USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA USC

Beatriz
Santos Torres

Tesis doctoral

Tenacibaculum maritimum: estudio epidemiológico y de la base genética del proceso infeccioso en peces marinos

Santiago de Compostela, 2022

PD en Avances en Biología Microbiana y Parasitaria

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TESIS DE DOCTORADO

TENACIBACULUM MARITIMUM: ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO Y DE LA BASE GENÉTICA DEL PROCESO INFECCIOSO EN PECES MARINOS

Beatriz Santos Torres

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA MICROBIANA Y PARASITARIA

SANTIAGO DE COMPOSTELA

2022

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DECLARACIÓN DEL AUTOR/A DE LA TESIS

D./Dña. **Beatriz Santos Torres**

Título de la tesis: ***Tenacibaculum maritimum*: estudio epidemiológico y de la base genética del proceso infeccioso en peces marinos.**

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) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
3) Confirmo que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.
4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En **Santiago de Compostela**, **25 de enero de 2022**.

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS

D./Dña. **Beatriz Magariños Ferro**

En condición de: **Tutor/a y director/a**

Título de la tesis: ***Tenacibaculum maritimum*: estudio epidemiológico y de la base genética del proceso infeccioso en peces marinos.**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por Dña **Beatriz Santos Torres**, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En **Santiago de Compostela**, **25 de enero de 2022**

Firma electrónica

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con los proyectos AGL2015-63569-R y RTI2018-093634-B-C21 de la Agencia Estatal de Investigación (AEI) de España, ambos cofinanciados con el Programa FEDER de la Unión Europea.

Asimismo, el Grupo de Investigación de Patología en Acuicultura de la USC recibió financiación del Programa de Consolidación e Estruturación 2018 de la Xunta de Galicia (ED431C 2018/18).

La autora disfrutó de un Contrato Predoctoral co-financiado por el Fondo Social Europeo y por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (BES-2016-077313)







UNIÓN EUROPEA
Fondo Europeo de
Desarrollo Regional (FEDER)
Una manera de hacer Europa



XUNTA
DE GALICIA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

“Comienza de nuevo. Cada
vez que fracases empieza otra
vez y te harás más fuerte hasta
que finalmente logres tu
propósito”
Anne Sullivan

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Aún no me creo que haya llegado el momento de escribir los agradecimientos. No pensaba que fuera a ser lo último que escribiría, ni lo que más me iba a costar, porque resumir estos años en pocas líneas, con una pandemia de por medio, se queda pequeño en comparación con todo lo que he aprendido y vivido.

En primer lugar, quiero dar las gracias a mi directora de tesis, la Dra Beatriz Magariños, que, sin conocerme de nada, siendo una TFM más, confió en mí y me dio la oportunidad de formar parte de este grupo. Gracias por acoger a una "forastera madrileña" y preocuparte de mí como si de una hija más se tratara, aunque en ocasiones te haya hecho perder los nervios. Gracias por tu paciencia, por tu cercanía y por los buenos momentos que hemos pasado juntas, que pesan mucho más que los malos.

A la Dra Alicia Toranzo, por ser para mí una referencia y un orgullo decir que trabajo en su Grupo de Investigación y por tener ese humor tan parecido al mío y que tan pocos entienden. Me has enseñado que, incluso siendo un referente en el mundo de la investigación, nunca hay que perder la humildad.

Al Dr Jesús Romalde, que, aunque no haya formado parte de su laboratorio, gracias por dejarme formar parte de este Departamento, por los momentos vividos en los congresos y los cafés compartidos.

A Dr Juan Barja, ojalá tener siempre esas ganas de aprender y esa curiosidad por todo que nos transmites cada día. Gracias por arreglar cualquier cosa que se rompe (tus llamados TFS), por traerme desde una placa sembrada hasta un recorte de periódico sobre cualquier curiosidad, por las "operaciones centolla" y por los "¿cómo vas, Flanagan?" de estos últimos meses. Y sobre todo por tu temple, porque sin tu mediación, este laboratorio sería una locura.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A Celsa, por ser imprescindible en este laboratorio. Sin tu trabajo no sabríamos ni por dónde empezar a hacer nada. No te agradecemos lo suficiente lo que haces por nosotros y lo afortunados que somos de tenerte, siempre además con una buena cara para todo y nunca un "no" por respuesta.

A Berta, por hacerme FMM en sus múltiples variantes y todo lo que le pides, sin tener por qué hacerlo, parte de esta tesis es tuya, por facilitarme tanto el trabajo. Y lo más importante, por hacer de psicóloga de todo el laboratorio. Lo que tienes que escuchar y los buenos consejos que das, no están pagados!

Al Dr Miguel Balado, por ayudarme y corregirme una parte de esta tesis. A Sol, que recién salidos del máster o carrera, nos pone en nuestro sitio a la vez que nos enseña, y por su cercanía y cariño.

A todos los compañeros de trabajo que han formado parte de este viaje. Menudas risas que nos hemos echado en los congresos, de cañas y en el laboratorio!. Noe… ai Noe! Me acogiste como a una amiga más desde mi TFM. Has sido mi segunda jefa, la persona que me ha enseñado a manejarme en un laboratorio, mi compañera de risas y de interminables charlas. Ana y Sabela, las personas a las que acudía con cualquier tipo de duda, y no dudaban en ponerse conmigo y enseñarme todo lo que sabían, amén de las risas en las horas de comer hablando y arreglando el mundo. Aide, la primera persona que me enseñó a cacharrear en el laboratorio y que siempre está ahí para escucharte y para ayudarte con lo que sea, siendo hater y ser de luz a partes iguales. Javi, gracias por echarme una mano con los experimentos y por hacerme volver a recuperar la ilusión por la investigación. Diego, que, aunque me bautizaste como "Espeonza" y casi quemas el laboratorio, nunca me he reído tanto en laboratorio como contigo. Quique, el único que me sentó y tuvo el valor de decirme: "no hagas la tesis, huye", y convirtió el asustarme en su hobby favorito. Miguel, por enseñarme a abrir ostras y por esas charlas interminables hablando de deporte. Alberto, por ser tan cercano y por conectar desde el primer momento conmigo. A Marta, David, Clara y Sergio, gracias por las risas y las charlas en los cafés, que me han ayudado a despejar la cabeza. Pilar, gracias por este

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

último año y medio, por ser mi apoyo y mi confidente y mi madrileña de confianza, que, a lo tonto, vamos poblando el laboratorio. Estoy segura de que llegarás lejos. Rubén, nos hemos metido aquí sin ser nada de eso nosotros. Gracias por aguantarme en el labo y ahora en la distancia, por entendernos sólo hablando con memes, y por comprenderme tan bien y apoyarnos mutuamente en esta etapa. Se que de aquí me llevo un amigo.

A mis amigos de Madrid, en especial a Valle, Yle y Miriam, mis titis, que, aunque estemos desperdigadas por el mundo, es como si no pasase el tiempo. A mis amigos de Portosín, mi otra familia desde pequeñita, gracias por hacer que se pare el tiempo cada vez que nos juntamos. A Ra y Nuri, por volver a los 15 años cada vez que hablamos, y arreglar el mundo cada vez que nos juntamos. A Iria, gracias por ser mi confidente, mi compañera de risas, de debates, mi todo. Gracias por estar ahí. A Lara, qué alegría que hayas llegado a mi vida, eres luz. A mis chicas, Adri, Leti y Trini, por estar apoyándome en los peores momentos de estos últimos años, por aturarme estos últimos meses y porque en los mejores siempre estáis presentes. Nos quedan muchas aventuras por vivir. David, mi madrileño en Galicia, gracias por ser tan como yo y conectar desde el primer momento conmigo. Roiciño, compañero de charlas y debates, gracias por tu apoyo y por creer en mí. Yago, Chris y Carlota, gracias por todos los momentos vividos estos años. A mis nuevos compañeros de entreno, en especial a Débora y Aaron, que me han hecho sentir una más desde el primer momento. A David, tú más que nadie sabes por lo que he pasado. Gracias por todo, te quiero.

Mención especial a mi familia. Papá, gracias por escucharme, por motivarme a seguir y porque siempre has sabido que podía con esto y con mucho más. Mamá, gracias por tus consejos, por saber lo que es hacer una tesis y por calmarme y darme ánimos cuando más lo necesitaba. A mi abuela Luz, gracias por estar pendiente de mí y por querer siempre lo mejor para nosotros. A Blanca, por ser la persona más importante en mi vida, mi hermana y mi mejor amiga, la que mejor me entiende y que siempre está ahí para mí. Os quiero muchísimo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

En memoria de mis abuelos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS 23

ÍNDICE DE TABLAS 33

ABREVIATURAS 37

RESUMEN 47

SUMMARY 51

1. INTRODUCCIÓN 57

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA EN EL MUNDO 57

1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA EN LA UNIÓN EUROPEA (UE) 58

1.3 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA EN ESPAÑA 60

1.4 ENFERMEDADES EN ACUICULTURA 61

1.5 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *T. maritimum*: LA TENACIBACULOSIS MARINA Y LA ESTOMATITIS BACTERIANA 62

1.5.1 Patología 63

1.5.2 Transmisión y reservorio 65

1.5.3 Rangos de hospedador y distribución geográfica 66

1.5.4 Factores que favorecen la aparición de la enfermedad 67

1.6 *Tenacibaculum maritimum* 73

1.6.1 Taxonomía 73

1.6.2 Caracterización bioquímica 74

1.6.3 Caracterización serológica 77

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.6.4 Caracterización molecular y métodos de diagnóstico 78
1.6.4.1 Métodos basados en la amplificación del ARNr 16S y otros genes 80
1.6.5 Caracterización proteómica y quimiotaxonómica 82
1.6.5.1 Caracterización proteómica 82
1.6.5.2 Caracterización quimiotaxonómica 83
1.7 VÍA DE ENTRADA DE *T. maritimum* 84
1.7.1 Coinfecciones con otros patógenos marinos 84
1.7.2 Ensayos de infección 85
1.8 FACTORES DE VIRULENCIA 86
1.8.1 Componentes de la cápsula y de la superficie celular 87
1.8.1.1 Lipopolisacárido (LPS) 87
1.8.1.2 Partes del LPS 89
1.8.1.3 Estudios del LPS en flavobacterias 90
1.8.2 Factores de adhesión y colonización: formación de biopelículas 92
1.8.2.1 Relación entre los sistemas de secreción, motilidad y formación de biopelícula en flavobacterias 93
1.8.3 Factores de invasión y toxinas 94
1.8.3.1 Condroitinasa 95
1.8.3.2 Condroitinasas en flavobacterias 96
1.8.3.3 Sialidasas 96
1.8.3.4 Sialidasas en flavobacterias 98
1.8.3.5 Esfingomielinasas y ceramidasas 99
1.8.4 Sideróforos 101
1.8.4.1 El hierro como elemento esencial para los microorganismos 101
1.8.4.2 Estructura química de los sideróforos y biosíntesis 102
1.8.4.3 Sideróforos en el género *Tenacibaculum* 104

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.9 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD 107

1.9.1 Vacunación frente a la tenacibaculosis y estomatitis bacteriana 107

1.9.2 Tratamientos frente a *T. maritimum* 109

2. OBJETIVOS 113

3. CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA, MOLECULAR Y QUIMIOTAXONÓMICA DE *T. maritimum* 117

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS 118

3.1.1 Caracterización serológica mediante la técnica de dot-blot 118

3.1.1.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo 118

3.1.1.2 Protocolo de la técnica de dot-blot 120

3.1.2 Caracterización molecular de *T. maritimum* 121

3.1.2.1 Cepas bacterianas, medios, condiciones de cultivo y extracción de ADN 121

3.1.2.2 Caracterización mediante REP-PCR 123

3.1.2.3 Caracterización mediante RAPD-PCR 124

3.1.2.4 Caracterización mediante ERIC-PCR 125

3.1.2.5 Electroforesis de los productos de REP, RAPD y RAPD-PCR 126

3.1.2.6 Análisis de los geles de electroforesis de REP, RAPD Y ERIC-PCR 126

3.1.3 Caracterización quimiotaxonómica de *T. maritimum* 127

3.1.3.1 Cepas bacterianas, medios, condiciones de cultivo 127

3.1.3.2 Protocolo de extracción de ácidos grasos 127

3.1.3.3 Análisis de los FAMEs 129

3.2 RESULTADOS 130

3.2.1 Caracterización serológica de *T. maritimum* 130

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2.2 Caracterización molecular de *T. maritimum*.....135
3.2.2.1 Análisis mediante REP-PCR.....135
3.2.2.2 Análisis mediante RAPD-PCR 136
3.2.2.3 Análisis mediante ERIC-PCR.....142
3.2.3 Caracterización quimiotaxonómica de *T. maritimum* 143
3.3 DISCUSIÓN.....147

4. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE *T. maritimum*.....155

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS 156
4.1.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo y extracción de ADN.....156
4.1.2 Amplificación y secuenciación de los genes 163
4.1.3 Análisis de la estructura poblacional.....165
4.1.3.1 Cálculo de índices de variabilidad 166
4.1.3.2 Estudio del equilibrio de ligamiento 166
4.1.3.3 Estudio de la estructura poblacional 167
4.1.3.4 Estudio de recombinación y mutación.....169
4.1.3.5 Genealogía clonal.....170
4.1.3.6 Historia demográfica de la población 171
4.2 RESULTADOS.....174
4.2.1 Descripción de la población y análisis de diversidad.....174
4.2.2 Estudio del equilibrio de ligamiento.....178
4.2.3 Estudio de la estructura de la población.....178
4.2.4 Análisis de la recombinación y mutación.....183
4.2.5 Genealogía clonal 192
4.2.6 Historia demográfica de la población.....192
4.3 DISCUSIÓN.....197

5. FACTORES DE VIRULENCIA DE *T. maritimum* 205

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS 206
5.1.1 Estudio de los antígenos O del LPS de *T. maritimum* ... 206
5.1.1.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo 206
5.1.1.2 Extracción del LPS y electroforesis SDS-PAGE 207
5.1.1.3 Western-blot del LPS de *T. maritimum* 209
5.1.1.4 Estudio de la agrupación génica de los genes de biosíntesis del antígeno O 210
5.1.2 Estudio de las enzimas relacionadas con la degradación de tejidos del hospedador (condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa) 212
5.1.2.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo 212
5.1.2.2 Búsqueda de los genes candidatos en el genoma de referencia *de T. maritimum* y diseño de cebadores 214
5.1.2.3 Extracción de ADN y amplificación de los genes mediante PCR 214
5.1.2.4 Análisis filogenético con los genes de degradación de tejido 217
5.1.2.5 Ensayos *in vitro* de las enzimas implicadas en la degradación de tejidos 218
5.1.3 Identificación de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo y descripción de su estructura química... 220
5.1.3.1 Puesta a punto del crecimiento de *T. maritimum* en déficit de hierro 220
5.1.3.2 Identificación y detección de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo 221
5.1.3.3 Determinación de la estructura química del sideróforo 223
5.2 RESULTADOS 225
5.2.1 Estudio de los antígenos O del LPS de *T. maritimum* ... 225

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.1.1 Análisis del LPS mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot.....225
5.2.1.2 Análisis de los genes de biosíntesis del antígeno O.....227
5.2.2 Estudio de las enzimas relacionadas con la degradación de tejidos del hospedador 231
5.2.2.1 Detección de los genes de la condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa y análisis filogenético 231
5.2.2.2 Detección de la actividad *in vitro* de la condroitinasa.....238
5.2.2.3 Detección de la actividad *in vitro* de sialidasa..239
5.2.2.4 Detección de la actividad *in vitro* de esfingomielinasa 240
5.2.3 Identificación de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo y descripción de su estructura química ...242
5.2.3.1 Puesta a punto del crecimiento de *T. maritimum* en déficit de hierro y producción de sideróforos.....242
5.2.3.2 Identificación y detección de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo.....245
5.2.3.3 Determinación de la estructura química del sideróforo.....247
5.3 DISCUSIÓN.....248

6. CONSIDERACIONES FINALES:.....257

7. CONCLUSIONES.....265

8. BIBLIOGRAFÍA.....269

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la producción de acuicultura en los Estados miembros de la Unión Europea por su cantidad (toneladas) y valor (millones de euros) en 2018 (imagen modificada de: FAO, 2020).....59

Figura 2. Ejemplo de peces afectados por algunos de los principales signos de la tenacibaculosis marina y la estomatitis bacteriana en los que se ha aislado *T. maritimum* en nuestro laboratorio. A: rodaballo con úlceras en la piel; B: lubinas con podredumbre en aleta caudal; C: salmón con presencia de placas amarillas en la boca; D: piel de salmón con úlcera que deja visible el músculo; E: lenguados con podredumbre de aleta caudal; F: lubinas con hemorragias en la boca. 64

Figura 3. De izquierda a derecha, crecimiento de *T. maritimum* en AM, en FMM agar y vista al microscopio óptico con contraste de fases.....77

Figura 4. Estructura de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Se muestra el LPS detallado.....88

Figura 5. A: Representación esquemática de la localización del gen *siaA* de *T. maritimum.* B: Modelo de la utilización del ácido siálico por parte de *T. maritimum* (imagen modificada de: Pérez-Pascual y col., 2017a).....99

Figura 6. Estructuras de los sideróforos de tipo hidroxamato (vía de síntesis NIS). Las estructuras químicas de la lisina y las diaminas se indican en rojo; los grupos acilo en verde; los grupos hidroxilo en azul; los residuos de citrato en negro y los grupos succinil en morado (imagen modificada de: Burrel y col., 2012). 106

Figura 7. Estructuras propuestas por Jang y col. (2007) para *Tenacibaculum sediminilitoris* (tenacibactinas A, B, C y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

D), y por Igarashi y col. (2022) para *Tenacibaculum aiptasiae* (tenacibactinas K, L, M). (Imágenes modificadas de :Jang y col., 2007 e Igarashi y col., 2022) 107

Figura 8. Distribución de las cepas de *T. maritimum* aisladas a partir de distintos hospedadores según el serotipo al que pertenecen (%). Se indican los serotipos por colores, O1: rosa; O2: azul; O3: amarillo; O4: verde. 132

Figura 9. Evolución de los aislados de *T. maritimum* en función el serotipo al que pertenecen. Se indica el período de aislamiento al que pertenecen en años. Se indican los serotipos por colores, O1: rosa; O2: azul; O3: amarillo; O4: verde. 133

Figura 10. Evolución de las cepas de *T. maritimum* según el hospedador del que fueron aisladas, indicando el serotipo al que pertenecen. Se indican los hospedadores por colores, *P. bogaraveo*: azul; *S. solea*: naranja; *S. aurata*: rosa claro; *D. labrax*: verde oscuro; *S. salar*: rosa oscuro; *S. maximus*: amarillo; *S. senegalensis*: verde claro. 134

Figura 11. Perfiles REP generados mediante la técnica de REP-PCR empleada en este estudio. 1: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc); 2: PC503.1; 3: CA80.1; 4: SNW20.2; 5: NCIMB 2158; 6:CA63.1; 7: NCIMB 2154^{T}; 8: ACR584.1; 9: ACR491.1; 10; ACR485.1; 15: 11: SNW19.1; 12: SNW20.1; 13: SNW35.1; 14: SNW15.1; 15: PC424.1; 16: ACC13.1; 17: CA53.1; 18: CA56.1; 19; CA61.1; 20: AQP79.1; 21: AQP72.1. Los números de la izquierda muestran las bandas del marcador molecular en pares de bases. 138

Figura 12. Dendrograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths) usando el coeficiente de similitud de Dice y UPGMA en base a los perfiles genéticos obtenidos mediante la REP-PCR de los aislados de *T. maritimum*. Se muestran a la derecha, las variables epidemiológicas de cada aislado. MM: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc). 139

Figura 13. Perfiles RAPD generados mediante la técnica de RAPD-PCR empleada en este estudio con el cebador P6. 1:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc); 2: ACR485.1; 3: ACR491.1; 4: ACR584.1; 5: CA61.1; 6: CA56.1; 7: ACC13.1; 8: CA53.1; 9: CA80.1; 10: AQP72.1; 11: AQP79.1; 12: SNW20.1; 13: SNW19.1; 14: SNW15.1; 15: SNW35.1; 16: AQP72.1; 17: AQP79.1; 18: NCIMB 2154^{T}; 19: SNW20.2; 20: PC424.1; 21: NCIMB 2158. Los números de la izquierda muestran las bandas del marcador molecular en pares de bases. 140

Figura 14. Dendrograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths) usando el coeficiente de similitud de Dice y UPGMA en base a los perfiles genéticos obtenidos mediante la RAPD-PCR de los aislados de *T. maritimum*. Se muestran a la derecha, las variables epidemiológicas de cada aislado. MM: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc). 141

Figura 15. Dendrograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths) usando el coeficiente de similitud de Dice y UPGMA en base a los perfiles genéticos obtenidos mediante la ERIC-PCR de los aislados de *T. maritimum*. Se muestran a la derecha, las variables epidemiológicas de cada perfil genético. MM: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc).....143

Figura 16. Perfil completo de ácidos grasos de los aislados de *T. maritimum* según serotipo y hospedador. Se muestra la composición de cada ácido graso en %. No se muestran los aislados concretos de cada tipo, sino una media de los ácidos grasos de cada grupo (8 grupos). 146

Figura 17. Estructura de la población de *T. maritimum*, *snapshot* obtenido mediante el algoritmo eBURST de todos los STs. Los SLVs (*Single Locus Variants*) están conectados mediante líneas negras, y los DLVs (*Double Locus Variants*) mediante líneas azules. Los CC están marcados con globos grises. Los STs están representados por puntos amarillos cuyo tamaño es proporcional al número de aislados que conforman cada ST. Los ancestros comunes se representan con círculos azules oscuro. 180

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 18. Red construida mediante el algoritmo MJ generada a partir de la secuencia de los 7 genes de mantenimiento concatenados (*atp*A, *dna*K, *gly*A, *gyr*B, *inf*B, *rlm*N y *tgt*). Los círculos amarillos son proporcionales al número de aislados de cada ST. El nombre del ST se muestra al lado de cada uno de los círculos amarillos. Los círculos rojos representan los vectores medios (mv). Los números dentro de los círculos grises representan las posibles mutaciones entre los nodos. Las líneas sin círculo gris corresponden a una sola posible mutación. Los globos grandes azules engloban a los aislados de los serotipos O1 y O4. 181

Figura 19. Árboles filogenéticos obtenidos mediante los métodos de NJ (izquierda) y ML (derecha) basados en la concatenación de las secuencias parciales de los genes *atp*A, *dna*K, *gly*A, *gyr*B, *inf*B, *rlm*N y *tgt* para *T. maritimum*, Barra, número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 70% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas. 182

Figura 20. *Split trees* generados para cada uno de los genes individuales para todos los aislados. Las barras representan las distancias genéticas. 185

Figura 21. *Spli tree* generado a partir de la secuencia concatenada de los 7 genes utilizados en este estudio. La barra representa la distancia genética. 188

Figura 22. Gráfica de los parámetros r/m y ρ/θ obtenidos mediante el programa ClonalFrame con un nivel de significación del 95% para todos los aislados de *T. maritimum* (arriba) y para los aislados de *T. maritimum* de la Pi (abajo). 189

Figura 23. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias concatenadas de los genes de mantenimiento (*atp*A, *dna*K, *gly*A, *gyr*B, *inf*B, *rlm*N, *tgt* empleando los 132 aislados de *T. maritimum* realizada mediante el algoritmo ML con el modelo GTR+G+I. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo Jukes-Cantor. Barra, 0,002 sustituciones nucleotídicas por sitio. Las barras coloreadas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

representan los cuatro ancestros genéticos (linajes) identificados por el programa Structure. La longitud de las barras coloreadas indica la proporción de los ancestros genéticos de cada uno de los cuatro linajes. 191

Figura 24. Genealogía clonal de *T. maritimum*. Los nodos de divergencia están indicados con letras. 194

Figura 25. Eventos evolutivos producidos en cada uno de los nodos obtenidos mediante el programa ClonalFrame. Las líneas rojas indican la probabilidad de ocurrencia de los eventos de recombinación en una escala del 0 al 1 (eje Y). Las cruces indican las sustituciones nucleotídicas. Cada columna de cada nodo representa uno de los siete genes de mantenimiento (eje X). 195

Figura 26. Electroforesis SDS-PAGE con tinción de plata de los perfiles de LPS de las cepas utilizadas en este estudio. 1: Control positivo (*E. tarda* ATCC 23656); 2: PC538.1; 3: CA56.1; 4: CA80.1; 5: SNW20.1; 6: AQP72.1; 7: NCIMB 2154^T; 8: CA63.1; 9: PC503.1; 10: ACR485.1; 11: ACR584.1; 12: SNW20.2; 13: SNW15.1; 14: SE30.1; 15: SP9.1. 226

Figura 27. Western blot de los perfiles de LPS analizados en este estudio. 1: Perfil generado contra el antisuero del serotipo O1 para las cepas NCIMB 2154^T, CA63.1, PC503.1, PC538.1; 2: Perfil generado contra el antisuero del serotipo O2 para las cepas ACR485.1, ACR584.1, CA80.1, SNW20.1; 3: Perfil generado contra el antisuero del serotipo O3 para las cepas AQP72.1, SNW15.1, CA56.1; 4: Perfil generado contra el antisuero del serotipo O4 para las cepas SNW20.2, SP9.1 y SE30.1.....227

Figura 28. Organización genética de los genes que codifican para las proteínas que participan en la biosíntesis de los distintos antígenos O de *T. maritimum*. *udgH*: UDP-glucosa deshidrogenasa; *wbpB*: UDP-2-acetamido-2-deoxi-D-ácido glucurónico deshidrogenasa; *kpsD*: transportador de ácido siálico; *cpb*: proteína putativa involucrada en la biosíntesis de polisacáridos capsulares; *pesB*: UDP-N-acetylglucosamina 4,6 deshidratasa; *ieoA*: proteína de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

membrana involucrada en la exportación de antígeno O; *maa*: maltosa-O-acetiltransferasa; *rffA*: TDP-4-oxo-6-deoxi-D-glucosa transaminasa; *rmlA*: glucosa-1-fosfato timidiltransferasa; *rlmB*: dTDP-glucosa 4,6 deshidratasa; *rlmC*: dTDP-4-deshidroramnosa 3,5 epimerasa; *rlmD*: dTDP-4-deshidroramnosa reductasa; *spsF*: biosíntesis de la capa de las esporas; *gsa*: Glutamato-1-semialdehído aminotransferasa**;** *perA*: perosamina sintasa; *neuB*; N-acetilneuraminato sintasa; *s5paA*: S5p alanina acetiltransferasa; *folC*: dihidrofolato sintasa; *dapH*: 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato-N-acetiltransferasa; *wbpE*: Glutamato--UDP-2-acetamido-2-deoxi-D-ribohex-3-ácido ululónico aminotransferasa; *wzx*: flipasa del antígeno O; *cat*: cloranfenicol acetiltransferasa; *wblL*: Proteína involucrada en la síntesis del antígeno O; *lpxD*: UDP-3-O-(3-hidroximiristoil) glucosamina N-aciltransferasa. 230

Figura 29. Genes implicados en la síntesis del lípido A y Kdo localizados en los aislados de *T. maritimum* estudiados en este trabajo. *kdsD*: arabinosa 5-fosfato isomerasa; *lpxA*: UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferasa; *lpxC*: UPD-3-O-acil-N-acetilglucosamina deacetilasa; *lpxD*: UDP-3-O- (3-hidroximiristoil) glucosamina N-aciltransferasa. 231

Figura 30. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos mediante PCR de los genes que codifican para las enzimas de degradación del aislado de *T. maritimum* correspondiente a la cepa LSP22.1. MM: Marcador molecular FastRuler Middle Range (Thermo Fisher Scientific Inc); 1: condroitinasa; 2: sialidasa; 3: esfingomielinasa; 4: ceramidasa. 232

Figura 31. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias del gen de la condroitinasa de los aislados de *T. maritimum* empleados en este estudio realizado mediante el método ML con el modelo HKY+G+I. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo TN93 + G. Barra, 0,01 sustituciones nucleotídicas por sitio. En color rosa: aislados pertenecientes al serotipo O1; en color azul:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aislados pertenecientes al serotipo O2; en color amarillo: aislados pertenecientes al serotipo O3; en color verde: aislados pertenecientes al serotipo O4. 234

Figura 32. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias del gen de la sialidasa de los aislados de *T. maritimum* empleados en este estudio realizado mediante el método ML con el modelo TN92+G. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo TN92 + G. Barra, 0,0005 sustituciones nucleotídicas por sitio. En color rosa: aislados pertenecientes al serotipo O1; en color azul: aislados pertenecientes al serotipo O2; en color amarillo: aislados pertenecientes al serotipo O3; en color verde: aislados pertenecientes al serotipo O4. 235

Figura 33. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias del gen de la esfingomielinasa de los aislados de *T. maritimum* empleados en este estudio realizado mediante el método ML con el modelo TN92+G. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo TN92 + G. Barra, 0,002 sustituciones nucleotídicas por sitio. En color rosa: aislados pertenecientes al serotipo O1; en color azul: aislados pertenecientes al serotipo O2; en color amarillo: aislados pertenecientes al serotipo O3; en color verde: aislados pertenecientes al serotipo O4. 236

Figura 34. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias del gen de la ceramidasa de los aislados de *T. maritimum* empleados en este estudio realizado mediante el método ML con el modelo TN92+G+I. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo TN92 + G. Barra, 0,002 sustituciones nucleotídicas por sitio. En color rosa: aislados pertenecientes al serotipo O1; en color azul: aislados pertenecientes al serotipo O2; en color amarillo:

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aislados pertenecientes al serotipo O3; en color verde: aislados pertenecientes al serotipo O4. 237

Figura 35. Ensayo de la actividad de la condroitinasa en *T. maritimum*. A: Se muestra como ejemplo, una placa con la degradación producida por la actividad condroitinasa de *T. maritimum* en las cepas detalladas. B: Placa con los controles negativos (*T. soleae*, *T. gallaicum* y *T. discolor*) sin actividad condroitinasa y el control positivo de *T. maritimum* (NCIMB 2154^{T}), con halo de degradación. 238

Figura 36. Actividad *in vitro* de la enzima sialidasa de los aislados de *T. maritimum*. Se representan los valores medios de las medidas de fluorescencia (Unidades Arbitrarias) de las cepas de cada hospedador y serotipo. En color rosa: cepas del serotipo O1; en color azul: cepas del serotipo O2; en color amarillo: cepas del serotipo O3; en color verde: cepas del serotipo O4. C- CM: Control negativo en caldo marino; C- FMM: Control negativo en FMM. 239

Figura 37. Actividad *in vitro* de la enzima esfingomielinasa paras todos los aislados de *T. maritimum*. Se representan los valores de las medidas de actividad esfingomielinasa a 655nm . En color rosa: cepas del serotipo O1; en color azul: cepas del serotipo O2; en color amarillo: cepas del serotipo O3; en color verde: cepas del serotipo O4. C-: Control negativo. 241

Figura 38. Actividad *in vitro* de la enzima esfingomielinasa paras todos los aislados de *T. maritimum*. Se representan los valores de las medidas de actividad esfingomielinasa a 655nm . En color rosa: cepas del serotipo O1; en color azul: cepas del serotipo O2; en color amarillo: cepas del serotipo O3; en color verde: cepas del serotipo O4. C-: Control negativo. 242

Figura 39. Prueba de producción de sideróforos en CAS agar de los cuatro aislados representativos de *T. maritimum* para el ensayo de producción de sideróforos. Se observan los halos amarillos alrededor del crecimiento de los aislados. 243

Figura 40. Prueba de CAS líquido de producción de sideróforos por los cuatro aislados representativos de *T. maritimum*. A:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Controles positivos con $Fe_2(SO_4)_3$ de los cuatro aislados representativos de los cuatro serotipos de *T. maritimum*. B: Crecimiento de los cuatro aislados con 5 μM de EDDA (en rojo), y control negativo (azul). C: Crecimiento de los cuatro aislados con 10 μM de EDDA (en rojo), y control negativo (azul). D: Crecimiento de los cuatro aislados con 20 μM de EDDA (en rojo), y control negativo (azul). 244

Figura 41. Valores de absorbancia del ensayo de CAS en medio líquido de la producción de sideróforos para los cuatro aislados representativos de los cuatro serotipos de *T. maritimum*. C+ (azul): CM9 líquido con el aislado correspondiente, más $Fe_2(SO_4)_3$. En rojo: Aislados de los cuatro serotipos con las distintas concentraciones de EDDA empleadas en este estudio. 244

Figura 42. Clúster de genes de biosíntesis del sideróforo producido por *T. maritimum.* 246

Figura 43. Electroforesis de los productos de amplificación de los genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum* correspondientes a la cepa SNW20.1. MM: Marcador molecular FastRuler Middle Range (Thermo Fisher Scientific Inc); 1: gen DABA-DC 2: monooxigenasa; 3: acetiltransferasa; 4: desferrioxamina E; 5: sintetasa. 246

Figura 44. Estructura química de la desferrioxamina D1 propuesta como uno de los posibles sideróforos producidos por *T. maritimum*. 248

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales especies producidas mediante acuicultura en la UE, por toneladas, en 2018 (FAO, 2020) 59

Tabla 2. Principales especies producidas mediante acuicultura en la UE, por valor, en 2018 (FAO, 2020) 60

Tabla 3. Especies de peces de las cuales se ha aislado *T. maritimum*, indicando el origen geográfico y el año. 69

Tabla 4. Características fenotípicas de *T. maritimum* descritas por distintos autores (Wakabayashi y col., 1986; Chen y col., 1995; Gosink y col., 1998; Suzuki y col., 2001; Avendaño-Herrera y col., 2006a). 75

Tabla 5. Datos epidemiológicos y del análisis serológico de las cepas de *T. maritimum* empleados en esta tesis doctoral..... 119

Tabla 6. Cepas empleadas en la caracterización molecular y quimiotaxonómica de *T. maritimum* 122

Tabla 7. Programa de REP-PCR empleado en esta tesis doctoral. 124

Tabla 8. Programa de RAPD-PCR empleado en esta tesis doctoral. 125

Tabla 9. Programa de ERIC-PCR empleado en esta tesis doctoral 126

Tabla 10. Ácidos grasos mayoritarios de *T. maritimum* según serotipo y hospedador. "*Summed in feature*" 3 contiene: $C_{16:1}$ ω7c y/ó iso-$C_{15:0}$ 2-OH. "*Summed in feature* 1" contiene: Iso-$C_{15:1}$ H y/ó $C_{13:0}$ 3- OH. Estos ácidos grasos se nombran de esta manera debido a la imposibilidad de separarlos por la técnica Sherlock^{TM} MIS. 144

Tabla 11. Perfil completo de ácidos grasos de los aislados de *T. maritimum* según serotipo y hospedador. Se muestra la composición de cada ácido graso en %. No se muestran los aislados concretos de cada tipo, sino una media de los ácidos grasos de cada grupo (8 grupos). Esta media y el error

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

estándar se calculan independientemente del hecho de que un determinado ácido graso no se encuentre en todas las cepas analizadas. "*Summed in feature* 3" contiene: $C_{16:1}$ ω7c y/ó iso-$C_{15:0}$ 2-OH. "*Summed in feature* 1" contiene: Iso-$C_{15:1}$ H y/ó $C_{13:0}$ 3- OH. 145

Tabla 12. Datos epidemiológicos y del análisis del MLST de las cepas de *T. maritimum* utilizadas en esta tesis doctoral. 156

Tabla 13. Programa de PCR empleado en el análisis MLST de esta tesis doctoral 164

Tabla 14. Cebadores empleados en la amplificación por PCR de los genes utilizados en este estudio..... 164

Tabla 15. Tamaño y media del contenido G + C de los fragmentos génicos empleados en este estudio. 175

Tabla 16. Número de alelos y variaciones nucleotídicas para todos los aislados incluidos en este estudio. 176

Tabla 17. Valores de diversidad nucleotídica para todos los aislados de este estudio. 177

Tabla 18. Número mínimo de eventos de recombinación para todos los aislados y para la población de la PI. 183

Tabla 19. Resumen de los estadísticos utilizados para el análisis de la historia demográfica de la población de *T. maritimum*. 196

Tabla 20. Cepas empleadas en el estudio de los antígenos O del lipopolisacárido de *T. maritimum*. 207

Tabla 21. Componentes y cantidades necesarias para realizar los geles de SDS-PAGE. 208

Tabla 22. Cepas utilizadas en el estudio de las enzimas de vía de entrada de *T. maritimum* al hospedador. 212

Tabla 23. Cebadores empleados en la amplificación mediante PCR de los cuatro genes de vía de entrada de *T. maritimum* al hospedador. 216

Tabla 24. Protocolo de amplificación por PCR empleado para la condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa. 216

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 25. Cebadores empleados en la amplificación mediante la técnica de PCR de los genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum*. 223

Tabla 26. Protocolo de amplificación por PCR de los genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum*. 223

Tabla 27. Sideróforos identificados en los sobrenadantes de *T. maritimum* de la cepa LSP9.1..... 248

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS

4-MU:	4-metillumbeliferona escindido libre
AIC:	Criterio de información de Akaike (*Akaike Information Criterion*)
ADN:	Ácido desoxirribonucléico
AGD:	Enfermedad amebiana de las branquias (*Amoebic Gill Disease*)
AH:	Ácido hialurónico
AM:	Agar Marino
AOA:	Agar Anaker Ordal (*Anaker Ordal Agar*)
APS:	Persulfato de amonio (*Amonium Persulfate*)
ARN:	Ácido ribonucleico
AT:	Alelos Tipo
ATCC:	Colección americana de cultivos tipo (*American Type Culture Collection*)
ATP:	Adenosin trifosfato
BAL:	Bacterias del ácido Láctico
BCIP:	5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BLAST:	Herramienta básica de búsqueda de alineación local (*Basic Local Alignment Search Tool*)
BPN:	Necrosis de manchas negras (*Black Patch Necrosis*)
BSA:	Albúmina de Suero bovina (*Bovine Serum Albumin*)
CAS:	Cromo Azurol Sulfonato

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CC:	Complejo Clonal
CECT:	Colección Española de Cultivos Tipo
CM9:	Caldo/medio Mínimo 9
CS:	Condroitin sulfato
CD:	Ceramida
CDasa:	Ceramidasa
CM:	Caldo Marino
CSasa:	Condroitinasa
D:	Prueba de Tajima
D*:	Estadístico de Fu y Li
DABA-DC:	L-2-4-diaminobutirato descarboxilasa (*L-2,4-diaminobutyrate decarboxylase*)
dATP:	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP:	desoxicitidina trifosfato
dGTP:	Desoxiguanosina trifosfato
DLV:	Variación en dos *loci* (*Double Locus Variant*)
DMSO:	Dimetilsulfóxido
d_N:	Sustituciones no sinónimas
dNTP:	Desoxinucleósido trifosfato
DO:	Densidad óptica
DS:	Dermatán sulfato
d_S:	Sustituciones sinónimas
dTTP:	Desoxitimidina trifosfato
EDDA/EDDHA:	Ácido etilendiamino-di-(o- hidroxifenil-acético)
EDTA:	Ácido etilendiaminotetraacético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ELISA:	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)
ERIC:	Amplificación de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)*
F*:	Estadístico de Fu y Li
F_S:	Estadístico de Fu
FAME:	Ésteres metílicos de ácidos grasos (*Fatty Acid Methyl Esters*)
FMM:	Medio para *Flexibacter maritimus* (*Flexibacter maritimus Medium*)
G:	Tasa de variación entre sitios
Ga:	Galio
GAG:	Glucosaminoglucano
GC:	Cromatografía de gases (*Gas Chromatopraphy*)
G+C:	Guanina + Citosina
Gdp:	Guanosina trifosfato
GTR:	Modelo general reversible en el tiempo (*General Time Reversible*)
HKY:	Modelo Hasegawa-Kishino-Yano
HPLC:	Cromatografía líquida de alta eficacia (*High Performance Liquid Chromatography*)
HRMS:	Espectrometría de masas de alta resolución (*High Resolution Mass Spectroscopy*)
HSC:	N-hidroxi-N-succinil-cadaverina
HSD:	N-hidroxi-N-succinil-diamina
HSP:	N-hidroxi-N-succinil-putrescina
I:	Sitios invariables (*Invariable sites*)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I_A:	Índice de Asociación
IG:	Isla Genómica
IgG:	Anti-inmunoglobulina G
IP:	Intraperitoneal
IS:	Índice de Similitud
I^S_A:	Índice de asociación estandarizado (*Standardized Association Index*)
KDO:	Ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico
LPS:	Lipopolisacárido
LB:	*Luria Broth*
MALDI-TOF:	Desorción/ionización láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*)
MCMC:	Cadena de Markow Monte Carlo (*Markov Chain Monte Carlo*)
MiliU:	Miliunidades
ML:	Máxima Verosimilitud (*Maximum Likelihood*)
MEGA:	Análisis de genética evolutiva molecular (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*)
MJ:	*Median–Joining*
MLSA:	Análisis de secuencia multigénica (*MultiLocus Sequence Analysis*).
MLST:	Tipado de secuencia multigénica (*MultiLocus Sequence Typing*)
MT:	Tipo MALDI (*MALDI Type*)
MUAN:	Ácido fluorogénico 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-N-acetilneuramínico
NBT:	*Nitroblue Tetrazolium*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

NCIMB:	Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas (*National Collection of Industrial and Marine Bacteria*)
NJ:	*Neighbor Joining*
NIS:	Sideróforo independiente de la vía NRPS (*NRPS Independent Siderophore*)
NMR:	Resonancia Magnética Nuclear *(Nuclear Magnetic Resonance*)
NRPS:	Péptido-sintetasa no ribosómica (*Non Ribosomal Peptide Synthetase*)
nt:	Nucleótidos
ORF:	*Open Reading Frame*
PATRIC:	*PAThosystems Resource Integration Center*
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
Phi:	Índice de homoplasia por pares (*Pairwise Homoplasy Index*)
PI:	Península Ibérica
PL:	Polisacárido Liasa (*Polysaccharide Lyase*)
PUL:	Loci de utilización/escisión de polisacáridos (*Polysaccharide Utilisation Loci*).
qPCR:	PCR cuantitativa (*quantitative PCR*)
QUAST:	*QUality ASsesment Tool*
R_2:	Estadístico de Ramos-Onsins
RAPD:	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (*Random Amplified Polimorphic DNA*)
RAST:	*Rapid Annotation Using Subsystem Technology*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

REP:	Amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (*Repetitive Extragenic Palindromic secuences)*
ROS:	Especies reactivas de oxígeno *(Reactive Oxygen Species)*
RT-PCR-EHA:	PCR con retrotranscriptasa inversa acoplados a ensayos de hibridación enzimática
S´:	Estadístico de Strobeck
SC:	Subcutáneo
SLV:	Variación en un solo locus (*Single Locus Variant*)
SM:	Esfingomielina
SMasa:	Esfingomielinasa
R_{min}:	Número mínimo de eventos de recombinación (*Minimum number of Recombination events*)
ST:	Secuencia Tipo (*Sequence Type*)
START2:	Análisis de tipos de secuencia y pruebas de recombinación (*Sequence Type Analysis and Recombination Tests*)
SDS:	Dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate*)
SDS-PAGE:	Geles de poliacrilmida con dodecil sulfato sódico (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel*)
MIS:	Sistema de Identificación Microbiana (*Microbial Identification System*) MIDI
T9SS:	Sistema de secreción de tipo IX (*Type IX Secretion System*)
TAE:	Tris Acetato EDTA
TBS:	Tris-Buffer-salino
TEMED:	Tetrametiletilendiamina (T*etramethylethylenediamine*)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

TN92 + G:	Modelo Tamura 3-*parameter* con distribución gamma
TN93 + G:	Modelo Tamura-Nei 93 con distribución gamma
TTBS:	Tween 20-Tris Buffer Salino
UPGMA:	Método de grupo de pares no ponderado con media aritmética (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*)
v-PCR:	PCR de viabilidad (*viability PCR*)
V_E:	Varianza Esperada
V_O:	Varianza Obtenida
YM:	Estomatitis bacteriana (*Yellow Mouth*)

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

Tenacibaculum maritimum es el patógeno marino causante de la tenacibaculosis marina y la estomatitis bacteriana, enfermedades que provocan cuantiosas pérdidas económicas en la producción de especies cultivadas de alto valor comercial en distintas zonas geográficas del mundo. Para poder prevenir y controlar estas dos enfermedades es necesario disponer de un amplio conocimiento de su agente causal. La presente tesis doctoral pretende ampliar el conocimiento de la especie *T. maritimum* con el fin de implementar los métodos de diagnóstico de la enfermedad, estudiar la estructura y la evolución de la población y el análisis de posibles factores de virulencia con el propósito de profundizar en los mecanismos de entrada al hospedador.

Los análisis serológicos de las diferentes cepas de *T. maritimum* realizados en la presente tesis doctoral mediante la técnica de dot-blot revelaron que existe una alta heterogeneidad entre los distintos aislados pertenecientes a distintos hospedadores, revelando la presencia de los cuatro serotipos descritos hasta el momento en esta especie bacteriana. Además, el presente trabajo demuestra que en los últimos años se han aislado un número considerable de cepas pertenecientes al serotipo O4 disminuyendo el número de aislados del serotipo O1 en favor de este nuevo serotipo. Por otro lado, los resultados han demostrado la coexistencia de aislados de distintos serotipos en peces de la misma especie y en la misma piscifactoría.

En esta tesis doctoral, las técnicas empleadas para la caracterización molecular fueron la REP-PCR, la RAPD-PCR y la ERIC-PCR. Todos los aislados analizados en este trabajo fueron tipificables mediante las tres técnicas produciéndose patrones de bandas o perfiles genéticos variables en mayor o menor medida, fácilmente interpretables y característicos del patógeno *T. maritimum*,

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

por lo que resultan métodos de tipificación óptimos para la clasificación de esta bacteria y, además, la REP-PCR y la RAPD-PCR resultan útiles para determinar la variabilidad genética intraespecífica de los aislados de *T. maritimum.* La caracterización quimiotaxonómica de *T. maritimum* realizada en esta tesis doctoral, reveló un perfil muy homogéneo de ácidos grasos para todos los aislados, a excepción del aislado del serotipo O4.

La evaluación de la diversidad y las relaciones evolutivas entre los miembros de una población bacteriana mediante la técnica MLST ha permitido comprobar que la diversidad genética de este patógeno es moderada, revelando así a *T. maritimum* como una especie cohesiva. Además, los resultados de la presente tesis doctoral revelan la existencia de un posible papel del comercio internacional de peces reproductores en la propagación de *T. maritimum* o por otras actividades humanas como la contaminación debida al agua de lastre de los barcos o actividades agrícolas, debido a la relación entre aislados de distintas localizaciones geográficas. Los aislados pertenecientes al mismo serotipo tienden a agruparse y a compartir el mismo ancestro genético, sugiriendo que algunos cambios en las secuencias podrían estar relacionadas con el serotipo de los aislados. Por otro lado, el número de eventos mutacionales fue mayor que el número de eventos de recombinación y la influencia de la mutación fue más importante que la influencia de la recombinación para la evolución y divergencia de *T. maritimum*. Por lo tanto, en esta tesis doctoral se sugiere una estructura de población epidémica para *T. maritimum* donde existe un nivel de basal de recombinación frecuente con expansión clonal consecutiva de algunos aislados.

Para que *T. maritimum* produzca la enfermedad, es necesaria la invasión y colonización del hospedador mediante distintos mecanismos de virulencia. El análisis de los perfiles del LPS de los diferentes aislados pertenecientes a los distintos serotipos, apoyan la evidencia de que *T. maritimum* es una bacteria antigénicamente heterogénea, presentando cuatro perfiles distintos de LPS con pequeñas variaciones a nivel de la fracción que representa el antígeno O, los cuales coinciden con los cuatro serotipos descritos para esta especie bacteriana. En cuanto a la organización genética del antígeno

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

O, mediante los análisis realizados en el presente estudio se pudo localizar el clúster de genes que codifican para el antígeno O en todos los aislados analizados, entre los que se encontraban los genes necesarios para la síntesis de los azúcares manosa y ramnosa. Además, se encontraron genes únicos para los distintos serotipos, como la perosamina sintasa, gen exclusivo del antígeno O del serotipo O2, el gen de la N-acetilneuraminato sintasa , único de los serotipos O2 y O3, y el gen de la flipasa antígeno O, característico del serotipo O4.

El análisis de las enzimas de degradación de tejido del hospedador (condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa) confirmó que todos los aislados de *T. maritimum* presentan los cuatro genes que codifican para las mismas, y, además, todas las cepas presentaron actividad *in vitro* para estas enzimas de degradación. Las reconstrucciones filogenéticas con los fragmentos amplificados de cada gen demostraron que los aislados tienden a agruparse según el serotipo al que corresponden, de modo que los genes para el antígeno O del LPS y los genes de estas enzimas de degradación de tejido podrían estar relacionados de alguna manera, o compartir mecanismos de biosíntesis o transporte, entre otros. En cuanto a las enzimas condroitinasa y sialidasa, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral parecen indicar que estas enzimas están presentes únicamente en la especie *T. maritimum* dentro del género *Tenacibaculum* debido a la presencia exclusiva de los genes *cslA* y *siaA* en este patógeno y su consecuente actividad *in vitro* de tipo CSasa AC y sialidasa, respectivamente. Por tanto, estas enzimas en *T. maritimum* pueden ser en parte las responsables de los procesos de invasión, con el apoyo de otras enzimas de degradación de tejidos, y de la aparición de las úlceras en la piel de los peces, características de la tenacibaculosis marina.

El análisis de clúster de genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum* realizado en esta tesis doctoral reveló que estaba formado por 6 genes adyacentes, los cuales eran idénticos para todas las cepas estudiadas, y que presenta una construcción genética similar a la de *T. mesophilum*, para la síntesis de hidroxamatos basados en N-hidroxi-N-succinil cadaverina (HSC) mediada por la vía independiente de péptido-sintetasas no ribosómicas (NIS). Por otro lado, el análisis de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la estructura química del sideróforo muestra que *T. maritimum* sintetizaría 6 formas o variantes diferentes de su sideróforo relacionadas con las desferrioxaminas. Uno de los sideróforos detectados coincide con la desferrioxamina D1, el cual pertenece al grupo de los hidroxamatos de tipo HSC. Por tanto, la propuesta de estructura química para el sideróforo de *T. maritimum* resultante de esta tesis doctoral concuerda con las distintas estructuras químicas propuestas para los sideróforos de bacterias del género *Tenacibaculum*, siendo todos ellos de tipo hidroxamato basados en HSD, concretamente en HSC, pudiendo ser de tipo desferrioxamina (*T. maritimum, T. sediminilitoris y T. aiptasiae*), o bisucaberina (*T. mesophilum*).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SUMMARY

Tenacibaculum maritimum is the causal agent of tenacibaculosis and bacterial stomatitis, diseases that cause considerable economic losses in the production of fish species of high commercial value in different geographical areas of the world. To prevent and control these diseases, it is necessary to have a wide knowledge of their causal agent. This doctoral thesis aims to expand the knowledge of the species *T. maritimum* to implement the diagnostic methods of the disease, study the structure and evolution of the population and the analysis of possible virulence factors with the purpose of deepening the mechanisms of entry into the host.

The serological analyses of the different strains of *T. maritimum* carried out in the present doctoral thesis by dot-blot technique revealed that there is a high heterogeneity among the different isolates belonging to different hosts, revealing the presence of the four serotypes described for this bacterial species. In addition, the present work demonstrates that in recent years, a considerable number of strains belonging to serotype O4 have been isolated, decreasing the number of isolates of serotype O4 in favor of this new serotype. In addition, the results have demonstrated the coexistence of isolates of different serotypes in fishes of the same species and in the same farm.

In this doctoral thesis, the techniques used for molecular characterization were REP-PCR, RAPD-PCR and ERIC-PCR. All the isolates analyzed in this work could be typeable by the three techniques, producing banding patterns or genetic profiles that vary to a greater or lesser extent, easily interpretable and characteristic of the pathogen *T. maritimum*, making them optimal typing methods for the classification of this bacterium and, in addition, REP-PCR and RAPD-PCR are useful for determining the intraspecific genetic variability of *T. maritimum* isolates. The chemotaxonomic characterization of *T. maritimum*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

performed in this doctoral thesis revealed a very homogeneous fatty acid profile for all isolates, except for the serotype O4 isolate.

The evaluation of the diversity and evolutionary relationships among the members of a bacterial population using the MLST technique has shown that the genetic diversity of this pathogen is moderate, revealing *T. maritimum* as a cohesive species. In addition, the results of the present doctoral thesis reveal the existence of a possible role of international trade of brood fish in the spread of *T. maritimum* or by other human activities such as contamination due to ballast water from ships or agricultural activities, or due to the connection between isolates from different geographical locations. Isolates belonging to the same serotype tend to cluster together and share the same genetic ancestry, suggesting that some sequence changes could be related to the serotype of the isolates. Furthermore, the number of mutational events was higher than the number of recombination events and the influence of mutation was more important than the influence of recombination for the evolution and divergence of *T. maritimum*. Therefore, this dissertation suggests an epidemic population structure for *T. maritimum* where there is a basal level of frequent recombination with consecutive clonal expansion of some isolates.

To be able to cause the disease, *T. maritimum* must invade and colonize the host through different virulence mechanisms. The analysis of the LPS profiles of the different isolates belonging to the different serotypes supports the evidence that *T. maritimum* is an antigenically heterogeneous bacterium, presenting four different LPS profiles with small variations at the level of the fraction representing the O antigen, which coincide with the four serotypes described for this bacterial species. Regarding the genetic organization of the O antigen, the analyses performed in the present study allowed us to locate the cluster of genes coding for the O antigen in all the isolates analyzed, among which were the genes necessary for the synthesis of the sugars mannose and rhamnose. In addition, genes unique to the different serotypes were found, such as perosamine synthase, a specific gene for the O-antigen of serotype O2, the N-acetylneuraminate synthase gene, unique to the serotypes O2 and O3, and the O-antigen flippase gene, characteristic of serotype O4.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Analysis of host tissue-degrading enzymes (chondroitinase, sialidase, sphingomyelinase and ceramidase) confirmed that all *T. maritimum* isolates present the four genes encoding for them, and, in addition, all strains showed *in vitro* activity for these degrading enzymes. Phylogenetic reconstructions with the amplified fragments of each gene showed that the isolates tend to cluster according to their serotype, so that the O antigen genes and the genes for these tissue-degrading enzymes could be related in some way, or share mechanisms of biosynthesis or transport, among others. Regarding the chondroitinase and sialidase enzymes, the results obtained in this doctoral thesis seem to indicate that these enzymes are present only in the species *T. maritimum* within the genus *Tenacibaculum* due to the exclusive presence of the *cslA* and *siaA* genes in this pathogen and its consequent *in vitro* CSase AC type and sialidase activity, respectively. Therefore, these enzymes in *T. maritimum* may be partly responsible for the invasion processes, supported by other tissue-degrading enzymes, and for the appearance of fish skin ulcers characteristic of marine tenacibaculosis.

The siderophore biosynthesis gene cluster analysis of *T. maritimum* performed in this PhD thesis revealed that it was formed by 6 adjacent genes, which were identical for all the strains studied, and it presents a similar gene construction to that of *T. mesophilum*, for the synthesis of N-hydroxy-N-succinyl cadaverine (HSC)-based hydroxamates mediated by the non-ribosomal peptide synthetases (NIS)-independent pathway. Furthermore, the analysis of the chemical structure of the siderophore shows that *T. maritimum* would synthesize 6 different forms or variants of its siderophore related to desferrioxamines. One of the siderophores detected coincides with desferrioxamine D1, which belongs to the group of HSC-type hydroxamates. Therefore, the proposed chemical structure for the siderophore of *T. maritimum* resulted from this doctoral thesis, it agrees with the different chemical structures proposed for the siderophores of bacteria of the genus *Tenacibaculum*, all of them being of the hydroxamate type based on HSD, specifically on HSC, being able to be a desferrioxamine (*T. maritimum*, *T. sediminilitoris* and *T. aiptasiae*), or a bisucaberine (*T. mesophilum*).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA EN EL MUNDO

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) define el término acuicultura como "el cultivo de organismos acuáticos en áreas continentales o costeras, que implica por un lado la intervención en el proceso de crianza para mejorar la producción y por el otro la propiedad individual o empresarial del *stock* cultivado". La acuicultura se ha convertido en una actividad económica importante responsable del crecimiento del suministro de pescado para consumo humano. Además, esta actividad supone una fuente de ingresos y empleo para más 20 millones de personas (FAO 2020).

De acuerdo con las estadísticas publicadas por la FAO, la producción acuícola mundial alcanzó otro récord histórico en el año 2018 de 114,5 millones de toneladas (200,8 millones de euros), lo que supuso 17,1 millones de toneladas más que la producción de la pesca. La producción total se dividió en 82,1 millones de toneladas de animales acuáticos, 32,4 millones de toneladas de algas acuáticas y 26.000 toneladas de conchas marinas ornamentales y perlas.

Con respecto a la producción por países, China continúa siendo líder de producción en 2018 (66.135.039 toneladas) con una notable diferencia sobre el segundo país, Indonesia (14.712.104 toneladas). Como tercer país productor acuícola se encuentra la India (7.071.302 toneladas), seguido de Vietnam (4.153.322 toneladas), Bangladesh (2.405.416 toneladas), Filipinas (2.304.361 toneladas), República de Corea (2.278.850 toneladas), Egipto (1.561.457 toneladas), Noruega (1.355.117 toneladas) y Chile (1.287.233 toneladas).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a las especies producidas en acuicultura en 2018, las dos mayoritarias han sido las algas laminaria japonesa o kombu *(Saccharina japonica*) y el alga eucheuma (géneros *Eucheuma* y *Kappaphycus*), seguida de la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) y la carpa china (*Ctenopharyngodon idella*). Sin embargo, en relación con el valor de producción, la primera especie es el langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) seguida por el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), cangrejo de las marismas (*Procambarus clarkii*) y la carpa china (*Ctenopharyngodon idella*) (FAO, 2020).

En lo que respecta al valor de producción, China continúa siendo líder alcanzando los 123.599 millones de euros

1.2 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA EN LA UNIÓN EUROPEA (UE)

En 2018 se generaron 1.365.112 toneladas de productos de acuicultura en la UE, lo que se traduce en un incremento del 0,4 % con respecto al año anterior, con un valor de producción de 4.357 millones de euros. Aunque el 80% de la producción acuática total en la UE proviene de la pesca extractiva, en algunos países la acuicultura se ha convertido en un importante motor económico y social que supera al de la pesca.

España es el país de la UE con una mayor producción de acuicultura, con 347.825 toneladas en 2018 (25,5 % del total de la UE), seguido por el Reino Unido con 197.618 toneladas y Francia con 185.650 toneladas. Aun así, el Reino Unido se sitúa a la cabeza en valor de producción con 1.075,3 millones de euros, seguido por Francia, Grecia y España (Figura 1). En la UE, las especies producidas son principalmente pescados y moluscos, entre los que destacan por número de toneladas el mejillón común (*Mytilus edulis*) y el mediterráneo (*Mytilus galloprovincialis*) (Tabla 1), y por valor de producción, el salmón de Atlántico y la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Tabla 2).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

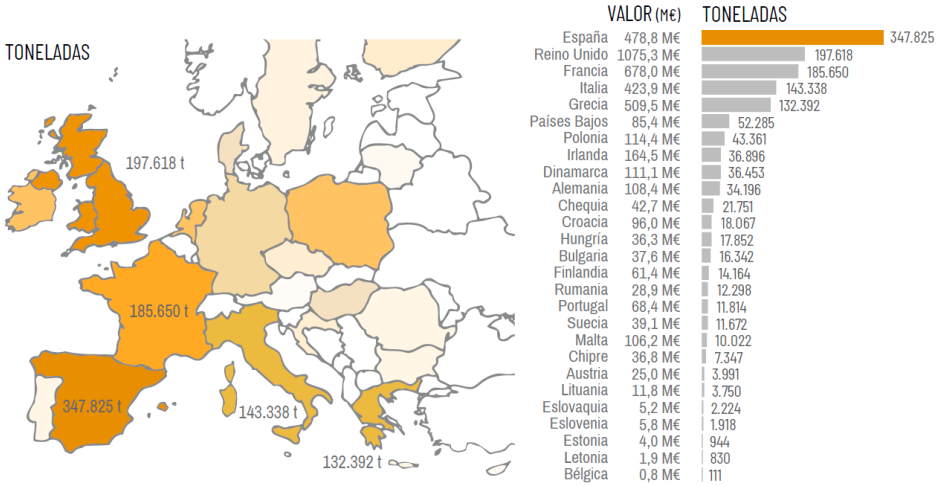


Figura 1. Distribución de la producción de acuicultura en los Estados miembros de la Unión Europea por su cantidad (toneladas) y valor (millones de euros) en 2018 (imagen modificada de: FAO, 2020).

Tabla 1. Principales especies producidas mediante acuicultura en la UE, por toneladas, en 2018 (FAO, 2020)

ESPECIE	NOMBRE CIENTÍFICO	TONELADAS
Mejillones	*Mytilus spp*	527.192
Salmón del Atlántico	*Salmo salar*	179.314
Trucha arco iris	*Onchorynchus mykiss*	174.987
Ostión japonés	*Cassostrea gigas*	98.681
Dorada	*Sparus aurata*	91.964
Lubina	*Dicentrarchus labrax*	84.400
Carpa común	*Cyprinus carpio*	75.348
Almeja japonesa	*Ruditapes philippinarum*	33.050
Atún rojo del Atlántico	*Thunnus thynnus*	11.181
Rodaballo	*Scophthalmus maximus*	8.395
TOTAL 10 PRINCIPALES ESPECIES		1.284.512
RESTO DE ESPECIES		80.598
TOTAL, ACUICULTURA UE		1.365.110

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 2. Principales especies producidas mediante acuicultura en la UE, por valor, en 2018 (FAO, 2020)

ESPECIE	NOMBRE CIENTÍFICO	VALOR (M€)
Salmón del Atlántico	*Salmo salar*	1.106,40
Trucha arco iris	*Onchorynchus mykiss*	573,9
Lubina	*Dicentrarchus labrax*	465
Dorada	*Sparus aurata*	463
Ostión japonés	*Cassostrea gigas*	434
Mejillones	*Mytilus spp*	419
Carpa común	*Cyprinus carpio*	165,7
Almeja japonesa	*Ruditapes philippinarum*	165,4
Atún rojo del Atlántico	*Thunnus thynnus*	127,6
Rodaballo	*Scophthalmus maximus*	59,7
TOTAL 10 PRINCIPALES ESPECIES		3.980,40
RESTO DE ESPECIES		376,7
TOTAL, ACUICULTURA UE		4357,1

1.3 SITUACIÓN ACTUAL DE LA ACUICULTURA EN ESPAÑA

España ocupa el vigésimo puesto mundial con 347.825 toneladas y un incremento del 11,8 % en el año 2018 y continúa en el puesto 31º con un valor de producción de unos 479 millones de euros, un 2,4 % más que en 2017 (FAO, 2020). El reciente informe de APROMAR estima que en 2019 España cosechó 342.867 toneladas por valor de 501 millones de euros (APROMAR, 2020). Las especies más producidas en España en 2019 fueron el mejillón (*Mytilus* spp.) (261.513 toneladas), seguido de la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (27.335 toneladas), la trucha arcoíris (18.955 toneladas) y la dorada (*Sparus aurata*) (13.521 toneladas).

El Plan Estratégico de la Acuicultura Española 2014-2020 fijó el objetivo de alcanzar las 369.470 toneladas en 2020 y de 527.766 toneladas en 2030, lo que supondrían 780 millones y 1.465 millones

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de euros, respectivamente. Para llegar a ese objetivo, dentro de este Plan Estratégico se proponen una serie de retos:

- La necesidad de agilización de los procedimientos administrativos.
- Modificación de la duración de las concesiones de ocupación del Dominio Público Marítimo Terrestre de la Ley de Costas a través de la Ley de Cambio Climático y Transición Energética.
- Estrategia "De la Granja a la Mesa"

1.4 ENFERMEDADES EN ACUICULTURA

A pesar de los avances tecnológicos y científicos, las enfermedades infecciosas causadas por virus, hongos, parásitos y en su gran mayoría por bacterias, suponen uno de los principales problemas en el sector de la acuicultura, provocando pérdidas económicas considerables debido a la morbilidad y/o mortalidad que provocan dichos patógenos (Toranzo y col., 2005). Además, en los últimos años, con la aparición de nuevos patógenos junto con las consecuencias del cambio climático, se hace necesaria la implementación de medidas de prevención y control de estas enfermedades en el sector de la acuicultura (Seggel y De Young, 2016; Hutson y Cain, 2019). Las especies bacterianas que más problemas generan en el sector de la acuicultura pertenecen a los géneros *Aeromonas*, *Aliivibrio*, *Chlamydia*, *Edwardsiella*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Photobacterium*, *Piscirickettsia*, *Pseudomonas*, *Tenacibaculum*, *Vibrio*, *Yersinia*, *Lactococcus*, *Renibacterium* y *Streptococcus* (Toranzo y col., 2005; Pridgeon y Klesius, 2012; Dadar y col., 2017; Hutson y Cain, 2019). Todas las bacterias de estos géneros afectan a especies de peces de alto valor comercial, provocando pérdidas económicas considerables para el sector.

A lo largo de los años se han ido implementando distintos métodos de diagnóstico, prevención y control con el fin de contener a estos patógenos. Para ello se han empleado distintos agentes antimicrobianos como método profiláctico, o la formulación de vacunas o autovacunas específicas para cada piscifactoría como

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

método de prevención. La implementación de nuevas medidas que consigan frenar los avances de estas enfermedades ya existentes y de otras emergentes hacen necesario el estudio en profundidad de los microorganismos que las causan, tanto a nivel genético como epidemiológico.

1.5 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *T. maritimum*: LA TENACIBACULOSIS MARINA Y LA ESTOMATITIS BACTERIANA

La tenacibaculosis marina es una enfermedad ulcerativa causada por el patógeno *Tenacibaculum maritimum*. Esta enfermedad es una de las infecciones bacterianas limitantes de la producción de especies cultivadas de alto valor comercial en distintas zonas geográficas del mundo (Toranzo y col., 2005; Avendaño-Herrera y col., 2006a; Austin y Austin, 2016).

Esta patología se ha denominado con distintas acepciones, atendiendo principalmente a los signos clínicos que produce, entre los que se encuentran los nombres de: necrosis de manchas negras (BPN, del inglés *Black Patch Necrosis*), podredumbre de aletas y cola, síndrome de la boca roja o erosionada o flexibacteriosis marina, entre otros (McVicar y White, 1979; 1982; Wakabayashi y col., 1984; Bernardet y col., 1990; Alsina y Blanch, 1993; Handlinger y col., 1997; Ostland y col., 1999).

T. maritimum es también la bacteria responsable de la enfermedad conocida como estomatitis bacteriana (YM, del inglés *Yellow Mouth*) la cual afecta principalmente a juveniles (*smolts*) de salmón del Atlántico en la zona del Noroeste del océano Pacífico (Columbia Británica, Canadá). Esta enfermedad presenta signos clínicos que difieren de la clásica tenacibaculosis (Frelier y col., 1994; Ostland y col., 1999; Frisch y col., 2018a; 2018b; Wynne y col., 2020; Bateman y col., 2021).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.1 Patología

Los peces afectados por la tenacibaculosis marina presentan distintos signos clínicos externos entre los que se encuentra como principal las úlceras en la piel que dejan visible el músculo (Figura 2). Otros signos característicos de esta enfermedad son las erosiones de la mandíbula con hemorragias (boca roja) o la degradación y/o podredumbre de los tejidos interradiales de las aletas (Figura 2). Aunque la mayoría de los peces no presentan signos a nivel interno, algunos muestran petequias y hemorragias del peritoneo, acumulación de fluido sanguíneo en abdomen, congestión de meninges y necrosis muscular (McVicar y White, 1979; Campbell y Buswell, 1982; Wakabayashi y col., 1984; Baxa y col., 1986; Bernardet y col., 1990; Alsina y Blanch, 1993; Chen y col., 1995; Handlinger y col., 1997; Ostland y col., 1999; Cepeda y Santos, 2002; Vilar y col., 2012). Las principales zonas afectadas son la superficie de la piel, las aletas, la boca y la cabeza. También se han observado casos de tenacibaculosis con lesiones en la zona de las branquias (Chen y col., 1995; Handlinger y col., 1997). Los peces afectados por la tenacibaculosis también presentan natación errática, inapetencia, adelgazamiento e irregularidades respiratorias (Devesa y col., 1989).

