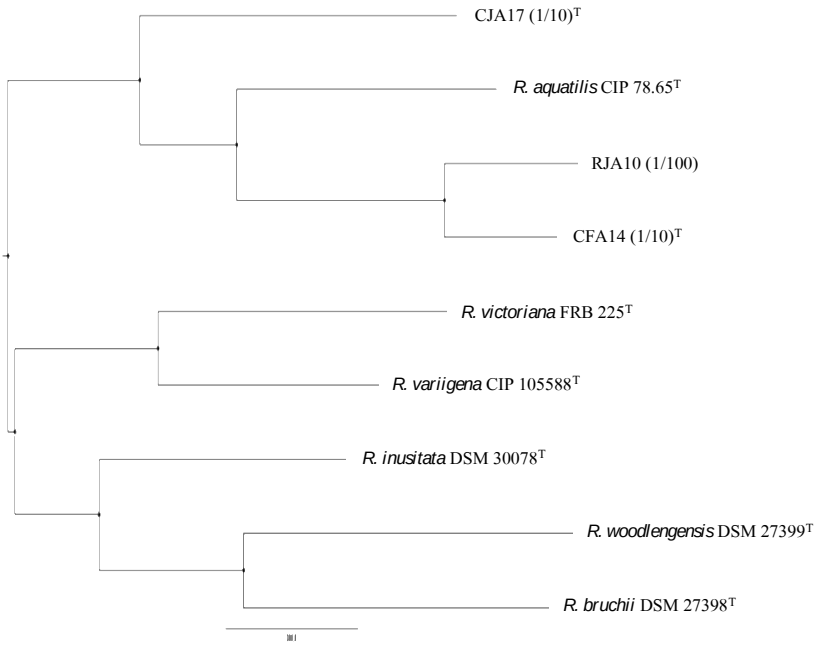

Figura 5.4. Árbol de parsimonia de nuestros 3 aislados y las cepas tipos de todas las especies del género *Rahnella* basado en la matriz consenso (OMCL and COGtriangles) de presencia y ausencias de genes.

Todos los resultados obtenidos ponen de manifiesto que nuestros aislados formarían 2 nuevas especies dentro del género *Rahnella*, una especie estaría formada únicamente por la cepa CJA17(100). La otra especie estaría constituida por los otros 4 aislados de almeja, RFA10(1/100), RFA1(1/10), CFA14(1/10) y CJA9(1/10), escogiendo como cepa tipo CFA14 $(10)^T$(Fig. 5.4).

5.3.4 Descripción de especies del género *Rahnella*

5.3.4.1 Descripción de *Rahnella conchicola* sp nov.

Rahnella conchicola (con.chi.co'la.; L. fem. n. conchula, pequeño molusco; L. suff – cola, habitante; N.L.n. conchicola, habitante de pequeños moluscos).

Las células son Gram negativas, bacilos móviles, catalasa positivas y anaerobios facultativas. Las colonias son blancas, circulares con bordes regulares y no producen de pigmentos en Agar Marino. Reducen nitrato a nitrito y son positivas para la hidrólisis de la esculina y la lipasa. Fermentan la glucosa y producen gas. Crecen en un rango de temperatura de 4-37ºC (óptimo a 25ºC), pH 3-9 (óptimo a 3-6). Crecen en concentraciones de NaCl y de Seasalts entre el 0,5-7% (óptimo entre 0,5%-4%). No son capaces de realizar la dihidrólisis de la arginina, la descarboxilación de la lisina y de la ortinitina ni la hidrólisis de gelatina y almidón. No utilizan el citrato ni producen de indol y son negativas para la prueba de la oxidasa y Voges-Proscauer.

Son positivas en las reacciones del API20E de la ţ-galcatosidasa (ONPG), producción de acetoína, gelatinasa, dihidroliss de la arginina, fermentación de la glucosa, manitol, sorbitol, sacarosa, ramnosa, melobiosa, amigdalina y arabinosa. Producen ácido a partir de de glicerol, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-rhamnosa, D-manitol, N-acetilglucosamina, arbutina, esculina, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-melibiosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-melezitosa, D-rafinosa, gentiobiosa, D-turanosa, L-fucosa, y 5-cetogluconato-potásico (API 50CHB/E). Utilizan como única fuente de carbono el ácido fumárico, D-glucosa, D-ribosa, acetato sódico, ácido. málico, D-trealosa, ácido succínico, celobiosa, D-manitol, salicina, glicerol, ácido sacárico,, melibiosa, lactosa, maltosa, D-galactosa, D-xilosa, fructosa, ácido glucurónico, ácido galactónico, D-gluconato,

ácido pirúvico, ácido láctico, L-ramnosa, D-sorbitol, L-aspártico, L-serina y sacarosa. El contenido G+C de la cepa tipo es del 52 mol%.
La cepa tipo CJA17(1/100)^T (=LMG 31370, =CECT 9855) fue aislada de *Ruditapes philippinarum* en Redondela (42°17'40.4" N 8°36'57.2" W), Galicia.

5.3.4.2 Description of *Rahnella gallaica* sp. nov.

Rahnella gallaica [gal.la´i.ca L. fem. adj. Gallaica, perteneciente a Gallaecia (Galicia), la región noroeste de la Península Ibérica].

Son bacterias Gram negativas, bacilos móviles, catalasa positivas y anaerobias facultativos. Las colonias en AM son blancas, circulares con bordes regulares. No realizan la dihidrólisis de la arginina, la descarboxilación de la lisina y de la ortinitina y no son capaceas de hidrolizar la gelatina ni el almidón. No producen indol y son oxidasa y ureasa negativas. Reducen nitratos a nitritos y son positivas para las pruebas de la esculina y lipasa. Fermentan la glucosa y producen gas. Crecen en un rango de temperatura del 4-37ºC (óptimo a 25ºC), pH 3-9 (óptimo a 3-6). Todas las cepas crece unas concentraciones del 0,5-7% Nacl (óptimo de 0,5-4%) y 0,5%-8% (óptimo entre 0,5%-4%) de SeaSalts. Todos los aislados son positivos para la ţ-galactosidasa (ONPG), utilización del citrato, fermentación de glucosa, manitol, sorbitol, sacarosa, rahmnosa, melibiosa, amygdalina y arabinosa (API20E).
Producen ácido a partir de: glicerol, L-arabinosa, D-ribosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-rhamnosa, dulcitol, D-sorbitol, metil-α-D-glucopiranosida, D-manitol, N-acetilglucosamina, arbutina, esculin, salicina, D-celobiosa, D-maltosa, D-lactosa, D-melibiosa, D-sacarosa, D-trehalosa, D-rafinosa, gentibiosa, L- fucosa, gluconato potásico y 5-cetogluconato potásico (API 50CHB/E).
Los compuestos que usaron como única fuente de carbono en BMA fueron los siguientes: ácido fumárico, D-glucosa, D-ribosa, acetato sódico, ácido málico, D-trehalosa, ácido succínico, celobiosa, D-manitol, salicina, glicerol, ácido sacárico, melibiosa, lactosa, maltosa, D-galactosa, D-xilosa, fructosa, ácido glucurónico, ácido galactónico, D-gluconato, ácido pirúvico, ácido láctico, L-Ramnosa, D-sorbitol, L-aspártico, L-serina y sacarosa..
El contenido G+C de la cepa tipo es del 51,6 mol%.

La cepa tipo CFA14(1/10)^{T} (=LMG 31368, =CECT 9856) fue aislada de *Ruditapes decussatus* en Carril (42°36'50.4" N 8°46'39.1" W), Galicia.

5.4 DISCUSIÓN

El estudio bioquímico de nuestros 5 aislados muestra la presencia de características semejantes a las otras especies del género *Rahnella*, como su morfología bacilar, su carácter Gram negativo, son oxidasa positivos y facultativos anaerobios. Si bien existe diferencias entre nuestros aislados, sobre todo entre CJA17(100), como su limitación de crecimiento a concentraciones de SeaSalts por encima del 7%, los resultado de la pruebas bioquímicas no ofrecen la consistencia necesaria para diferenciar nuestros aislados entre ellos y establecer una identificación correcta de nuestras cepas.

El sistema miniaturizado API20E muestra diferencias con los resultados obtenidos mediante las técnicas convencionales de tubo y placa en las pruebas del citrato, Voges-Proskauer y arginina dihidrolasa. Los resultados de estos sistemas no son muy fiables debido a la existencia de falsos negativos y positivos en bacterias marinas (Kent, 1982; Santos y col., 1993).

Al realizar una primera aproximación con la secuenciación del gen ARNr 16S, se identificó a nuestros 5 aislados como pertenecientes al género *Rahnella*, con porcentajes de similitud entre el 99,5% y el 99% con la especie *Rahnella aquatilis*. Al elaborar el árbol filogenético con las secuencias del gen ARNr 16S, todos los aislados de almeja se encontraron agrupados con la especie *R. aquatilis* en una rama diferenciada de las otras cinco especies del género.

Tras secuenciar el genoma completo y realizar análisis comparativos de los genomas de nuestros aislados con los demás genomas depositados de las especies del género, se comprobó como las cepas de almeja se encontraban por debajo del umbral para definición de nueva especie tanto en los análisis en ANI (95-96%) como en los análisis de eDDH (70%). Además, los valores obtenidos entre las cepas CFA14(1/100) y RFA10(1/100) confirman que formarían parte de la misma especie y que el aislado CJA17(100) constituiría otra nueva especie. Los árboles realizados a partir de las secuencias concatenadas de los 4 genes seleccionados (*gyr*B, *atp*D, *fts*Z y *rpo*B) y del pangenoma, mostraron como nuestros aislados

se encontraban formando dos grupos bien diferenciados, por un lado, CJA17(1/100) y por el otro lado CFA14 (1/100) y RFA10(100).

Todos los resultados taxonómicos, moleculares y bioquímicos sostienen la propuesta de que nuestros aislados constituirían dos nuevas especies dentro del género *Rahnella* para las que proponemos los nombre *Rahnella conchicola* sp nov. y *Rahnella gallaica* sp. nov. siendo las cepas CJA17(1/100) ^{T} y CFA14(1/100) ^{T} las cepas tipo de cada especie, respectivamente.

Por otro lado, en los análisis del gen ARNr 16S, nuestros aislados y la especie tipo del género (*R. aquatilis*) se encuentran separadas de las demás especies del género. La especie *R. inusitata* aparece en un rama alejada independiente, agrupada con especies del género *Rouxiella*. Al analizar las secuencias del gen ARNr 16S en la base de datos EzBiocloud se observa como esta cepa presenta porcentajes de similitud más elevados con especies del género *Rouxiella* (99,3%-98,8%), que con las especies del género *Rahnella* (98,4%-97,5%) (Tabla 5.8). Los análisis comparativos mediante los índices ANI, eDDH y el análisis MLSA también muestran una clara diferenciación de esta especie con el resto del género. Todos estos resultados plantean la necesidad de realizar un estudio taxonómico más profundo del género *Rahnella* y una posible reclasificación de la especie *R. inusitata.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6.
DISCUSIÓN GENERAL

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6 DISCUSIÓN GENERAL

El estudio de la microbiota de las almejas cultivadas es importante para poder ampliar nuestro conocimiento sobre la dinámica de esta comunidad bacteriana, como interactúan las bacterias entre ellas y con el hospedador o cual puede ser la función de determinados taxones dentro del hospedador. Además, este conocimiento ampliado sobre nuevos taxones bacterianos, puede ayudarnos a mejorar los sistemas de cultivo en almeja y a combatir nuevos patógenos.

En esta tesis, se ha desarrollado un estudio de la microbiota asociada a almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) en las Rías de Arousa (Carril) y Pontevedra (Redondela).

El estudio realizado mediante la técnica de secuenciación masiva del gen ARNr 16S ha puesto de manifiesto la gran diversidad de géneros asociados a la microbiota de la almeja fina y japonesa, así como, la especificidad de órgano de algunos grupos de bacterias y géneros. Las muestras de hepatopáncreas y gónada fueron las que presentaron una mayor número de OTUs. Además, los análisis de ANOSIM mostraron una mayor heterogeneidad de la microbiota entre las muestras de almeja fina que entre las de almeja japonesa. El filo *Proteobacteria* fue el más abundante en la mayoría de las muestras, seguido de los filos *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* que fueron los taxones predominantes en algunas muestras de manto y hepatopáncreas.

Los géneros *Methylobacterium* o *Sphingomonas* presentaron una elevada abundancia relativa en gónada de ambas especies de almejas en el mes de octubre, las cuales se encontraban maduras sexualmente. Ambos géneros tienen funciones que pueden ser beneficiosas para la almeja como la síntesis de carotenoides y mevalonato, la absorción de la radiación UV-A o la actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos (Van Dien y col., 2003; Romanenko y col., 2007; Liang y col., 2017; Yoshida y col., 2017).

El género *Endozoicomonas* apareció asociado a las branquias de almeja fina, pudiendo ejercer funciones importantes en la almeja como la participación en el transporte de proteínas y carbohidratos o la producción de compuestos antimicrobiano (Neave y col., 2016b). *Rickketssiales* AB1 también se encontró con mucha abundancia relativa en branquia de almeja fina, los organismos tipo *Ricketssia* (RLO) ya se habían asociado con infecciones asintomáticas en moluscos bivalvos (Carballal y col., 2001; Jones, 2007; Sabry y col., 2011).

Además, estudios anteriores de la microbiota asociada a almejas ya habían descrito la especificad de este grupo en almeja fina (Romalde y col., 2013).

El género *Mycoplasma* aparece con abundancia relativa elevada en las muestras de hepatopáncreas y, aunque este género ya se ha descrito anteriormente en moluscos bivalvos (Harshbarger y Chang 1977; Paillard y col., 2004; Loggans y col., 2006; Winters y col., 2011; King y col., 2012; Arfken y col., 2017; Milan y col., 2018), su función ecológica dentro del hospedador está poco estudiada. Otro género que aparece asociado a hepatopáncreas es *Formosa*, que podría tener alguna función degradando polisacáridos de algas (Man y col., 2013).

En algunas muestras de manto se ha encontrado una gran prevalencia del género *Psychrobacter* y de bacterias no cultivables de la familia *Microscillaceae.* Existen estudios que asocian la abundancia de estas bacterias con la presencia de metales pesados en el medio como mercurio o cromo (Wang y col., 2014; Pepi y col., 2011; Turgay y col., 2019).

El gran número de bacterias no cultivables encontrado, apareciendo en muchos casos como grupos mayoritarios, pone de manifiesto la necesidad de seguir realizando nuevos estudios que nos ayuden a esclarece la función de estos y otros grupos de bacterias en los diferentes órganos de las almejas. Los resultados obtenidos también ponen de manifiesto la sobrestimación del género *Vibrio* en las técnicas convencionales. Además, se han detectado géneros no descritos anteriormente en almejas que podría estar involucrado en funciones importantes, como en procesos digestivos, reproductivos o de otra índole.

Por otro lado, se ha realizado el estudio de la microbiota mediante la técnica de dilución a extinción (D/E) tratando de aislar especies bacterianas oligotróficas o que se puedan ver enmascarados por grupos de bacterias que crecen mejor en los medios convencionales AM y TCBS. Los resultados obtenidos, así como su comparación con las especies identificadas por la metodología clásica, pone de manifiesto las gran diferencia de taxones bacterianos identificados en las dos técnicas. Mientras que mediante la metodología clásica los géneros *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* fueron los más abundantes, en los aislados obtenidos de dilución a extinción solo se identificó un asilado perteneciente a estos géneros.

Además, los resultados de dilución a extinción mostraron una mayor diversidad de géneros, siendo los géneros más abundantes *Pseudomonas* y *Shewanella*; apareciendo además géneros no descritos anteriormente en la microbiota de almejas (Balboa y col., 2016) como los géneros *Brachybacterium o Rahnella.* En el caso del género *Rahnella,* la mayoría de las

especies descritas hasta el momento se habían asociado a infecciones de diferentes organismos como humanos, peces, cebollas y árboles (Chang y col., 1999; Tash, 2005; Brady y col., 2014; Ai-Jun Lü y col., 2017; Lamb y col, 2018; Asselin y col., 2019). Por otro lado algunas especies del género *Brachybacterium* presentan actividad antimicrobiana o capacidad de degradar antraceno (Lily y col., 2013; Leiva y col., 2015; Rizzo y col., 2018). Por lo tanto, sería interesante estudiar estos géneros y ver su efecto en larvas de almejas y/o almejas adultas.

Otros géneros como *Microbacterium*, *Janibacter* o *Sphingomona*s, identificados a partir de la secuenciación masiva del gen ARNr 16S (ver capitulo 3) pudieron ser recuperados mediante D/E, permitiendo así estudiar más profundamente estos taxones y obtener información sobre el papel que pueden desempeñar dentro de la almeja.

La gran diferencia entre los géneros detectados mediante las técnicas convencionales y la técnica de dilución a extinción, muestra la necesidad de modificar la composición de los medios de cultivo y los tiempos de incubación de forma que podamos estudiar mejor los diferentes taxones bacterianos asociados almejas así como la identificación de nuevas especies bacterias que puedan ser posibles patógenos o probióticos.

Por último, se identificaron y describieron dos especies pertenecientes al género *Rahnella* a partir de 5 aislados obtenidos mediante la técnica de dilución a extinción de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*). La elaboración del árbol filogenético a partir del gen ARNr 16S agrupó a todos nuestros aislados en una rama diferenciada dentro del género *Rahnella* con la especie tipo del género, *Rahnella aquatilis*. Los análisis realizados a partir de la secuenciación del genoma completo confirmaron la diferenciación de nuestros aislados de las demás especies descritas del género, al encontrarse los valores de ANI y eDDH por debajo del umbral para definición de nueva especie (95-96% y 70%, respectivamente). Estos mismo índices, así como la elaboración del árbol pangenómico y el MLSA, permitieron diferenciar nuestros aislados, de forma que se encontrarían conformando dos nuevas especies dentro del género *Rahnella*. para la cuales se proponen los nombre *Rahnella conchicola* sp nov., y *Rahnella gallaica* sp. nov. siendo las cepas CJA17(1/100)^T y CFA14(1/100)^T las cepas tipo de cada especie, respectivamente.

En resumen, sería necesario seguir realizando estudios mediante las nuevas técnicas de secuenciación que nos permitan obtener más información sobre la composición de la microbiota y la función de diferentes taxones en la almeja. Además, es importante tratar de

aislar y cultivar nuevos géneros mediante la modificación de los medios de cultivo y tiempos de incubación, pudiendo realizar estudio más completos de la función de taxones no cultivables hasta el momento.

7.
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7 CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en los diferentes capítulos de este memoria, se pueden deducir las siguientes conclusión:

1. El estudio de la microbiota mediante la secuenciación masiva del gen ARNr 16S demuestra la sobrestimación de los género *Vibrio* y *Pseudoalteromonas* mediante las técnicas convencionales de cultivo.

2. Tanto la almeja fina como la japonesa presentan una diversidad de géneros elevada, observándose una mayor riqueza de géneros en las muestras de primavera. Además, las comunidades microbianas fueron más similares entre las muestras de otoño que entre las muestras de primavera.