En el caso de la estomatitis bacteriana, el signo clínico más característico es la presencia de placas amarillas que se forman debido a la acumulación de la bacteria en la boca, los dientes y el paladar de los peces afectados (Figura 2) (Frisch y col., 2018b). También se han reportado casos de la presencia de estas placas en las branquias (Mitchel y Rodger, 2011).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

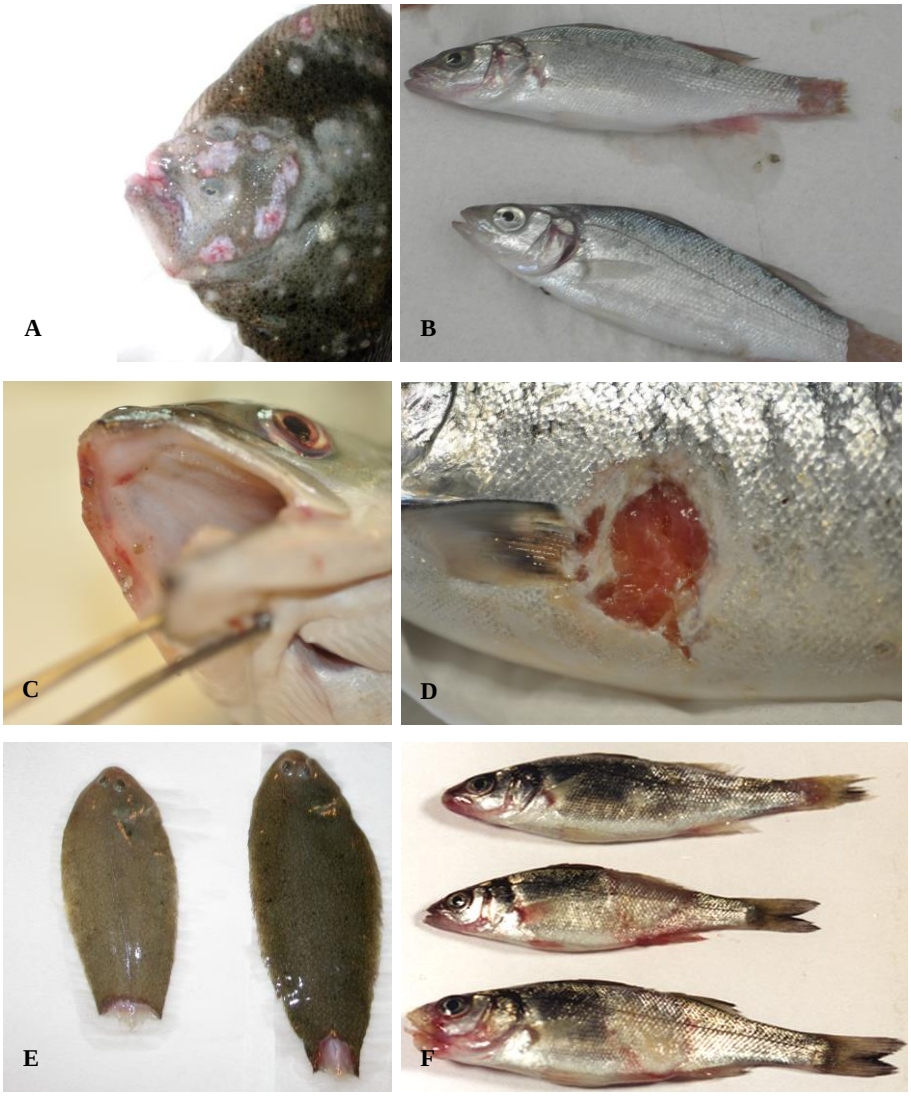


Figura 2. Ejemplo de peces afectados por algunos de los principales signos de la tenacibaculosis marina y la estomatitis bacteriana en los que se ha aislado *T. maritimum* en nuestro laboratorio. A: rodaballo con úlceras en la piel; B: lubinas con podredumbre en aleta caudal; C: salmón con presencia de placas amarillas en la boca; D: piel de salmón con úlcera que deja visible el músculo; E: lenguados con podredumbre de aleta caudal; F: lubinas con hemorragias en la boca.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.5.2 Transmisión y reservorio

El principal problema a la hora de trabajar con *T. maritimum* es la dificultad para desarrollar un modelo de infección que sea reproducible, ya que, hasta la fecha, no se conoce con exactitud la vía de entrada de *T. maritimum* al hospedador.

Distintos estudios en los que se realizaron ensayos de virulencia utilizando diferentes vías de inoculación de *T. maritimum*, revelan que la transmisión se ve favorecida a través de la vía tópica por baño en comparación con la inyección (Wakabayashi y col., 1984; Baxa y col., 1987; Avendaño-Herrera y col., 2006b; Yamamoto y col., 2010), al producirse mayores mortalidades a través de la vía tópica. Baxa y col. (1987) postularon que era necesario realizar una preexposición con *T. maritimum* mediante un frotis o escarificación en la superficie del pez previa a la infección por inmersión. En ensayos posteriores se postula que la inmersión sin previa escarificación es el método de infección más eficaz para este patógeno (Mabrok y col., 2016).

Además, algunos estudios muestran que las lesiones provocadas por otros patógenos o las producidas por la manipulación de los peces en los tanques facilitan la entrada de *T. maritimum* al hospedador (Kimura y Kusuda, 1983; Chen y col., 1995). Asimismo, se ha comprobado que las úlceras producidas por *T. maritimum* permiten la invasión de otros microorganismos (Campbell y Buswell, 1982; Chen y col., 1995; Handlinger y col., 1997; Bodammer, 2000; Law, 2001; Mastan y Qureshi, 2001; 2003; Udomkusonsri y col., 2004).

Adicionalmente, el análisis del mucus de la piel de peces infectados por *T. maritimum* evidencia un retraso en la respuesta inmune en comparación con la encontrada a nivel sistémico, y un aumento de determinadas enzimas que parece que juegan un papel importante en la defensa del hospedador (Guardiola y col., 2019).

T. maritimum ha sido aislado de la superficie y del agua de tanques de peces diagnosticados con tenacibaculosis (Carson y col., 1993; Santos y col., 1999). También se ha encontrado que esta bacteria está asociada al incremento de la población de medusas y el piojo de mar, sugiriendo que pueden actuar como vectores de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

transmisión del microorganismo (Barker y col., 2009; Ferguson y col., 2010; Delannoy y col., 2011; Fringuelli y col., 2012; Downes y col., 2018). Sin embargo, *T. maritimum* presenta una supervivencia limitada en agua de mar no estéril, tal y como apuntan Avendaño-Herrera y col. (2006c).

Estudios recientes citan el posible papel del comercio y el transporte de peces reproductores, así como las aguas de lastre de los buques en la diseminación de *T. maritimum* (Brinkmeyer, 2016; Frisch y col., 2017; Georgiades y col., 2021). Concretamente, Brosnahan y col. (2019) apuntan a que la presencia de *T. maritimum* en Nueva Zelanda es debida a la introducción de salmónidos importados desde Tasmania, Norteamérica y Europa entre 1880 y 1960. Igualmente, Nekouei y col. (2018) aislaron *T. maritimum* de aguas de diferentes regiones de Canadá, sugiriendo que la diseminación de este patógeno puede haberse dado por las actividades en las piscifactorías de la zona.

1.5.3 Rangos de hospedador y distribución geográfica

Tenacibaculum maritimum ha sido aislada a partir de distintas especies de peces y localizaciones geográficas (Tabla 3). El primer aislamiento de *T. maritimum* se realizó en Japón a partir de pargo negro (*Acanthopagrus schlegelii*) y pargo japonés (*Pagrus major*) tras la aparición de grandes mortalidades en estas especies (Masumura y Wakabayashi, 1977; Hikida y col., 1979; Wakabayashi y col., 1984; 1986). Posteriormente, este patógeno ha sido aislado en Japón a partir de otras especies de peces (Tabla 3).

En el continente europeo, la tenacibaculosis se ha convertido en una de las enfermedades que más afectan a las especies cultivadas en acuicultura. En Europa, *T. maritimum* fue identificado como el microorganismo causante de esta enfermedad por primera vez en el lenguado común (*Solea solea*) en Escocia (McVicar y White, 1979; 1982; Campbel y Buswell, 1982; Bernardet y col., 1990). Esta bacteria ha sido aislada de lenguado común en España (Avendaño-Herrera y col., 2004a) y más recientemente en Holanda (Habib y col., 2014). A partir de la década los 90, se han reportado numerosos casos de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tenacibaculosis en distintas especies de peces de elevado valor comercial en las que se han producido altas mortalidades y, en consecuencia, pérdidas económicas considerables. Por ejemplo, *T. maritimum* ha sido detectado en lubina (*Dicentrarchus labrax*) en Francia (Pépin y Emery, 1993; Bernardet y col., 1994), en Malta (Bernardet, 1998), en Italia (Salati y col., 2005), en Grecia (Kolygas y col., 2012) y en Turquía (Yardimci y Timur, 2016). En dorada (*Sparus aurata*), *T. maritimum* ha sido aislada en España (Avendaño-Herrera y col., 2004a; 2004b), Italia (Salati y col., 2005) y Grecia (Kolygas y col., 2012). En rodaballo (*Scophthalmus maximus*) se han detectado casos en la Península Ibérica (Devesa y col., 1989; Alsina y Blanch, 1993; Pazos y col., 1993; Avendaño-Herrera y col., 2004a; 2004b), Italia (Magi y col., 2007), Francia (Habib y col., 2014) y Noruega (Olsen y col., 2017). Otra de las especies importantes en acuicultura es el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), en el que se han detectado brotes de tenacibaculosis en la Península Ibérica (Cepeda y Santos, 2002; Avendaño-Herrera y col., 2004a; 2004b; Avendaño-Herrera y col., 2005a). El salmón del Atlántico también ha sufrido numerosos brotes de tenacibaculosis en distintos países del continente europeo como España (Pazos y col., 1993), Escocia (Ferguson y col., 2010) e Irlanda (Downes y col., 2018) (Tabla 3).

Por otra parte, en Estados Unidos *T. maritimum* también ha sido aislada a partir de distintas especies de peces entre las que destacan el salmón del Atlántico, la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (Frelier y col., 1994) y el salmón real (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Chen y col., 1995), entre otros. Asimismo, en Canadá se han detectado brotes de tenacibaculosis en distintos salmónidos como el salmón del Atlántico (Kent, 1992; Ostland y col., 1999; Frisch y col., 2017), el salmón rojo (*Oncorhynchus nerka*) (Nekouei y col., 2018) o el salmón coho (*Oncorhynchus kisutch*) (Nekouei y col., 2019) (Tabla 3).

1.5.4 Factores que favorecen la aparición de la enfermedad

Algunos estudios relacionan el incremento de la temperatura (Tª) del agua (>15ºC) con la aparición de tenacibaculosis (Campbell y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Buswell, 1982; McVicar y White, 1982; Wakabayashi y col., 1986; Handlinger y col., 1997; Avendaño-Herrera y col., 2006a; Brosnahan y col., 2019). Este crecimiento de *T. maritimum* condicionado por la Tª del agua (Downes y col., 2018), puede estar relacionado a su vez con la procedencia geográfica de la bacteria, ya que los aislados de Australia crecen a Tª más bajas (8ºC) que los aislados de Europa y Japón (15ºC) (Soltani y Burke, 1994; Barker y col., 2009).

La tenacibaculosis afecta sobre todo a peces juveniles, pero también se desarrolla en peces adultos (McVicar y White, 1979; Wakabayashi y col., 1984; 1986; Kent, 1992; Frelier y col., 1994; Bernardet y col., 1994; Cepeda y Santos, 2002; Toranzo y col., 2005; Småge y col., 2016).

Otros factores como el estrés, las lesiones producidas en el transporte, un aumento de la salinidad y una mala calidad de agua, las patologías asociadas a las branquias, el exceso de radiación ultravioleta y la elevada densidad de población de los tanques, favorecen la aparición de la tenacibaculosis (Chen y col., 1995; Handlinger y col., 1997; McVicar y White, 1982).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 3. Especies de peces de las cuales se ha aislado *T. maritimum*, indicando el origen geográfico y el año.

FAMILIA	HOSPEDADOR (NOMBRE COMÚN)	HOSPEDADOR (NOMBRE CIENTÍFICO)	ORIGEN GEOGRÁFICO	REFERENCIA
Salmónidos (*Salmonidae*)	Salmón del Atlántico	*Salmo salar*	España	Pazos y col. (1993)
			Australia	Soltani y Burke (1994); Handlinger y col. (1997); Powell y col. (2004)
			Canadá (CB)	Kent (1992); Ostland y col. (1999); Frisch y col. (2017)
			Noruega	PHARMAQ-Analytiq, 2017
			Chile	Apablaza y col. (2017)
			Escocia	Ferguson y col. (2010)
			EE. UU. (Washington)	Frelier y col. (1994)
			Irlanda	Downes y col. (2018)
	Salmón real/chinook	*Oncorhynchus tshawytscha*	EE. UU. (California)	Chen y col. (1995)
			Nueva Zelanda	Brosnahan (2019)
	Salmón coho	*Oncorhynchus kisutch*	Canadá	Nekouei y col. (2019)
	Salmón rojo	*Oncorhynchus nerka*	Canadá	Nekouei y col. (2018)
	Trucha arcoíris	*Oncorhynchus mykiss*	Australia	Soltani y col. (1996); Handlinger y col. (1997)
			EE. UU. (Washington)	Frelier y col. (1994)

FAMILIA	HOSPEDADOR (NOMBRE COMÚN)	HOSPEDADOR (NOMBRE CIENTÍFICO)	ORIGEN GEOGRÁFICO	REFERENCIA
			Chile	Valdés y col. (2021)
Soleidos (*Soleidae*)	Lenguado senegalés	*Solea senegalensis*	Portugal	Cepeda y Santos (2002); Avendaño-Herrera y col. (2005a)
			España	Cepeda y Santos (2002); Avendaño-Herrera y col. (2004a; 2004b; 2005a)
	Lenguado común	*Solea solea*	Reino Unido	McVicar y White (1979, 1982); Campbell y Buswell (1982); Bernardet y col. (1990)
			Holanda	Habib y col. (2014)
			España	Avendaño-Herrera y col. (2004a)
	Acedía	*Dicologoglossa cuneata*	España	Chen y col. (1995); López y col. (2009)
Escoftálmidos (*Scophthalmidae*)	Rodaballo	*Scophthalmus maximus*	España	Devesa y col. (1989); Alsina y Blanch (1993); Pazos y col. (1993); Avendaño-Herrera y col. (2004a; 2004b)
			Portugal	Avendaño-Herrera y col. (2004b)
			Chile	Bernardet y col. (1998); López y col. (2009)
			Francia	Habib y col. (2014)
			Noruega	Olsen y col. (2017)
			Italia	Magi y col. (2007)
Morónidos (*Moronidae*)	Lubina	*Dicentrarchus labrax*	Francia	Pépin y Emery (1993); Bernardet y col. (1994)
			Malta	Bernardet (1998)
			Italia	Salati y col. (2005)
			Grecia	Kolygas y col. (2012)
			Turquía	Yardimci y Timur (2016)

FAMILIA	HOSPEDADOR (NOMBRE COMÚN)	HOSPEDADOR (NOMBRE CIENTÍFICO)	ORIGEN GEOGRÁFICO	REFERENCIA
Esciénidos (*Sciaenidae*)	Lubina blanca	*Atractoscion nobilis*	EE. UU. (California)	Chen y col. (1995); Salati y col. (2005)
Espáridos (*Sparidae*)	Dorada	*Sparus aurata*	España	Avendaño-Herrera y col. (2004a; 2004b)
			Italia	Salati y col. (2005)
			Grecia	Kolygas y col. (2012)
	Besugo	*Pagellus bogaraveo*	España	Castro y col. (2007)
	Sargo	*Diplodus sargus*	Italia	Salati y col. (2005)
	Sargo picudo	*Diplodus puntazzo*	Italia	Salati y col. (2005)
	Dentón común	*Dentex dentex*	Italia	Salati y col. (2005)
	Pargo japonés	*Pagrus major*	Japón	Masumura y Wakabayashi (1977)
	Pargo negro	*Acanthopagrus schlegelii*	Japón	Masumura y Wakabayashi (1977); Wakabayashi y col. (1984); Wakabayashi y col (1986)
	Besugo negro	*Acanthopagrus butcheri*	Australia	Handlinger y col. (1997)
Percas (*Latidae*)	Barramundi	*Lates calcarifer*	Singapur	Labrie (2008)
			Australia	Soltani y col. (1996)
Pomacéntridos (*Pomacentridae*)	Damisela negra	*Neoglyphidodon melas*	Ornamental	ICES (2019)
			Egipto	Abd El-Galil y Hashiem (2011)
Lábridos (*Labridae*)	Lábrido de cola de escoba	*Cheilinus lunulatus*	Egipto	Abd El-Galil y Hashiem (2012)
Pleuronéctidos (Pleuronectidae)	*Platija dorada*	*Rhombosolea tapirina*	Australia	Soltani y col. (1996); Handlinger y col. (1997)

FAMILIA	HOSPEDADOR (NOMBRE COMÚN)	HOSPEDADOR (NOMBRE CIENTÍFICO)	ORIGEN GEOGRÁFICO	REFERENCIA
Lenguados areneros (*Paralichthyidae*)	Platija japonesa	*Paralichthys olivaceus*	Japón Corea	Baxa y col. (1986) Jang y col. (2009)
Peces ballesta (*Balistidae*)	Pez ballesta picasso	*Rhinecanthus assasi*	Ornamental Egipto	ICES (2019) Abd El-Galil y Hashiem (2011)
Tetraodóntidos (*Tetraodontidae*)	Pez globo japonés	*Takifugu rubripes*	Japón	Rahman y col. (2014)
Peces grumo (*Cyclopteridae*)	Lumpo	*Cyclopterus lumpus*	Noruega	Småge y col. (2016)
Engráulidos (*Engraulidae*)	Anchoa del norte	*Engraulis mordax*	EE. UU. (California)	Chen y col. (1995)
Pagualas (*Ephippidae*)	Pez murciélago orbicular	*Platax orbicularis*	Polinesia Francesa	Bardon-Albaret y col. (2016)
Sardinas (*Clupeidae*)	Sardina del Pacífico	*Sardinops sagax*	EE. UU. (California)	Chen y col. (1995)
Oplegnathidae	Pez pico rayado	*Oplegnathus fasciatus*	Japón	Wakabayashi y col. (1986)
Odontaspidídos (*Odontaspididae*)	Tiburón toro	*Carcharias taurus*	Italia	Salati y col. (2005); Florio y col. (2016)
Trompetistas (*Latridae*)	Trompetista rayado	*Latris lineata*	Australia	Carson y col. (1992); Handlinger y col. (1997)
Rubios (*Triglidae*)	Rubio	*Chelidonichthys lucerna*	Italia	Avendaño-Herrera y col. (2006a)
Lisas (*Mugilidae*)	Salmonete de ojos amarillos	*Aldrichetta forsteri*	Australia	Handlinger y col. (1997)
Carángidos (*Carangidae*)	Pez de cola amarilla	*Seriola quinqueradiata*	Japón	Baxa y col. (1988a; 1988b); Avendaño-Herrera y col. (2006a)

EE. UU.: Estados Unidos; CB: Columbia Británica

1.6 *Tenacibaculum maritimum*

1.6.1 Taxonomía

La taxonomía de bacterias pertenecientes a los géneros *Cytophaga* y *Flexibacter* (Complejo *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*) ha resultado confusa durante varias décadas (Lewin y Lounsbery, 1969; Bernardet y Grimont, 1989; Hahnke y col., 2016), produciéndose distintos cambios según las características de estas bacterias. En concreto, *T. maritimum* ha sido descrita con diferentes nombres a lo largo de los años. Los primeros aislados de *T. maritimum* en 1977 y 1979 en Japón fueron caracterizados por Hikida y col. (1979), quienes propusieron el nombre de *Flexibacter marinus.* Debido a que el adjetivo *marinus* había sido utilizado anteriormente en *Vibrio marinus,* se propuso denominar a la bacteria como *Flexibacter maritimus* (*F. maritimus*) (Wakabayashi y col., 1986), depositándose en la Colección Nacional de Bacterias Industriales y Marinas (NCIMB, del inglés *Nacional Collection of Industrial and Marine Bacteria*) una cepa aislada de *Pagrus major* como cepa tipo (NCIMB 2154^{T}). Posteriormente, Reichenbach y col. (1989), proponen el nombre de *Cytophaga marina* como una nueva especie, incluyendo la cepa NCIMB 2153 aislada de *Acanthopagrus schlegelii* como cepa tipo. Más adelante, estudios de hibridación ADN-ADN demuestran que ambas cepas correspondían a la misma especie (Bernardet y Grimont, 1989) y se le da prioridad al nombre *F. maritimus* siendo reconocida la cepa NCIMB 2154 como cepa tipo (Holmes, 1992).

Posteriormente, mediante el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen ADN girasa (*gyrB*) y del gen 16SARN ribosómico y de la secuencia de aminoácidos de la proteína GyrB de aislados pertenecientes a los grupos *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides*, se propuso la inclusión de *F. maritimus* en un nuevo género denominado *Tenacibaculum* (Te.na.ci.ba´cu.lum. L. adj. n. *tenax* adhesión rápida; L. neut. n. *baculum* bastón), que significa microorganismos con forma de bacilo y que se adhieren a superficies (Suzuki y col., 2001). Este género *Tenacibaculum* propuesto por Suzuki y col (2001) incluiría aislados pertenecientes a las especies *Flexibacter maritimus* y *Flexibacter*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ovolyticus. Así, la bacteria finalmente pasó a llamarse *Tenacibaculum maritimum* (Suzuki y col., 2001). Por tanto, actualmente, *Tenacibaculum maritimum* se encuentra dentro del filo "*Bacteroidetes*", clase *Flavobacteriia*, orden *Flavobacteriales*, familia *Flavobacteriaceae*, género *Tenacibaculum* (McBride, 2014).

1.6.2 Caracterización bioquímica

T. maritimum ha sido caracterizada por muchos autores, utilizando métodos convencionales en tubo y placa y métodos miniaturizados como el sistema API®ZYM (Pazos y col., 1993; Chen y col., 1995; Bernardet y Grimont, 1989; Bernardet y col., 1990; Ostland y col., 1999; Suzuki y col., 2001), poniendo de manifiesto la existencia de una gran homogeneidad en los resultados de las pruebas morfológicas y bioquímicas. A pesar de esta uniformidad a nivel fenotípico, las técnicas clásicas muestran una limitada utilidad a nivel epidemiológico puesto que no permiten establecer diferencias entre las cepas de *T. maritimum* procedentes de un mismo o distinto origen geográfico u hospedador.

T. maritimum es un bacilo alargado (0,5x2-30μm), Gram-negativo, aerobio estricto y con movimiento deslizante sin la presencia de flagelos. Se trata de una bacteria filamentosa que tras varios días en cultivo tiende a acortarse y adquiere una conformación esférica denominada esferoplasto. El tiempo de cultivo de esta bacteria es de 2 a 4 días y su Tª de crecimiento oscila entre los 15 y los 34ºC, llegando incluso a darse algunos casos de crecimiento a 8ºC (Suzuki y col., 2001; Småge y col., 2016). Esta bacteria crece a pH entre 5,9 y 8,6 y, a diferencia de otras bacterias halófilas obligadas, necesita todas las sales del agua de mar para crecer (Avendaño-Herrera y col., 2006a). Para evitar que se formen agregados, los cultivos líquidos deben mantenerse con una fuerte agitación (Burchard y Schwarz, 1989; Sorongon, y col., 1991; Mabrok y col., 2016).

T. maritimum es catalasa y oxidasa positiva, hidroliza caseína y gelatina, pero no agar ni celulosa, absorbe el rojo Congo, no posee pigmentos de tipo flexirrubina y no produce ácido sulfhídrico, entre otras características (Wakabayashi y col., 1986; Suzuki y col., 2001) (Tabla 4).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 4. Características fenotípicas de *T. maritimum* descritas por distintos autores (Wakabayashi y col., 1986; Chen y col., 1995; Gosink y col., 1998; Suzuki y col., 2001; Avendaño-Herrera y col., 2006a).

CARACTERÍSTICAS	***T. maritimum***
Movilidad deslizante	+
Pigmento de flexirrubina	-
Adherencia al agar	(+)
Absorción rojo Congo	+
Carácter Gram	-
Metabolismo Oxidativo/Fermentativo	Oxidativo
Reducción de nitratos	+*
Tamaño celular	0,5x2-30µm
Tª de crecimiento	15-34ºC
Crecimiento en:	
NaCl	No crece
Agua de mar (%)	30 -100
Rango de pH	5,9-8,6
Producción de:	
Citocromo oxidasa	+
Catalasa	+
Ácido sulfhídrico	- *
Degradación de:	
Caseína	+
Gelatina	+ *
Almidón	-
Tirosina	+
Carbometilcelulosa	-
Quitina	-
Crecimiento en:	
Casaminoácidos	+
N-acetilglucosamina	- *
Sucrosa	- *
D-ribosa	- *
DL-aspartato	-
L-prolina	-
L-glutamato	d(-)

+ , prueba positiva; – , prueba negativa; d, resultado débil; * , resultados diferentes en los estudios.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El diagnóstico de la tenacibaculosis causada por *T. maritimum* comienza por el aislamiento de esta bacteria de la superficie y órganos internos de los peces susceptibles de sufrir la enfermedad y su siembra en medios de cultivo apropiados para este patógeno. Anteriormente, el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de *T. maritimum* era el de Anacker y Ordal (AOA, del inglés *Anacker Ordal Agar*) (Hikida y col., 1979; Wakabayashi y col., 1984; 1986; Handlinger y col., 1997; Salati y col., 2005) disuelto en agua de mar. Actualmente, los dos medios principales para el cultivo de *T. maritimum* son el Agar Marino (AM) (Campbell y Buswell, 1982; Alsina y Blanch, 1993; Avendaño-Herrera y col., 2006a; Romero y col., 2010; Vilar y col., 2012) y el FMM (del inglés, *Flexibacter maritimus Medium*) (Pazos y col., 1996; Cepeda y col., 2003; Vilar y col., 2012; Buller, 2014). El FMM se considera el medio más efectivo para el aislamiento y recuperación de *T. maritimum* ya que imposibilita el crecimiento de otros patógenos relacionados con la invasión de úlceras. Las colonias de *T. maritimum* en FMM se caracterizan por presentar un color amarillo pálido, con bordes irregulares, planas y adherentes al agar en mayor o menor medida (Pazos y col., 1996; Avendaño-Herrera, 2005). En el otro medio utilizado para el aislamiento de esta bacteria, el AM, las colonias son redondas y de color amarillo brillante (Campbell y Buswell, 1982; Alsina y Blanch, 1993; Avendaño-Herrera y col., 2006a) (Figura 3). El AM se encuentra disponible comercialmente (MA, 2216E), dispensado por los Laboratorios Difco, y el FMM por los Laboratorios Conda. El periodo de incubación de esta bacteria en los diferentes medios de cultivo oscila entre los 2 y 4 días a una temperatura comprendida entre los 20 y los 25ºC.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

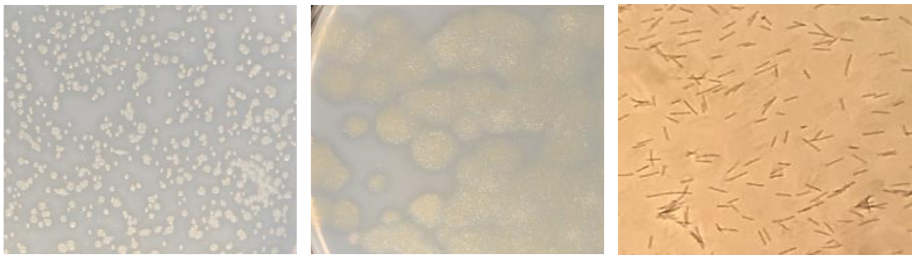


Figura 3. De izquierda a derecha, crecimiento de *T. maritimum* en AM, en FMM agar y vista al microscopio óptico con contraste de fases.

1.6.3 Caracterización serológica

El conocimiento a nivel antigénico del patógeno es un aspecto imprescindible tanto para el diagnóstico de la enfermedad, como para la selección de las cepas que permitan formular correctamente una vacuna contra la enfermedad (Romalde y col., 2005). En *T. maritimum* han sido aplicadas diferentes técnicas serológicas a la hora de realizar los estudios a nivel antigénico. Además, es necesario tener en cuenta que los antisueros utilizados en los diferentes métodos empleados difieren entre los distintos trabajos. Los primeros estudios serológicos descritos por Wakabayashi y col., (1984), basados en ensayos de aglutinación, describieron la homogeneidad antigénica entre los aislados de *T. maritimum*, con independencia de su origen y fuente de aislamiento. Esta homogeneidad antigénica fue corroborada en distintos estudios empleando diferentes técnicas como el análisis de las proteínas de la célula (Avendaño-Herrera y col., 2004a; Bernardet y col., 1994; Pazos y col., 1993; Avendaño-Herrera y col., 2004a; Van Gelderen y col., 2010a), ensayos de aglutinación (Baxa y col., 1988b; Ostland y col., 1999; Pazos y col., 1993), ensayos dot-blot (Pazos, 1997), ensayos de inmunodifusión (Baxa y col., 1988b; Ostland y col., 1999), y Western blots (Pazos, 1997; Ostland y col., 1999).

Sin embargo, posteriores trabajos demostraron la existencia de variabilidad antigénica utilizando las técnicas de microaglutinación (Baxa y col., 1988b; Pazos, 1997) y Western blot del lipopolisacárido (LPS) (Pazos, 1997) estableciendo seis (Baxa y col., 1988b) y cuatro serotipos (Pazos, 1997) dentro de esta especie sin relación con el origen de aislamiento. Ostland y col. (1999) también confirmaron la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

heterogeneidad antigénica de *T. maritimum* mediante Western blot del LPS, estableciendo una posible relación entre el serotipo y el origen geográfico de las cepas. Más adelante, Arenas y col. (2003) demuestra también la existencia de heterogeneidad antigénica mediante el ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), describiendo 3 serogrupos sin relación con el origen de aislamiento.

Avendaño-Herrera y col. (2004a; 2005a) demostraron mediante las técnicas de dot-blot y Western blot la existencia de al menos 3 serotipos distintos (O1, O2, O3) asociados principalmente al hospedador. Así, todos los aislados de dorada pertenecían al serotipo O1, todos los aislados de rodaballo al serotipo O2, y todos los aislados de lenguado a los serotipos O1 y O3. Estudios posteriores realizados por Castro y col. (2007), demostraron que los tres serotipos no estaban tan estrechamente asociados al hospedador, debido a que existían aislados de rodaballo pertenecientes al serotipo O3. Del mismo modo, Van Gelderen y col. (2010a) detectan dos y cuatro serotipos mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta y Western blot, respectivamente, los cuales tampoco están relacionados con la especie hospedadora. Los últimos estudios de serotipado realizados por Yardimci y Timur (2016) postulan que todos los aislados de dorada cultivada en Turquía, pertenecen al serotipo O1.

Por tanto, hasta la actualidad, se ha demostrado que *T. maritimum* es una especie homogénea a nivel bioquímico y de proteínas de membrana totales y externas (Bernardet y col., 1994; Pazos, 1997) y heterogénea a nivel antigénico, en la que se han descrito al menos cuatro serotipos distintos. Esta heterogeneidad antigénica se debe principalmente a las variaciones del antígeno O del LPS (Ostland y col., 1999; Van Gelderen y col., 2010a).

1.6.4 Caracterización molecular y métodos de diagnóstico

La primera técnica empleada para el estudio del genoma de *T. maritimum* fue la hibridación ADN-ADN (Bernardet y Grimont, 1989; Bernardet y col., 1994), mediante la cual no se pudieron establecer diferencias a nivel genético entre los aislados de este patógeno.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Posteriormente, Pazos (1997) demostró la existencia de diversidad genética entre aislados mediante la técnica de ribotipado utilizando la enzima *Pvu* II. Los resultados mostraron cinco patrones de ribotipado asociados a los cuatro serotipos descritos hasta el momento en *T. maritimum*, pero sin asociación entre hospedadores u origen geográfico.

En los últimos años, el desarrollo de las técnicas moleculares para la caracterización molecular de microorganismos ha progresado rápidamente. Avendaño-Herrera y col. (2004c) demostraron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *Polymerase Chain Reaction*) de amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD, del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*) que *T. maritimum* presenta variabilidad genética intraespecífica. Además, esta variabilidad genética entre cepas parece estar asociada al hospedador y/o al serotipo de cada cepa. Estos autores establecieron dos grupos genéticos distintos, uno formado por cepas aisladas de lenguado y dorada todas del serotipo O1 y otro con aislados de salmón y rodaballo, todas del serotipo O2.

Posteriormente, Fernández-Álvarez y col. (2018a) realizaron un estudio de tipificación de *T. maritimum* y otras especies de *Tenacibaculum* empleando las técnicas de PCR de amplificación de secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC, del inglés *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) y amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos (REP, del inglés *Repetitive Extragenic Palindromic Secuences*). Este estudio permitió establecer 5 perfiles genéticos distintos con la técnica REP-PCR, poniendo de manifiesto la variabilidad genética intraespecífica. Por el contrario, se comprobó que la técnica de ERIC-PCR no permite establecer perfiles genéticos distintos entre las cepas de *T. maritimum*, pero si diferenciarlas de los aislados pertenecientes a otras especies del género *Tenacibaculum*. Por tanto, para la bacteria *T. maritimum*, estas dos técnicas de tipificación molecular son útiles para diferenciar aislados de otras especies del mismo género, pero no resultan útiles como herramientas epidemiológicas, ya que no establecen relación entre los perfiles genéticos y su origen geográfico, origen de aislamiento o serotipo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Otra de las técnicas que ha sido ampliamente empleada para la caracterización molecular de *T. maritimum* ha sido el análisis de secuencia multigénica (MLSA, del inglés *MultiLocus Sequence Analysis*). El primer y más amplio estudio fue realizado por Habib y col. (2014), en el cual describen a *T. maritimum* como un grupo cohesivo y sugieren que los brotes de tenacibaculosis no están relacionados con la contaminación producida por el movimiento y transporte de peces entre áreas geográficas alejadas. Además, Habib y col. (2014), describen tres genotipos principales que parecen estar asociados al hospedador, año y origen geográfico. Olsen y col. (2017) consiguen mediante esta misma técnica identificar dos aislados como *T. maritimum*. Posteriormente, Frisch y col. (2017), muestran que los aislados canadienses de salmón del Atlántico están relacionados con los aislados de lumpo de Noruega y los aislados de salmón en Chile, y exponen que esta relación puede deberse a que la temperatura de cultivo de las especies de las que se recuperan estos aislados es la misma. Por tanto, la técnica de MLSA es una herramienta útil a la hora de realizar estudios epidemiológicos (Lin y col., 2014).

1.6.4.1 Métodos basados en la amplificación del ARNr 16S y otros genes

Para la identificación de *T. maritimum* se han diseñado distintos protocolos de PCR basados en la amplificación de genes conservados como el gen ARN ribosomal 16S (ARNr 16S). Para esta bacteria existen dos protocolos principales de PCR de identificación en los que se amplifica una región del gen ARNr 16S de 1088 pares de bases (pb), que permite la diferenciación de *T. maritimum* de otras flavobacterias (Toyama y col., 1996), o una región de 400 pb que permite diferenciar a *T. maritimum* de otras especies del género *Tenacibaculum* (Bader y Shotts, 1998). El principal inconveniente de estos dos protocolos anteriormente mencionados es la incapacidad de detectar bajos niveles del patógeno en muestras de peces con tenacibaculosis. Para resolver este problema, se desarrollaron distintos protocolos de PCR anidada de detección de *T. maritimum* a partir cultivos puros y mixtos (Cepeda y Santos, 2002; Avendaño-Herrera y col., 2004b) de muestras de peces infectados (Cepeda y col., 2003) y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de peces infectados experimentalmente (Avendaño-Herrera y col., 2004b). Adicionalmente se han probado protocolos de PCR-ELISA (Wilson y col., 2002), PCR con retrotranscriptasa inversa acoplados a ensayos de hibridación enzimática (RT-PCR-EHA) (Wilson y Carson, 2003) y pruebas de microarrays de ADN (Warsen y col., 2004), los cuales han demostrado ser útiles para la detección de *T. maritimum*.

También se han desarrollado protocolos de PCR cuantitativa (qPCR, del inglés *quantitative PCR*) en tiempo real como el de Fringuelli y col. (2012) basados en la amplificación de un fragmento del gen ARNr 16S. Este protocolo demostró ser altamente sensible para *T. maritimum* (4,8 número de copias por microlitro), pero sólo fue probado en tejidos fijados ya recolectados anteriormente susceptibles de presentar infección por este patógeno. El protocolo de Fringuelli y col. (2012) ha mostrado ser eficaz para la detección de *T. maritimum* a partir de cultivos procedentes de peces infectados (Frisch y col., 2018b; Nowlan y col., 2021). Frisch y col. (2018b) diseñaron una RT-PCR en tiempo real de una proteína externa de membrana (OmpA) específica de *T. maritimum*, la cual resultó ser menos sensible que la de Fringuelli y col. (2012). Fernández-Álvarez y col. (2019) desarrollaron un nuevo protocolo de PCR en tiempo real acoplado a una curva de desnaturalización basado también en la amplificación de un fragmento del gen ARNr 16S. Este protocolo permitió detectar la presencia de *T. maritimum* con una mayor sensibilidad (2,2 número de copias por microlitro) que el de Fringuelli y col. (2012) a partir de placas de cultivo, muestras de peces infectados y agua de mar.

Para la detección de *T. maritimum* en tejidos dónde exista la presencia de otros patógenos, López y col. (2012) desarrollaron una PCR multiplex combinada con una hibridación inversa. Esta técnica está basada en la hibridación de los productos de amplificación del gen ARNr 16S a sondas específicas, con el fin de detectar cambios en las secuencias amplificadas y así poder discriminar entre distintas especies de bacterias. Castro y col. (2014) describieron una PCR multiplex para la detección de *T. maritimum* y *Edwardsiella tarda (E. tarda)*. Chapela y col. (2018) también desarrollaron una PCR multiplex en tiempo real utilizando el gen *gyrB* para la detección de *T.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

maritimum y otros patógenos. La última PCR multiplex desarrollada ha sido descrita por Wilson y col. (2019), con la que aparte de detectar *T. maritimum* desde cultivos mixtos y puros, se pudo detectar la presencia de otros dos patógenos de peces del mismo género como son *Tenacibaculum dicentrarchi* (*T. dicentrarchi*) y *Tenacibaculum soleae* (*T. soleae*).

También se ha optimizado y validado un protocolo de PCR convencional y de qPCR para la detección de células viables de *T. maritimum* en tejido de piel de salmón (Brosnahan y col., 2019). Estas PCR de viabilidad (v-PCR, del inglés *viability PCR*) redujeron el potencial de falsos positivos en comparación con el uso de PCR y qPCR convencionales.

1.6.5 Caracterización proteómica y quimiotaxonómica

1.6.5.1 Caracterización proteómica

La espectrometría de masas mediante desorción/ionización láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF, del inglés *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) es una técnica muy útil para tipificación de bacterias (Singhal y col., 2015).

El primer análisis mediante la técnica de MALDI-TOF realizado en distintas especies de *Tenacibaculum* (Fernández-Álvarez y col., 2017) reveló que todas las especies del género *Tenacibaculum* analizadas mostraban un patrón de picos de masas característico de este género (m/z 2273.50; 2433.48; 2661.82; 4789.03; 5048.15; 5314.34; 10,507.39; 13,148.28). En este estudio también se identificaron picos de masas específicos para cada especie de *Tenacibaculum*, siendo el de *T. maritimum* un pico de m/z 9408.33. Posteriormente, los mismos autores (Fernández-Álvarez y col., 2018a) realizaron un estudio con la misma técnica con la intención de identificar los distintos serotipos descritos en distintas especies de *Tenacibaculum*. En el caso de *T. maritimum*, no fue posible detectar picos específicos para cada serotipo descrito dentro de esta especie.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Posteriormente, Bridel y col. (2020), realizaron una comparación de varios genomas de *T. maritimum* junto con un análisis mediante la técnica de MALDI-TOF. En este estudio se utilizó un enfoque similar al de la técnica de tipado de secuencia multigénica (MLST, del inglés, *MultiLocus Sequence Typing*) en el que se combinaron las distintas isoformas para designar perfiles de tipo MALDI (MT, del inglés *MALDI Type*) los cuales dieron lugar a diferentes grupos MALDI. De acuerdo con estos análisis, estos autores postularon que existe una relación entre el origen geográfico de las cepas y el MT designado, coincidentes con los resultados anteriores de MLSA (Habib y col., 2014).

1.6.5.2 Caracterización quimiotaxonómica

Los métodos quimiotaxonómicos como el análisis del perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, del inglés *Fatty Acid Methyl Esters*) se han aplicado con éxito en la clasificación de muchas especies bacterianas relevantes en acuicultura (Romalde y col., 1995; Piñeiro-Vidal y col., 2008; 2012). En estos estudios se analizan entre otros, el perfil de ácidos grasos para diferenciar un nuevo taxón entre los taxones existentes del género, o entre cepas de la misma especie. En cuanto a la caracterización quimiotaxonómica de *T. maritimum* en concreto, Piñeiro-Vidal y col. (2008) estudiaron si el perfil de ácidos grasos celulares podría facilitar la distinción de *T. maritimum* de otras bacterias del género *Tenacibaculum* e incluso diferenciar cepas procedentes de diferentes fuentes de aislamiento. Estos investigadores vieron que *T. maritimum* contenía 32 ácidos grasos diferentes, siendo el más abundante iso-$C_{15:0}$, seguido de iso-$C_{15:0}$ 3-OH, "*Summed in feature* 3" (que contiene $C_{16:1}\omega 7c$ ⁄o iso-$C_{15:0}$ 2-OH), iso-$C_{15:1}$G, iso-$C_{17:0}$ 3-OH e iso-$C_{16:0}$ 3-OH. Además, se observó que las cepas de *T. maritimum* aisladas de diferentes hospedadores y/o zonas geográficas diferían significativamente en las cantidades de algunos ácidos grasos (Iso-$C_{15:0}$-3-OH e iso-$C_{15:1}$G), lo que sugiere que el perfil de ácidos grasos podría utilizarse para distinguir las cepas aisladas de diferentes fuentes. Así, las cepas de *T. maritimum* se dividieron en dos grupos: el primero, caracterizado por su alto contenido en iso-$C_{15:1}$G; y el segundo, caracterizado por su alto contenido en iso-$C_{15:0}$ 3-OH. Por

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tanto, estos dos ácidos grasos podrían ser utilizados como marcadores quimiotaxonómicos para estudios epidemiológicos de *T maritimum*.

1.7 VÍA DE ENTRADA DE *T. maritimum*

La vía de entrada de este patógeno a los organismos marinos no ha sido descubierta todavía. Magariños y col. (1995) describieron que *T. maritimum* poseía una alta adherencia al mucus de distintas especies de peces y que resistía su acción bactericida.

1.7.1 Coinfecciones con otros patógenos marinos

En el sector de la acuicultura, las coinfecciones son muy comunes en las piscifactorías, aunque muchas veces se desconoce el efecto que pueden llegar a tener en los peces afectados.

Handlinger y col. (1997) describieron que las úlceras provocadas por *T. maritimum* permitían la entrada de otros microorganismos patógenos marinos como *Vibrio splendidus*. Más adelante, Ferguson y col. (2010) demostraron que *T. maritimum* era capaz de causar una infección secundaria en las branquias del salmón del Atlántico después de una lesión primaria en las mismas causada por nematocistos derivados de medusas (*Phialella quadrata*).

Posteriormente, Powell y col. (2005) y Downes y col. (2018) revelaron que la enfermedad amebiana de las branquias (AGD, del inglés *Amoebic Gill Disease*) no predispone a infecciones por *T. maritimum* y viceversa.

Wynne y col. (2020) postulan que la estomatitis bacteriana se caracteriza por una gran disbiosis de la comunidad microbiana dentro de la cavidad bucal, siendo *T. maritimum* la especie mayoritaria tanto en animales enfermos, sanos como en recuperados de la enfermedad, por lo que la presencia de este patógeno por sí solo no produce la enfermedad. Debido a la existencia de estudios que describen la presencia de especies de la familia *Flavobacteriacae*, entre los que se encuentran miembros del género *Tenacibaculum* en la piel sana del salmón del Atlántico cultivado (Karlsen y col., 2017), el estudio de Wynne y col. (2020) sugiere que una proporción de los peces

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

considerados sanos estaban subclínicamente o preclínicamente infectados con *T. maritimum*, pero no mostraban signos clínicos de la estomatitis bacteriana.

Además, Wynne y col. (2020) también observaron que la abundancia de muchas especies del género *Vibrio* se asociaba significativamente con la abundancia de *T. maritimum* en los peces que mostraban signos clínicos de estomatitis bacteriana. Por tanto, las especies del género *Vibrio* pueden actuar como patógenos oportunistas que colonizan los tejidos dañados tras la infección por *T. maritimum*.

En un último estudio realizado por Bateman y col. (2021) se observó que los niveles elevados de *T. maritimum* tanto en peces muertos como moribundos podrían poner de manifiesto el papel oportunista de esta bacteria, más que una causa directa de mortalidad. Además, dada su alta prevalencia general en peces, las coinfecciones podrían agravar la infección por *T. maritimum*, aumentando la mortalidad de los peces infectados.

1.7.2 Ensayos de infección

Uno de los principales inconvenientes a la hora de trabajar con *T. maritimum* es la incapacidad de desarrollar un modelo de infección. Existen numerosos estudios en los que se ha intentado reproducir la infección por *T. maritimum* en distintas especies de peces (Yamamoto y col., 2010; Mabrok y col., 2016; Frisch y col., 2018a).

El principal inconveniente de realizar un estudio de infección por inyección ya sea subcutáneo (SC) o intraperitoneal (IP), es que no reproduce de forma natural la infección bacteriana. Van Gelderen y col. (2009a; 2009b; 2010b; 2011) consiguieron reproducir la infección por el método de inyección IP, postulando que los productos extracelulares de *T. maritimum* jugaban un papel importante en el desarrollo de la tenacibaculosis. Sin embargo, en estudios realizados por Avendaño-Herrera y col. (2006b y Yamamoto y col. (2010) se observó que la inyección IP de *T. maritimum* no daba como resultado el desarrollo de la enfermedad.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a los ensayos de infección por inyección SC, se ha conseguido reproducir la enfermedad en lenguado común (Campbell y Buswell, 1982) y en rodaballo (Faílde y col., 2013). Además, Faílde y col. (2013) sugieren que la infección por inyección SC es más efectiva que la infección por inyección IP para el desarrollo de la tenacibaculosis.

Por otra parte, varios estudios ponen de manifiesto que la infección por baño con *T. maritimum* es el método más efectivo para reproducir la tenacibaculosis (Avendaño-Herrera y col., 2006b; Nishioka y col., 2009; Frisch y col., 2018a). Para llevar a cabo esta infección por baño o inmersión, en algunos estudios se realizaba una escarificación en la superficie de los peces como paso previo a la infección (Wakabayashi y col., 1984; Baxa y col., 1987; Powel y col., 2004; 2005). En investigaciones posteriores se demostró que no era necesario realizar estas escarificaciones si se prolongaba el tiempo de inmersión con el patógeno (Avendaño-Herrera y col., 2006b; Mabrok y col., 2016). Además, Yamamoto y col. (2010) concluyeron que una inmersión de los peces en una solución de *T. maritimum* por un breve periodo de tiempo seguida de un contacto prolongado de los mismos con una dilución de ese mismo baño con agua de mar, producía mortalidades más estables.

De acuerdo con los estudios mencionados, debido a que la infección por baño con *T. maritimum* es el modelo de infección que mejor reproduce la enfermedad, Mabrok y col. (2016) sugieren que la superficie de los peces puede ser el primer sitio por dónde accede *T. maritimum*, en base a las úlceras que produce. Este hecho ya había sido puesto de manifiesto en otros estudios como el de Magariños y col. (1995) y en el de Faílde y col. (2013).

1.8 FACTORES DE VIRULENCIA

Las bacterias patógenas producen varias moléculas conocidas como factores de virulencia que permiten a la bacteria la entrada, invasión y colonización del hospedador favoreciendo la evasión de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

respuesta inmune del mismo. La mayoría de estos factores son proteínas implicadas en la patogenicidad que están codificadas por genes del cromosoma bacteriano y/o plásmidos. Existen cuatro grupos principales de factores de virulencia: los componentes de la cápsula y la superficie celular, los factores de adhesión, colonización e invasión, las exotoxinas y los sistemas de captación de hierro.

1.8.1 Componentes de la cápsula y de la superficie celular

La cápsula está reconocida como un mecanismo que protege a las bacterias y las vuelve más virulentas y resistentes al sistema inmune de los hospedadores. Avendaño-Herrera (2005) describió la presencia de envoltura capsular en *T. maritimum* mediante microscopía óptica y de transmisión. Por otra parte, el suero de los hospedadores produce un efecto bactericida sobre las bacterias. Para evadir este efecto bactericida, las bacterias presentan distintos tipos de antígenos en la superficie bacteriana que reaccionan a la respuesta inmune específica del hospedador. Entre estos mecanismos de resistencia al suero se encuentra el antígeno O de los lipopolisacáridos (Raetz y Whitfield, 2002).

1.8.1.1 Lipopolisacárido (LPS)

El LPS es el componente mayoritario de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, siendo una de las principales moléculas estructurales e inmunodominantes de la membrana externa. Los LPS también reciben el nombre de endotoxinas debido a su capacidad para activar una respuesta inmune en animales durante la infección (Alexander y Rietschel, 2001). Así, cuando el LPS pasa al torrente sanguíneo genera una activación del sistema inmune, produciendo citocinas que pueden dar lugar a un *shock* séptico (Shapira y col., 1996).

El LPS está localizado en la membrana externa, dónde la parte interior está formada por los fosfolípidos y en la parte exterior se encuentra el propio LPS (Figura 4). El LPS a su vez, está formado por una parte lipídica (lípido A), y una parte polisacarídica (núcleo interno y externo y antígeno O), unidas mediante un enlace covalente (Raetz y Whitfield, 2002). Debido a que el LPS se encuentra en contacto con el medio, es la superficie antigénica más importante de las bacterias

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Gram negativas. El LPS es una molécula anfifílica, en la que la parte hidrofóbica es el lípido A y la parte hidrofílica sería la parte polisacarídica. En cuanto a la variación estructural de cada una de las partes del LPS, el antígeno O es la parte más variable, seguida en menor grado del núcleo externo, siendo el núcleo interno y el lípido A las partes más conservadas (Rietschel y col., 1996). Esto es debido a que las partes más conservadas son las que están destinadas al mantenimiento de la integridad de la membrana externa, mientras que las partes más variables son las que están expuestas a las células fagocíticas o a los anticuerpos, entre otros (Heinrichs y col., 1998).

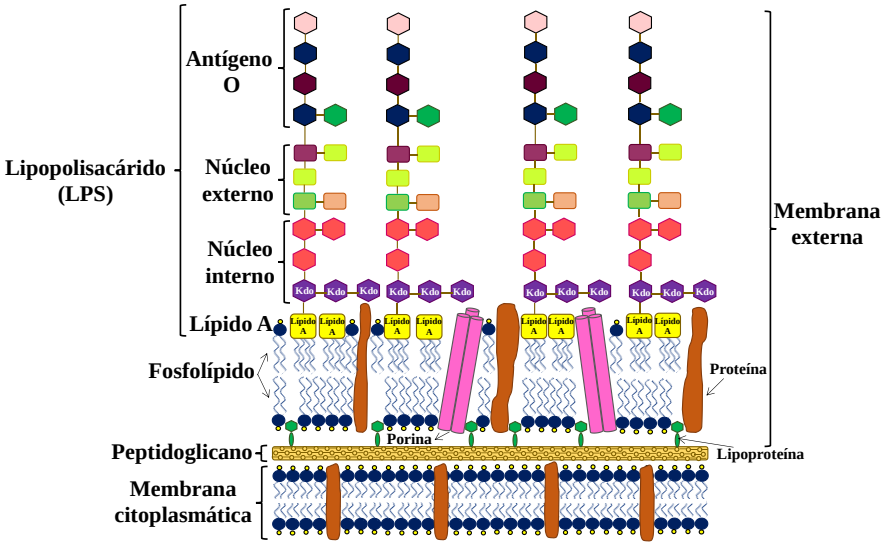


Figura 4. Estructura de la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Se muestra el LPS detallado.

Además, dentro de los LPS podemos distinguir dos tipos, el LPS liso y el rugoso. El LPS liso posee todas las partes del LPS y las bacterias que lo sintetizan se caracterizan por presentar colonias con bordes lisos en las placas de cultivo. Sin embargo, el LPS rugoso carece de la parte del antígeno O y en alguna ocasión no presenta el núcleo completo, o no es capaz de sintetizar el antígeno O, dándole a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

las colonias un borde rugoso característico en placa (Whitfield y col., 1997).

1.8.1.2 Partes del LPS

Lípido A

Es la parte más conservada del LPS y se encuentra unida a la parte más externa de la membrana externa, siendo una molécula esencial en el mantenimiento de la integridad estructural y estabilización de la membrana externa (De Cock y col., 1999). En cuanto a su estructura química, está compuesto por un disacárido de D-glucosamina unido por enlace β (1-6), con ácidos grasos unidos mediante enlaces éster en las posiciones 3 y 3´ y mediante enlaces amida en las posiciones 2 y 2´ (Aquilini, 2012). En cuanto a la organización genética del lípido A, aunque muchos de los genes están dispersos a lo largo del genoma de las bacterias ya que comparten rutas de biosíntesis con otras macromoléculas, los genes de biosíntesis del lípido A (*lpxA*, *lpxB* y *lpxD*) se encuentran agrupados en el mismo operón y codifican enzimas que utilizan el mismo sustrato (Klena y Schnaitman, 1993).

Núcleo

Es una de las partes polisacarídicas del LPS que se divide en núcleo interno y núcleo externo. El núcleo interno está formado por heptosas y residuos de Kdo (ácido 3-desoxi-D-manooctulosónico) y está bastante conservado a nivel estructural y genético entre bacterias. El núcleo interno está unido al lípido A por los residuos de Kdo. Por otro lado, el núcleo externo, formado por hexosas, está unido al antígeno O y presenta más variabilidad a nivel estructural (Aquilini, 2012). En cuanto a la organización genética de los genes del núcleo, la mayoría están localizados en un grupo llamado *waa* (Raetz y Whitfield, 2002).

Antígeno O

Es la otra parte polisacarídica del LPS y está unida al núcleo externo del LPS. Es la parte del LPS con mayor diversidad estructural. En cuanto a su composición, el antígeno O está formado por la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

repetición de una subunidad básica la cual está formada por un monosacárido o varios monosacáridos, dando lugar a subunidades lineales o ramificadas (Reeves y col., 1996). Debido a que el antígeno O se encuentra en la superficie de la bacteria, sirve de protección frente a la respuesta inmune de los hospedadores. Además, se ha estudiado que el antígeno O puede funcionar como una adhesina en algunos patógenos, permitiendo que la bacteria se una a las membranas de las mucosas de los hospedadores (Merino y col., 1996). En las bacterias marinas, el antígeno O es de naturaleza aniónica. Esta carga negativa permite que las uniones de la membrana sean más estables y se produzca un mejor empaquetamiento de la membrana, protegiendo a la bacteria de factores como la alta presión (Leone y col., 2007).

Existen 3 vías de biosíntesis del antígeno O, que se diferencian principalmente en el mecanismo de exportación del antígeno O a la membrana. La dependiente del gen *wzy* (polimerasa del antígeno O), la dependiente de los transportadores de ATP (transportadores de proteínas de membrana) y la dependiente de una enzima sintasa. En cuanto a la organización genética, de acuerdo con la nomenclatura de Reeves y col. (1996), los genes implicados en la biosíntesis del antígeno O se denominan *wb*-y los genes encargados del ensamblaje *wz*-.

1.8.1.3 Estudios del LPS en flavobacterias

En cuanto al estudio del LPS en flavobacterias (Nazarenko y col., 2011), existen distintos trabajos en los que se describe la estructura química del antígeno O. MacLean y col. (2001) describieron la estructura química del antígeno O del LPS de *Flavobacterium psychrophilum* (*F. psychrophilum*) y de *Flavobacterium columnare* (*F. columnare*) (MacLean y col., 2003) mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (NMR, del inglés *Nuclear Magnetic Resonance*) y espectrometría de masas, entre otras técnicas. Se vio que el antígeno O de *F. columnare* difería estructuralmente del de *F. psychrophilum.* Por otro lado, Vinogradov y col. (2003) describieron la posible estructura química del antígeno O de *Tenacibaculum*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

maritimum mediante la técnica de degradación ácida suave, observando diferencias con la de *F. psychrophilum*.

En cuanto al análisis molecular del LPS, existen diversos estudios en bacterias de la familia *Flavobacteriaceae*, así como en *T. maritimum*. En *F. psychrophilum*, La Frentz y col. (2007) analizaron el LPS mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot y vieron que existían dos patrones de bandas de carbohidratos distintos, que pertenecían al LPS y al glucocálix de la bacteria. En otro trabajo realizado por Rochat y col. (2017), se analizaron los genomas completos de varias cepas de *F. psychrophilum* para identificar los genes que determinan los serotipos, siguiendo el esquema de serotipado de Lorenzen y Olesen (1997). Estos autores revelaron que el gen *wzy* (polimerasa del antígeno O) era distinto en los diferentes serotipos y desarrollaron un protocolo de PCR multiplex para la discriminación entre cepas de los diferentes grupos serológicos de esta bacteria. En un último estudio publicado para *F. psychrophilum*, Cisar y col., 2019 describen que las estructuras del antígeno O de *F. psychrophilum* de dos cepas de distintos serogrupos son idénticas excepto por un enlace en el que participa el gen *wzy* (polimerasa de antígeno O) y por un gen que codifica una glicosiltransferasa (*wfpB*). Por tanto, esos dos genes son distintos en las cepas de distintos serogrupos de *F. psychrophilum*. Zhang y col. (2006), estudiaron los perfiles de LPS mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot en cepas de *F. columnare* y revelaron que las cepas que pertenecían a grupos genéticos distintos presentaban perfiles de LPS diferentes.

Con respecto a *T. maritimum*, Pazos (1997) y Ostland y col. (1999) realizaron Western blots del LPS de distintos aislados de *T. maritimum* y comprobaron que existían diferencias antigénicas dentro de esta especie bacteriana. Posteriormente, utilizando la misma técnica que los autores anteriores, Avendaño-Herrera y col. (2004a) revelaron que existían dos grupos serológicos principales con un patrón de LPS característico para cada uno de ellos, demostrando que las diferencias serológicas en *T. maritimum* estaban probablemente causadas por los antígenos O del LPS. Más adelante, Avendaño-Herrera y col. (2005a) demostraron la existencia de un nuevo grupo serológico distinto a los dos descritos con anterioridad (Avendaño-Herrera y col., 2004a),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

revelando que este nuevo serotipo mostraba un patrón de LPS diferente a los de los serotipos ya descritos. En un estudio posterior, Van Gelderen y col. (2010a) respaldan la evidencia de variación antigénica de *T. maritimum* al obtener perfiles distintos de LPS mediante Western blot.

1.8.2 Factores de adhesión y colonización: formación de biopelículas

Para que una bacteria patógena pueda causar una infección, primero se tiene que adherir a la superficie mucosa del hospedador. Burchard y col. (1990) describieron la gran capacidad de adhesión *T. maritimum* a superficies hidrofóbicas frente a las hidrofílicas, y al plástico, vidrio y agar (Pérez-Pascual y col., 2017a). Esta característica le permite sobrevivir en la superficie de los hospedadores, tal y como sucede en otros microorganismos (Toranzo y Barja 1993). A su vez, Carson y col. (1993) observaron una pérdida de adherencia cuando *T. maritimum* era cultivada en agua de mar artificial, con respecto al cultivo de agua de mar natural. Más tarde, Magariños y col. (1995) demostraron que *T. maritimum* se adhiere fuertemente a la piel y a la mucosa de los peces. Por tanto, esta bacteria es capaz de formar biopelículas que le permiten permanecer tanto en la superficie de los peces como en los tanques de cultivo, pudiendo ser una de las vías de transmisión de la tenacibaculosis (Vinogradov y col., 2003; Avendaño-Herrera y col., 2006a; Declercq y col., 2013; Frisch y col., 2017; Frisch y col., 2018a; Frisch y col., 2018b). Van Gelderen y col. (2010b) sugieren que los aislados más virulentos, son los que más biopelícula forman.

Además, Frisch y col. (2018a) señalaron la dificultad para realizar ensayos en peces con *T. maritimum* debido a la capacidad adhesiva y a la formación de agregados, lo que dificulta el ajuste de la densidad óptica (DO) del inóculo. Estos autores también señalan la dificultad para utilizar dosis específicas en las infecciones por baño, debido a que las biopelículas que se forman podrían extender la duración del ensayo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El último estudio de biopelículas en *T. maritimum* fue llevado a cabo por Levipan y col. (2019). En este estudio se comprobó que esta bacteria formaba biopelículas en superficies hidrófobas en un proceso de tres pasos, y que estaban formadas por células vivas y muertas con una mayor contribución de bacterias muertas en las últimas etapas del desarrollo de la biopelícula. También se han reportado casos de formación de biopelícula de *T. maritimum* en los dientes de los peces con estomatitis bacteriana (Frelier y col., 1994). A la hora de trabajar de forma experimental con *T. maritimum*, se ha comprobado que la agitación vigorosa de los cultivos líquidos reduce la formación de biopelículas (Sorongon y col., 1991; Mabrok y col., 2016).

1.8.2.1 Relación entre los sistemas de secreción, motilidad y formación de biopelícula en flavobacterias

La mayoría de los miembros del filo *Bacteroidetes* emplean el sistema de secreción de tipo IX (T9SS, del inglés *Type IX Secretion System*) para secretar adhesinas y proteínas responsables del movimiento deslizante (Mc Bride y Zhu, 2013; Mc Bride y Nakane, 2015). Existen distintos trabajos en bacterias de la familia *Flavobacteriaceae* en los que se ha estudiado la relación entre los sistemas de secreción, el sistema responsable del movimiento deslizante de la bacteria y la formación de biopelículas. Pérez-Pascual y col. (2017b) mutaron dos genes de *F. psychrophilum* responsables del movimiento deslizante (*gldD* y *gldG*), lo que implicó una reducción de la secreción de proteínas reguladas por el T9SS, adhesión, y capacidad de formación de biopelículas. Tanto Li y col. (2017) con *F. columnare* como Barbier y col. (2020) para *F. psychrophilum* realizaron una mutación para uno de los genes responsables de la motilidad (*gldN*).

En el caso de *F. columnare* (Li y col., 2017), el mutante no presentaba movimiento deslizante, había perdido la capacidad de secretar algunas proteínas extracelulares y su virulencia se vio disminuida. Es de destacar que en *F. columnare* se ha visto que los genes de adquisición de hierro se ven regulados al alza en las biopelículas de esta bacteria (Lange y col., 2020).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Para *F. psychrophilum* (Barbier y col., 2020), el mutante había perdido también su motilidad y su capacidad de secretar algunas proteínas extracelulares y además había perdido su capacidad de adhesión.

El último estudio realizado en *Flavobacterium johnsoniae* (*F. johnsoniae*) (Eckroat y col., 2021) reveló que el mutante para genes del T9SS y motilidad no eran capaces de formar biopelículas. Por otro lado, el mutante sólo para los genes del T9SS no producía casi biopelícula, pero el mutante para los genes de motilidad si producía biopelícula. Por tanto, para esta bacteria el T9SS es esencial para formar biopelículas, y aunque el sistema de motilidad no lo es, contribuye a que las biopelículas sean más consistentes.

Para *T. maritimum*, Pérez-Pascual y col. (2017a) detectaron los genes que codificaban para la síntesis de exopolisacáridos, adhesinas, lectinas y motivos de secuencias de unión a carbohidratos, así como los genes del T9SS. Se han encontrado 14 genes *gld*, responsables de la motilidad deslizante (de *gldA* a *gldN*) y los 10 genes de propagación *spr* (*sprA*, *sprB*, *sprC*, *sprD*, *sprE* y cinco genes parálogos *sprF*).

1.8.3 Factores de invasión y toxinas

De acuerdo con lo explicado en el apartado 1.5.1, se ha visto que, de forma general, no se producen aislamientos de *T. maritimum* a partir de órganos internos de peces con tenacibaculosis. También, en el apartado 1.7.2 se pone de manifiesto que la infección por baño es el modelo de infección que mejor reproduce la enfermedad y que la superficie de los peces puede ser el primer sitio por dónde accede *T. maritimum*, en base a las úlceras que produce (Mabrok y col., 2016). Por tanto, esta bacteria debe poseer mecanismos de virulencia que le permitan invadir y colonizar los tejidos de los hospedadores a los que infecta. Pérez-Pascual y col. (2017a) identifican distintas enzimas responsables de la rotura de la membrana y la lisis de las células de hospedador. Adicionalmente, el análisis del mucus de la piel de peces infectados por *T. maritimum* evidencia un retraso en la respuesta inmune en comparación con la encontrada a nivel sistémico y un aumento de determinadas enzimas que parece que juegan un papel

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

importante en la defensa del hospedador (Guardiola y col., 2019; Escribano y col., 2020).

1.8.3.1 Condroitinasa

Los glucosaminoglucanos (GAGs) son una familia de heteropolisacáridos lineales de carga negativa dispuestos a lo largo de la superficie celular y matriz extracelular de los animales. Estos GAGs tienen un papel principalmente estructural y se encuentran en el tejido epitelial, conectivo y óseo, entre otros (Wang y col., 2016). Atendiendo a su estructura química, los GAGs se clasifican en cuatro grupos, entre los que se encuentra el condroitin sulfato (CS). El condroitin sulfato está compuesto por unidades de disacárido repetidas que consisten en ácido D-glucurónico (GlcUA) unido N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) (GlcUAβ1-3GalNAc (Sugahara y col., 2003). Las condroitinasas (CSasas) reducen la rigidez de los tejidos conectivos causada por la pérdida de CS y permiten una diseminación más fácil de las bacterias por todo el hospedador. Debido a que la piel, el cartílago y las espinas de los peces son ricos en CS (Arima y col., 2013; Maccari y col., 2015), las CSasas desempeñan un papel importante en el desarrollo de lesiones e invasión de tejidos más profundos.

A nivel bioquímico, las CSasas son liasas de polisacáridos (PL, del inglés, *Polysaccharide Lyases*) que eliminan el enlace entre la hexosamina y el ácido urónico (Garron y Cygler 2010). Atendiendo al tipo de sustrato que degradan, las CSasas se pueden dividir en tres tipos distintos (Rani y col., 2018). Las CSasas ABC pertenecen a la familia 8 de las PL y pueden degradar tanto CS como otros dos GAG denominados dermatán sulfato (DS) y ácido hialurónico (AH). Un ejemplo de este grupo es la CSasa de *Proteus vulgaris* (Yamagata y col., 1968). El segundo tipo son las CSasas AC, pertenecientes también a la familia 8 de las PL, que tienen la capacidad de degradar CS y AH (Linhardt y col., 2006), como por ejemplo la CSasa de *Flavobacterium heparinum* (Payza y Kork, 1956). El tercer tipo son las CSasas B, de la familia 6 de las PL, que actúan sobre DS como la otra CSasa de *Flavobacterium heparinum* (Rani y col., 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.8.3.2 Condroitinasas en flavobacterias

La mayoría de los estudios están realizados con el patógeno de peces *F. columnare*. En uno de los primeros estudios se reveló la existencia del gen que codifica para la CSasa de *F. columnare*, siendo una CSasa de tipo AC (Xie y col.,2005). Posteriormente, Kunttu y col. (2011) describieron que la actividad CSasa en las cepas virulentas de tipo rizoide de *F. columnare* es mucho mayor que en las cepas no virulentas de tipo rugoso o liso. Más adelante, Suomalainen y col. (2006) revelaron que la actividad CSasa de *F. columnare* era mayor cuando se aumentaba la temperatura del ensayo de virulencia. Li y col. (2015) comprobaron que al eliminar los dos genes que codifican para las CSasas de *F. columnare* (*cslA* y *cslB*), la bacteria perdía su actividad CSasa. Sin embargo, la actividad CSasa no parece ser un factor de virulencia esencial, ya que la cepa sin los genes de la CSasa causaba la infección igualmente, aunque en menor medida que la salvaje.

En cuanto a *T maritimum*, Rahman y col. (2014) describieron que esta bacteria era capaz de degradar condroitin sulfato C. Posteriormente, Pérez-Pascual y col. (2017a) predijeron que esta bacteria tenía un gen (*clsA*) que codificaba para una CSasa de tipo AC de la familia 8 de las PL, muy similar a la de *F. columnare*. Estos autores comprobaron que *T. maritimum* era capaz de degradar condroitin sulfato A y C en placa y la proteína recombinante también. Además, comprobaron que otras especies del género como *Tenacibaculum discolor* (*T. discolor*), *T. soleae* o *Tenacibaculum jejuense* (*T. jejuense*) no muestran actividad CSasa en placa, por lo que la CSasa de *T. maritimum* podría ser uno de los factores de virulencia que le permite la invasión del tejido de los peces a los que infecta.

1.8.3.3 Sialidasas

El ácido siálico o ácido neuramínico es un monosacárido terminal con carga negativa que se encuentra unido a las cadenas de glucanos de glucolípidos y glucoproteínas, formando parte de los sitios de reconocimiento a los que se adhieren los patógenos (Varki y Varki,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2007). Los ácidos siálicos son azúcares de 9 carbonos que incluyen ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac), ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc), ácido 2-ceto-3-deoxi-d-glicero-d-galacto-nonulosónico (Kdn) y los ácidos legioamínico y pseudoamínico. Los ácidos siálicos contribuyen a la estabilización de las membranas y regulan los procesos biológicos que involucran interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular uniéndose a receptores de superficie específicos o enmascarando otros sitios de reconocimiento de carbohidratos (Cavalcante y col., 2021). Además, las mucosas de los animales contienen secreciones especialmente ricas en sialoglicanos, lo que contribuye a la adherencia de los patógenos mediante aglutininas, adhesinas y lectinas que se unen al ácido siálico (Lewis y Lewis, 2012).

Las sialidasas, también llamadas neuraminidasas, son glicosil hidrolasas encargadas de eliminar el enlace α-glucosídico que une al ácido siálico con las glucoproteínas y glucolípidos (Miyagi y Yamaguchi, 2012) y están presentes tanto en los animales vertebrados como en los microorganismos. Las sialidasas pueden ser endo-sialidasas, que hidrolizan dentro de un polímero de ácido siálico, o exo-sialidasas, que escinden solo el residuo terminal de ácido siálico. Dentro de las exo-sialidasas, se encuentran la sialidasa A, que rompe el enlace α2,3 del ácido siálico, la sialidasa B, que rompe los enlaces α2,3y α2,6, la sialidasa C, que rompe los enlaces α2,3, α2,6 y α2,8, y otra sialidasa que rompe los enlaces α2,3 α2,6, α2,8 y α2,9 (Sato y Kitajima, 2019). En algunas bacterias patógenas, las sialidasas funcionan como posibles factores de virulencia que contribuyen al reconocimiento de los ácidos siálicos expuestos en la superficie de la célula huésped (Vimr y col., 2004) como en la mucosa gastrointestinal (Sela y col., 2011). Además, algunos microorganismos utilizan el ácido siálico liberado como fuente de carbono (Lewis y Lewis, 2012). Es importante destacar que en diversas bacterias patógenas que provocan infección de mucosas, se ha visto que las sialidasas contribuyen a la formación de biopelículas, como en el caso de *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, y *Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa)* (Soong y col., 2006).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.8.3.4 Sialidasas en flavobacterias

Una de las bacterias de la familia *Flavobacteriaceae* en las que se ha descrito la presencia de la enzima sialidasa (en este caso, sialidasa C) es *Capnocytophaga canimorsus*. Esta bacteria está presente como comensal en la cavidad bucal de los perros y gatos y provoca infecciones tras la mordedura de estos animales. La sialidasa de esta bacteria le permite utilizar los aminoazúcares internos de cadenas de glucanos de glicoproteínas de la célula del hospedador como fuente de carbono para su supervivencia (Mally y col., 2008).

Pérez-Pascual y col. (2017a) describieron una sialidasa A (*siaA*) y demostraron su actividad mediante una prueba con un sustrato fluorogénico. En contraste, en otras especies de *Tenacibaculum* estudiadas por Pérez-Pascual y col. (2017a) incluidas las especies patógenas de peces *T. soleae* y *T. discolor*, no se identificó ningún gen que codificara para alguna sialidasa ni se obtuvieron actividades de esta enzima *in vitro*.

Este gen *siaA* se encuentra en una Isla Genómica (IG) en la que la parte 5´contiene genes que codifican para la escisión de polisacáridos (PUL, del *inglés Polysaccharide Utilisation Loci*) como los genes *susC* (receptor dependiente de TonB) y *susD* (proteína de unión), una N-acetilneuraminato liasa (*nanA*), una N-acil-D-glucosamina 2-epimerasa (*age*) y una N-acetilneuraminato epimerasa (*nanNT*) (Figura 5).

Se ha comprobado que la sialidasa de *C. canimorsus* es una lipoproteína expuesta periplásmica que procesa oligosacáridos tras la importación mediada por *susC* y *susD*, mientras que la sialidasa de *T. maritimum* está expuesta en la superficie celular y procesa el ácido siálico de las glicoproteínas. Por tanto, las dos sialidasas de estas bacterias realizan la misma función, pero de forma distinta.

Por último, Guardiola y col. (2019), detectaron una mayor cantidad de ácido siálico en el moco de la piel de los peces sometidos a un ensayo de virulencia con *T. maritimum* tras 72 h, en comparación con los valores encontrados a las 4 h, aunque no provocó variaciones en el perfil de carbohidratos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

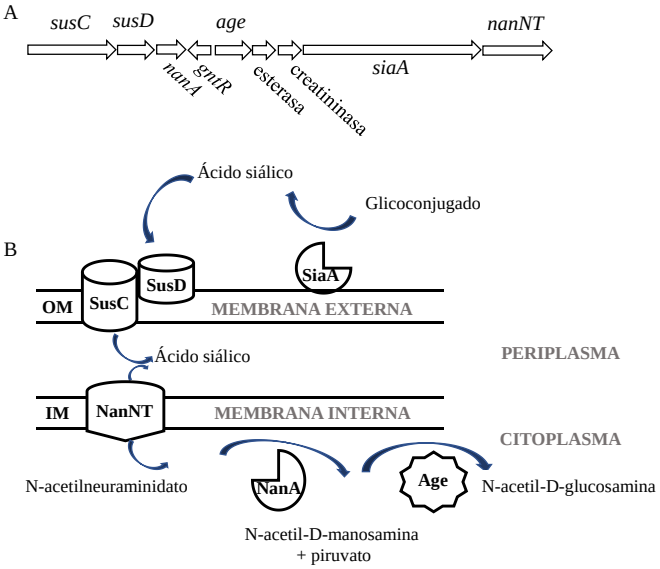


Figura 5. A: Representación esquemática de la localización del gen *siaA* de *T. maritimum*. B: Modelo de la utilización del ácido siálico por parte de *T. maritimum* (imagen modificada de: Pérez-Pascual y col., 2017a).

1.8.3.5 Esfingomielinasas y ceramidasas

La esfingomielina (SM) es un esfingolípido que se encuentra en las membranas plasmáticas de las células y además de tener un papel estructural, regula procesos de interacción entre el hospedador y las bacterias (Li y col., 2019). Las esfingomielinasas (SMasas) son fosfodiesterasas que hidrolizan la SM en fosfocolina y ceramida. La ceramida es un esfingolípido componente de las membranas plasmáticas de las células capaz de modificar las propiedades de la membrana, volviéndola más rígida o fluída o más o menos permeable. Cuando la SMasa hidroliza la SM, se incrementa la cantidad de ceramida, la cual media diversos procesos celulares como la proliferación, diferenciación y apoptosis, y media en la respuesta al estrés oxidativo e inflamación, entre otros (Xiang y col., 2021). A nivel bioquímico, las ceramidas están compuestas por una esfingosina

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

unida a un ácido graso de longitud y saturación variable. Las diversas funciones de la ceramida en las infecciones sugieren que las SMasas y la ceramida están implicadas en la respuesta del hospedador a muchos patógenos (Grassmé y Becker, 2013).

Las SMasas se pueden clasificar de acuerdo con el pH al que actúan en SMasa ácida lisosomal, la SMasa ácida de suero dependiente de Zn^{2+}, la SMasa neutra dependiente de Mg^{2+} unido a membrana, la SMasa neutra independiente de Mg^{2+} y la SMasa alcalina. (Goni y Alonso, 2002). Tanto las SMasas ácidas como las neutras, se pueden encontrar en diversos tejidos, mientras que las SMasas alcalinas sólo están presentes en el intestino (Simonis y Schubert-Unkmeir, 2018). De acuerdo con el enlace que hidrolizan, las SMasas bacterianas se pueden dividir en SMasa C, que hidroliza el enlace éster entre la ceramida y la fosfocolina como la de *Bacillus cereus* (*B. cereus*) o la de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*); y la SMasa D, que hidroliza el enlace fosfodiéster entre la ceramida-1-fosfato y la colina como las del género *Corynebacterium* (Flores-Díaz y col., 2016).

Un ejemplo de SMasas en bacterias marinas es la SMasa D hemolítica de *Photobacterium damselae subsp. damselae*, también denominada damselisina, que no está relacionada estructuralmente con las enzimas descritas anteriormente, pero que también degrada fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Kreger y col., 1987).

Por otro lado, las ceramidasas (CDasas) son responsables de hidrolizar la ceramida (CD) en esfingosina y ácidos grasos libres. Estas enzimas tienen como función la regulación de los niveles de ceramida y esfingosina que a su vez están implicados en procesos como la proliferación, diferenciación, apoptosis y autofagia celular (Coant y col., 2017). Al igual que con las SMasas, las CDasas también se dividen según el pH al que actúan en ácidas, neutras y alcalinas. La CDasa ácida está en los lisosomas, la CDasa neutra se localiza en la membrana plasmática, las mitocondrias y el aparato de Golgi y la CDasa alcalina se encuentra en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi (Sakamoto y col., 2019).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a *T. maritimum*, Pérez-Pascual y col. (2017a) identificaron un gen que codificaba para una SMasa con un péptido señal homólogo al de *B. cereus*. Se ha comprobado que la SMasa de *B. cereus* puede hidrolizar la SM de la membrana de los glóbulos rojos, lisándolos, lo que podría jugar un papel en la adquisición de hierro (Oda y col., 2010). Dada la homología entre la SMasa de esta bacteria con la de *T. maritimum*, cabría esperar que ésta presentara una actividad similar a la de *B. cereus*. Además, Pérez-Pascual y col. (2017a) clonaron el gen de la SMasa y comprobaron que la proteína recombinante producía actividad SMasa *in vitro*. Estos mismos autores también identificaron un gen que codificaba para una CDasa con un péptido señal y un dominio proteico homólogo al de *P. aeruginosa*. Okino e Ito (2007) revelaron que la CDasa de *P. aeruginosa* presentaba funciones relacionadas con la hemólisis en mamíferos. Dada la homología entre la CDasa de *P. aeruginosa* y la de *T. maritimum*, ésta puede estar relacionada también con la adquisición de hierro.

1.8.4 Sideróforos

1.8.4.1 El hierro como elemento esencial para los microorganismos

El hierro es un elemento químico esencial para la supervivencia de casi todos los seres vivos ya que forma parte de los centros activos de enzimas que participan en el Ciclo de Krebs, síntesis de aminoácidos o síntesis de ADN, entre otros (Miethke y Marahiel, 2007). A pesar de que es uno de los elementos más abundantes de la Tierra, no se encuentra biodisponible para su utilización por parte de los seres vivos. Esto es debido a que, en ambientes aeróbicos el hierro se oxida al ion +3 (Fe^{3+}) y forma de agregados insolubles (Wandersman y Delepelaire, 2004). Por otra parte, cuando el hierro se encuentra en su forma reducida (Fe^{2+}) es enormemente tóxico ya que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) en la reacción de Fenton (Cornelis y col., 2011). La baja disponibilidad de hierro es mayor en ambientes marinos, dónde se oxida con mayor facilidad (Price y Morel, 1998).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Debido a esta limitación, los hospedadores han desarrollado estrategias para adquirir hierro de la dieta y almacenarlo en proteínas transportadoras como la ferritina, lo que evita la toxicidad del hierro en su forma reducida. A su vez, los microorganismos patógenos han de disponer de mecanismos de adquisición de hierro capaces de extraer el metal de las fuentes del hospedador (Miethke, 2013). La producción de sideróforos está considerada como uno de los factores de virulencia más importantes. Los sideróforos son compuestos de naturaleza peptídica y bajo peso molecular que actúan como agentes solubilizadores de hierro. La mayoría de las bacterias patógenas los producen debido a que, al tener más afinidad por el hierro que la transferrina y la lactoferrina, son capaces de extraer el hierro de las proteínas transportadoras de los vertebrados (Neilands, 1995). Los sideróforos actúan como quelantes del ion Fe^{3+} y forman complejos hierro-sideróforo estables, los cuales deben ser transportados al interior celular a través de receptores de membrana específicos (Wandersman y Delepelaire, 2004). En las bacterias Gram-negativas, el complejo sideróforo-Fe^{3+} es reconocido por un transportador de membrana externa específico que depende del sistema de transducción de energía TonB. En la internalización del complejo ferri-sideróforo también intervienen transportadores de membrana interna de tipo ABC. Una vez en el citoplasma, el hierro Fe^{3+} es liberado del complejo mediante un proceso redox. Finalmente, el hierro (ahora convertido en Fe^{2+}) es incorporado al metabolismo celular (Wandersman y Delepelaire, 2004). La producción de sideróforos por parte de los microorganismos les dota a éstos de un sistema de captación de hierro eficiente, sobre todo en ambientes que fluctúan con facilidad (Mcrose y col., 2018).

1.8.4.2 Estructura química de los sideróforos y biosíntesis

Existen más de 500 sideróforos diferentes que se pueden clasificar en base al grupo funcional que se une al hierro. Siguiendo esta norma, existen 3 clases de sideróforos: catecolatos/fenolatos, hidroxamatos y carboxilatos (o ácidos α-hidroxicarboxílicos). También se han descrito sideróforos mixtos, los cuales presentan dos grupos funcionales distintos (Scarrow, 1985).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los sideróforos también se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de síntesis. Existen dos modos principales: la vía dependiente de péptido-sintetasas no ribosómicas (NRPS, del inglés *Non Ribosomal Peptide Synthetases*) (Barry y Challis, 2009; Koglin y Walsh, 2009; Strieker y col., 2010) y la vía independiente de NRPS (NIS, del inglés *NRPS Independent Siderophore*) (Challis, 2005; Oves-Costales y col., 2009). Las enzimas NRPS son grandes complejos enzimáticos multimodulares que actúan secuencialmente incorporando al péptido naciente sus diferentes constituyentes. La combinación de dominios determina la estructura final del sideróforo. Los sideróforos de tipo catecolato se sintetizan por NRPS y la ruta de síntesis más caracterizada es la del sideróforo enterobactina de *E. coli* (Raymond y col., 2003). Sin embargo, la mayoría de los sideróforos de tipo hidroxamato o carboxilato se sintetizan por vías NIS. Esta vía de biosíntesis NIS se caracteriza por la presencia de una o varias sintetasas dependientes de nucleótidos trifosfato encargadas de las reacciones de condensación durante la biosíntesis de sideróforos (Challis, 2005; Oves-Costales y col., 2009). Una de las rutas más estudiada es de la síntesis del sideróforo aerobactina (de Lorenzo y col., 1986). Los sideróforos sintetizados por la vía NIS suelen contener en su estructura diaminas, a excepción de la aerobactina, que contiene lisina en lugar de una diamina (Burrel y col., 2012).

Dentro de los sideróforos de tipo hidroxamato se pueden distinguir dos grupos. El primer grupo incluye sideróforos de estructura química lineal (abierta) que contienen citrato. El segundo grupo está formado por sideróforos de estructura cíclica basados en N-hidroxi-N-succinil-diaminas (HSD) (Figura 6). Los sideróforos de este segundo grupo pueden ser N-hidroxi-N-succinil-putrescina (HSP) o N-hidroxi-N-succinil-cadaverina (HSC). A su vez, dentro de los sideróforos de tipo HSC se encuentran distintos compuestos macrocíclicos o acíclicos, entre los que se hallan las bisucaberinas y las desferrioxaminas (Fujita y col., 2013). Dentro de los sideróforos de tipo HSC acíclicos, la mayoría son lineales con un grupo acetil u otro monocarboxilato en el extremo hydroxilamino-terminal.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.8.4.3 Sideróforos en el género *Tenacibaculum*

Uno de los primeros estudios sobre sideróforos en el género *Tenacibaculum* fue realizado por Avendaño-Herrera y col. (2005b). En este trabajo demostraron que la especie *T. maritimum* es capaz de crecer en condiciones de limitación de hierro y que las cepas utilizadas eran positivas para el ensayo colorimétrico de CAS (Cromo Azurol Sulfonato) (Schwyn y Neilands, 1987). Estos resultados permitieron concluir que *T. maritimum* produce algún tipo de sideróforo. Además, se sugiere que el sideróforo producido por *T. maritimum* no es ni de tipo hidroxamato ni de tipo fenolato pues las cepas eran negativas tanto en el ensayo de Arnow (Arnow, 1937), el cual cuantifica sideróforos de tipo catecolato, como en el test de Csáky (Csáky, 1948) con el que se detecta la producción de sideróforos hidroxamatos. Posteriormente, Jang y col. (2007) determinaron la estructura química de cuatro sideróforos de tipo hidroxamato a los que denominan tenacibactinas A, B, C y D (Figura 7) a partir de sobrenadantes de una cepa aislada de una marisma perteneciente a *Tenacibaculum sediminilitoris* (*T. sediminilitoris*),

Más recientemente, Fujita y col. (2013) aislaron el sideróforo producido por *Tenacibaculum mesophilum* (*T. mesophilum*) y mostraron que en su síntesis intervienen genes de biosíntesis de sideróforos basados en N-hidroxi-N-succinil cadaverina (HSC). Genes homólogos de este sistema de genes se habían descrito anteriormente en *Streptomyces coelicolor* (*S. coelicolor*) (Bahona-Gómez y col., 2004; Kadi y col., 2007), un metagenoma marino (Fujita y col., 2012) y *Alteromonas haloplanktis (A. haloplanktis)* (Kadi y col., 2008). Además, mostraron que la enzima D de *T. mesophilum* cataliza la oligomerización y no la macrociclación de este sideróforo, siendo el resultado una molécula lineal (Fujita y col., 2013). Por lo tanto, el sideróforo producido por *T. mesophilum* es una bisucaberina B de tipo lineal. Un sideróforo HSC lineal es inusual, ya que posee un ácido carboxílico en el extremo hidroxilamino terminal, y no un grupo monocarboxilato. Es de destacar que la bisucaberina B lineal la produce *T. mesophilum* como único sideróforo y no como un metabolito resultante de la descomposición de la desferrioxamina B, como se había descrito hasta ahora (Winkelmann y col., 1999).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En trabajos más recientes sobre la producción de sideróforos en el género *Tenacibaculum*, los autores clonaron el clúster de genes de biosíntesis en *T. mesophilum* (Fujita y col., 2018). Este sistema estaría formado por seis genes biosintéticos y no cuatro como en sistemas de sideróforos similares. Fujita y col. (2018) también realizaron la expresión heteróloga de la enzima BsbD2 necesaria para la síntesis de bisucaberina B (lineal), pero no de bisucaberina, que sería el análogo macrocíclico. Por tanto, la enzima BsbD2 es la primera enzima que sintetiza exclusivamente sideróforos lineales basados en HSD. Recientemente, Igarashi y col. (2022) han descrito tres sideróforos de tipo hidroxamato pertenecientes a las desferrioxaminas, denominadas tenacibactinas K, L y M (Figura 7) para la bacteria aislada a partir de coral, *Tenacibaculum aiptasiae* (Wang y col., 2008).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

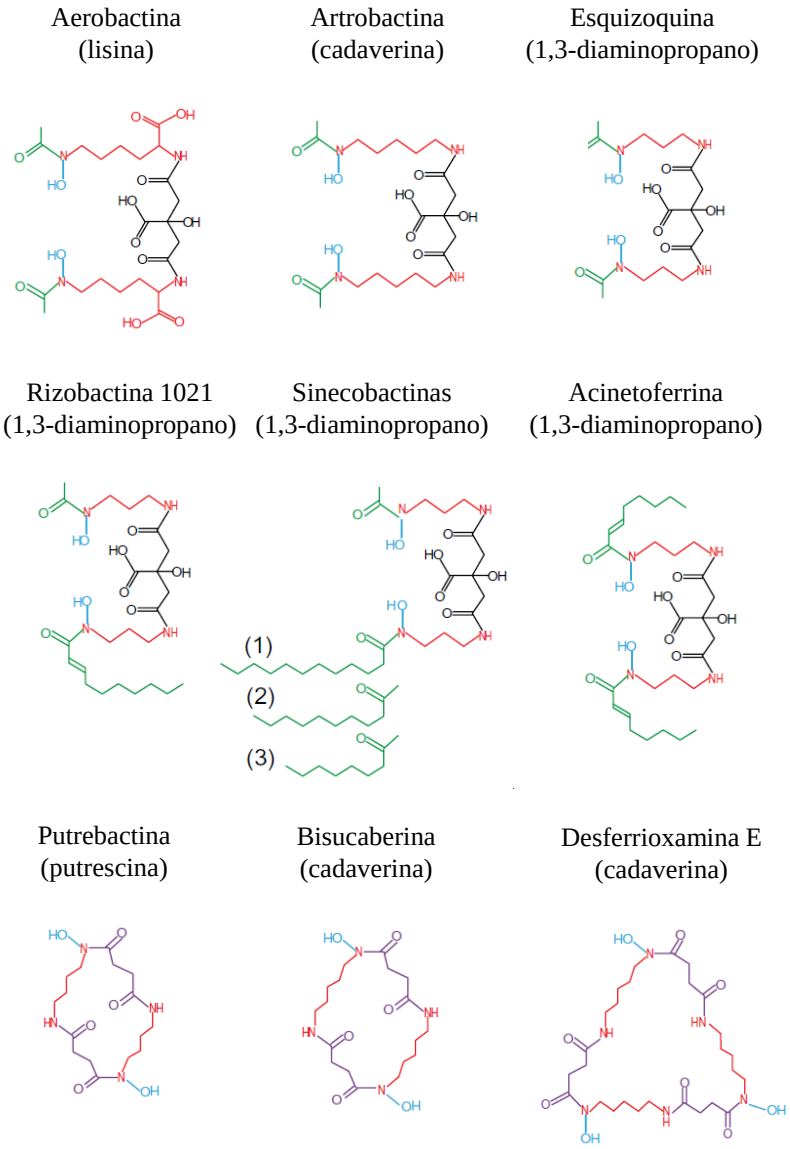


Figura 6. Estructuras de los sideróforos de tipo hidroxamato (vía de síntesis NIS). Las estructuras químicas de la lisina y las diaminas se indican en rojo; los grupos acilo en verde; los grupos hidroxilo en azul; los residuos de citrato en negro y los grupos succinil en morado (imagen modificada de: Burrel y col., 2012).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

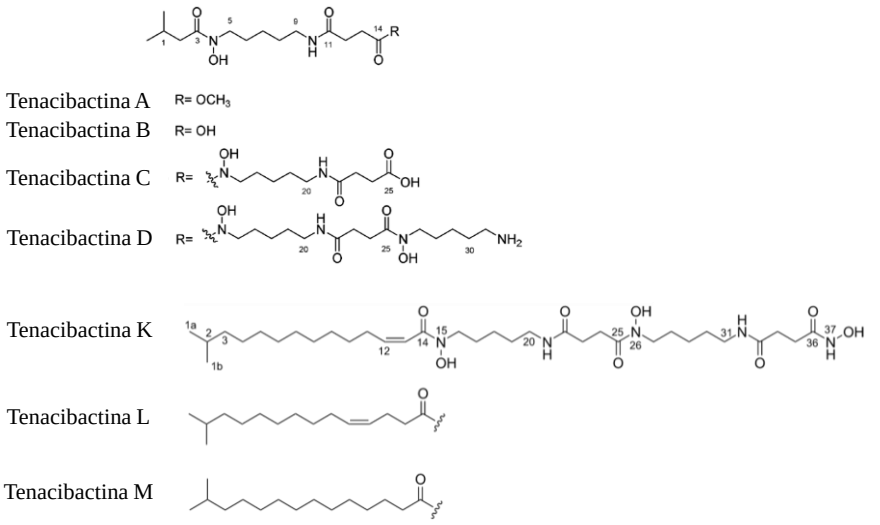


Figura 7. Estructuras propuestas por Jang y col. (2007) para *Tenacibaculum sediminilitoris* (tenacibactinas A, B, C y D), y por Igarashi y col. (2022) para *Tenacibaculum aiptasiae* (tenacibactinas K, L, M). (Imágenes modificadas de :Jang y col., 2007 e Igarashi y col., 2022)

1.9 PREVENCIÓN Y CONTROL DE LA ENFERMEDAD

1.9.1 Vacunación frente a la tenacibaculosis y estomatitis bacteriana

Actualmente, la vacunación es el principal método de prevención contra las infecciones bacterianas en los cultivos de peces en acuicultura. En cuanto a la vía de administración, la inyección IP es el método de vacunación más eficaz, aunque presenta limitaciones como el tamaño del pez o el estrés, entre otros (Miccoli y col., 2019). Por otro lado, la vacunación oral por medio del pienso se presenta como una buena opción en el caso de peces carnívoros como la dorada o la lubina. Actualmente, se propone a las vacunas de peces por vía mucosal para la vacunación por inmersión/oral (Mutoloki y col., 2015; Embregts y Forlenza, 2016), ya que podrían suministrarse en las primeras etapas del cultivo de los peces.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En cuanto a la inmunidad de *T. maritimum*, Guardiola y col. (2019) realizaron un ensayo de virulencia por baño que mostró un retraso en la respuesta inmune del mucus del lenguado, y un aumento significativo de los neutrófilos tras 48 y 72 horas. Posteriormente, Escribano y col. (2020) revelaron que la inmersión por baño en lenguado realizada con *T. maritimum* no influyó en el perfil hematológico. Por otro lado, Faílde y col. (2014) revelaron que la infección subcutánea de rodaballo con *T. maritimum* provocaba una respuesta inmune humoral que se tradujo en un aumento de leucocitos en sangre periférica y en el número y distribución de células Ig^+ en el bazo, riñón, timo, intestino y la piel.

Existen numerosos estudios que prueban distintas estrategias de vacunación contra *T. maritimum* en diversas especies de peces. Existe una patente concedida en el año 2000 de una vacuna frente a *T. maritimum* (FM-95) para la prevención de la enfermedad flexibacteriosis en rodaballo y peces salmónidos cultivados en agua de mar. Esta vacuna formulada con la cepa CECT 5045, es una vacuna inactivada con formol que se administra por inyección intraperitoneal (Santos y col., 1999). También se han probado distintas formulaciones experimentales en salmón del Atlántico (Carson y col., 1993) sin demostrar suficiente actividad protectora frente a *T. maritimum*. Van Gelderen y col. (2009a) demostraron una protección significativa del salmón del Atlántico frente a *T. maritimum* empleando una vacuna adyuvantada frente a una vacuna sin adyuvante, ambas inactivadas con formalina, aunque se observaron efectos secundarios del adyuvante oleoso (adyuvante incompleto de Freund) en los peces. Frisch y col. (2018a) probaron una vacuna adyuvantada inactivada con formalina y suministrada por inyección IP frente a *T. maritimum* en salmón del Atlántico que no resultó ser efectiva contra este patógeno.

En cuanto a vacunas comerciales frente a *T. maritimum*, actualmente la empresa CERMAQ de Canadá está realizando ensayos con una vacuna en Noruega y en Canadá en salmón del Atlántico, aunque los resultados indican una baja eficacia. Por otro lado, la vacuna ICTHIOVAC®-TM, producida por la empresa española HIPRA para prevenir la mortalidad en rodaballo, con un porcentaje relativo de supervivencia del 75% y una duración de inmunidad de 6

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

meses, es una bacterina desarrollada frente a una cepa del serotipo O2 administrada por inyección IP a peces de 20-30g.

1.9.2 Tratamientos frente a *T. maritimum*

Debido al problema que genera este patógeno en gran parte por la formación de biopelículas en los tanques de cultivo, se hace necesaria la disponibilidad de tratamientos efectivos que puedan ayudar a mejorar los inconvenientes que produce *T. maritimum* en el cultivo de peces en acuicultura.

Para el tratamiento de las infecciones por *T. maritimum*, se han probado distintos fármacos y productos químicos como el peróxido de hidrógeno, el cual consigue reducir la concentración de *T. maritimum*, pero no la mortalidad producida por esta bacteria (Avendaño-Herrera y col., 2006d). Otros productos químicos como el bronopol y el dióxido de cloro estabilizado han demostrado su eficacia frente a *T. maritimum* y no producen mortalidad de las especies cultivadas (Watanabe y Nishimura, 2010).

En cuanto al uso de antibióticos frente a *T. maritimum*, se ha comprobado que esta bacteria es sensible a ampicilina, nitrofurantoína, oxitetraciclina, penicilina G, eritromicina, amoxicilina, cloranfenicol, florfenicol y sulfonamidas potenciadas. Por el contrario, este microorganismo es resistente al ácido oxolínico, a la flumequina, enrofloxacina, colistina, aminocidina, bacitracina, kanamicina, neomicina, y en algunas cepas a la trimetoprima-sulfametoxazol (Avendaño-Herrera, 2005c; Avendaño-Herrera y col., 2008; Fernández-Álvarez y Santos, 2018b). Actualmente, para tratar la estomatitis bacteriana en salmón en Canadá, se están utilizando el florfenicol y las sulfonamidas potenciadas (Nowlan y col., 2020).

Por último, es importante destacar el uso de otras bacterias marinas utilizadas como probióticos frente a la infección producida por *T. maritimum*. Muñoz-Atienza y col. (2014) probaron distintas bacterias del ácido láctico (BAL) aisladas de productos pesqueros, las cuales inhibieron la unión de la bacteria al mucus del rodaballo. Las bacterias que demostraron tener efectividad frente a *T. maritimum* y

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

capacidad para estimular la inmunidad inespecífica del rodaballo fueron *Leuconostoc mesenteroides subsp. cremoris* SMM69 y *Weissella cibaria* P71.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

2. OBJETIVOS

La tenacibaculosis marina es una enfermedad ulcerativa causada por el patógeno de peces *Tenacibaculum maritimum*. Aunque este microorganismo fue aislado por primera vez en la década de los ´70 en Japón, en el continente europeo la tenacibaculosis se ha convertido en una de las enfermedades que causa grandes pérdidas económicas en el sector acuícola.

A lo largo de este trabajo, desarrollado dentro de la línea de Investigación sobre Patología Bacteriana de Peces que se lleva a cabo en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidade de Santiago de Compostela (USC), se ha profundizado en el estudio del agente causal de la tenacibaculosis, basándose en los siguientes objetivos:

1. La caracterización serológica, molecular y quimiotaxonómica de cepas de *Tenacibaculum maritimum* aisladas durante un periodo de 20 años y que presentan diferente origen de aislamiento y geográfico.

2. La realización de un estudio de la estructura y de la evolución de la población de *T. maritimum.*

3. La búsqueda de posibles factores de virulencia relacionados con la antigenicidad de la bacteria, la degradación de tejidos y los sistemas de captación del hierro.

La consecución de estos objetivos permitirá no sólo actualizar los conocimientos sobre la especie *T. maritimum* si no también profundizar en el estudio de sus mecanismos de virulencia y establecer nuevas estrategias de prevención y control de la enfermedad.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA, MOLECULAR Y QUIMIOTAXONÓMICA DE *T. maritimum*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3. CARACTERIZACIÓN SEROLÓGICA, MOLECULAR Y QUIMIOTAXONÓMICA DE *T. maritimum*

La caracterización epidemiológica se basa en la diferenciación o tipificación de los aislados de un microorganismo de acuerdo con unos caracteres fenotípicos o genotípicos específicos, con el fin de determinar si presentan un origen común. La identificación de bacterias resulta indispensable en microbiología clínica, alimentaria y ambiental (Emerson y col., 2008). Las técnicas de caracterización abarcan desde métodos que comparan caracteres fenotípicos, hasta técnicas que comparan fragmentos de ADN genómico. Los métodos de fenotipado bacteriano, aunque siguen siendo útiles, tienen una serie de limitaciones para el estudio completo de una población bacteriana. Sin embargo, alguna de estas técnicas como la serotipificación resultan ser una herramienta útil para el desarrollo y formulación de vacunas en bacterias con un esquema de serotipado descrito (Belkum y col., 2007). La técnica de serotipificación utilizada en esta tesis doctoral ha sido la técnica de dot blot.

Por otra parte, las cepas con un mismo fenotipo pueden presentar genotipos distintos y viceversa, y por ello, la tipificación fenotípica ha sido complementada con la tipificación molecular. La tipificación molecular se puede utilizar para identificar o clasificar a las bacterias en base a patrones de bandas de ADN generados mediante la amplificación por PCRs específicas o digestiones con enzimas de restricción que se visualizan en un gel de electroforesis. Las técnicas de tipificación molecular utilizadas en esta tesis doctoral han sido REP-PCR, RAPD-PCR y ERIC-PCR.

Los métodos quimiotaxonómicos también permiten la clasificación de los microorganismos en base a marcadores químicos como los ácidos grasos, incluyéndose como métodos rutinarios de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

identificación en paralelo con las pruebas bioquímicas, las serológicas o la secuenciación. Los perfiles de ácidos grasos bacterianos son únicos de una especie a otra por lo que resultan una herramienta útil de cara a la clasificación e identificación bacteriana (Emerson y col., 2008). En esta tesis doctoral, la técnica quimiotaxonómica utilizada ha sido la técnica de análisis de ácidos grasos Sherlock^{TM} MIS.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 Caracterización serológica mediante la técnica de dot-blot

Esta técnica es utilizada para la detección de antígenos y surgió como una modificación del conocido ELISA en la que, a diferencia del Western blot, las proteínas antigénicas no se separan electroforéticamente, sino que los antígenos celulares se impregnan directamente en membranas de nitrocelulosa circulares.

3.1.1.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Para este estudio se utilizaron 198 cepas de *T. maritimum* aisladas en nuestro laboratorio a partir de distintas epizootias durante el periodo comprendido entre el año 2000 y el 2019, así como las cepas cedidas/donadas por parte de otros grupos de investigación (Tabla 5). Como cepas de referencia se utilizaron la cepa tipo NCIMB 2154^{T} y la NCIMB 2158 de la Colección nacional de bacterias de interés industrial, alimentario y marino (NCIMB, del inglés *National Collection of Industrial Food and Marine Bacteria*) (Aberdeen, UK); y como cepas control de cada serotipo se utilizaron la cepa PC503.1 (serotipo O1), la cepa PC424.1 (serotipo O2), la cepa ACC13.1 (serotipo O3) y la cepa SNW20.2 (serotipo O4). Todas las cepas se cultivaron de forma rutinaria en el medio FMM (*Flexibacter maritimus Medium*) agar o caldo (Pazos y col., 1996) y en Agar Marino (AM) (Difco) y se incubaron a 25ºC durante 48 horas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5.. Datos epidemiológicos y del análisis serológico de las cepas de *T. maritimum* empleados en esta tesis doctoral.

Nº DE AISLADOS	SEROTIPO	HOSPEDADOR	ORIGEN GEOGRÁFICO	PERÍODO DE AISLAMIENTO
n=12	O1	*Solea senegalensis*	España	2000-2004
n=13	O1	*Solea senegalensis*	España	2005-2009
n=5	O1	*Scophthalmus maximus*	España	2000-2004
n=2	O1	*Scophthalmus maximus*	España	2005-2009
n=5	O1	*Sparus aurata*	España	2000-2004
n=1	O1	*Sparus aurata*	Italia	2005-2009
n=1	O1	*Solea solea*	Holanda	2010-2014
n=2	O1	*Pagellus bogaraveo*	España	2005-2009
n=1	O2	*Solea senegalensis*	España	2000-2004
n=10	O2	*Solea senegalensis*	España	2005-2009
n=18	O2	*Solea senegalensis*	España	2010-2014
n=13	O2	*Solea senegalensis*	España	2015-2019
n=6	O2	*Solea senegalensis*	Portugal	2005-2009
n=15	O2	*Scophthalmus maximus*	España	2000-2004
n=18	O2	*Scophthalmus maximus*	España	2005-2009
n=4	O2	*Scophthalmus maximus*	Portugal	2005-2009
n=5	O2	*Salmo salar*	España	2015-2019
n=1	O2	*Dicentrarchus labrax*	Francia	2010-2014
n=1	O2	*Sparus aurata*	Turquía	2005-2009
n=7	O3	*Solea senegalensis*	España	2005-2009
n=6	O3	*Solea senegalensis*	España	2010-2014
n=2	O3	*Solea senegalensis*	España	2015-2019
n=3	O3	*Solea senegalensis*	Portugal	2000-2004
n=1	O3	*Scophthalmus maximus*	España	2000-2004
n=1	O3	*Scophthalmus maximus*	España	2005-2009
n=2	O3	*Scophthalmus maximus*	Portugal	2000-2004
n=9	O3	*Scophthalmus maximus*	Portugal	2005-2009
n=4	O3	*Salmo salar*	España	2010-2014
n=1	O3	*Salmo salar*	España	2015-2019
n=1	O3	*Dicentrarchus labrax*	Francia	2000-2004
n=3	O3	*Dicentrarchus labrax*	Portugal	2015-2019
n=1	O3	*Solea solea*	España	2000-2004
n=4	O4	*Solea senegalensis*	España	2015-2019
n=6	O4	*Solea senegalensis*	Portugal	2010-2014
n=5	O4	*Solea senegalensis*	Portugal	2015-2019
n=2	O4	*Scophthalmus maximus*	España	2000-2004
n=7	O4	*Salmo salar*	España	2015-2019

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.1.2 Protocolo de la técnica de dot-blot

El ensayo dot-blot se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cipriano y col. (1985) con ligeras modificaciones (Bolinches y col., 1990).

Preparación de antígenos bacterianos (antígeno O): Los antígenos se prepararon a partir de las cepas resuspendidas (10^9 células/ml) en 1 ml de solución salina (agua y NaCl al 0'85%) que posteriormente se incubaron 1h a 100ºC. Se conservaron a 4ºC para su posterior uso.

Obtención de los antisueros: Para la obtención de los antisueros de las cepas control de cada serotipo mencionadas en el apartado anterior, se inocularon conejos de raza neozelandesa (del inglés, *New Zealand White*) siguiendo el protocolo descrito por Sørensen y Larsen (1986). Transcurrido el tiempo de inoculación y generación de respuesta inmunitaria, se procedió a la extracción de la sangre y se incubó a 4ºC durante toda la noche para separar la fracción del suero (sobrenadante). El suero de cada serotipo fue alicuotado y guardado a -20ºC. Los sueros se obtuvieron según el procedimiento aprobado por el comité de bioética de la Universidade de Santiago de Compostela (USC).

Absorción de los sueros: Para eliminar posibles reacciones cruzadas entre los distintos serotipos, se absorbieron 100 µl de cada alícuota de los antisueros con 100 µl de la suspensión del antígeno O de cepas heterólogas y se incubaron a 25ºC en agitación (80 rpm) durante 1h y después a 4ºC durante toda la noche (Romalde y col., 1993). Posteriormente, los antisueros reabsorbidos se centrifugaron a 8000 rpm durante 20 min y se recogió el sobrenadante, conservándose a -20ºC.

Ensayo dot-blot: Todas las incubaciones de este ensayo se realizaron a 25ºC y en agitación (80 rpm). Las membranas de nitrocelulosa estériles se lavaron con PBS (pH 7.4). Una vez secas, se depositó 1 µl de los antígenos O de las cepas de *T. maritimum.* Como control negativo se utilizó 1 µl de PBS. Las membranas se bloquearon en tampón Tris-Buffer-salino (TBS) (Trizma Base y NaCl, pH 7.5)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

suplementado con gelatina al 3% (p/v) durante 1h. Una vez finalizado el bloqueo y tras dos lavados con TTBS (Tween 20-Tris-Buffer Salino), cada membrana se incubó con el antisuero correspondiente diluido 1/1000 con la solución de anticuerpos (100 ml de TBS suplementado con gelatina al 2%) durante 1h. Tras esta incubación y dos lavados con TTBS, se incubaron las membranas con el anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulina G (IgG) de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Bio-Rad) diluido en solución de anticuerpos 1/3000. Tras una hora de incubación, se lavaron las membranas de nuevo con TTBS seguido de un lavado en TBS. Posteriormente, las membranas se revelaron en oscuridad, con una solución compuesta por tampón carbonato (NaHCO3, MgCl2, pH 9.8) suplementado con 0,7 ml de N,N dimetilformamida, 0,3 ml de agua destilada, 30 mg de NBT (del inglés, *Nitroblue Tetrazolium*) (Sigma-Aldrich), 15mg de 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP) (Sigma-Aldrich) y 1 ml de N,N dimetilformamida. Una vez detectada la aparición del color la reacción se detuvo mediante el lavado de las membranas con agua destilada. Sólo las reacciones de intensidad similar a las obtenidas con las cepas control se consideraron positivas.

3.1.2 Caracterización molecular de *T. maritimum*

3.1.2.1 Cepas bacterianas, medios, condiciones de cultivo y extracción de ADN

Para estos estudios se emplearon cepas de *T. maritimum* aisladas durante el período 2007-2016 (Tabla 6). La selección de las cepas se realizó en base al origen de aislamiento y a los estudios serológicos realizados previamente en esta tesis doctoral. Como cepas de referencia se utilizaron las cepas NCIMB 2154^T y la NCIMB 2158. Todas las cepas se cultivaron rutinariamente en FMM agar o caldo (Pazos y col., 1996) y en AM o CM (Difco) y se incubaron a 25ºC durante 48h, a 150rpm en el caso de los cultivos líquidos.

El ADN cromosómico para el análisis mediante REP, ERIC y RAPD-PCR de todas las cepas analizadas fue extraído usando el kit *InstaGene Matrix* (Bio-Rad, Madrid, España) siguiendo el protocolo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

descrito por Romalde y col. (1999). De acuerdo con este protocolo, se resuspendieron las bacterias a partir de cultivos puros obtenidos en placas de AM o FMM en 1ml de agua destilada estéril en tubos de 1ml y se centrifugaron 1 min a 12.000rpm. Tras la centrifugación, se retiró el sobrenadante, se añadieron 200µl de la solución *InstaGene Matrix* y se incubaron a 56ºC durante 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se agitaron las muestras en un vórtex durante 10s, y una vez mezcladas se incubaron en un baño de agua a 100ºC durante 8 min. A continuación, se mezclaron durante 10 s en el vórtex nuevamente, y se centrifugaron 2 min a 12.0000rpm. La concentración, calidad y pureza de las muestras de ADN extraídas se examinó midiendo la absorbancia a 260nm y 280nm mediante el espectrofotómetro Quawell Q5000 (Quawell Technology, Inc., USA). Las muestras se guardaron a -20ºC hasta ser utilizadas para la realización de las reacciones de PCR.

Tabla 6. Cepas empleadas en la caracterización molecular y quimiotaxonómica de *T. maritimum*.

CEPA	SEROTIPO	AÑO	HOSPEDADOR	ORIGEN
PC503.1	O1	2001	*Solea senegalensis*	España
CA63.1	O1	2007	*Solea senegalensis*	España
PC424.1	O2	2000	*Scophthalmus maximus*	España
NCIMB2154T	O1	1977	*Pagrus major*	Japón
NCIMB2158	O2	1981	*Solea solea*	Escocia
ACR485.1	O2	2011	*Solea senegalensis*	España
ACR491.1	O2	2011	*Solea senegalensis*	España
ACR584.1	O2	2014	*Solea senegalensis*	España
SNW19.1	O2	2015	*Salmo salar*	España
SNW20.1	O2	2015	*Salmo salar*	España
CA53.1	O2	2007	*Scophthalmus maximus*	España
CA80.1	O2	2007	*Scophthalmus maximus*	España
ACC13.1	O3	2003	*Solea senegalensis*	España
CA56.1	O3	2007	*Solea senegalensis*	España
CA61.1	O3	2007	*Solea senegalensis*	España
AQP72.1	O3	2016	*Dicentrarchus labrax*	España
AQP79.1	O3	2016	*Dicentrarchus labrax*	Portugal
SNW15.1	O3	2014	*Salmo salar*	España
SNW35.1	O3	2016	*Salmo salar*	España
SNW20.2	O4	2015	*Salmo salar*	España

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.2.2 Caracterización mediante REP-PCR

La técnica de REP-PCR (del inglés, *Repetitive Extragenic Palindromic Secuences PCR***)** es un método de tipificación bacteriana basado en la amplificación de las regiones que separan las secuencias repetitivas palindrómicas extragénicas (secuencias REP). Estas secuencias REP, de unos 35 a 40 pares de bases, que se hallan distribuidas a lo largo de todo el genoma bacteriano y están muy conservadas, se desconoce la función que desempeñan (Versalovic y col., 1991; Fernández-Cuenca y col., 2013). Los patrones genéticos resultantes de cada bacteria dependerán del número de secuencias REP y de la distancia entre ellas.

Las reacciones de REP-PCR se llevaron a cabo empleando el kit comercial *Illustra*^{TM} *PuReTaq Ready-To-Go*^{TM} *PCR Beads* (GE Healthcare, Buckinghampshire, UK) que contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR: BSA, dATP; dCTP, dGTP, dTTP estabilizadores, tampón de reacción y 2,5 unidades de pureTaq polimerasa. Cuando una *bead* se reconstituye en 25µL de volumen final, la concentración de cada dNTP es 200µM en 10mM de Tris-HCl, (pH 9,0), 50mM de KCl y 1,5mM de $MgCl_2$. A cada reacción se añadió el ADN correspondiente (200 ng/µl), los cebadores REP-1D (10µM) y REP-2D (10µM) y se completó con agua Milli-Q® hasta un volumen final de 25µl. Las secuencias de los cebadores utilizados (Sigma-Aldrich), ambas de 18 bases, se muestran a continuación (Versalovic y col., 1991):

REP-1D: 5’-NNNRCGYCGNCATCMGGC-3’

REP-2D: 5’-RCGYCTTATCMGGCCTAC-3’

La M de estos cebadores puede ser adenina (A) o citosina (C), la R puede ser A o guanina (G), la Y puede ser C o timidina (T) y la N es cualquier nucleótido (Stern y col., 1984). La reacción de REP-PCR fue desarrollada en el termociclador T-Gradient Thermocycler (Biometra, Alemania) utilizando el programa descrito por Mancuso y col. (2007) (Tabla 7).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 7. Programa de REP-PCR empleado en esta tesis doctoral.

Paso	Temperatura (ºC)	Tiempo (t)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	7´	
Desnaturalización	92	45´´	
Hibridación	40	1´	35
Elongación	72	8´	
Elongación final	72	15´	

3.1.2.3 Caracterización mediante RAPD-PCR

La técnica de RAPD-PCR (del inglés, *Random Amplified Polymorphic DNA PCR*) se basa en la amplificación de regiones polimórficas del ADN genómico mediante un cebador de secuencia arbitraria de aproximadamente 10 nucleótidos (nt). Estos cebadores arbitrarios hibridan en *loci* que se encuentran dispersos de forma aleatoria por todo el genoma. Estos polimorfismos resultan útiles a la hora de tipificar y clasificar especies ya que son marcadores genéticos y taxonómicos (Mancuso y col., 2007).

Las reacciones de RAPD-PCR se realizaron en tubos con *Illustra*^{TM} *PuReTaq Ready-To-Go*^{TM} *RAPD Analysis Beads* (GE Healthcare, Buckinghampshire, UK). A cada reacción se añadió el ADN correspondiente (200 ng/µl), el cebador (P6 a 10µM) y completando con agua Milli-Q® hasta un volumen final de 25µl. Se empleó el cebador P6 en base a los estudios realizados previamente por Avendaño-Herrera y col. (2004c). La secuencia del cebador (Sigma-Aldrich), de 10 bases, es la siguiente:

P6: 5´-d[CCCGTCAGCA]-3´

La reacción de RAPD-PCR fue desarrollada en el termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf, Alemania), y se utilizó el programa detallado en la Tabla 8 (Avendaño-Herrera y col., 2004c).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 8. Programa de RAPD-PCR empleado en esta tesis doctoral.

Paso	Temperatura (ºC)	Tiempo (t)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5´	
Desnaturalización	95	1´	
Hibridación	35	1´	30
Elongación	72	2´	
Elongación final	72	5´	

3.1.2.4 Caracterización mediante ERIC-PCR

La técnica de ERIC-PCR (del inglés, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*) se utiliza para estudiar la relación clonal entre diversas enterobacterias y se basa en la amplificación de las regiones que separan las secuencias consenso intergénicas repetitivas enterobacterianas (secuencias ERIC) dispersas por todo el genoma (Stern y col., 1984; Hulton y col., 1991; Martin y col., 1992).

Las reacciones de ERIC-PCR se llevaron a cabo utilizando *IllustraTM PureTaqTM Ready-To-GoTM PCR Beads* (GE Healthcare, Buckinghampshire, UK). A cada reacción se añadió el ADN correspondiente (200 ng/µl), los cebadores ERIC-1(10µM) y ERIC-2 (10µM), y agua Milli-Q® (µl restantes hasta un volumen final de reacción de 25µl). Las secuencias de los cebadores utilizadas (Sigma-Aldrich), ambas de 22 bases, fueron las siguientes (Versalovich y col., 1991):

ERIC-1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3')

ERIC-2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3')

La reacción de ERIC-PCR se realizó en el termociclador T-Gradient Thermocycler (Biometra, Alemania) y se utilizó el siguiente programa detallado en la Tabla 9 (Mancuso y col., 2007).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 9. Programa de ERIC-PCR empleado en esta tesis doctoral.

Paso	Temperatura (ºC)	Tiempo (t)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5´	
Desnaturalización	92	45´´	
Hibridación	52	1´	35
Elongación	70	10´	
Elongación final	70	20´	

3.1.2.5 Electroforesis de los productos de REP, RAPD y RAPD-PCR

Los productos de amplificación obtenidos mediante las técnicas de ERIC, REP y RAPD-PCR fueron separados mediante electroforesis horizontales durante 60 minutos a 90 voltios (V) en geles agarosa al 1,5% (p/v) para los productos de REP y RAPD-PCR, y agarosa al 2% (p/v) para los productos de ERIC-PCR, sumergidos en tampón de electroforesis TAE 1X (0,04 M Tris, 0,0001M EDTA, pH 8) (Sambrook y col., 1989). Como marcadores moleculares se utilizaron el marcador de peso molecular FastRuler Low Range de 50- 1500 pb (Thermo Fisher Scientific Inc.) en el caso de la REP y la RAPD-PCR, y el GeneRuler 1kb Plus para la ERIC-PCR (Thermo Fisher Scientific Inc.). Los geles se tiñeron con 4µl de RealSafe (Real Laboratory, Valencia, España) y se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (BioRad).

3.1.2.6 Análisis de los geles de electroforesis de REP, RAPD Y ERIC-PCR

Los patrones de bandas de amplificación obtenidos mediante las técnicas de REP-PCR, RAPD-PCR y ERIC-PCR se analizaron con el software GelCompar II (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Las similitudes entre cepas se estimaron por medio del coeficiente de Dice (Sd) (Dice, 1945) como una medida de homología, de acuerdo con la ecuación: Sd = [24 / (2A + B + C) J X 100, donde A es número de las

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bandas coincidentes y, B y C son los números de bandas presentes en unas cepas, pero no en la otras. Los dendrogramas se hicieron en base al promedio aritmético de los grupos de pares no ponderados con media aritmética (UPGMA).

3.1.3 Caracterización quimiotaxonómica de *T. maritimum*

La técnica Sherlock™ MIS (del inglés, *Microbial Identification System*) desarrollada por la compañía MIDI (Microbial IDentification Inc. Newark, DE, EE. UU.) permite la identificación de microorganismos en función de su contenido de ácidos grasos mediante Cromatografía de Gases (GC, del inglés *Gas Chromatopraphy*) (Sasser y col., 2001).

3.1.3.1 Cepas bacterianas, medios, condiciones de cultivo

Para este estudio se utilizaron las mismas cepas de *T. maritimum* que para los análisis de REP, ERIC y RAPD-PCR (Tabla 6). Los aislados de *T. maritimum* fueron cultivados en placas de AM mediante la técnica de estría por agotamiento, en cuatro cuadrantes e incubados a 25ºC durante 48 horas. Esto es necesario debido a que las células deben ser recolectadas del tercer cuadrante (fase logarítmica tardía), ya que son las que presentan los ácidos grasos más estables. Además, como control positivo se utilizó la cepa CECT 115 de *Stenotrophomonas maltophilia,* la cual se creció en LB (del inglés, *Luria Broth*) durante 24 horas a 37ºC (Mahdi y col., 2014), recomendada por Sherlock™ MIS cuando se trabaja con bacterias aerobias.

3.1.3.2 Protocolo de extracción de ácidos grasos

Para la extracción de los ácidos grasos de *T. maritimum* se utilizó la técnica Sherlock ™ MIS siguiendo básicamente las indicaciones detalladas en el estudio de Piñeiro-Vidal y col. (2008). Este protocolo de extracción de ácidos grasos se divide en las siguientes fases:

1. **Recolección:** Las células fueron recogidas del tercer cuadrante de las placas de AM e introducidas en tubos de ensayo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. **Saponificación**: En este paso, los ácidos grasos se escinden de las células lipídicas y se convierten en sus sales sódicas. Se añadió 1ml de Reactivo de Saponificación (22,5g de NaOH, 75ml de Metanol, 75ml de agua destilada) a cada muestra y se agitaron en un vórtex hasta su completa resuspensión. A continuación, las muestras se pusieron en un baño a 100ºC durante 5 min y tras ello, se agitaron 10s en un vórtex. Por último, las muestras se hirvieron a 100ºC durante 25 min.
3. **Metilación:** Este proceso convierte los ácidos grasos (que se encuentran en forma de sales sódicas) en metil-ésteres de ácidos grasos (FAMEs). Esto hace que los ácidos grasos incrementen su volatilidad para el análisis por Cromatografía de Gases (GC). Se añadieron 2ml de Reactivo de Metilación (162,5ml de HCl 6N, 137,5ml de Alcohol metílico) a cada muestra y se agitaron 10s en el vórtex. Posteriormente, las muestras se incubaron en un baño a 80ºC durante 10 min.
4. **Extracción:** Los FAMEs se pasan de una fase acuosa a una fase orgánica. Para ello se añadieron 1,25ml de Reactivo de Extracción (100ml de Hexano, 100ml de Metil-etil-butil-éter) a cada tubo y se agitaron en un oscilador durante 10 min obteniéndose dos fases, eliminando la fase inferior con una pipeta Pasteur.
5. **Lavado:** El lavado sirve para quitar los posibles restos de reactivos y ácidos grasos libres de la fase orgánica, con el objetivo de que no interfieran en el análisis. Se añadieron 4ml de Reactivo de Lavado (5,4g de NaOH, 450ml de agua destilada) a cada tubo y se agitaron en un oscilador durante 5 min. Posteriormente se añadieron unas gotas de NaCl saturado para terminar de separar las fases, se tomaron 2/3 del sobrenadante (fracción que contiene los ácidos grasos) y se pasaron a los viales de GC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.1.3.3 Análisis de los FAMEs

Los FAMEs fueron analizados en el cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA), controlado por el software Sherlock MIDI 4,5 (MIDI Systems, USA). Como gas de transporte se utilizó Hidrógeno (0,5ml/min). La composición en ácidos grasos fue calculada como porcentaje del área de pico en relación con la sumatoria de áreas de todos los ácidos grasos de C9 a C20. La nomenclatura adoptada para los ácidos grasos fue:

- El número anterior a los dos puntos indica el número total de carbonos de la molécula.

- El número posterior indica el número de dobles enlaces.

- El número que sigue a ω (en caso de existir) indica el carbono inicial del doble enlace seguido de la palabra cis o trans para la correspondiente configuración.

- El número antes de la palabra metil indica la posición de éste y la indicación iso o anteiso indica la posición del metilo terminal o subterminal.

El sistema de Identificación Sherlock MIDI 4,5 (MIDI Systems, USA) analiza la composición de ácidos grasos de un microorganismo y la compara con una base de datos interna de perfiles generada a partir de cepas de referencia. En este caso, la base de datos o librería utilizada es la TSBA6, indicada para cuando se trabaja con microorganismos aerobios, como es el caso de *T. maritimum*. De este modo se genera una lista de posibles especies en base a un Índice de Similitud (IS), que considera adecuados los índices con valores de 0,500 o superiores y una diferencia mayor de 0,100 entre la primera y segunda opción de identificación. Si el valor del índice se encuentra entre 0,300 y 0,500 y con una diferencia mayor de 0,100 con la segunda entrada, puede tratarse de una buena identificación, pero con una composición de ácidos grasos ligeramente diferente al perfil de la base de datos (cepa atípica). Aquellos valores menores de 0,300 indicarían que no existe esa especie en la base de datos del software.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.2 RESULTADOS

3.2.1 Caracterización serológica de *T. maritimum*

Los análisis realizados mediante la técnica de dot-blot revelaron la existencia de heterogeneidad antigénica entre todos los aislados estudiados, mostrando una clara y fuerte reacción de los antígenos O de estos aislados de *T. maritimum* con su suero homólogo. La distribución por serotipos de todas las cepas estudiadas se detalla en la Figura 8 y en la Tabla 5. El serotipo mayoritario resultó ser el serotipo O2 (46,46%), seguido de los serotipos O3 (20,71%) y O1 (20,71%), siendo el serotipo menos representado el O4 (12,12%). En cuanto a la evolución del serotipo en los aislados de *T. maritimum* (Figura 9), los serotipos O2 y O3 fueron detectados durante todo el período estudiado (2000-2019). Respecto al serotipo O1, los brotes pertenecientes a este grupo serológico se dieron principalmente durante los primeros años (2000-2009), disminuyendo en los últimos períodos analizados. Contrariamente, el serotipo O4, aunque se detectó esporádicamente en dos aislados entre los años 2000-2004, en el último período analizado (2015-2019) se detectó un aumento considerable del número de cepas pertenecientes a dicho serotipo (Figura 9).

En cuanto a la evolución de *T. maritimum* según el hospedador del que se recogen los aislados (Figura 10), durante el período 2000-2004, las cepas analizadas pertenecientes al serotipo O1 fueron aisladas de lenguado senegalés (n=12), rodaballo (n=5) y dorada (n=5). Los aislados correspondientes al serotipo O2 se obtuvieron de rodaballo (n=15) y lenguado senegalés (n=1), y los obtenidos para el serotipo O3, de lenguado senegalés (n=3), rodaballo (n=3), lubina (n=1) y lenguado común (n=1). En este período sólo se detectaron dos casos esporádicos de *T. maritimum* del serotipo O4 pertenecientes a rodaballo.

Es importante destacar que durante el siguiente quinquenio analizado (2005-2009) se produjo un elevado número de mortalidades producidas por *T. maritimum*. En este período se detectaron epizootias en la mayoría de las especies de peces evaluadas perteneciendo las cepas aisladas a los serotipos O1 (n=18), O2 (n=39) y O3 (n=17). Es de destacar el aumento en el número de aislados del serotipo O2 obtenidos a partir de rodaballo (n=22) y lenguado senegalés (n=16)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(Figura 10). Asimismo, se incrementó la detección de cepas pertenecientes al serotipo O3 con respecto al período anterior, las cuales fueron aisladas a partir de epizootias de rodaballo (n=10) y lenguado senegalés (n=7). La incidencia del serotipo O1 fue similar a la del período anterior, incorporándose dos aislados de besugo. En este período no se detectó ningún caso de tenacibaculosis cuyo agente causal fuese un aislado perteneciente al serotipo O4.

En el período 2010-2014 se demostró una disminución en la incidencia de brotes de tenacibaculosis causados por cepas de *T. maritimum* de los serotipos O1 (n=1), O2 (n=19) y O3 (n=10) (Figura 9 y 10). Curiosamente, durante estos años no se registran brotes de mortalidades en rodaballo causadas por *T. maritimum*, y se comienzan a detectar casos en salmón (n=4) pertenecientes al serotipo O3, no detectados hasta ahora (Figura 10). En este periodo, las epizootias causadas por cepas de *T. maritimum* pertenecientes al serotipo O4 sólo se detectaron en el lenguado senegalés (n=6).

En el último período analizado (2015-2019), el aumento en el número de cepas de *T. maritimum* del serotipo O4 fue evidente siendo todas ellas detectadas a partir de aislados de lenguado senegalés (n=9) y salmón (n=7) (Figura 10). En este período no se detectaron cepas pertenecientes al serotipo O1. Con respecto a los serotipos O2 y O3 en este período también se evidencia una disminución en su incidencia (Figura 9).

En lo que respecta a la distribución por hospedadores, tal y como se muestra en la Figura 10 y Tabla 5 la especie hospedadora con mayor representación en los cuatro serotipos fue el lenguado senegalés, seguida del rodaballo, siendo el serotipo O2 el predominante en ambos casos. Por otro lado, de lubina, sólo se han detectado aislados de los serotipos O2 y O3, y en dorada únicamente se aislaron cepas del serotipo O1. En salmón, los principales brotes de tenacibaculosis fueron detectados a partir del 2014, y los aislados de *T. maritimum* pertenecieron a los serotipos O2, O3 y O4, no obteniéndose ninguna cepa correspondiente al serotipo O1. Por último, sólo se aislaron dos cepas de besugo perteneciente al serotipo O1 en el período de 2005-2009.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

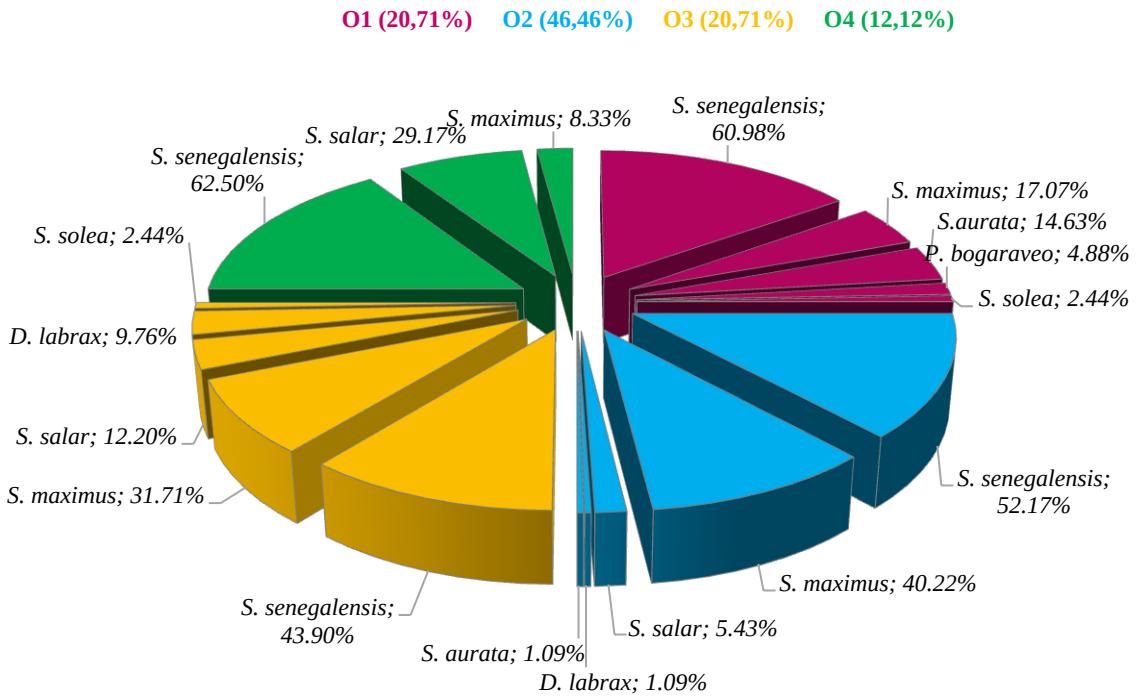


Figura 8. Distribución de las cepas de *T. maritimum* aisladas a partir de distintos hospedadores según el serotipo al que pertenecen (%). Se indican los serotipos por colores, O1: rosa; O2: azul; O3: amarillo; O4: verde.

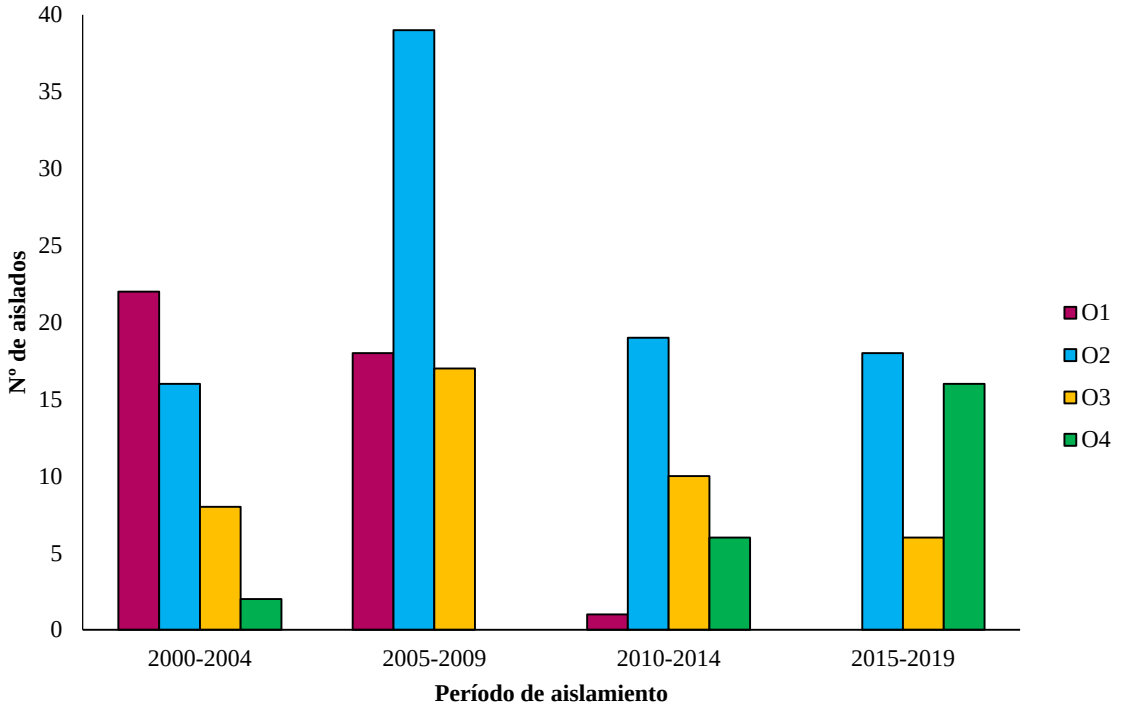


Figura 9. Evolución de los aislados de *T. maritimum* en función el serotipo al que pertenecen. Se indica el período de aislamiento al que pertenecen en años. Se indican los serotipos por colores, O1: rosa; O2: azul; O3: amarillo; O4: verde.

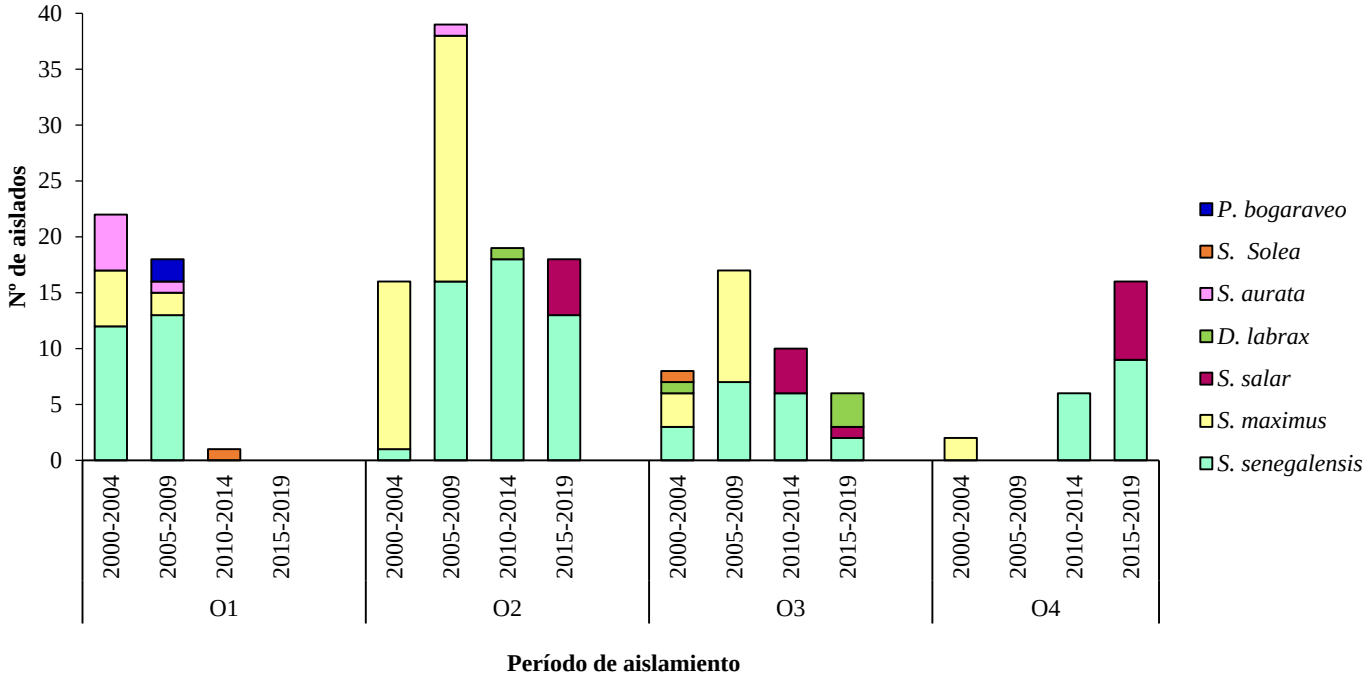


Figura 10. Evolución de las cepas de *T. maritimum* según el hospedador del que fueron aisladas, indicando el serotipo al que pertenecen. Se indican los hospedadores por colores, *P. bogaraveo*: azul; *S. solea*: naranja; *S. aurata*: rosa claro; *D. labrax*: verde oscuro; *S. salar*: rosa oscuro; *S. maximus*: amarillo; *S. senegalensis*: verde claro.