3. La elevada abundancia de bacterias no cultivables que presentan los diferentes órganos hace que sea necesario diseñar nuevos estudios y métodos que permitan dilucidar la función de estos taxones en las almejas.

4. Muchos de los géneros detectados mediante secuenciación masiva muestra especificidad por algunos órganos. Algunos géneros aparecen asociados a las gónadas de almejas que se encontraban maduras sexualmente, pudiendo estar involucrados en la síntesis de compuestos necesarios para la almeja durante la reproducción.

5. La gran diferencia de géneros encontrada entre los aislados obtenidos a partir de la técnica de dilución a extinción y los métodos convencionales de cultivo pone de manifiesto la necesidad de incluir más medios de cultivo y modificar protocolos de incubación en futuros estudios. Además, la técnica de dilución a extinción permitió aislar bacterias de géneros detectados solo en los estudios de secuenciación masiva, haciendo posible un estudio más profundo de géneros no descritos hasta el momento en almeja.

6. La caracterización polifásica y el análisis comparativo de los genomas de los aislados obtenidos a partir de dilución a extinción permitió la descripción de dos nuevas especies: *Rahnella aquatilis* sp. nov., y *Rahnella conchicola* sp. nov. Además, los estudios filogenéticos y los valores de los índices ANI y eDDH plantean la necesidad de reclasificación taxonómica de la especie *Rahnella inusitata*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CONCLUSIONS

Based on the results obtained in the different chapters of this memory, we can infer the following conclusions:

1. The study of clam microbiota by means of high throughput sequencing of 16S rRNA gene demonstrates the overestimation of the *Vibrio* and *Pseudoalteromonas* genera by conventional culture techniques.

2. Both the grooved carpet shell and manila clams have a high diversity of genera, a greater richness of genera being observed from the spring samples. In addition, the microbial communities were more similar among autum samples than among spring samples.

3. The high abundance of non-cultivable bacteria presented by the different organs makes it necessary to develop new studies and methods that allow to elucidate the function of these taxa in clams.

4. Many of the genera detected by high throughput sequencing show specificity for some organs. Some genera appear associated with clam gonads that were sexually mature, and may be involved in the synthesis of compounds necessary for clam during reproduction.

5. The difference in bacterial genera found among the isolates obtained from the dilution-to-extinction technique and the conventional culture method demonstrates the need to include more culture media and to modify incubation protocols in future studies. Moreover, with the dilution-to-extinction technique it was possible to isolate bacteria linked to genera detected only by high-throughput sequencing, allowing a deeper study of genera not described so far in clams.

6. The polyphasic characterization and comparative analysis of the genomes of the isolates obtained from dilution-to-extinction method, allowed the description of two new species: *Rahnella aquatilis* sp. nov., and *Rahnella conchicola* sp. nov. In addition, phylogenetic studies and the values of the ANI and eDDH indexes suggest the need of taxonomic reclassification of the species *Rahnella inusitata*.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.
EXTENDED SUMMARY

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8 EXTENDED SUMMARY

The culture of bivalve mollusc, specially clams and mussels, has a huge economic importance for the aquaculture in Galicia. The introduction of seeds and adult specimens from other countries to solve the problem of the overexploitation of natural beds, increases the risk of introducing new diseases. The study of the microbiota associated to different species of clams could help to know their sanitary status or to try to design new control strategies as well as to improve the clam rearing.

The first study analysing microbiota associated to bivalve mollusc was in 1960 (Cowel y col., 1960). This study related the predominance of Gram negative bacteria, being the most abundant genera *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium* and *Achromobacter*. Some studies on mollusc microbiota have analysed the variation of the structure of bacterial communities taking into account spatial (Colwell and Liston 1961; Colwell and Sparks 1967; Lovelace y col., 1968) and temporal variables (Pujalte y col., 1999), the different growth stages of the bivalve, as well as in the different organs (Rajagopalan and Silvalingham, 1978).

Most studies on clam microbiota of clams are based on classic techniques. Indeed, Our group carried out the most extended study of Manila clam and grooved carpet shell microbiota based on cultured dependent techniques where the predominant phyla was *Alphaproteobacteria* and the most abundant genera were *Vibrio*, followed by *Pseudoalteromonas* and *Shewanella* (Romalde y col., 2013).

The development of next generation sequencing (NGS) techniques have allowed the study of the uncultured and cultured bacteria associated to bivalves molluscs. Some of these studies have focused on the analysis of whole body homogenates or single tissues (Trabal y col 2014; Lokmer y col., 2015, Roterma y col., 2015; Lasa y col., 2016) and other have compared microbiota composition between different tissues in bivalves. The results obtained with these techniques have revealed the high bacterial diversity present in the bivalve molluscs and the overestimation of certain groups of bacteria such as *Vibrio* or *Pseudomonas* by culture dependent techniques.

Due to the limitation of the classic techniques that only allow the study of low percentages of the microbial diversity in the environment, the application of NGS may help to have a better knowledge about the microbiota of clams. In the present work, we have analysed the

microbiota associated to Manila clam (*Ruditapes philippinarum)* and grooved carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) using high-throughput sequencing of the V3-V4 hypervariable regions of 16S rRNA gene, comparing the microbiota present in different organs (gonad, mantle, hepatopancreas and gills), geographical localizations and two different sampling periods (April and October).

The obtained results showed that most of samples reach saturation or asymptotic phase in rarefaction analyses except the spring samples from Redondela and the grooved carpet shell clam from Carril. In most samples, more than 93% of the clustered sequences could be assigned taxonomically.

More than 30 phyla were identified but most of the diversity could be explained analysing only 14 phyla (including *Proteobacteria, Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Tenericute*s and *Firmicutes*). *Proteobacteria* was the most abundant phylum in both species of clams, showing a high relative abundance during October in all samples. Phylum *Actinobacteria* also represented high percentages in Redondela site in autumn.

Taxonomic assignment of the sequences of the different organs also showed a high number of phyla and genera. Most of the microbiota in these samples could have been assigned to *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes, Tenericutes*, *Firmicutes*, *Fusobacteria Spirochaetae* and *Chlamydiae*. *Proteobacteria* was the more abundant phylum in most of samples, whereas *Bacteroidetes* was the predominant phylum in mantle of Manila clam, representing more than 60% of the total microbiota in this tissue.

All samples showed a great diversity of genera, being spring the period in which higher number of genera has been observed. Uncultured bacteria that belong to different families (*Propionibacteriaceae, Spirochaetaceae, Francisellaceae* and *Chlamidiaceae*) and *Mycoplasma, Methylobacterium, Psychrobacter, Endozoicomones* and *Vibrio* genera were the predominant bacterial groups in most samples.

Certain organ specificity has been observed among samples. For example, *Mycoplasma* genus was detected with relative high abundance in the hepatopancreas of both species of clams. *Psychrobacter* was detected with relative high abundances in the mantles of both species in Carril in autumn.

Uncultured bacteria of the *Propionibacteriaceae* and *Francisellaceae* families were the predominant taxa in Redondela in October. Uncultured *Propionibacteriaceae* were the predominant taxon in the hepatopancreas of both clam species in October in Redondela.

Moreover, this group of bacteria were also the most abundant taxon in the gonad in spring samples from Carril. On the other hand, uncultured *Francinsella* were detected with high relative abundance in gills and mantle of *R. decussatus*.

Methylobacterium genus was more abundant in October than in April, being one of the predominant genera in the gonads from both species during this month. Genus *Endozoicomonas* was associated with gills of grooved carpet shell clam in Carril, while in Manila clams it was detected with relative abundances lower than 1%. *Rickketssiales* AB1 group appears with high relative abundances in mantle, gonad and gill of grooved carpet shell in Redondela but it was no detected in this clam species from Carril.

Vibrio and *Pseudoalteromonas* genera were detected in most samples of this study but with relative abundance much lower than in studies carried out using culture-dependent methodologies (Romalde y col., 2013).

All samples showed a great richness of OTUs, being higher in both species of clams during spring. The Chao-1 index also showed a higher diversity of samples in April than in October. The principal coordinate analysis (PCoA) of clam samples, showed that samples collected in October, regardless of the species or location, grouped together, while April samples were distant from each other. Similar results have been observed in NMDS analysis, where October samples are grouped together, showing higher dissimilarity for samples collected in April.

On the other hand, analysis of similarity (ANOSIM) showed that microbial communities were more heterogeneous in grooved carpet samples than in Manila clam samples.

The analysis of the Microbiota for individualized tissues of both species of clams showed a great number of OTUs. In grooved carpet shell clam the highest values of Chao-1 were formed in gonad and hepatopancreas. In Manila clams, higher values of Chao-1 index were observed in April than in October, except in the samples of hepatopancreas. PCoA and NMDs analysis showed that hepatopancreas samples separated, not only from the other samples, but also among themself, showing the great bacterial diversity in this organ. Moreover, gonad samples of both clam species in autumn clustered together, indicating high level of similarity of bacterial composition among these samples.

The results for this study demonstrate the overestimation of certain groups of bacteria by culture-dependent techniques. More studies of the ecological function of some genera should be carry out to improve the knowledge of their metabolic role in clams and their functions in some processes as reproduction or antimicrobial action. It would be also interesting to

understand the role of the bacterial groups that displayed a seasonality showing and increase/decrease between seasons.

On the other hand, a study of the grooved carpet shell and Manila clam microbiota was carried out using the classic culture-dependent technique and in parallel with the "dilution to extinction" procedure in which the nutrient concentration of media is reduced and the incubation times is increased, to isolate oligotrophic and facultative bacteria adapted to environment with low nutrients and to try to isolate no cultivable bacteria in conventional cultivation techniques. A total of 135 strains isolated from dilution to extinction technique (D/E) and 95 strains isolated from marine agar (MA) and Thiosulfate-citrate-bile-sucrose agar (TCBS) were obtained. Analysis of the 16S rRNA gene sequence allowed the identification of all these strains using EzBiocloud database. *Gammaproteobacteria* was the predominant group in all dilution to extinction (D/E) isolates. Moreover, *Actinobacteria* phylum was more abundant in D/E than in samples cultivated in MA and TCBS. The number of different genera identified in Carril was higher than in Redondela in D/E isolates. *Pseudomonas* and *Shewanella* were the most abundant genera in the isolates obtained from MA diluted 10 times (MA1/10). In Carril, *Pseudomonas, Shewanella* and *Aeromonas* were the most abundant bacteria in both clam species, meanwhile in Redondela, *Pseudomonas* and *Shewanella* genera represented more than 60% and 80% of the total isolates in manila clam and grooved carpet shell, respectively.

Dominance of the genus *Pseudomonas* was appreciated in all samples of MA diluted 100 times (AM1/100). In Carril, *Pseudomonas* and *Micrococcus* constituted the 40% of total of isolates in Manila clam. The other 60% of isolates were constituted by several genera: *Shewanella*, *Aeromonas*, *Rahnella*, *Janthinobacterium, Lelliottia*, *Microbacterium*, *Brachybacterium*, *Brevudimonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Stenotrophomonas*, *Sphingobacterium* and *Serratia.* In *R. decussatus* more than 50% of isolates were represented by *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Gordonia*. The remaining group of *Micrococcus Microbacterium Shewanella*, *Lelliotia*, *Brevundimonas*, *Dieztia*, Sphingomonas and *Janibacter* made up a total of 47% of all isolates. On the other hand, most of isolates of MA1/100 from Redondela were identified as *Pseudomonas*, that constituted 77% of the total of isolates from Manila clam and 42% in grooved carpet shell clam.

Vibrio was the most abundant genus in the isolates obtained from MA and TCBS, followed by *Pseudoaltemonas* and *Shewanella* genera. Previous study of microbiota of these clam

species have been already reported the predominance of *Vibrio* and *Pseudoalteromonas* genera (Romalde y col., 2013). However, most genera detected by D/E were not detected on classic media and most of them were no detected in the microbiota of Manila clam and grooved carpet shell clam in previous studies. Moreover, comparing genera shared between D/E and classic proceeding, only 3 genera were detected by both techniques, *Vibrio*, *Pseudomonas* and *Shewanella. Vibrio* was represented by one isolate in D/E samples while on classic media only one isolate was identified as member of *Pseudomonas* genus. Although the number of isolates of *Shewanella* genus was high in both techniques, when comparing the isolates at the species level, in D/E most of isolates were identified as *Shewanella hafniensis*, while none of the isolates obtained with classic media were identified as this species. The species detected on MA and TCBS (*S. electrodiphila*, *S. sairae*, *S. aestuarii*, *S. pneumatophori*, *S. colwelliana*, *S. echelgeliana* and *S. algidipiscicola*) were not identified among the isolates from D/E method.

On the other hand, genera that were detected by NGS in the chapter 3 of this memory as *Microbacteirum, Janibacter* or *Sphingomonas*, could be isolated by dilution to extinction technique. None of these genera were detected in MA and TCBS isolates. Moreover, genera hitherto unidentified using standard culture techniques were detected associated to clam microbiota, such as *Rahnella*, *Brachybacterium, Janthinobacterium* or *Brevudimonas*.

The differences in bacterial genera obtained from the dilution-to-extinction technique and the conventional culture method demonstrates the need to include more culture media and to modify incubation protocols in future studies. Moreover, with the dilution-to-extinction technique it was possible to isolate bacteria linked to genera detected only by high-throughput sequencing, allowing a deeper study of genera not described so far in clams.

The results presented in this work also included the description of two new species of *Rahnella* genus carried out through the sequencing of the whole genome and the comparative analysis of five isolates obtained from “dilution to extinction” technique. The 16S rRNA gene sequences obtained showed similarities among the five isolates and the type strain of *Rahnella aquatilis* ranging from 98,58% to 99,64%. Phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene showed that the clam isolates formed two different groups and the type strain of *R. aquatilis* clustered with our isolates. The rest of species of the genus clustered in a different and distant group respect to clam isolates and *R. aquatilis*. Due to this results, the genomes of three representative genomes of these isolates, CJA17(1/100), CFA14(1/10) and

RFA10(1/100), were sequenced to perform a deep phylogenetic and comparative analysis. Sequences of gyrB, atpD, ftsZ and rpoB genes were selected from these genomes to perform a MLSA. Moreover, a pangenome analysis was carried out with the genome of clam isolates and all the type strains of *Rahnella* genus, confirming the results obtained with the 16S rRNA gene. All these phylogenetic analyses showed that the three isolates formed two different groups within the genus. ANIm, ANIb, OrthoANI and eDDH values among clam isolates and the species of the genus were below the respective threshold for species delimitation (95-96% ANI and 70% eDDH). *R. aquatilis* was the closet species, with ANI values of 90%-92.7% and eDDH values of 44.3%-48.9%. Comparative genomic analyses also showed that CFA14(1/10) and RFA10(1/100) formed a single species with ANI and eDHH values between them of 99% and 95%, respectively. In addition, CJA17(1/100) presented ANI values between 90.12-90.98% and eDDH values of 41.7% with the other two isolates, indicating therefore that it constitutes a different species within the genus *Rahnella.*

In summary, the taxonomic and molecular studies of the clam isolates support the proposal of two novel species within the genus *Rahnella*, for which the names *Rahnella conchicola* sp. nov. and *Rahnella gallaica* sp. nov. are proposed.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

9. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

9 BIBLIOGRAFÍA

Abollo, E., Ramilo, A., Casas, S.M., Comesaña, P., Cao, A., Carballal, M.J. y Villalba, A. (2008). First detection of the protozoan parasite *Bonamia exitiosa* (*Haplosporidia*) infecting flat oyster *Ostrea edulis* grown in European waters. Aquacult, 274: 201–207. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.11.037.

Aceves, A.K., Johnson, P., Bullard, S.A., Lafrentz, S. y Arias, C.R. (2018). Description and characterization of the digestive gland microbiome in the freshwater mussel *Villosa nebulosa* (Bivalvia: Unionidae). J Molluscan Stud, 84: 240-246. https://doi.org/10.1093/mollus/eyy014.

Adessi, C., Matton, G., Ayala, G., Turcatti, G., Mermod, J., Mayer, P. y Kawashima, E. (2000). Solid phase DNA amplification: characterization of primer attachment and amplification mechanisms. Nucleic Acids Res, 28: E87. https://doi.org/10.1093/nar/28.20.e87

Agamennone, V., Le, N.G., van Straalen, N.M., Brouwer, A., y Roelofs, D. (2019). Antimicrobial activity and carbohydrate metabolism in the bacterial metagenome of the soil-living invertebrate Folsomia candida. Scientific Reports, 9: 7308. https://doi.org/10.1038/s41598-019-43828-w.

Ainsworth, T.D., Krause, L., Bridge, T, Torda, G., Raina, J-P., Zakrzewski M., Gates, R.D., Padilla-Gamiño, J.L., Spalding, H.L., Smith, C., Woolsey, E.S., Bourne, D.G., Bongaerts, P., Hoegh-Guldberg, O. y Leggat, W. (2015) The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. ISME J, 9: 2261-2274. https://doi.org/10.1038/ismej.2015.39.

Allain, G., Arzul, I., Chollet, B., Cobret, L., de Decker, S., Faury, N., Ferrand, S., François, C., Garcia, C., Haffner, P., Joly, J.P., Michel, J., Miossec, L., Morga, B., Nicolas, J.L., Omnes, E., Pépin, J.F., Robert, M., Saulnier, D., Schikorski, D., Segarra, A., Tourbiez, D. y Renault, T. (2009). Summer mortality outbreaks of French Pacific oysters, *Crassostrea gigas* in 2008: research and detection of pathogens. Proc. 14th EAFP

International Conference. Diseases of Fish and Shellfish. Prague, Czech Republic. pp. 127.

Allam, B., y Paillard, C. (1998). Defense factors in clam extrapallial fluids. Dis Aquat Organ, 33: 123-128 https://doi.org/10.3354/dao033123.

Allam, B., Ashton-Alcox, K.A. y Ford, S.E. (2001). Haemocyte parameters associated with resistance to brown ring disease in *Ruditapes* spp. clams. Dev Comp Immun, 25: 365–375.

Allam, B., Paillard, C. y Ford, S. E. (2002). Pathogenicity of *Vibrio tapetis*, the etiological agent of brown ring disease in clams. Dis Aquat Org, 48: 221-231.https://doi.org/10.3354/dao048221.

Allam, B., Paillard, C., Howard, A. y Le Pennec, M. (2000). Isolation of the pathogen *Vibrio tapetis* and defense parameters in brown ring diseased Manila clams *Ruditapes philippinarum* cultivated in England. Dis Aquat Org, 41: 105–113.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol, 215: 403-410. http//doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2.

Alvarado, R. y Leiva, S. (2017). Agar-degrading bacteria isolated from Antarctic macroalgae. Folia Microbiol (Praha), 62: 409-416. https://doi.org/10.1007/s12223-017-0511-1.

Andrews, J.D. (1996) History of *Perkinsus marinus*, a pathogen of oysters in Chesapeake Bay 1950–1984. J Shellfish Res, 15: 13–16.