3.2.2 Caracterización molecular de *T. maritimum*

3.2.2.1 Análisis mediante REP-PCR

El análisis de los resultados indicó que la técnica REP-PCR permite la tipificación de *T. maritimum*, ya que todos los aislados fueron tipificables por esta técnica y que, además, existía diversidad genética entre las cepas analizadas debido a los distintos perfiles de tipado obtenidos (Figura 11). Los distintos perfiles REP generados variaron en el número y tamaño de bandas, siendo algunas bandas comunes a todos ellos. El número de bandas de ADN de estos perfiles REP varió de cuatro a seis bandas, y el tamaño de los fragmentos osciló entre los 1015 pb a los 207 pb.

De acuerdo con los distintos patrones de bandas de ADN generados mediante la técnica REP-PCR, se establecieron 7 perfiles REP, que se detallan en la Figura 11. El perfil REP 1 resultó ser el perfil mayoritario (30%) con cuatro bandas de 1015, 635, 521 y 207 pb. Este perfil REP 1 estaba formado por seis cepas aisladas entre los años 1977 y 2007, obtenidas a partir de distintos hospedadores tales como el lenguado senegalés, lenguado común, salmón del Atlántico, pargo japonés y rodaballo, de diferentes serotipos (O1, O2 y O4) y distinto origen geográfico (España, Japón y Escocia). El perfil REP 2, tercer perfil mayoritario (15%) con cinco bandas de 1015, 635, 521 y 407 pb, agrupó tres cepas españolas de *T. maritimum* del serotipo O2 aisladas a partir de lenguado senegalés entre los años 2011 y 2014. El perfil REP 3 fue el segundo perfil más común (20%), mostrando cinco bandas de 1015, 751, 635, 521 y 207 pb y agrupando a cuatro cepas de *T. maritimum* aisladas en España a partir de ejemplares enfermos de salmón del Atlántico entre los años 2014 y 2016, pertenecientes a los serotipos O2 y O3. El perfil REP 4 se caracterizó por la amplificación de cinco bandas de unos 1300, 1015, 635, 300 y 207 pb y lo compusieron dos (10%) cepas españolas aisladas de rodaballo y lenguado senegalés pertenecientes a los serotipos O2 y O3 entre los años 2000 y 2003. El perfil REP 5 fue el menos común (5%) y mostró tres bandas de 635, 521 y 207 pb incluyendo sólo un aislado de *T.*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

maritimum del serotipo O2 obtenido de rodaballo cultivado en España en el año 2007. El perfil REP 6 presentó seis bandas de 1015, 751, 635, 521, 407 y 207 pb y agrupó dos cepas (10%) españolas de lenguado senegalés del serotipo O3 del año 2007. Por último, el perfil REP 7 presentó tres bandas de 1015, 751 y 207 pb y englobó dos cepas (10%) aisladas de lubina en el año 2016 del serotipo O3 cuyo origen geográfico fue España y Portugal.

Por otro lado, en la Figura 12 se muestra el dendrograma generado por el programa Gel Compar II a partir de los perfiles de bandas resultantes de cada cepa estudiada. Como se observa en el dendrograma, todos los aislados presentaban una similitud > 50%, con independencia del perfil al que pertenecían. Es de destacar que las cepas pertenecientes al perfil REP 2 presentaban un porcentaje de similitud del 100% entre ellas. Los aislados restantes no presentaban una agrupación de acuerdo con el perfil REP al que pertenecían. Los resultados obtenidos mediante la técnica de REP-PCR revelaron que existía una ligera relación entre los perfiles genéticos y las variables epidemiológicas de origen de aislamiento, serotipo, año u hospedador.

3.2.2.2 Análisis mediante RAPD-PCR

El análisis de los resultados mostró que la técnica RAPD-PCR resulta útil para el tipado de *T. maritimum*, ya que todos los aislados fueron tipificables por esta técnica y que, además, existía diversidad genética entre las cepas en base a los distintos perfiles genéticos obtenidos (Figura 13). El análisis de los distintos aislados de *T. maritimum* mediante la técnica de RAPD-PCR mostró diferentes patrones de bandas de ADN permitiendo establecer 5 perfiles RAPD (Figura 13). El perfil RAPD 2 agrupó los dos aislados de lubina del serotipo O3, mientras el perfil RAPD 3 estaba formado por un aislado de Japón de pargo japonés del serotipo O1 y un aislado español de salmón del Atlántico del serotipo O4. Los perfiles RAPD 4 y 5 constaron sólo de una cepa cada uno, siendo éstas una cepa española de *T. maritimum* aislada de rodaballo del O2 y un aislado escocés de lenguado común del O2, respectivamente. Todas las demás cepas se encuentraban agrupadas en el perfil RAPD 1, con cepas de rodaballo

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

del O2, de lenguado del O1, O2 y O3 y de salmón del serotipo O2 y O3.

En cuanto al análisis del dendrograma obtenido a partir de los perfiles de bandas de la RAPD-PCR (Figura 14), todos los aislados presentaban una similitud > 50%. En este dendrograma se puede observar que existían dos grupos, en cada uno de los cuales las cepas presentaban una similitud del 60% entre ellas. Cabe destacar, que todas las cepas de salmón estaban en uno de los grupos. Por otro lado, todas las cepas de lenguado (*S. senegalensis*) de los serotipos O2 y O3 se encontraban agrupadas en una de las ramas y, a excepción de la cepa ACR491.1, existía una similitud de un 100% entre ellas. También existía una similitud del 100% entre las cepas de salmón del serotipo O3. Las dos cepas de lubina, que presentaban el mismo perfil RAPD (RAPD 2), se encontraban agrupadas en la misma rama con casi un 90% de similitud entre ellas. Los resultados obtenidos mediante la técnica de RAPD-PCR revelaron que se puede establecer una cierta relación entre los perfiles genéticos y las variables epidemiológicas de origen de aislamiento, serotipo, año u hospedador, y que esta técnica es útil para la tipificación de *T. maritimum.*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

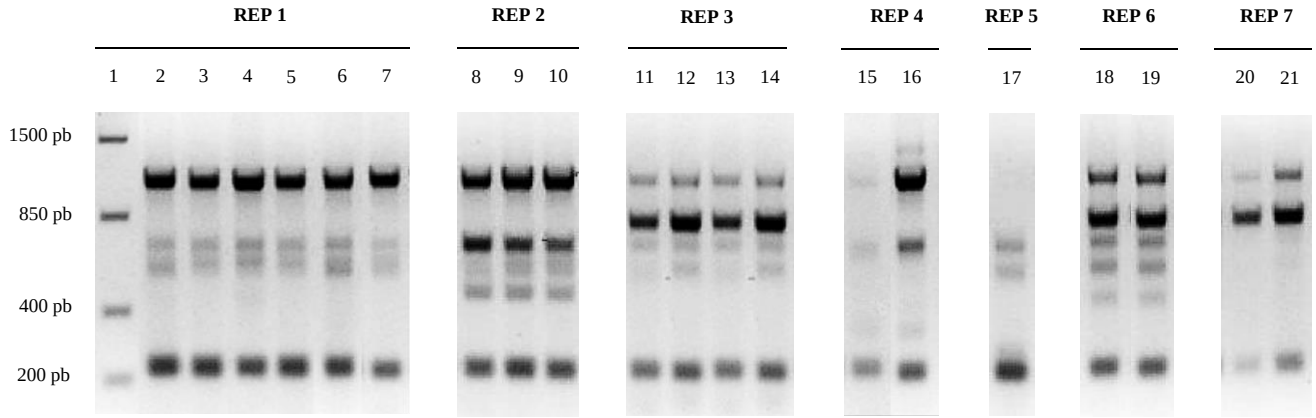
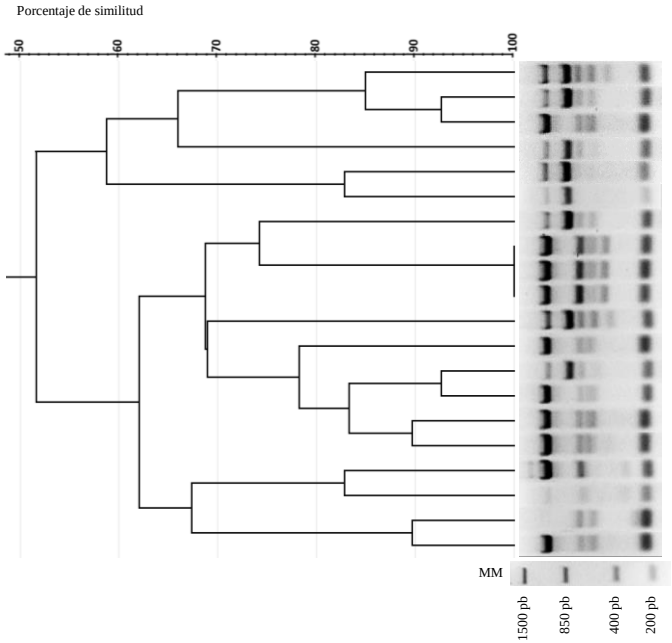


Figura 11. Perfiles REP generados mediante la técnica de REP-PCR empleada en este estudio. 1: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc); 2: PC503.1; 3: CA80.1; 4: SNW20.2; 5: NCIMB 2158; 6:CA63.1; 7: NCIMB 2154^{T}; 8: ACR584.1; 9: ACR491.1; 10; ACR485.1; 15: 11: SNW19.1; 12: SNW20.1; 13: SNW35.1; 14: SNW15.1; 15: PC424.1; 16: ACC13.1; 17: CA53.1; 18: CA56.1; 19; CA61.1; 20: AQP79.1; 21: AQP72.1. Los números de la izquierda muestran las bandas del marcador molecular en pares de bases.



CEPA	SEROTIPO	AÑO	HOSPEDADOR	ORIGEN	PERFIL REP
CA56.1	O3	2007	*Solea senegalensis*	España	6
SNW15.1	O3	2014	*Salmo salar*	España	3
CA63.1	O1	2007	*Solea senegalensis*	España	1
SNW35.1	O3	2016	*Salmo salar*	España	3
AQP72.1	O3	2016	*Dicentrarchus labrax*	España	7
AQP79.1	O3	2016	*Dicentrarchus labrax*	Portugal	7
SNW20.1	O2	2015	*Salmo salar*	España	3
ACR485.1	O2	2014	*Solea senegalensis*	España	2
ACR491.1	O2	2011	*Solea senegalensis*	España	2
ACR584.1	O2	2011	*Solea senegalensis*	España	2
CA61.1	O3	2007	*Solea senegalensis*	España	6
NCIMB 2158	O2	1981	*Solea solea*	Escocia	1
SNW19.1	O2	2015	*Salmo salar*	España	3
NCIMB 2154^{T}	O1	1977	*Pagrus major*	Japón	1
SNW20.2	O4	2015	*Salmo salar*	España	1
CA80.1	O2	2007	*Scophthalmus maximus*	España	1
ACC13	O3	2003	*Solea senegalensis*	España	4
PC424.1	O2	2000	*Scophthalmus maximus*	España	4
CA53.1	O2	2007	*Scophthalmus maximus*	España	5
PC503.1	O1	2001	*Solea senegalensis*	España	1

Figura 12. Dendrograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths) usando el coeficiente de similitud de Dice y UPGMA en base a los perfiles genéticos obtenidos mediante la REP-PCR de los aislados de *T. maritimum*. Se muestran a la derecha, las variables epidemiológicas de cada aislado. MM: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc).

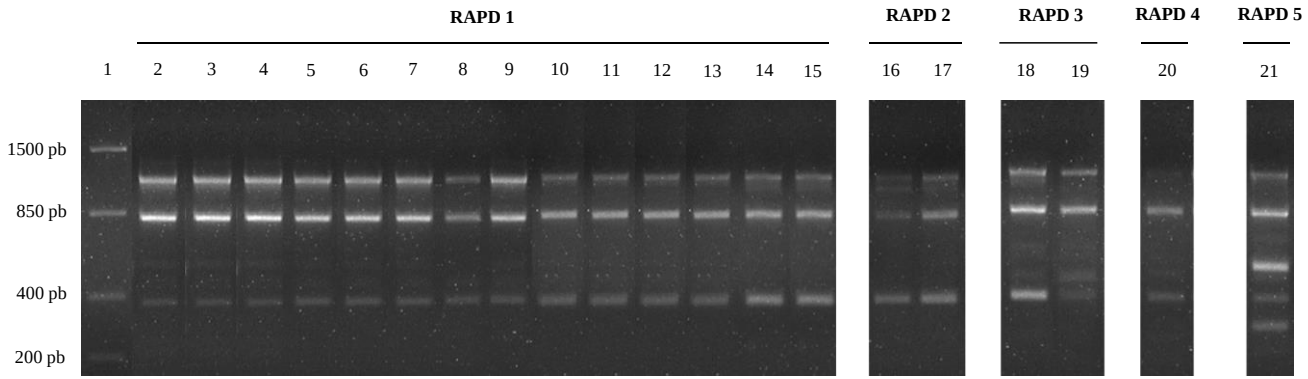
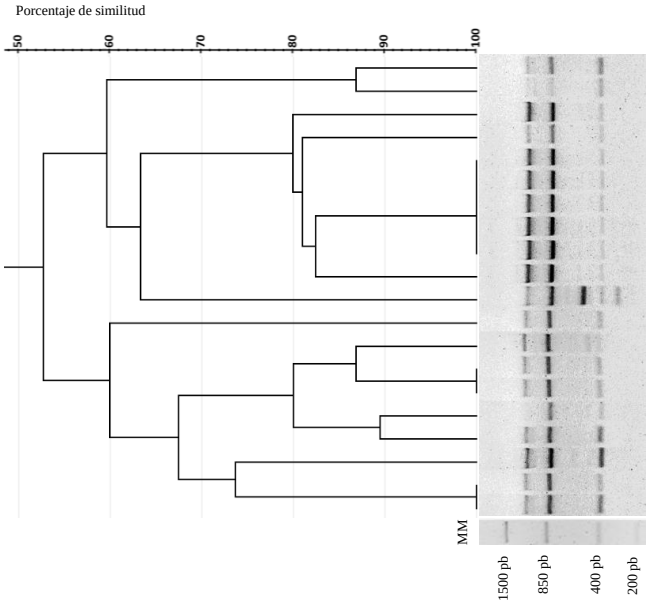


Figura 13. Perfiles RAPD generados mediante la técnica de RAPD-PCR empleada en este estudio con el cebador P6. 1: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc); 2: ACR485.1; 3: ACR491.1; 4: ACR584.1; 5: CA61.1; 6: CA56.1; 7: ACC13.1; 8: CA53.1; 9: CA80.1; 10: AQP72.1; 11: AQP79.1; 12: SNW20.1; 13: SNW19.1; 14: SNW15.1; 15: SNW35.1; 16: AQP72.1; 17: AQP79.1; 18: NCIMB 2154^{T}; 19: SNW20.2; 20: PC424.1; 21: NCIMB 2158. Los números de la izquierda muestran las bandas del marcador molecular en pares de bases.



CEPA	SEROTIPO	AÑO	HOSPEDADOR	ORIGEN	PERFIL RAPD
AQP79.1	O3	2016	*Dicentrarchus labrax*	Portugal	2
AQP72.1	O3	2016	*Dicentrarchus labrax*	España	2
CA80.1	O2	2007	*Scophthalmus maximus*	España	1
CA53.1	O2	2007	*Scophthalmus maximus*	España	1
ACC13	O3	2003	*Solea senegalensis*	España	1
CA56.1	O3	2007	*Solea senegalensis*	España	1
CA61.1	O3	2007	*Solea senegalensis*	España	1
ACR584.1	O2	2011	*Solea senegalensis*	España	1
ACR485.1	O2	2014	*Solea senegalensis*	España	1
ACR491.1	O2	2011	*Solea senegalensis*	España	1
NCIMB 2158	O2	1981	*Solea solea*	Escocia	5
SNW19.1	O2	2015	*Salmo salar*	España	1
SNW20.2	O4	2015	*Salmo salar*	España	3
SNW35.1	O3	2016	*Salmo salar*	España	1
SNW15.1	O3	2014	*Salmo salar*	España	1
PC424.1	O2	2000	*Scophthalmus maximus*	España	4
CA63.1	O1	2007	*Solea senegalensis*	España	1
NCIMB 2154^{T}	O1	1977	*Pagrus major*	Japón	3
SNW20.1	O2	2015	*Salmo salar*	España	1
PC503.1	O1	2001	*Solea senegalensis*	España	1

Figura 14. Dendrograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths) usando el coeficiente de similitud de Dice y UPGMA en base a los perfiles genéticos obtenidos mediante la RAPD-PCR de los aislados de *T. maritimum*. Se muestran a la derecha, las variables epidemiológicas de cada aislado. MM: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc).

3.2.2.3 Análisis mediante ERIC-PCR

Los resultados obtenidos mediante la técnica de ERIC-PCR revelaron que es posible establecer una relación entre los perfiles genéticos y las variables epidemiológicas y que *T. maritimum* puede tipificarse mediante esta técnica. El análisis mediante la técnica ERIC-PCR reveló 8 perfiles genéticos distintos entre los aislados de *T. maritimum* de entre 5 a 10 bandas de ADN (Figura 15) comprendidas entre 137 y 2679 pb. Estos perfiles genéticos, aunque eran ligeramente distintos, resultaron muy similares entre sí.

En el dendrograma de la Figura 15 se presentan los perfiles genéticos de un aislado representativo de cada hospedador y serotipo. Así, se observa que con esta técnica todos los perfiles presentaban una similitud > 50%. Los perfiles representativos de salmón y lenguado se agruparon en una rama con un porcentaje de similitud de más de un 60%. En esta misma rama, los perfiles genéticos de lenguado del serotipo O2 y O3 presentaron una similitud de un 90%, mientras que los perfiles de salmón del O2 y O3 presentaban una similitud de un 80% entre ellos.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

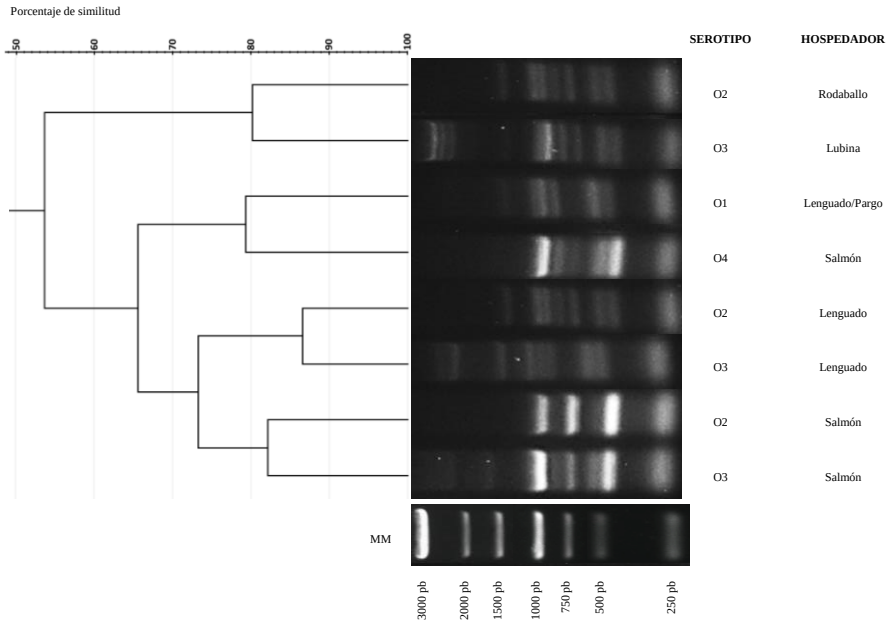


Figura 15. Dendrograma realizado con el programa GelCompar II (Applied Maths) usando el coeficiente de similitud de Dice y UPGMA en base a los perfiles genéticos obtenidos mediante la ERIC-PCR de los aislados de *T. maritimum*. Se muestran a la derecha, las variables epidemiológicas de cada perfil genético. MM: Marcador molecular FastRuler Low Range (Thermo Fisher Scientific Inc).

3.2.3 Caracterización quimiotaxonómica de *T. maritimum*

El perfil de ácidos grasos originado mediante el análisis de los FAMEs fue muy similar para todas las cepas de *T. maritimum* estudiadas, con independencia de serotipo y hospedador. Se detectaron un total de 18 ácidos grasos diferentes en un porcentaje mayor al 1% (picos de referencia). Entre ellos, los más abundantes fueron iso $C_{15:0,}$ seguido de iso $C_{15:1}$G, iso $C_{15:03}$-OH y "*Sum in feature* 3" (que contiene $C_{16:1}\omega 7c$ ⁄ó iso-$C_{15:0}$ 2-OH). En todas las muestras de nuestro estudio predominan estos cuatro ácidos grasos con este orden de abundancia, excepto en la muestra perteneciente al serotipo O4 (Tabla 10).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 10. Ácidos grasos mayoritarios de *T. maritimum* según serotipo y hospedador. "*Summed in feature*" 3 contiene: $C_{16:1}$ ω7c y/ó iso-$C_{15:0}$ 2-OH. "*Summed in feature* 1" contiene: Iso-$C_{15:1}$ H y/ó $C_{13:0}$ 3- OH. Estos ácidos grasos se nombran de esta manera debido a la imposibilidad de separarlos por la técnica Sherlock^{TM} MIS.

SEROTIPO	HOSPEDADOR	ÁCIDOS GRASOS
O1	Lenguado	Iso $C_{15:0}$> Iso $C_{15:1}$G> Iso $C_{15:0}$3-OH>"*Sum in feature* 3"
O2	Lenguado	Iso $C_{15:0}$> Iso $C_{15:1}$G> Iso $C_{15:0}$3-OH>"*Sum in feature* 3"
O3	Lenguado	Iso $C_{15:0}$> Iso $C_{15:1}$G> Iso $C_{15:0}$3-OH>"*Sum in feature* 3"
O2	Rodaballo	Iso $C_{15:0}$> Iso $C_{15:1}$G> Iso $C_{15:0}$3-OH>"*Sum in feature* 3"
O2	Salmón	Iso $C_{15:0}$> Iso $C_{15:1}$G> Iso $C_{15:0}$3-OH>"*Sum in feature* 3"
O3	Lubina	Iso $C_{15:0}$> Iso $C_{15:1}$G> Iso $C_{15:0}$3-OH>"*Sum in feature* 3"
O2	Pargo	Iso $C_{15:0}$> Iso $C_{15:1}$G> Iso $C_{15:0}$3-OH>"*Sum in feature* 3"
O4	Salmón	Iso C_{14}>"*Sum in feature* 1" > $C_{13:0}$

En la Tabla 11 se muestran los perfiles de ácidos grasos obtenidos mediante la técnica Sherlock^{TM} MIS para las cepas de *T. maritimum* según el serotipo y el hospedador al que pertenecen. Como se puede observar en la Figura 16, no se encontraron diferencias notables en cuanto a la abundancia de los distintos ácidos grasos entre cepas de los serotipos (O1, O2 y O3) procedentes de diferentes hospedadores. Sin embargo, el grupo formado por los aislados procedentes de lubina parecía tener un porcentaje de ácidos grasos ligeramente diferente a los demás aislados. El único aislado del serotipo O4 analizado perteneciente a salmón (SNW20.2), presentaba un perfil único de ácidos grasos, el cual podría ser específico de este serotipo. Para demostrarlo, se necesitaría analizar más cepas de este serotipo.

El género *Tenacibaculum* no se encuentra incluido en la librería TSBA6 de MIDI (ni en ninguna otra librería de MIDI), por lo que las cepas no pudieron ser identificadas como *T. maritimum*. Sin embargo, algunas de las cepas fueron erróneamente identificadas como *Flavobacterium ferrugineum*, con un Índice de Similitud (IS) < 0,300. De acuerdo con lo explicado en el apartado de 3.1.3.3, las cepas identificadas con un IS <0,500 no se consideran correctamente identificadas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 11. Perfil completo de ácidos grasos de los aislados de *T. maritimum* según serotipo y hospedador. Se muestra la composición de cada ácido graso en %. No se muestran los aislados concretos de cada tipo, sino una media de los ácidos grasos de cada grupo (8 grupos). Esta media y el error estándar se calculan independientemente del hecho de que un determinado ácido graso no se encuentre en todas las cepas analizadas. "*Summed in feature* 3" contiene: $C_{16:1}$ ω7c y/ó iso-$C_{15:0}$ 2-OH. "*Summed in feature* 1" contiene: Iso-$C_{15:1}$ H y/ó $C_{13:0}$ 3- OH.

ÁCIDO GRASO	O1 LENGUADO	O2 LENGUADO	O3 LENGUADO	O2 RODABALLO	O2 SALMÓN	O3 SALMÓN	O4 SALMÓN	O3 LUBINA
Cadena lineal								
C13:0	-	-	-	-	-	-	5,34	-
Cadena ramificada								
Iso-$C_{13:0}$	3,63	2,06	2,18	2,71 ±0,001	2,48	1,85	-	1,9
Iso-$C_{14:0}$	3,48	2,28 ±0,001	1,93 ±0,001	1,23 ±0,001	2,13	1,33	67,21	2,3
Iso-$C_{15:0}$	24,64	27,21 ±0,004	26,73 ±0,001	24,12 ±0,001	27,34 ±0,001	26,13 ±0,003	-	15,60 ±0,001
Anteiso-$C_{15:0}$	3,10 ± 0,001	2,22 ±0,001	2,93 ±0,001	3,14 ±0,001	3,4	2,48	-	1,65
Iso-$C_{15:1}$ G	19,81 ± 0,001	18,07 ±0,003	19,12 ±0,001	14,5 ±0,001	18,71 ±0,001	15,61 ±0,002	-	11,94 ±0,002
Iso-$C_{16:0}$	-	1,04 ±0,006	1,58±0,001	1,36 ±0,005	1,47 ±0,004	-	-	-
Iso-$C_{16:1}$ H	3 ±0,007	2,59 ±0,006	2,27 ±0,006	2,16 ±0,005	3,66 ±0,005	1,71 ±0,004	-	2,37 ±0,005
Insaturadas								
C15:1 ω6c	5,51 ±0,002	5,68 ±0,001	5,14 ±0,001	8,19 ±0,001	3,09 ±0,001	7 ±0,001	-	7,35 ±0,003
C17:1 ω6c	-	-	1,53 ± 0,004	-	-	1,47 ±0,004	-	-
Hidroxiladas								
$C_{15:0}$ 3-OH	2,72 ±0,008	2,93 ±0,005	2,66 ±0,007	-	-	3,13 ±0,007	-	3,46 ±0,005
Iso-$C_{15:0}$ 2-OH	-	1,13 ±0,004	1,05 ± 0,004	-	-	-	-	1,42 ±0,004
Iso-$C_{15:0}$ 3-OH	12,23 ±0,006	10,12 ±0,003	12,04 ±0,004	11,73 ±0,004	10,33 ±0,005	11,57 ±0,003	-	15,84 ±0,003
$C_{16:0}$ 3-OH	-	1,09 ±0,007	1,27 ± 0,008	-	-	1,38 ±0,008	-	-
Iso-$C_{16:0}$ 3-OH	4,94 ±0,011	5,17 ±0,008	4,61 ±0,01	3,75 ±0,008	5,29 ±0,01	2,78 ±0,009	-	7,4 ±0,01
Iso-$C_{17:0}$ 3OH	-	2,15 ±0,011	4,08 ± 0,014	5,58 ±0,01	4,25 ±0,01	5,46 ±0,01	-	4,24 ±0,01
"*Sum in feature* 1"	-	-	-	-	-	-	27,45	-
"*Sum in feature* 3"	8,44 ±0,011	8,68 ±0,008	9,7 ±0,01	12,24 ±0.01	7,95 ±0,01	10,71 ±0,009	-	16,07 ±0,009

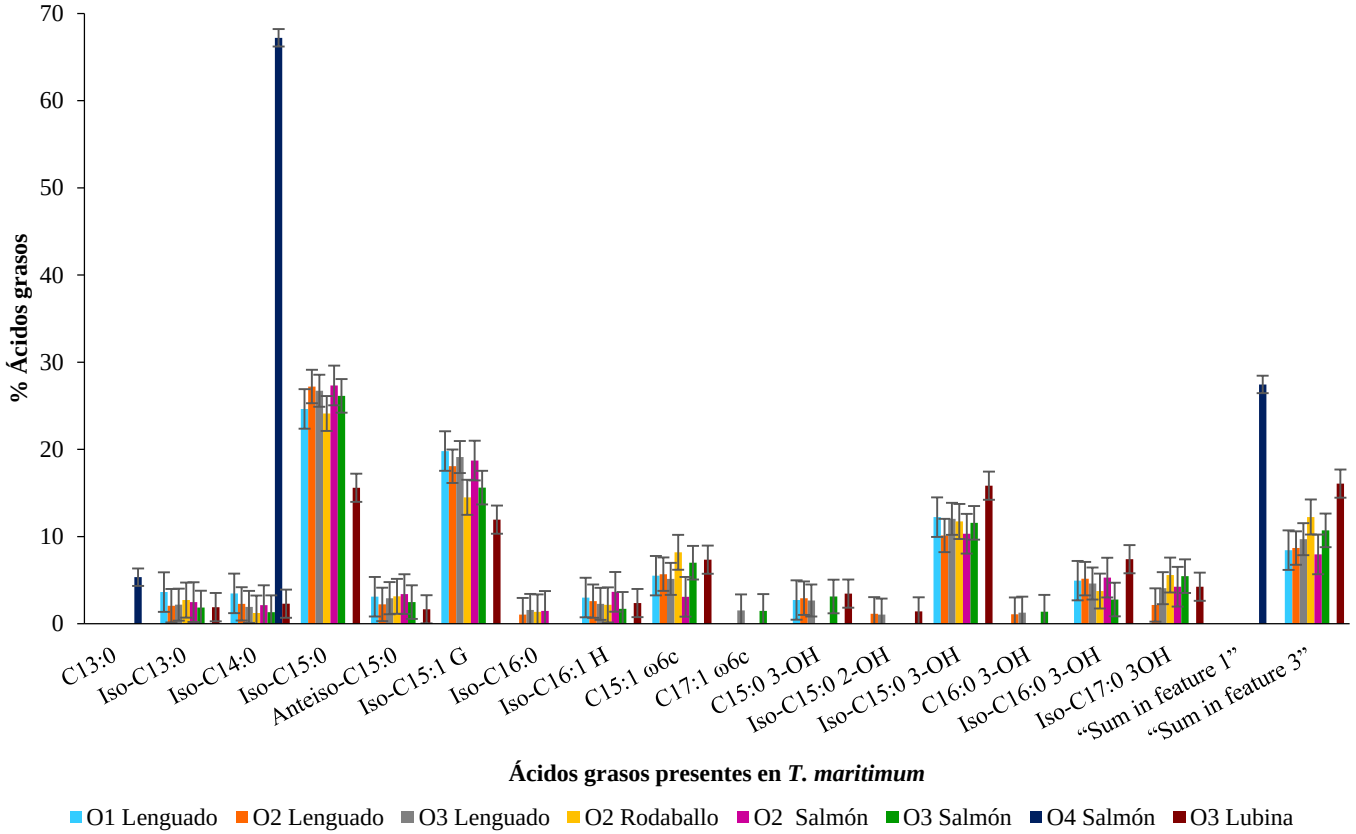


Figura 16. Perfil completo de ácidos grasos de los aislados de *T. maritimum* según serotipo y hospedador. Se muestra la composición de cada ácido graso en %. No se muestran los aislados concretos de cada tipo, sino una media de los ácidos grasos de cada grupo (8 grupos).

3.3 DISCUSIÓN

Los análisis serológicos de las diferentes cepas de *T. maritimum* realizados mediante la técnica de dot-blot revelaron que existe una alta heterogeneidad entre los distintos aislados pertenecientes a distintos hospedadores. Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con la distribución de serotipos descritos por Avendaño Herrera y col. (2004a; 2005) y Castro y col. (2007). Sin embargo, el presente trabajo demuestra que en los últimos años se han aislado un número cepas considerable pertenecientes a un cuarto serotipo (O4) no descrito, aunque nombrado con esta nomenclatura por algunos autores (Pazos, 1997; Piñeiro-Vidal, 2008; Fernández-Álvarez y col., 2018a). Por otro lado, los resultados demuestran que aislados de *T. maritimum* pertenecientes a distintos serotipos pueden coexistir en un mismo hospedador en la misma piscifactoría. Estos datos se deben tener en consideración a la hora de formular autovacunas contra la tenacibaculosis. El hecho de que el serotipo O1 en mayor grado, y los serotipos O2 y O3 en menor grado hayan ido disminuyendo en favor de un nuevo serotipo (O4), puede justificarse por el uso de vacunas y autovacunas contra la tenacibaculosis en las instalaciones pesqueras. Estas formulaciones son bacterinas compuestas por células formolizadas de los serotipos O2 (ICTHIOVAC® TM, Hipra) o por combinación de diferentes serotipos (autovacunas) que se emplean como medida de prevención de la tenacibaculosis en los cultivos de rodaballo y lenguado.

Las técnicas moleculares de tipificación de microorganismos basadas en la amplificación por PCR han demostrado ser útiles para la tipificación y clasificación bacteriana (Wolska y Szweda, 2012), entre los que cabe destacar a patógenos marinos como *Photobacterium damselae* ssp. *piscicida* (Mancuso y col., 2007), *Pseudomonas anguilliseptica, Aeromonas salmonicida* (Beaz-Hidalgo y col., 2008) y *E. tarda* (Castro y col., 2011), así como bacterias de la familia *Flavobacteriaceae* como *F. psychrophilum* (Saticioglu y col., 2018) o *T. maritimum* (Avendaño-Herrera y col., 2004c; Fernández-Álvarez y col., 2018a), *T. soleae y T. discolor* (Fernández-Álvarez y col.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2018a). Estas técnicas resultan útiles para conocer la epidemiología de una enfermedad y su diseminación.

En esta tesis doctoral, las técnicas utilizadas fueron la REP-PCR, la RAPD-PCR y la ERIC-PCR. Para las tres técnicas, los protocolos utilizados detallados en el apartado 3.1.2 de esta tesis, resultaron reproducibles para todos los aislados. Así, todas las cepas analizadas fueron tipificables mediante las técnicas de REP-PCR, RAPD-PCR y ERIC-PCR. Con las tres técnicas empleadas se produjeron patrones de bandas o perfiles genéticos variables en mayor o menor medida, fácilmente interpretables y característicos del patógeno *T. maritimum*, por lo que resultan métodos de tipificación óptimos para la clasificación de esta bacteria.

En cuanto a la técnica de REP-PCR, para los 20 aislados analizados, se obtuvieron 7 perfiles REP distintos (de REP 1 a REP 7) (Figura 11), lo que indica que dentro de la especie *T. maritimum*, la distribución de los elementos palindrómicos extragénicos es variable dentro del genoma. En comparación con los resultados obtenidos por Fernández-Álvarez y col. (2018a), los perfiles REP 1, REP 3 y REP 4 resultaron ser idénticos en cuanto a número de bandas y tamaño a los perfiles obtenidos en el análisis realizado en esta tesis doctoral. Sin embargo, se han encontrado diferencias en cuanto a las variables epidemiológicas de los aislados. En concreto, el perfil REP 1 fue el perfil mayoritario en ambos estudios, incluyendo también la cepa tipo japonesa de *T. maritimum* (NCIMB 2154^{T}) y cepas españolas de lenguado senegalés y rodaballo de los serotipos O1 y O2. Además, a este perfil REP 1 en este presente estudio se incorporó un aislado de salmón del serotipo O4, así como una cepa de lenguado común escocesa. En cuanto al perfil REP 3, aunque el patrón de bandas sea idéntico al descrito por Fernández-Álvarez y col. (2018a), los aislados agrupados no presentan los mismos datos epidemiológicos. Así, el perfil REP 3 del presente estudio incluyó todos aislados españoles de salmón del O2 y O3, mientras que el realizado por Fernández-Álvarez y col. (2018a) agrupó aislados japoneses, españoles y chilenos de lenguado senegalés, rodaballo, pargo japonés y jálibut, todos del serotipo O1. De igual forma, el perfil REP 4, aunque resultó ser idéntico en patrón de bandas que el de Fernández-Álvarez y col.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(2018a), los aislados agrupados no compartían datos epidemiológicos. De esta manera, el perfil REP 4 obtenido en esta tesis doctoral agrupó cepas de *T. maritimum* españolas aisladas de rodaballo y lenguado senegalés del O2 y O3, mientras que el perfil REP 4 de Fernández-Álvarez y col. (2018a) constó sólo de aislados españoles de lenguado común del serotipo O4. Cabe destacar que, en el presente estudio todas las cepas de lenguado senegalés del serotipo O2 se agruparon en el perfil REP 2, y que las cepas de lubina se agruparon en el perfil REP 7. En el dendrograma realizado para la técnica REP-PCR (Figura 12), los aislados no se agrupan de acuerdo con los perfiles REP generados, a excepción del perfil REP 2, mientras que en el estudio de Fernández-Álvarez y col. (2018a) el dendrograma generado sí agrupa los aislados de cada perfil REP en una rama distinta. En el caso del presente análisis, aunque todas las cepas presentan al menos una similitud > 50%, sólo las cepas del perfil REP 2 muestran una similitud del 100% y las cepas del perfil REP 7 una similitud del 80%. Aunque existe una correlación entre algunos perfiles REP y las variables epidemiológicas de hospedador y serotipo, sería necesario ampliar el número de aislados de distintas procedencias y grupo serológico para comprobar si la técnica de REP-PCR es válida para la clasificación de los aislados de *T. maritimum* en base a estas dos variables.

En cuanto a los resultados obtenidos con la técnica de RAPD-PCR, Avendaño-Herrera y col. (2004c) postularon que todos los aislados amplificados con el primer P6 agrupaban de acuerdo con su serotipo y hospedador. En el caso del presente estudio, se ha visto que las cepas siguen una tendencia a agruparse en base a estas dos variables epidemiológicas, pero no de manera tan clara como en el trabajo publicado por Avendaño-Herrera y col. (2004c). Atendiendo a los perfiles genéticos, el perfil RAPD 1, que contiene los aislados de salmón del O2 entre otros, coincide con el perfil de un aislado de salmón del O2 (SO127) de Avendaño-Herrera y col. (2004c), y el perfil RAPD 3 coincide con otro de los perfiles genéticos descritos por estos autores, pero no comparte variables epidemiológicas con el RAPD 3 descrito en esta tesis doctoral.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por otro lado, los resultados obtenidos con la técnica de ERIC-PCR muestran perfiles de amplificación muy parecidos a los descritos por Fernández-Álvarez y col. (2018a) y todos los perfiles presentaron una similitud de más de un 50%, del mismo modo que los aislados del estudio de Fernández-Álvarez y col. (2018a). Cabe destacar que, en el caso del presente estudio se podría establecer una correlación entre los perfiles genéticos y las variables epidemiológicas de hospedador y serotipo. Sin embargo, como se ha comentado en el apartado 3.2.2.3, los perfiles de bandas de los distintos aislados son muy parecidos entre sí, por lo que resulta difícil la asignación de distintos patrones que permita la diferenciación intraespecífica de este patógeno. Por tanto, *T. maritimum* es tipificable mediante la técnica de ERIC-PCR, pero dicha técnica no sería la adecuada para la diferenciación epidemiológica entre los distintos aislados de esta bacteria.

También es importante resaltar el hecho de que cepas con distintos orígenes geográficos presentan los mismos perfiles, independientemente del análisis realizado (REP, RAPD o ERIC-PCR), pero no se agrupan en los dendrogramas realizados. De hecho, utilizando la metodología de REP-PCR (Figura 11) se comprueba que el aislado de *T. maritimum* de origen escocés presenta el mismo perfil (REP 1) que el aislado japonés y que otras cepas españolas, pero el dendrograma los distribuye en ramas diferentes (Figura 12). Igualmente, los resultados obtenidos mediante la técnica de ERIC-PCR, muestran que los aislados escocés y japonés presentan el mismo perfil y agrupan con un aislado español en el dendrograma (Figura 15). De igual forma, en la técnica RAPD-PCR el aislado japonés presenta el mismo perfil que un aislado español de salmón (RAPD 3) (Figura 13) y agrupa con otras cepas españolas de distinto perfil en el dendrograma (Figura 14). El aislado escocés es el único que presenta un perfil único (RAPD 5), separándose de las demás cepas en el dendrograma. Estos hallazgos revelan que los aislados de *T. maritimum* de distintas zonas geográficas presentan perfiles genéticos similares, y que en una misma zona geográfica existen a su vez distintos perfiles genéticos (Sachdeva y Virdi, 2004; Fernández-Álvarez y col., 2018a). Esto puede deberse a la diseminación de *T. maritimum* (Brinkmeyer, 2016: Frisch y col., 2017) entre países

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

derivada del comercio internacional de peces reproductores u otras actividades humanas como la contaminación debida al agua de lastre de los barcos (Georgiades y col., 2021). Así, la diseminación de *T. maritimum* fue sugerida por Frisch y col. (2017) y más adelante contrastada por Brosnahan y col. (2019), quienes relacionaron la presencia de este microorganismo en Nueva Zelanda por la introducción de salmónidos importados de Tasmania, Norteamérica y Europa desde 1880 hasta 1960. Además, la presencia de *T. maritimum* en aguas de manantiales silvestres (Nekouei y col., 2018) en diferentes regiones de Canadá sugiere que la diseminación de este patógeno puede haberse visto influida por las actividades agrícolas.

En cuanto a la caracterización quimiotaxonómica de *T. maritimum*, los cuatro ácidos grasos más abundantes descritos en este trabajo para esta especie bacteriana coinciden con los cuatro ácidos grasos más abundantes del estudio de Piñeiro-Vidal y col. (2008), aunque en distinto orden de abundancia. Así, en el caso del presente estudio, el orden de mayor a menor abundancia fue iso $C_{15:0}$, seguido de iso $C_{15:1}$ G, iso $C_{15:0}$ 3-OH y "*Sum in feature* 3" (que contiene $C_{16:1}\omega 7c$ ⁄o iso-$C_{15:0}$ 2-OH), mientras que en el caso de Piñeiro-Vidal y col. (2008) fue iso $C_{15:0}$, seguido de iso $C_{15:0}$ 3-OH, "*Sum in feature 3*" e iso $C_{15:1}$ G. Sin embargo, contrariamente a lo descrito por Piñeiro-Vidal y col. (2008), no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la abundancia de los distintos ácidos grasos entre cepas de los serotipos O1, O2 y O3, ni con distinto origen de aislamiento, por lo que ninguno de estos ácidos grasos se podría utilizar como marcador quimiotaxonómico a la hora de clasificar los aislados según las distintas variables epidemiológicas dentro de esta especie bacteriana

Solamente el aislado de serotipo O4 analizado presenta un perfil único y diferente de ácidos grasos, el cual podría ser específico de este serotipo. Sin embargo, sería necesario el análisis quimiotaxonómico de más aislados pertenecientes a este serotipo para comprobarlo.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE *T. maritimum*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. ESTUDIO DE LA ESTRUCTURA Y EVOLUCIÓN DE LA POBLACIÓN DE *T. maritimum*

En los últimos años, las técnicas de secuenciación han experimentado un gran desarrollo facilitando el estudio de la diversidad genética de las especies bacterianas. Además, estas técnicas permiten la diferenciación genética entre especies y el estudio de la relación evolutiva y epidemiológica entre las distintas cepas de una misma especie bacteriana patógena.

La genómica de poblaciones emplea los datos de secuencia de los genomas para establecer relaciones entre el fenotipo, el genotipo de una población y la información epidemiológica de los aislados como el origen geográfico, el hospedador del que fueron aislados o el año de aislamiento (Jolley y col., 2018).

Una de las técnicas utilizadas para el estudio epidemiológico de la estructura y la evolución de una población bacteriana es el tipado de secuencia multigénica (MLST, del inglés, *MultiLocus Sequence Typing*). Esta técnica se introdujo en 1998 como un método de tipificación bacteriana para estudios epidemiológicos de genética poblacional (Maiden y col., 1998) basado en el análisis de un grupo de genes constitutivos, de mantenimiento o *housekeeping*. La técnica de MLST se basa en la amplificación mediante PCR de fragmentos internos de estos genes constitutivos que posteriormente son secuenciados y empleados en estudios filogenéticos y de genética evolutiva y poblacional tanto a nivel intraespecífico como interespecífico (Maiden y col., 2013). Esta técnica es altamente reproducible y sensible para estudios epidemiológicos de bacterias patógenas y proporciona un conocimiento de la diversidad de las relaciones evolutivas entre los distintos aislados de una población bacteriana.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En contraste con otras técnicas de tipificación que implican la comparación de tamaños de fragmentos de ADN en geles de agarosa, la técnica de MLST permite comparar los datos de secuencia y los perfiles alélicos generados y asignados a cada aislado en la base de datos pubMLST (Jolley y col., 2018) disponible en internet.

En este trabajo se ha realizado un estudio de la estructura y evolución de la población de *T. maritimum* con el objetivo de entender su mecanismo evolutivo y si los cambios genéticos están relacionados con las diferentes variables epidemiológicas de este patógeno. Además, se ha analizado si el conjunto de cepas de la Península Ibérica (PI) sigue el mismo patrón de evolución que toda la población.

4.1 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo y extracción de ADN

Para este estudio se emplearon 45 aislados (Tabla 12) obtenidos de distintas especies de peces, con distinto origen geográfico, año de aislamiento y diferente serotipo. Estos aislados fueron cultivados rutinariamente en FMM agar y caldo (Pazos y col., 1996) e incubados a 25ºC durante 48 horas, en agitación a 150rpm en el caso de los cultivos en líquido. Además, en este estudio se incluyeron las secuencias de todas las cepas de *T. maritimum* (Habib y col., 2014; Olsen y col., 2017; Frisch y col., 2017) depositadas en la base de datos pubMLST (https://pubmlst.org/organisms/tenacibaculum-spp), resultando un total de 132 aislados para analizar (Tabla 12). Para la extracción del ADN genómico desde cultivos puros se utilizó el kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante para bacterias Gram negativas. Las muestras se eluyeron en H_2O destilada libre de nucleasas (Sigma-Aldrich). La concentración y la pureza del ADN extraído se midió en el espectrofotómetro NanoDrop™ One/One^C (Thermo Fisher Scientific).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 12. Datos epidemiológicos y del análisis del MLST de las cepas de *T. maritimum* utilizadas en esta tesis doctoral.

CEPA	ST	ANÁLISIS EBURST	ANÁLISIS STRUCTURE	HOSPEDADOR	SEROTIPO	AÑO	ORIGEN GEOGRÁFICO
NCIMB 2154^{T}	1 (1, 1, 1, 1, 1, 1, 1)	CC5	Linaje 2	*P. major*	O1	1977	Japón
PC1012.1	1 (1, 1, 1, 1, 1, 1, 1)	CC5	Linaje 2	*S. maximus*	O2	2008	España
JIP 05/00(1)	1 (1, 1, 1, 1, 1, 1, 1)	CC5	Linaje 2	*S. maximus*	ND	2000	Francia
SP9.1	2 (2, 2, 2, 2, 2 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. salar*	O4	1993	España
SNW25.1*	3 (2, 3, 1, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. salar*	O4	2015	España
SNW24.1*	4 (3, 3, 1, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. salar*	O4	2015	España
SNW21.1*	5 (4, 4, 1, 3, 4 ,2, 3)	Singleton	Linaje 2	*S. salar*	O2	2015	España
SNW20.1*	5 (4, 4, 1, 3, 4 ,2, 3)	Singleton	Linaje 2	*S. salar*	O2	2015	España
SNW19.1*	5 (4, 4, 1, 3, 4 ,2, 3)	Singleton	Linaje 2	*S. salar*	O2	2015	España
SNW20.2*	6 (2, 3, 2, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. salar*	O4	2015	España
USC SE30.1	6 (2, 3, 2, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*O. kisutch*	O4	1993	España
SNW15.1*	7 (5, 5, 1, 4, 5 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. salar*	O3	2014	España
SNW11.1*	7 (5, 5, 1, 4, 5 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. salar*	O3	2014	España
SNW6.1*	7 (5, 5, 1, 4, 5 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. salar*	O3	2014	España
SNW5.1*	7 (5, 5, 1, 4, 5 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. salar*	O3	2014	España
RM276.1*	8 (6, 1, 1, 4, 5 ,2, 4)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	O1	2004	España
RM265.1*	9 (6, 1, 1, 4, 6 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	O1	2002	España
RI136.1*	10 (7, 1, 3, 4, 5 ,3, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	O3	2001	España
PC824.1	11 (8, 6, 4, 5, 5 ,2, 5)	Singleton	Linaje 3	*S. aurata*	O1	2003	España
PC682.1*	12 (2, 7, 5, 2, 2 ,4, 5)	Singleton	Linaje 4	*S. maximus*	O2	2003	España
PC538.1	13 (8, 6, 6, 4, 7 ,1, 6)	Singleton	Linaje 3	*S. aurata*	O1	2002	España
PC529.1*	14 (9, 6, 7, 4, 7 ,1, 6)	Singleton	Linaje 3	*S. senegalensis*	O1	2002	España

CEPA	ST	ANÁLISIS EBURST	ANÁLISIS STRUCTURE	HOSPEDADOR	SEROTIPO	AÑO	ORIGEN GEOGRÁFICO
PC503.1	15 (8, 6, 1, 4, 7 ,2, 1)	Singleton	Linaje 3	*S. senegalensis*	O1	2001	España
PC424.1	16 (10, 1, 1, 4, 6 ,2, 7)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	O2	2000	España
CA53.1*	16 (10, 1, 1, 4, 6 ,2, 7)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	O2	2007	España
CA51.1*	16 (10, 1, 1, 4, 6 ,2, 7)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	O2	2007	España
RI93.1	16 (10, 1, 1, 4, 6 ,2, 7)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	O2	2002	España
JIP 10/97	16 (10, 1, 1, 4, 6 ,2, 7)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	ND	1997	Francia
JIP 24/99	16 (10, 1, 1, 4, 6 ,2, 7)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	O2	1999	Francia
JIP 31/99	16 (10, 1, 1, 4, 6 ,2, 7)	Singleton	Linaje 1	*S. maximus*	ND	1999	Francia
LSP91.2*	17 (2, 2, 2, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. senegalensis*	O4	2013	Portugal
LSP22.1*	17 (2, 2, 2, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. senegalensis*	O4	2013	Portugal
LSP9 .1*	17 (2, 2, 2, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. senegalensis*	O4	2012	Portugal
USC RP67.1	17 (2, 2, 2, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. maximus*	O2	1993	España
LSP73.1*	18 (2, 2, 1, 2, 3 ,2, 2)	CC2	Linaje 4	*S. senegalensis*	O4	2013	Portugal
LSP59.1*	19 (11, 2, 2, 4, 3 ,2, 1)	Singleton	Linaje 2	*S. senegalensis*	O4	2013	Portugal
LgV1-04*	20 (5, 1, 2, 4, 8 ,5, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. senegalensis*	O1	2004	España
LgH35-03*	21 (7, 5, 3, 6, 6 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. senegalensis*	ND	2003	España
LD29.1*	22 (7, 1, 1, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. maximus*	O2	2004	España
CA56.1*	22 (7, 1, 1, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O3	2007	España
IEO8.1*	23 (5, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2003	España
CA61.1*	23 (5, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O3	2007	España
NAC SLCC 101	23 (5, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	ND	1995	Malta
COS 4.1*	24 (7, 1, 1, 1, 8 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O3	2011	España
COS 2.1	25 (7, 1, 1, 4, 8 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O3	2011	España
COS3.1	25 (7, 1, 1, 4, 8 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O3	2011	España

CEPA	ST	ANÁLISIS EBURST	ANÁLISIS STRUCTURE	HOSPEDADOR	SEROTIPO	AÑO	ORIGEN GEOGRÁFICO
CA80.1*	26 (10, 5, 8, 7, 4 ,2, 8)	Singleton	Linaje 2	*S. maximus*	O2	2007	España
CA50.1*	26 (10, 5, 8, 7, 4 ,2, 8)	Singleton	Linaje 2	*S. senegalensis*	O2	2007	España
CA42.1	26 (10, 5, 8, 7, 4 ,2, 8)	Singleton	Linaje 2	*S. senegalensis*	O2	2006	España
CA43.1	26 (10, 5, 8, 7, 4 ,2, 8)	Singleton	Linaje 2	*S. senegalensis*	O2	2006	España
CA67.1*	27 (12, 6, 4, 8, 7 ,6, 6)	Singleton	Linaje 3	*S. senegalensis*	O1	2007	España
CA66.1*	27 (12, 6, 4, 8, 7 ,6, 6)	Singleton	Linaje 3	*S. senegalensis*	O1	2007	España
CA64.1*	27 (12, 6, 4, 8, 7 ,6, 6)	Singleton	Linaje 3	*S. senegalensis*	O1	2007	España
CA63.1*	27 (12, 6, 4, 8, 7 ,6, 6)	Singleton	Linaje 3	*S. senegalensis*	O1	2007	España
CA59.1*	28 (5, 1, 1, 3, 1 ,2, 3)	Singleton	Linaje 2	*S. maximus*	O2	2007	España
CA58.1*	29 (7, 1, 1, 1, 1 ,1, 1)	CC5	Linaje 2	*S. maximus*	O2	2007	España
CA54.1*	30 (5, 1, 1, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O3	2007	España
ACR589.1*	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2015	España
ACR584.1*	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2014	España
ACR581.1*	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2014	España
ACR570.1*	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2014	España
ACR567.1*	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2014	España
ACR491.1	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2011	España
ACR485.1	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2011	España
ACR488.1	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O2	2011	España
JIP 21/91-1	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	ND	1991	Francia
JIP 21/91-2	31 (7, 5, 3, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	O1	1991	Francia
ACC20.1*	32 (7, 5, 1, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O3	2004	Portugal
ACC13.1	32 (7, 5, 1, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. senegalensis*	O3	2004	Portugal
ACC8.1*	32 (7, 5, 1, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. maximus*	O3	2003	Portugal

CEPA	ST	ANÁLISIS EBURST	ANÁLISIS STRUCTURE	HOSPEDADOR	SEROTIPO	AÑO	ORIGEN GEOGRÁFICO
AF37.1	33 (13, 6, 4, 5, 5 ,6, 9)	CC4	Linaje 3	*P. bogaraveo*	O1	2006	España
AF39.1	34 (13, 6, 4, 5, 5 ,6, 6)	CC4	Linaje 3	*P. bogaraveo*	O1	2006	España
PC834.1	34 (13, 6, 4, 5, 5 ,6, 6)	CC4	Linaje 3	*S. aurata*	ND	2003	España
FS08(1)	35 (14, 6, 9, 5, 5 ,6, 6)	Singleton	Linaje 3	*S. aurata*	O1	2006	Italia
NCIMB 2153	36 (14, 6, 9, 5, 7 ,7, 1)	Singleton	Linaje 2	*A. schlegelii*	O1	1976	Japón
NCIMB 2158	37 (16, 1, 1, 3, 5 ,2, 3)	Singleton	Linaje 2	*S. solea*	O2	1981	Escocia
RIM70.1	38 (13, 6, 9, 5, 7 ,6, 9)	Singleton	Linaje 3	*S. maximus*	O2	2009	España
USC RPM539.1	39 (9, 5, 11, 7, 4 ,3, 1)	Singleton	Linaje 2	*S. maximus*	O1	1993	España
DPIF 90/1445	40 (7, 1, 2, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*S. salar*	ND	1990	Tasmania
DPIF 89/0239-1	41 (2, 5, 1, 4, 4 ,8, 11)	Singleton	Linaje 2	*S. salar*	O3	1989	Tasmania
DPIF 89/0235-3	42 (17, 1, 3, 4, 4 ,9, 10)	Singleton	Linaje 2	*O. mykiss*	ND	1989	Tasmania
DPIF 89/0528-1	42 (17, 1, 3, 4, 4 ,9, 10)	Singleton	Linaje 2	*S. salar*	ND	1989	Tasmania
DPIF 89/0329-11	43 (5, 5, 1, 10, 9 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. salar*	ND	1989	Tasmania
DPIF 89/0329-5	43 (5, 5, 1, 10, 9 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. salar*	ND	1989	Tasmania
DPIF 89/0699	43 (5, 5, 1, 10, 9 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*S. salar*	ND	1989	Tasmania
DPIF 89/1288-8	43 (5, 5, 1, 10, 9 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*O. mykiss*	ND	1989	Tasmania
DPIF 89/0578-4	44 (7, 1, 2, 10, 9 ,2, 7)	Singleton	Linaje 1	*S. salar*	ND	1989	Tasmania
DPIF 89/3001-6.2	45 (2, 8, 12, 4, 7 ,1, 1)	Singleton	Linaje 2	*L. lineata*	O3	1989	Tasmania
Baxa 1y 1-1	46 (9, 1, 13, 4, 4 ,2, 12)	CC3	Linaje 2	*A. schlegeli*	ND	1985	Japón
JIP 46/00	47 (18, 9, 14, 4, 10 ,2, 1)	Singleton	Linaje 2	*S. maximus*	ND	2000	Francia
CVI10001048	48 (7, 5, 1, 4, 11 ,2, 13)	Singleton	Linaje 1	*S. solea*	O1	2010	Holanda
JIP 32/99	48 (7, 5, 1, 4, 11 ,2, 13)	Singleton	Linaje 1	*D. labrax*	O1	1991	Francia
Baxa DBA-4a	49 (9, 1, 2, 4, 4 ,2, 13)	Singleton	Linaje 2	*S. quinqueradiata*	ND	1986	Japón
FC	50 (19, 9, 3, 4, 4 ,2, 1)	Singleton	Linaje 2	*S. maximus*	O1	1998	Chile

CEPA	ST	ANÁLISIS EBURST	ANÁLISIS STRUCTURE	HOSPEDADOR	SEROTIPO	AÑO	ORIGEN GEOGRÁFICO
FM1068	51 (19, 1, 2, 10, 4 ,2, 1)	Singleton	Linaje 2	*D. labrax*	ND	1993	Francia
FPC371	52 (20, 1, 13, 4, 4 ,2, 12)	CC3	Linaje 2	*P. major*	ND	1977	Japón
FPC386	53 (21, 10, 3, 9, 4 ,2, 14)	Singleton	Linaje 2	*P. major*	O1	1978	Japón
FPC394	53 (21, 10, 3, 9, 4 ,2, 14)	Singleton	Linaje 2	*P. major*	O1	1982	Japón
FPC454	54 (15, 1, 13, 4, 4 ,2, 15)	Singleton	Linaje 2	*P. major*	ND	1983	Japón
Baxa GBF-8601	55 (10, 5, 2, 11, 4 ,2, 1)	Singleton	Linaje 2	*P. olivaceus*	ND	1986	Japón
JIP 21/91-3	56 (7, 1, 1, 4, 5 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	ND	1991	Francia
JIP 32/91-1	56 (7, 1, 1, 4, 5 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	ND	1991	Córcega
JIP 32/91-3	56 (7, 1, 1, 4, 5 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	ND	1991	Córcega
JIP 32/91-4	56 (7, 1, 1, 4, 5 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	O3	1991	Córcega
JIP 32/91-5	56 (7, 1, 1, 4, 5 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	NA	1991	Córcega
JIP 32/91-6	56 (7, 1, 1, 4, 5 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	NA	1991	Córcega
LVDH 1577.01	57 (7, 1, 1, 4, 5 ,2, 16)	CC1	Linaje 1	*D. labrax*	O3	2001	Francia
USC RPM522.1	58 (7, 11, 2, 10, 4 ,8, 1)	Singleton	Linaje 2	*S. maximus*	O1	1992	España
UCD SB2	59 (22, 1, 1, 4, 12 ,2, 1)	Singleton	Linaje 2	*A. nobilis*	O2	1995	California
UCD SD26	60 (10, 5, 1, 4, 13 ,2, 17)	Singleton	Linaje 2	*A. nobilis*	NA	1995	California
NAC SLCC 105	61 (4, 5, 2, 4, 14 ,2, 1)	Singleton	Linaje 2	*D. labrax*	NA	1995	Malta
NAC SLCC 109	62 (23, 1, 1, 12, 9 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*D. labrax*	NA	1995	Malta
NAC SLCC 115	62 (23, 1, 1, 12, 9 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*D. labrax*	NA	1996	Malta
NAC SLCC 120	62 (23, 1, 1, 12, 9 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*D. labrax*	NA	1996	Malta
NAC SLCC MFF	63 (8, 6, 7, 4, 7 ,2, 6)	Singleton	Linaje 3	*D. labrax*	O1	ND	Malta
UCD V2b	64 (10, 9, 3, 7, 4 ,2, 17)	Singleton	Linaje 2	*A. nobilis*	NA	1993	California
UCD V6f	65 (10, 5, 1, 4, 15 ,2, 18)	Singleton	Linaje 2	*E. mordax*	NA	1994	California
UCD WSB-1b	66 (3, 5, 1, 13, 16 ,2, 1)	Singleton	Linaje 2	*A. nobilis*	NA	1994	California

CEPA	ST	ANÁLISIS EBURST	ANÁLISIS STRUCTURE	HOSPEDADOR	SEROTIPO	AÑO	ORIGEN GEOGRÁFICO
TmarCan16-10	67 (2, 12, 15, 2, 2 ,1, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan16-8	67 (2, 12, 15, 2, 2 ,1, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan16-5	67 (2, 12, 15, 2, 2 ,1, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan15-1	67 (2, 12, 15, 2, 2 ,1, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2015	Canada
TmarCan16-9	68 (24, 13, 15, 14, 17 ,4, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan16-7	68 (24, 13, 15, 14, 17 ,4, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan16-6	68 (24, 13, 15, 14, 17 ,4, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan16-4	68 (24, 13, 15, 14, 17 ,4, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan16-3	68 (24, 13, 15, 14, 17 ,4, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan16-2	68 (24, 13, 15, 14, 17 ,4, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan16-1	68 (24, 13, 15, 14, 17 ,4, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2016	Canada
TmarCan11-1	68 (24, 13, 15, 14, 17 ,4, 1)	Singleton	Linaje 4	*S. salar*	NA	2011	Canada
TNO091	69 (5, 1, 2, 4, 4 ,2, 1)	CC1	Linaje 1	*C. lumpus*	NA	ND	Noruega
TNO092	70 (7, 5, 7, 4, 6 ,2, 1)	Singleton	Linaje 1	*C. lumpus*	NA	ND	Noruega

* Cepas nuevas incluidas en este trabajo. ND: datos no disponibles, CC: Complejo Clonal, ST: Secuencia Tipo. Se muestran los distintos linajes generados mediante el programa Structure en distintos colores. Linaje 1: rojo; linaje 2: verde; linaje 3: amarillo; linaje 4 azul. Los números entre paréntesis de cada ST hacen referencia a los alelos tipo (AT) identificados para cada gen utilizado, siguiendo el siguiente orden: *atp*A, *dna*K, *gly*A, *gyr*B, *inf*B, *rlm*N, *tgt*.

4.1.2 Amplificación y secuenciación de los genes

El estudio poblacional se realizó utilizando la secuencia parcial de 7 genes constitutivos empleados en estudios previos llevados a cabo con la bacteria *T. maritimum* (Habib y col., 2014; Olsen y col., 2017; Frisch y col., 2017). Los 7 genes seleccionados fueron el *atp*A (subunidad a de la ATP sintasa), *dna*K (proteína chaperona), *gly*A (serina hidroximetiltransferasa), gyrB (subunidad B de la ADN girasa), *inf*B (factor de iniciación de la traducción IF2), *rlm*N (ARN metiltransferasa de doble especificidad) y *tgt* (*queuine tRNA-ribosyltransferase)*. Todas las reacciones de PCR se realizaron empleando el kit comercial *Illustra*^{TM} *PuReTaq Ready-To-Go*^{TM} *PCR Beads* (GE Healthcare, Buckinghampshire, UK), que contiene todos los componentes necesarios para la PCR: BSA, dATP; dCTP, dGTP, dTTP estabilizadores, tampón de reacción y 2,5 unidades de pureTaq polimerasa. Cuando una *bead* se reconstituye en 25µL de volumen final, la concentración de cada dNTP es 200µM en 10mM de Tris-HCl (pH 9), 50mM de KCl y 1,5mM de $MgCl_2$. La concentración de todos los cebadores utilizados en las reacciones de amplificación de cada uno de los genes fue de 10µM y la concentración de ADN de todos los aislados bacterianos empleados fue de 100ng/µL. Todas las reacciones de PCR se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Habib y col. (2014) detallado en la Tabla 13 y los cebadores utilizados para la amplificación de estos genes se detallan en la Tabla 14 (Habib y col., 2014).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 13. Programa de PCR empleado en el análisis MLST de esta tesis doctoral

PASO	TEMPERATURA (ºC)	TIEMPO (T)	CICLOS
Desnaturalización inicial	94	5´	
Desnaturalización	94	30´´	
Hibridación	55	30´´ (-0,4ºC/ciclo)	24
Elongación	72	1´(+2´´/ciclo)	
Desnaturalización	94	30´´	
Hibridación	45	30´´	12
Elongación	72	2´(+3´´/ciclo)	
Elongación final	72	10´	

Tabla 14. Cebadores empleados en la amplificación por PCR de los genes empleados en este estudio.

Locus	Nombre del cebador	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicón (pb)	Tamaño empleado en el MLST (pb)
*atp*A	*atp*AF	ATTGGWGAYCGTCAAACWGG	764	567
	*atp*AR	CCAAAYTTAGCRAAHGCTTC		
*dna*K	*dna*KF	GGWACYACNAAYTCDTGTGT	770	573
	*dna*kR	TCWATCTTMGCTTTYTCAGC		
*gly*A	*gly*AF	CAYTTAACWCAYGGWTCDCC	713	558
	*gly*AR	ACCATRTTTTTRTTTACHGT		
*gyr*B	gyrBF	AGTATYCARGCRCTRGAAGG	830	597
	gyrBR	GTWCCTCCTTCRTGYGTRTT		
*inf*B	infBF	ATGCCDCAAACWAAAGARGC	761	564
	infBR	GTAATHGCTCCAACYCCTTT		
*rlm*N	rlmNF	GCKTGTGTDTCDAGYCARGT	704	549
	rlmNR	CCRCADGCDGCATCWATRTC		
tgt	tgtF	GAAACWCCWATWTTYATGCC	614	486
	tgtR	TAYAWYTCTTCNGCWGGTTC		

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Los productos de amplificación obtenidos fueron separados mediante electroforesis horizontales durante 60 minutos a 90 voltios (V) en geles agarosa al 1% (p/v) sumergidos en tampón de electroforesis TAE 1X (0,04M Tris, 0,0001M EDTA, pH 8) (Sambrook y col., 1989). Como marcador molecular se utilizó el marcador de peso molecular FastRuler Low Range de 50-1500 pb (Thermo Fisher Scientific Inc). Los geles se tiñeron con 4µl de RealSafe (Real Laboratory, Valencia, Spain) y se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (BioRad).

Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados mediante secuenciación Sanger por la empresa Stab Vida Lcd. (Portugal). Los electroferogramas proporcionados por Stab Vida para cada gen se ensamblaron empleando los programas SeqMan y EditSeq del paquete informático Lasergene (DNASTAR lasergene v7.1.0) y se corrigieron manualmente. Posteriormente, se comprobó mediante la base de datos pública BLAST (Altschul y col., 1990) que las secuencias obtenidas se correspondían con los genes secuenciados.

4.1.3 Análisis de la estructura poblacional

Siguiendo los protocolos para la realización de un análisis MLST (Maiden, 2006), primero se realizó una asignación arbitraria de los números que identifican cada alelo distinto (AT, alelos tipo) a cada una de las diferentes secuencias, aunque se diferenciasen en un solo nucleótido. Posteriormente, para cada cepa o aislado se determinó un perfil alélico o tipo de secuencia (ST, del inglés, *Sequence Type*), que consiste en la combinación única de los ATs obtenidos para todos los *loci* estudiados en el siguiente orden: *atp*A, *dna*K, *gly*A, *gyr*B, *inf*B, *rlm*N, *tgt*. Después, se procedió a realizar los análisis estadísticos a partir de las secuencias, para determinar la estructural poblacional de *T. maritimum.*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.1.3.1 Cálculo de índices de variabilidad

Pi (π) y Theta (θ)

Son medidas de la diversidad nucleotídica. Pi (π) es el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar (Nei y Li, 1979). Este parámetro se ve afectado por los alelos con mayor frecuencia y es independiente del tamaño muestral. Theta (θ) es el número total de sitios segregativos (lugares en los que difiere una secuencia) en una muestra de secuencia dada, y está afectado por la deriva génica y por el tamaño muestral. El cálculo de π y θ se realizó para cada uno de los genes individuales, así como para el concatenado utilizando el programa DnaSP6 (Rozas y col., 2017).

Relación d_N/d_S

Estudia el tipo de selección que actúa en la población en base a las sustituciones sinónimas (d_S) y las no sinónimas (d_N). Si ambos valores son iguales, se cumpliría la hipótesis de neutralidad, dónde $d_N = d_S$. Si $d_N/d_S > 1$ indica que la selección es positiva, y si $d_N/d_S < 1$, la población se encuentra bajo selección purificadora. La relación d_N/d_S se calculó siguiendo el método de Nei y Gojobori (1986) empleando el programa START2 (del inglés, *Sequence Type Analysis and Recombination Tests*), disponible en http://pubmlst.org/software/analysis/start2/.

4.1.3.2 Estudio del equilibrio de ligamiento

Índice de asociación (I_A)

Define la probabilidad de que dos cepas o haplotipos elegidos al azar en la población difieran en un *locus* determinado. Se estima el valor esperado (V_E) para la varianza en la distribución de no coincidencias a partir de las frecuencias alélicas para un locus dado. Este valor se compara con el valor de la varianza observado para nuestras muestras (V_O), obteniéndose una medida del grado de asociación entre alelos en los *loci* estudiados que se expresa como el índice de asociación I_A (Brown y col., 1980; Maynard- Smith y col., 1993).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El índice I_A estima si existe un desequilibrio de ligamiento en la muestra estudiada. Así, los valores que difieren significativamente de cero ($V_O \neq V_E$) indican desequilibrio o un cierto grado de asociación entre los alelos de los diferentes *loci* estudiados. Cuando esto ocurre, los alelos no están distribuidos al azar, sino que existen combinaciones alélicas que se dan con mayor frecuencia que otras. El grado de recombinación existente en la población no es suficiente para romper estas asociaciones alélicas, por lo que la población presenta una estructura clonal. Si, por el contrario, el valor de I_A no es significativamente diferente de cero ($V_O=V_E$), los alelos se encuentran en equilibrio de ligamiento. En este caso, la población presenta una tasa muy elevada de recombinación y es capaz de romper cualquier posible asociación entre alelos en los distintos *loci* analizados. Este índice se calculó utilizando el programa START2, disponible en http://pubmlst.org/software/analysis/start2/.

Índice de asociación estandarizado (I^S_A)

Es una modificación del I_A en el que el valor no depende del número de *loci* analizados (Haubold y Hudson, 2000). El programa (START2) y la interpretación de los valores resultantes es igual que para el I_A.

4.1.3.3 Estudio de la estructura poblacional

Esquema eBURST

Una vez establecidos los ATs y los STs, como se ha detallado en el apartado 4.1.3, se procedió a la búsqueda de las relaciones entre estos STs y a la búsqueda del ancestro común de la población estudiada. Esto se realizó conforme a las relaciones entre las variantes de los diferentes *loci*, siendo SLV (del inglés, *Single Locus Variant*) las variaciones en un solo locus y DLV (del inglés, *Double Locus Variant*) las variaciones en dos *loci*, mediante la realización de 1000 *bootstrap*. De este modo, se denomina complejo clonal (CC) a un grupo de un mínimo de dos STs que se relacionan entre sí mediante SLVs, en el cual cada ST comparte 9 de cada 10 *loci* con otro ST del complejo. Cuando los STs no se pueden agrupar en forma de CC, se

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

denominan *singletones*. El esquema eBURST se realizó con el programa eBURST v3.0 (http://eburst.mlst.net).

Red genealógica de haplotipos

Para determinar las relaciones genealógicas de los haplotipos se construyó una red utilizando el método de *Median–Joining* (MJ) (Bandelt y col., 1999) incluido en el programa NETWORK 4.2.0.1 (http://www.fluxus–engineering.com). Esta red se compone de dos tipos de nodos: los que representan las secuencias analizadas y cuyo tamaño es proporcional al número de aislados que contienen, y los nodos que representan los vectores medios. Estos vectores medios (mv, del inglés *median vector*) son secuencias hipotéticas necesarias para conectar las secuencias reales ya existentes en la red a través de máxima parsimonia. Las conexiones entre ellos hacen referencia a las mutaciones existentes entre los nodos (Farris, 1970).

Estudio filogenético

El alineamiento múltiple de las secuencias en pauta se realizó empleando el programa MEGA7 (Kumar y col., 2016) utilizando los parámetros de alineamiento por defecto en MEGA7. Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se revisaron y se corrigieron manualmente. Debido a que las secuencias de los genes codificantes de proteínas presentan diferente pauta de lectura, se alineó cada gen de manera individual, y posteriormente se realizó el concatenando de las secuencias. El análisis filogenético de los 132 aislados de *T. maritimum* se realizó mediante métodos basados en distancias, caracteres y probabilidades. Las secuencias de los genes individuales y la concatenación de éstos se analizaron mediante métodos *Neighbor Joining* (NJ), usando el modelo Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969). En el caso del método de Máxima Verosimilitud (ML, del inglés *Maximum Likelihood*) se realizó previamente una estimación para cada gen del mejor modelo evolutivo de sustitución nucleotídica mediante el programa MEGA7, usando el *Akaike Information Criterion* (AIC). Este AIC es un estimador que mide la distancia esperada entre el modelo verdadero y el modelo estimado (Posada y Buckley, 2004). Así, el modelo empleado en el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

método ML fue el modelo general reversible en el tiempo (GTR, del inglés *General Time Reversible*) +G (tasa de variación entre sitios) +I (sitios invariables) (Tavaré, 1986). Para todos los árboles se obtuvieron los valores de *bootstrap* (método no paramétrico de remuestreo) implementando 1000 pseudo–réplicas. Los árboles filogenéticos generados a partir de los análisis se visualizaron mediante el programa MEGA7.

4.1.3.4 Estudio de recombinación y mutación

El número mínimo de eventos de recombinación (R_{min}) (Hudson y Kaplan, 1985) se calculó mediante el programa DnaSP6 (Rozas y col., 2017). Por otro lado, se realizó el phi test (del inglés, *pairwise homoplasy index*) (Huson y Bryant, 2006) utilizando el programa SplitsTree v4.0 (Huson y Bryant, 2006) que localiza las regiones de DNA con una mayor evidencia de mosaicismo. Además, estos resultados se analizaron gráficamente mediante la construcción de diagramas de descomposición de particiones (*Split decomposition analysis*) empleando el mismo programa informático. Estos diagramas transforman los datos en una serie de particiones compatibles y se representan mediante un esquema no jerárquico en forma de red (*Split graph*) (Bandelt y Dress, 1992). Los diagramas adquieren forma de árbol reticulado en el que los paralelogramos mostrados pueden ser considerados como indicador de diferentes filogenias dentro de la población estudiada.

Por otro lado, se analizó la relación entre las tasas de recombinación y mutación mediante el uso de los parámetros, r/m (recombinación/mutación) y ρ/θ (rho/theta) empleando el programa ClonalFrame (Didelot y Falush, 2007). El parámetro ρ/θ establece el ratio o medida de la frecuencia en el que ocurren eventos de recombinación y mutación en una muestra. La relación entre r/m es la ratio de probabilidades de que un sitio determinado en una secuencia sea alterado por recombinación y mutación. Es una medida que considera la importancia que tiene la recombinación en la diversificación de la población en relación con la mutación.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Por último, el programa STRUCTURE v2.3 (Pritchard y col., 2000; Falush y col., 2003, 2007; Hubisz y col., 2009) se empleó para identificar grupos con distintas frecuencias de alelos y para la identificación de aislados portadores de ADN extraño, es decir, para la identificación de distintas poblaciones genéticas, la asignación de individuos a las poblaciones y la identificación de los migrantes. Este programa analiza las diferencias en la distribución de variantes genéticas entre las poblaciones con un algoritmo reiterativo bayesiano colocando muestras en grupos cuyos miembros comparten frecuencias alélicas para cada *locus*. Este modelo asume que los marcadores no están en desequilibrio de ligamiento. Cuando subpoblaciones distintas están genéticamente próximas, se pueden generar nuevos patrones genéticos mediante recombinación. Las diferentes líneas genéticas están representadas mediante colores y la creación de nuevos patrones genéticos mediante recombinación, genera patrones en los que los colores se mezclan. La cantidad de subpoblaciones (K) se estableció de entre una a diez y todas las ejecuciones se repitieron cinco veces. El mejor modelo de probabilidad se estimó utilizando 100.000 interacciones en un período de *burn-in* y una MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) de 50.000.

4.1.3.5 Genealogía clonal

La genealogía clonal se construyó utilizando el programa ClonalFrame v1.1 (Didelot y Falush, 2007) que emplea métodos bayesianos para inferir filogenias utilizando el método de Montecarlo basado en cadenas de Markov (MCMC, del inglés *Markov Chain Monte Carlo*). Las inferencias se realizan aplicando diferentes modelos y escenarios evolutivos para determinar cuál de ellos ha dado lugar a los datos actuales. Esta aproximación se diferencia del método bayesiano puro en que el programa ClonalFrame tiene en cuenta el efecto de la recombinación. Esto permite estudiar el tipo de evento ocurrido en cada rama, es decir si la divergencia en ese punto ocurrió por mutación o recombinación. El programa genera un árbol consenso de entre las distintas descomposiciones que encuentra para la población siguiendo la regla de la mayoría del 50%, y al considerar todos los eventos posibles puede calcular las tasas de recombinación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y/o mutación que ocurren en cada nodo. La principal ventaja que presenta este método es que la filogenia es mucho más precisa y muestra información sobre los procesos de recombinación por sí mismos (Didelot, 2010; Didelot y Falush, 2007). Los análisis se realizaron con los parámetros incluidos por defecto en el programa con 100000 iteraciones de MCMC.

4.1.3.6 Historia demográfica de la población

La evolución biológica es el conjunto de variaciones en los caracteres fenotípicos y genéticos de las poblaciones biológicas en el tiempo. En un principio se pensaba que los encargados de mantener la biodiversidad en cada nivel de la organización biológica eran los procesos evolutivos. Más adelante, con el avance de las técnicas moleculares se determinó que esta teoría no se podía justificar sólo mediante la selección natural, y se desarrolló la teoría neutra de la evolución (Kimura, 1968; 1983). Esta teoría postula que la mayor parte de la variación a nivel molecular no se mantiene por la selección de tipo darwiniano (adaptativa), sino que es resultado de un balance entre la deriva génica y las mutaciones neutras o casi neutras (Kimura, 1983; Nei y Kumar, 2000; Ohta y Basten, 1992). Esto se traduce en que las variaciones a nivel molecular tienen lugar de forma aleatoria y no tienen función adaptativa.

Con el fin de detectar la implicación de la selección en una región del genoma o gen, hay que conocer si la hipótesis nula de que la selección no actúa en las secuencias mencionadas es aprobada o rechazada. Esto se lleva a cabo mediante los postulados de Kimura (1968; 1983), los cuales permiten generar patrones esperados para la evolución de las secuencias si existiesen desviaciones del modelo neutro originadas por mutación y deriva génica sin la participación de la selección. Los estudios de selección natural llevados a cabo en este capítulo se han basado en la distribución de polimorfismos. Estos índices analizan la información proporcionada por los estimadores de diversidad genética π y θ, y la relación que existe entre ellos permite conocer si las secuencias se encuentran bajo el modelo neutral o si existe alguna desviación. Si π y θ son iguales, se interpreta como que

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

el polimorfismo es neutro, encontrándose distribuido aleatoriamente por la muestra. Si, por el contrario, existen diferencias entre π y θ, la selección está afectando a alguno de los estimadores promoviendo su incremento o disminución. Si π es mayor que θ, se incrementan las frecuencias alélicas y existe una selección positiva. Para determinar estas diferencias se emplearon varias pruebas que se detallan a continuación:

Prueba de Tajima (D) (Tajima, 1989)

Detecta las diferencias entre π y θ con la determinación del estadístico D y se define como:

$$D = \frac{\pi - \theta}{\sqrt{V(\pi - \theta)}}$$

Cuando D es igual a 0 indica que la población se encuentra bajo equilibrio neutral. Si D es negativa ($\pi > \theta$) indica la presencia de mutaciones deletéreas, y si es positiva ($\pi < \theta$) indica que algunos alelos se encuentran bajo selección positiva, incrementando sus frecuencias.

Método de Fu y Li (D* y F*) (Fu y Li, 1993)

La diferencia con el índice de Tajima es que el método de Fu y Li considera la distribución de las mutaciones en una genealogía de muestras tomadas al azar a partir de una población dada. Supone que las mutaciones antiguas serán detectadas con mayor probabilidad en las ramas más antiguas de la genealogía, y las más recientes en las ramas más externas. Con estos dos estadísticos (D* y F*) las desviaciones de la neutralidad se identifican como las desviaciones del estimador θ derivadas del número de mutaciones en las ramas externas de la filogenia y de número total de las mutaciones (D*) o de la media de la diversidad pareada (*pairwise diveristy*) (F*). Si estos estadísticos presentan valores positivos, existe un déficit en las mutaciones en las ramas externas, indicando la presencia de alelos inusualmente antiguos que probablemente han sido mantenidos por selección balanceadora.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

F_S de Fu (Fu, 1997)

Indica la probabilidad de observar no menos de "k" haplotipos en una muestra de n secuencias dado un cierto valor de θ, calculado a través de π. Se calcula como:

$$F_s = \ln\left(\frac{S'}{1 - S'}\right)$$

Así, S´ es la probabilidad de encontrar un número de alelos igual o menor que el observado en una muestra aleatoria suponiendo que la diversidad alélica y su distribución siguen el modelo neutral. Valores negativos de F_S evidencian un exceso de alelos, característico de una población con reciente expansión o *hitchhiking* genético y que no siguiese el modelo neutral. Por el contrario, si los valores son positivos significa que existe una deficiencia de alelos, característico de una población que ha experimentado un evento de cuello de botella reciente. Esta prueba asume que la recombinación es igual a cero, y por lo tanto una prueba significativa puede simplemente estar demostrando la presencia de un exceso de haplotipos por el efecto de la recombinación.

S´ de Strobeck (Strobeck, 1987)

Es la probabilidad de tener un número igual o menos haplotipos en una muestra que los observados en función de la distribución de frecuencia génica derivada de la tasa de mutación inferida θ. S´ es un buen indicador cuando hay muchas mutaciones recientes, pero no se debe escoger como estimador único debido a que habitualmente da valores muy próximos a cero. En estos casos es aconsejable observar la información proporcionada por F_S.

R_2 (Ramos-Onsins y Rozas, 2002)

Este estimador mide la diferencia entre el número de mutaciones que presenta un solo individuo (mutación *singleton*) observadas en una población y el número medio de diferencias nucleotídicas en esa población. Valores bajos de este estadístico se debe a un incremento del número de mutaciones *singleton* e indican un episodio de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

expansión poblacional. R_2 está considerado como un buen índice para poblaciones pequeñas en las que existe recombinación.

Los estudios que comparan la efectividad de diversos indicadores evolutivos en distintas simulaciones demuestran que la prueba de Tajima (D) es la más poderosa cuando hablamos de hipótesis alternativa de barrido selectivo (*selective sweeps*) y cuello de botella (Simmonsen y col., 1995; Tajima, 1989). Sin embargo, el test de Fu (F_s) se adecua más a casos de expansión poblacional y *hitchhiking* genético, ya que es capaz de detectar un exceso en los alelos raros (Fu, 1997; Ramos-Onsins y Rozas, 2002).

Para el cálculo de todos estos índices se utilizó el programa DnaSP6 (Rozas y col., 2017). La significación se evaluó mediante simulaciones de coalescencia (10000 réplicas) basadas en un proceso de Monte Carlo (Hudson, 1990) asumiendo la opción más conservativa, que es la ausencia de recombinación en los datos.

4.2 RESULTADOS

4.2.1 Descripción de la población y análisis de diversidad

Para todas las cepas analizadas, la concatenación de los siete genes *housekipping* empleados para llevar a cabo los análisis de MLST dieron como resultado una secuencia concatenada de 3894 pb. El tamaño de los genes utilizados en este estudio varió entre 486 (*tgt*) y 597 (*gyr*B), y el contenido G+C (%) osciló entre 31,42% (*rlm*N) y 39,32% (*atp*A) (Tabla 15), siendo el contenido medio de G+C (%) de la secuencia concatenada 35,65%. En la Tabla 15 se muestra el contenido G+C (%) de todos los genes analizados para la bacteria *T. maritimum* y para la secuencia concatenada, así como los tamaños de los amplicones de los genes utilizados en este estudio.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 15. Tamaño y media del contenido G + C de los fragmentos génicos empleados en este estudio.

GEN	TAMAÑO DEL AMPLICÓN (pb)	TAMAÑO EMPLEADO EN MLST (pb)	MEDIA DEL CONTENIDO G+C (%)	REFERENCIA
***atp*A**	764	567	39,32	Habib y col. (2014)
***dna*K**	770	573	37,55	Habib y col. (2014)
***gly*A**	713	558	36,37	Habib y col. (2014)
***gyr*B**	830	597	35,45	Habib y col. (2014)
***inf*B**	761	564	35,90	Habib y col. (2014)
***rlm*N**	704	549	31,42	Habib y col. (2014)
tgt	614	486	33,56	Habib y col. (2014)
MLST	-	3894	35,65	Habib y col. (2014)

Para todos los aislados, el número de alelos detectados para cada locus varió entre 9 *(rlm*N) y 24 (*atp*A) (Tabla 16). El locus con mayor número de sitios polimórficos fue el *atp*A (25 sitios bialélicos y 1 sitio tretaalélico), en contraste con el locus *rlm*N (8 sitios bialélicos). Además, las secuencias concatenadas estuvieron compuestas por 70 alelos distintos. Por otro lado, la diversidad nucleotídica (π) y el número total de sitios segregativos (θ) para las secuencias concatenadas fue bajo (0,00511 y 0,00584 respectivamente). El ratio d_N/d_S también fue bajo, lo que indica una fuerte selección purificadora. Los valores de estos índices para cada gen individual se muestran en la Tabla 17.

Cuando estos análisis se realizaron sólo teniendo en cuenta las cepas de la Península Ibérica (PI), los loci con mayor número de sitios polimórficos fueron el *atp*A (igual que para toda la población) y el *gyr*B, mientras que el *rlm*N fue el locus menos diverso. Los índices π y θ y la ratio d_N/d_S fueron muy similares a los obtenidos para la toda la población.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 16. Número de alelos y variaciones nucleotídicas para todos los aislados incluidos en este estudio.

TODOS LOS AISLADOS			AISLADOS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA		
LOCUS	**Nº DE ALELOS**	**Nº DE SITIOS POLIMÓRFICOS (SPI)***	**LOCUS**	**Nº DE ALELOS**	**Nº DE SITIOS POLIMÓRFICOS (SPI)**
***atp*A**	24	26 (22)	***atp*A**	12	17 (17)
***dna*K**	13	13 (11)	***dna*K**	7	8 (6)
***gly*A**	15	17 (13)	***gly*A**	8	14 (11)
***gyr*B**	14	21 (19)	***gyr*B**	8	17 (16)
***inf*B**	17	19 (16)	***inf*B**	8	14 (14)
***rlm*N**	9	8 (6)	***rlm*N**	6	6 (3)
tgt	18	15 (13)	***tgt***	8	10 (10)
MLST	70	119 (100)	**MLST**	45	86 (77)

*SPI: En paréntesis se indica el número de sitios parsimoniosos.

Tabla 17. Valores de diversidad nucleotídica para todos los aislados de este estudio.

TODOS LOS AISLADOS				AISLADOS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA			
LOCUS	**π**	**θ**	**d_N/d_S**	**LOCUS**	**π**	**Θ**	**d_N/d_S**
***atp*A**	0,00868	0,00905	0,032	***atp*A**	0,00769	0,00732	0,0434
***dna*K**	0,00388	0,00416	0,0112	***dna*K**	0,00325	0,00305	0
***gly*A**	0,00481	0,00591	0,08	***gly*A**	0,00307	0,00548	0,0584
***gyr*B**	0,00661	0,00706	0,0417	***gyr*B**	0,00659	0,00622	0,0126
***inf*B**	0,00587	0,00617	0,0085	***inf*B**	0,00597	0,00543	0
***rlm*N**	0,00194	0,00267	0	***rlm*N**	0,00146	0,00239	0
tgt	0,00359	0,00566	0,051	***tgt***	0,00377	0,0045	0,0483
MLST	0,00511	0,00584	ND	**MLST**	0,00459	0,00494	ND

π: media del número de nucleótidos diferentes por sitio; θ: número total de sitios segregativos; d_N/d_S: ratio entre sitios no sinónimos y sinónimos; ND; datos no disponibles.

4.2.2 Estudio del equilibrio de ligamiento

Como se ha descrito anteriormente, el equilibrio de ligamiento se determinó mediante el índice de asociación I_A el cual dio un resultado de 1,088 (P=0,000) y mediante el índice de asociación estandarizado (I^S_A) con un valor de 0,1813 (P=0,000). Estos resultados fueron significativamente diferentes de cero, mostrando que los alelos no siguen una distribución aleatoria dentro de la población. Esto puede ser debido a que puede haber un cierto grado de ligamiento y que la recombinación no ocurre en la frecuencia necesaria para romper la asociación entre ellos.

4.2.3 Estudio de la estructura de la población

Los 132 aislados de *T. maritimum* analizados mediante la técnica de MLST dieron lugar a 70 tipos de secuencias o STs (Tabla 12), de los cuales 48 están representados por un solo aislado. El análisis mediante el programa eBUSRT identificó cinco complejos clonales (CC1, CC2, CC3, CC4 y CC5) y 47 singletones (Figura 17). El ancestro común para toda la población fue el ST22. El CC1 incluyó 31 aislados obtenidos de diferentes peces afectados por la tenacibaculosis marina procedentes de Europa, excepto un aislado procedente de Tasmania. Los aislados de este CC1 se distribuyeron en once STs, cuyo ancestro común fue el ST22. El CC2 comprendió 9 cepas de la PI pertenecientes al serotipo O4 procedentes de salmón y lenguado y una cepa del serotipo O2 aislada de rodaballo. Los aislados de este CC2 se distribuyeron en 6 STs, siendo el ST17 el ancestro común. El CC3 estaba compuesto por dos cepas procedentes de Japón, distribuidas en dos STs. Además, es interesante destacar que las cepas del ST54 y ST49 que estaban unidas mediante DLVs con el CC3, también son originarias de Japón. El CC4 incluyó 3 aislados procedentes de España distribuidos en dos STs, incluyéndose en este CC las dos únicas cepas de besugo. El CC5 agrupó dos STs formado por 4 cepas, de las cuales 3 fueron aisladas de rodaballo pertenecientes al serotipo O2. En los complejos CC3, CC4 y CC5 el ancestro común no fue detectado. Es importante destacar que el ST13, el S14, el ST15

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

y el ST63, unidos entre sí por DLVs pero sin formar ningún CC, agrupan cepas del serotipo O1

En la red filogenética generada mediante el algoritmo Median Joining (MJ) con el programa NETWORK se observó la existencia de pocas mutaciones entre los nodos, con una gran mayoría de ellas con una sola mutación (Figura 18). Debido a que este método no es un método filogenético, la longitud de las ramas que conectan los mv con las secuencias reales no es proporcional a su distancia evolutiva. Este diagrama reveló la existencia de un grupo central del cual emergieron dos grupos. Uno de estos grupos está formado por cepas del serotipo O1 y el otro grupo está compuesto por aislados pertenecientes al serotipo O4.

Por último, se llevó a cabo la construcción de un árbol filogenético con las secuencias concatenadas mediante el método NJ y ML (Figura 19) para conocer las relaciones filogenéticas entre los aislados de *T. maritimum*.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

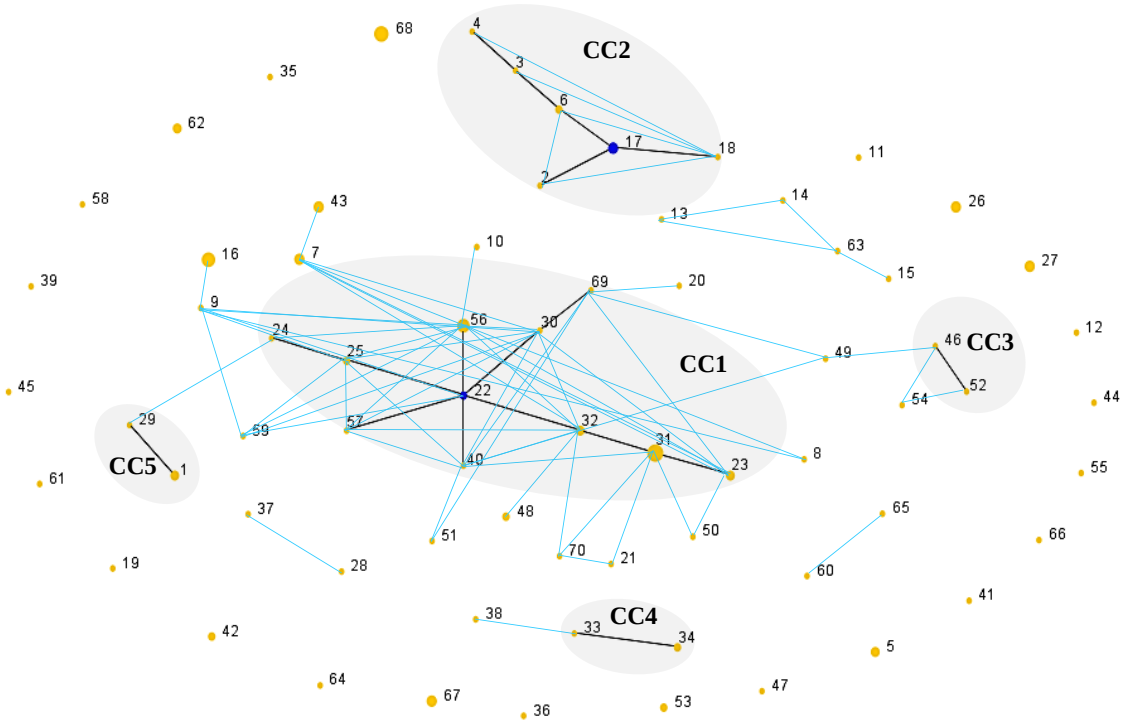


Figura 17. Estructura de la población de *T. maritimum*, *snapshot* obtenido mediante el algoritmo eBURST de todos los STs. Los SLVs (*Single Locus Variants*) están conectados mediante líneas negras, y los DLVs (*Double Locus Variants*) mediante líneas azules. Los CC están marcados con globos grises. Los STs están representados por puntos amarillos cuyo tamaño es proporcional al número de aislados que conforman cada ST. Los ancestros comunes se representan con círculos azules oscuro.

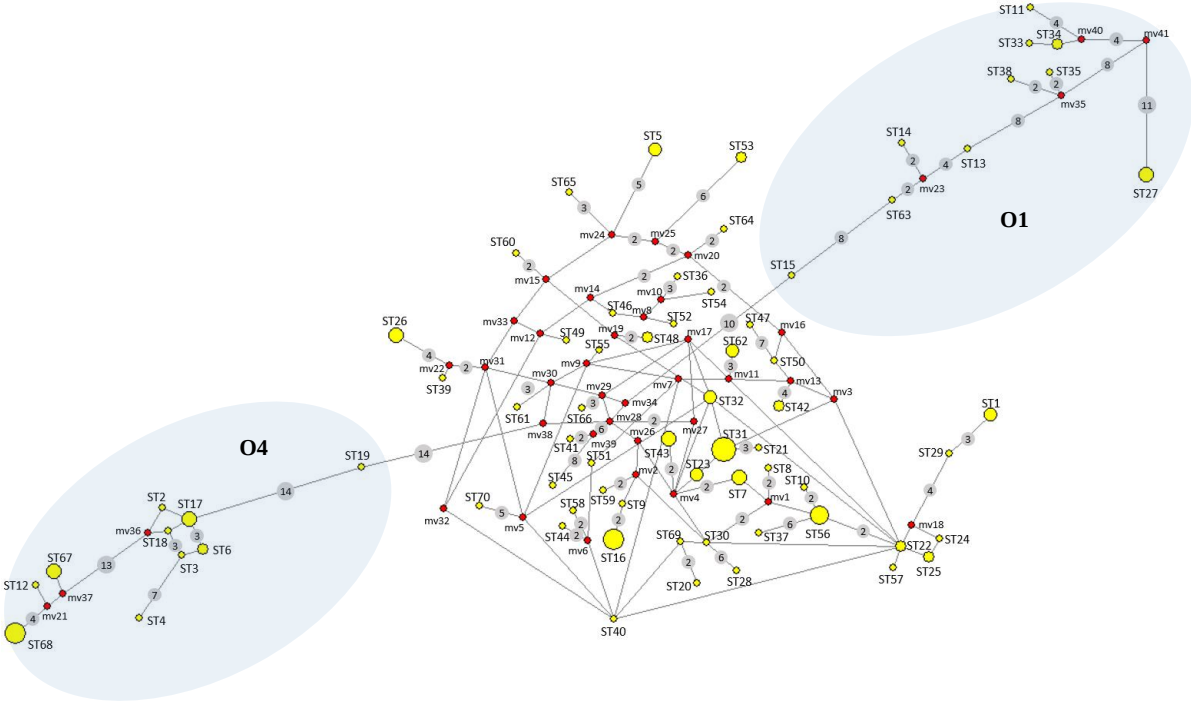


Figura 18. Red construida mediante el algoritmo MJ generada a partir de la secuencia de los 7 genes de mantenimiento concatenados (*atp*A, *dna*K, *gly*A, *gyr*B, *inf*B, *rlm*N y *tgt*). Los círculos amarillos son proporcionales al número de aislados de cada ST. El nombre del ST se muestra al lado de cada uno de los círculos amarillos. Los círculos rojos representan los vectores medios (mv). Los números dentro de los círculos grises representan las posibles mutaciones entre los nodos. Las líneas sin círculo gris corresponden a una sola posible mutación. Los globos grandes azules engloban a los aislados de los serotipos O1 y O4.

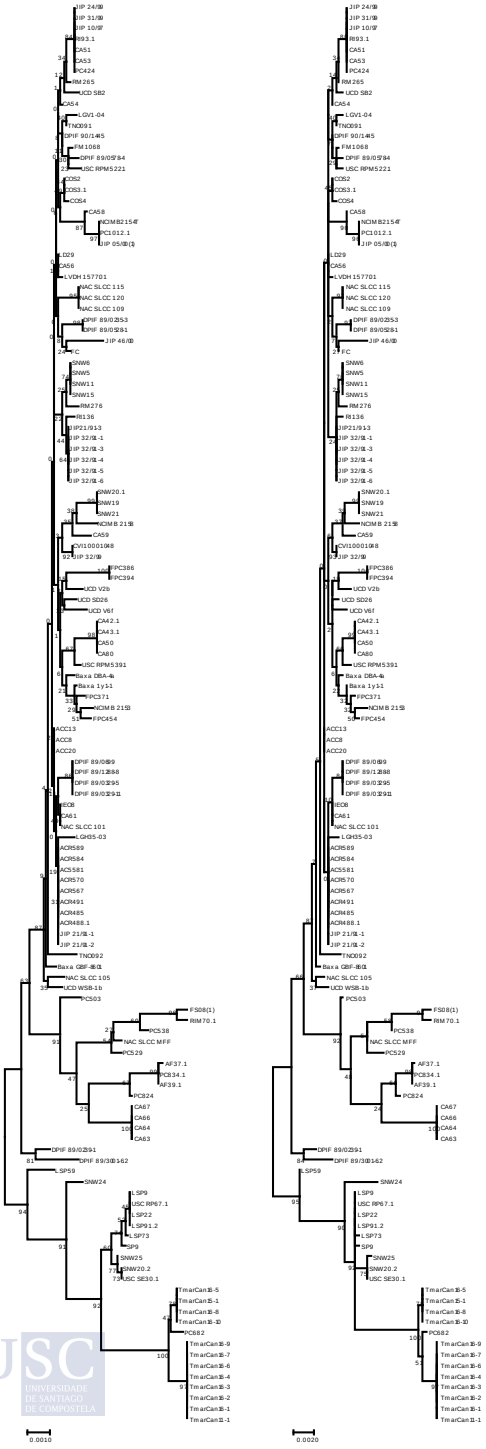


Figura 19. Árboles filogenéticos obtenidos mediante los métodos de NJ (izquierda) y ML (derecha) basados en la concatenación de las secuencias parciales de los genes *atp*A, *dna*K, *gly*A, *gyr*B, *inf*B, *rlm*N y *tgt* para *T. maritimum*, Barra, número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 70% como porcentaje de 1000 pseudoréplicas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.4 Análisis de la recombinación y mutación

El estudio de los posibles eventos de recombinación reveló diferentes resultados según el análisis empleado. Así, tanto para todas las cepas analizadas como para el conjunto de los aislados de la PI por separado, el phi test realizado con el programa SplitsTree indicó que no existen evidencias estadísticamente significativas de recombinación en ninguno de los genes analizados. Sin embargo, la construcción de los gráficos *split tree* para cada gen (Figura 20) y para la secuencia concatenada (Figura 21), demostró estructuras en forma de red y la presencia de paralelogramos, los cuales pueden indicar la existencia de eventos de recombinación. Los genes que dieron lugar a gráficos menos complejos fueron los genes *rlm*N, *dna*K e *inf*B (Figura 20).

Por otra parte, el cálculo del número mínimo de eventos de recombinación (R_{min}) estimado mediante el programa DnaSP6 detectó algunos eventos de recombinación para la población entera (Tabla 18). Se puede observar que los genes *inf*B y *rlm*N, los cuales presentaban los *split tree* con menos paralelogramos indicando pocos eventos de recombinación, presentan un bajo número de R_{min}. En el caso del análisis de los aislados de la PI, los R_{min} detectados fueron muy pocos, e incluso en los genes *gyr*B, *inf*B y *rlm*N no se detectó ninguno, mostrando una baja recombinación para la población de la PI.

Tabla 18. Número mínimo de eventos de recombinación para todos los aislados y para la población de la PI.

LOCUS	R_{min} PARA TODOS LOS AISLADOS	R_{min} PARA LOS AISLADOS DE LA PI
***atp*A**	3	2
***dna*K**	2	2
***gly*A**	3	3
***gyr*B**	1	0
***inf*B**	1	0
***rlm*N**	1	0
tgt	3	1
MLST	20	13

R_{min}: Número mínimo de eventos de recombinación

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El gráfico *split tree* generado para la secuencia concatenada de todos los genes (Figura 21) concuerda con los árboles filogenéticos (Figura 19) y con la red filogenética obtenida mediante MJ (Figura 18).

Para estudiar en mayor profundidad la relación entre la mutación y la recombinación, se empleó el programa ClonalFrame. El análisis de las secuencias concatenadas para toda la población predijo que la mutación es más importante que la recombinación en la evolución de *T. maritimum* (r/m=0.476647, 95% CI: 0.204529–0.869353) y además que la tasa de mutación es mucho mayor que la tasa de recombinación (ρ/θ=0.224080, 95% CI: 0.070304–0.4877). La representación gráfica de estos índices se muestra en la Figura 22.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

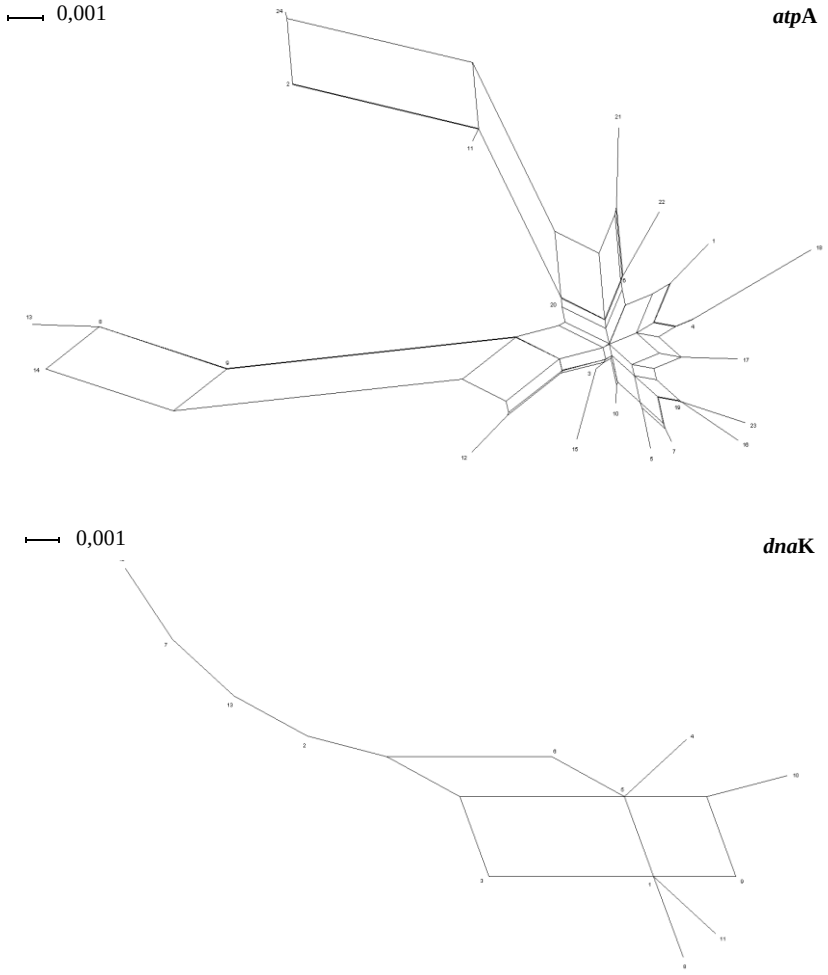


Figura 20. *Split trees* generados para cada uno de los genes individuales para todos los aislados. Las barras representan las distancias genéticas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

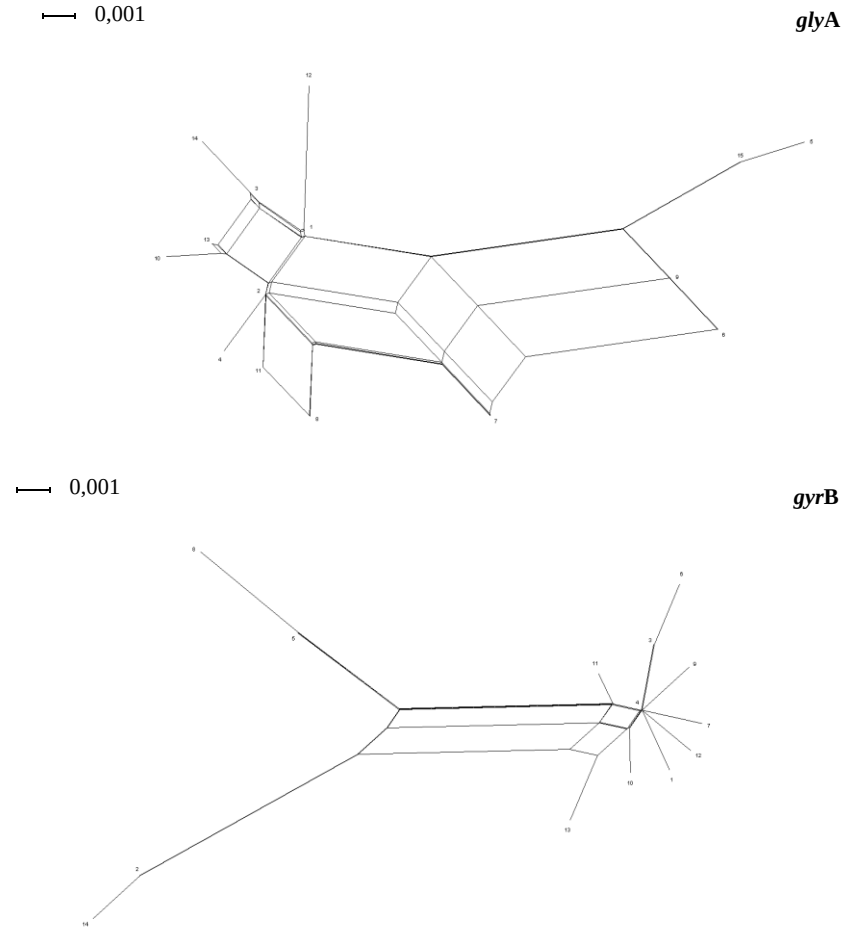


Figura 20 (continuación). *Split trees* generados para cada uno de los genes individuales para todos los aislados. Las barras representan las distancias genéticas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

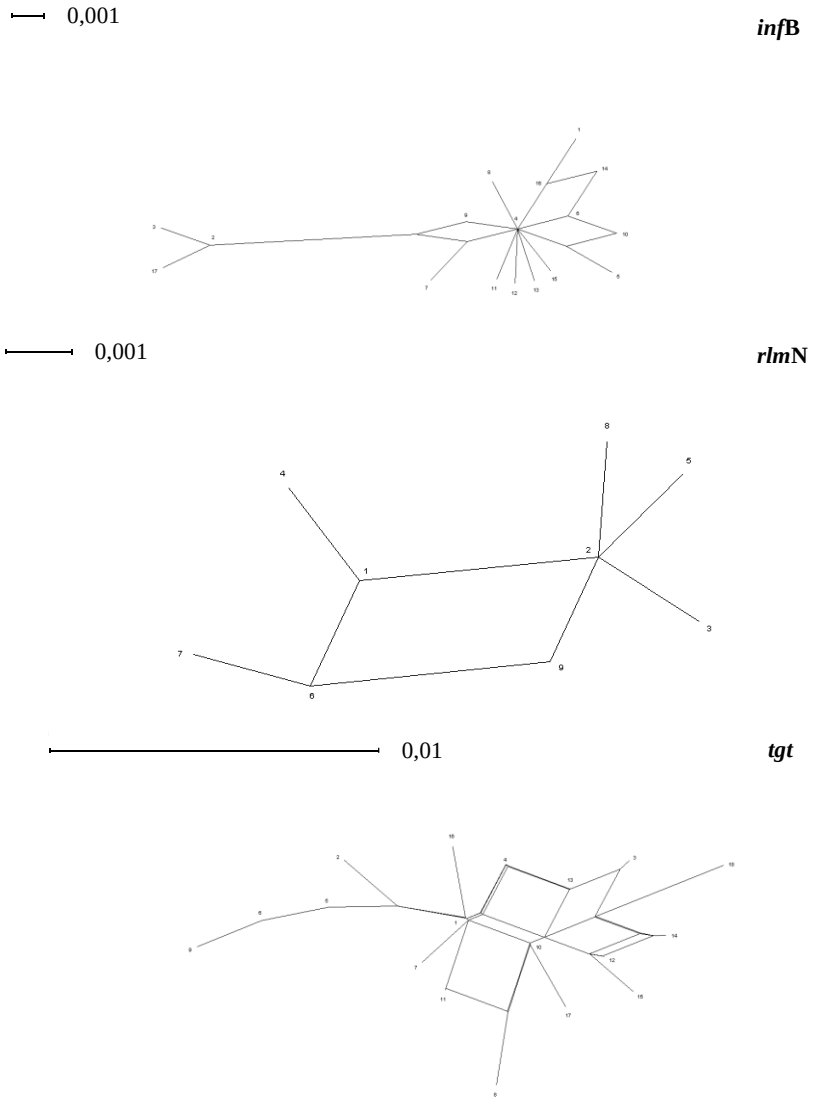


Figura 20 (continuación). *Split trees* generados para cada uno de los genes individuales para todos los aislados. Las barras representan las distancias genéticas.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

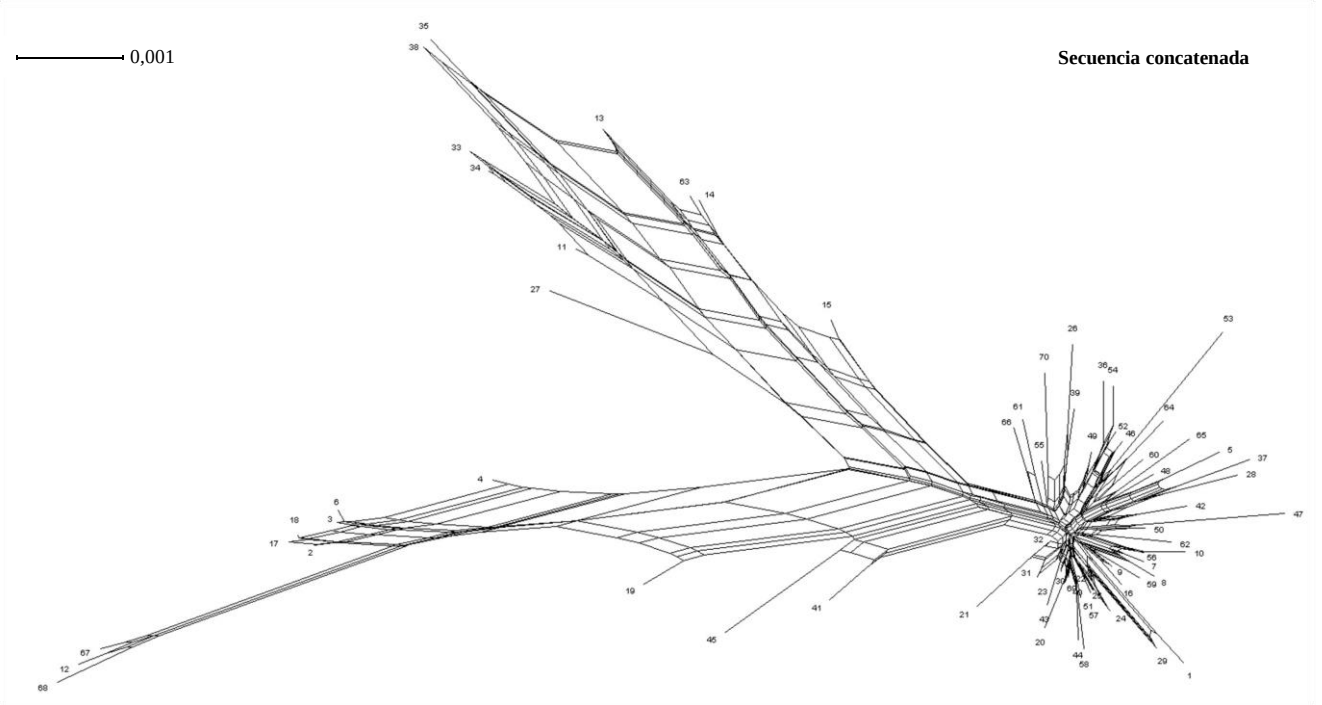


Figura 21. *Split tree* generado a partir de la secuencia concatenada de los 7 genes utilizados en este estudio. La barra representa la distancia genética.

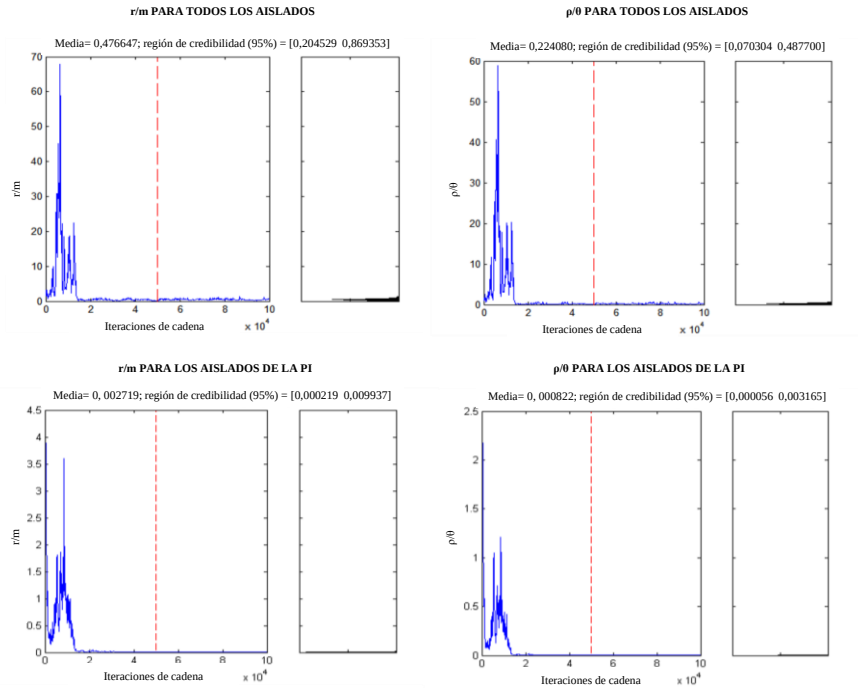


Figura 22. Gráfica de los parámetros r/m y ρ/θ obtenidos mediante el programa ClonalFrame con un nivel de significación del 95% para todos los aislados de *T. maritimum* (arriba) y para los aislados de *T. maritimum* de la Pi (abajo).

Analizando el conjunto de cepas de la PI, los resultados fueron los mismos que para el conjunto de todos los aislados, siendo más importante la mutación que la recombinación en la evolución de los aislados de *T. maritimum* de la PI y también, más abundante (r/m=0.002719, 95% CI: 0.000219–0.009937; ρ/θ=0.000822, 95% CI: 0.000056–0.003165) (Figura 22). Por tanto, los diferentes análisis realizados coinciden en la baja presencia de eventos de recombinación, salvo subgrupos concretos de STs.

Adicionalmente, se estableció el perfil genético de la población de *T. maritimum* con el objetivo de conocer si se producía recombinación entre las cepas y el grado de asociación ente las distintas poblaciones genéticas en base a alguna variable como hospedador, serotipo, origen geográfico o año. Los resultados generados mediante el programa

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Structure con las 132 cepas de *T. maritimum* analizadas determinaron la existencia de 4 ancestros genéticos o linajes, subdivididos en 15 patrones genéticos distintos (Tabla 12 y Figura 23). Los patrones genéticos se agruparon según cuál de los 4 ancestros presentaba una contribución igual o superior al 65% en la variabilidad genética de cada cepa (Figura 23). En cuanto a los linajes, el linaje 3 (amarillo) estaba formado en su mayoría por cepas pertenecientes al serotipo O1 procedentes de países del Sur de Europa (España, Malta e Italia), excepto por una cepa perteneciente al serotipo O2 (RIM70.1) y otra cepa no serotipada (PC834.1). Además, todas las cepas aisladas a partir de dorada pertenecen a este linaje 3. Por otro lado, los aislados pertenecientes al serotipo O4, excepto el aislado LSP59.1, se agruparon en el linaje 4 (azul). La mayoría de las cepas pertenecientes al serotipo O3 se congregaron en el linaje 1 (rojo), a excepción de las cepas DPIF 89/0239-1 y DPIF 89/3001-6.2, las cuales se incluyen en el linaje 2 (verde). Además, la mayoría de las cepas de lubina pertenecieron al linaje 1 (rojo). Las cepas del serotipo O2 se distribuyeron entre los linajes 1 (rojo) y 2 (verde). Es interesante destacar que los cuatro linajes están representados en el conjunto de las cepas de la PI.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

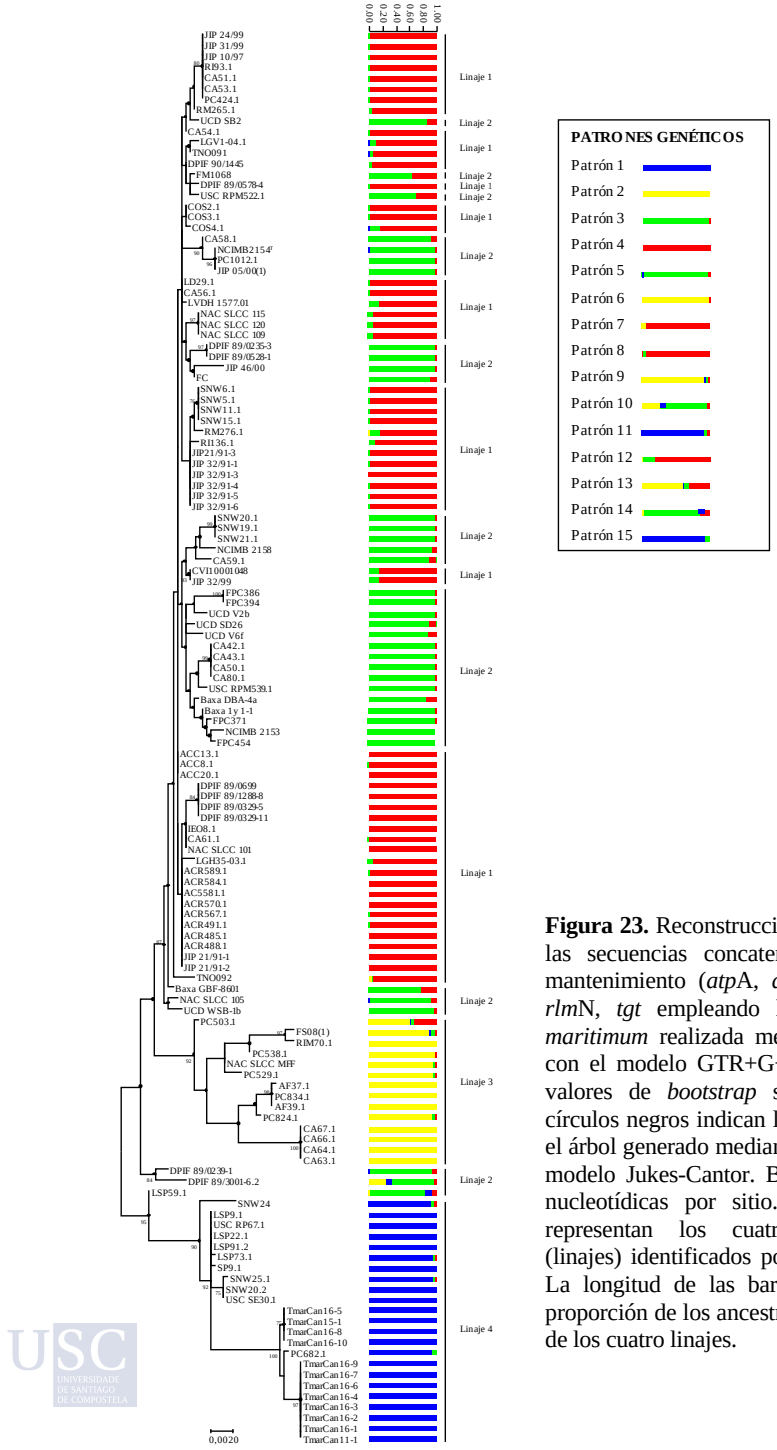


Figura 23. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias concatenadas de los genes de mantenimiento (*atp*A, *dna*K, *gly*A, *gyr*B, *inf*B, *rlm*N, *tgt* empleando los 132 aislados de *T. maritimum* realizada mediante el algoritmo ML con el modelo GTR+G+I. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo Jukes-Cantor. Barra, 0,002 sustituciones nucleotídicas por sitio. Las barras coloreadas representan los cuatro ancestros genéticos (linajes) identificados por el programa Structure. La longitud de las barras coloreadas indica la proporción de los ancestros genéticos de cada uno de los cuatro linajes.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

4.2.5 Genealogía clonal

El árbol consenso obtenido para la genealogía clonal (Figura 24) muestra unos resultados muy similares a los demás árboles generados en este estudio. En este árbol, los nodos de divergencia se representan mediante letras. En la Figura 25, se detallan gráficamente las representaciones de las diferencias nucleotídicas (marcadas mediante cruces negras) que se han producido en las secuencias concatenadas de los siete genes empleados y han dado lugar a cada nodo del árbol. Las líneas rojas indican la probabilidad de que un cambio nucleotídico haya sido producido por recombinación. En estos gráficos, cada columna representa cada uno de los siete genes de mantenimiento.

Así, analizando los nodos del árbol (Figura 25), se observa que existe un 100% de recombinación en el nodo F y una alta posibilidad de recombinación en los nodos B, C, D, O, P, Q y R. Por el contrario, en los nodos A, M, N, U y V existe una baja posibilidad de recombinación. En los nodos E, G, H, I, K y T, ambos eventos, recombinación y mutación, están presentes. Por último, en los nodos J, L y S existe una posibilidad media de recombinación.

4.2.6 Historia demográfica de la población

Para toda la población, las pruebas de Tajima (D), Fu y Li (F *) y el estadístico de Fu (F_s) fueron negativas para la secuencia concatenada, indicando la presencia de polimorfismos de baja frecuencia, lo que podría sugerir una expansión de la población (Tabla 19). La prueba de neutralidad de Ramos-Onsins (R_2) mostró valores cercanos a 0 y los resultados del estadístico Strobeck (S) para todos los genes y la secuencia concatenada fueron cercanos a 1, revelando nuevamente que la población está en expansión. La prueba D de Tajima mostró el mismo resultado para cada gen individual, pero el estadístico D* fue positivo en los genes *atp*A, *dna*K, *gyr*B, *inf*B, *tgt* y en la secuencia concatenada, informando que la población podría estar atravesando un proceso de cuello de botella. Este proceso de cuello de botella podría descartarse debido a los valores negativos del estadístico de Fu (F*s*) (excepto el gen *gyr*B) y a los altos valores del estadístico de Strobeck (S), indicando abundancia de alelos (Tabla 19).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Al analizar las cepas de la PI, los estadísticos de Tajima (D) y Fu (F_s) y el estadístico de Strobeck (S) arrojaron los mismos resultados que para toda la población. Sin embargo, las pruebas de Fu y Li (D * y F *) fueron positivas para la secuencia concatenada lo que podría indicar que el conjunto de los aislados de la PI sí podría haber sufrido un proceso de cuello de botella (Tabla 19).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

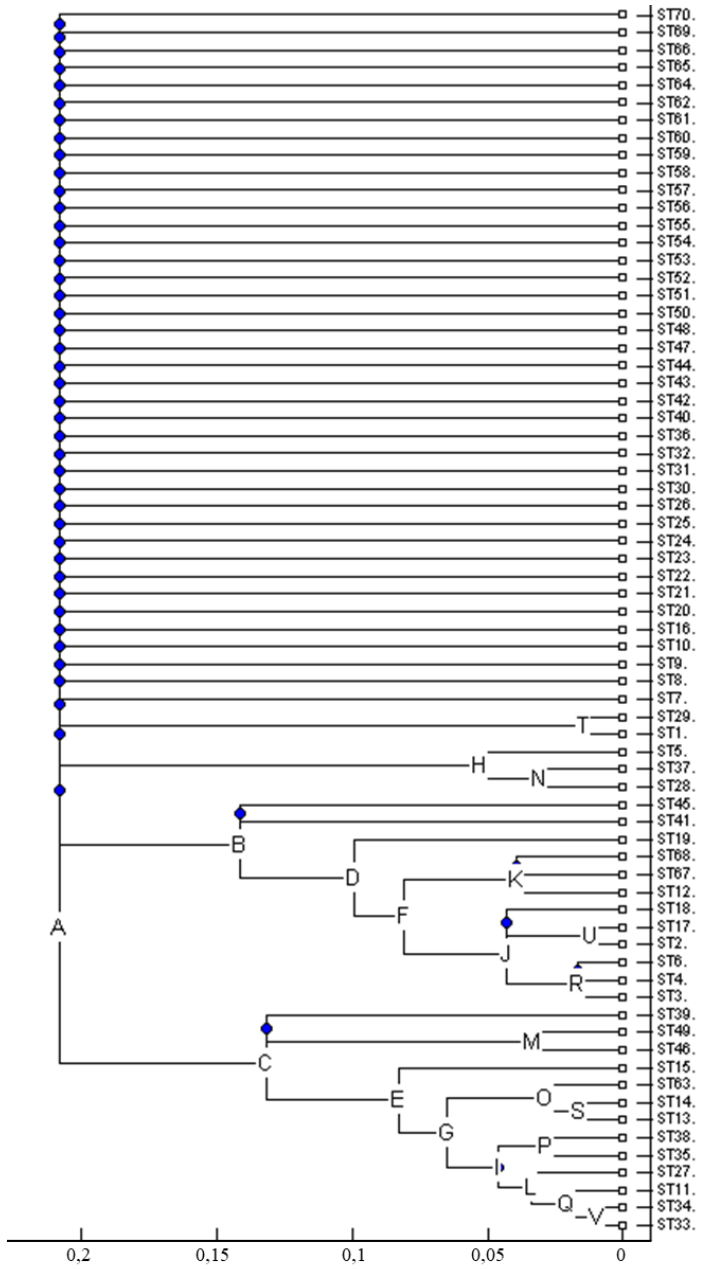


Figura 24. Genealogía clonal de *T. maritimum*. Los nodos de divergencia están indicados con letras.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

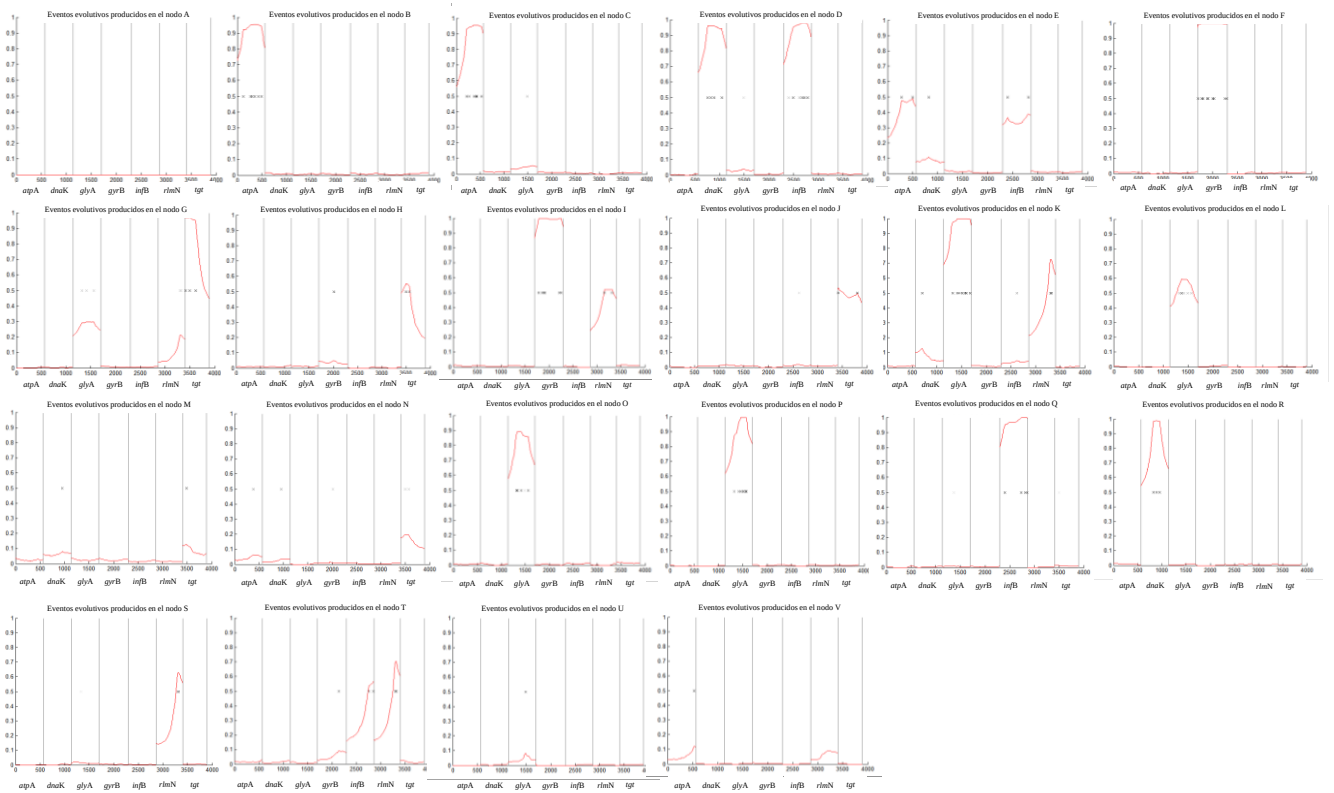


Figura 25. Eventos evolutivos producidos en cada uno de los nodos obtenidos mediante el programa ClonalFrame. Las líneas rojas indican la probabilidad de ocurrencia de los eventos de recombinación en una escala del 0 al 1 (eje Y). Las cruces indican las sustituciones nucleotídicas. Cada columna de cada nodo representa uno de los siete genes de mantenimiento (eje X).

Tabla 19. Resumen de los estadísticos utilizados para el análisis de la historia demográfica de la población de *T. maritimum*.

TODOS LOS AISLADOS							AISLADOS DE LA PENÍNSULA IBÉRICA						
LOCUS	**D**	**D***	**F***	**F_S**	**S**	**R_2**	**LOCUS**	**D**	**D***	**F***	**F_S**	**S**	**R_2**
***atp*A**	-0.40162	0.43865	0.26012	-3,473	0.984	0.0939	***atp*A**	0.15461	1,27891	1.05217	0.167	0.604	0.1274
***dna*K**	-0.17596	0.2506	0.11278	-1.829	0.924	0.0848	***dna*K**	0.17501	-0.1594	-0.05939	0.218	0.63	0.1167
***gly*A**	-0.5118	-0.8499	-0.86364	-2.083	0.939	0.0779	***gly*A**	-1.31592	0.05776	-0.48614	-0.83	0.833	0.064
***gyr*B**	-0.18081	0.53633	0.30766	0.445	0.516	0.0932	***gyr*B**	0.17977	1.19835	1.00295	2.477	0.157	0.1149
***inf*B**	-0.13657	0.24897	0.12182	-2.078	0.936	0.0863	***inf*B**	0.29855	1.54547	1.32627	1.733	0.27	0.1202
***rlm*N**	-0.64003	-0.43853	-0.60414	-2.344	0.962	0.0663	***rlm*N**	-0.96642	-1.45458	-1.52463	-1.603	0.933	0.0692
tgt	-0.97389	0.43977	-0.10277	-8.103	1	0.0578	***tgt***	-0.45352	1.39584	0.92299	-0.588	0.793	0.0916
MLST	-0.40162	0.21598	-0.07147	-18.753	1	0.0824	**MLST**	-0.2483	1.04398	0.66332	-3.202	0.98	0.1022

D: Estadístico de Tajima; D* y F*: Estadísticos de Fu y Li; F_S: Estadístico de Fu; S: Estadístico de Strobeck; R_2: Estadístico de Onsins R_2.

4.3 DISCUSIÓN

La técnica de MLST constituye un método efectivo para evaluar la diversidad y las relaciones evolutivas entre los miembros de una población bacteriana. En este trabajo se analizaron un total de 132 cepas con distinto origen geográfico, serotipo, hospedador y año de aislamiento con el fin de generar un esquema MLST con el objetivo de estudiar las relaciones evolutivas entre los distintos aislados de *T. maritimum* y en concreto entre el conjunto de aislados de la PI.

A pesar del amplio rango de hospedadores y la distribución geográfica mundial de *T. maritimum*, la diversidad genética (π) de este patógeno fue moderada (± 0,005) si se compara con las especies bacterianas típicas, las cuales pueden presentar una divergencia de hasta 0,05 nucleótidos (Kim y col., 2014). Este resultado para el mismo patógeno fue confirmado también por otros autores (Habib y col., 2014; Bridel y col., 2020) y coincidió con los obtenidos para otros miembros de la familia *Flavobacteriaceae* como *Flavobacterium psychrophilum* (± 0,004) (Nicolas y col., 2008; Duchaud y col., 2018), *Flavobacterium columnare* (± 0,004) (Ashrafi y col., 2015), y en otras bacterias marinas como *Renibacterium salmoninarum* (<0,0008) (Brynildsrud y col., 2014). Es interesante observar que en todas las especies de la familia *Flavobacteriaceae* mencionadas anteriormente, incluidas las especies analizadas en el presente estudio, el gen *atp*A fue el que mostró mayor diversidad genética (Nicolas y col., 2008; Habib y col., 2014; Ashrafi y col., 2015). El bajo número de sitios segregativos (θ) junto con el bajo número de sitios polimórficos detectados en este estudio apoyan la diversidad de secuencias moderada, que revela a *T. maritimum* como una especie cohesiva (Vos y Didelot, 2009).