Arfken, A., Song, B., Bowman, J.S. y Piehler, M. (2017). Denitrification potential of the eastern oyster microbiome using a 16S rRNA gene based metabolic inference approach. PLoS one, 12: e0185071. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185071.

Arias, C.R., Macián, M.C., Aznar, R., Garay, E. y Pujalte, M.J. (1999). Low incidence of *Vibrio vulnificus* among *Vibrio* isolates from sea water and shellfish of the western Mediterranean coast. J Appl Microbiol, 86: 125-134.

Arzul, I., Chollet, B., Michel, J., Robert, M., Garcia, C., Joly, J.-P., François, C. y Miossec, L. (2012). One *Perkinsus* species may hide another: characterization of *Perkinsus* species present in clam production areas of France. Parasitology, 139: 1757–1771. https://doi.org/10.1017/S0031182012001047.

Asselin, J.E., Eikemo, H., Perminow, J., Nordskog, B., Brurberg, M.B. y Beer, S.V. (2019). *Rahnella* spp. are commonly isolated from onion (*Allium cepa*) bulbs and are weakly pathogenic. J Appl Microbiol, 127: 812-824. https://doi.org/10.1111/jam.14340.

Aubin, G.G., Bémer, P., Kambarev, S., Patel, N.B., Lemenand, O., Caillon, J., Lawson, P.A. y Corvec, S. (2016). *Propionibacterium namnetense* sp. nov., isolated from a human bone infection. Int J Syst Evol Microbiol, 66: 3393–3399. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001204.

Auch, A.F., Klenk, H.-P. y Gõker, M. (2010b). Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. Stand Genomic Sci, 2: 142–148. doi: 10.4056/sigs.541628.

Auch, A.F., von Jan, M., Klenk, H.-P. y Gõker, M. (2010a). Digital DNA-DNA hybridization for microbial species delineation by means of genome-to-genome sequence comparison. Stand Genomic Sci, 2: 117–134. https://doi.org/10.4056/sigs.531120.

Azandégbé, A., Garnier, M., Andrieux–Loyer, F., Kérouel, R., Philippon, X. y Nicolas JL. (2010) Occurrence and seasonality of *Vibrio aestuarianus* in sediment and *Crassostrea gigas* haemolymph at two oyster farms in France. Dis Aquat Organ, 91: 213–221. https://doi.org/10.3354/dao02253.

Azevedo, C. (1993). Occurence of an unusual branchial mycoplasma-like infection in cockle *Cerastoderma edule* (Mollusca, Bivalvia). Dis Aquat Org, 16: 55-59. https://doi.org/10.3354/dao016055.

Azevedo, C., Montes, J. y Corral, L. (1999). A revised description of *Haplosporidium armoricanum*, parasite of *Ostrea edulis* L. from Galicia, northwestern Spain, with special reference to the spore-wall filaments. Parasitol Res, 85: 977–983 https://doi.org/10.1007/s004360050669.

Baker, G.C., Smith, J.J. y Cowan D.A. (2003). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. J Microbiol Methods, 55: 541–555. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2003.08.009.

Bakermans, C., Ayala-del-Río, H.L., Ponder, M.A., Vishnivetskaya, T., Gilichinsky, D., Thomashow, M.F. y Tiedje, J.M. (2006). *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. Int J Syst Evol Microbiol, 56: 1285–1291. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64043-0.

Balboa, S., Lasa, A,. Gerpe, D., Diéguez, A.L. y Romalde, J.L. (2016). Microbiota associated to clams and oyster: a key factor for culture success. In Romalde, J.L. (Eds.) Oyster and Clams. New York: Nova Science Publisher, pp 39-66.

Balboa, S. (2012). Estudio de la variabilidad intraespecífica del patógeno de almejas *Vibrio tapetis*. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

Bateman, K.S., White, P. y Longshaw, M. (2012). Virus-like particles associated with mortalities of the Manila clam *Ruditapes philippinarum* in England. Dis Aquat Organ, 99: 163–167. https://doi.org/10.3354/dao02462.

Baumann, P., Bauman, L. (1981). The marine Gram-negative eubacteria: genero *Photobacterium*, *Beneckea*, *Alteromonas*, *Pseudomonas* and, *Alcaligenes*. En: The Prokaryotes Vol II. Starr, M.P., Stolp H, Trüper H.G., Balows A., Schleger, H. (Eds). Springer, Heidelberg, pp. 1302-1331.

Bayne, B.L., Windows, J. y Thompson, R.J. (1976). Physiology II. In Bayne, B.L. (Ed.), Marine Mussels: Their Ecology and Physiology. Cambridge University Press, Cambridge, pp 121-206

Bayne, B.L.; Widdows, J.; Thompson, R.J. (1976). Physiology: II, in: Bayne, B.L. (Ed.) (1976). Marine mussels: their ecology and physiology. International Biological Programme, pp. 207-260

Beaz-Hidalgo, R., Balboa, S., Romalde, J.L. y Figueras, M.J. (2010). Diversity and pathogenecity of *Vibrio* species in cultured bivalve molluscs. Environ Microbiol Rep, 2: 34–43. https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00135.x.

Beinart, R.A., Nyholm, S.V., Dubilier, N. y Girguis, P.R. (2014) Intracellular *Oceanospirillales* inhabit the gills of the hydrothermal vent snail *Alviniconcha* with chemosynthetic, γ-*Proteobacterial* symbionts. Environ Microbiol Rep, 6: 656–664. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12183.

Berthe, F.C.J., Le Roux, F., Peyretaillade, E., Peyret, P., Rodriguez, D., Gouy, M. y Vivarès, C.P. (2000). Phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA of Marteilia refringens validates the existence of Phylum Paramyxea (Desportes and Perkins, 1990). J Eukaryot Microbiol, 47: 288-293 https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00049.x.

Birkbeck, T.H., Bordevik, M., Frøystad, M.K. y Baklien, Å. (2007). Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. J Fish Dis, 30: 505-507. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00837.x

Birkbeck, T.H., Feist, S.W. y Verner-Jeffreys, D.W. (2011). *Francisella* infections in fish and shellfish. J Fish Dis, 34: 173-87. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01226.x

Boettcher, K.J., Geaghan, K.K., Maloy, A.P. y Barber, B.J. (2005). *Roseovarius crassostreae* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. Inter J Syst Evol Microbiol, 55: 1531–1537. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63620-0.

Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30: 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170.

Borrego, J.J., Castro, D., Luque, A., Paillard, C., Maes, P., García, M. y Ventosa, A. (1996). *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. Int J Syst Bacteriol, 46: 480-484. https://doi.org/10.1099/00207713-46-2-480.

Bourouni, O.C., El Bour, M., Mraouna, R., Abdennaceur, H. y Boudabous, A. (2007). Preliminary selection study of potential probiotic bacteria from aquacultural area in Tunisia. *Ann Microbiol*. 2007. doi:10.1007/BF03175205.

Bower S.M., McGladdery S.E. y Price I.M. (1994). Synopsis of infectious diseases and parasites of commercially exploited shellfish. Annu Rev Fish Dis, 4: 1–199. https://doi.org/10.1016/0959-8030(94)90028-0.

Bower, S.M. (1992). Diseases of cultured Japanese scallops (*Patinopecten yessoensis*) in British Columbia, Canada. Aquacult, 107: 201-210. https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90068-V.

Bower, S.M., y Meyer, G.R. (1991). Disease of Japanese scallops (*Patinopecten* yessoensis) caused by an intracellular bacterium. J Shellfish Res, 10: 513.

Bower, S.M., B. Goh, G.R. Meyer, R.B. Carnegie and A. Gee. (2005). Epizootiology and detection of nocardiosis in oysters. In P. Walker P., Lester, R.G, y Bondad-Reantaso, M.G. (eds). Diseases in Asian Aquaculture V. Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, pp. 249-262.

Bowman, J.P., Nichols, D.S. y McMeekin, T.A. (1997). *Psychrobacter glacincola* sp. nov., a halotolerant, psychrophilic bacterium isolated from Antarctic sea ice. Syst Appl Microbiol, 20: 209–215. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(97)80067-7.

Bowman, P., Cavanagh, J., Austin, J.J. y Sanderson, K. (1996). Novel *Psychrobacter* species from Antarctic ornithogenic soils. Int J Syst Bacteriol, 46: 841–848. https://doi.org/10.1099/00207713-46-4-841.

Brady, C., Hunter, G., Kirk, S., Arnold, D. y Denman, S. (2014). *Rahnella victoriana* sp. nov., *Rahnella bruchi* sp. nov., *Rahnella woolbedingensis* sp. nov., classification of *Rahnella* genomospecies 2 and 3 as *Rahnella variigena* sp. nov. and Rahnella inusitata sp. nov., respectively and emended description of the genus Rahnella. Syst Appl Microbiol, 37: 545–552. https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.09.001

Breber, P. (1985). On-growing of the carpet-shell clam (*Tapes decussatus* (L.)): Two years' experience in Venice Lagoon. Aquacult, 44: 51-56 https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90041-9.

Bricelj, V.M, Ford, S.E., Borerro, F.J, Perkins, F.O., Rivara, G., Hillman, R.E., Elston R.A. y Chang, J. (1992). Unexplained mortalities of hatchery-reared, juvenile oysters, *Crassostrea virginica* (Gmelin). J Shellfish Res, 11: 331–347.

Brown, C. y Losee, E. (1978). Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. J Invertebr Pathol, 31: 41-47.

Buck, J.D. (1982). Nonstaining (KOH) method for determination of gram reactions of marine bacteria. Appl Environ Microbiol, 44: 992–993.

Bunse, C., Bertos-Fortis, M., Sassenhagen, I., Sildever, S., Sjõqvist, C., Godhe, A., Gross, S., Kremp, A., Lips, I., Lundholm, N., Rengefors, K., Sefbom, J., Pinhassi, J. y Legrand, C. (2016). Spatio-temporal interdependence of bacteria and phytoplankton during a baltic sea spring bloom. Front Microbiol, 7: 517.https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00517.

Burreson, E.M., Stokes, N.A. y Friedman, C.S. (2000). Increased virulence in an introduced pathogen: *Haplosporidium nelsoni* (msx) in the eastern oyster *Crassostrea virginica*. J Aquat Anim, 12: 1-8. https://doi.org/10.1577/1548-8667(2000)012<0001:IVIAIP>2.0.CO;2.

Cajaraville, M. P. y Angulo, E. (1991). *Chlamydia*-like organisms in digestive and duct cells of mussels from the Basque coast. J Invertebr Pathol, 58: 381-386. https://doi.org/10.1016/0022-2011(91)90184-r.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K. y Madden, T.L. (2009). BLAST+: Architecture and applications. BMC Bioinformatics. https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421.

Campa-Córdova, A.I., Luna-González, A., Mazón-Suastegui, J.M., Aguirre-Guzmán, G., Ascencio, F. y González-Ocampo, H.A. (2011). Efecto de bacterias probióticas en el

cultivo larvario del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). Rev Biol Trop, 59: 183-191.

Cano, I., van Aerle, R., Ross, S., Verner-Jeffreys, D.W., Paley, R.K., Rimmer, DR., Hooper, P., Stone, D. y Feist, S.W. (2018). Molecular characterization of an *Endozoicomonas*-like organism causing infection in the king scallop (*Pecten maximus* L.). Appl Environ Microbiol, 84: e00952-27 https://doi.org/10.1128/AEM.00952-17.

Carballal, M.J., Iglesias, D., Santamarina, J., Ferro-Soto, B. y Villalba, A. (2001). Parasites and pathologic conditions of the cockle *Cerastoderma edule* populations of the coast of Galicia (NW Spain). J Invertebr Pathol, 78: 87–97. https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5049.

Carella, F., Carrasco, N., Andree, K.B., Lacuesta, B., Furones, D. y De Vico, G. (2013). Nocardiosis in Mediterranean bivalves: First detection of *Nocardia crassostreae* in a new host *Mytilus galloprovincialis* and in *Ostrea edulis* from the Gulf of Naples (Italy).

Casas, S.M., LaPeyre, J.F., Reece, K.S., Azevedo, C. y Villalba, A. (2002) Continuous in vitro culture of the carpet shell clam *Tapes decussates* protozoan parasite *Perkinsus atlanticus*. J. Eukaryot. Microbiol., 55: 34–43. https://doi.org/0.3354/dao052217

Castro, D., Martinez-Manzanares, F., Luque, A., Fouz, B., Moriñigo, M. A., Borrego, J. J. y Toranzo, A. F. (1992). Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. Dis Aquat Organ, 14: 229–236. https://doi.org/10.3354/dao014229.

Castro, D., Pujalte, M.J., Lopez-Cortes, L., Garay, E. y Borrego, J.J. (2002). Vibrios isolated from the cultured manila clam (*Ruditapes philippinarum*): Numerical taxonomy and antibacterial activities. J Appl Microbiol, 93: 438-447. https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01709.x.

Cerviño (2011). Ciclo reproductivo, cultivo en criadero y en el medio natural de la almeja babosa *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. y Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. J Microbiolog Methods, 69: 330-339. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005.

Chang, C.L., Jeong, J., Shin, J. H., Lee, E. Y. y Son, H.C. (1999). *Rahnella aquatilis* sepsis in an immunocompetent adult. J Clin Microbiol, 37: 4161-4162.

Chao, A. (1984). Non-parametric estimation of the classes in a population. Scand J Statist, 11: 265-270. https://doi.org/10.2307/4615964.

Chao, A. y Lee, S.M. (1992). Estimating the number of classes via sample coverage. J American Statistical Association, 87: 210-217. https://doi.org/10.1080/01621459.1992.10475194.

Chauhan, N.S. (2019). Metagenome analysis and interpretation. Data Processing Handbook for Complex Biological Data Sources, 139–160. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816548-5.00010-1.

Chen, M., Xu, P., Zeng, G., Yang, C., Huang, D. y Zhang, J. (2015). Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, petroleum, pesticides, chlorophenols and heavy metals by composting: Applications, microbes and future research needs. Biotechnol Advances. 33: 745-755. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.05.003.

Chittpurna, Singh, P.K., Verma, D., Pinnaka, A.K., Mayilraj, S. y Korpole, S. (2011). Micrococcus lactis sp. nov., isolated from dairy industry waste. Int J Syst Evol Microbiol, 61: 2832–2836. https://doi.org/10.1099/ijs.0.028043-0.

Choi, K.-S. y Park, K. I. (1997). Report on the occurrence of *Perkinsus* sp. in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum* in Korea. Korean J Aquacult, 10: 227-237. https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.04.007.

Clarke, K.R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. Aust J Ecol, 18: 117-143. https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.1993.tb00438.x.

Cochennec, N., Le Roux, F., Berthe, F. y Gerard, A. (2000). Detection of *Bonamia ostreae* based on small subunit ribosomal probe. J Invertebr Pathol, 76: 26-32. https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4939.

Collado J, Platas G, Paulus B, Bills GF. (2007). High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. FEMS Microbiol Ecol, 60: 521-533. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00294.x.

Colwell, R.R. y Liston, J. (1960). Microbiology of shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Appl Microbiol, 8: 104–109.

Colwell, R.R. y Liston, J. (1961). Taxonomic relationships among the pseudomonads. J Bacteriol, 82: 1-14.

Colwell, R.R. y Sparks, A.K. (1967). Properties of *Pseudomonas enalia*, a marine bacterium pathogenic for the invertebrate *Crassostrea gigas* (Thunberg). Appl Microbiol, 15: 980–986. https://doi.org/10.3892/etm.2014.2097.

Contreras-Moreira, B. y Vinuesa, P. (2013). GET_HOMOLOGUES, a versatile software package for scalable and robust microbial pangenome analysis. Appl Environ Microbiol, 79: 7696–7701. https://doi.org/10.1128/aem.02411-13.

Davis, C.V. y Barber, B.J. (1994). Size-dependent mortality in hatchery-reared populations of oysters, *Crassostrea virginica*, Gmelin 1791, affected by juvenile oyster disease. J Shellfish Res, 13: 137–142. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00135-0.

De Castro, A.P., Araújo, S.D., Reis, A.M. M., Moura, R. L., Francini-Filho, R. B., Pappas, G., Rodrigues T.B., Thompson F.L. y Krũger, R.H. (2010). Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from Eastern Brazil. Microb Ecol, 59: 658–667. https://doi.org/10.1007/s00248-010-9646-1.

De la Herrán, R., Garrido-Ramos, M.A., Navas, J.I., Ruiz Rejón, C. y Ruiz Rejón, M. (2000). Molecular characterization of the ribosomal RNA gene region of *Perkinsus atlanticus*: its use in phylogenetic analysis and as a target for a molecular diagnosis. Parasitology, 120: 345-353. https://doi.org/10.1017/S003118209900565X.

Delgado, M., Carrasco, N., Elandaloussi, L., Furones, D. y Roque, A. (2007). A mortality event of the venerid bivalve *Callista chione* (Linnaeus, 1758) in a hatchery system - A case study. Bull Eur Assoc Fish Pathol, 27: 214–222.

Denman, S., Doonan, J., Ransom-Jones, E., Broberg, M., Plummer, S., Kirk, S., Scarlett, K., Griffiths, A.R., Kaczmarek, M., Forster, J., Peace, A., Golyshin, P.N., Hassard, F., Brown, N., Kenny, J.G. y McDonald, J.E. (2018). Microbiome and infectivity studies reveal complex polyspecies tree disease in Acute Oak Decline. ISME J, 12: 386–399. https://doi.org/10.1038/ismej.2017.170.

DiSalvo, L.H., Blecka, J. y Zebal, R. (1978). *Vibrio anguillarum* and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. Appl Environ Microbiol, 35: 219-221.

Douillet, P. y Langdon, C.J. (1993). Effects of marine bacteria on the culture of axenic oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg) larvae. Biol Bull, 184: 36-51 https://doi.org/10.2307/1542378.

Drummond, L.C., Balboa, S., Beaz, R., Mulcahy, M.F., Barja, J.L., Culloty, S.C. y Romalde, J.L. (2007). The susceptibility of Irish-grown and Galician-grown Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, to *Vibrio tapetis* and Brown Ring Disease J Invertebr Pathol, 95: 1-8. https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.11.010.

Dubert, J., Barja, J.L. y Romalde, J.L. (2017). New insights into pathogenic Vibrios affecting bivalves in hatcheries: Present and future prospects. Front Microbiol, 8: 762. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00762.

Dubert, J., Romalde, J.L., Spinard, E.J., Nelson, D.R., Gómez-Chiarri, M. y Barja, J.L. (2016). Reclassification of the larval pathogen for marine bivalves *Vibrio tubiashii* subsp. *europaeus* as *Vibrio europaeus* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 66: 4791–4796. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001431.

Eckert, E.M., Salcher, M.M., Posch, T., Eugster, B. y Pernthaler, J. (2012). Rapid successions affect microbial N-acetyl-glucosamine uptake patterns during a lacustrine spring phytoplankton bloom. Environ Microbiol, 14: 794–806. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02639.x

European Food Safety Authorithy / Panel on Animal Health and Welfare (2010). Scientific Opinion on the increased mortality events in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. EFSA J, 8: 1894. https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1894.