Como era de esperar, dado que se cree que la mayoría de las especies bacterianas tienen tamaños poblacionales efectivos muy grandes (Lynch y Conery, 2003), el valor negativo para el estadístico de Tajima (D) (Tajima, 1989) y la relación d_N/d_S cercana a 0 (Li, 1997) para todos los aislados indican que todos los alelos estaban bajo selección negativa o purificadora. Sólo determinadas proteínas de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

superficie expuestas al sistema inmunitario del hospedador en algunas especies como *Escherichia coli* están sujetas a selección positiva (Reid y col., 1999). Además, debido a que la relación de mutaciones no sinónimas con respecto a las sinónimas es menor de 1 (d_N / d_S <1), la variabilidad de secuencia es selectivamente neutra a nivel de proteína, apoyando la correcta selección de los genes realizada por Habib y col. (2014).

Estudios anteriores de MLST realizados con el patógeno *T. maritimum* (Habib y col., 2014; Bridel y col., 2020) revelaron la ausencia de cualquier rastro de diseminación transcontinental. Esto contrasta con los resultados obtenidos para otros miembros de la familia *Flavobacteriaceae* (Nicolas y col., 2008; Fujiwara-Nagata y col., 2013). En este estudio, la estructura de la población analizada por el programa eBURST mostró la estrecha relación entre los complejos clonales CC1, CC3 y CC5 y otros singletones, los cuales abarcan aislados de *T. maritimum* procedentes de Japón, Europa, América del Norte, Chile y Tasmania. Estos resultados revelan un posible papel del comercio internacional de peces reproductores en la propagación de *T. maritimum* o por otras actividades humanas como la contaminación debida al agua de lastre de los barcos (Brinkmeyer, 2016; Frisch y col., 2017; Georgiades y col., 2021). La diseminación de *T. maritimum* fue descrita por Brosnahan y col. (2019), quienes relacionaron la presencia de este patógeno en Nueva Zelanda con la introducción de salmónidos importados de Tasmania, Norteamérica y Europa desde 1880 hasta 1960. Además, la presencia de *T. maritimum* en aguas de manantiales silvestres (Nekouei y col., 2018) en diferentes regiones de Canadá sugiere que la diseminación de este patógeno puede haberse visto promovida por las actividades agrícolas.

Habib y col. (2014) describieron que las cepas de *T. maritimum* parecían estar relacionadas con el hospedador del que eran aisladas y su origen geográfico. El análisis MLST realizado en este estudio no permitió establecer relaciones entre cepas por origen geográfico y/o especie hospedadora. Sin embargo, los aislados pertenecientes al mismo serotipo tienden a agruparse. De hecho, los árboles filogenéticos mostraron tres ramas principales. Una de ellas consistió principalmente en aislados que pertenecían al serotipo O1 de países

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

del sur de Europa (linaje 3), otro grupo compuesto por cepas pertenecientes al O2 y O3 (linajes 1 y 2), y el otro grupo incluyó a casi todas las cepas pertenecientes al serotipo O4 (linaje 4). Esto puede sugerir que algunos cambios en las secuencias podrían estar relacionadas con el serotipo de los aislados.

Adicionalmente, a pesar de que en este estudio no se han encontrado relaciones entre los diferentes orígenes geográficos de las cepas, la topología del árbol generado en el presente estudio mostró tres subgrupos que coinciden con los descritos previamente por Bridel y col. (2020), dónde el clado A que describen estos autores correspondería con el linaje 3 del presente trabajo, el clado B al linaje 1 y 2 y el clado C al linaje 4. Frisch y col. (2017) también describen que las cepas del clado C de Habib y col. (2014) se agrupan con sus cepas procedentes de Canadá, las cuales agrupan en ese mismo grupo (linaje 4) en nuestro estudio. Además, la división en tres subgrupos respaldada por la red *Median Joining* mostró una fuerte relación entre las cepas de *T. maritimum* evidenciada por el bajo número de mutaciones en la estructura de la población.

El análisis mediante el programa ClonalFrame reveló que el número de eventos mutacionales fue mayor que el número de eventos de recombinación (ρ/θ), y el índice r/m (r/m = 0.476647) mostró que la influencia de la mutación era más importante que la influencia de la recombinación para la evolución y divergencia de *T. maritimum* (Vos y Didelot, 2009). Estos datos contrastan fuertemente con los resultados publicados por Habib y col. (2014) y Bridel y col. (2020) en el que se describe una importante contribución de la recombinación en el proceso evolutivo ($r/m \geq 7$), así como con los reportados en otras especies de la familia como *F. psychrophilum* (Duchaud y col., 2018) o *F. columnare* (Ashrafi y col., 2015). El árbol generado por el software ClonalFrame para todos los aislados mostró que los nodos C y B fueron los nodos que causaron la divergencia de la mayoría de las cepas pertenecientes al serotipo O1 y al serotipo O4, respectivamente, en gran parte debido a la recombinación. Aunque se detectó recombinación putativa dentro de cada locus (R_{min}), este número mínimo acumulativo de eventos de recombinación fue bajo (R_{min}= 20). Este hecho está relacionado causalmente con la diversidad

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

genética limitada, lo que hace que la recombinación sea más difícil de detectar mediante el estadístico R_{min} (Habib y col., 2014).

A pesar de que el phi test no reveló evidencia estadística significativa de recombinación en ningún gen, los *split tree* de cada gen, y el de la secuencia concatenada mostraron estructuras de red y paralelogramos para todos los genes sugiriendo así la posibilidad de recombinación. El hecho de que el phi test no diera un resultado significativo puede deberse a que la recombinación no es detectable en genes que están bajo selección purificadora, eliminando cualquier variación de secuencia necesaria para la detección de recombinación intragénica por la mayoría de los algoritmos (Schierup y Wiuf, 2010). Los resultados del análisis sobre el desequilibrio de ligamiento revelaron una evidencia estadísticamente significativa para poblaciones clonales ($\bar{I}^{S}_{A}$), lo que apoya que la mutación parece ser una fuerza impulsora de la diversidad en *T. maritimum* y el grado de clonalidad de la población. No es sorprendente encontrar un desequilibrio de ligamiento, ya que un alelo debe cambiar al menos 20 veces más frecuentemente por recombinación que por mutación para lograr un surtido aleatorio dentro de una población bacteriana (Smith y col., 1993). Sólo unas pocas especies bacterianas, como *Neisseria gonorrhoeae* y *Helicobacter pylori*, están próximas al equilibrio de ligamiento (Knupp y col., 2019).

En cuanto al análisis realizado con el programa Structure para examinar el intercambio de material genético entre los diferentes grupos de cepas, los diferentes ancestros genéticos (linajes) detectados parecen estar correlacionados con los cuatro serotipos descritos en *T. maritimum*. Así, la mayoría de las cepas pertenecientes al serotipo O3 pertenecen al linaje 1, la mayoría de los aislados pertenecientes al serotipo O4 están en el linaje 4 y el linaje 3 estaba formado principalmente por cepas que pertenecen al serotipo O1. Los linajes 3 y 4 formaron un grupo genéticamente homogéneo. Sin embargo, los linajes 1 y 2 representan un grupo genéticamente heterogéneo con mezcla de material genético entre ellos. Además, la alta similitud genética entre las cepas pertenecientes al serotipo O4 de la PI y las cepas de Canadá en todos los análisis realizados y la fuerte asociación

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

entre los aislados pertenecientes al citado serotipo, sugiere la posibilidad de que las cepas canadienses pertenezcan al serotipo O4.

Con todos estos resultados y volviendo a observar el I^S_A, el intercambio genético y la recombinación observados dentro de los linajes son incompatibles con una estructura de población clonal, aunque el I^S_A así lo indique. Por lo tanto, sugerimos una estructura de población epidémica para *T. maritimum* donde existe un nivel de basal de recombinación frecuente con expansión clonal consecutiva de algunos aislados. Esta estructura de población ha sido propuesta también para otras especies bacterianas de la misma familia como *F. psychrophilum* (Nilsen y col., 2014) y *F. columnare* (Ashrafi y col., 2015).

De acuerdo con la historia demográfica de la población para todas las cepas, los índices D, F *, F_s, R_2 y S para la secuencia concatenada, revelaron la presencia de polimorfismos de baja frecuencia, lo que significa que la población se encontraría en expansión (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). No obstante, algunos genes mostraron valores conflictivos en los estadísticos de Fu y Li (D * y F *) y Fu (F_s). Estas desviaciones de la tendencia general de la población de algunos genes podrían explicarse por las presiones evolutivas únicas de cada gen, los resultados falsos o la combinación de ambos factores (Barton, 2000).

Los resultados obtenidos para las cepas de la PI fueron muy similares (excepto por la historia demográfica) a los resultados obtenidos para toda la población. Este hecho confirma la baja diversidad genética de la especie, la gran importancia de la mutación en la diversificación y la cohesión de *T. maritimum*. Como era de esperar, los resultados discordantes fueron los relativos a la historia demográfica, donde las pruebas D * y F * fueron positivas para la secuencia concatenada, lo que podría indicar que los aislados de la PI podrían haber sufrido un proceso de cuello de botella (Fu, 1997). Este hecho puede explicarse porque el estudio se realizó en una población delimitada geográficamente.

En resumen, los bajos valores de recombinación obtenidos en los diferentes métodos empleados explicaron la baja diversidad genética de *T. maritimum*, tanto para las cepas de la PI como para el conjunto

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de la población. Los datos obtenidos para las cepas de la PI reportados en este trabajo coinciden con los de Habib y col. (2014), indicando una colonización endémica de *T. maritimum*. Sin embargo, el análisis de estructura mostró algunas cepas vinculadas a pesar de la gran distancia entre ellas, lo que puede explicarse por los movimientos de los peces, tal y como se ha explicado anteriormente.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. FACTORES DE VIRULENCIA DE *T. maritimum*

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. FACTORES DE VIRULENCIA DE *T. maritimum*

Para entender en profundidad el desarrollo de una enfermedad bacteriana y poder establecer las medidas y protocolos de prevención y control es fundamental el conocimiento y estudio de los mecanismos de virulencia que el patógeno presenta para producir dicha enfermedad. Dentro de estos mecanismos de virulencia se encuentran los componentes de la cápsula y la superficie celular, los factores de adhesión, colonización e invasión, las exotoxinas y los sistemas de captación de hierro, entre otros.

El análisis de estos mecanismos de virulencia se puede abordar desde un punto de vista genético empleando los genomas completos de las bacterias, los cuales se secuencian y anotan mediante distintas bases de datos que confieren a estos genes sus funciones correspondientes *in silico*. Estas funciones predichas deben compararse posteriormente con genes similares descritos en distintas bacterias mediante bases de datos de alineamientos de secuencia tipo BLAST (Altschul y col., 1990), y analizar si los genes presentan los dominios proteicos característicos de la proteína que se está analizando.

Independientemente de que una bacteria presente un determinado gen identificado correctamente con una función determinada, en este caso como factor de virulencia, puede darse la posibilidad de que la expresión de este gen no de como resultado la proteína esperada, siendo necesario estudiar tanto la secuencia nucleotídica como la aminoacídica de cada gen y corroborar la expresión de éstos mediante distintas técnicas de ingeniería genética. Cuando se localiza un gen que se sospecha responsable de un factor de virulencia, se comprueba *in vitro* su actividad, y posteriormente se corrobora que ese gen candidato es el causante de dicha función eliminándolo del genoma de

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

la bacteria mediante ingeniería genética, por mutación por inserción o deleción, entre otros (Barbier y col., 2020).

En cuanto a la bacteria patógena *T. maritimum*, se sospecha que pueda presentar mecanismos de virulencia que le permitan invadir la superficie de los peces, en base a las úlceras que produce (Mabrok y col., 2016; Pérez-Pascual y col., 2017a). Por ello, en esta tesis doctoral se localizará y analizará el conjunto de genes que permiten la invasión y colonización por parte de *T. maritimum* de los tejidos de los hospedadores a los que infecta, probablemente enzimas responsables de la rotura de la membrana y la lisis de las células de hospedador. Adicionalmente, se estudiarán los genes responsables de la biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum*, sistema por el cuál la bacteria asimila el hierro (Wandersman y Delepelaire, 2004), y su estructura química. Además, se analizarán los genes responsables de los diferentes serogrupos descritos en este patógeno, localizados a nivel del antígeno O del LPS, los cuales generan una respuesta inmune en el hospedador (Alexander y Rietschel, 2001).

5.1 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1.1 Estudio de los antígenos O del LPS de *T. maritimum*

5.1.1.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Para este estudio se utilizaron 14 cepas de *T. maritimum* aisladas de distintas especies de peces y diferentes serotipos previamente analizados mediante la técnica de dot-blot, de acuerdo con lo detallado en el apartado 3.1.1 (Tabla 20). Así, se trabajó con aislados pertenecientes a los 4 serotipos descritos hasta el momento en la especie *T. maritimum*. Como cepa de referencia se utilizó la cepa tipo NCIMB 2154^T previamente secuenciada por Pérez-Pascual y col. (2017a). Todas las cepas se cultivaron de forma rutinaria en el medio FMM agar o caldo (Pazos y col., 1996) y se incubaron a 25ºC durante 48 horas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 20. Cepas empleadas en el estudio de los antígenos O del LPS de *T. maritimum*.

CEPA	SEROTIPO	HOSPEDADOR	ORIGEN GEOGRÁFICO	AÑO
NCIMB 2154^T	O1	*P. major*	Japón	1977
CA63.1	O1	*S. senegalensis*	España	2007
PC503.1	O1	*S. senegalensis*	España	2001
PC538.1	O1	*S. aurata*	España	2002
ACR485.1	O2	*S. senegalensis*	España	2011
ACR584.1	O2	*S. senegalensis*	España	2011
CA80.1	O2	*S. maximus*	España	2007
SNW20.1	O2	*S. salar*	España	2015
AQP72.1	O3	*D. labrax*	España	2016
SNW15.1	O3	*S. salar*	España	2014
CA56.1	O3	*S. senegalensis*	España	2007
SNW20.2	O4	*S. salar*	España	2015
SP9.1	O4	*S. salar*	España	1993
SE30.1	O4	*O. kisutch*	España	1993

5.1.1.2 Extracción del LPS y electroforesis SDS-PAGE

Extracción del LPS:

La extracción del LPS de las cepas de *T. maritimum* se realizó a partir de cultivos puros previamente realizados en placas de FMM y para ello se siguió el protocolo descrito por Hitchcock y Brown (1983). Para cada cepa, se tomó una pequeña cantidad de bacteria y se depositó en un vial Eppendorf. Posteriormente se añadieron 25µL de *sample buffer* (4% de β-mercaptoetanol, 4% de dodecil sulfato sódico (SDS) y 20% glicerol en 0,1 M de Tris-HCl a pH 6,8), se agitaron en un vórtex y se hirvieron 15 minutos. Se adicionaron 25µL de proteinasa K (1mg/ml diluido en Tris-Mg) (Sigma-Aldrich) y se incubaron 1 hora y 30 minutos en un baño a 60ºC.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Electroforesis en SDS-PAGE:

Para la electroforesis en geles de poliacrilmida con SDS (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel*) (Laemmli, 1970) se prepararon las soluciones de las dos partes que compusieron cada gel, el gel separador *(resolving gel*) y el gel concentrador (*stacking gel*), tal y como se detalla en la Tabla 21.

Tabla 21. Componentes y cantidades necesarias para realizar los geles de SDS-PAGE.

Componente	Gel concentrador	Gel separador
Tampón del gel separador	-	3,2 mL
Tampón del gel concentrador	1,25 mL	-
Acrilamida (12%)	850 µL	5,6 mL
H_2O bidestilada	2,9 mL	4 mL
APS (10%)*	35 µL	80 µL
TEMED**	10 µL	18,6 µL

*APS: persulfato de amonio (del inglés *amonium persulfate*);
**TEMED:Tetrametiletilendiamina (del inglés *Tetramethylethylenediamine*). Las cantidades detalladas son las adecuadas para preparar 2 geles completos.

Los geles, formados por dos capas, la concentradora y la separadora y polimerizados por la adición de los agentes catalizadores TEMED y APS se sumergieron en tampón de electroforesis (*running buffer*) 1X, partiendo de una solución stock (10X) que contenía Tris base (0,2501 M), glicina (1,924 M) y SDS (0,0347 M). Las muestras de LPS se hirvieron durante 10 minutos, cargándolas posteriormente en los pocillos del gel (10µL). La electroforesis se realizó a 10 miliamperios (mA) durante 15 minutos. Como control positivo de la electroforesis se utilizó la cepa tipo ATCC 23656 de la bacteria *E. tarda*.

Una vez terminada la electroforesis, se procedió a la tinción del gel con nitrato de plata (Hitchcock y Brown, 1983). Para ello, se sumergió el gel durante 2 horas en una solución de fijación (40 mL etanol 5 mL de ácido acético glacial y 55 mL de H_2O desionizada), y a continuación, se oxidó durante 7 minutos en una solución con 55 mL

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

de H_2O desionizada, 5 mL de ácido acético glacial y 0,7 g de ácido peryódico. Se lavó el gel 3 veces con H_2O desionizada (10 minutos cada vez) y posteriormente se incubó durante 10 minutos exactos en la solución de nitrato de plata (14 mL de NaOH (4 g/L) + 57,36 mL de H_2O desionizada + 0,95 mL de NH_4OH 30% + (2,5 mL de H_2O desionizada + 0,5 g NO_3Ag)). Tras la tinción, los geles se lavaron nuevamente con H_2O desionizada (5 minutos cada vez), y finalmente, se revelaron con una solución de ácido cítrico y formaldehído (100 mL de H_2O desionizada + 50µL de citrato sódico al 10% + 50µL de formaldehído) hasta la aparición de bandas. La reacción de relevado se detuvo mediante la utilización de una solución de metilamina diluida en H_2O desionizada durante 10 minutos y posteriormente se sumergió el gel en H_2O desionizada durante 10 minutos para finalmente secarlo.

5.1.1.3 Western-blot del LPS de *T. maritimum*

Para la realización del Western-blot o immunoblot a partir de los geles de poliacrilamida del LPS anteriormente realizados, se siguió el protocolo descrito por Towbin y col. (1979).

El ensayo de transferencia electroforética de los LPSs a membranas de nitrocelulosa se realizó utilizando el tampón de transferencia (25 mM Tris base, 192 mM de glicina a pH 8,3 con 20% de metanol (vol/vol)), a una corriente constante de 350 mA durante 1 hora a 4ºC. Tras la transferencia las membranas se lavaron empleando el tampón de lavado (Tris base 10 mM + NaCl 138 mM + H_2O desionizada) y se bloquearon durante 1 hora utilizando la solución de bloqueo (tampón de lavado con 0,1 g de leche o albúmina de suero bovina).

Incubación con el primer anticuerpo: Para la detección del LPS de *T. maritimum*, se prepararon 200 mL de la solución de lavado con 1 mL de Tween 20. De esta solución se tomaron 20 mL y se añadieron 0,1 g de leche o BSA, agitando en el vórtex hasta su completa disolución. Posteriormente, se prepararon 4 soluciones de 5 mL de esta mezcla anterior con 50 µL de cada antisuero correspondiente a los cuatro antígenos O de *T. maritimum* (O1, O2, O3 y O4). Se incubó cada membrana con el antisuero correspondiente durante 1 hora en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

agitación. Tras la incubación con el primer anticuerpo, se lavaron las membranas con 10 mL de la solución de tampón de lavado con Tween 20, 3 veces durante 10 minutos en agitación por cada vez.

Incubación con el segundo anticuerpo: Se tomaron nuevamente 20 mL de tampón de lavado con Tween 20 y se añadieron 0,1 g de leche o BSA, agitando en el vórtex hasta su completa disolución. A continuación, se prepararon 4 soluciones de 5 mL de esta mezcla anterior con 5 μL (relación 1/1000) de Fosfatasa alcalina anticonejo (Bio-Rad) y se incubó cada membrana durante 1 hora en agitación. Tras la incubación con el segundo anticuerpo, se lavaron las membranas con 10 mL de la solución de tampón de lavado con Tween 20, 3 veces durante 10 minutos en agitación por cada vez.

Revelado: Previamente se preparó el tampón de revelado (140 mL de H_2O bidestilada + 20mL de Tris-HCl 1M (pH 9,5) + 20 mL de NaCl 1M + 20 mL de $MgCl_2$ 0,5 M). Con este tampón de revelado se incubaron las membranas durante 10 minutos en agitación, 3 veces. Posteriormente se tomaron 10 mL del tampón de revelado y se añadieron 200 μL de solución NBT/BCIP (Sigma-Aldrich). Las membranas se incubaron en oscuridad hasta comenzar a detectar la aparición de color. La reacción de revelado se paró añadiendo H_2O bidestilada.

5.1.1.4 Estudio de la agrupación génica de los genes de biosíntesis del antígeno O

Para el análisis de los genes del LPS de *T. maritimum* se secuenció el genoma completo de las cepas que aparecen descritas en la Tabla 20.

Extracción del ADN genómico

La extracción de ADN de todas las cepas se realizó con el kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante para bacterias Gram negativas. Las muestras se eluyeron en H_2O destilada libre de nucleasas (Sigma-Aldrich). La concentración y la pureza del ADN extraído se midieron en el espectrofotómetro NanoDrop™ One/One^C (Thermo Fisher Scientific). La pureza y calidad se determinaron utilizando el

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

espectrofotómetro NanoDrop™ One/One^{C}. Se descartaron todas las muestras cuyo valor del cociente A260/A280 se encontraba por debajo de 1,65. También se descartaron las muestras que presentaron valores por encima de 1,9 debido a la posible contaminación de éstas con carbohidratos, EDTA o fenol. Todos los ADN genómicos se ajustaron a una concentración final de 50 ng/µl con agua destilada libre de nucleasas (Sigma-Aldrich).

La integridad del genoma completo se compró mediante la realización de una electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 10 minutos a 120 voltios (V) empleando como tampón de electroforesis TAE 1X (0,04 M Tris, 0,0001M EDTA, pH 8) (Sambrook y col., 1989). Como marcador molecular se utilizó el marcador de peso molecular FastRuler Middle Range de 100-5000 pb (Thermo Fisher Scientific Inc). Los geles se tiñeron con 4µl de RealSafe (Real Laboratory, Valencia, Spain) y se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (BioRad).

Ensamblaje, anotación y análisis de los genomas

La creación de librerías y secuenciación de las muestras de *T. maritimum* 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 unos 450 pares de bases.

La calidad de las lecturas obtenidas se analizó mediante el programa FASTQC (Brabaham Bioinformatics), el cual predice el número, calidad, longitud de las secuencias y la presencia de adaptadores y cebadores. Tanto los adaptadores de las secuencias como los fragmentos con baja calidad de secuencia se eliminaron mediante el programa informático Trimmomatic 0.32 (Bolger y col., 2014). Posteriormente se procedió al ensamblaje del genoma mediante el programa de ensamblado *de novo* SPAdes 3.6.2 (Nurk y col., 2013), y el programa QUAST (Gurevich y col., 2013) fue utilizado para evaluar el ensamblaje resultante. Por último, se realizó la anotación de todos los genomas utilizando los programas de anotación automática *on line* RAST (Overbeek y col., 2014) y PATRIC (Wattam y col., 2018).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.2 Estudio de las enzimas relacionadas con la degradación de tejidos del hospedador (condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa)

5.1.2.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

Para el presente estudio se utilizaron 60 cepas (Tabla 22) seleccionadas en base al origen de aislamiento y a los estudios serológicos previamente realizados (apartado 3.1.1). Como cepas de referencia se utilizaron la cepa tipo NCIMB 2154^T y la cepa NCIMB 2153. Todos los aislados de *T. maritimum* fueron cultivados rutinariamente en FMM agar o caldo durante 48 horas a 25°C.

Tabla 22. Cepas utilizadas en el estudio de las enzimas de vía de entrada de *T. maritimum* al hospedador.

CEPA	SEROTIPO	HOSPEDADOR	ORIGEN GEOGRÁFICO	AÑO
NCIMB 2154^T	O1	*P. major*	Japón	1977
CA63.1	O1	*S. senegalensis*	España	2007
PC503.1	O1	*S. senegalensis*	España	2001
PC529.1	O1	*S. senegalensis*	España	2002
PC538.1	O1	*S. aurata*	España	2002
LM5.1	O1	*S. maximus*	España	2007
AF37.1	O1	*P. bogaraveo*	España	2006
AF39.1	O1	*P. bogaraveo*	España	2006
NCIMB 2153	O1	*A. schlegelii*	Japón	1976
COM8.1	O1	*S. senegalensis*	España	2006
IEO19.1	O1	*S. senegalensis*	España	2006
IEO26.1	O1	*S. senegalensis*	España	2006
RPM808.1	O1	*S. maximus*	España	2004
PC824.1	O1	*S. aurata*	España	2003
PC833.1	O1	*S. aurata*	España	2003
SNW20.1	O2	*S. salar*	España	2015
CA80.1	O2	*S. maximus*	España	2007
ACR485.1	O2	*S. senegalensis*	España	2011
ACR584.1	O2	*S. senegalensis*	España	2014
AC6.1/06	O2	*S. senegalensis*	España	2006
ACC102.1	O2	*S. maximus*	Portugal	2007
ACR567.1	O2	*S. senegalensis*	España	2014

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CEPA	SEROTIPO	HOSPEDADOR	ORIGEN GEOGRÁFICO	AÑO
RM285.1	O2	*S. maximus*	España	2006
PC682.1	O2	*S. maximus*	España	2003
PC1012.1	O2	*S. maximus*	España	2008
NCIMB 2158	O2	*S. solea*	Escocia	1981
TM12	O2	*D. labrax*	Francia	2010
SNW21.1	O2	*S. salar*	España	2015
SNW41.1	O2	*S. salar*	España	2017
CA43.1	O2	*S. senegalensis*	España	2006
SNW15.1	O3	*S. salar*	España	2014
CA56.1	O3	*S. senegalensis*	España	2007
AQP72.1	O3	*D. labrax*	España	2016
ACC13.1	O3	*S. senegalensis*	Portugal	2004
ACR568.1	O3	*S. senegalensis*	España	2014
COS3.1	O3	*S. senegalensis*	España	2011
SNW35.1	O3	*S. salar*	España	2016
AZ226.1	O3	*S. solea*	España	2010
AQP79.1	O3	*D. labrax*	Portugal	2016
SNW11.1	O3	*S. salar*	España	2014
ACC20.1	O3	*S. senegalensis*	Portugal	2004
CA4.1	O3	*S. maximus*	España	2015
ACC54.1	O3	*S. maximus*	Portugal	2006
RI136.1	O3	*S. maximus*	España	2002
ACC8.1	O3	*S. senegalensis*	Portugal	2003
VIL3.1	O4	*S. maximus*	España	2004
SNW24.1	O4	*S. salar*	España	2015
SNW17.1	O4	*S. salar*	España	2015
ACR685.1	O4	*S. senegalensis*	España	2018
ACR687.1	O4	*S. senegalensis*	España	2018
LSP110.1	O4	*S. senegalensis*	Portugal	2018
LSP9.1	O4	*S. senegalensis*	Portugal	2012
SP9.1	O4	*S. salar*	España	1993
SNW25.1	O4	*S. salar*	España	2015
AZ200.1	O4	*S. maximus*	España	2003
SNW20.2	O4	*S. salar*	España	2015
SE30.1	O4	*O. kisutch*	España	1993
LSP22.1	O4	*S. senegalensis*	Portugal	2013
LSP73.1	O4	*S. senegalensis*	Portugal	2013
LSP59.1	O4	*S. senegalensis*	Portugal	2013

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.2.2 Búsqueda de los genes candidatos en el genoma de referencia *de T. maritimum* y diseño de cebadores

En primer lugar, en base a los genomas completos secuenciados en el apartado 5.1.1.4, se realizó una búsqueda de los genes candidatos correspondientes a cuatro enzimas de degradación: condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa, probablemente responsables de la vía de entrada de *T. maritimum* al hospedador. Para ello se buscaron estos genes en el genoma completo de la cepa tipo NCIMB 2154^T, previamente descargada de la base de datos pública BLAST (Altschul y col., 1990) y anotada con el programa RAST (Overbeek y col., 2014). A continuación, con el mismo programa, se buscaron en los demás genomas completos secuenciados en esta tesis doctoral (apartado 5.1.1.4). Posteriormente se diseñaron los cebadores correspondientes para cada gen con la herramienta Primer-BLAST (Ye y col., 2012) (Tabla 23).

5.1.2.3 Extracción de ADN y amplificación de los genes mediante PCR

Para la extracción del ADN necesario para realizar las reacciones de PCR, se utilizó el kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante para bacterias Gram negativas. Las muestras se eluyeron en H_2O destilada libre de nucleasas (Sigma-Aldrich). La concentración y la pureza del ADN extraído se midió en el espectrofotómetro NanoDrop™ One/One^C (Thermo Fisher Scientific).

Las reacciones de PCR de todos los genes se llevaron a cabo empleando el kit comercial *Illustra^{TM} PuReTaq Ready-To-Go^{TM} PCR Beads* (GE Healthcare, Buckinghampshire, UK) que contiene todos los componentes necesarios para llevar a cabo la PCR: BSA, dATP; dCTP, dGTP, dTTP, estabilizadores, tampón de reacción y 2,5 unidades de pureTaq polimerasa. Cuando una *bead* se reconstituye en 25µL de volumen final, la concentración de cada dNTP es 200µM en 10mM de Tris-HCl, (pH 9,0), 50mM de KCl y 1,5mM de $MgCl_2$. A cada reacción se añadió el ADN correspondiente (200 ng/µL), el cebador directo correspondiente (10µM), el cebador inverso

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

correspondiente (10μM) y se completó con agua Milli-Q® hasta un volumen final de 25μL.

El protocolo de PCR para los cuatro genes fue el mismo y se diseñó en torno a las temperaturas de fusión de los cebadores. De este modo, el protocolo empleado para la amplificación por PCR de los 4 genes de virulencia se detalla en la Tabla 24.

Los productos de amplificación obtenidos para estos 4 genes fueron separados mediante electroforesis horizontales durante 60 minutos a 90 voltios (V) en geles agarosa al 1% (p/v), sumergidos en tampón de electroforesis TAE 1X (0,04 M Tris, 0,0001M EDTA, pH 8) (Sambrook y col., 1989). Como marcadores moleculares se utilizaron el marcador de peso molecular FastRuler Low Range de 50-1500 pb (Thermo Fisher Scientific Inc) y el FastRuler Middle Range de 100-5000 pb (Thermo Fisher Scientific Inc). Los geles se tiñeron con 4μl de RealSafe (Real Laboratory, Valencia, Spain) y se visualizaron con luz ultravioleta en un transiluminador GelDoc (BioRad).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 23. Cebadores empleados en la amplificación mediante PCR de los cuatro genes de vía de entrada de *T. maritimum* al hospedador.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicon (pb)	Referencia
Condroitinasa	ChonF	TTATACTACAAAATCAACAAAT	2031	Este estudio
	ChonR	ATCCTTACAATATACACTCCT		
Sialidasa	SiaF	GTAGCTGACTTCGGCGTGGTT	547	Este estudio
	SiaR	GAGGATCGGGCAGTTGAGTTTC		
Esfingomielinasa	SphF	AAAAAAGGATCCAATGATGACGTTTCCCTTGGAGAAA	1000	Pérez-pascual y col. (2017a)*
	SphR	TTTTTTCAATTGTTAGTAGCTAAAGTAAAAAGTTTGCTTG		
Ceramidasa	CerF	TGATGACCAAATGACCGTGCTAA	1544	Este estudio
	CerR	TTTGCCCCATCGCGTTTGTAATA		

*Los cebadores directo y reverso de la esfingomielinasa tienen una cola de poliA y poli T, respectivamente, que no corresponden a ninguna parte del gen, debido a que fueron diseñados para otro experimento con dicho gen.

Tabla 24. Protocolo de amplificación por PCR empleado para la condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa.

Paso	Temperatura (ºC)	Tiempo (t)	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	5´	
Desnaturalización	94	45´´	
Hibridación	55	30´´	35
Elongación	72	1´	
Elongación final	72	5´	

5.1.2.4 Análisis filogenético con los genes de degradación de tejido

Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados mediante secuenciación Sanger por la empresa Stab Vida Lcd. (Portugal). Los electrofenogramas proporcionados por Stab Vida para cada gen se ensamblaron empleando los programas SeqMan y EditSeq del paquete informático Lasergene (DNASTAR lasergene v7.1.0) y se corrigieron manualmente. Posteriormente, se comprobó con la secuencia del genoma completo de la cepa tipo (NCIMB 2154^T) descargada de la base pública de datos BLAST (Altschul y col., 1990), que las secuencias obtenidas se correspondían con los genes secuenciados.

El alineamiento múltiple de las secuencias en pauta se realizó empleando el programa MEGA7 (Kumar y col., 2016) utilizando los parámetros de alineamiento por defecto en MEGA7. Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se revisaron y se corrigieron manualmente. Los árboles filogenéticos de cada gen de virulencia de *T. maritimum* se obtuvieron mediante el método *Neighbor Joining* (NJ) y mediante el método de Máxima Verosimilitud (ML, del inglés *Maximum-likelihood*), realizando previamente una estimación para cada gen del mejor modelo evolutivo de sustitución nucleotídica mediante el programa MEGA7, usando el *Akaike Information Criterion* (AIC). Este AIC es un estimador que mide la distancia esperada entre el modelo verdadero y el modelo estimado (Posada y Buckley, 2004). En los árboles realizados mediante el método NJ, para los genes de la ceramidasa, sialidasa y esfingomielinasa se utilizó el modelo TN92 + G (Tamura 3-*parameter* con distribución gamma) (Tamura, 1992), mientras que para el gen de la condroitinasa se utilizó el modelo TN93 + G (Tamura-Nei 93 con distribución gamma) (Tamura y Nei, 1993). En los árboles realizados mediante el método ML, el modelo escogido para los genes sialidasa y esfingomielinasa fue el TN92 + G, para el gen de la ceramidasa fue el TN92 + G + I (proporción de sitios invariantes), y para el gen de la condroitinasa el modelo elegido fue el HKY (Hasegawa-Kishino-Yano) + G + I (Hasegawa y col., 1985).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.2.5 Ensayos *in vitro* de las enzimas implicadas en la degradación de tejidos

Para comprobar que los genes que codifican para la condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa eran funcionales y producían actividad, se analizó la presencia de estas enzimas empleando distintos métodos *in vitro* en placa, fluorométricos y coloriméticos.

Ensayo *in vitro* de la condroitinasa:

La actividad de la enzima condroitinasa se ensayó *in vitro* de acuerdo con lo descrito por Li y col. (2015) y Pérez-Pascual y col. (2017a). Para ello, se preparó el medio compuesto por Agar Marino (AM) enriquecido con condroitin sulfato A (Sigma-Aldrich) al 20% (p/v) y BSA al 10% (p/v). En primer lugar, el AM se autoclavó y tras atemperarse, se añadió la mezcla de condroitin sulfato y BSA con un filtro de 0,45 micras. Posteriormente se vertió el medio en placas hasta su completa solidificación.

Las cepas de *T. maritimum* se cultivaron en FMM agar y caldo durante 48 horas a 25ºC. Posteriormente, en cada placa se inocularon varias cepas mediante el método de picadura. La incubación se realizó a 25ºC durante 48 horas y transcurrido ese tiempo, los resultados se revelaron cubriendo la superficie de las placas con ácido clorhídrico (HCl) 1M o ácido acético 2N. Como control negativo, se utilizaron las bacterias *T. soleae* CECT 7292, *T. discolor* NCIMB 14278 y *T. gallaicum* CECT 7123, de acuerdo con lo descrito por Pérez-Pascual y col. (2017a). La aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento de la bacteria indicaría un resultado positivo para la enzima condroitinasa.

Ensayo *in vitro* de la enzima sialidasa

Para comprobar la actividad de la enzima sialidasa, se realizó un ensayo fluorimétrico. Para este ensayo se procedió con un experimento *in vitro* siguiendo el protocolo descrito por Mally y col. (2008) y Pérez-Pascual y col. (2017a), empleando la sal de sodio hidratada del ácido fluorogénico 2'-(4-metilumbeliferil)-α-D-N-acetilneuramínico (MUAN) (Sigma-Aldrich). Se cultivaron los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

distintos aislados de *T. maritimum* en FMM caldo durante 48 horas a 25ºC. Cuando los cultivos alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento (D.O = 0,6), se incubaron durante tres minutos en agitación con el sustrato (MUAN). Posteriormente, y con el fin de detener la actividad de la enzima, se añadió una gota de carbonato sódico (Na_2CO_3) a 0,5 M y pH 10. Finalmente, tras una incubación de 60 minutos, se midió la presencia de 4-metillumbeliferona escindido libre (4-MU) mediante fluorescencia en el lector Mithras Microplate Reader (Berthold Technologies) a una longitud de onda de 360/440 nm.

Como controles negativos, se emplearon las bacterias *T. soleae* (CECT 7292), *T. discolor* (NCIMB 14278) y *T. gallaicum* (CECT 7123), de acuerdo con lo descrito por Pérez-Pascual y col. (2017a).

Ensayo *in vitro* de la enzima esfingomielinasa

Para el ensayo de la actividad de la enzima esfingomielinasa se empleó el *Colorimetric Sphyngomyelinase Assay kit* (Sigma-Aldrich) y una placa de 96 pocillos. En primer lugar, se mezcló el Estándar de la Esfingomielinasa (10 unidades/mL) con el Tampón de Ensayo, para formar la Solución Estándar (10 miliunidades/mL). La Solución Estándar se diluyó seriadamente con el Tampón de Ensayo para realizar los patrones estándar a distintas concentraciones: 0,078 miliU/mL (blanco), 0,156 miliU/mL, 0,313 miliU/mL, 0,625 miliU/mL, 1,25 miliU/mL, 2,5 miliU/mL, y 5 miliU/mL. Cada estándar se añadió al pocillo correspondiente (50µL) por duplicado. Por otro lado, se preparó la Solución de Trabajo de Esfingomielinasa mezclando Esfingomielina (50 µL) y Tampón de Reacción de la Esfingomielinasa (5 mL) y se añadieron tanto a los estándares como a los pocillos de las muestras, 50 µL de esta solución. Posteriormente se mezcló el Tampón de Ensayo con la Mezcla de Enzimas del kit y el *Blue Detection Reagent* (previamente se añadió DMSO para obtener una concentración de 200X) para dar lugar a la Mezcla de Ensayo de la Esfingomielinasa. De esta Mezcla de Ensayo de la Esfingomielinasa se añadieron 50 µL tanto a los patrones estándares como a los pocillos de las muestras. Por último, cada cepa, previamente cultivada en FMM caldo durante 48 horas a 25ºC, se ajustó a D.O.= 0,5 con

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tampón fosfato salino y se inocularon 50μL a los pocillos correspondientes a las muestras. Todas las cepas se ensayaron por duplicado. La placa de 96 se incubó 2 horas en agitación en oscuridad. Tras la incubación, se midió la absorbancia en un lector de placas a 655 nm.

5.1.3 Identificación de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo y descripción de su estructura química

5.1.3.1 Puesta a punto del crecimiento de *T. maritimum* en déficit de hierro

Para la puesta a punto del crecimiento de *T. maritimum* en déficit de hierro, se crecieron las cepas previamente en FMM agar durante 48 horas a 25ºC. Posteriormente se inoculó una colonia en FMM caldo durante 48 horas a 25ºC en agitación. Una vez crecida la bacteria en FMM caldo, se ajustó a una D.O. de 0,5 y se inocularon tubos de ensayo con medio mínimo CM9, con un volumen final de 5 mL. Este medio está compuesto por Na_2HPO_4 (6 g/L); KH_2PO_4 (3g/L); NaCl (5 g/L); NH_4Cl (1 g/L); $CaCl_2$ (1,47 mg/L); $MgSO_4$ (12,04 mg/L); glucosa (0,5%) y casaminoácidos (0,2%) a pH 7,2 (Lemos y col., 1988). Como agente quelante se empleó el ácido etilendiamino-di-(o-hidroxifenil-acético) (EDDHA o EDDA). Para determinar la concentración mínima a la que *T. maritimum* era capaz de producir sideróforos, se probaron distintas concentraciones de EDDA (5μM, 10 μM y 20 μM). Los cultivos se incubaron a 25ºC durante 48 horas en agitación y se tomaron medidas de la D.O. a 600 nm a partir de las 24 horas. Para estos ensayos se utilizó como control positivo un cultivo de *T. maritimum* en CM9 con $Fe_2(SO_4)_3$. Como controles negativos se utilizaron el medio CM9 suplementado con la concentración correspondiente de EDDA. Las cepas utilizadas en estos estudios de puesta a punto fueron las mismas que las seleccionadas para la secuenciación del genoma completo (Tabla 20, apartado 5.1.1.1).

La cuantificación y verificación de la producción de sideróforos se realizó empleando el ensayo químico cromo azurol-S (CAS) de Schwyn y Neilands (1987), tanto en medio líquido como sólido. Esta

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

técnica permite detectar la presencia de sideróforos mediante un complejo ferri-cromogénico que cambia de color cuando pierde el Fe^{+3}.

Los sideróforos, que tienen más afinidad por el hierro que el cromógeno, capturan el hierro del complejo ferri-cromogénico, resultando en un cambio del color del colorante de azul a amarillo en el caso de las placas de agar, y de azul a rojo en el caso del ensayo en medio líquido. Para el ensayo en medio líquido, los cultivos de *T. maritimum* realizados en CM9 con distintas concentraciones de EDDA se centrifugaron (1 mL) a 12000 rpm y los sobrenadantes se mezclaron con una parte proporcional de CAS. Tras 15 minutos de incubación, se observó la presencia de viraje de color, indicando la presencia de sideróforo, y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Hitachi U-2000) a 630 nm, indicando los valores negativos producción de sideróforo. Este ensayo también se realizó en placas de FMM suplementadas con CAS. Para ello, se depositaron acúmulos de bacteria sobre dichas placas y se observó la presencia de viraje de color.

Tras estos ensayos iniciales, se escalaron los experimentos a matraces de 20 mL, con las mismas condiciones de cultivo y concentraciones de EDDA y se comprobó nuevamente la producción de sideróforos.

5.1.3.2 Identificación y detección de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo

En base a los genomas completos secuenciados en el apartado 5.1.1.4, se realizó una búsqueda de los posibles genes del clúster de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum*, de acuerdo con lo descrito por Pérez-Pascual y col. (2017a) en este patógeno, y en *T. mesophilum* por Fujita y col. (2018). En primer lugar, se buscaron y localizaron los posibles genes de biosíntesis del sideróforo en el genoma completo de la cepa tipo NCIMB 2154^{T}, previamente descargada de la base de datos pública BLAST (Altschul y col., 1990) y anotada con el programa RAST (Overbeek y col., 2014), y a continuación, mediante el mismo programa, se buscaron estos posibles genes de biosíntesis en

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

todas las demás cepas secuenciadas de *T. maritimum* en esta tesis doctoral.

Una vez localizados los posibles genes de biosíntesis del sideróforo, se diseñaron los cebadores correspondientes para cada gen con la herramienta Primer-BLAST (Ye y col., 2012) (Tabla 25), y se realizó la amplificación de éstos mediante la técnica de PCR. Las condiciones y el protocolo de la PCR para estos genes se detallan en la Tabla 26. Se comprobó la presencia de todos los genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum* en 60 cepas con distinto origen geográfico, hospedador y serotipo (apartado 5.1.2.1, Tabla 22).

Para la extracción del ADN se utilizó el kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante para bacterias Gram negativas, con las mismas indicaciones que se detallan en el apartado 5.1.2.3. Asimismo, los productos de amplificación obtenidos para estos 4 genes fueron separados mediante electroforesis horizontales, con las mismas condiciones que se detallan en el apartado 5.1.2.3. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados mediante secuenciación Sanger por la empresa Stab Vida Lcd. (Portugal). Los electrofenogramas proporcionados por Stab Vida para cada gen se ensamblaron empleando los programas SeqMan y EditSeq del paquete informático Lasergene (DNASTAR lasergene v7.1.0) y se corrigieron manualmente. Posteriormente, se comprobó con la secuencia del genoma completo de la cepa tipo (NCIMB 2154^{T}) descargada de la base pública de datos BLAST (Altschul y col., 1990) que las secuencias obtenidas se correspondían con los genes secuenciados.

El alineamiento múltiple de las secuencias en pauta se realizó empleando el programa MEGA7 (Kumar y col., 2016) utilizando los parámetros de alineamiento por defecto en MEGA7. Los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se revisaron y se corrigieron manualmente.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 25. Cebadores empleados en la amplificación mediante la técnica de PCR de los genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum*.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5´-3´)	Tamaño del amplicon (pb)
*tbs*A	tbsA-F	GACTACGGAAGTTTTGACCC	1509
	tbsA-R	AACAATACCCTCCTCAATACC	
*tbs*B	tbsB-F	GCAGTTCATTCTTCTCAATACC	1329
	tbsB-R	AACCATTCCTAAATCAGGCG	
*tbs*C	tbsC-F	TCATAATGCTTACATGGGGG	576
	tbsC-R	GCTTCTTCGTAATTTTCCCTTG	
*tbs*D	tbsD-F	CGATGATTTCTCAGCACAAC	1821
	tbsD-R	TGTTTTGCAATTGTAGTCGG	
*tbs*CD	tbsCD-F	CAGATCAGTATTTAGCACAGC	2418
	tbsCD-R	GTAATAATGCTACTGGGTCATC	

Tabla 26. Protocolo de amplificación por PCR de los genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum*.

Paso	Temperatura (ºC)	Tiempo (t)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5´	
Desnaturalización	95	30´´	
Hibridación	53	30´´	35
Elongación	72	1´	
Elongación final	72	10´	

5.1.3.3 Determinación de la estructura química del sideróforo

Con el fin de conocer la estructura química del sideróforo producido por *T. maritimum*, se seleccionó la cepa LSP9.1 aislada de lenguado en España y perteneciente al serotipo O4. Esta cepa se cultivó en placas de FMM durante 48 horas a 25ºC. Se prepararon preinóculos rutinariamente de 400 mL de FMM caldo inoculando una colonia de la cepa previamente sembrada en FMM agar, e incubando

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en agitación durante 48 horas a 25ºC. Posteriormente, se inocularon matraces con 2 L de CM9, con 400 mL del preinóculo anterior ajustado a una D.O de 0,5. A este inóculo se añadió EDDA a una concentración de 20μM y se incubó en agitación durante 48 horas a 25ºC. Transcurrido este tiempo, se comprobó mediante la prueba de CAS (Schwyn y Neilands 1987) líquido la producción de sideróforos en el cultivo. Para poder detectar el sideróforo con mayor facilidad, se añadió Galio (III) a los inóculos de CM9 como paso previo al proceso de filtrado, dejando los cultivos durante 24 horas en agitación a 25ºC.

Posteriormente se centrifugó el cultivo a 6000 rpm durante 30 minutos a 4ºC en una centrífuga *Avanti TM J25* con un rotor JA-10 (15000 xg) (Beckman Coulter). Tras la centrifugación, el sobrenadante se filtró en un sistema de filtración continua (*PREP/SCALE®-TFF CARTRIDGE*, Milipore). El filtrado resultante se envió al laboratorio del Dr. Carlos Jiménez del Departamento de Química Fundamental de la Universidad de A Coruña, en el que se optimizó el proceso de aislamiento de dichos compuestos.

Para ello, se recurrió a una metodología de fraccionamiento bioguiada, estudiando la presencia de compuestos quelatadores de hierro (III) mediante el ensayo líquido CAS (del inglés *Chrome Azurol Sulfonate assay*) y ensayos de actividad sideróforа. Debido a la elevada inestabilidad de los compuestos observada durante este proceso, se llevó a cabo el estudio paralelo de los sobrenadantes de dicha bacteria quelatados con Galio (III) y hierro (III). Mientras el Galio presenta una distribución isotópica distinguida que permite localizar fácilmente los compuestos quelatadores de este metal en espectrometría de masas, el hierro permite conocer en qué fracción se encuentra la actividad sideróforа. Usando dicho método se alcanzó una metodología basada en la utilización de la resina no iónica XAD-7, reportada previamente por el grupo del Dr. Carlos Jiménez como una gran alternativa para el aislamiento de compuestos hidroxámicos, seguida de un fraccionamiento mediante cartuchos de fase reversa que logró obtener una fracción con gran actividad sideróforа, eluida con un 25% de MeOH en H_2O desionizada.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Una vez obtenidas las fracciones que contenían el sideróforo, se procedió a realizar la cuantificación de la actividad biológica de estos extractos mediante bioensayos con *T. maritimum*, con el fin de comprobar si promovían el crecimiento de esta bacteria. Estos ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos. Para ello se mezcló el cultivo de la cepa LSP9.1 con las fracciones del sideróforo diluidos a 1:200 y 1:2000 en las proporciones de los disolventes correspondientes a cada fracción (H_2O y metanol), junto con EDDA a 5, 7 y 10μM en CM9. Como control positivo se empleó $Fe_2(SO_4)_3$ en vez de EDDA, para favorecer la disponibilidad de hierro. Como control negativo se utilizó el medio CM9 suplementado con la concentración correspondiente de EDDA.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Estudio de los antígenos O del LPS de *T. maritimum*

5.2.1.1 Análisis del LPS mediante electroforesis SDS-PAGE y Western blot

Con el fin de conocer las diferencias entre los LPS de los aislados de *T. maritimum* pertenecientes a distintos serotipos, se llevó a cabo un estudio del perfil completo, así como del antígeno O del LPS mediante las técnicas de electroforesis SDS-PAGE con tinción de plata y mediante Western blot, respectivamente.

El análisis mediante electroforesis SDS-PAGE con tinción de plata no produjo un patrón claro de bandas para ningún perfil de LPS de los aislados utilizados en este estudio, patrón que si se puede apreciar en el control positivo utilizado (*E. tarda* ATCC 23656) (Figura 26 y Tabla 20). Por lo tanto, esta técnica no permitió establecer diferencias entre los aislados de *T. maritimum* pertenecientes a diferentes serotipos en base a diferencias en el perfil de LPS.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

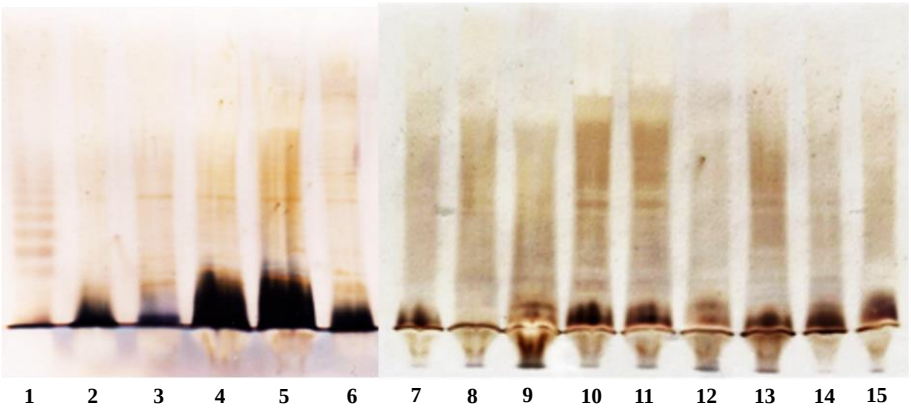


Figura 26. Electroforesis SDS-PAGE con tinción de plata de los perfiles de LPS de las cepas utilizadas en este estudio. 1: Control positivo (*E. tarda* ATCC 23656); 2: PC538.1; 3: CA56.1; 4: CA80.1; 5: SNW20.1; 6: AQP72.1; 7: NCIMB 2154^{T}; 8: CA63.1; 9: PC503.1; 10: ACR485.1; 11: ACR584.1; 12: SNW20.2; 13: SNW15.1; 14: SE30.1; 15: SP9.1.

En cuanto al análisis de los perfiles de LPS mediante la técnica de Western blot (Figura 27 y Tabla 20), se observaron cuatro perfiles distintos correspondientes a los cuatro serotipos descritos en *T. maritimum*. Así, todas las cepas pertenecientes al serotipo O1 presentaron un mismo perfil de LPS reaccionando sólo contra el antisuero del serotipo O1. De igual forma, los aislados del serotipo O2 mostraron reacción cruzada contra el antisuero O2 con un único perfil de bandas. Del mismo modo, las cepas pertenecientes al serotipo O3 sólo reaccionaron contra el antisuero del serotipo O3, generando un mismo perfil, y los aislados correspondientes al serotipo O4 únicamente generaron un perfil de bandas cuando se incubaron con el antisuero del serotipo O4.

Estos resultados obtenidos mediante la técnica de Western blot pusieron de manifiesto la heterogeneidad antigénica de *T. maritimum* y corroboraron la presencia de cuatro serotipos, los cuales se diferencian en base a la presencia de distintos antígenos O.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

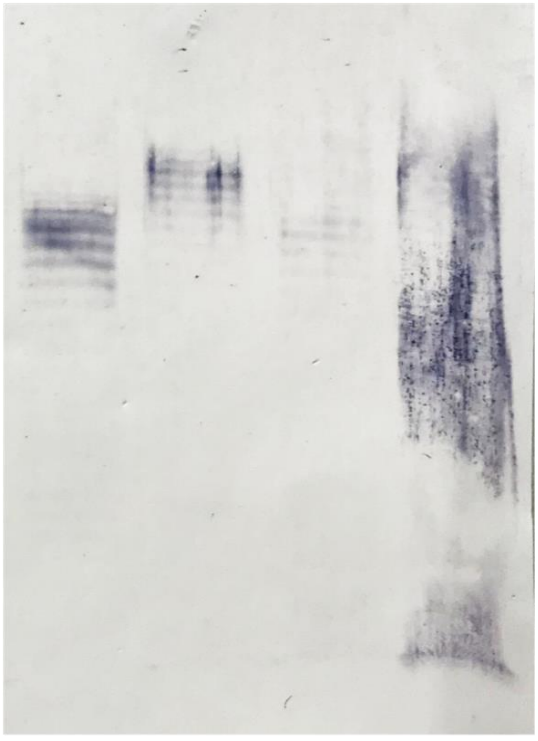


Figura 27. Western blot de los perfiles de LPS analizados en este estudio. 1: Perfil generado contra el antisuero del serotipo O1 para las cepas NCIMB 2154^{T}, CA63.1, PC503.1, PC538.1; 2: Perfil generado contra el antisuero del serotipo O2 para las cepas ACR485.1, ACR584.1, CA80.1, SNW20.1; 3: Perfil generado contra el antisuero del serotipo O3 para las cepas AQP72.1, SNW15.1, CA56.1; 4: Perfil generado contra el antisuero del serotipo O4 para las cepas SNW20.2, SP9.1 y SE30.1

5.2.1.2 Análisis de los genes de biosíntesis del antígeno O

Una vez realizado el análisis mediante Western blot, se procedió a buscar y localizar el conjunto de genes de biosíntesis de los antígenos O de cada aislado y se estudiaron las posibles diferencias genéticas

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

entre ellos. Además, se localizaron algunos de los genes encargados de la biosíntesis del Kdo-lípido A.

Para ello, una vez anotados los genomas mediante los programas de anotación RAST y PATRIC, se localizaron *in silico* los genes responsables de la biosíntesis de los distintos antígenos O del LPS de *T. maritimum* en todas las cepas analizadas en este estudio (Tabla 20). Se identificó el grupo de genes de biosíntesis del antígeno O para todos los aislados (Figura 28) y los resultados se corroboraron mediante la comparación con los genes de biosíntesis del antígeno O descritos, anotados y curados en otras bacterias.

Los resultados obtenidos demostraron la existencia de diferencias a nivel genético entre los distintos serotipos. Así, todos los aislados del serotipo O1 (Tabla 20) presentaban el mismo conjunto de genes de biosíntesis del antígeno O (Figura 28) y estaban ordenados de la misma manera dentro del genoma de *T. maritimum*. Del mismo modo, todas las cepas pertenecientes al serotipo O2 (Tabla 20) poseían la misma agrupación genética. Igualmente, todas las cepas correspondientes al serotipo O3 presentaban el mismo clúster de genes (Figura 28) y todos los aislados pertenecientes al serotipo O4 poseían también los mismos genes de biosíntesis y ordenados de la misma manera.

Es necesario destacar que, en el caso de los aislados pertenecientes a los serotipos O2 y O4, existe un gen único en cada serotipo, que serviría para diferenciar estos dos serogrupos de los demás. En el caso de los aislados del serotipo O2, se trata del gen perosamina sintasa (*perA*), que cataliza la formación de perosamina, un derivado de la GDP manosa que suele formar parte como azúcar de la estructura del antígeno O de los LPS (Figura 28). En el grupo de genes de biosíntesis del antígeno O de los aislados del serotipo O4 se encontró el gen de la flipasa del antígeno O (*wzx*), encargado de translocar las unidades de repetición de los azúcares que formarán el antígeno O, desde el citoplasma al periplasma, para su posterior polimerización (Figura 28). Además, en los aislados pertenecientes al serotipo O2 y O3, se localizó el gen que codifica para la N-acetilneuraminato sintasa (*neuB*), el cual participa en la síntesis de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ácido neuramínico, un tipo de azúcar que también puede formar parte del antígeno O (Figura 28).

Todos los aislados, con independencia del serotipo al que correspondan, presentan los genes encargados de la síntesis de la ramnosa (en concreto la deoxitimidina difosfo-L-ramnosa, dTDP-L-ramnosa), un azúcar presente en el antígeno O (Figura 28, genes marcados en rojo), que se sintetiza a partir de la glucosa-1-fosfato. Estos genes son la glucosa-1-fosfato timidiltransferasa (*rmlA*), la dTDP-glucosa 4,6 deshidratasa (*rmlB*), la dTDP-4-deshidroramnosa 3,5 epimerasa (*rmlC*), los cuales se encuentran localizados adyacentes en todas las cepas, y la dTDP-4-deshidroramnosa reductasa (*rmlD*), que se encuentra cercano a los anteriores en las cepas pertenecientes a los serotipos O2 y O3, pero mucho más alejado en el caso de los aislados pertenecientes al serotipo O1 y O4 (Figura 28). Además, todos los aislados presentaban el gen que codifica para la ramnosiltransferasa (*wbbL*), enzima encargada de añadir los residuos de ramnosa a las cadenas del antígeno O.

Adicionalmente, todos los aislados presentaban los genes correspondientes a la síntesis de manosa (en concreto la guanosina difosfato manosa, GDP manosa) a partir de fructosa-1-fosfato, azúcar que puede formar parte del antígeno O, pero se encontraron en distintas localizaciones del genoma de los aislados de *T. maritimum* y no dentro del clúster de genes de antígeno O. Los genes de síntesis de la GDP manosa localizados fueron *manA* (manosa-6-fosfato isomerasa), *manB* (fosfomanomutasa) y *manC* (manosa-1-fosfato guanililtranferasa), y el gen *gmd* (GDP manosa 4,6 dehidratasa) que da lugar al paso previo para la formación de distintos derivados de GDP-manosa. Por otro lado, todos los aislados de *T. maritimum* presentaban distintos genes que codificaban para la síntesis de otros azúcares que formarán el antígeno O, los cuales se encuentran detallados en la Figura 28.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

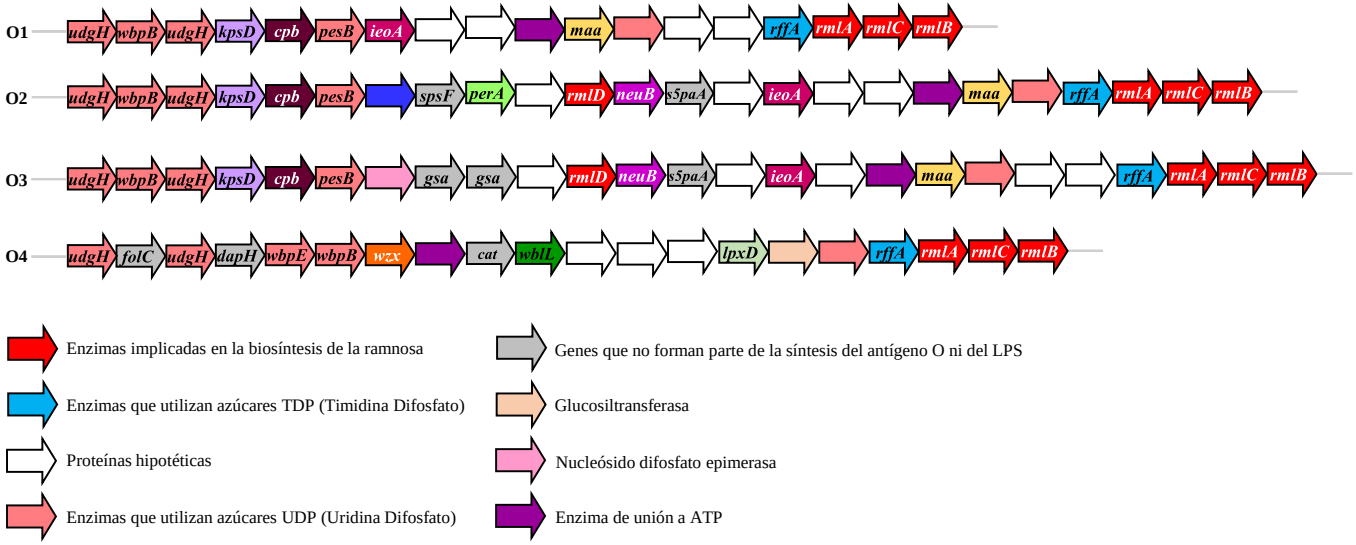


Figura 28. Organización genética de los genes que codifican para las proteínas que participan en la biosíntesis de los distintos antígenos O de *T. maritimum*. *udgH*: UDP-glucosa deshidrogenasa; *wbpB*: UDP-2-acetamido-2-deoxi-D-ácido glucurónico deshidrogenasa; *kpsD*: transportador de ácido siálico; *cpb*: proteína putativa involucrada en la biosíntesis de polisacáridos capsulares; *pesB*: UDP-N-acetylglucosamina 4,6 deshidratasa; *ieoA*: proteína de membrana involucrada en la exportación de antígeno O; *maa*: maltosa-O-acetiltransferasa; *rffA*: TDP-4-oxo-6-deoxi-D-glucosa transaminasa; *rmlA*: glucosa-1-fosfato timidiltransferasa; *rlmB*: dTDP-glucosa 4,6 deshidratasa; *rlmC*: dTDP-4-deshidroramnosa 3,5 epimerasa; *rlmD*: dTDP-4-deshidroramnosa reductasa; *spsF*: biosíntesis de la capa de las esporas; *gsa*: Glutamato-1-semialdehído aminotransferasa**;** *perA*: perosamina sintasa; *neuB*; N-acetilneuraminato sintasa; *s5paA*: S5p alanina acetiltransferasa; *folC*: dihidrofolato sintasa; *dapH*: 2,3,4,5-tetrahidropiridina-2,6-dicarboxilato-N-acetiltransferasa; *wbpE*: Glutamato--UDP-2-acetamido-2-deoxi-D-ribohex-3-ácido ululónico aminotransferasa; *wzx*: flipasa del antígeno O; *cat*: cloranfenicol acetiltransferasa; *wblL*: Proteína involucrada en la síntesis del antígeno O; *lpxD*: UDP-3-O- (3-hidroximiristoil) glucosamina N-aciltransferasa.

Adicionalmente, es necesario destacar que se han localizado algunos de los genes necesarios para la síntesis del lípido A (*lpxA, lpxC, lpxD*) y el Kdo (*kdsD*), los cuales se encuentran muy conservados en todos los aislados (Figura 29). Además, todos los aislados presentaban el gen *waaL*, el cual codifica para la ligasa del antígeno O, encargado de la unión del antígeno O al lípido A.

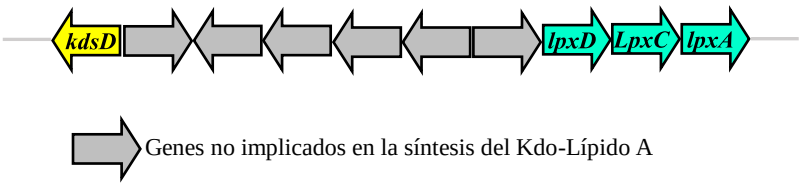


Figura 29. Genes implicados en la síntesis del lípido A y Kdo localizados en los aislados de *T. maritimum* estudiados en este trabajo. *kdsD*: arabinosa 5-fosfato isomerasa; *lpxA*: UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferasa; *lpxC*: UPD-3-O-acil-N-acetilglucosamina deacetilasa; *lpxD*: UDP-3-O- (3-hidroximiristoil) glucosamina N-aciltransferasa.

5.2.2 Estudio de las enzimas relacionadas con la degradación de tejidos del hospedador

5.2.2.1 Detección de los genes de la condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa y análisis filogenético

Con el objetivo de detectar los genes de la condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa, se realizó una amplificación de éstos mediante la técnica de PCR (Tablas 23 y 24) de 60 aislados de *T. maritimum* con distintos datos epidemiológicos (Tabla 22). Como resultado se obtuvo la amplificación de los cuatro genes en todas las cepas empleadas (Figura 30). La electroforesis mostró para todos los aislados una banda de 2031 pb correspondiente al gen que codifica para la condroitinasa, una banda de 547 pb correspondiente al gen que codifica para la sialidasa, una banda de 1000 pb para el gen de la esfingomielinasa y una banda de 1544 pb, que se corresponde con el gen que codifica para la ceramidasa (Figura 30).

Todos los fragmentos correspondientes a los cuatro genes estudiados amplificados mediante la técnica de PCR fueron secuenciados

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

mediante Secuenciación Sanger. Una vez recibidas las secuencias, se procedió a su corrección mediante los programas SeqMan y EditSeq y a su alineamiento en MEGA v7. Posteriormente, se compararon todas las secuencias obtenidas para cada gen con las secuencias de los genes anotados como condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa de la cepa NCIMB 2154^{T} (Pérez-Pascual y col., 2017a). Los porcentajes de similitud con esta cepa de referencia fueron en torno a un 96,32% para el gen de la condroitinasa, 99,28% para la esfingomielinasa, 99,39% para la ceramidasa y 99,64% para el gen de la sialidasa, resultado que indica que todas las secuencias objeto de estudio se corresponden con la secuencia del gen que se esperaba.

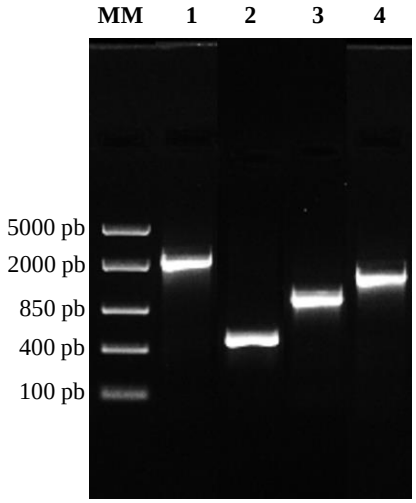


Figura 30. Electroforesis de los productos de amplificación obtenidos mediante PCR de los genes que codifican para las enzimas de degradación del aislado de *T. maritimum* correspondiente a la cepa LSP22.1. MM: Marcador molecular FastRuler Middle Range (Thermo Fisher Scientific Inc); 1: condroitinasa; 2: sialidasa; 3: esfingomielinasa; 4: ceramidasa.

La reconstrucción filogenética de todas las secuencias para cada uno de los genes reveló diferencias principalmente a nivel de serotipo. Para todos los genes, los resultados obtenidos mediante los métodos NJ y ML arrojaron resultados muy similares. Así, el árbol filogenético construido con las secuencias del gen que codifica para la condroitinasa (*cslA*) (Figura 31) se dividió en dos ramas principales. La rama

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

superior del árbol congregó al 100% de los aislados pertenecientes al serotipo O4 (indicados en color verde en el árbol) con un *bootstrap* de 90. Esta rama superior también agrupó a la mayoría de las cepas correspondientes al serotipo O3 (marcadas en amarillo). En el caso de las cepas pertenecientes al serotipo O1 (marcadas en rosa) y O2 (marcadas en azul), éstas se encontraban distribuidas en ambas ramas principales.

En el árbol construido con las secuencias pertenecientes al gen que codifica para la sialidasa (Figura 32), las cepas correspondientes al serotipo O4 excepto los aislados SP9.1, SNW17.1, SE30.1, se concentraron en una sola rama del árbol. Sin embargo, para este gen no existe una clara diferenciación entre las cepas de los tres serotipos restantes (O1, O2 y O3), ya que éstas se hallan distribuidas entre las diferentes ramas del árbol filogenético.

Para el árbol filogenético correspondiente al gen de la esfingomielinasa (Figura 33), el 100% de las cepas que pertenecen al serotipo O4 se encontraron nuevamente agrupadas en una misma rama del árbol, al igual que ocurría en el caso de los árboles filogenéticos construidos con los genes condroitinasa y sialidasa. En el caso de este gen, el 100% de las cepas pertenecientes los serotipos O2 y O3 se agruparon en una misma rama, con un *bootstrap* de 98. Sin embargo, los aislados del serotipo O1, se encontraban distribuidas a lo largo de todo el árbol filogenético.

En el caso de la reconstrucción filogenética realizada con las secuencias pertenecientes al gen que codifica para la ceramidasa (Figura 34), los aislados pertenecientes al serotipo O4 se agruparon nuevamente en una rama, con un *bootstrap* de 94, salvo la cepa AZ200.1. Del mismo modo que ocurrió con el árbol filogenético perteneciente al gen que codifica para la sialidasa, los aislados de los otros tres serotipos restantes (O1, O2 y O3) se encuentran distribuidos por todo el árbol filogenético.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

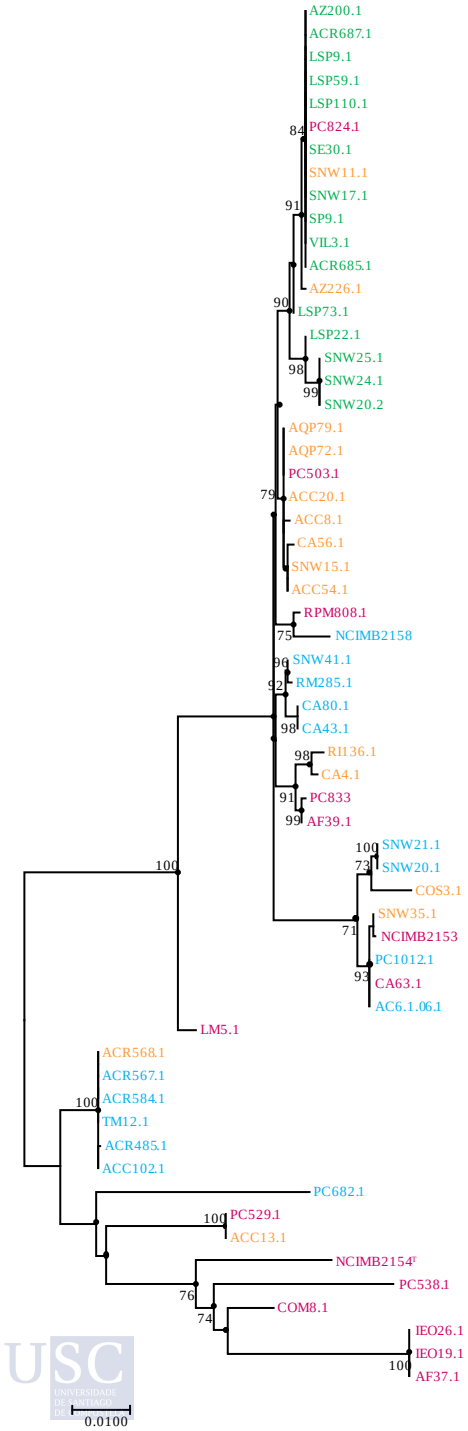


Figura 31. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias del gen de la condroitinasa de los aislados de *T. maritimum* empleados en este estudio realizado mediante el método ML con el modelo HKY+G+I. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo TN93 + G. Barra, 0,01 sustituciones nucleotídicas por sitio. En color rosa: aislados pertenecientes al serotipo O1; en color azul: aislados pertenecientes al serotipo O2; en color amarillo: aislados pertenecientes al serotipo O3; en color verde: aislados pertenecientes al serotipo O4.

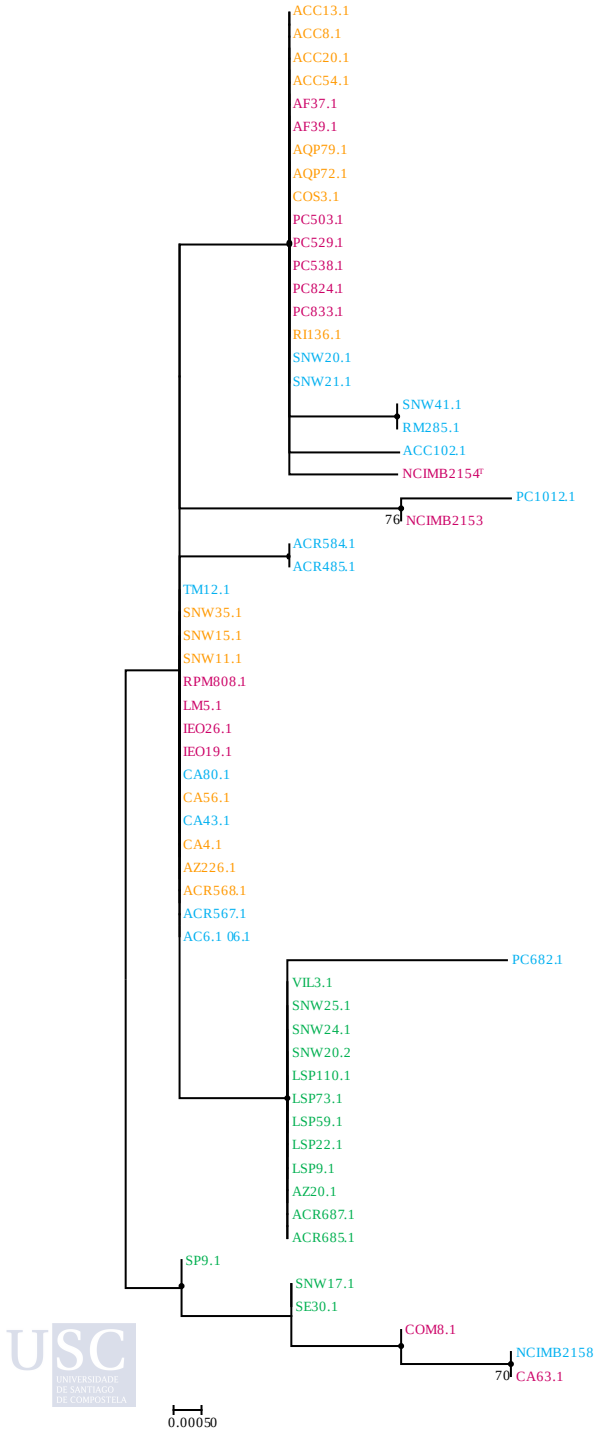


Figura 32. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias del gen de la sialidasa de los aislados de *T. maritimum* empleados en este estudio realizado mediante el método ML con el modelo TN92+G. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo TN92 + G. Barra, 0,0005 sustituciones nucleotídicas por sitio. En color rosa: aislados pertenecientes al serotipo O1; en color azul: aislados pertenecientes al serotipo O2; en color amarillo: aislados pertenecientes al serotipo O3; en color verde: aislados pertenecientes al serotipo O4.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

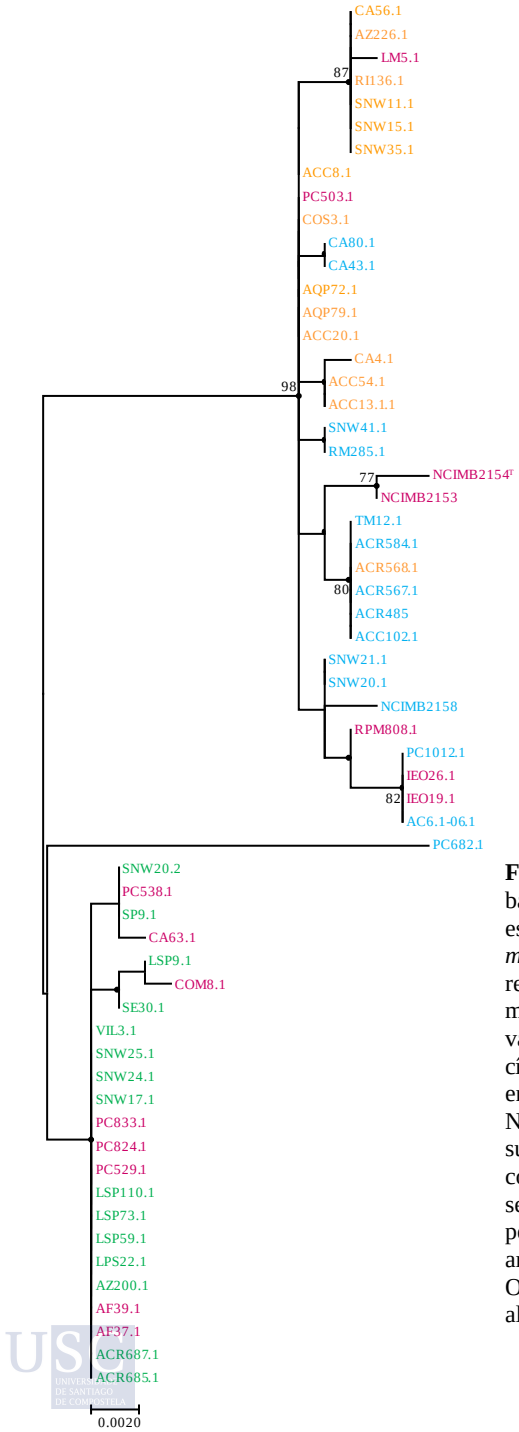


Figura 33. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias del gen de la esfingomielinasa de los aislados de *T. maritimum* empleados en este estudio realizado mediante el método ML con el modelo TN92+G. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo TN92 + G. Barra, 0,002 sustituciones nucleotídicas por sitio. En color rosa: aislados pertenecientes al serotipo O1; en color azul: aislados pertenecientes al serotipo O2; en color amarillo: aislados pertenecientes al serotipo O3; en color verde: aislados pertenecientes al serotipo O4.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

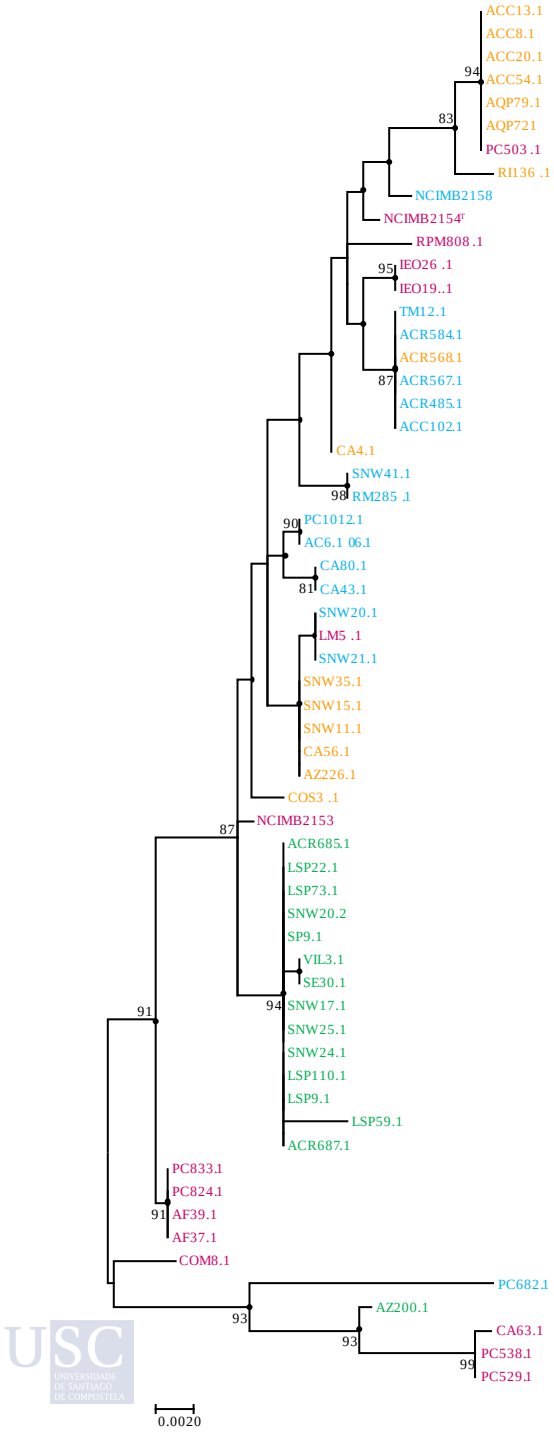


Figura 34. Reconstrucción filogenética basada en las secuencias del gen de la ceramidasa de los aislados de *T. maritimum* empleados en este estudio realizado mediante el método ML con el modelo TN92+G+I. Sólo se muestran los valores de *bootstrap* superiores al 70%. Los círculos negros indican los nodos coincidentes en el árbol generado mediante el algoritmo NJ con el modelo TN92 + G. Barra, 0,002 sustituciones nucleotídicas por sitio. En color rosa: aislados pertenecientes al serotipo O1; en color azul: aislados pertenecientes al serotipo O2; en color amarillo: aislados pertenecientes al serotipo O3; en color verde: aislados pertenecientes al serotipo O4.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.2.2 Detección de la actividad *in vitro* de la condroitinasa

Los resultados de los ensayos *in vitro* de la actividad de la enzima condroitinasa de *T. maritimum* para las 60 cepas analizadas (Tabla 22) revelaron la capacidad de todos los aislados para degradar el condroitín sulfato A. De este modo, todas las cepas analizadas en este trabajo presentaron un halo de degradación alrededor de la zona crecimiento, resultado indicativo de la presencia de actividad de la enzima condroitinasa en todos los aislados de *T. maritimum* (Figura 35). El tamaño de los halos resultantes de la degradación del condroitín sulfato A por parte de las cepas de *T. maritimum* fue constante para todos ellos. Las cepas utilizadas como controles negativos en este ensayo, *T. soleae* CECT 7292, *T. discolor* NCIMB 14278 y *T. gallaicum* CECT 7123, no formaron halo de degradación. Además, cabe destacar que la degradación del sustrato aumentó con el transcurso del tiempo, ya que el halo fue mayor a las 48 horas que a las 24 horas.

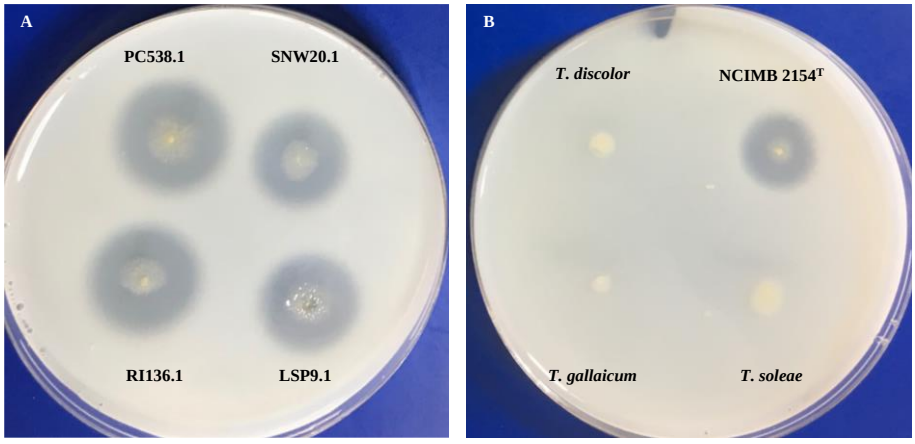


Figura 35. Ensayo de la actividad de la condroitinasa en *T. maritimum*. A: Se muestra como ejemplo, una placa con la degradación producida por la actividad condroitinasa de *T. maritimum* en las cepas detalladas. B: Placa con los controles negativos (*T. soleae*, *T. gallaicum* y *T. discolor*) sin actividad condroitinasa y el control positivo de *T. maritimum* (NCIMB 2154^T), con halo de degradación.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.2.3 Detección de la actividad *in vitro* de sialidasa

Para la detección de la actividad *in vitro* de la enzima sialidasa, se realizó el ensayo fluorimétrico detallado anteriormente en el apartado 5.1.2.5.

Con respecto a este ensayo, no se encontraron diferencias en la actividad de la enzima sialidasa en función del hospedador o el serotipo de los aislados estudiados (Figura 36). Así, todas las cepas analizadas mostraron 4-MU libre, debido a que todas ellas poseían la capacidad de degradar el sustrato MUAN, el cual contiene ácido siálico o neuramínico, demostrando así que todos los aislados presentan actividad sialidasa o neuraminidasa. Además, los controles negativos, tanto los medios de cultivo sin ninguna bacteria, como las especies *T. discolor, T. gallaicum* y *T. soleae*, no presentaron fluorescencia, resultando indicativo de que no poseían actividad sialidasa.

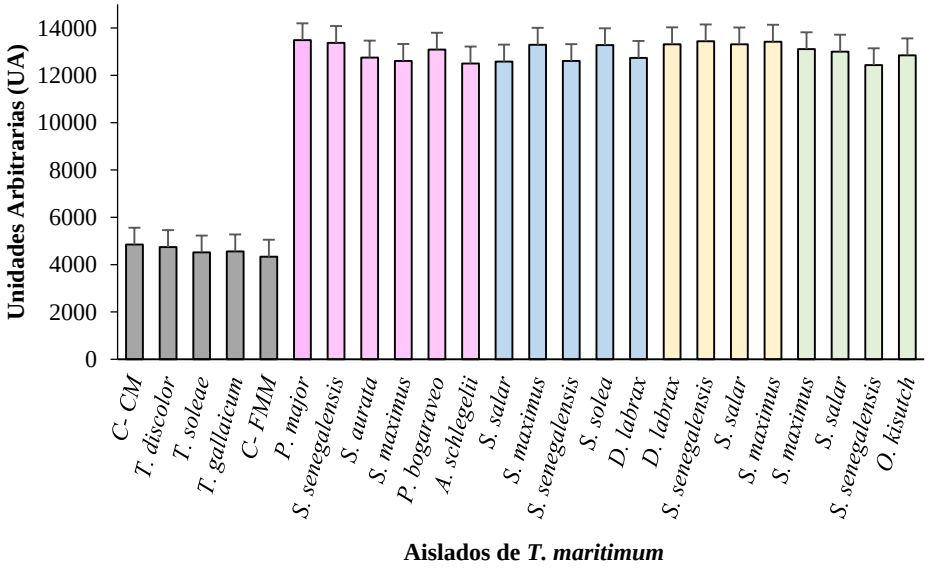


Figura 36. Actividad *in vitro* de la enzima sialidasa de los aislados de *T. maritimum*. Se representan los valores medios de las medidas de fluorescencia (Unidades Arbitrarias) de las cepas de cada hospedador y serotipo. En color rosa: cepas del serotipo O1; en color azul:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

cepas del serotipo O2; en color amarillo: cepas del serotipo O3; en color verde: cepas del serotipo O4. C- CM: Control negativo en caldo marino; C- FMM: Control negativo en FMM.

5.2.2.4 Detección de la actividad *in vitro* de esfingomielinasa

Para la detección de la actividad *in vitro* de la enzima esfingomielinasa, se realizó el ensayo colorimétrico detallado anteriormente en el apartado 5.1.2.5. En este ensayo se midió la actividad esfingomielinasa mediante absorbancia a 655nm.

No se encontraron grandes diferencias en la actividad de la enzima esfingomielinasa en función del hospedador o el serotipo de los aislados estudiados. Así, todas las cepas analizadas mostraron actividad esfingomielinasa, y por tanto, todos los aislados presentaron la capacidad de degradar esfingomielina. En la Figura 37 se muestran los resultados de la actividad esfingomielinasa de los aislados en función del serotipo al que pertenecen. Partiendo de que los resultados para todas las cepas son muy similares, las cepas de rodaballo LM5.1 y RPM808.1, pertenecientes al serotipo O1, presentaron una actividad esfingomielinasa ligeramente inferior a las demás cepas del serotipo O1 (Figura 37). De igual forma, las cepas SNW21.1 y SNW41.1 de salmón y la cepa TM12.1 de lubina, todas del serotipo O2, tenían valores de absorbancia levemente por debajo de las demás cepas del mismo serotipo (Figura 37). Observando los aislados del serotipo O3, las cepas CA56.1 y ACC8,1 de lenguado y la cepa SNW35.1 de salmón, mostraron datos de absorbancia sutilmente por debajo de las demás cepas pertenecientes al serotipo O3, de la misma manera que las cepas SP9.1 y SE30.1, ambas de salmón, pertenecientes al serotipo O4 (Figura 37).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

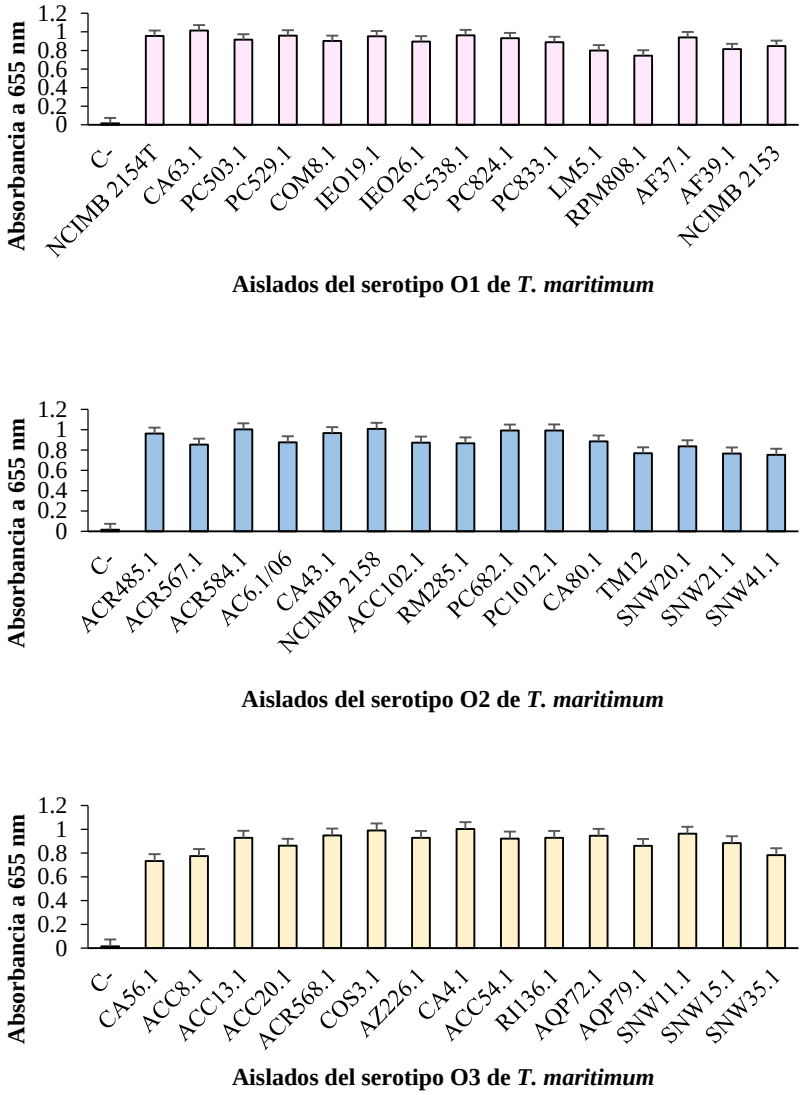


Figura 37. Actividad *in vitro* de la enzima esfingomielinasa paras todos los aislados de *T. maritimum*. Se representan los valores de las medidas de actividad esfingomielinasa a 655nm . En color rosa: cepas del serotipo O1; en color azul: cepas del serotipo O2; en color amarillo: cepas del serotipo O3; en color verde: cepas del serotipo O4. C-: Control negativo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

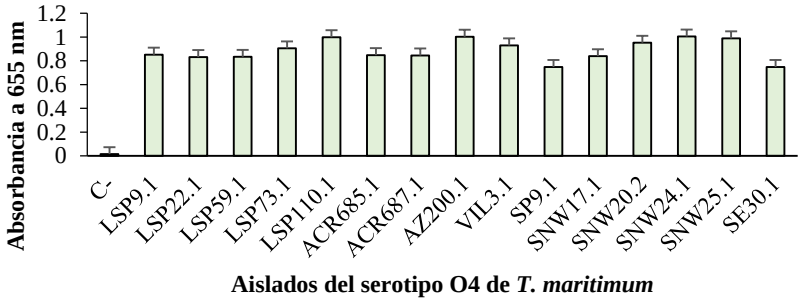


Figura 38 (continuación). Actividad *in vitro* de la enzima esfingomielinasa paras todos los aislados de *T. maritimum*. Se representan los valores de las medidas de actividad esfingomielinasa a 655nm . En color rosa: cepas del serotipo O1; en color azul: cepas del serotipo O2; en color amarillo: cepas del serotipo O3; en color verde: cepas del serotipo O4. C-: Control negativo.

5.2.3 Identificación de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo y descripción de su estructura química

5.2.3.1 Puesta a punto del crecimiento de *T. maritimum* en déficit de hierro y producción de sideróforos

En primer lugar, se realizó un ensayo con los aislados de *T. maritimum* descritos en la Tabla 22 en placas de CAS agar. Los resultados mostraron que todas las cepas producían sideróforo, ya que todas las colonias generaban un halo de color amarillo característico a su alrededor (Figura 38). Finalmente, se seleccionaron cuatro cepas representativas de los cuatro serotipos descritos con el fin de realizar los posteriores ensayos de crecimiento en déficit de hierro a distintas concentraciones de EDDA en medio líquido. Las cepas elegidas para este ensayo fueron la PC503.1 (O1), la SNW20.1 (O2), ACC13.1 (O3) y la LSP9.1 (O4).

Las cuatro cepas seleccionadas, representativas de cada uno de los cuatro serotipos, fueron crecidas en condiciones de déficit de hierro al adicionar al medio de cultivo 5, 10 y 20 μM del quelante de hierro EDDA. Los resultados mostraron que las cepas seleccionadas son

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

capaces de crecer en déficit de hierro y producir sideróforos (Figura 39). Además, en la Figura 40 se detallan las absorbancias derivadas de la producción de sideróforos de los cuatro aislados de *T. maritimum* utilizados. Las cuatro cepas produjeron valores de absorbancia negativos en el ensayo de CAS líquido, indicativo de la producción de sideróforos. Como se puede observar, a mayor concentración de quelante EDDA, más negativa es la absorbancia a 630nm (20 μM > 10 μM > 5 μM) (Figura 40). De estos resultados se puede concluir que los cuatro aislados estudiados, con independencia del serotipo, fueron capaces de crecer en déficit de hierro, produciendo además cantidades significativas de sideróforo.

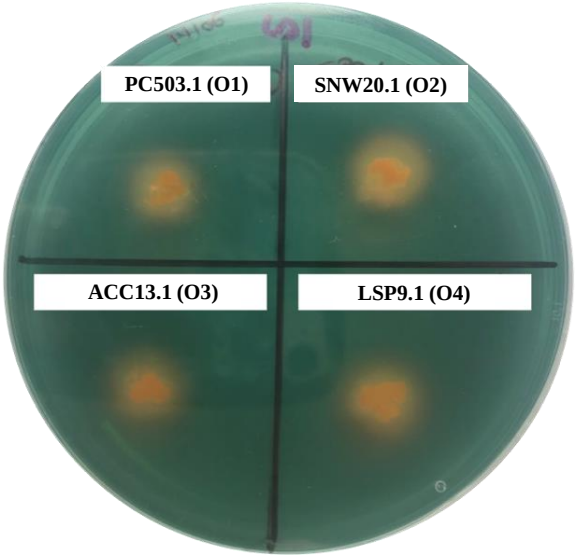


Figura 39. Prueba de producción de sideróforos en CAS agar de los cuatro aislados representativos de *T. maritimum* para el ensayo de producción de sideróforos. Se observan los halos amarillos alrededor del crecimiento de los aislados.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

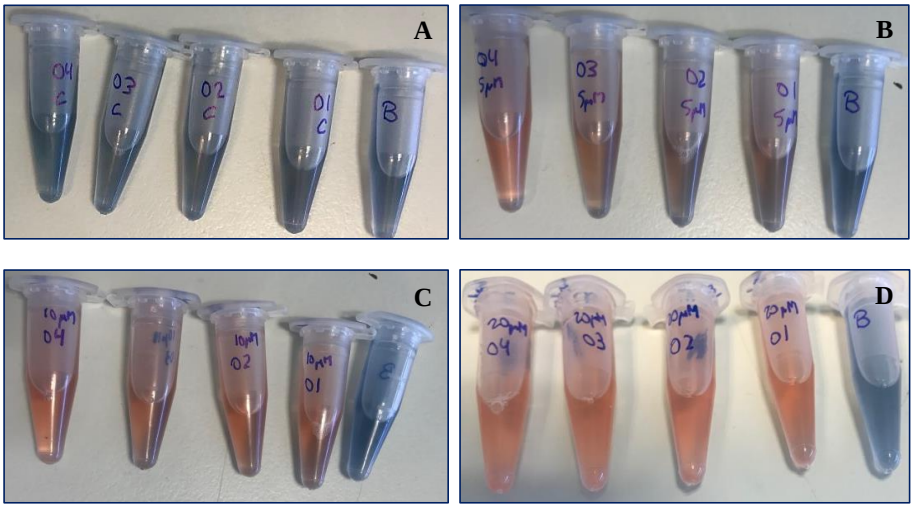


Figura 40. Prueba de CAS líquido de producción de sideróforos por los cuatro aislados representativos de *T. maritimum*. A: Controles positivos con $Fe_2(SO_4)_3$ de los cuatro aislados representativos de los cuatro serotipos de *T. maritimum*. B: Crecimiento de los cuatro aislados con 5 µM de EDDA (en rojo), y control negativo (azul). C: Crecimiento de los cuatro aislados con 10 µM de EDDA (en rojo), y control negativo (azul). D: Crecimiento de los cuatro aislados con 20 µM de EDDA (en rojo), y control negativo (azul).

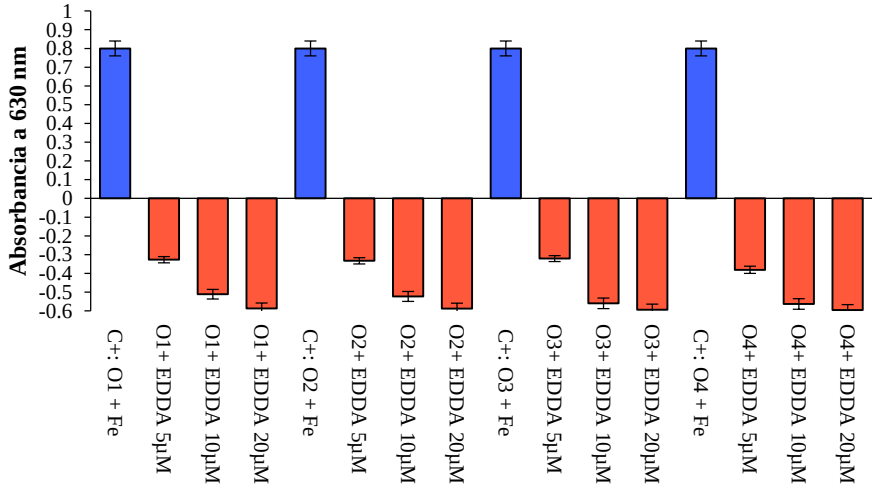


Figura 41. Valores de absorbancia del ensayo de CAS en medio líquido de la producción de sideróforos para los cuatro aislados representativos de los cuatro serotipos de *T. maritimum*. C+ (azul): CM9 líquido con el aislado correspondiente, más $Fe_2(SO_4)_3$. En rojo: Aislados de los cuatro serotipos con las distintas concentraciones de EDDA empleadas en este estudio.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2.3.2 Identificación y detección de genes implicados en la biosíntesis del sideróforo

En los genomas disponibles y previamente anotados mediante los programas de anotación RAST y PATRIC, se procedió a la identificación *in silico* de genes candidatos a codificar funciones implicadas en la biosíntesis del sideróforo producido por *T. maritimum* (Tabla 20). Así, se identificó el grupo de genes de biosíntesis de sideróforos para todos los aislados (Figura 41). Este clúster estaría compuesto por 6 ORFs (*Open Reading Frames*). La comparación de los genes de biosíntesis de *T. maritimum* con los genes de sideróforos previamente descritos en otras bacterias del género *Tenacibaculum* como es el caso de *T. mesophilum* (Fujita y col., 2018), mostró que guardaban alta similitud.

El clúster de genes de *T. maritimum* codificaría una lisina descarboxilasa (1509 pb, 502 aa) denominada L-2-4-diaminobutirato descarboxilasa (DABA-DC); una monooxigenasa de 1329 pb (443 aa); una permeasa de 873 pb (291 aa); una probable sintetasa (2418 pb, 806 aa); una acetiltransferasa (576 pb, 192 aa) fusionada con el gen anterior; mientras que el último gen codificaría una enzima homóloga a sintasas implicadas en la síntesis de desferrioxamina E (1821 pb, 607 aa). Debido a que el clúster de genes de biosíntesis presentaba los genes DABA-DC y un gen que parece codificar para la desferrioxamina E, el sideróforo producido por *T. maritimum* probablemente sea un hidroxamato estructuralmente relacionado con la desferrioxamina. Es importante destacar, que todas las cepas de *T. maritimum* secuenciadas presentaban el mismo clúster de genes de biosíntesis, por lo que este clúster de genes está muy conservado.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

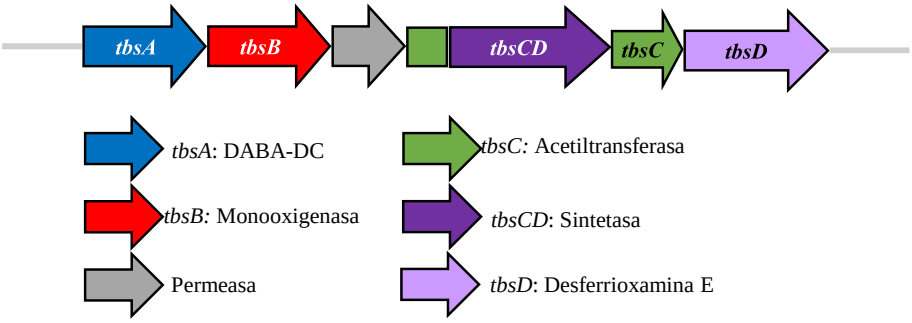


Figura 42. Clúster de genes de biosíntesis del sideróforo producido por *T. maritimum.*

Además, mediante la amplificación por PCR (Tablas 25 y 26) se demostró la presencia de todos estos genes en los 60 aislados de *T. maritimum* con distintos datos epidemiológicos (Tabla 22). Como resultado se obtuvo la amplificación de los genes en todas las cepas empleadas (Figura 42). La electroforesis mostró para todos los aislados una banda de 1509 pb correspondiente al gen que codifica para la DABA-DC, una banda de 1329 pb correspondiente al gen que codifica para la monooxigenasa, una banda de 576 pb para el gen de la acetiltranferasa, una banda de 1821 pb que se corresponde con el gen que codifica para la posible desferrioxamina E, y una banda de 2418 pb para el gen que codifica para la sintetasa (Figura 42).

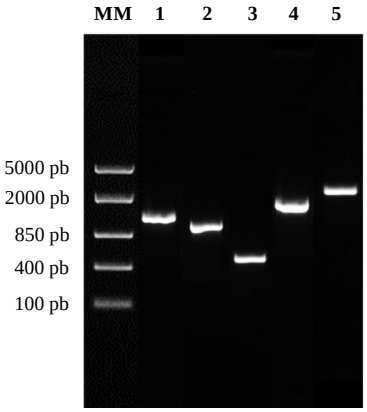


Figura 43. Electroforesis de los productos de amplificación de los genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum* correspondientes a la cepa SNW20.1. MM: Marcador molecular FastRuler Middle Range (Thermo Fisher Scientific Inc); 1: gen DABA-DC 2: monooxigenasa; 3: acetiltransferasa; 4: desferrioxamina E; 5: sintetasa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Finalmente, se seleccionaron los fragmentos amplificados de los cuatro genes de varias cepas para realizar una secuenciación Sanger. Una vez recibidas las secuencias, se procedió a su corrección mediante los programas SeqMan y EditSeq y a su alineamiento en MEGA v7. Se compararon todas las secuencias obtenidas para cada gen con las secuencias de los genes descritos para el clúster de genes de *T. mesophilum* (Fujita y col., 2018). Los porcentajes de similitud, de acuerdo con la secuencia aminoacídica correspondiente a cada gen de *T. mesophilum* fueron 75,30% para el gen de la DABA-DC, 80,09% para el gen de la monooxigenasa, 69,35 para el gen que codifica para la acetiltransferasa, un 78,01% para el gen que codificaba para la sintetasa, y un 74,45% para el gen que codifica para la desferrioxamina E. Estos resultados ponen de manifiesto que el clúster de genes de *T. maritimum* parece ser muy similar al de *T. mesophilum.*

5.2.3.3 Determinación de la estructura química del sideróforo

Una vez analizado el clúster de genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum*, se obtuvieron sobrenadantes libres de células y ricos en sideróforos que se analizaron por técnicas cromatográficas, con el objetivo de determinar la estructura química del mismo. Estos trabajos fueron realizados en colaboración con el grupo de Química Orgánica del profesor Carlos Jiménez de la Universidad de A Coruña.

El estudio por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a detección por espectrometría de masas de alta resolución (HRMS, del inglés *High Resolution Mass Spectroscopy*) de la fracción en el sobrenadante quelatado con Galio (Ga), mostró la presencia de seis compuestos que contienen dicho metal en su estructura (Tabla 27). A partir del aducto $[M + H]^+$ se calcularon las fórmulas moleculares de los compuestos y se compararon con los sideróforos hidroxámicos reportados previamente. Los resultados mostraron la presencia del sideróforo desferrioxamina D1 quelatado con Ga(III) a través del ión $[M + H]^+$ m/z 669.2727, correspondiente a la fórmula molecular $C_{27}H_{48}O_9N_6Ga$ (calculada para $C_{27}H_{48}O_9N_6Ga$ m/z 669.2738, Δ 1 ppm), mientras que el resto de los compuestos no se encontraron en la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

bibliografía (Figura 43). Los resultados obtenidos sugieren que dichos compuestos pertenecen a la misma familia y por tanto son análogos de desferrioxamina D1. Actualmente, los esfuerzos están centrados en la purificación de los compuestos mediante HPLC para su caracterización mediante técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

Tabla 27. Sideróforos identificados en los sobrenadantes de *T. maritimum* de la cepa LSP9.1

Masa	[M + H]+		Fórmula molecular	Masa teórica	Δmass (ppm)
	Ga69	Ga71			
570	570.2047	572.2029	$C_{22}H_{39}O_8N_5Ga$	570.2054	0.7
582	582.2041	584.2031	$C_{23}H_{39}O_8N_5Ga$	582.2054	1.3
584	584.2192	586.2181	$C_{23}H_{41}O_8N_5Ga$	584.2210	1.8
608	608.2195	610-2185	$C_{25}H_{41}O_8N_5Ga$	608.2210	1.5
610	610.2355	612.2342	$C_{25}H_{43}O_8N_5Ga$	610.2367	1.3
669	669.2727	671.2720	$C_{27}H_{48}O_9N_6Ga$	669.2738	1.1

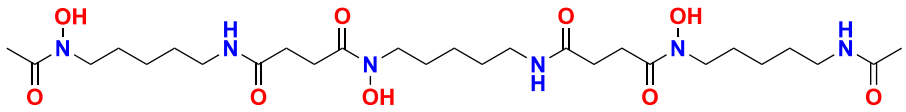


Figura 44. Estructura química de la desferrioxamina D1 propuesta como uno de los posibles sideróforos producidos por *T. maritimum*.

5.3 DISCUSIÓN

Este capítulo constituye el estudio preliminar de algunos de los distintos mecanismos de virulencia de *T. maritimum*. Se han estudiado por un lado las diferencias existentes entre los distintos LPS de la bacteria, las enzimas de degradación de tejido del hospedador y la producción de sideróforos.

Las posibles diferencias entre los LPS de los diferentes aislados de *T. maritimum* pertenecientes a distintos serotipos no se pudieron

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

detectar mediante electroforesis SDS-PAGE con tinción de plata (Hitchcock y Brown, 1983). Esta técnica no produjo un patrón claro de bandas para los aislados de *T. maritimum*, pero si para el control positivo con *E. tarda*. Esto podría ser debido a que, aunque todas las cepas fueron digeridas con proteinasa K, algunas proteínas de *T. maritimum* resisten la acción de esta enzima (Sørensen y col., 1992; Van Gelderen y col., 2010a) y podrían estar enmascarando las bandas de los perfiles del LPS.

Por otro lado, los análisis de los perfiles del LPS de los diferentes aislados de *T. maritimum* analizados mediante la técnica de Western blot revelaron heterogeneidad a nivel antigénico. Estos aislados presentaban cuatro perfiles distintos de LPS, que coincidían con los cuatro serotipos descritos para esta especie bacteriana. Estas diferencias se pueden atribuir a la parte del antígeno O del LPS de *T. maritimum*, el cual parece variar de un serotipo a otro. Aunque los primeros indicios apuntaban a que *T. maritimum* era un patógeno antigénicamente homogéneo (Wakabayashi y col., 1986), posteriormente se demostró mediante el análisis por Western blot del LPS y dot blot (Baxa y col., 1988; Pazos, 1997; Ostland y col., 1999; Avendaño-Herrera y col., 2004a; 2005a; Van Gelderen y col., 2010a) la existencia de cuatro serotipos distintos. Los hallazgos resultantes del presente estudio apoyan la evidencia de que *T. maritimum* es una bacteria antigénicamente heterogénea, con un LPS que presenta pequeñas variaciones a nivel de la fracción que representa el antígeno O.

En cuanto a la organización genética del antígeno O, mediante los análisis realizados en el presente estudio se pudo localizar el clúster de genes que codifican para el antígeno O en todos los aislados analizados. De acuerdo con los genes encontrados para la síntesis de dTDP-L-ramnosa (Samuel y Reeves, 2003; Wagstaff y col., 2021), todos los antígenos O del LPS de *T. maritimum*, independientemente del serotipo, parecen estar constituidos por este azúcar. El otro azúcar que parece formar parte del antígeno O del LPS de este patógeno podría ser la GDP manosa (Samuel y Reeves, 2003; Klein y Raina, 2019) o derivados del mismo. Es necesario destacar que el clúster de biosíntesis del antígeno O del serotipo O2 presentaba el gen de la

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

perosamina sintasa, un azúcar derivado de la GDP manosa que también está presente en el antígeno O de bacterias como *Vibrio cholerae* (Stroeher y col., 1995) y *Brucella melitensis* (Godfroid y col., 1998). Además, azúcares como el ácido siálico parece que podrían estar presentes en el antígeno O de las cepas de los serotipos O2 y O3, debido a que poseen el gen de la N-acetilneuraminato sintasa, tal y como ocurre en otras especies del género *Salmonella (*Bugla-Ploskońska y col., 2010).

Con respecto a las rutas de biosíntesis del antígeno O, sólo en el caso de las cepas del serotipo O4 se pudo localizar el gen de la flipasa del antígeno O (*wzx*), característico de la ruta de biosíntesis *wzx*/*xzy*, mediante la cual, las unidades de repetición de los distintos azúcares son transportados desde la membrana interna al espacio periplásmico por la flipasa (*wzx*) y unidos mediante la polimerasa (*wzy*) formando una cadena larga de polisacáridos, los cuales se unirán al lípido A mediante la ligasa *waaL* (Kalynych y col., 2014; Liu y col., 2020). Sin embargo, para los demás antígenos O (O1, O2 y O3), no ha sido posible la detección de los genes de su vía de ensamblaje. En lo que respecta a otras bacterias de la misma familia que *T. maritimum* (*Flavobacteriaceae*) se ha encontrado que *F. psychrophilum* presenta L-ramnosas en la estructura química del antígeno O (Cisar y col., 2019), y que posee los genes que codifican para la síntesis de L-ramnosa, al igual que ocurre en *T. maritimum* (Rochat y col., 2017; Cisar y col., 2019). Además, *F. psychrophilum* posee los genes *wzx* y *wxy*, por lo que el clúster de genes del antígeno O4 de *T. maritimum* podría ser similar al de las cepas de *F. psychrophilum.*

Con el objetivo de diferenciar entre cepas de diferentes serotipos de *T. maritimum* sería interesante desarrollar un protocolo de PCR multiplex similar al de *F. psychrophilum* propuesto por Rochat y col. (2017), como método rápido de diferenciación de los distintos serogrupos de *T. maritimum*. Esto supondría una ventaja frente a otras técnicas de serotipado como el dot blot, ya que, aunque siguen siendo eficaces, el tiempo empleado en esta metodología es mucho mayor que en la técnica de PCR.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El análisis de las enzimas de degradación de tejido del hospedador (condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa) confirmó que todos los aislados de *T. maritimum* presentaban los cuatro genes que codifican para las mismas, y, además, todas las cepas presentaron actividad *in vitro* para estas enzimas de degradación. Además, como se observó en las reconstrucciones filogenéticas con los fragmentos amplificados de cada gen, las cepas tienden a agruparse según el serotipo al que corresponden, de modo que los genes que codifican para el LPS (en concreto el antígeno O) y los genes de estas enzimas de degradación de tejido podrían estar relacionados de alguna manera, o compartir mecanismos de biosíntesis o transporte, entre otros.

En cuanto a la enzima condroitinasa, los resultados del presente estudio apoyan lo descrito por otros autores (Rahman y col., 2014; Pérez-Pascual y col., 2017a). Por otro lado, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral parecen indicar que esta enzima está presente únicamente en la especie *T. maritimum* dentro del género *Tenacibaculum* puesto que sólo se ha encontrado el gen (*cslA*) en este patógeno y, además, sólo éste produce actividad *in vitro* de tipo CSasa AC. Dentro de las bacterias marinas de la familia *Flavobacteriaceae*, se han localizado distintas condroitinasas (*cslA* y *cslB*) en *F. columnare* (Xie y col., 2005) cuya actividad es mucho mayor en las cepas virulentas (Kunttu y col., 2011). Sin embargo, la mutación de estos dos genes no afecta al proceso de infección en los peces (Li y col., 2015). Por tanto, esta enzima condroitinasa en *T. maritimum* puede ser en parte la responsable de los procesos de invasión, con el apoyo de otras enzimas de degradación de tejidos, y de la aparición de las úlceras en la piel de los peces características de la tenacibaculosis marina (Bernardet y col., 1990). Con el objetivo de conocer si la enzima condroitinasa es la principal responsable de las úlceras producidas en la piel y, por tanto, de la vía de invasión de *T. maritimum* al hospedador, sería necesario construir un mutante para la deleción de este gen. Con esto se comprobaría si la pérdida del gen lleva parejo la desaparición de las úlceras en la piel, una disminución las mismas, o incluso si se deja de producir una infección en el hospedador.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Con respecto a la enzima que codifica para el gen de la sialidasa (*siaA*), los resultados del presente análisis confirman lo descrito por Pérez-Pascual y col. (2017a), debido a que todos los aislados analizados en esta tesis doctoral presentan el gen *siaA*, que codifica para una exo-sialidasa, el cual se encuentra en una Isla Genómica (IG) que también contiene los genes *SusC*, *SusD*, *nanA*, *age* y *NanNT*, encargados de la utilización del ácido siálico por parte de *T. maritimum*. Además, al igual que ocurre con la condroitinasa, sólo *T. maritimum* presenta esta enzima dentro del género *Tenacibaculum*. Adicionalmente, este gen *siaA* parece realizar la misma función, pero de forma distinta al gen que codifica para la exo-sialidasa C (*siaC*) de la flavobacteria *F. canimorsus* (Mally y col., 2008) ya que la *siaA* de *T. maritimum* está expuesta en la superficie celular, y la *siaC* de *F. canimorsus* se encuentra en el espacio periplásmico. Esta sialidasa de *T. maritimum* podría utilizar los azúcares de las cadenas de glucanos de las glicoproteínas de la célula del hospedador como fuente de carbono, lo que ayudaría a la supervivencia del patógeno (Mally y col., 2008; Lewis y Lewis, 2012) y podría contribuir a la formación de biopelículas (Soong y col., 2006) debido a la detección de gran cantidad de ácido siálico en el mucus de los peces sometidos a un proceso de infección con *T. maritimum* (Guardiola y col., 2019).

De igual forma, los genes que codifican para las enzimas esfingomielinasa (*sph*) y ceramidasa apoyan los resultados revelados por Pérez-pascual y col. (2017a), presentando todos los aislados estudiados en esta tesis doctoral los genes que codifican para la esfingomielinasa C y para una ceramidasa neutra. Como la esfingomielinasa de *T. maritimum* comparte un péptido señal homólogo con *B. cereus* (Pérez-Pascual y col., 2017a), la cual es capaz de hidrolizar la esfingomielina de la membrana de los glóbulos rojos, lisándolos, la esfingomielinasa de *T. maritimum* podría tener también esta función (Oda y col., 2010) además de una función de desestabilización de las membranas plasmáticas de las células del hospedador (Li y col., 2019) y de inflamación debido al aumento de la ceramida (Xiang y col., 2021). Por otro lado, la ceramidasa de los aislados de *T. maritimum* también presenta un péptido señal y un dominio proteico homólogo al de *P. aeruginosa* (Pérez-Pascual y col.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2017a). Este hallazgo puede revelar un papel promotor de la hemólisis por parte de la ceramidasa de *T. maritimum*, ya que se ha visto que la proteína hómologa de *P. aeruginosa* promovía la acción de una fosfolipasa hemolítica en esta bacteria (Okino e Ito, 2007).

El análisis de clúster de genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum* realizado en esta tesis doctoral reveló que estaba formado por un clúster de 6 genes idénticos en todas las cepas estudiadas. Los genes de sideróforos de *T. maritimum* están estrechamente relacionados con los de la bacteria *T. mesophilum* (Fujita y col., 2013; 2018), especie que sintetizaría un sideróforo por la vía independiente de péptido-sintetasa no ribosómicas (NIS) de tipo hidroxamato basado en N-hidroxi-N-succinil cadaverina (HSC). El análisis de los genes sugiere que *T. maritimum* produciría un sideróforo hidroxamato de tipo HSC. Es importante destacar que el clúster de genes de síntesis de hidroxamatos basados en N-hidroxi-N-succinil diaminas (HSD) como los HSC, están formados por 4 genes y no 6, como ocurre en el caso del género *Tenacibaculum* y de otras bacterias como *S. coelicolor* (Kadi y col., 2007), o un metagenoma marino (Fujita y col., 2012). Sin embargo, en contraste con lo publicado por Fujita y col. (2018) para *T. mesophilum* en el cual el gen D da lugar a una bisucaberina B de tipo lineal, el gen *tsbD* para los aislados de *T. maritimum* del presente estudio codifican para una desferrioxamina E. Por tanto, aunque ambas bacterias presentan genes de biosíntesis homólogos, no producirían el mismo sideróforo.

El análisis químico de sobrenadantes de *T. maritimum* y la posterior identificación de sideróforo(s) presentes en estos sobrenadantes permitió identificar 6 compuestos cuya masa molecular concuerda con sideróforos de estructura similar a la desferrioxamina. Por lo tanto, *T. maritimum* sintetizaría 6 formas o variantes diferentes de su sideróforo relacionadas con las desferrioxaminas propuestas por Jan y col. (2007) para una cepa de *Tenacibaculum sediminilitoris* (*T. sediminilitoris*) (Park y col., 2016) o para un aislado de *Tenacibaculum aiptasiae* (*T. aiptasiae*) (Igarashi y col., 2022). Uno de los sideróforos detectados tiene una masa que coincide con la desferrioxamina D1, el cual pertenece al grupo de los hidroxamatos de tipo HSC. Los resultados de esta presente tesis doctoral contradicen

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

los resultados descritos por Avendaño-Herrera y col. (2005b), que sugerían que el sideróforo producido por *T. maritimum* no era ni de tipo fenolato ni de tipo hidroxamato. El sideróforo descrito por Fujita y col. (2013; 2018) para la bacteria *T. mesophilum* también sería un hidroxamato de tipo bisucaberina (bisucaberina B de tipo lineal) y no una desferrioxamina, como parece ser el sideróforo de la presente tesis doctoral, al igual que las tenacibactinas descritas por Jan y col. (2007) e Igarashi y col. (2022). La propuesta de estructura química para el sideróforo de *T. maritimum* resultante de esta tesis doctoral, concuerda con las distintas estructuras químicas propuestas para los sideróforos de bacterias del género *Tenacibaculum*, siendo todos ellos de tipo hidroxamato basados en HSD, concretamente en HSC, pudiendo ser de tipo desferrioxamina (*T. maritimum, T. sediminilitoris y T. aiptasiae*), o bisucaberina (*T. mesophilum*).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. CONSIDERACIONES FINALES

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

6. CONSIDERACIONES FINALES:

Tenacibaculum maritimum es el patógeno marino causante de la tenacibaculosis marina y la estomatitis bacteriana, enfermedades que provocan cuantiosas pérdidas económicas en la producción de especies cultivadas de alto valor comercial en distintas zonas geográficas del mundo (Frelier y col., 1994; Ostland y col., 1999; Toranzo y col., 2005; Avendaño-Herrera y col., 2006a; Frisch y col., 2018a; 2018b). Para poder prevenir y controlar estas dos enfermedades causadas por *T. maritimum* es necesario disponer de un amplio conocimiento de dicho patógeno. La presente tesis doctoral pretende ampliar el conocimiento de la especie *T. maritimum* con el fin de implementar los métodos de diagnóstico de la enfermedad, estudiar la estructura y la evolución de la población y el análisis de posibles factores de virulencia con el propósito de profundizar en los mecanismos de entrada al hospedador por parte de este patógeno.

Los análisis serológicos de las diferentes cepas de *T. maritimum* realizados en la presente tesis doctoral mediante la técnica de dot-blot revelaron que existe una alta heterogeneidad entre los distintos aislados pertenecientes a distintos hospedadores, revelando la presencia de los cuatro serotipos descritos para esta especie bacteriana (Pazos, 1997; Avendaño-Herrera y col. (2004a; 2005a). Sin embargo, el presente trabajo demuestra que en los últimos años se han aislado un número cepas considerable pertenecientes al serotipo O4, no descrito pero nombrado por algunos autores (Pazos, 1997; Piñeiro-Vidal, 2008; Fernández-Álvarez y col., 2018a). El hecho de que el serotipo O1 en mayor grado, y los serotipos O2 y O3 en menor grado hayan ido disminuyendo en favor de un nuevo serotipo (O4), puede justificarse por el uso de vacunas y autovacunas contra la tenacibaculosis en las instalaciones pesqueras. Además, los resultados han demostrado la coexistencia de aislados de distintos serotipos en peces de la misma especie y en la misma piscifactoría.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En esta tesis doctoral, las técnicas empleadas para la caracterización molecular fueron la REP-PCR, la RAPD-PCR y la ERIC-PCR. Todos los aislados analizados en este trabajo fueron tipificables mediante las tres técnicas produciéndose patrones de bandas o perfiles genéticos variables en mayor o menor medida, fácilmente interpretables y característicos del patógeno *T. maritimum*, por lo que resultan métodos de tipificación óptimos para la clasificación de esta bacteria. Las técnicas de RAPD-PCR y REP-PCR ponen de manifiesto la variabilidad genética intraespecífica de los aislados de *T. maritimum* (Avendaño-Herrera y col. 2004c; Fernández-Álvarez y col., 2018a) y, aunque existe una correlación entre algunos de los perfiles RAPD y REP generados y las variables epidemiológicas de hospedador y serotipo, sería necesario ampliar el número de aislados de distintas procedencias y grupo serológico para comprobar si estas dos técnicas son válidas para la clasificación de los aislados de *T. maritimum* en base a estas dos variables. Por otro lado, los resultados obtenidos con la técnica de ERIC-PCR muestran perfiles de amplificación muy parecidos entre sí, como también apuntaron Fernández-Álvarez y col. (2018a), por lo que *T. maritimum* es tipificable mediante la técnica de ERIC-PCR, pero dicha técnica no sería la adecuada a la hora de clasificar epidemiológicamente los distintos aislados de esta bacteria. También es importante resaltar el hecho de que cepas con distintos orígenes geográficos, presentan los mismos perfiles, independientemente del análisis realizado (REP, RAPD o ERIC-PCR), hecho que parece indicar que en una misma zona geográfica existen a su vez distintos perfiles genéticos (Sachdeva y Virdi, 2004; Fernández-Álvarez y col., 2018a) posiblemente debido a la diseminación de *T. maritimum* (Brinkmeyer, 2016; Frisch y col., 2017; Brosnahan y col., 2019) entre países derivada del comercio internacional de peces reproductores, introducción de peces importados u otras actividades humanas como el agua de lastre de los barcos (Georgiades y col., 2021) o por actividades agrícolas (Nekouei y col., 2018).

En cuanto a la caracterización quimiotaxonómica de *T. maritimum*, los cuatro ácidos grasos más abundantes descritos en este trabajo para esta especie bacteriana coinciden con los cuatro ácidos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

grasos más abundantes del estudio de Piñeiro-Vidal y col. (2008), aunque en distinto orden de abundancia. Sin embargo, contrariamente a lo descrito por Piñeiro-Vidal y col. (2008), no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a la abundancia de los distintos ácidos grasos entre cepas de los serotipos O1, O2 y O3, ni con distinto origen de aislamiento, por lo que ninguno de estos ácidos grasos se podría utilizar como marcador quimiotaxonómico a la hora de clasificar los aislados según las distintas variables epidemiológicas dentro de esta especie bacteriana. Solamente el aislado de serotipo O4 analizado presenta un perfil único y diferente de ácidos grasos, el cual podría ser específico de este serotipo. Sin embargo, sería necesario el análisis quimiotaxonómico de más aislados pertenecientes a este serotipo.

La evaluación de la diversidad y las relaciones evolutivas entre los miembros de una población bacteriana mediante la técnica MLST ha permitido comprobar que la diversidad genética de este patógeno es moderada (Habib y col., 2014; Bridel y col., 2020), resultados que coinciden con bacterias de la misma familia *Flavobacteriaceae* como *Flavobacterium psychrophilum* (Nicolas y col., 2008; Duchaud y col., 2018) y *Flavobacterium columnare* (Ashrafi y col., 2015), revelando así a *T. maritimum* como una especie cohesiva (Vos y Didelot, 2009). En contraste con anteriores estudios de MLST realizados con el patógeno *T. maritimum* (Habib y col., 2014; Bridel y col., 2020) los resultados de la presente tesis doctoral revelan la existencia de un posible papel del comercio internacional de peces reproductores en la propagación de *T. maritimum* o por otras actividades humanas como la contaminación debida al agua de lastre de los barcos o actividades agrícolas (Brinkmeyer, 2016; Frisch y col., 2017; Nekouei y col., 2018; Brosnahan y col., 2019; Georgiades y col., 2021). Aunque el análisis MLST realizado en este estudio no ha permitido establecer relaciones entre cepas por origen geográfico o especie hospedadora, los aislados pertenecientes al mismo serotipo tienden a agruparse y a compartir el mismo ancestro genético, sugiriendo que algunos cambios en las secuencias de los genes utilizados podrían estar relacionadas con el serotipo de los aislados. Por otro lado, el número de eventos mutacionales fue mayor que el número de eventos de

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

recombinación y la influencia de la mutación fue más importante que la influencia de la recombinación para la evolución y divergencia de *T. maritimum* resultados que contrastan con los descritos por Habib y col. (2014) y Bridel y col. (2020). De acuerdo con la historia demográfica de la población para todas las cepas, los resultados revelaron que la población se encontraría en expansión (Ramos-Onsins y Rozas, 2002). Los resultados obtenidos para las cepas de la Península Ibérica (PI) fueron muy similares a los resultados obtenidos para toda la población, lo que confirma la baja diversidad genética de la especie, la gran importancia de la mutación en la diversificación y la cohesión de *T. maritimum*. En resumen, los bajos valores de recombinación obtenidos en los diferentes métodos empleados explicaron la baja diversidad genética de *T. maritimum*, tanto para las cepas de la PI como para el conjunto de la población. Por lo tanto, en esta tesis doctoral se sugiere una estructura de población epidémica para *T. maritimum* donde existe un nivel de basal de recombinación frecuente con expansión clonal consecutiva de algunos aislados. Esta estructura de población ha sido propuesta también para otras especies bacterianas de la misma familia como *F. psychrophilum* (Nilsen y col., 2014) y *F. columnare* (Ashrafi y col., 2015).

Para que *T. maritimum* produzca la enfermedad, es necesaria la invasión del hospedador mediante distintos mecanismos de virulencia. El análisis de los perfiles del LPS de los diferentes aislados pertenecientes a los distintos serotipos, apoyan la evidencia de que *T. maritimum* es una bacteria antigénicamente heterogénea, presentando cuatro perfiles distintos de LPS con pequeñas variaciones a nivel de la fracción que representa el antígeno O, los cuales coinciden con los cuatro serotipos descritos para esta especie bacteriana (Avendaño-Herrera y col., 2004a; 2005a; Van Gelderen y col., 2010a). En cuanto a la organización genética del antígeno O, mediante los análisis realizados en el presente estudio se pudo localizar el clúster de genes que codifican para el antígeno O en todos los aislados analizados, entre los que se encontraban los genes necesarios para la síntesis de los azúcares manosa y ramnosa (Klein y Raina, 2019; Wagstaff y col., 2021). Además, se encontraron genes únicos para los distintos serotipos, como la perosamina sintasa, gen exclusivo del antígeno O

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

del serotipo O2, el gen de la N-acetilneuraminato sintasa, único de los serotipos O2 y O3, y el gen de la flipasa del antígeno O, característico del serotipo O4. Sin embargo, es importante mencionar que, independientemente del serotipo al que pertenezcan las cepas, todas fueron obtenidas a partir de brotes de la enfermedad, lo cual pone de manifiesto la patogenicidad de la especie.

El análisis de las enzimas de degradación de tejido del hospedador (condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa) confirmó que todos los aislados de *T. maritimum* presentan los cuatro genes que codifican para las mismas, y, además, todas las cepas presentaron actividad *in vitro* para estas enzimas de degradación. Además, como se observó en las reconstrucciones filogenéticas con los fragmentos amplificados de cada gen, los aislados tienden a agruparse según el serotipo al que corresponden, de modo que los genes para el antígeno O del LPS y los genes de estas enzimas de degradación de tejido podrían estar relacionados de alguna manera, o compartir mecanismos de biosíntesis o transporte, entre otros. En cuanto a la enzima condroitinasa, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral parecen indicar que esta enzima está presente únicamente en la especie *T. maritimum* dentro del género *Tenacibaculum* debido a la presencia exclusiva del gen *cslA* en este patógeno y su consecuente actividad *in vitro* de tipo CSasa AC. Por tanto, esta enzima condroitinasa en *T. maritimum* puede ser en parte la responsable de los procesos de invasión, con el apoyo de otras enzimas de degradación de tejidos, y de la aparición de las úlceras en la piel de los peces, características de la tenacibaculosis marina (Bernardet y col., 1990). Con respecto a la enzima que codifica para el gen de la sialidasa (*siaA*), los resultados del presente análisis confirman que todos los aislados analizados en esta tesis doctoral presentan el gen *siaA,* que codifica para una exo-sialidasa y, al igual que ocurre con la condroitinasa, sólo *T. maritimum* presenta esta enzima dentro del género *Tenacibaculum*. Esta sialidasa de *T. maritimum* podría utilizar los azúcares de las cadenas de glucanos de las glicoproteínas de la célula del hospedador como fuente de carbono, debido a su similitud con la sialidasa de *F. canimorsus* (Mally y col., 2008) y contribuir a la formación de biopelículas en vista de la gran cantidad de ácido siálico

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

en el mucus de los peces sometidos a un proceso de infección con *T. maritimum* (Guardiola y col., 2019). Además, *T. maritimum* codifica para una esfingomielinasa C y una ceramidasa neutra las cuales podrían desempeñar un papel importante en la hemólisis de los glóbulos rojos debido a su homología con los esfingomielinasa de *B. cereus* (Oda y col., 2010) y con la ceramidasa de *P. aeruginosa* (Okino e Ito, 2007).

El análisis de clúster de genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum* realizado en esta tesis doctoral reveló que estaba formado por un clúster de 6 genes idénticos en todas las cepas estudiadas, el cuál presenta una construcción genética similar a la de *T. mesophilum*, para la síntesis de hidroxamatos basados en N-hidroxi-N-succinil cadaverina (HSC) mediada por la vía independiente de péptido-sintetasas no ribosómicas (NIS) (Fujita y col., 2018). Sin embargo, el gen *tsbD* para los aislados de *T. maritimum* del presente estudio parece que codifican para una desferrioxamina E. Por tanto, aunque ambas bacterias presentan genes de biosíntesis homólogos, no producirían el mismo sideróforo.

El análisis de la estructura química del sideróforo muestra que *T. maritimum* sintetizaría 6 formas o variantes diferentes de su sideróforo relacionadas con las desferrioxaminas. Uno de los sideróforos detectados coincide con la desferrioxamina D1, el cual pertenece al grupo de los hidroxamatos de tipo HSC. Por tanto, la propuesta de estructura química para el sideróforo de *T. maritimum* resultante de esta tesis doctoral, concuerda con las distintas estructuras químicas propuestas para los sideróforos de bacterias del género *Tenacibaculum*, siendo todos ellos de tipo hidroxamato basados en HSD, concretamente en HSC, pudiendo ser de tipo desferrioxamina (*T. maritimum, T. sediminilitoris y T. aiptasiae*), o bisucaberina (*T. mesophilum*).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7. CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos a lo largo del trabajo realizado y presentado en los distintos capítulos de esta tesis doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. En cuanto a la caracterización serológica, molecular y quimiotaxonómica:

a) *T. maritimum* presenta una alta heterogeneidad a nivel antigénico, con una coexistencia de aislados de distintos serotipos en peces de la misma especie y en la misma piscifactoría. Se pone de manifiesto también un desplazamiento del serotipo O1 en favor del serotipo O4.

b) *T. maritimum* es tipificable mediante las técnicas de REP, RAPD y ERIC-PCR y, a excepción de la ERIC-PCR, son herramientas útiles a la hora de determinar la variabilidad genética intraespecífica de la especie.

c) A excepción del aislado perteneciente al serotipo O4, las cepas pertenecientes a los serotipos O1, O2 y O3 presentan un perfil homogéneo de ácidos grasos no resultando útil esta metodología de análisis para la identificación de los diferentes serotipos descritos en la especie.

2. En cuanto a la estructura y evolución de la población:

a) Se sugiere una estructura de población epidémica para *T. maritimum* donde existe un nivel de basal de recombinación frecuente con expansión clonal consecutiva de algunos aislados, en los que la mutación presenta un mayor grado de implicación en la diversificación.

b) La baja diversidad genética revela a *T. maritimum* como una especie cohesionada, en la que los ancestros genéticos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

detectados parecen estar correlacionados con los cuatro serotipos de este patógeno.

c) Existe una estrecha relación entre aislamientos de diferentes países, lo que revela un posible papel del comercio internacional de reproductores u otras actividades en la propagación de este patógeno.

3. En cuanto a la búsqueda de factores de virulencia:

a) El antígeno O de *T. maritimum* presenta pequeñas variaciones a nivel genético correspondientes con los cuatro serotipos descritos para esta especie bacteriana. Se ha localizado el clúster de genes que codifican para el antígeno O del LPS, entre los que se encontraban los genes necesarios para la síntesis de manosa y ramnosa. Además, se han encontrado genes únicos para los distintos serotipos los cuales podrían ser útiles como herramienta de serotipado.

b) Todos los aislados presentan los cuatro genes que codifican para las enzimas de degradación de tejido (condroitinasa, sialidasa, esfingomielinasa y ceramidasa) y presentan su correspondiente actividad *in vitro*, y las reconstrucciones filogenéticas con dichos genes agrupan a los aislados de los distintos serotipos. Por tanto, los genes para el antígeno O del LPS y los genes de estas enzimas de degradación de tejido podrían estar relacionados de alguna manera. Además, los genes de la condroitinasa y la sialidasa parecen ser únicos para *T. maritimum*, dentro de su género.

c) El clúster de genes de biosíntesis del sideróforo de *T. maritimum* está formado por un clúster de 6 genes idénticos para todas las cepas estudiadas y codifica para la síntesis de hidroxamatos basados en N-hidroxi-N-succinil cadaverina (HSC) mediada por la vía independiente de péptido-sintetasas no ribosómicas (NIS). El análisis de la estructura química muestra que *T. maritimum* sintetizaría 6 formas o variantes diferentes de su sideróforo relacionadas con las desferrioxaminas entre las que se ha encontrado la desferrioxamina D1.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8. BIBLIOGRAFÍA

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. BIBLIOGRAFÍA

Abd El-Galil, M.A.A. y Hashiem, M. (2011). Tenacibaculosis in Picasso triggerfish (*Rhinecanthus assasi*) and black damselfish (*Neoglyphieodon meles)* of Red Sea at Hurghada, Egypt. *Life Sci. J.* 8: 1166-1171.

Abd El-Galil, M.A.A. y Hashiem, M. (2012). Epidemiological and bacteriological studies on tenacibaculosis in some Red Sea fishes, Egypt. *IJESE* 3: 25-32.

Alexander, C. y Rietschel, E.T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endotoxin Res*. 7: 167-202.

Alsina, M. y Blanch, A.R. (1993). First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*. 13: 157-160.

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.