Elston, R.A. (1993) Infectious diseases of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Annu Rev Fish Dis, 3: 259–276. https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90038-D.

Engelsma, M.Y., Roozenburg, I. y Joly, J.P. (2008) First isolation of *Nocarida crassostreae* from Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Europe. Dis Aquat Organ, 80: 229–234. https://doi.org/10.3354/dao01938.

Fan, X., Zhang, Z., Li, Z. y Zhang, X.H. (2014). *Luteococcus sediminum* sp. nov., isolated from deep subseafloor sediment of the South Pacific Gyre. Int J Syst Evol Microbiol, 64: 2522–2527. https://doi.org/10.1099/ijs.0.058529-0.

FAO (2008). Glossary of Aquaculture. FAO Fisheries and Aquaculture Departmennt.

FAO-FIGIS (2019). Fisheries Global Information System (FIGIS). Foos and Agriculture Organization of the United Nations. FAO Fisheries and Aquaculture Department. Institutional websites.

Farley, C.A., Banfield, W.G., Kasnic, G. y Foster, W.S. (1972). Oyster *Herpes*-Type Virus. Science, 178: 159-760. https://doi.org/10.1126/science.178.4062.759.

Felsenstein, J. (2005). PHYLIP (Phylogeny Inference Package), version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, WA. http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html

Fernández-Piquer, J., Bowman, J.P., Ross, T. y Tamplin, M.L. (2012). Molecular analysis of the bacterial communities in the live pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the influence of postharvest temperature on its structure. Appl Microbiol, 112: 1134–1143. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05287.x.

Figueras, A., Robledo, J.A.F. y Novoa, B. (1992). Occurrence of *Haplosporidium* and *Perkinsus*-like infections in carpet-shell clams, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) of the Ría of Vigo (Galicia, NW Spain). J Shell Res, 11: 377-382.

Figueras, A., Robledo, J.A.F. y Novoa, B. (1996). Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes decussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. J Shellfish Res, 15: 363–368.

Fischer-Piette E. y Métivier B. (1971). Revision des *Tapetinae* (Molusques Bivalves). Mém. Mus. Nat. d′ Histoire Naturelle, Serie A, Zoologie, 71: 1–106.

Ford, S.E. y Tripp M.R. (1996). Diseases and defense mechanisms. In: Kennedy, V.S., Newell, R.I.E. y Eble, A.F. (Eds) The Eastern oyster *Crassostrea virginica*. College Park. MD: Maryland Sea Grant College, pp 581–660.

Ford, S.E. y Borrero, F.J. (2001). Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the easter oyster, *Crassostrea virginica*. J Invertebr Pathol, 78: 141-154. https://doi.org/10.1006/jipa.2001.5052

Fournier, P.E. y Raoult, D. (2009) Current knowledge on phylogeny and taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann. N. Y.* Acad. Sci, 1166: 1–11. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04528.x.

Friedman C.S., Beattie, J.H., Elston, R.A.y Hedrick, R.P. (1991a). Investigation of the relationship between the presence of a Gram-positive bacterial infection and summer mortality of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* Thumberg. Aquacult 94: 1-15. https://doi.org/10.1016/0044-8486(91)90124-P.

Friedman, C.S., Beaman, B.L., Chun, J., Goodfellow, M., Gee, A., Hedrick, R.P. (1998) *Nocardia crassostreae* sp. nov., the causal agent of nocardiosis in Pacific oysters. Int J Syst Bacteriol, 48: 237–246. https://doi.org/10.1099/00207713-48-1-237.

Fujita, T., Matsubara, T., Hirokawa, H. y Araki, F. (1953) On the inflammatorious changes of the *Ostrea gigas* in Hiroshima Bay. Bull. Jpn Soc Fish Sci, 19: 766– 770.

Fujita, T., Matsubara, T., Hirokawa, H. y Araki, F. (1955) On the inflammatorious changes of the *Ostrea gigas* in Hiroshima Bay II. Bull. Jpn Soc Fish Sci, 20: 1063– 1065.

Gardner, G.R., Harshbarger, J.C., Lake, J.L., Sawyer, T.K., Price, K.L., Stephenson, M.D., Haaker, P.L. y Togstad, H.A. (1995). Association of prokaryotes with symptomatic appearance of withering syndrome in black abalone *Haliotis cracherodii*. J Invertebr Pathol, 66: 111–120. https://doi.org/10.1006/jipa.1995.1072.

Garland, C.D., Nash, G.V., Sumner, C.E. y Mcmeekin, T.A. (1983). Bacterial pathogens of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in a Tasmanian hatchery. Aust J Mar Fresw Res, 34: 483-487.

Garnier, M., Labreuche, Y., García, C., Robert, M. y Nicolas, J. L. (2007). Evidence for the involvement of pathogenic bacteria in summer mortalities of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Microbiol. Ecol, 53: 187-196. https://doi.org/10.1007/s00248-006-9061-9

Gay, M., Berthe, F.C.J. y Le Roux, F. (2004). Screening of *Vibrio* isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster *Crassostrea gigas.* Dis Aquat Org, 59: 49-56. https://doi.org/10.3354/dao059049.

Gay, M., Renault, T., Pons, A.M. y Le Roux, F. (2004). Two *Vibrio splendidus* related strains collaborate to kill *Crassostrea gigas*: taxonomy and host alterations. Dis Aquat Org, 62: 65-74. https://doi.org/10.3354/dao062065.

Gibson, L.F., Woodworth, J. y George, A.M. (1998). Probiotic activity of *Aeromonas* media on the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, when challenged with *Vibrio tubiashii*. Aquacult, 169: 111-120. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00369-X.

Giovannoni, S.J., Tripp, H.J., Givan, S., Podar, M., Vergin, K.L., Baptista, D., Bibbs, L., Eads, J., Richardson, T.H., Noordewier, M., Rappé, M.S., Short, J.M., Carrington, J.C. y Mathur, E.J. (2005). Genome streamlining in a cosmopolitan oceanic bacterium. Science, 309: 1242–1245. https://doi.org/10.1126/science.1114057.

Gofás, S., Moreno, D. y Salas, C. (coords)(2011). Moluscos marinos de Andalucía: II. Clase Gastropoda (Heterobranchia), clase *Bivalvia*, clase *Scaphopoda*, clase *Cephalopoda*, glosario e índices. Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad de Málaga, Málaga. 12: 343-798.

Gómez-Gil, B., Soto-Rodríguez, S., García-Gasca, A., Roque, A., Vázquez-Juárez, A. y Swings, J. (2004). Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. Microbiology, 150: 1769-1777. https://doi.org/10.1099/mic.0.26797-0.

Gómez-León, J., Villamil, L., Lemos, M.L. y Novoa, B. (2005). Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. Appl Environ Microbiol, 71: 98-104. https://doi.org 10.1128/AEM.71.1.98-104.2005

Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P. y Tiedje, J.M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. Int J Syst Evol Microbiol, 57: 81-91. https://doi.org 10.1099/ijs.0.64483-0.

Gosling, E. (2003). Morpholofy of bivalves. In Gosling, E (Ed) Bivalve Molluscs: biology, ecology and culture. Fishing News Books, a division of Blackwell Publishing Editorial, pp 7-39..

Grassé, P.P. (1976). Zoología. Tomo 1. Invertebrados. Ed. Masson.

Green T.J. y Barnes A.C. (2010) Bacterial diversity of the digestive gland of Sydney rock oysters, *Saccostrea glomerata* infected with the paramyxean parasite*, Marteilia Sydney*. Appl Microbiol, 109: 613–622. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04687.x.

Green, B.D. y Keller, M. (2006). Capturing the uncultivated majority. Curr Opin Biotech 17: 236-240. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.004.

Guía del Cultivo de Almeja en Criadero - Huelva. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (2013). 1-21 p. Formato digital (e-book) - (Cultivos Marinos y Recursos Pesqueros).

Guillard, R.R.L. (1959). Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. The Biological Bulletin, 117: 258-266. https://doi.org/10.2307/1538905

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. y Tesler, G. (2013). QUAST: Quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics, 29: 1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086.

Hamaguchi, M., Suzuki, N., Usuki, H. y Ishioka, H. (1998). *Perkinsus* protozoan infection in Manila clam *Tapes* (*Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. Fish Pathol, 33: 473–480. https://doi.org/10.3147/jsfp.33.473.

Harris, J.M. (1993). The presence, nature, and role of gut microflora in aquatic invertebrates: a synthesis. Microb Ecol, 25: 195–231. https://doi.org/10.1007/BF00171889

Harshbarger, J.C., Chang, S.C. y Otto, S.V. (1977). *Chlamydiae* (with phages), *Mycoplasmas*, and *Rickettsiae* in Chesapeake bay bivalves. Science, 196: 666–668. https://doi.org/10.1126/science.193184.

Hatha, A.A. M., Christi, K.S., Singh, R. y Kumar, S. (2005). Bacteriology of the freshwater bivalve clam *Batissa violacea* (Kai) sold in the Suva market. The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences, 23: 48–50. https://doi.org/10.1071/sp05009.

Henz, S.R., Huson, D.H., Auch, A.F., Nieselt-Struwe, K. y Schuster, S.C. (2005). Whole-genome prokaryotic phylogeny. Bioinformatics, 21: 2329–2335. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth324.

Hine, P.M. y Diggles, B.K. (2002). Prokaryote infections in the New Zealand scallops *Pecten novaezelandiae* and *Chlamys delicatula*. Dis Aquat Org, 50: 137-144. https://doi.org/10.3354/dao050137.

Hine, P., Wesney, B. y Hay, B. (2007). Herpesviruses associated with mortalities among hatchery-reared larval Pacific oysters *Crassostrea gigas*. Diseases of Aquatic Organisms, 12: 135-142. https://doi.org/10.3354/dao012135

Hsieh, C.Y., Tung, M.C., Tu, C., Chang, C.D. y Tsai, S.S. (2006). Enzootics of visceral granulomas associated with *Francisella*-like organism infection in tilapia (*Oreochromis* spp.). Aquacult, 254: 129-138. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.03.044

Hugh, R., y Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J Bacteriol, 66: 24–26.

Hurtado, N.S., Pérez-García, C., Morán, P. y Pasantes, J.J. (2011). Genetic and cytological evidence of hybridization between native *Ruditapes decussatus* and introduced *Ruditapes philippinarum* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae) in NW Spain. Aquacult, 311: 123–128. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.12.015.

Huse, S.M., Dethlefsen, L., Huber, J.A., Welch, D.M., Relman, D.A., Sogin, M.L. (2008). Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable Tag sequencing. PLoS one Genet. 4: e1000255. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000255.

Itoh, N., Momoyama, K. y Ogawa, K. (2005). First report of three protozoan parasites (a haplosporidian, *Marteilia* sp. and *Marteilioides* sp.) from the Manila clam, *Venerupis* (=*Ruditapes*) *philippinarum* in Japan. Journal of Invertebrate Pathology, 88: 201–206. https://doi.org/10.1016/J.JIP.2004.12.001.

Ivanova, E.P., Alexeeva, Y.V., Flavier, S., Wright, J.P., Zhukova, N.V., Gorshkova, N.M., Mikhailov, V.V., Nicolau, D.V. y Christen, R. (2004). *Formosa algae* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Flavobacteriaceae*. Int J Syst Evol Microbiol, 54: 705–711. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02763-0.

Iwai, K., Aisaka, K. y Suzuki, M. (2010). *Friedmanniella luteola* sp. nov., *Friedmanniella lucida* sp. nov., *Friedmanniella okinawensis* sp. nov. and *Friedmanniella sagamiharensis* sp. nov., isolated from spiders. Int J Syst Evol Microbiol, 60: 113-120. https://doi.org/10.1099/ijs.0.67036-0.

Izard, D., Gavini, F., Trinel, P.A. y Leclere, H. (1979). *Rahnella aquatilis*, nouveau membre de la famille des Enterobacteriaceae. Ann Biol, 130: 163–177.

Jang, Y., Oh, H., Kim, H., Kang, I. y Cho, J. (2011). Genome Sequence of Strain IMCC1989 , a Novel Member of the Marine Gammaproteobacteria Genome Sequence of Strain IMCC1989, a Novel Member of the Marine Gammaproteobacteria. J Bacteriol, 193: 3672-3674. https://doi.org/10.1128/JB.05202-11.

Jeffery, K.R., Stone, D., Feist, S.W. y Verner-Jeffreys, D.W. (2010). An outbreak of disease caused by *Francisella* sp. in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* at a recirculation fish farm in the UK. Dis Aquat Organ, 91: 161-165. https://doi.org/10.3354/dao02260

Jensen, S., Duperron, S., Birkeland, N.K. y Hovland, M. (2010). Intracellular *Oceanospirillales* bacteria inhabit gills of *Acesta* bivalves. FEMS Microbiol Ecol, 74: 523–533. https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00981.x.

Jones, J.B., Bondad-Reantaso, M.G., McGladdery, S.E. y Berthe, F.C.J. (2007). Review of pearl oyster mortalities and disease problems. Pearl Oyster Health Management: *FAO fisheries technical paper*. pp, 61–70. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1609.1604.

Juanes, J.A., Bidegain, G., Echavarri-Erasun, B., Puente, A., García, A., García, A., Bárcena, J.F., Álvarez, C. y García-Castillo, G. (2012). Differential distribution pattern of native *Ruditapes decussatus* and introduced *Ruditapes phillippinarum* clam populations in the Bay of Santander (Gulf of Biscay): Considerations for fisheries management. Ocean Coast Manage, 69: 316–326. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2012.08.007.

Jung, S.Y., Kim, H.S., Song, J.J., Lee, S.G., Oh, T.K. y Yoon, J.H. (2007). *Aestuariimicrobium kwangyangense* gen. nov., sp nov., an LL-diaminopimelic acid-containing bacterium isolated from tidal flat sediment. Int J Syst Evol Microbiol, 57: 2114-2118. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64917-0.

Kaas, R.S., Friis, C., Ussery, D.W. y Aarestrup, F.M. (2012). Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes. BMC Genomics, 13: 577. https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-577.

Kamaishi, T., Miwa, S., Goto, E., Matsuyama, T. y Oseko, N. (2010). Mass mortality of giant abalone *Haliotis gigantea* caused by a *Francisella* sp. bacterium. Dis Aquat Organ, 89: 145–154. https://doi.org/10.3354/dao02188.

Katkansky, S.C. y Warner, R.W. (1974) Pacific Oyster Disease and Mortality Studies in California. California Department of Fish and Game, Marine Resources Technical, report 25.

Kent, M.L. (1982). Characteristic and indentification of *Pasteurella* and Vibrios species pathofenic to fishes using API–20E (Analytab Products) multitube test strips. Can . J. Fish Aquat SCI, 39: 1725–1729

Kesarcodi-Watson, A., Miner, P., Nicolas, J. L. y Robert, R. (2012). Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). Aquacult, 344–349: 29–34 https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2012.02.029.

Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J Mo Evol, 16: 111-120

King, G.M., Judd, C., Kuske, C.R. y Smith, C. (2012). Analysis of Stomach and Gut Microbiomes of the Eastern Oyster (*Crassostrea virginica*) from Coastal Louisiana, USA. PLoS one, 7: e51475. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051475.

King, W. L., Siboni, N., Williams, N. L. R., Kahlke, T., Nguyen, K.V., Jenkins, C., Dove, M., O´Connor, W., Seymour, J.R. y Labbate, M. (2019). Variability in the composition of pacific oyster microbiomes across oyster families exhibiting different levels of susceptibility to OsHV-1 ɀ var disease. Front Microbiol, 10: 473. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00473.

Kiran, G. S., Sabarathnam, B., Thajuddin, N. y Selvin, J. (2014). Production of glycolipid biosurfactant from sponge-associated marine actinobacterium *Brachybacterium paraconglomeratum* MSA21. J Surfact Deterg, 17: 531-542. https://doi.org/10.1007/s11743-014-1564-7.

Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M. y Glõckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. Nucleic Acids Res, 41: 1–11. https://doi.org/10.1093/nar/gks808.

Kloos, W.E. y Musselwhite, M.S. (1975). Distribution and persistence of Staphylococcus and Micrococcus species and other aerobic bacteria on human skin. Appl Microbiol, 30: 381-5.

Koganezawa, A. (1975) Present status of studies on the mass mortality of cultured oysters in Japan and its prevention. Proc 3rd U.S.-Japan Meeting on Aquaculture, Tokyo. 29–34.

Konstantinidis, K.T. y Tiedje, J.M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. Proc Natl Acad Sci U S A, 102: 2567-2572; https://doi.org/10.1073/pnas.0409727102.

Kottmann, R., Gray, T., Murphy, S., Kagan, L., Kravitz, S., Lombardot, T., Field, D. y Glõckner, F. O. (2008). A standard MIGS/MIMS compliant XML schema: Toward the development of the Genomic Contextual Data Markup Language (GCDML). OMICS, 12: 115-121 https://doi.org/10.1089/omi.2008.0A10.

Kovacs, N (1956). Identification of *Pseudomonas pyogenes* by the oxidase reactions. Nature 178: 703. https://doi.org/10.1038/178703a0

Kristensen, D.M., Kannan, L., Coleman, M.K., Wolf, Y.I., Sorokin, A., Koonin, E.V. y Mushegian, A. (2010). A low-polynomial algorithm for assembling clusters of orthologous groups from intergenomic symmetric best matches. Bioinformatics, 26: 1481-1487. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq229.

Kueh, C.S.W. y Chan, K. (1985). Bacteria in bivalve shellfish with special reference to the oyster. J Appl Bacteriol, 59: 41–47 https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1985.tb01773.x.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol, 33: 1870-1874

Lacoste, A.F., Jalabert, S., Malham, A., Cueff, F., Gelebart, C., Cordevant, M., Lange, S. y Poulet. A. (2001) A *Vibrio splendidus* strain is associated with summer mortality of juvenile oysters *Crassostrea gigas* in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis Aquat Organ, 46: 139-145. https://doi.org/10.3354/dao046139.

Lamb, R.W., Smith, F., Aued, A.W., Salinas-de-León, P., Suárez, J., Gómez-Chiarri, M, Smolowitz, R., Giray, C. y Witman, J.D. (2018). El Niño drives a widespread ulcerative skin disease outbreak in Galapagos marine fishes. Sci Rep, 8: 16602. https://doi.org/10.1038/s41598-018-34929-z.

Lambert, C., Nicolas, J.L., Cilia, V. y Corre, S. (1998). *Vibrio pectenicida* sp. nov., a pathogen of scallop (*Pecten maximus*) larvae. Int J Syst Bacteriol, 48: 481–487. https://doi.org/10.1099/00207713-48-2-481.

Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., López, R-, Thompson, J.D., Gibson, T.J. y Higgins, D.G. (2007). CLUSTAL W and CLUSTAL X version 2.0. Bioinformatics 23: 2947–2948. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404.

Lasa, A. y Romalde, J. L. (2017). Genome sequence of three *Psychrobacter* sp. strains with potential applications in bioremediation. Genom Data, 12: 7-10 https://doi.org/10.1016/j.gdata.2017.01.005.

Lasa, A., di Cesare, A., Tassistro, G., Borello, A., Gualdi, S., Furones, D., Carrasco, N., Cheslett, D., Brechon, A., Paillard, C., Pernet, L., Canesi, L., Edomi, P., Pallavicini, A., Pruzzo, C. y Vezzulli, L. (2019). Dynamics of the Pacific oyster pathobiota during mortality episodes in Europe assessed by 16S rRNA gene profiling and a new target enrichment next-generation sequencing strategy. Environ Microbiol, https://doi.org/10.1111/1462-2920.14750.

Lasa, A., Mira, A., Camelo-Castillo, A., Belda-Ferre, P. y Romalde, J. L. (2016). Characterization of the microbiota associated to *Pecten maximus* gonads using 454-pyrosequencing. Int Microbiol, 19: 93-99. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.267.

Lauckner, G. (1983). Diseases of Mollusca: Bivalvia. In: Kinne, O (Eds.). Diseases of Marine Animals Biologishe Anstalt Helgoland Hamburg, pp 477-963.

Lazado, C.C. y Caipang, C.M. (2014b). Bacterial viability differentially influences the immunomodulatory capabilities of potential host-derived probiotics in the intestinal epithelial cells of Atlantic cod *Gadus morhua*. J Appl Microbiol, 116: 990-998. https://doi.org/10.1111/jam.12414.

Lazado, C.C. y Caipang C.M.A. (2014a). Mucosal immunity and probiotics in fish. Fish Shellfish Immunol. 39: 78-89. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.04.015

Le Deuff, R.M., Nicolas, J.L., Renault, T. y Cochennec, N. (1994). Experimental transmission of a *Herpes*-like virus to axenic larvae of Pacific oyster, *Crassostrea gigas.* Bull Eur Ass Fish Pathol 14: 69.

Lee C.K., Barbier B.A., Bottos E.M., McDonald I.R., Cary S.C. y Barbier B.A. (2012). The inter-valley soil comparative survey: the ecology of dry valley edaphic microbial communities. ISME J, 6: 1046–1057. https://doi.org/10.1038/ismej.2011.170

Lee, I., Kim, Y.O., Park, S.C. y Chun, J. (2016). OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity. Int J Syst Evol Microbiol 66: 1100-1103. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000760.

Lee, M.-K., Cho, B.-Y., Lee, S.-J., Kang, J.-Y., Jeong, H.Do, Huh, S.H. y Huh, M.-D. (2001). Histopathological lesions of Manila clam, *Tapes philippinarum*, from Hadong and Namhae coastal areas of Korea. Aquacult, 201: 199–209. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00648-2.

Lee, M., Taylor, G.T., Bricelj, V.M., Ford, S.E. y Zahn, S. (1996). Evaluation of *Vibrio* spp. and microplankton blooms as causative agents of Juvenile Oyster Disease in *Crassostrea virginica* (Gme-lin). J Shellfish Res, 15: 319 –329.

Leite, L., Jude-Lemeilleur, F., Raymond, N., Henriques, I., Garabetian, F. y Alves, A. (2017). Phylogenetic diversity and functional characterization of the Manila clam microbiota: a

culture-based approach. Environ Sci Pollut R, 24: 21721-21732. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9838-z.

Leiva, S., Alvarado, P., Huang, Y., Wang, J. y Garrido, I. (2015). Diversity of pigmented Gram-positive bacteria associated with marine macroalgae from Antarctica. FEMS Microbiol Lett. 362: fnv20. https://doi.org/10.1093/femsle/fnv206.

Lemos, M.L., Toranzo, A.E. y Barja, J.L. (1985). Modified medium oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. Appl Environ Microbiol, 49: 1541-1543.

Lewis, E.J., Farley, C. A., Small, E.B. y Baya, A.M. (1996). Asynopsis of juvenile oyster disease (JOD) experimental studies in *Crassostrea virginica*. Aquat Liv Res, 9: 169 – 178. https://doi.org/10.1051/alr:1996020.

Li, L., Stoeckert, C.J. y Roos, D. S. (2003). OrthoMCL: Identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. Genome Research, 13: 2178-89. https://doi.org/10.1101/gr.1224503.

Li, W. y Godzik, A. (2006). Cd-hit: A fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. Bioinformatics. 22: 1658–1659 https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl158.

Liang, W.F., Cui, L.Y., Cui, J.Y., Yu, K.W., Yang, S., Wang, T. M. y Xing, X.H. (2017). Biosensor-assisted transcriptional regulator engineering for *Methylobacterium extorquens* AM1 to improve mevalonate synthesis by increasing the acetyl-CoA supply. Metab Eng, 39: 159-168. https://doi.org/10.1016/j.ymben.2016.11.010.

Lily, M.K., Bahuguna, A., Bhatt, K.K. y Dangwal, K. (2013). Degradation of Anthracene by a novel strain Brachybacterium paraconglomeratum BMIT637C (MTCC 9445). Int J Environ Sci, 3: 1242. https://doi.org/10.6088/ijes.2013030400003.

Liu, Z., DeSantis, T.Z., Andersen, G.L., Knight, R. (2008). Accurate taxonomy assignments from 16S rRNA sequences produced by highly parallel pyrosequencers. Nucleic Acids Res, 36: e120. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkn491.

Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D. y Knight, R. (2007). Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. Nucleic Acids Res, 35: e120. http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkm541.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. y Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. J Biomed Biotechnol, https://doi.org/10.1155/2012/251364.

Liu, X.Y., Wang, B.J., Jiang, C.Y. y Liu, S.J. (2007). *Micrococcus flavus* sp. nov., isolated from activated sludge in a bioreactor. Int J Syst Evol Microbiol, 57: 66–69. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64489-0.

Lodeiros, C., Bolinches, J., Dopazo, C.P. y Toranzo, A.E. (1987). Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. Aquacult, 65: 15-29. https://doi.org/10.1016/0044-8486(87)90267-5.

Lodeiros, C., Freites, L., Fernández, E., Vélez, A. y Bastardo, J. (1989). Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia de la vieira *Pecten ziczac* infectadas con el germen *Vibrio anguillarum*. Bol INst Oceanogr. Venerxuela Univ Oriente, 28: 165-169.

Loggans, D.E., Biesiot, P.M. y Wang, S.Y. (2006) Gut microbial communities in the estuarine bivalves *Geukensia demissa* and *Crassostrea virginica*. Integr Comp Biol, 46: E223.

Lokmer, A. y Wegner, K.M (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. ISME Journal, 9: 670–682. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.160.

Lokmer, A., Kuenzel, S., Baines, J. F. y Wegner, K.M. (2016). The role of tissue-specific microbiota in initial establishment success of Pacific oysters. Environ Microbiol, 18: 970–987. https://doi.org/10.1111/1462-2920.13163.

Longeon, A., Peduzzi, J., Barthélemy, M., Corre, S., Nicolas, J. L. y Guyot, M. (2004). Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium *Pseudoalteromonas* species strain X153. Mari Biotechnol 6: 633-41 https://doi.org/10.1007/s10126-004-3009-1.

Lovelace, T.E., Tubiash, H. y Colwell, R.R. (1968). Quantitative and qualitative commensal bacterial flora of *Crassostrea virginica* in Chesapeake Bay. Proc Nat Shellfish Ass, 58: 82-94.

Lũ, A.J., Wang, R.X., Hu, X.C., Sun, J.F., Li, L., Pei, C., Zhang C., Nie, G.X. (2017). First report of *Rahnella aquatilis* infection in crucian carp *Carassius auratus* in China. Dis Aquat Organ, 123: 205-212. https://doi.org/10.3354/dao03099.

Luna-González A., Maeda-Martínez A.N., Sainz J.C. y Ascencio-Valle F. (2002). Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. Dis Aquat Organ, 49: 221–226. https://doi.org/10.3354/dao049221.

MacFaddin, J.F. (1993). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica (Translation by Médica Panamericana S.A.), Baltimore, MD: Williams & Wilkins (in Spanish).

Maeno, Y., Yoshinaga, T. y Nakajima, K. (1999). Occurrence of *Perkinsus* species (Protozoa, Apicomplexa) from Manila clam *Tapes philippinarum* in Japan. Fish Pathol, 34: 127–131. https://doi.org/10.3147/jsfp.34.127.

Maes, C. y Paillard, C. (1992). Effect du Vibrio P1, pathogène de *Ruditapes philippinarum*, sur dáutres espèces de bivalves. Les Mollusques marins, Biologie et Aquaculture. Ifremer, Actes de Colloques 14: 141-148.

Maloy, A.P., Ford, S.E., Karney, R.C. y Boettcher, K.J. (2007). *Roseovarius crassostreae*, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as *Roseovarius* Oyster Disease) in *Crassostrea virginica*. Aquacult, 269: 71-83. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.04.008.

Mann, A.J., Hahnke, R. L., Huang, S., Werner, J., Xing, P., Barbeyron, T., Huettel, B., Stũber, K., Reinhardt, R., Harder, J., Glõckner, F.O., Amann R.I. y Teeling, H. (2013). The genome of the alga-associated marine flavobacterium *Formosa agariphila* KMM 3901T reveals a broad potential for degradation of algal polysaccharides. Appl Environ Microbiol, 79: 6813–6822. https://doi.org/10.1128/AEM.01937-13.

Manso, C.F., Díaz, S., Carballal, M.J., Villalba, A. y Romalde, J.L. (2012). Detection of reverse transcriptase activity in golden carpet shell clams (*Venerupis aurea*) with disseminated neoplasia. Bull Eur Ass Fish Pathol, 32: 56-63.

Matsuyama, H., Kawasaki, K., Yumoto, I. y Shida, O. (1999). *Microbacterium* kitamiense sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from the wastewater of a sugar-beet factory. Int J Syst Evol Microbiol, 49: 1353-1357. https://doi.org/10.1099/00207713-49-4-1353.

Matsuyama, T., Sakai, T., Kiryu, I., Yuasa, K., Yasunobu, H., Kawamura, Y. y Sano, M. (2010). First Isolation of Vibrio tapetis, the Etiological Agent of Brown Ring Disease (BRD), in Manila Clam Ruditapes philippinarum in Japan. Fish Pathology, 45: 77–79. https://doi.org/10.3147/jsfp.45.77.

Mauel, M.J., Soto, E., Moralis, J.A. y Hawke, J. (2007). A Piscirickettsiosis-like syndrome in cultured Nile tilapia in Latin America with *Francisella* spp. as the pathogenic agent. J Aquat Anim Health, 19: 27-24. https://doi.org/10.1577/H06-025.1

McHenery, J.G. y Birkbeck, T.H. (1985). Uptake and processing of cultured microorganisms by bivalves. J Exp Mar Biol Ecol, 90: 145–163. https://doi.org/10.1016/0022-0981(85)90116-9.

Meier-Kolthoff, J. P., Auch, A. F., Klenk, H. P. y Gõker, M. (2013). Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. BMC Bioinformatics 14: 60. https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-60.

Meisterhans, G., Raymond, N., Girault, E., Lambert, C., Bourrasseau, L., de Montaudouin, X., Garabetian, F. y Jude-Lemeilleur, F. (2016). Structure of Manila Clam (*Ruditapes philippinarum*) Microbiota at the organ scale in contrasting sets of individuals. Microbial Ecology, 71: 194–206. https://doi.org/10.1007/s00248-015-0662-z.

Meyer, G.R., Lowe, G.J., Gilmore, S.R. y Bower, S.M. (2017). Disease and mortality among Yesso scallops *Patinopecten yessoensis* putatively caused by infection with Francisella halioticida. Dis Aquat Organ, 125: 79-84. https://doi.org/10.3354/dao03130.

Metzger, M.J., Villalba, A., Carballal, M.J., Iglesias, D., Sherry, J., Reinisch, C., Muttray, A.F., Baldwin, S.A. y Goff, S.P. (2016). Widespread transmission of independent cancer lineages within multiple bivalve species. *Nature*, 534: 705-709. https://goi.org/10.1038/nature18599.

Milan, M., Carraro, L., Fariselli, P., Martino, M. E., Cavalieri, D., Vitali, F., Boffo, L., Patarnello, T., Bargelloni, L. Y Cardazzo, B. (2018). Microbiota and environmental stress: how pollution affects microbial communities in Manila clams. Aquat Toxicol, 94: 195-207. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.11.019.

Montalvo, N.F., Mohamed, N.M., Enticknap, J.J. y Hill, R.T. (2005). Novel Actinobacteria from marine sponges. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol, 87: 29-36. https://doi.org/10.1007/s10482-004-6536-x.

Montes, J.F., Durfort, M. y Garcia-Valero, J. (2001). Parasitism by the protozoan Perkinsus atlanticus favours the development of opportunistic infections. Dis Aquat Org, 46: 57-66. https://doi.org/10.3354/dao046057.

Montilla, R., Palomar, J., Fusté, M. C. y Viñas, M. (1995). Taxonomy and protein fingerprinting of halophilic *Vibrio* isolates from bivalves of the Ebre delta. Can J Microbiol, 41:64-9. https://doi.org/10.1139/m95-008.

Moore, J.D., Robbins, T.T. y Friedman, C.S. (2000). The role of a *Rickettsia*-like prokaryote in withering syndrome in California red abalone, *Haliotis rufescens.* J Shellfish Res, 19: 525–526.

Morey, M., Fernández-Marmiesse, A., Castiñeiras, D., Fraga, J. M., Couce, M. L. y Cocho, J.A. (2013). A glimpse into past, present, and future DNA sequencing. Mol Genet Metab, 110: 3-24. https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2013.04.024.

Morrison, C. y Shum, G. (1982). *Chlamydia*-like organisms in the digestive diverticula of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lmk). J Fish Dis, 5: 173-184. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1982.tb00472.

Morrison, C y Shum, G. (1983). *Rickettsias* in the kidney of the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck). J Fish Dis, 6: 537–541. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1983.tb00108.x.

Morrow, K.M., Moss, A.G., Chadwick, N.E. y Liles, M.R. (2012). Bacterial associates of two caribbean coral species reveal species-specific distribution and geographic variability. Appl Environ Microbiol, 78: 6438–6449. https://doi.org/10.1128/AEM.01162-12.

Morrow, K.M., Bourne, D.G., Humphrey, C, Botté, E.S., Laffy, P. Zaneveld, J.R., Uthicke, S., Fabricius, K.E. y Webster, N.S. (2015). Natural volcanic CO2 seeps reveal future trajectories for host-microbial associations in corals and sponges. ISME J. 2015. https://doi.org/10.1038/ismej.2014.188.

Murchelano, R.A. y Brown, C. (1970) Heterotrophic bacteria in Long Island Sound. Mar. Biol, 7: 1–6.

Najiah, M., Nadirah, M., Lee, K.L., Lee, S.W., Wendy, W., Ruhil, H.H. y Nurul, F.A. (2008) Bacteria flora and heavy metals in cultivated oysters *Crassostrea iredalei* of Setiu Wetland,East Coast Peninsular Malaysia. Vet Res Commun, 32: 377-81. https://doi.org/10.1007/s11259-008-9045-y.

Nam, K.-W., Jeung, H.-D., Song, J.-H., Park, K.-H., Choi, K.-S. y Park, K.-I. (2018). High parasite burden increases the surfacing and mortality of the Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) in intertidal sandy mudflats on the west coast of Korea during hot summer. Parasites Vectors, 11: 42. https://doi.org/10.1186/s13071-018-2620-3.

Navas, J. I., Castillo, M. C., Vera, P. y Ruiz-Rico, M. (1992). Principal parasites observed in clams, *Ruditapes decussatus* (L.), *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve), *Venerupis pullastra* (Montagu) and *Venerupis aureus* (Gmelin), from the Huelva coast (S.W. Spain). Aquacult, 107: 193-199 https://doi.org/10.1016/0044-8486(92)90067-U.

Neave, M.J., Apprill, A., Ferrier-Pagès, C. y Voolstra, C. R. (2016). Diversity and function of prevalent symbiotic marine bacteria in the genus *Endozoicomonas*. Appl Microbiol Biotechnol, 100: 8315–8324. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7777-0.

Neave, M.J., Rachmawati, R., Xun, L., Michell, C.T., Bourne, D.G., Apprill, A. y Voolstra, C.R. (2017). Differential specificity between closely related corals and abundant Endozoicomonas endosymbionts across global scales. ISME Journal 11: 186-200. https://doi.org/10.1038/ismej.2016.95.

Nedashkovskaya, O.I., Kim, S.B., Vancanneyt, M., Snauwaert, C., Lysenko, A.M., Rohde, M., Frolova, G.M., Zhukova, N.V., Mikhailov, V.V., Bae, K.S., Oh, H.W. y Swings, J. (2006). *Formosa agariphila* sp. nov., a budding bacterium of the family *Flavobacteriaceae* isolated from marine environments, and emended description of the genus *Formosa*. Int J Syst Evol Microbiol, 56: 161–167. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63875-0.

Nerlovi, C.V., Korlevi, C.M. y Mravinac, B. (2016). Morphological and molecular differences between the invasive bivalve *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) and the native species *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) from the northeastern Adriatic Sea. J Shellfish Res, 35: 1–9. https://doi.org/10.2983/035.035.0100.

Newell, R.I.E. (2004). Ecosystem influences of natural and cultivated populations of suspension feeding Bivalve Mollusc: a review. J Shellfish Res, 23, 51-61. https://doi.org/10.2983/035.029.0302.

Nithyanand, P., Indhumathi, T., Ravi, A.V. y Pandian, S.K. (2011). Culture independent characterization of bacteria associated with the mucus of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. World J Microbiol Biotechno, 27: 1399–1406. https://doi.org/10.1007/s11274-010-0591-4.

Norton, J.H., Shepherd, M.A., Abdon-Naguit, M.R. y Lindsay, S. (1993a). Mortalities in the giant clam *Hippopus hippopus* associated with *Rickettsiales*-like organisms. J Invertebr Pathol, 62: 207–209. https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1100.

Norton, J.H., Shepherd, M.A. y Prior H.C. (1993b). Intracellular bacteria associated with winter mortality in juvenile giant clams, *Tridacna gigas*. J Invertebr Pathol, 62: 204–206. https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1099.

Novoa, B., Luque, A., Castro, D., Borrego, J. J. y Figueras, A. (1998). Characterization and infectivity of four bacterial strains isolated from brown ring disease-affected clams. J Invertebr Pathol, 71: 34-41 https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4704.

Novoa, B. y Figueras, A. (2000). Virus-like particles associated with mortalities of the carpet-shell clam Ruditapes decussatus. Dis Aquat Organ. https://doi.org/doi:10.3354/dao039147.

Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A.A., Korobeynikov, A., Lapidus, A. y Pevzner, P.A. (2013). Assembling single-cell genomes and mini-metagenomes from chimeric MDA products. J Comput Biol, 20: 714-37. https://doi.org/10.1089/cmb.2013.0084.