Apablaza, P., Frisch, K., Brevik, Ø. J., Småge, S. B., Vallestad, C., Duesund, H., Mendoza, J. y Nylund, A. (2017). Primary Isolation and Characterization of *Tenacibaculum maritimum* from Chilean Atlantic Salmon Mortalities Associated with a *Pseudochattonella* spp. Algal Bloom. *J. Aquat. Anim. Health* 29: 143-149.

APROMAR (2019). La acuicultura en España. Informe realizado por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR): www.apromar.es.

Aquilini, E. (2012). Lipopolysaccharide (LPS) core biosynthesis in *Proteus mirabilis*. Universitat de Barcelona, Barcelona, España.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Arenas, J., Mata, M. y Santos, Y. (2003). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for serological typing of *Tenacibaculum maritimum* 11th International Conference of the EAFP P-171

Arima, K., Fujita, H., Toita, R., Imazu-Okada, A., Tsutsumishita-Nakai, N., Takeda, N., Nakao, Y., Wang, H., Kawano, M., Matsushita, K., Tanaka, H., Morimoto, S., Nakamura, A., Kitagaki, M., Hieda, Y., Hatto, R., Watanabe, A., Yumura, T., Okuhara, T., Hayashi, H., Shimizu, K., Nakayama, K., Masuda, S., Ishihara, Y., Yoshioka, S., Yoshioka, S., Shirade, S. y Tamura, J. (2013). Amounts and compositional analysis of glycosaminoglycans in the tissue of fish. *Carbohydr. Res.* 366: 25-32.

Arnow, L. E. (1937). Colorimetric determination of the components of 3,4-dihydroxy-phenylalanine-tyrosine mixture. *J. Biol. Chem.* 118: 531–541.

Ashrafi, R., Pulkkinen, K., Sundberg, L., Pekkala, N. y Ketola T. (2015). A multilocus sequence analysis scheme for characterization of *Flavobacterium columnare* isolates. *BMC Microbiol*. 15: 243.

Austin, B. y Austin, D.A. (2016). *Bacterial Fish Pathogens: Disease of Farmed and Wild Fish*. 6ª Ed. Springer International Publishing. Nueva York. EE. UU.

Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., López-Romalde, S., Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (2004a). Phenotyphic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Dis. Aquat. Org*. 58: 1-8.

Avendaño-Herrera, R., Núñez, S., Magariños, B. y Toranzo, A.E. (2004b). A non-destructive method for rapid detection of *Tenacibaculum maritimum* in farmed fish using nested PCR amplification. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 24: 280-286

Avendaño-Herrera, R., Rodríguez, J., Magariños, B., Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (2004c). Intraspecific diversity of the marine fish

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

pathogen *Tenacibaculum maritimum* as determined by randomly amplified polymorphic DNA-PCR. *J. Appl. Microbiol.* 96: 871-877.

Avendaño-Herrera, R. (2005). Avances en el conocimiento del patógeno de peces *Tenacibaculum maritimum*: implicaciones en el diagnóstico y prevención de la enfermedad. Tesis doctoral. Universidade de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.

Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Moriñigo, M.A., Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (2005a). A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 25: 70-74.

Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E., Romalde, J.L., Lemos, M.L. y Magariños, B. (2005b). Iron uptake mechanisms in the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6947-6953.

Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Núñez, S., Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (2005c). Recommendation of an appropriate medium for in vitro drug susceptibility testing of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 49: 82-87.

Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E. y Magariños, B. (2006a). Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Dis. Aquat. Org.* 71: 255-266.

Avendaño-Herrera, R., Toranzo, A.E. y Magariños, B. (2006b). A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *J. Fish Dis*. 29: 371-374.

Avendaño-Herrera, R., Irgang, R., Magariños, B., Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (2006c). Use of microcosms to determine the survival of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* in seawater. *Environ. Microbiol*. 8: 921-928.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Irgang, R. y Toranzo, A.E. (2006d). Use of hydrogen peroxide against the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* and its effect on infected turbot (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture* 257: 104-110.

Avendaño-Herrera, R., Núñez, S., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (2008). Evolution of drug resistance and minimum inhibitory concentration to enrofloxacin in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated in fish farms. *Aquac. Int*. 16: 1-11.

Bandelt, H.J. y Dress, A.W.M. (1992). Split Decomposition: a new and useful approach to phylogenetic analysis of distance data. *Mol. Phylogen. Evol*. 1: 242-252.

Bandelt, H.J., Foster, P. y Rhöl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol*. 16: 37-48.

Bader, J.A. y Shotts, E.B. (1998). Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species- specific polymerase chain reaction primers to the 16S ribosomal RNA gene. J. *Aquat. Anim. Health* 10: 311-319.

Barbier, P., Rochat, T., Mohammed, H.H., Wiens, G.D., Bernardet, J.F., Halpern, D., Duchaud, E. y McBride, M.J. (2020). The Type IX Secretion System Is Required for Virulence of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 86: e00799-20.

Bardon-Albaret, A., Vidal-Dupiol, J., Maamaatuaiahutapu, M., David, R., Lau, C., Magré, K., Sicard, J., Belliard, C., Levy, P., Piquemal, D. y Saulnier, D. (2016). Investigations on predictive biomarkers of resistance to *Tenacibaculum maritimum* by transcriptome analysis of targeted tissues from juvenile batfish (*Platax orbicularis*). 4th International Symposium on Genomics in Aquaculture GIA 2016. Athens, Greece.

Barker, D.E., Braden, L.M., Coombs, M.P. y Boyce, B. (2009). Preliminary studies on the isolation of bacteria from sea lice,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Lepeophtheirus salmonis, infecting farmed salmon in British Columbia, Canada. *Parasitol. Res*. 105: 1173-1177.

Barona-Gomez, F., Wong, U., Giannakopulos, A.E., Derrick, P.J. y Challis, G.L. (2004). Identification of a cluster of genes that directs desferrioxamine biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* M145. *J. Am. Chem. Soc.* 126: 16282-16283.

Barry, S.M. y Challis, G.L. (2009). Recent advances in siderophore biosynthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13: 205-215.

Barton, N.H. (2000). Genetic hitchhiking. Philos. *Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355: 1553-1562.

Bateman, A.W., Schulze, A.D., Kaukinen, K.H., Tabata, A., Mordecai, G., Flynn, K., Bass, A., Di Cicco, E. y Miller, K. M. (2021). Descriptive multi-agent epidemiology via molecular screening on Atlantic salmon farms in the northeast Pacific Ocean. *Sci. Rep.* 11: 3466.

Baxa, D.V., Kawai, K. y Kusuda

, R. (1986). Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. *Fish Pathol*. 21: 251-258.

Baxa, D.V., Kawai, K. y Kusuda, R. (1987). Experimental infection of *Flexibacter maritimus* in black sea bream (*Acanthopagrus schlegeli*) fry. *Fish Pathol*. 22: 105-109.

Baxa, D.V., Kawai, K. y Kusada, R. (1988a). Chemotherapy of *Flexibacter maritimus* infection. *Rep. Usa. Mar. Biol. Inst. Kochi. Univ*. 10: 9-14.

Baxa, D.V., Kawai, K. y Kusada, R. (1988b). *In vitro* and *in vivo* activities of *Flexibacter maritimus* toxins. *Rep. Usa. Mar. Biol. Inst. Kochi. Univ*. 10: 1-8.

Baxa, D.V., Kawai, K. y Kusuda, R. (1988c). Detection of *Flexibacter maritimus* by fluorescent antibody technique in experimentally infected black sea bream fry. *Fish Pathol*. 23: 29-32.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Beaz-Hidalgo, R., López-Romalde, S., Toranzo, A.E. y Romalde, J.L. (2008). Polymerase chain reaction amplification of repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic sequences for molecular typing of *Pseudomonas anguilliseptica* and *Aeromonas salmonicida*. *J. Aquat. Anim. Health* 20: 75-85.

Bernardet, J.F. y Grimont, P.A. (1989). Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., nom. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 39: 346-354.

Bernardet, J.F., Campbell, A.C. y Buswell, J.A. (1990). *Flexibacter maritimus* is the agent of 'black patch necrosis' in Dover sole in Scotland. *Dis. Aquat. Org*. 8: 233-237.

Bernardet, J.F., Kerouault, B. y Michel, C. (1994). Comparative study on *Flexibacter maritimum* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. *Fish Pathol.* 29: 105-111.

Bernardet, J.F. (1998). *Cytophaga, Flavobacterium, Flexibacter* and *Chryseobacterium* infections in cultured marine fish. *Fish Pathol.* 33: 229-238.

Bodammer, J.E. (2000). Some new observations on the cytopathology of fin erosion disease in winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Dis. Aquat. Org*. 40: 51-65.

Bolger, A.M., Lohese, M. y Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30: 2114-2120.

Bolinches, J., Lemos, M. L., Fouz, B., Cambra, M., Larsen, J.L. y Toranzo, A.E. (1990). Serological relationships among *Vibrio anguillarum* strains. *J. Aquat. Anim. Health*. 1: 12-20.

Bridel, S., Bourgeon, F., Marie, A., Saulnier, D., Pasek, S., Nicolas, P., Bernardet, J.F. y Duchaud, E. (2020). Genetic diversity and population structure of *Tenacibaculum maritimum*, a serious bacterial pathogen of marine fish: from genome comparisons to high throughput MALDI-TOF typing. *Vet. Res.* 51: 60.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Brinkmeyer, R. (2016). Diversity of bacteria in ships ballast water as revealed by next generation DNA sequencing. *Mar. Pollut. Bull.* 107: 277-285.

Brosnahan, C.L., Munday, J.S., Ha, H.J., Preece, M. y Jones, J.B. (2019). New Zealand rickettsia-like organism (NZ-RLO) and *Tenacibaculum maritimum*: Distribution and phylogeny in farmed Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Fish Dis*. 42: 85-95.

Brown, A.D., Feldman, M.W. y Nevo, E. (1980). Multilocus structure of natural populations of *Hordeum spontaneum*. *Genetics* 96: 523-536.

Brynildsrud, O., Feil, E.J., Bohlin, J., Castillo-Ramirez, S., Colquhoun, D., McCarthy, U., Matejusova, I.M., Rhodes, L.D., Wiens, G.D. y Verner-Jeffreys, D.W. (2014). Microevolution of *Renibacterium salmoninarum*: evidence for intercontinental dissemination associated with fish movements. *ISME J.* 8: 746-756.

Bugla-Płoskońska, G., Rybka, J., Futoma-Kołoch, B., Cisowska, A., Gamian, A. y Doroszkiewicz, W. (2010). Sialic acid-containing lipopolysaccharides of *Salmonella* O48 strains--potential role in camouflage and susceptibility to the bactericidal effect of normal human serum. *Microb. Ecol*. 59: 601-613.

Buller, N.B. (2014). *Bacteria and fungi from fish and other aquatic animals: a practical identification manual*. Buller, N.B (ed). CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire.

Burchard, R.P., Rittschof, D. y Bonaventura, J. (1990). Adhesion and Motility of Gliding Bacteria on Substrata with Different Surface Free-Energies. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2529-2534.

Burchard, R.P., y Sorongon, M. L. (1998). A gliding bacterium strain inhibits adhesion and motility of another gliding bacterium strain in a marine biofilm. *Appl. Environ. Microbiol*. 64: 4079-4083.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Burrell, M., Hanfrey, C.C., Kinch, L.N., Elliott, K.A. y Michael, A.J. (2012). Evolution of a novel lysine decarboxylase in siderophore biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 86: 485-499.

Campbell, A.C. y Buswell, J.A. (1982). An investigation into the bacterial aetiology of 'black patch necrosis' in Dover sole, *Solea solea* L. *J. Fish Dis.* 5: 495-508.

Carson, J., McCosh, P. y Schmidtke, L. (1992). Pathogenicity of *Flexibacter maritimus* in Rainbow trout. SALTAS Research Review Seminar, Hobart, Australia, April 29th, 1992, pp: 89-99.

Carson, J., Schmidtke, L. y Lewis, T. (1993). Development of a vaccine against disease. Results of efficacy testing of three types of vaccine. En: *Barriers and Breakthroughs. Papers from the Saltas*. Research and Development Review Seminar, Hobart, Tasmania, pp: 149-158.

Castro, N., Magariños, B., Nuñez, S. y Toranzo, A.E. (2007). Reassessment of the *Tenacibaculum maritimum* serotypes causing mortalities in cultured marine fish. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*. 27: 229-233.

Castro, N., Toranzo, A.E., Bastardo, A., Barja, J.L. y Magariños, B. (2011). Intraspecific genetic variability of *Edwardsiella tarda* strains from cultured turbot. *Dis. Aquat. Org.* 95: 253-258.

Castro, N., Toranzo, A.E. y Magariños, B. (2014). A multiplex PCR for the simultaneous detection of *Tenacibaculum maritimum* and *Edwardsiella tarda* in aquaculture. *Int. Microbiol.* 17: 111-117.

Cavalcante, T., Medeiros, M.M., Mule, S.N., Palmisano, G. y Stolf, B.S. (2021). The Role of Sialic Acids in the Establishment of Infections by Pathogens, With Special Focus on *Leishmania*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11: 671913.

Cepeda, C. e Santos, Y. (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*. 22: 388-392.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cepeda, C., García-Márquez, S. e Santos, Y. (2003). Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. *J. Fish Dis.* 26: 65-70.

Challis, G.L. (2005). A widely distributed bacterial pathway for siderophore biosynthesis independent of nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem.* 6: 601-611.

Chapela, M.J., Ferreira, M., Ruiz-Cruz, A., Martin-Varela, I., Fernández-Casal, J. y Garrido-Maestu, A. (2018). Application of real-time PCR for early diagnosis of diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, and *Tenacibaculum maritimum* in turbot: A field study. *J. Appl. Aquac.* 30: 76-89.

Chen, M.F., Henry-Ford, D. y Groff, J.M. (1995). Isolation and characterization of *Flexibacter maritimus* from marine fishes of California. *J. Aquat. Anim. Health* 7: 318-326.

Cipriano, R.C., Pyle, J.B., Starliper, C.E. y Pyle, S.W. (1985). Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay. *J. Wildl. Dis.* 21: 211-218.

Cisar, J.O., Bush, C.A. y Wiens, G.D. (2019). Comparative Structural and Antigenic Characterization of Genetically Distinct *Flavobacterium psychrophilum O*-Polysaccharides. *Front. Microbiol.* 10: 1041.

Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C. y Hannun, Y.A. (2017). Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv. Biol. Regul.* 63: 122-131.

Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S.C. y Vinckx, T. (2011). Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* 3: 540-49.

Csaky, T.Z. (1948). On the estimation of bound hydroxylamine in biological materials. *Acta Chem. Scand.* 2: 450-454.

Dadar, M., Dhama, K., Vakharia, V.N., Hoseinifar, S.H., Karthik, K., Tiwari, R., Khandia, R., Munjal, A., Salgado-Miranda, C. y Joshi, S.K. (2017). Advances in aquaculture vaccines against

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

fish pathogens: global status and current trends. *Rev. Fish. Sci. Aquac.* 25: 184-217.

Declercq, A.M., Haesebrouck, F., Van den Broeck, W., Bossier, P. y Decostere, A. (2013). Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Vet. Res*. 44: 27-27.

De Cock, H., Brandenburg, K., Wiese, A., Holst, O. y Seydel, U. (1999). Non-lamellar structure and negative charges of lipopolysaccharides required for efficient folding of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 274: 5114-5119.

Delannoy, C.M.J., Houghton, J.D.R., Fleming, N.E.C. y Ferguson, H.W. (2011). Mauve Stingers (*Pelagia noctiluca*) as carriers of the bacterial fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Aquaculture* 311: 255-257.

De Lorenzo, V., Bindereif, A., Paw, B.H. y Neilands, J.B. (1986). Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 165: 570-578.

Devesa, S., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1989). Ulcerative skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L). *J. Fish Dis.* 12: 323-333.

Dice, L.R. (1945). Measures of amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.

Didelot, X. y Falush, D. (2007). Inference of bacterial microevolution using multilocus sequence data. *Genetics* 175: 1251-1266.

Didelot, X. (2010). Sequence based analysis of bacterial populations. En: *Bacterial population genetics in infectious diseases*. Robinson, D.A., Falusch, D., Feil, E.J. (eds).John Wiley & Sons. pp: 37-60.

Downes, J.K., Yatabe, T., Marcos-Lopez, M., Rodger, H.D., MacCarthy, E., O'Connor, I., Collins, E. y Ruane, N.M. (2018). Investigation of co-infections with pathogens associated with gill disease in Atlantic salmon during an amoebic gill disease outbreak. *J. Fish Dis.* 41: 1217-1227.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Duchaud, E., Rochat, T., Habib, C., Barbier, P., Loux, V., Guérin, C., Dalsgaard, I., Madsen, L., Nilsen, H., Sundell, K., Wiklund, T., Strepparava, N., Wahli, T., Caburlotto, G., Manfrin, A., Wiens, G.D., Fujiwara-Nagata, E., Avendaño-Herrera, R., Bernardet, J.F. y Nicolas, P. (2018). Genomic Diversity and Evolution of the Fish Pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Front. Microbiol.* 9: 138.

Eckroat, T.J., Greguske, C. y Hunnicutt, D.W. (2021). The Type 9 Secretion System Is Required for *Flavobacterium johnsoniae* Biofilm Formation. *Front. Microbiol.* 12: 660887.

Embregts, C.W. y Forlenza, M. (2016). Oral vaccination of fish: Lessons from humans and veterinary species. *Dev. Comp. Immunol.* 64: 118-137.

Emerson, D., Agulto, L., Liu, H. y Liu, L. (2008). Identifying and Characterizing Bacteria in an Era of Genomics and Proteomics. *BioScience* 58: 925-936.

Escribano, M.P., Ramos-Pinto, L., Fernández-Boo, S., Afonso, A., Costas, B. y Guardiola, F.A. (2020). Mucosal immune responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles after *Tenacibaculum maritimum* challenge: A comparative study between ocular and blind sides. *Fish Shellfish Immunol.* 104: 92-100.

Faílde, L.D., Losada, A.P., Bermúdez,R., Santos, Y. y Quiroga, M.I. (2013). *Tenacibaculum maritimum* infection: pathology and immunohistochemistry in experimentally challenged turbot (*Psetta maxima* L.). *Microb. Pathog*. 65: 82-88.

Faílde, L.D., Losada, A.P., Bermúdez, R., Santos, Y. y Quiroga, M.I. (2014). Evaluation of immune response in turbot (*Psetta maxima* L.) tenacibaculosis: haematological and immunohistochemical studies. *Microb. Pathog.* 76: 1-9.

Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using Multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J.K. (2007). Inference of population structure using Multilocus genotype data, dominant markers, and null alleles. *Mol. Ecol. Notes*. 7: 574-578.

FAO (2020). The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome.

Farris, J.S. (1970). Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool*. 19: 83-92.

Ferguson, H. W., Delannoy, C.M.J., Hay, S., Nicolson, J., Sutherland, D. y Crumlish, M. (2010). Jellyfish as vectors of bacterial disease for farmed salmon (*Salmo salar*). *J. Vet. Diagn. Invest*. 22: 376-382.

Fernández-Álvarez, C., Torres-Corral, Y., Saltos-Rosero, N., Santos, Y. (2017). MALDI-TOF mass spectrometry for rapid differentiation of *Tenacibaculum* species pathogenic for fish. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101: 5377-5390.

Fernández-Álvarez, C., Torres-Corral, Y., e Santos, Y. (2018a). Comparison of serological and molecular typing methods for epidemiological investigation of *Tenacibaculum* species pathogenic for fish. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 102: 2779-2789.

Fernández-Álvarez, C. y Santos, Y. (2018b). Identification and typing of fish pathogenic species of the genus *Tenacibaculum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102: 9973-9989.

Fernández-Álvarez, C., González, S.F. e Santos, Y. (2019). Quantitative PCR coupled with melting curve analysis for rapid detection and quantification of *Tenacibaculum maritimum* in fish and environmental samples. *Aquaculture* 498: 289-296.

Fernández-Cuenca, F., López-Cerero, L. y Pascual-Hernández, A. (2013). Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31: 20-25.

Flores-Díaz, M., Monturiol-Gross, L., Naylor, C., Alape-Girón, A. y Flieger, A. (2016). Bacterial Sphingomyelinases and

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Phospholipases as Virulence Factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80: 597-628.

Florio, D., Gridelli, S., Fioravanti, M.L. y Zanoni, R.G. (2016). First Isolation of *Tenacibaculum maritimum* in a captive Sand Tiger Shark (*Carcharias taurus*). *J. Zoo Wildl. Med*. 47: 351-353.

Frelier, P.F., Elston, R.A., Loy, J.K. y Mincher, C. (1994). Macroscopic and microscopic features of ulcerative stomatitis in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis. Aquat. Org*. 18: 227-231.

Fringuelli, E., Savage, P.D., Gordon, A., Baxter, E.J., Rodger, H.D. y Graham, D.A. (2012). Development of a quantitative real-time PCR for the detection of *Tenacibaculum maritimum* and its application to field samples. *J. Fish Dis*. 35: 579-590.

Frisch, K., Smage, S.B., Brevik, O.J., Duesund, H. y Nylund, A. (2017). Genotyping of *Tenacibaculum maritimum* isolates from farmed Atlantic salmon in Western Canada. *J. Fish Dis*. 41: 131-137.

Frisch, K., Smage, S.B., Vallestad, C., Duesund, H., Brevik, O.J., Klevan, A., Olsen, RH., Sjaatil, S.T., Gauthier, D., Brudeseth, B. y Nylund, A. (2018a). Experimental induction of mouthrot in Atlantic salmon smolts using *Tenacibaculum maritimum* from Western Canada. *J. Fish Dis*. 41: 1247-1258.

Frisch, K., Smage, S.B., Johansen, R., Duesund, H., Brevik, O.J. y Nylund, A. (2018b). Pathology of experimentally induced mouthrot caused by *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon smolts. *PLoS One* 13: e0206951.

Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

Fu, Y.X. y Li, W.H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.

Fujiwara-Nagata, E., Chantry-Darmon, C., Bernardet, J.F., Eguchi, M., Duchaud, E. y Nicolas, P. (2013). Population structure of

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* at whole-country and model river levels in Japan. *Vet. Res*. 44: 34.

Fujita, M.J., Kimura, N., Yokose, H. y Otsuka, M. (2012). Heterologous production of bisucaberin using a biosynthetic gene cluster cloned from a deep sea metagenome. *Mol. BioSyst.* 8: 482-485.

Fujita, M.J., Nakano, K y Sakai, R. (2013). Bisucaberin B, a linear hydroxamate class siderophore from the marine bacterium *Tenacibaculum mesophilum*. *Molecules* 18: 3917-3926.

Fujita, M.J., Goto, Y. y Sakai, R. (2018). Cloning of the Bisucaberin B Biosynthetic Gene Cluster from the Marine Bacterium *Tenacibaculum mesophilum*, and Heterologous Production of Bisucaberin B. *Mar. Drugs* 16: 342.

Garron, M.L. y Cygler, M. (2010). Structural and mechanistic classification of uronic acid-containing polysaccharide lyases. *Glycobiology* 20: 1547-1573.

Georgiades, E., Scianni, C., Davidson, I., Tamburri, M.N., First, M.R., Ruiz, G., Ellard, K., Deveney, M. y Kluza, D. (2021). The Role of Vessel Biofouling in the Translocation of Marine Pathogens: Management Considerations and Challenges. *Front. Mar. Sci.* 8: 660125.

Godfroid, F., Taminiau, B., Danese, I., Denoel, P., Tibor, A., Weynants, V., Cloeckaert, A., Godfroid, J. y Letesson, J.J. (1998). Identification of the perosamine synthetase gene of *Brucella melitensis* 16M and involvement of lipopolysaccharide O side chain in *Brucella* survival in mice and in macrophages. *Infect. Immun.* 66: 5485-5493.

Goñi, F.M. y Alonso, A. (2002). Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* 531: 38–46.

Gosink, J.J., Woese, C.R. y Staley, J.T. (1998) *Polaribacter* gen. nov., with three new species,*P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolated polar marine bacteria of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* group

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

and reclassification of '*Flectobacillus glomeratus*' as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 48: 223-235.

Grassmé, H. y Becker, K.A. (2013). Bacterial infections and ceramide. *Handb. Exp. Pharmacol.* 216: 305-320.

Guardiola, F.A., Mabrok, M., Machado, M., Azeredo, R., Afonso, A., Esteban, M.A. y Costas, B. (2019). Mucosal and systemic immune responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) bath challenged with *Tenacibaculum maritimum*: A time-course study. *Fish Shellfish Immunol.* 87: 744-754.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. y Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29: 1072-1075.

Habib, C., Houel, A., Lunazzi, A., Bernardet, J.F., Olsen, A.B., Nilsen, H., Toranzo, A.E., Castro, N., Nicolas, P. y Duchaud, E. (2014). Multilocus sequence analysis of the marine bacterial genus *Tenacibaculum* suggests parallel evolution of fish pathogenicity and endemic colonization of aquaculture systems. *Appl. Environ. Microbiol*. 80: 5503-5514.

Hahnke, R.L., Meier-Kolthoff, J.P., García-López, M., Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N.N., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Klenk, H.P. y Göker, M. (2016). Genome-Based Taxonomic Classification of *Bacteroidetes*. *Front. Microbiol.* 7: 2003.

Handlinger, J., Soltani, M. y Percival, S. (1997). The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species in Tasmania, Australia. *J. Fish Dis*. 20: 159-168.

Hasegawa M, Kishino H. y Yano T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA . *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.

Haubold, B. y Hudson, R.R. (2000). LIAN 3.0: detecting linkage disequilibrium in multilocus data. *Bioinformatics* 16: 847-848.

Heinrichs, D.E., Yethon, J. A. y Whitfield, C. (1998). Molecular basis for structural diversity in the core regions of the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol. Microbiol.* 30: 221-232.

Hikida, M., Wayabayashi, H., Egusa, S. y Masumura, K. (1979). *Flexibacter* sp., a gliding bacterium pathogenic to some marine fishes in Japan. *Bull. Jpn. Soc. Sci Fish* 45: 421-428.

Hitchcock, P.J. y Brown, T.M. (1983). Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silverstained polyacrilamide gels. *J. Bacteriol*. 154: 269-272.

Holmes, B. (1992) Synonymy of *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986 and *Cytophaga marina* Reichenbach 1989. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 42: 185.

Hubisz, M., Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J.K. (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol. Ecol. Resour*. 9: 1322-1332.

Hudson, R.R. y Kaplan, N.L. (1985). Statistical properties of the number of recombination events in the history of a sample of DNA sequences. *Genetics* 111: 147-164.

Hudson, R.R. (1990). Gene genealogies and the coalescent process. *Oxf. Surv. Evol. Biol*. 7: 1-44.

Hulton, C.S., Higgins, C.F. y Sharp, P.M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Mol. Microbiol*. 5: 825-834.

Huson, D.H. y Bryant, D. (2006). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol*. 23: 254-267.

Hutson, K.S. y Cain, K.D. (2019). Pathogens and parasites. En: *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants*. Lucas, J. S., Southgate, P. C. y Tucke, C. S. (eds.). John Wiley & Sons Ltd. pp: 217-47.

ICES. 2019. *Tenacibaculum maritimum*, causal agent of tenacibaculosis in marine fish. En: *Identification Leaflets for*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Diseases and Parasites of Fish and Shellfish, No. 70. Copenhagen, Denmark. 70. 5 p.

Igarashi, Y., Ge, Y., Zhou, T., Sharma, A.R., Harunari, E., Oku, N. y Trianto, A. (2022). Tenacibactins K–M, cytotoxic siderophores from a coral-associated gliding bacterium of the genus *Tenacibaculum*. *Beilstein J. Org. Chem.* 18: 110-119.

Jang, J.H., Kanoh, K., Adachi, K., Matsuda, S. y Shizuri, Y. (2007). Tenacibactins A-D, hydroxamate siderophores from a marine-derived bacterium, *Tenacibaculum* sp. A4K-17. *J. Nat. Prod.* 70: 563-566.

Jang, H.Y., Jeong, J.B., Yeo, I.K., Kim, K.Y., Harikrishnan, R. y Heo, M.S. (2009). Biological characterization of *Tenacibaculum maritimum* isolated from cultured olive flounder in Korea and sensitivity against native plant extracts. *J. Fish Pathol*. 22: 53-65.

Jolley, K.A., Bray, J.E. y Maiden, M.C.J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 3: 124.

Jukes, T.H. y Cantor, C.R. (1969). Evolution of protein molecules. En: *Mammalian Protein Metabolism*, Munro, H.N. (ed). Pp: 21-132, Academic Press, New York.

Kadi, N., Oves-Costales, D., Barona-Gomez, F. y Challis, G. L. (2007). A new family of ATP-dependent oligomerization-macrocyclization biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* 3: 652–656.

Kadi, N., Song, L. y Challis, G.L. (2008). Bisucaberin biosynthesis: an adenylating domain of the BibC multi-enzyme catalyzes cyclodimerization of N-hydroxy-N-succinylcadaverine. *Chem. Commun.* 41: 5119-5121.

Kalynych, S., Morona, R. y Cygler, M. (2014). Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. *FEMS Microbiol. Rev.* 38: 1048-1065.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Karlsen, C., Ottem, K.F., Brevik, Ø.J., Davey, M., Sørum, H. y Winther-Larsen, H.C. (2017). The environmental and host-associated bacterial microbiota of Arctic seawater-farmed Atlantic salmon with ulcerative disorders. *J. Fish Dis*. 40: 1645-1663.

Kent, M.L. (1992). Diseases of seawater netpen-reared salmonid fishes in the Pacific Northwest. *Can. Spec. Publ. fish. Aquat. Sci*. 116:1-76.

Kim, M., Oh, H.S., Park, S.C. y Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 64: 346-351.

Kimura, M. (1968). Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217: 624-626 .

Kimura, M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge.

Kimura, H. y Kusuda, R. (1983). Microbial succession in gliding bacterium infection in red sea bream. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish* 49: 1553-1559.

Klein, G. y Raina, S. (2019). Regulated Assembly of LPS, Its Structural Alterations and Cellular Response to LPS Defects. *Int. J. Mol. Sci.* 20: 356.

Klena J.D. y Schaitman J.D. (1993). Function of the rfb gene cluster and the rfb gene in the synthesis of O antigen by *Shigella dysenteriae* 1. *Mol. Microbiol.* 9:393-402.

Knupp, C., Wiens, G.D., Faisal, M., Call, D.R., Cain, K.D., Nicolas,P., Van Vliet, D., Yamashita, C., Ferguson, J.A., Meuninck, D., Hsu, H.M., Baker, B.B., Shen, L. y Loch, T.P. (2019). Large-Scale Analysis of *Flavobacterium psychrophilum* Multilocus Sequence Typing Genotypes Recovered from North American Salmonids Indicates that both Newly Identified and Recurrent Clonal Complexes Are Associated with Disease. *Appl. Environ. Microbiol.* 85: e02305-18.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Koglin, A. y Walsh, C.T. (2009). Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat. Prod. Rep.* 26: 987-1000.

Kolygas, M.N., Gourzioti, E., Vatsos, I.N. y Athanassopoulou, F. (2012). Identification of *Tenacibaculum maritimum* strains from marine farmed fish in Greece. *Vet. Rec.* 170: 623.

Kreger A.S., Bernheimer A.W., Etkin L.A. y Daniel L.W. (1987). Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infect. Immun.* 55: 3209-3212.

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

Kunttu, H.M., Jokinen, E.I., Valtonen, E.T. y Sundberg, L.R. (2011). Virulent and nonvirulent *Flavobacterium columnare* colony morphologies: characterization of chondroitin AC lyase activity and adhesion to polystyrene. *J. Appl. Microbiol.* 111: 1319-1326.

Labrie, L., Ng, J., Tan, Z., Komar, C., Ho, E. y Grisez, L. (2008). Nocardial infections in fish: an emerging problem in both freshwater and marine aquaculture systems in Asia. *Dis. Asian Aquac.* VI: 297-312.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

LaFrentz, B.R., Lindstrom, N.M., LaPatra, S.E., Call, D.R. y Cain, K.D. (2007). Electrophoretic and Western blot analyses of the lipopolysaccharide and glycocalyx of *Flavobacterium psychrophilum*. *Fish Shellfish Inmunol*. 23: 770-780.

Lange, M.D., Abernathy, J., Shoemaker, C.A., Zhang, D., Kirby, A., Peatman, E. y Beck, B. H. (2020). Proteome analysis of virulent *Aeromonas hydrophila* reveals the upregulation of iron acquisition systems in the presence of a xenosiderophore. *FEMS Microbiol. Lett.* 367: fnaa169.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Law, M. (2001). Differential Diagnosis of Ulcerative Lesions in Fish. *Environ. Health Perspect*. 109: 681-686.

Lemos, M.L., Salinas, P., Toranzo, A.E., Barja, J.L. y Crosa, J.H. (1988). Chromosome-mediated iron uptake system in pathogenic strains of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* 170: 1920-1925.

Leone, S., Silipo, A., Nazarenko, E.L., Lanzetta, R., Parrilli, M., y Molinaro, A. (2007). Molecular structure of endotoxins from Gram-negative marine bacteria: an update. *Mar. Drugs* 5: 85-112.

Levipan, H.A., Tapia-Cammas, D., Molina, V., Irgang, R., Toranzo, A.E., Magariños, B. y Avendaño-Herrera, R. (2019). Biofilm development and cell viability: An undervalued mechanism in the persistence of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*. *Aquaculture* 511: 1-8.

Lewin, R.A. y Lounsbery, D.M. (1969). Isolation, cultivation, and characterization of flexibacteria. *J. Gen. Microbiol.* 58: 145-170.

Lewis, A.L. y Lewis, W.G. (2012). Host sialoglycans and bacterial sialidases: a mucosal perspective. *Cell. Microbiol.* 14: 1174-1182.

Li, W.H. (1997). Molecular Evolution, Sinauer Publishers, Massachusetts.

Li, N., Qin, T., Zhang, X.L., Huang, B., Liu, Z.X., Xie, H.X., Zhang, J., McBride, M.J. y Nie, P. (2015). Gene deletion strategy to examine the involvement of the two chondroitin lyases in *Flavobacterium columnare* virulence. *Appl. and Environ. Microbiol.* 81: 7394-7402.

Li, N., Zhu, Y., LaFrentz, B.R., Evenhuis, J.P., Hunnicutt, D.W., Conrad, R.A., Barbier, P., Gullstrand, C.W., Roets, J.E., Powers, J.L., Kulkarni, S.S., Erbes, D.H., García, J.C., Nie, P. y McBride, M.J. (2017). The Type IX Secretion System Is Required for Virulence of the Fish Pathogen *Flavobacterium columnare*. *Appl. Environ. Microbiol.* 83: e01769-17.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Li, C., Wang, A., Wu, Y., Gulbins, E., Grassme, H. y Zhao, Z. (2019). Acid sphingomyelinase-ceramide system in bacterial infections. *Cell. Physiol. Biochem.* 52: 280-301.

Lin, T., Lin, L. y Zhang, F. (2014). Review on molecular typing methods of pathogens. *Open J. Med. Microbiol*. 4: 147-152.

Linhardt, R.J., Avci, F.Y., Toida, T., Kim, Y.S. y Cygler, M. (2006). CS lyases: structure, activity, and applications in analysis and the treatment of diseases. *Adv. Pharmacol.* 53: 187-215.

Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A.V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P.R., Knirel, Y.A., Wang, L. y Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of Escherichia coli O antigens. *FEMS Microbiol. Rev.* 44: 655-683.

López, J.R., Nuñez, S., Magariños, B., Castro, N., Navas, J.I., de la Herran, R. y Toranzo, A.E. (2009). First isolation of *Tenacibaculum maritimum* from wedge sole, *Dicologoglossa cuneata* (Moreau). *J. Fish Dis*. 32: 603-610.

López, J.R., Navas, J.I., Thanantong, N., de la Herran, R. y Sparagano, O.A.E. (2012). Simultaneous identification of five marine fish pathogens belonging to the genera *Tenacibaculum*, *Vibrio*, *Photobacterium* and *Pseudomonas* by reverse line blot hybridization. *Aquaculture* 324-325: 33-38.

Lorenzen, E. y Olesen, N.J. (1997). Characterization of isolates of *Flavobacterium psychrophilum* associated with coldwater disease or rainbow trout fry syndrome II: serological studies. *Dis. Aquat. Organ.* 31: 209-220.

Lynch, M. y Conery, J.S. (2003). The origins of genome complexity. *Science* 302: 1401-4.

Mabrok, M., Machado, M., Serra, C.R., Afonso, A., Valente, L.M.P. y Costas, B. (2016). Tenacibaculosis induction in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and studies of *Tenacibaculum maritimum* survival against host mucus and plasma. *J. Fish Dis*. 39: 1445-1455.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Maccari, F., Galeotti, F. y Volpi, N. (2015). Isolation and structural characterization of chondroitin sulfate from bony fishes. *Carbohydr. Polym.* 129: 143-147.

MacLean, L.L., Vinogradov, E., Crump, E.M., Perry, M.B. y Kay, W.W. (2001). The structure of the lipopolysaccharide O-antigen produced by *Flavobacterium psychrophilum* (259-93). *Eur. J. Biochem*. 268: 2710-2716.

MacLean, L.L., Perry, M.B., Crump, E.M. y Kay, W.W. (2003). Structural characterization of the lipopolysaccharide O-polysaccharide antigen produced by *Flavobacterium columnare* ATCC 43622. *Eur. J. Biochem.* 270: 3440-3446.

Maiden, M.C. (2006). Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu. Rev. Microbiol*. 60: 561-588.

Maiden, M.C., Jansen van Rensburg, M.J., Bray, J.E., Earle, S.G., Ford, S.A., Jolley, K.A. y McCarthy, N.D. (2013). MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 728-736.

Martin, B., Humbert, O., Cámara, M., Guenzi, E., Walzer, J., Mitchell, T., Andrei, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hackenbeck, R., Morrison, D.A., Buolnois, G.J. y Claverys, I.P. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumonite. Nucleic. Acids Res*. 20: 3479-3483 .

McBride, M.J. y Zhu, Y. (2013). Gliding motility and Por secretion system genes are widespread among members of the phylum *bacteroidetes. J. Bacteriol.* 195: 270-278.

McBride, M.J. y Nakane, D. (2015). *Flavobacterium* gliding motility and the type IX secretion system. *Curr. Opin. Microbiol.* 28: 72-77.

Mahdi, O., Eklund, B. y Fisher, N. (2014). Laboratory culture and maintenance of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Curr. Protoc. Microbiol.* 32: Unit–6F.1.

Magariños, B., Pazos, F., Santos, Y., Romalde, J.L. y Toranzo, A.E. (1995). Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

maritimus to skin mucus of marine fish. *Dis. Aquat. Org*. 21: 103-108.

Magi, G.E., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Toranzo, A.E. y Romalde, J.L. (2007). First reports of flexibacteriosis in farmed tub gurnard (*Chelidonichthys lucernus L.*) and wild turbot (*Scophthalmus maximus*) in Italy. *Bull. Eur. Ass. Fish Pathol*. 27: 177-184.

Mally, M., Shin, H., Paroz, C., Landmann, R. y Cornelis, G.R. (2008). *Capnocytophaga canimorsus*: a human pathogen feeding at the surface of epithelial cells and phagocytes. *PLoS Pathog*. 4: e1000164.

Mancuso, M., Avendaño-Herrera, R., Zaccone, R., Toranzo, A.E. y Magariños, B. (2007). Evaluation of different DNA-based fingerprinting methods for *typing Photobacterium damselae* ssp. *piscicida*. *Biol. Res*. 40: 85-92.

Mastan S.A. y Qureshi T.A. (2001). Role of bacteria in epizootic ulcerative syndrome (EUS) of fishes. *J. Environ. Biol.* 22: 187-192.

Mastan S.A. y Qureshi T.A. (2003). Observations on the histological alterations in various tissues of EUS affected fish, *Channa striatus* (Bloch). *J. Environ. Biol* 24: 405-410.

Masumura, K. y Wakabayashi, H. (1977). An outbreak of gliding bacterial disease in hatchery- born Red Seabream (*Pagrus major*) and Gilthead (*Acanthopagrus schlegeli*) fry in Hiroshima. *Fish Pathol*. 12: 171-177.

Maynard-Smith, J., Smith, N.H., O'Rourke, M. y Spratt, B.G. (1993). How clonal are bacteria?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4384-4388.

McBride, M. J. (2014). The family *Flavobacteriaceae*. En: *The Prokaryotes: Other Major Lineages Of Bacteria And The Archaea*, Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E. y F. Thompson (eds). Springer, Berlin, pp: 643–676.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mcrose, D. L., Seyedsayamdost, M.R. y Morel, F.M.M. (2018). Multiple siderophores: bug or feature?. *J. Biol. Inorg. Chem*. 1: 3.

McVicar, A.H. y White, P.G. (1979). Fin and skin necrosis of cultivated Dover sole *Solea solea* (L). *J. Fish Dis.* 2: 557-562.

McVicar, A.H. y White, P.G. (1982). The prevention and cure of an infectious disease in cultivated juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.). *Aquaculture* 26: 213-222.

Merino, S., Rubires, X., Aguilar, A. y Tomás, J. (1996). The O:34-antigen lipopolysaccharide as an adhesin in *Aeromonas hydrophila*. *FEMS Microbiol. Lett.* 139: 97-101.

Miccoli, A., Saraceni, P.R. y Scapigliati, G. (2019). Vaccines and immune protection of principal Mediterranean marine fish species. *Fish Shellfish Inmunol.* 94: 800-809.

Miethke, M. y Marahiel, M.A. (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev*. 71: 413-51.

Miethke, M. (2013). Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems. *Metallomics* 5: 15-28.

Mitchell, S.O. y Rodger, H.D. (2011). A review of infectious gill disease in marine salmonid fish. *J. Fish Dis.* 34: 411-432.

Miyagi, T. y Yamaguchi, K. (2012). Mammalian sialidases: physiological and pathological roles in cellular functions. *Glycobiology* 22: 880-896.

Muñoz-Atienza, E., Araújo, C., Magadán, S., Hernández, P.E., Herranz, C., Santos, Y. y Cintas, L.M. (2014). *In vitro* and *in vivo* evaluation of lactic acid bacteria of aquatic origin as probiotics for turbot (*Scophthalmus maximus* L.) farming. *Fish Shellfish Immunol.* 41: 570-580.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Mutoloki, S., Munang'andu, H.M. y Evensen, Ø. (2015). Oral Vaccination of Fish - Antigen Preparations, Uptake, and Immune Induction. *Front. Immunol.* 6: 519.

Nazarenko, E.L., Crawford, R.J., y Ivanova, E.P. (2011). The structural diversity of carbohydrate antigens of selected gram-negative marine bacteria. *Mar. Drugs* 9: 1914-1954.

Nei, M. y Li, W.H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5269-5273.

Nei, M. y Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol. Biol. Evol.* 3: 418-426.

Nei, M. y Kumar, S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York. pp: 333.

Neilands, J.B. (1995). Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *J. Biol. Chem*. 270: 26723-26726.

Nekouei, O., Vanderstichel, R., Ming, T., Kaukinen, K.H., Thakur, K., Tabata, A., Laurin, E., Tucker, S., Beacham, T.D. y Miller, K.M. (2018). Detection and assessment of the distribution of infectious agents in juvenile Fraser River Sockeye Salmon, Canada, in 2012 and 2013. *Front. Microbiol*. 9: 1-16.

Nekouei, O., Vanderstichel, R., Kaukinen, K.H., Thakur, K., Ming, T., Patterson, D.A., Trudel, M., Neville, C. y Miller, K.M. (2019). Comparison of infectious agents detected from hatchery and wild juvenile Coho salmon in British Columbia, 2008-2018. *PLoS One* 14: e0221956.

Nicolas, P., Mondot, S., Achaz, G., Bouchenot, C., Bernardet, J.F. y Duchaud E (2008). Population Structure of the Fish-Pathogenic Bacterium *Flavobacterium psychrophilum Appl. Environ. Microbiol*. 74: 3702-3709.

Nilsen, H., Sundell, K., Duchaud, E., Nicolas, P., Dalsgaard, I., Madsen, L., Aspán, A., Jansson, E., Colquhoun, D.J. y Wiklund,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

T. (2014). Multilocus sequence typing identifies epidemic clones of *Flavobacterium psychrophilum* in Nordic countries. *Appl. Environ. Microbiol*. 80: 2728-36.

Nishioka, T., Watanabe, K. y Sano, M. (2009). A bath challenge method with *Tenacibaculum maritimum* for Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Pathol*. 44: 178-181.

Nowlan, J.P., Lumsden, J.S. y Russell, S. (2020). Advancements in Characterizing *Tenacibaculum* Infections in Canada. *Pathogens* 9: 1029.

Nowlan, J.P., Britney, S.R., Lumsden, J.S. y Russell, S. (2021). Experimental Induction of Tenacibaculosis in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Using *Tenacibaculum maritimum*, *T. dicentrarchi*, and *T. finnmarkense*. *Pathogens* 10: 1439.

Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A., Korobeynikov, A., Lapidus, A., Prjibelsky, A., Pyshkin, A., Sirotkin, A., Sirotkin, Y., Stepanauskas, R., McLean, J.S., Lasken, R.S., Clingenpeel, S.R., Woyke, T., Tesler, G., Alekseyev, M.A. y Pevzner, P.A. (2013). Assembling genomes and mini-metagenomes from highly chimeric reads. *Lect. N. Bioinformat*. 7821: 158-170.

Oda, M., Takahashi, M., Matsuno, T., Uoo, K., Nagahama, M. y Sakurai, J. (2010). Hemolysis induced by *Bacillus cereus* sphingomyelinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1798: 1073-1080.

Ohta, T. y Basten, C.J. (1992) Gene conversion generates hypervariability at the variable regions of kallikerins and their inhibitors. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1: 87-90.

Okino, N. y Ito, M. (2007). Ceramidase enhances phospholipase C-induced hemolysis by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 282: 6021-6030.

Olsen, A.B., Gulla, S., Steinum, T., Colquhoun, D.J., Nilsen, H.K. y Duchaud, E. (2017). Multilocus sequence analysis reveals extensive genetic variety within *Tenacibaculum* spp. associated

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

with ulcers in sea-farmed fish in Norway. *Vet. Microbiol*. 205: 39-45.

Ostland, V.E., LaTrace, C., Morrison, D. y Ferguson, H.W. (1999). *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *J. Aquat. Anim. Health* 11: 35-44.

Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G.D., Olsen, G.J., Davis, J.J., Disz, T., Edwards, R.A., Gerdes, S., Parrello, B., Shukla, M., Vonstein, V., Wattam, A.R., Xia, F. y Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res.* 42: D206–D214.

Oves-Costales, D., Kadi, N. y Challis, G.L. (2009). The long-overlooked enzymology of a nonribosomal peptide synthetase-independent pathway for virulence-conferring siderophore biosynthesis. *Chem. Commun*. 43: 6530-6541.

Park, S., Ha, M.J., Jung, Y.T., Kang, C.H. y Yoon, J.H. (2016). *Tenacibaculum sediminilitoris* sp. nov., isolated from a tidal flat. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 66: 2610-2616.

Payza, A.N. y Kork, E.D. (1956). Bacterial degradation of heparin. *Nature* 177: 88-89.

Pazos, F., Nuñez, S. y Toranzo, A.E. (1993). Increasing occurrence of *Flexibacter maritimus* in the marine aquaculture of Spain. *FHS/AFS News* 21: 1-2.

Pazos, F., Santos, Y., Macias, A.R., Nuñez, S. y Toranzo, A.E. (1996). Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *J. Fish Dis*. 19: 193-197.

Pazos, F. (1997). *Flexibacter maritimus*: estudio fenotipico, inmunologico y molecular. Tesis Doctoral. Universidade Santiago de Compostela. Santiago de Compostela, España.

Pepin, J.F. y Emery, E. (1993). Marine Cytophaga-like bacteria (CLB) isolated from diseased reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

from French Mediterranean Coast. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*. 13: 165.

Pérez-Pascual, D., Lunazzi, A., Magdelenat, G., Rouy, Z., Roulet, A., Lopez-Roques, C., Larocque, R., Barbeyron, T., Gobet, A., Michel, G., Bernardet, J.F. y Duchaud, E. (2017a). The complete genome sequence of the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum* provides insights into virulence mechanisms. *Front. Microbiol*. 8: 1542.

Pérez-Pascual, D., Rochat, T., Kerouault, B., Gómez, E., Neulat-Ripoll, F., Henry, C., Quillet, E., Guijarro, J.A., Bernardet, J.F. y Duchaud, E. (2017b). More Than Gliding: Involvement of GldD and GldG in the Virulence of *Flavobacterium psychrophilum*. *Front. Microbiol*. 8: 2168.

Piñeiro-Vidal, M., Pazos, F. e Santos, Y. (2008). Fatty acid analysis as a chemotaxonomic tool for taxonomic and epidemiological characterization of four fish pathogenic *Tenacibaculum* species. *Lett. Appl. Microbiol*. 46: 548-554 .

Piñeiro-Vidal, M., Gijón, D., Zarza, C. e Santos, Y. (2012). *Tenacibaculum dicentrarchi* sp. nov., a novel marine bacteria of the family *Flavobacteriaceae* isolated from European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 62: 425-429.

Posada, D. y Buckley, T.R. (2004). Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests. *Syst. Biol.* 53: 793-808.

Powell, M., Carson, J. y van Gelderen, R. (2004). Experimental induction of gill disease in Atlantic salmon *Salmo salar* smolts with *Tenacibaculum maritimum*. *Dis. Aquat. Org*. 61: 179-185.

Powell, M.D., Harris, J.O., Carson, J. y Hill, J.V. (2005). Effects of gill abrasion and experimental infection with *Tenacibaculum maritimum* on the respiratory physiology of Atlantic salmon

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Salmo salar affected by amoebic gill disease. *Dis. Aquat. Org*. 63: 169-174.

Price, N.M. y Morel, F.M.M. (1998). Biological Cycling of Iron in the Ocean. *Met. Ions Biol. Syst.* 35: 1-36.

Pridgeon, J.W. y Klesius, P.H. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CAB Reviews* 7:1-16.

Pritchard, J.K., Stephens, M. y Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945-995.

Raetz, C.R. y Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem*. 71: 635-700.

Rahman, T., Suga, K., Kanai, K. y Sugihara, Y. (2014). Biological and serological characterization of a non-gliding strain of *Tenacibaculum maritimum* isolated from a diseased puffer fish *Takifugu rubripes*. *Fish Pathol.* 49: 121-129.

Ramos-Onsins, S.E. y Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol*. 19: 2092-2100.

Rani, A., Patel, S. y Goyal, A. (2018). Chondroitin Sulfate (CS) Lyases: Structure, Function and Application in Therapeutics. *Curr. Protein Pept. Sci*. 19: 22-33.

Raymond, K.N., Dertz, E.A. y Kim, S.S. (2003). Enterobactin: an archetype for microbial iron transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 3584-3588.

Reeves, P.R., Hobbs, M., Valvano, M.A., Skurnik, M., Whitfield, C., Coplin, D., Kido, N., Klena, J., Maskell, D., Raetz, C.R., y Rick, P.D. (1996). Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends Micobiol.* 4: 495-503.

Reichenbach, H. (1989) Family I. *Cytophagaceae*. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Staley, J.T., Bryant, M.P.,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pfenning, N. y Holt, J.G. (eds.) The Williams and Wilkins Co., Baltimore, USA, pp: 2013-2050.

Reid, S.D., Selander, R.K. y Whittam, T.S. (1999). Sequence diversity of flagellin (*fli*C) alleles in pathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. 181: 153-160.

Rietschel, E.T., Brade, H., Holst, O., Brade, L., Müller-Loennies, S., Mamat, U., Zähringer, U., Beckmann, F., Seydel, U., Brandenburg, K., Ulmer, A.J., Mattern, T., Heine, H., Schletter, J., Loppnow, H., Schönbeck, U., Flad, H.D., Hauschildt, S., Schade, U.F., Di Padova, F., Kusumoto, S. y Schumann, R.R. (1996). Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Inmunol.* 216: 39-81.

Rochat, T., Fujiwara-Nagata, E., Calvez, S., Dalsgaard, I., Madsen, L., Calteau, A., Lunazzi, A., Nicolas, P., Wiklund, T., Bernardet, J.F. y Duchaud, E. (2017). Genomic Characterization of *Flavobacterium psychrophilum* Serotypes and Development of a Multiplex PCR-Based Serotyping Scheme. *Front. Microbiol*. 8: 1752.

Romalde, J.L., Magariños, B., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1993). Antigenic and molecular characterization of *Yersenia ruckeri*. Proposal for a new intraspecies classification. *Syst. Appl. Microbiol*. 16: 411-419

Romalde, J.L., Magariños, B., Turnbull, K.D., Baya, A.M., Barja, J.M. y Toranzo, A.E. (1995). Fatty acid profiles of "*Pasteurella*" *piscicida:* comparison with other fish pathogenic gram-negative bacteria. *Arch. Microbiol.* 163: 211-216.

Romalde, J.L., Magariños, B., Villar, C., Barja, J.L. y Toranzo, A.E. (1999). Genetic analysis of turbot pathogenic *Streptococcus parauberis* strains by ribotyping and random amplified polymorphic DNA. *FEMS Microbiol. Lett*. 459: 297-304.

Romalde, J.L., Ravelo, C., López-Romalde, S., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B. y Toranzo, A. E. (2005). Vaccination strategies to

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

prevent emerging diseases for Spanish aquaculture. *Dev. Biol.* 121: 85-95.

Romero, M., Avendaño-Herrera, R., Magariños, B., Cámara, M. y Otero, A. (2010). Acylhomoserine lactone production and degradation by the fish pathogen *Tenacibaculum maritimum*, a member of the *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* (CFB) group. *FEMS Microbiol. Lett.* 304: 131-139.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-Del Barrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. y Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol*. 34: 3299-3302.

Sachdeva, P. y Virdi, J.S. (2004). Repetitive elements sequence (REP/ERIC)-PCR based genotyping of clinical and environmental strains of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A reveal existence of limited number of clonal groups. *FEMS Microbiol. Lett.* 240: 193-201.

Sakamoto, W., Canals, D., Salamone, S., Allopenna, J., Clarke, C.J., Snider, J., Obeid, L.M. y Hannun, Y.A. (2019). Probing compartment-specific sphingolipids with targeted bacterial sphingomyelinases and ceramidases. *J. Lipid Res.* 60: 1841-1850.

Salati, F., Cubadda, C., Viale, I. y Kusuda, R. (2005). Immune response of sea bass *Dicentrarchus labrax* to *Tenacibaculum maritimum* antigens. *Fisheries Science* 71: 563-567.

Sambrook, J., Fritsch, E.R. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samuel, G. y Reeves, P. (2003). Biosynthesis of O-antigens: genes and pathways involved in nucleotide sugar precursor synthesis and O-antigen assembly. *Carbohydr. Res.* 338: 2503-2519.

Santos, Y., Pazos, F. y Barja, J.L. (1999) *Flexibacter maritimus*, causal agent of flexibacteriosis in marine fish. En: *ICES Identification Leaflets for diseases and parasites of fish and*

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

shellfish, No. 55. Oliver, G (ed.), International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen, Denmark. pp: 1-6.

Sasser, M. (2001). Identification of bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids. MIDI Technical Note 101.

Sato, C. y Kitajima, K. (2019). Sialic Acids in Neurology. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 76: 1-64.

Saticioglu, I.B., Duman, M., Wiklund, T. y Altun, S. (2018). Serological and genetic characterization of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from farmed salmonids in Turkey. *J. Fish Dis.* 41:1899-1908.

Scarrow, R. (1985). Ferric ion sequestering agents. 14.1-Hydroxy-2(1H)- pyridinone complexes: properties and structure of a novel iron-iron dimer. *J. Am. Chem. Soc.* 107: 6540-6546.

Schierup, M.H. y Wiuf, C. (2010). The coalescent of bacterial populations. In: *Bacterial population genetics in infectious disease*. Robinson, D.A., Falush, D., Feil, E.J., (eds). John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, United States, pp: 3-18.

Schwyn, B. y Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160: 47-56.

Seggel, A. y De Young, C. (2016). Climate change implications for fisheries and aquaculture: summary of the findings of the intergovernmental panel on climate change fifth assessment report. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular* C1122: 1-65.

Sela, D.A., Li, Y., Lerno, L., Wu, S., Marcobal, A.M., German, J.B., Chen, X., Lebrilla, C.B. y Mills, D.A. (2011). An infant-associated bacterial commensal utilizes breast milk sialyloligosaccharides. *J. Biol. Chem.* 286: 11909-11918.

Shapira, L., Soskolne, W.A., Houri, Y., Barak, V., Halabi, A. y Stabholz, A. (1996). Protection against endotoxic shock and lipopolysaccharide-induced local inflammation by tetracycline: correlation with inhibition of cytokine secretion. *Infect. Immun.* 64: 825-828.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Simonis, A. y Schubert-Unkmeir, A. (2018). The role of acid sphingomyelinase and modulation of sphingolipid metabolism in bacterial infection. *Biol. Chem.* 399: 1135-1146.

Simmonsen, K.L., Churchill, G.A. y Aquadro, G.F. (1995). Properties of statistical tests of neutrality for ADN polymorphism data. *Genetics* 141: 413-429.

Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P.K. y Virdi, J.S. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol*, 6: 791.

Småge, S.B., Frisch, K., Brevik, O.J., Watanabe, K. y Nylund, A. (2016). First isolation, identification, and characterisation of *Tenacibaculum maritimum* Norway, isolated from diseased farmed sea lice cleaner fish *Cyclopterus lumpus* L. *Aquaculture* 464: 178-184.

Smith, J.M., Smith, N.H., O'Rourke, M. y Spratt, B.G. (1993). How clonal are bacteria? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4384-8.

Soltani, M. y Burke, C.M. (1994). Responses of fish-pathogenic *Cytophaga flexibacter*-like (CFLB) to environmental conditions. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol*. 14: 185-187.

Soltani, M., Munday, B.L. y Burke, C.M. (1996). The relative susceptibility of fish to infections by *Flexibacter columnaris* and *Flexibacter maritimus*. *Aquaculture* 140: 259-264.

Soong, G., Muir, A., Gomez, M.I., Waks, J., Reddy, B., Planet, P., Singh, P.K., Kaneko, Y., Wolfgang, M.C., Hsiao, Y.S., Tong, L. y Prince, A. (2006). Bacterial neuraminidase facilitates mucosal infection by participating in biofilm production. *J. Clin. Invest.* 116: 2297-2305.

Sørensen, U.B.S. y Larsen, J.L. (1986). Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 593-597.

Sørensen, J., Skouv, J., Jørgensen, A. y Nybroe, O. (1992). Rapid identification of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* and *P. putida* by SDS-PAGE

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

analysis of whole-cell protein patterns. *FEMS Microbiol. Lett.* 101: 41-50.

Sorongon, M.L., Bloodgood, R.A. y Burchard, R.P. (1991). Hydrophobicity, adhesion, and surface-exposed proteins of gliding bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3193-3199.

Stern, M.J., Ames, G.F.L., Smith, N.H., Robinson, E.C. y Higgins, C.F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of bacteria genome. *Cell* 37: 1015-1026.

Strieker, M., Tanovic, A. y Marahiel, M.A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20: 234-240.

Strobeck, C. (1987). Average number of nucleotide differences in a sample from a single subpopulation, a test for population subdivision. *Genetics* 117: 149-153.

Stroeher, U.H., Karageorgos, L.E., Brown, M.H., Morona, R. y Manning, P. A. (1995). A putative pathway for perosamine biosynthesis is the first function encoded within the rfb region of *Vibrio cholerae* O1. *Gene* 166: 33-42.

Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K. y Kitagawa, H. (2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr. Opin. Struct. Biol*. 13: 612-620.

Suomalainen, L.R., Tiirola, M. y Valtonen, E.T. (2006). Chondroitin AC lyase activity is related to virulence of fish pathogenic *Flavobacterium columnare*. *J. Fish Dis.* 29: 757-763.

Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S. y Yamamoto, S. (2001). Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 51: 1639-1652.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-59.

Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+C-content biases. *Mol. Biol. Evol.* 9: 678-687.

Tamura, K. y Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10: 512-526.

Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect. Math. Life Sci.* 17: 57-86.

Toranzo, A.E. y Barja, J.L. (1993). Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annu. Rev. Fish Dis*. 3: 5-36.

Toranzo, A.E., Magariños B. y Romalde J.L. (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246: 37-61.

Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.

Toyama, T., Kita-Tsukamoto, K. y Wakabayashi, H. (1996). Identification of *Flexibacter maritimus, Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S Ribosomal DNA. *Fish Pathol*. 31: 25-31.

Valdes, S., Irgang, R., Barros, M. C., Ilardi, P., Saldarriaga-Córdoba, M., Rivera–Bohle, J., Madrid, E., Gajardo-Córdova, J. y Avendaño-Herrera, R. (2021). First report and characterization of *Tenacibaculum maritimum* isolates recovered from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farmed in Chile. *J. Fish Dis*. 44: 1481-1490.

van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S. y Struelens, M. y European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Group on Epidemiological Markers (ESGEM) (2007). Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect*. 13: 1-46.

van Gelderen, R., Carson, J. y Nowak, B. (2009a). Experimental vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against marine flexibacteriosis. *Aquaculture* 288: 7-13.

van Gelderen, R., Carson, J. y Nowak, B. (2009b). Effect of extracellular products of *Tenacibaculum maritimum* in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis*. 32: 727-731.

van Gelderen, R., Carson, J., Gudkovs, N. y Nowak, B. (2010a). Physical characterisation of *Tenacibaculum maritimum* for vaccine development. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1668-1676.

van Gelderen, R., Carson, J. y Nowak, B. (2010b). Experimentally induced marine flexibacteriosis in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. I. Pathogenicity. *Dis. Aquat. Org*. 91: 121-128.

van Gelderen, R., Carson, J. y Nowak, B. (2011). Experimentally induced marine flexibacteriosis in Atlantic salmon smolts *Salmo salar*. II. Pathology. *Dis. Aquat. Org.* 95: 125-135.

Varki, N.M. y Varki, A. (2007). Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab. Invest. J. Tech. Meth. Pathol.* 87: 851-857.

Versalovich, J., Koeuth, T. y Lupski, J.R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19: 6823-6831.

Vilar, P., Faílde, L.D., Bermúdez, R., Vigliano, F., Riaza, A., Silva, R., Santos, Y. y Quiroga, M.I. (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated *J. Fish Dis*. 35: 437-445.

Vimr, E.R., Kalivoda, K.A., Deszo, E.L. y Steenbergen, S.M. (2004). Diversity of microbial sialic acid metabolism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 132–153

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Vinogradov, E., MacLean, L.L., Crump, E.M., Perry, M.B. y Kay, W.W. (2003). Structure of the polysaccharide chain of the lipopolysaccharide from *Flexibacter maritimus*. *Eur. J. Biochem.* 270: 1810-1815.

Vos, M. y Didelot, X.A. (2009). A comparison of homologous recombination rates in bacteria and archaea. *ISME J*. 3: 199-208.

Wagstaff, B.A., Zorzoli, A. y Dorfmueller, H.C. (2021). NDP-rhamnose biosynthesis and rhamnosyltransferases: building diverse glycoconjugates in nature. *Biochem. J.* 478: 685-701.

Wakabayashi, H., Hikida, M. y Masumura, K. (1984). Flexibacter infection in cultured marine fish in Japan. *Helgol. Meeresunters.* 37: 587-593.

Wakabayashi, H., Hikida, M. y Masumura, K. (1986). *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol*. 36: 396-398.

Wandersman, C. y Delepelaire, P. (2004). Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Ann. Rev. Microbiol*. 58: 611-47.

Wang, J.T., Chou, Y.J., Chou, J.H., Chen, C.A. y Chen, W.M. (2008). *Tenacibaculum aiptasiae* sp. nov., isolated from a sea anemone *Aiptasia pulchella*. *Int.l J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 761-766.

Wang, S., Sugahara, K. y Li, F. (2016). Chondroitin sulfate/dermatan sulfate sulfatases from mammals and bacteria. *Glycoconj. J.* 33: 841-851.

Warsen, A.E., Krug, M.J., LaFrentz, S., Stanek, D.R., Loge, F.J. y Call, D.R. (2004). Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and DNA microarrays. *Appl. Environ. Microbiol*. 70: 4216-4221.

Watanabe, K. y Nishimura, T. (2010). Antibacterial effect of chemical reagents against *Tenacibaculum maritum*. *Fish. Pathol*. 45: 66-68.

Wattam, A.R., Brettin, T., Davis, J.J., Gerdes, S., Kenyon, R., Machi, D., Mao, C., Olson, R., Overbeek, R., Pusch, G.D., Shukla,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

M.P., Stevens, R., Vonstein, V., Warren, A., Xia, F. y Yoo, H. (2018). Assembly, Annotation, and Comparative Genomics in PATRIC, the All-Bacterial Bioinformatics Resource Center. *Methods Mol. Biol.* 1704: 79-101.

Wilson, T., Carson, J. y Bowman, J. (2002). Optimization of one-tube PCR-ELISA to detect femtogram amounts of genomic DNA. *J. Microbiol. Methods* 51: 163-170.

Wilson, T. y Carson, J. (2003). Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridization assay to detect selected bacterial fish pathogens. *Dis. Aquat. Org*. 54: 127-134.

Wilson, T., Douglas, M. y Dunn, V. (2019). First identification of fish pathogens *Tenacibaculum dicentrarchi* and *T. soleae* in Tasmania and multiplex PCR for these organisms and *T. maritimum*. *Dis. Aquat. Org*. 136: 219-226.

Winkelmann, G., Busch, B., Hartmann, A., Kirchhof, G., Süssmuth, R. y Jung, G. (1999). Degradation of desferrioxamines by *Azospirillum irakense*: assignment of metabolites by HPLC/electrospray mass spectrometry. *Biometals* 12: 255-264.

Whitfield, C., Amor P.A. y R. Koplin. (1997). Modulation of the surface architecture of gram- negative bacteria by the action of surface polymer: Lipid A-core ligase and by determinants of polymer chain length. *Mol. Microbiol.* 23: 629-638.

Wolska, K. y Szweda, P. (2012). Genotyping techniques for determining the diversity of microorganisms. In: *Genetic diversity in microorganisms*. Caliskan, M. (ed). InTech, Rijeka, pp: 53-94.

Wynne, J.W., Thakur, K.K., Slinger, J., Samsing, F., Milligan, B., Powell, J., McKinnon, A., Nekouei, O., New, D., Richmond, Z., Gardner, I. y Siah, A. (2020). Microbiome Profiling Reveals a Microbial Dysbiosis During a Natural Outbreak of Tenacibaculosis (Yellow Mouth) in Atlantic Salmon. *Front. Microbiol.* 11: 586387.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Xiang, H., Jin, S., Tan, F., Xu, Y., Lu, Y. y Wu, T. (2021). Physiological functions and therapeutic applications of neutral sphingomyelinase and acid sphingomyelinase. *Biomed. Pharmacother.* 139: 111610.

Xie, H.X., Nie, P., Chang, M.X., Liu, Y. y Yao, W.J. (2005). Gene cloning and functional analysis of glycosaminoglycan-degrading enzyme chondroitin AC lyase from *Flavobacterium columnare* G4. *Arch. Microbiol.* 184: 49-55.

Yamagata, T., Saito, H., Habuchi, O. y Suzuki, S. (1968). Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. *J. Biol. Chem.* 243: 1523-1535.

Yamamoto, T., Kawai, K. y Oshima, S. (2010). Evaluation of an Experimental Immersion Infection Method with *Tenacibaculum maritimum* in Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquac. Sci.* 58: 481-489.

Yardimci, R.E. y Timur, G. (2016). Antigenic Characterisation of *Tenacibaculum maritimum* Isolates from Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) Farmed on the Aegean Sea Coasts of Turkey. *J. Aqua. Res. Dev.* 7: 408.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S.G. y Madden, T.L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134.

Yoon, S.H., Ha, SM., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H. y Chun, J. (2017). Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 1613-1617.

Zhang, Y., Arias, C.R., Shoemaker, C.A. y Klesius, P. H. (2006). Comparison of lipopolysaccharide and protein profiles between *Flavobacterium columnare* strains from different genomovars. *J. Fish Dis.* 29: 657-663.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tenacibaculum maritimum es el patógeno marino causante de la tenacibaculosis marina y la estomatitis bacteriana, enfermedades que provocan cuantiosas pérdidas económicas en la producción de especies cultivadas de alto valor comercial en distintas zonas geográficas del mundo. En esta tesis ha llevado a cabo la caracterización serológica, molecular y quimiotaxonómica del microorganismo. Además, se ha estudiado la estructura y evolución de la población para esta especie, sugiriendo una estructura de población epidémica en la que la mutación tiene más importancia que la recombinación. Hemos demostrado que la presencia de enzimas de degradación de tejido como condroitinasa y sialidasa son exclusivas de la especie *T. maritimum* dentro del género *Tenacibaculum*, que existen diferencias en el antígeno O del LPS y que este microorganismo produce al menos 6 variantes del sideróforo, siendo una de ellas una desferrioxamina D1.