Nylund, A., Ottem, K.F., Watanabe, K., Karlsbakk, E. y Krossøy, B. (2006). *Francisella* sp. (Family *Francisellaceae*) causing mortality in Norwegian cod (*Gadus morhua*) farming. Arch Microbiol, 185: 383-392. https://doi.org/10.1007/s00203-006-0109-5.

Nzoughet, J.K., Grant, I.R., Prodõhl, P.A., Hamilton, J.T.G., Botana, L.M. y Elliott, C.T. (2011). Evidence of *Methylobacterium* spp. and *Hyphomicrobium* sp. in azaspiracid toxin contaminated mussel tissues and assessment of the effect of azaspiracid on their growth. Toxicon, 58: 619-622 https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.09.012.

Ojea, J., Pazos, A.J., Martınez, D., Novoa, S., Sánchez, J.L. y Abad, M. (2004). Seasonal variation in weight and biochemical composition of the tissues of *Ruditapes decussatus* in relation to the gametogenic cycle. Aquacult, 238: 451–468. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.05.022.

Ojea (2013). Estudio del desarrollo gametogénico de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linné, 1758) en el medio natural y optimización de las condiciones del acondicionamiento en criadero. Tesis doctoral.Universidad de Santiago. Santiago de Compostela, España.

Oksanen, J.F., Blanchet, G., Friendly, F., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Szoecs, E. y Wagner,

E. (2017). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.4-5. https://CRAN.R-project.org/package=vegan.

Olsen, A.B., Mikalsen, J., Rode, M., Alfjorden, A., Hoel, E., Straum-Lie, K., Haldorsen R. y Colquhoun, D.J. (2006). A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. J Fish Dis, 29: 307-311. https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00714.x.

Oprandy, J.J. y Chang, P.W. (1983). 5-Bromodeoxyuridine induction of hematopoietic neoplasia and retrovirus activation in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. J Invertebr Pathol, 42: 196-206 https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90062-9.

Oprandy, J.J., Chang, P.W., Pronovost, A.D., Cooper, K.R., Brown, R.S. y Yates, V.J. (1981). Isolation of a viral agent causing hematopoietic neoplasia in the soft-shell clam, *Mya arenaria*. J Invertebr Pathol, 38: 45-51. https://doi.org/10.1016/0022-2011(81)90033-1.

Overbeek, R., Fonstein, M., D'Souza, M., Pusch, G.D. y Maltsev, N. (1999). Use of contiguity on the chromosome to predict functional coupling. In Silico Biol, 1: 93-108.

Page K.A., Connon, S.A. y Giovannoni, S.J. (2004). Representative freshwater bacterioplankton isolated from Crater Lake, Oregon. Appl Environ Microbiolm, 70: 6542–6550. https://doi.org/doi:10.1128/AEM.70.11.6542-6550.2004.

Paillard C., Ashton-Alcox, K. y Ford, S.E. (1996). Changes in bacterial densities and hemocyte parameters in oysters affected by Juvenile Oyster Disease. Aquat. Living Resour, 9: 145-158.

Paillard, C. (2004). A short review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. Aquatic Living Resources, 17: 467–475. https://doi.org/10.1051/alr:2004053

Paillard, C. y Maes, P. (1994). The brown ring disease symptom in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*: establishment of a classification system. Diseases of Aquatic Organisms, 19: 137–146. https://doi.org/10.3354/dao019137.

Paillard, C., Le Roux, F. y Borrego, J.J. (2004). Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. Aquatic Living Resour, 17: 477–498. https://doi.org/10.1051/alr:2004054.

Paillard, C., Korsnes, K., Le Chevalier, P., Le Boulay, C., Harkestad, L., Eriksen, A.G., *et al.* (2009). *Vibrio tapetis*-like strain isolated from introduced Manila clams *Ruditapes philippinarum* showing symptoms of brown ring disease in Norway. Dis Aquat Org, 81: 153–161. http://doi.or/10.3354/dao01950.

Paillard, C. y Maes, P. (1990). Etiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: Pathogenicite d'un *Vibrio* sp. C.R. Acad. Sci.Paris, 310: 15–20.

Paillard, C., Maes, P., Mazurié, J., Claude, S., Marhic, A. y Le Pennec, M. (1997). Epidemiological survey of the brown ring disease in clams of Atlantic coast: role of temperature in variation of prevalence. Eighth Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics. (ISVEE'97). AEEMA Publications, Paris, July 8–11. Paris, France, pp. 14.03.11-14.03.13.

Park, K.Il y Choi, K.S. (2001). Spatial distribution of the protozoan parasite *Perkinsus* sp. found in the Manila clams, *Ruditapes philippinarum*, in Korea. Aquacult, 203: 9-22 https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00619-6.

Park, K.-I., Paillard, C., Le Chevalier, P. y Choi, K.-S. (2006). Report on the occurrence of brown ring disease (BRD) in Manila clam, *Ruditapes philippinarum*, on the west coast of Korea. Aquacult, 255: 610–613. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.12.011.

Park, M.S., Chun, S.K. (1989). Study on *Marteilioides chungmuensis*. Comps et al., 1986 parasite of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Thunberg. J. Fish Pathol. 2: 53–70.

Park, S., Lee, J.S., Lee, K.C. y Yoon, J.H. (2013). *Formosa undariae* sp. nov., isolated from a reservoir containing the brown algae *Undaria pinnatifida*. Int J Syst Evol Microbiol, 63 4130–4135. https://doi.org/10.1099/ijs.0.053157-0.

Park, S., Park, J.M., Kang, C.H. y Yoon, J.H. (2015). *Aliiroseovarius pelagivivens* gen. nov., sp. nov., isolated from seawater, and reclassification of three species of the genus

Roseovarius as *Aliiroseovarius crassostreae* comb. nov., *Aliiroseovarius halocynthiae* comb. nov. and *aliiroseovarius sediminilitori*. Int J Syst Evol Microbiol, 65: 2646–2652. https://doi.org/10.1099/ijs.0.000315.

Pepi, M., Gaggi, C., Bernardini, E., Focardi, S., Lobianco, A., Ruta, M., Nicolardi, V., Volterrani, M., Gasperini, S., Trinchera, G., Renzi, P., Gabellini, M. y Focardi, S. E. (2011). Mercury-resistant bacterial strains *Pseudomonas* and *Psychrobacter* spp. isolated from sediments of Orbetello Lagoon (Italy) and their possible use in bioremediation processes. Int Biodeter and Biodegr, 65: 85-91. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.09.006.

Pichot, Y., Comps, M., Tige, G., Grizel, H. y Rabouin M.A. (1980). Recherches sur *Bonamia ostreae* gen. n., sp. n., parasite nouveau de l'huître plate *Ostrea edulis* L. Rev Trav Inst Peches Marit, 43: 131–140.

Prado, S. (2006). Microbiota asociada a criaderos de moluscos patogénesis y probiosis. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

Prado, S,. Montes, J., Romalde, J.L. y Barja, J.L. (2009). Inhibitory activity of *Phaeobacter* strains against aquaculture pathogenic bacteria. Int Microbiol, 12: 107-14. https://doi.org/10.2436/20.1501.01.87.

Prado, S., Dubert, J., Romalde, J.L., Toranzo, A.E. y Barja, J.L. (2014). *Vibrio ostreicida* sp. nov., a new pathogen of bivalve larvae. Int J Syst Evol Microbiol, 64: 1641–1646.

Prado, S., Romalde, J.L., Montes, J. y Barja, J.L. (2005). Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of *Vibrio neptunius* as an oyster pathogen. Dis Aquat Organ, 67: 209-215 https://doi.org/10.3354/dao067209.

Prieur, D., Mével, G., Nicolas, J.L., Plusquellec, A. y Vigneulle, M. (1990). Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment Oceanogr Mar Biol. Annu. Rev, 28: 277-352.

Pujalte, M.J., Ortigosa, M., Macian, M.C.Y. y Garay, E. (1999) Aerobic and facultative anaerobic heterotrophic bacteria associated to Mediterranean oysters and seawater. Int Microbiol, 2: 259–266.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. y Glõckner, F.O. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. Nucleic Acids Res, 41: 590–596 https://doi.org/10.1093/nar/gks1219.

Quéro, J.C. y Vayne, J.J. (1998) Les fruits de la mer et les plantes marines des pêches françaises. Delachaux et Niestlé / Ifremer.

Quinn, O., Gruber, M.A.M., Brown, R.L., Baty, J.W., Bulgarella, M. y Lester, P.J. (2018). A metatranscriptomic analysis of diseased social wasps (*Vespula vulgaris*) for pathogens, with an experimental infection of larvae and nests. *PLoS one*, 13: e0209589. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209589.

Rajagolapan, L.P.D. y Sivalingan, P.M. (1978). Bacteria flora of a great mussel (*Mytilus viridis* Linnaeus) and naturally occurring rock oyster (*Cassotrea cuculata*). Mar Appl Biol 7: 43-47.

Ramilo, A., Carrasco, N., Reece, K.S., Valencia, J.M., Grau, A., Aceituno, P., Rojas, M., Gairin, I., Furones, M.D., Abollo, P. y Villalba, A. (2015). Update of information on perkinsosis in NW Mediterranean coast: Identification of *Perkinsus* spp. (Protista) in new locations and hosts. J Invertebr Path. 125: 37-41. https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.12.008.

Rappé, M.S., Connon, S.A., Vergin, K.L. y Giovannoni, S.J. (2002) Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature*, 418: 630–633 https://doi.org/10.1038/nature00917.

Renault, T., Stokes, N.A., Chollet, B., Cochennec, N., Berthe, F. y Burreson, E.M. (2000). Haplosporidiosis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, from the French Atlantic coast. Diseaded Aquatic Organisms, 42: 207-214. https://doi.org/ 10.3354/dao042207.

Renault, T. y Arzul, I. (2001)c. Herpes-like virus infections in hatchery-reared bivalve larvae in Europe: Specific viral DNA detection by PCR. J Fish Dis. 24: 161-167. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00282.x.

Renault, T. y Cochennec, N. (1994). *Rickettsia*-like Organisms in the Cytoplasm of Gill Epithelial Cells of the Pacific Oyster *Crassostrea gigas*. J Invertebr Path, 64: 160–162. https://doi.org/10.1006/jipa.1994.1090.

Renault, T. y Novoa, B. (2004). Viruses infecting bivalve molluscs. Aquat Living Resour, 17: 397-409. https://doi.org/10.1051/alr:2004049.

Renault, T. y Cochennec, N. (1994) *Rickettsia*-like organisms in the cytoplasm of gill epithelial cells of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. J Invertebr Path, 64: 160–162. https://doi.org/10.1006/jipa.1994.1090.

Renault, T., Lipart, C. y Arzul, I. (2001 A). A herpes-like virus infects a non-ostreid bivalve species: Virus replication in *Ruditapes philippinarum* larvae. Dis Aquat Organ, 45: 1-7. https://doi.org/10.3354/dao045001.

Renault, T., Lipart, C. y Arzul, I. (2001 B). A herpes-like virus infecting *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum* larvae in France. J Fish Dis, 24: 369-276. https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2001.00300.x.

Richter, M. y Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. P Natl Acad Sci USA, 106(45): 19126-31. https://doi.org/10.1073/pnas.0906412106.

Riquelme, C. E., Jorquera, M. A., Rojas, A. I., Avendaño, R. E. y Reyes, N. (2001). Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). Aquacult, 192: 111-119 https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00461-0.

Riquelme, C., Araya, R., Vergara, N., Rojas, A., Guaita, M. y Candia, M. (1997). Potential probiotic strains in the culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). Aquacult, 181: 25-36. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00043-4.

Riquelme, C., Hayashida, G., Araya, R., Uchida, A., Satomi, M. y Ishida, Y. (1996). Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic vibrios. J Shellfish Res, 15: 369-374.

Rizzo, C. y Lo Giudice, A. Lo. (2018). Marine invertebrates: Underexplored sources of bacteria producing biologically active molecules. Diversity, 10: 52. https://doi.org/10.3390/d10030052.

Rodríguez-moscoso, E., Pazó, J., García, A. y Fernández Cortés, F. (1992). Reproductive cycle of Manila clam, *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve 1850) in Ria of Vigo (NW Spain). Sci Mar, 98: 1645-1657. https://doi.org/10.1017/S0025315417001382

Rodríguez, F. y Navas, J.I. (1995). A comparison of gill and hemolymph assays for the thioglycollate diagnosis of *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa, Perkinsea) in clams, *Ruditapes decussatus* (L.) and *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve). Aquacult, 132: 145-152. https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)00393-3.

Rognes, T., Flouri, T., Nichols, B., Quince, C. y Mahé, F. (2016) VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. Peer J. https://doi.org/10.7717/peerj.2584.

Romalde, J.L. (2016). Oyster summer mortality: The example of multifactorial syndrome. In Romalde, J.L. (Eds.) Oyster and Clams. New York: Nova Science Publisher, pp 189-207.

Romalde, J. L., Diéguez, A. L., Doce, A., Lasa, A., Balboa, S., López, C. y Beaz- Hidalgo, R. (2013). Advances in the knowledge of the microbiota associated with clams from natural beds. In F. da Costa (Eds.) Clam Fisheries and Aquaculture. New York: Nova Science Publishers. 163-190.

Romalde, J. L., Diéguez, A. L., Lasa, A. y Balboa, S. (2014). New Vibrio species associated to molluscan microbiota: A review. Front Microbiol, 413: 1-11. https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00413.

Romalde, J. L., Luz Vilariño, M., Beaz, R., Rodríguez, J. M., Díaz, S., Villalba, A. y Carballal, M. J. (2007). Evidence of retroviral etiology for disseminated neoplasia in

cockles (*Cerastoderma edule*). J Invertebr Path, 94: 95-101. https://doi.org/10.1016/j.jip.2006.09.007.

Romalde, J.L., Toranzo, A.E. y Barja, J.L. (1990). Changes in bacterial populations during red tides caused by *Mesodinium rubrum* and *Gymnodinium catenatum* in North West coast of Spain. J Appl Bacteriol, 68: 123–132. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02556.x.

Romanenko L.A, Uchino M, Frolova G.M., Tanaka N., Kalinovskaya N.I., Latyshev N. y Mikhailov V.V.(2007). *Sphingomonas molluscorum* sp. nov., a novel marine isolate with antimicrobial activity. Int J Syst Evol Microbiol, 57: 358-363. https://doi.org/10.1099/ijs.0.64441-0.

Romanenko, L.A., Uchino, M., Kalinovskaya, N.I. y Mikhailov, V.V. (2008). Isolation, phylogenetic analysis and screening of marine mollusc-associated bacteria for antimicrobial, hemolytic and surface activities. Microbiol Res, 163: 633–644. https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.001.

Romero, X., Thurnbull J. F. y Jiménez R. (2000). Ultrastructure and cytopathology of a *Rickettsia*-like organism causing systemic infection in the red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Crustacea: Decapoda), in Ecuador. J Invertebr Path, 76: 95-104. https://doi.org/10.1006/jipa.2000.4952.

Roterman, Y. R., Benayahu, Y., Reshef, L. y Gophna, U. (2015). The gill microbiota of invasive and indigenous Spondylus oysters from the Mediterranean Sea and northern Red Sea. Env Microbiol Rep, 7: 860–867. https://doi.org/10.1111/1758-2229.12315.

Ruano, F., 1989. Agentes patogénicos da amêijoa boa (*Ruditapes decussatus*) em populações cultivadas no litoral Algarvio. Actas do Seminário Aquacultura em Portugal. Universidade do Algarve: 10p. Faro 18–20 de Janeiro de 1989.

Rubiolo, J.A., Lozano-Leon, A., Rodriguez-Souto, R., Fol Rodríguez, N., Vieytes, M.R. y Botana, L.M (2018). The impact of depuration on mussel hepatopancreas bacteriome composition and predicted metagenome. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 111: 1117-1129. https://doi.org/10.1007/s10482-018-1015-y.

Ruimy, R., Meziane-Cherif, D., Momcilovic, S., Arlet, G., Andremont, A. y Courvalin, P. (2010) RAHN-2, a chromosomal extended-spectrum class A β-lactamase from *Rahnella aquatilis*. J Antimicrob Chemothe, 65:1619–1623. https://doi.org/10.1093/jac/dkq178.

Ruiz, M., López, C., Lee, R.S., Rodríguez, R. y Darriba, S.A. (2016). Novel paramyxean parasite, *Marteilia octospora* n. sp. (Cercozoa) infecting the Grooved Razor Shell clam *Solen marginatus* from Galicia (NW Spain). J Invertebr Pathol, 135: 34-42. https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.02.002.

Ruiz-Ponte, C., Samain, J., Sánchez, J., y Nicolas, J. (1999). The benefit of a *Roseobacter* species on the survival of scallop larvae. Mar Biotechnol, 1: 52-59. https://dx.doi.org/10.1007/PL00011751.

Sabry, R.C., da Silva, P.M., Gesteira, T.C.V., Pontinha, V. de A. y Magalhȳes, A.R.M. (2011). Pathological study of oysters *Crassostrea gigas* from culture and *C. rhizophorae* from natural stock of Santa Catarina Island, SC, Brazil. Aquacult, 320: 43–50. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.08.006.

Sagristà, E., Durfort, M. y Azevado.C. (1996). Ultrastructural data on the life cycle of the parasite, *Perkinsus atlanticus* (Apicomplexa), on the clam, *Ruditapes philippinarum*, in the Mediterranean. Sci Mar, 60: 283-288.

Saitou, N. y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol, 4: 406–425.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. Nueva York.

Santiago-Vázquez, L.Z., Brũck, T.B., Brũck, W.M., Duque-Alarcón, A.P., McCarthy, P. J. y Kerr, R.G. (2007). The diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirrhipathes lutkeni*. ISME Journal, 1: 654–659. https://doi.org/10.1038/ismej.2007.77.

Santos, Y., Romalde, J.L., Bandín, I., Magariños, B., Núñez, S., Barja, J.L., Toranzo, A.E. (1993). Usefulness of the API–20E system for the identification of bacterial fish pathogens. Aquacult, 166: 11–120.

Satomi, M., Vogel, B.F., Gram, L. y Venkateswaran, K. (2006). *Shewanella hafniensis* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. Int J Syst Evol Micr, 56: 243-9. https://doi.org/10.1099/ijs.0.63931-0.

Saulnier, D., de Decker, S., Haffner, P., Cobret, L., Robert, M. y Garcia, C. (2010). A large-scale epidemiological study to identify bacteria pathogenic to Pacific Oyster *Crassostrea gigas* and correlation between virulence and metalloprotease-like activity. Microb Ecol, 59(4): 787–798. https://doi.org/10.1007/s00248-009-9620-y.

Schill, W.B., Iwanowicz, D. y Adams, C. (2017). *Endozoicomonas* dominates the gill and intestinal content microbiomes of *Mytilus edulis* from Barnegat Bay, New Jersey. J Shellfish Res, 36(2): 391-401. https://doi.org/10.2983/035.036.0212.

Scholz, C.F.P. y Kilian, M. (2016). The natural history of cutaneous Propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov. Int J Syst Evol Micr, 66: 4422–4432 https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001367.

Seguineau, C., Laschi-Loquerie, A., Moal, J. y Samain, J.F. (1996). Vitamin requirements in great scallop larvae. Aquacult Int, 4: 315–324. https://doi.org/10.1007/bf00120948.

Short, E. E., Caminade, C. y Thomas, B.N. (2017). Climate change contribution to the emergence or re-emergence of parasitic diseases. Infectious Diseases: Research and Treatment, 10: 1-7. https://doi.org/10.1177/1178633617732296.

Shtykova, Y.R., Sitnikova, T.Y., Kulakova, N.V., Sukhanova, E.V., Khanayev, I.V. y Parfenova, V.V. (2018). First reports on the bacterial community of the digestive system of endemic baikal gastropods *Benedictia baicalensis*. Microbiology (Russian Federation), 87: 825-832. https://doi.org/10.1134/S0026261718060140.

Smith, E.P., van Belle, G. (1984). Nonparametric estimation of species richness. Biometrics, 40:119-129.

Sohn, S., Lundgren, K.M., Tammi, K., Smolowitz, R., Nelson, D.R., Rowley, D.C. y Gómez-Chiarri, M. (2016). Efficacy of probiotics in preventing vibriosis in the larviculture of different species of bivalve shellfish. J Shellfish Res, 35: 319-328. https://doi.org/10.2983/035.035.0206.

Song, J., Oh, H.M. y Cho, J.C. (2008). Improved culturability of SAR11 strains in dilution-to-extinction culturing from the East Sea, West Pacific Ocean. FEMS Microbiol Lett; 295: 141-147. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01623.x.

Sowani, H., Kulkarni, M. y Zinjarde, S. (2018). An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species. Crit Rev Microbiol, 44: 393-413. https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1418286.

Srinivas, T.N., Singh., SM., Pradhan, S., Pratibha, M.S., Kishore K.H., Singh, A.K., Begum, Z., Prabagaran, S.R., Reddy, G.S. y Shivaji, S. (2011). Comparison of bacterial diversity in proglacial soil from Kafno Glacier, Himalayan Mountain ranges, India, with the bacterial diversity of other glaciers in the world. Extremophiles, 15: 673–690. https://doi.org/10.1007/s00792-011-0398-8.

Suffredini, E., Lanni, L., Arcangeli, G., Pepe, T., Mazzette, R., Ciccaglioni, G. y Groci, L. (2014). Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy. Int J Food Microbiol, 184: 21-6. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.026.

Sugawara, Y., Ueki, A., Abe, K., Kaku, N., Watanabe, K. y Ueki, K. (2011). *Propioniciclava tarda* gen. nov., sp. nov., isolated from a methanogenic reactor treating waste from cattle farms. Int J Syst Evol Micr, 61: 2298–2303. https://doi.org/10.1099/ijs.0.027482-0.

Sugita, H., Tanaami, H., Kobashi, T. y Deguchi, Y. (1981). Bacterial flora of coastal bivalves. B Jpn Soc Sci Fish, 47: 655-661. https://doi.org/10.2331/suisan.47.655.

Stingl, U., Cho, J.C., Foo, W., Vergin, K.L., Lanoil, B. y Giovannoni, S.J. (2008). Dilution-to-extinction culturing of psychrotolerant planktonic bacteria from permanently ice-covered lakes in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. Microb Ecol, 55: 395-405. https://doi.org/10.1007/s00248-007-9284-4.

Sun, J. y Wu, X. (2004). Histology, ultrastructure, and morphogenesis of a *Rickettsia*-like organism causing disease in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. J Invertebr Pathol, 86: 77–86. https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.04.004.

Sutton, D. C. y Garrick R. (1993). Bacterial disease of cultured giant clam *Tridacna gigas* larvae. Dis Aqua Organ, 16: 47-53. https://doi.org/10.3354/dao016047.

Svärd, L. (1999). Bacteria, granulocytomas, and trematode metacercariae in the digestive gland of *Mytilus edulis*: seasonal and interpopulation variation. J Invertebr Pathol, 74: 275-280. https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4880.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. Mol Biol Evol, 28: 2731-2739. https://doi.org/10.1093/molbev/msr121.

Tak, E.J., Kim, H.S., Lee, J.Y., Kang, W., Hyun, D.W., Kim, P.S., Shin, N.R. y Bae, J. W. (2018). *Tessaracoccus aquimaris* sp. nov., isolated from the intestine of a Korean rockfish, *Sebastes schlegelii*, from a marine aquaculture pond. Int J Syst Evol Micr, 68: 1065-1072. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002626.

Takeuchi, M. y Hatano, K. (1998). Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* ZoBell and Upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium maritypicum* comb. nov. Int J Syst Bacteriol, 48: 973-982. https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-973.

Tanaka, R., Ootsubo, M., Sawabe, T., Ezura, Y. y Tajima, K. (2004). Biodiversity and *in situ* abundance of gut microflora of abalone (*Haliotis discus hannai*) determined by culture-independent techniques. Aquacult, 241: 453–463. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.08.032.

Tanaka, R., Cleenwerck, I., Mizutani, Y., Iehata, S., Shibata, T., Miyake, H., Mori, T., Tamaru, Y., Ueda, M., Bossier, P. y Vandamme, P. (2015). *Formosa haliotis* sp. nov., a brown alga degrading bacterium isolated from the gut of the abalone haliotis gigantea. Int J Syst Evol Micr, 65: 4388-93. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000586.

Tang, R., Li, X., Mo, Y., Ma, Y., Ding, C., Wang, J., Zang, T. y Wang, X. (2019). Toxic responses of metabolites, organelles and gut microorganisms of *Eisenia fetida* in a soil with chromium contamination. Environ Pollut, 251: 910-920. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.069.

Tash, K. (2005). *Rahnella aquatilis* bacteremia from a suspected urinary source. J Clin Microbiol, 43: 2526–2528. https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2526-2528.2005.

Tettelin, H., Masignani, V., Cieslewicz, M. J., Donati, C., Medini, D., Ward, N. L., Angiuoli, S.V., Crabtree, J., Jones, A.L, Durkin, A.S, DeBoy, R.T., Davidsen, T.M., Mora, M., Scarselli, M., Margarit y Ros, I., Peterson, J.D., Hauser, C.R., Sundaram, J.P, Nelson, W.C, Madupu, R., Brinkac, L.M., Dodson, R.J, Rosovitz, M.J., Sullivan, S.A., Daugherty, S.C., Haft, D.H., Selengut, J., Gwinn, M.L., Zhou, L., Zafar, N., Khouri, H., Radune, D., Dimitrov, G., Watkins, K., O'Connor, K.J.B., Smith,S., Utterback, T.R., White, O., Rubens, C.E., Grandi, G., Madoff, L.C., Kasper, D.L., Telford, J.L., Wessels, M.R., Rappuoli, R., y Fraser, C.M. (2005). Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: Implications for the microbial "pan-genome." P Natl Acad Sci USA, 102: 13950-13955. https://doi.org/10.1073/pnas.0506758102.

Thomas, F., Hehemann, J.H., Rebuffet, E., Czjzek, M., y Michel, G. (2011). Environmental and gut *Bacteroidetes*: The food connection. Front Microbiol, 2: 93. https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093.

Thompson, C.C., Thompson, F.L., Vicente, A.C. y Swings, J. (2007). Phylogenetic analysis of vibrios and related species by means of *atp*A gene sequences. Int J Syst Evol Micr, 57: 2480-2484. https://doi.org/10.1099/ijs.0.65223-0.

Thompson, F.L., Li, Y., Gomez-Gil, B., Thompson, C.C., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Rupp, G.S., Pereira, A., De Bem, M.M., Sorgeloos, P. y Swings, J. (2003d). *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). Int J Syst Evol Micr, 53: 245-252. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02447-0.

Thompson, F.L., Thompson, C.C. y Swings, J. (2003a). *Vibrio tasmaniensis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Syst Appl Microbiol, 26: 65-69. https://doi.org/10.1078/072320203322337326.

Thompson, F.L., Thompson, C.C., Li, Y., Gomez- Gil, B., Vanderberghe, J., Hoste, B. y Swings, J. (2003b). *Vibrio kanaloae* sp. nov., *Vibrio pomeroyi* sp. nov. and *Vibrio chagasii* sp. nov., from sea water and marine animals. Int J Syst Evol Micr, 53: 753-759. https://doi.org/10.1099/ijs.0.02490-0.

Thompson, F.L., Thompson, C.C., Vicente, A.C., Theophilo, G.N.D., Hofer, E. y Swings, J. (2003c). Genomic diversity of clinical and environmental *Vibrio cholerae* strains isolated in Brazil between 1991 and 2001 as revealed by Fluorescent Amplified Length Polymorphism Analysis. J Clin Microbiol, 41: 1946-1950. https://doi.org/10.1128/jcm.41.5.1946-1950.2003.

Thongphrom, C., Kim, J.H., Bora, N., y Kim, W. (2017). *Tessaracoccus arenae* sp. nov., isolated from sea sand. Int J Syst Evol Micr, 67: 2008-2013. https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001907.

Trabal Fernández, N., Mazón-Suástegui, J. M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., & Romero, J. (2014). Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. FEMS Microbiol Ecol, 88: 69–83. https://doi.org/10.1111/1574-6941.12270.

Trabal Fernández, N., Mazón-Suástegui, J. M., Vázquez-Juárez, R., Ascencio-Valle, F., Morales-Bojórquez, E. y Romero J. (2012). Molecular analysis of bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea gigas and Crassostrea corteziensis*) in different

growth phases at two cultivation sites. Microb Ecol, 64: 555–569. https://doi.org/10.1007/s00248-012-0039-5.

Travers, M.A., Mersni Achour, R., Haffner, P., Tourbiez, D., Cassone, A. L., Morga, B., Doghri, I., Garcia, C., Renault, T., Fruitier-Arnaudin, I. y Salunier, D. (2014). First description of French *V. tubiashii* strains pathogenic to mollusk: I. Characterization of isolates and detection during mortality events. J Invertebr Pathol, 123: 38–48. https://doi.org/10.1016/j.jip.2014.04.009.

Tripp, H.J., Kitner, J.B., Schwalbach, M.S., Dacey, J.W.H., Wilhelm, L.J. y Giovannoni S.J. (2008). SAR11 marine bacteria require exogenous reduced sulphur for growth. Nature, 452: 741-744. https://doi.org/10.1038/nature06776.

Troy, E.B. y Kasper, D.L. (2010). Beneficial effects of *Bacteroides fragilis* polysaccharides on the immune system. Front Biosci, 15: 25–34. https://doi.org/10.2741/3603.

Tubiash, H.S., Chanley, P.E. y Leifson E. (1965). Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve molluscs I. Etiology and epizootiology. J Bacteriol, 90: 1036–1044.

Tubiash, H.S., Colwell, R.R. y Sayazaki, R. (1970). Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. J Bacteriol, 103: :271-2.

Tubiash, H.S, y Otto, S.V. (1986) Bacterial problems in oysters: A review. Pathology in Marine Aquaculture. In Vivarès, C.P., Bonami, J.R., y Jasper, E. (eds). Bredene, Belgium: European Aquaculture Society, Spec Publ, pp. 233–242.

Tuo, L., Pan, Z., Li, F.N., Lou, I., Guo, M., Lee, S.M., Chen, L., Hu, L. y Sun, C.H. (2016). *Friedmanniella endophytica* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from bark of Kandelia candel. Int J Syst Evol Microbiol, 66: 3057-62 https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001146.

Turgay, E., Steinum, T.M., Colquhoun, D. y Karataş, S. (2019). Environmental biofilm communities associated with early-stage common dentex (*Dentex dentex*) culture. J Appl Microbiol, 126: 1032-1043. https://doi.org/10.1111/jam.14205.

Van Dien, S.J., Okubo, Y., Hough, M.T., Korotkova, N., Taitano, T. y Lidstrom, M.E. (2003). Reconstruction of C3 and C4 metabolism in *Methylobacterium extorquens* AM1 using transposon mutagenesis. Microbiology, 149: 601–609. https://doi.org/10.1099/mic.0.25955-0.

Vanbelle, M., Teller, E. y Focant, M. (1990). Probiotics in animal nutrition: a review. Archiv Fũr Tierernãhrung, 40: 543-567. https://doi.org/10.1080/17450399009428406.

Velho-Pereira, S., Parvatkar, P. y Furtado, I.J. (2015). Evaluation of antioxidant producing potential of halophilic bacterial bionts from marine invertebrates. Indian J Pharm Sci, 77: 183-9.

Verschuere, L., Rombaut, G., Sorgeloos, P. y Verstraete, W. (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Molecul Biol Rev, 64: 655–671.

Vezzulli, L., Stagnaro, L., Grande, C., Tassistro, G., Canesi, L. y Pruzzo, C. (2017). Comparative 16SrDNA gene-based microbiota profiles of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) and the mediterranean mussel (*Mytilus galloprovincialis*) from a shellfish farm (Ligurian Sea, Italy). Microb Ecol, 75: 495-504. https://doi.org/10.1007/s00248-017-1051-6.

Villalba, A., Carballal, M.J., López, C., Cabada, A., Corral, L. Azevedo, C. (1999). Branchial *Rickettsia*-like infection associated with clam *Venerupis rhomboides* mortality. Dis. Aquat. Org. 36: 53-60. https://doi.org/10.3354/dao036053.

Villalba, A., Mourelle, S., López, M., Carballal, M. y Azevedo, C. (1993). Marteiliasis affecting cultured mussels *Mytilus galloprovincialis* of Galioa (NW Span). I. Etiology, chases of the infection, and temporal and spatial variability in prevalence. Dis Aquat Organ, 16: 61-71. https://doi.org/ 10.3354/dao016061.

Villalba, A., Casas, S.M., López, C. y Carballal, M.J. (2005). Study of perkinsosis in the carpet shell clam *Tapes decussatus* in Galicia (NW Spain). II. Temporal pattern of disease dynamics and associations with clam mortality. Dis Aquat Org, 65: 257-267. https://doi.org/10.3354/dao065257

Villalba, A., Iglesias, D., Ramilo, A., Darriba, S., Parada, J. M., No, E., Abollo, E., Molares, J. y Carballal, M.J. (2014). Cockle *Cerastoderma edule* fishery collapse in the Ría de Arousa (Galicia, nw spain) associated with the protistan parasite *Marteilia cochilli*. Dis Aquat Organ, 109: 55-80. https://doi.org/10.3354/dao02723.

Timp, W., Mirsaidov, U.M., Wang, D., Comer, J., Aksimentiev, A. y Timp G. (2010). Nanopore sequencing: electrical measurements of the code of life. IEEE Trans Nanotechnol, 9: 281-294. https://doi.org/10.1109/TNANO.2010.2044418

Waechter, M., Le Roux, F., Nicolas, J.L., Marissal, E., Berthe, F. (2002). Characterization of pathogenic bacteria of the cupped oyster *Crassostrea gigas*. C R Biol, 325: 231-238.

Wang, W., Zhong, R., Shan, D. y Shao Z. (2014). Indigenous oil-degrading bacteria in crude oil-contaminated seawater of the Yellow sea, China. Appl Microbiol Biotechnol, 98: 7253-69. https://doi.org/10.1007/s00253-014-5817-1.

Whittaker, R.H. (1960). Vegetation of the Siskiyou Mountains, Oregon and California. Ecol Monogr, 30: 280-338. https://doi.org/10.2307/1948435

Winters, A.D., Marsh, T.L. y Faisal, M. (2011). Heterogeneity of bacterial communities within the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the Laurentian Great Lakes Basin. J Great Lakes Res, 37: 318–324. https://doi.org/10.1016/j.jglr.2011.01.010

Wu, X. (2003a). *Rickettsiae* infection in farmed abalone, *Haliotis diversicolor* Reeve (Mollusca, Gastropoda) from the Daya Bay, Guangdong in China. Proceedings of the third World Fisheries Congress. Bethesda: Am Fish Soc Symp, 221.

Wu, X. y Pan, J. (1999). Studies on *Rickettsia*-like organism disease of the tropical marine pearl oyster I: The fine structure and morphogenesis of *Pinctada maxima* Pathogen *Rickettsia*-like organism. J Invertebr Pathol, 73: 162–172. https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4809.

Wu, X., Pan, J. (2000). An intracellular prokaryotic microorganism associated with lesions in the oyster, *Crassostrea ariakensis* Gould. J Fish Dis, 23: 409–414. http://doi.org/10.1046/j.1365-2761.2000.00243.x.

Wu, X., Li, D., Pan, J. y Jaing, J. (2003). Studies on *Rickettsia*-like organism (RLO) disease of tropical marine pearl oyster: epidemiological investigation of RLO disease in juvenile populations of maricultured *Pinctada maxima*. Acta Oceanol Sin, 22: 421–435-

Wu, X. y Pan, J. (1999). Studies on *Rickettsia*-like organism disease of the tropical marine pearl oyster I: the fine structure and morphogenesis of *Pinctada maxima* pathogen *Rickettsia*-like Organism. J Invertebr Pathol, 73: 162–172. https://doi.org/10.1006/jipa.1998.4809.

Yoon, B.J. y Oh, D.C. (2011). *Formosa spongicola* sp. nov., isolated from the marine sponge *Hymeniacidon flavia*. Int J Syst Evol Microbiol, 61: 330–333. https://doi.org/10.1099/ijs.0.023499-0

Yoon, J.H., Schumann, P., Kang, S.J., Lee, C.S., Lee, S.Y. y Oh, T.K. (2009). *Microbacterium insulae* sp. nov., isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol, 59: 1738–1742. https://doi.org/10.1099/ijs.0.007591-0.

Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo H y Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. Int J Syst Evol Microbiol, 67: 1613-1617.

Yoshida, S., Hiradate, S., Koitabashi, M., Kamo, T. y Tsushima, S. (2017). Phyllosphere *Methylobacterium* bacteria contain UVA-absorbing compounds. J Photoch Photobio B, 167: 168–175. https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.019.

Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. y Steward, G.F. (2003). Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. Environ Microbiol, 5: 539–554. https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00451.x.

Zeng, Y.X., Yu, Y., Li, H.R. y Luo, W. (2015). *Psychrobacter fjordensis* sp. nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Arctic fjord in Svalbard. *Antonie van Leeuwenhoek*. Int J Syst Evol Microbiol, 108: 1283–1292. https://doi.org/10.1007/s10482-015-0580-6.

Zhang, D.F., Wang, H.F., Xiong, Z.J., Tian, X.P., Liu, L., Zhang, X.M., Jiang, Z., Zhang, S. y Li, W.J. (2014). *Mariniluteicoccus flavus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Propionibacteriaceae*, isolated from a deep-sea sediment. Int J Syst Evol Microbiol, 64: 1051–1056. https://doi.org/10.1099/ijs.0.058404-0.

Zhang, J.Y., Liu, X.Y. y Liu, S.J. (2010). *Agrococcus terreus* sp. nov. and *Micrococcus terreus* sp. nov., isolated from forest soil. Int J Syst Evol Microbiol, 60: 1897–1903. https://doi.org/10.1099/ijs.0.013235-0

Zhao, G.Z., Li, J., Qin, S., Zhang, Y.Q., Zhu, W.Y., Jiang, C.L., XU, L.H. y Li, W.J. (2009). *Micrococcus yunnanensis* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from surface-sterilized *Polyspora axillaris* roots. Int J Syst Evol Microbiol, 59: 2383–2387. https://doi.org/10.1099/ijs.0.010256-0.

Zhou, J., Richlen, M.L., Sehein, T.R., Kulis, D.M., Anderson, D. M. y Cai, Z. (2018). Microbial community structure and associations during a marine dinoflagellate bloom. Front Microbiol, 9: 1201. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01201

Zhu, Z., Xu, T., He, Z., Wu, X., Wu, L., Meng, Q. y Huang, J. (2012). *Rickettsia*-like organism infection associated with mass mortalities of blood clam, *Tegillarca granosa*, in the Yueqing Bay in China. Acta Oceanol Sin, 31: 106–115. https://doi.org/10.1007/s13131-012-0182-3.

Ziegler, M., Seneca, F.O., Yum, L.K., Palumbi, S.R. y Voolstra, C.R. (2017). Bacterial community dynamics are linked to patterns of coral heat tolerance. Nat Commun, 8: 14213. https://doi.org/10.1038/ncomms14213

Zurel, D., Benayahu, Y., Kovacs, A. y Gophna, U. (2011). Composition and dynamics of the gill microbiota of an invasive Indo-Pacific oyster in the eastern Mediterranean Sea. Environ Microbiol, 13: 1467–1476. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02448.x.

10.
ANEXO I

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Tabla S1. Similitud e identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados de dilución a extinción de almeja japonesa de Carril.

Aislado	Longitud (pb)	Especie	%	Aislado	Longitud (pb)	Especie	%
CJA 1/10:				**CJA1/100:**			
CJA 1	1373	*Shewanella hafniensis*	99,12%	CJA11	1400	*Pseudomomnas hibiscicola*	99,64%
CJA 2	1357	*Pseudomonas psychrophila*	99,63%	CJA12	1385	*Acinetobacter lwoffii*	99,78%
CJA 3	1412	*Shewanella hafniensis*	99,36%	CJA13	1391	*Pseudomonas lurida*	99,71%
CJA 4	1305	*Pseudomonas yamanorum*	99,16%	CJA14	1284	*Brevundimonas vesicularis*	99,69%
CJA 5	1339	*Citrobacter europaeus*	93,11%	CJA15	1390	*Shewanella hafniensis*	99,39%
CJA 6	1390	*Areomonas molluscorum*	99,64%	CJA16	1374	*Micrococcus yunnanensis*	99,93%
CJA 7	1381	*Pseudomonas fragi*	99,78%	CJA17	1394	*Rahnella aquatilis*	99,64%
CJA 8	1391	*Aeromonas molluscorum*	99,64%	CJA19	1396	*Pseudomonas lurida*	99,50%
CJA 9	1408	*Rahnella victoriana*	99,85%	CJA20	1100	*Janthinobacterium lividum*	99,39%
CJA 10	1393	*Aeromonas molluscorum*	99,71%	CJA22	1376	*Micrococcus terreus*	99,69%
CJA 11	989	*Pseudomonas taetrolens*	98,07%	CJA23	1100	*Pseudomonas fragi*	99,73%
CJA 12	1378	*Janthinobacterium lividum*	99,42%	CJA24	1377	*Pseudomonas yamanorum*	99,93%
CJA 13	1411	*Shewanella hafniensis*	99,36%	CJA25	1376	*Micrococcus endophyticus*	99,93%
CJA1/100:				CJA26	1377	*Sphingobacterium nematocida*	93,93%
CJA2	1394	*Serratia plymuthica*	99,86%	CJA27	1383	*Stenotrophomonas maltophilia*	99,78%
CJA3	1314	*Micrococcus yunnanensis*	99,77%	CJA28	1393	*Stenotrophomonas maltophilia*	99,78%
CJA4	1327	*Brachybacterium paraconglomeratum*	99,85%	CJA30	1402	*Pseudomonas rhodesiae*	99,71%
CJA5	1340	*Microbacterium kitamiense*	99,85%	CJA31	1391	*Rahnella victoriana*	99,93%
CJA6	1297	*Micrococcus aloeverae*	99,85%	CJA32	1393	*Aeromonas molluscorum*	99,86%
CJA7	1376	*Pseudomonas rhodensiae*	99,78%	CJA33	1371	*Microbacterium paraoxidans*	100%
CJA10	1295	*Brevundimonas vesicularis*	99,61%				

C= Carril, J= almeja japonesa, 1/10= Agar Marino diluido 10 veces, 1/100= Agar Marino diluido 100 veces

Tabla S2. Similitud e identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados de los aislados de dilución a extinción de almeja fina de Carril.

Aislado	Longitud (pb)	Especie	%	Aislado	Longitud (pb)	Especie	%
CFA1/10:				**CFA1/100:**			
CFA1	1352	*Pseudomonas wihenstephanensis*	99,19%	CFA1	1402	*Pseudomonas rhodesiae*	99,71%
CFA2	1210	*Shewanella hafniensis*	98,42%	CFA3	1395	*Acinetobacter lwoffii*	99,71%
CFA3	1160	*Shewanella hafniensis*	97,06%	CFA4	1393	*Shewanella hafniensis*	98,55%
CFA4	944	*Pseudomonas umsongensis*	99,79%	CFA5	1334	*Dietzia cercidiphylli*	99,93%
CFA5	1190	*Brachybacterium paraconglomeratum*	99,58%	CFA6	1373	*Gordonia honkongensis*	100%
CFA6	1413	*Shewanella hafniensis*	99,50%	CFA7	1332	*Sphingomonas yunnanensis*	98,65%
CFA8	1392	*Shewanella hafniensis*	97,62%	CFA9	1300	*Brevundimonas vesicularis*	99,46%
CFA10	1366	*Brachybacterium rhamnosum*	100%	CFA10	1349	*Janibacter hoylei*	99,85
CFA11	1380	*Micrococcus yunnanensis*	99,86%	CFA11	1053	*Pseudomonas fluorescens*	96,54%
CFA12	1378	*Pseudomonas psychrophila*	99,78%	CFA12	1373	*Micrococcus flavus*	99,49%
CFA13	1388	*Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*	100%	CFA13	1363	*Gordonia hongkongensis*	99,41%
CFA14	1410	*Rahnella aquatilis*	98,94%	CFA14	1398	*Acinetobacter lwoffii*	99,71%
CFA15	1371	*Aeromonas salmonicida* subsp *salmonicida*	100%	CFA16	1395	*Acinetobacter lwoffii*	97,71%
				CFA17	1380	*Micrococcus aloeverae*	99,93%
				CFA18	1400	*Pseudomonas rhodesiae*	99,79
				CFA19	1389	*Lelliottia amnigena*	98,70%
				CFA21	1375	*Gordonia hongkongensis*	100%
				CFA22	1386	*Pseudomonas rhodesiae*	99,78%
				CFA24	1371	*Microbacterium aurantiacum*	99,56%
				CFA26	1379	*Pseudomonas helmanticensis*	99,35%
				CFA27	1381	*Microbacterium insulae*	99,13%

1/10= Agar Marino diluido 10 veces, 1/100= Agar Marino diluido 100 veces.

Tabla S3. . Similitud e identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados de dilución a extinción de almeja japonesa de Redondela.

Aislado	Longitud (pb)	Especie	%	Aislado	Longitud (pb)	Especie	%
RJA1/10:				**RJA1/100:**			
RJA 1	1385	*Pseudomonas psychrophila*	99,86%	RJA 1	1391	*Pseudomonas baetica*	98,92%
RJA 2	1394	*Rahnella victoriana*	99,78%	RJA 2	1389	*Serratia fonticola*	99,78%
RJA 3	1388	*Pseudomonas migulae*	99,13%	RJA 3	1386	*Pseudomonas rhodesiae*	99,86%
RJA 4	1344	*Rahnella victoriana*	99,54%	RJA 4	1389	*Pseudomonas psychrophila*	99,86%
RJA 5	1387	*Pseudomonas gessardii*	98,9%	RJA 5	1381	*Micrococcus aloeverae*	99,93%
RJA 6	1401	*Shewanella hafniensis*	99%	RJA 6	1387	*Pseudomonas migulae*	99,06%
RJA 7	1391	*Yersinia bercovieri*	99,71%	RJA 7	1379	*Pseudomonas psychrophila*	99,85%
RJA 8	1172	*Pseudomonas deceptionensis*	99,48%	RJA 8	1384	*Pseudomonas migulae*	99,06%
RJA 9	1228	*Shewanella baltica*	98,69%	RJA9	1364	*Pseudomonas psychrophila*	99,78%
RJA 10	1174	*Serratia fonticola*	99,66%	RJA 10	1387	*Pseudomonas granadensis*	99,57%
RJA 12	1411	*Shewanella hafniensis*	99,08%	RJA 11	1398	*Pseudomonas baetica*	99,00%
RJA 13	1391	*Shewanella putrefaciens*	99,28%	RJA 12	1395	*Pseudomonas migulae*	99,07%
RJA 14	1371	*Micrococcus aloeverae*	99,85%	RJA 13	1396	*Pseudomonas rhodesiae*	100%
RJA 15	1373	*Micrococcus yunnanensis*	99,85%	RJA 14	1398	*Serratia fonticola*	99,79%
RJA 16	1402	*Shewanella hafniensis*	99%				
RJA 17	1390	*Pseudomonas fragi*	99,86%				

1/10= Agar Marino diluido 10 veces, 1/100= Agar Marino diluido 100 veces.

Tabla S4. Similitud e identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados de dilución a extinción de almeja fina de Redondela.

Aislado	Longitud (pb)	Especie	%	Aislado	Longitud (pb)	Especie	%
RFA1/10:				**RFA1/100:**			
RFA 1	1400	*Shewanella hafniensis*	99,64%	RFA 1	1392	*Rahnella aquatilis*	99,06%
RFA 2	1395	*Pseudomonas rhodesiae*	100%	RFA 2	1386	*Pseudomonas rhodesiae*	100%
RFA 3	1384	*Pseudomonas helmalticensis*	99,49%	RFA 3	1396	*Pseudomonas rhodesiae*	100%
RFA 4	1391	*Aeromonas molluscorum*	99,78%	RFA 4	1368	*Micrococcus yunnanensis*	99,93%
RFA 5	1392	*Serratia proteamaculans*	98,78%	RFA 5	1397	*Pseudomonas rhodesiae*	100%
RFA 6	1338	*Shewanella hafniensis*	99,21%	RFA 6	1394	*Rahnella victoriana*	99,85%
RFA 8	1402	*Shewanella hafniensis*	98,93%	RFA 7	1348	*Pseudomonas paralactis*	99,93%
RFA 9	1410	*Shewanella hafniensis*	98,94%	RFA 8	1384	*Pseudomonas migulae*	99,06%
RFA 10	1405	*Pseudomonas fragi*	99,57%	RFA9	1070	*Pseudomonas thivervalensis*	98,28%
RFA 11	1389	*Pseudomonas paralactis*	99,86%	RFA 10	1349	*Rahnella aquatilis*	99,04%
RFA 12	1420	*Shewanella hafniensis*	98,87%	RFA 12	1359	*Serratia proteamaculans*	99,34%
RFA 13	1392	*Shewanella putrefaciens*	99,21%	RFA 13	1393	*Pseudomonas rhodesiae*	100%
RFA 14	1414	*Shewanella hafniensis*	98,72%				
RFA 15	1390	*Pseudomonas helmanticensis*	99,50%				
RFA 16	1380	*Pseudomonas koreensis*	99,85%				

1/10= Agar Marino diluido 10 veces, 1/100= Agar Marino diluido 100 veces.

Tabla S5. Similitud e identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados de siembra directa de almeja fina de Redondela

Aislado	Longitud (pb)	Especie	%	Aislado	Longitud (pb)	Especie	%
RF:				RF 27	1373	*Bacillus aryabhattai*	100%
RF 2	1320	*Vibrio breogani*	99,92%	RF 29	1395	*Vibrio xuii*	99,57%
RF 3	1422	*Vibrio gigantis*	99,93%	RF 30	1386	*Acinetobacter johnsonii*	99,35%
RF 6	1337	*Vibrio lentus*	99,40%	RF 32	1398	*Vibrio hyugaensis*	99,42%
RF 7	1395	*Shewanella sairae*	99,71%	RF 33	1388	*Aliivibrio fischeri*	99,35%
RF 8	1393	*Shewanella aestuarii*	98,56%	RF 34	1370	*Vibrio atlanticus*	99,63%
RF 9	1418	*Aliivibrio fischeri*	99,93%	RF 35	1404	*Vibrio hyugaensis*	99,42%
RF 10	1394	*Vibrio gigantis*	100%	RF 37	1308	*Vibrio gigantis*	99,85%
RF 11	1150	*Shewanella electrodiphila*	98,61%	RF 38	1357	*Vibrio atlanticus*	99,93%
RF 12	1382	*Pseudoalteromonas distincta*	99,28%	RF 39	1395	*Vibrio hyugaensis*	99,42%
RF 13	1346	*Shewanella pneumatophori*	99,70%	RF 41	1394	*Vibrio atlanticus*	99,78%
RF 14	1410	*Bacillus hwajipoensis*	99,50%	RF 42	1377	*Vibtio atlanticus*	99,78%
RF 15	1398	*Vibrio neocaledonicus*	99,93%	RF 44	1370	*Vibrio aestuarianus*	97,62%
RF 16	1390	*Photobacterium swingsii*	99,06%	RF 49	1370	*Vibrio atlanticus*	99,93%
RF17	1365	*Vibrio toranzoniae*	99,93%	RF 50	1401	*Endozoicomonas gorgoniicola*	95,56%
RF19	1304	*Shewanella electrodiphila*	98,23%				
RF 21	1326	*Kiloniella spongiae*	99,70%				
RF 22	1416	*Vibrio hyugaensis*	99,93%				
RF 23	1313	*Aliiroseovarius crassostreae*	97,94%				
RF 24	1000	*Shewanella colwelliana*	99,70%				
RF 25	1385	*Dokdonia genika*	99,64%				
RF 26	1423	*Aliivibrio fischeri*	100%				
RF 28	1404	*Acinetobacter johnsonii*	99,24%				

Tabla S6. Similitud e identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados de siembra directa de almeja fina de Carril

Aislado	Longitud (pb)	Especie	%	Aislado	Longitud (pb)	Especie	%
CF:							
CF 1	1381	*Pseudoalteromonas tetraodonis*	99,93%	CF 17	1337	*Vibrio toranzoniae*	99,85%
CF 2	1380	*Vibrio toranzoniae*	99,78%	CF 18	1389	*Vibrio alginolyticus*	99,86%
CF 3	1392	*Pseudoalteromonas tetraodonis*	99,64%	CF 19	1400	*Shewanella electrodiphila*	98,85%
CF 4	1388	*Pseudoalteromonas hodoensis*	99,93%	CF 21	1378	*Vibrio kanaloae*	99,78%
CF 5	1361	*Pseudoalteromonas hodoensis*	100%	CF 23	1417	*Vibrio algynolyticus*	99,79%
CF 6	1397	*Vibrio gigantis*	99,93%				
CF 7	1401	*Vibrio pomeroyi*	100%				
CF 8	995	*Vibrio atlanticus*	99%				
CF 9	1405	*Vibrio pomeroyi*	99,86%				
CF 10	1401	*Vibrio neocaledonicus*	99,86%				
CF 11	1232	*Shewanela electrodiphila*	98,62%				
CF 12	1077	*Pseudoalteromonas issachekonii*	98,79%				
CF 13	1420	*Vibrio atlanticus*	99,93%				
CF 14	1410	*Bacillus hwajinpoensis*	99,50%				
CF 15	1398	*Vibrio neocaledonicus*	99,93%				
CF 16	1396	*Photobacterium swingsii*	99,86%				

Tabla S7. Similitud e identificación de las secuencias del gen ARNr 16S de los aislados de siembra directa de almeja japonesa de Carril

Aislado	Longitud (pb)	Especie	%	Aislado	Longitud (pb)	Especie	%
RJ:							
RJ 1	1099	*Vibrio renipiscarius*	96,47%	CJ 8	1421	*Vibrio crassostreae*	100%
RJ 2	1373	*Shewanella schlegeliana*	99,93%	CJ 9	1400	*Vibrio splendidus*	99,63%
RJ 3	1349	*Shewanella schlegeliana*	99,85%	CJ 10	1420	*Vibrio xuii*	99,57%
RJ 4	1396	*Vibrio xuii*	99,50%	CJ 11	1405	*Vibrio tasmaniensis*	97,64%
RJ 5	1356	*Pseudoalteromonas hodoensis*	99,10%	CJ 12	1382	*Shewanella colwelliana*	99,49%
RJ 6	1361	*Tenacibaculum ascidiaceicola*	99,85%	CJ 13	1390	*Shewanella colwelliana*	99,93%
RJ 7	1416	*Vibrio europaeus*	100%	CJ 14	1393	*Shewanella algidipiscicola*	99,93%
RJ 8	1401	*Pseudomonas libanensis*	99,71%	CJ 15	1383	*Pseudoalteromonas hodoensis*	99,86%
RJ 9	1389	*Vibrio gallaecicus*	97,26%	CJ 16	1400	*Photobacterium lutimaris*	99,36%
RJ 10	1420	*Vibrio xuii*	99,57%	CJ 17	1389	*Bacillus weihenstephanensis*	100%
RJ 11	1409	*Vibrio gigantis*	100%	CJ 18	1343	*Vibrio gigantis*	99,93%
RJ 12	1317	*Aliiroseovarius pelagivivens*	97,87%	CJ 19	1424	*Vibrio gigantis*	99,79%
RJ 13	1373	*Cellulophaga lytica*	99,71%	CJ 20	1401	*Bacillus hwajinpoensis*	99,57%
CJ:				CJ 22	1419	*Vibrio atlanticus*	99,93%
CJ 1	1397	*Pseudoalteromonas hodoensis*	98,91%	CJ 23	1423	*Vibrio splendidus*	99,78%
CJ 2	1387	*Pseudoalteromonas hodoensis*	99,93%	CJ 24	1421	*Vibrio tasmaniensis*	99,81%
CJ 3	1373	*Pseudoalteromonas hodoensis*	99,84%	CJ 25	1425	*Vibrio splendidus*	99,78%
CJ 5	1125	*Pseudoalteromonas tetradonis*	100%	CJ 27	1257	*Vibrio atlanticus*	99,76%
CJ 6	1396	*Pseudoalteromonas hodoensis*	99,93%	CJ 28	1365	*Pseudoalteromonas carrageenovora*	99,12%
CJ 7	1401	*Vibrio pomeroyi*	100%				