



ESCUELA DE DOCTORADO  
INTERNACIONAL DE LA USC

Alba  
Vázquez Barca

Tesis doctoral

Estudio transcriptómico de  
*Photobacterium damsela*  
subsp. *damsela*: influencia de  
la salinidad, identificación de  
nuevos factores de virulencia y  
diseño de aplicaciones  
biotecnológicas

Santiago de Compostela, 2023



ESCOLA DE DOUTORAMENTO  
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO DE  
*PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP.  
*DAMSELAE*: INFLUENCIA DE LA SALINIDAD,  
IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS FACTORES  
DE VIRULENCIA Y DISEÑO DE  
APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS**

Alba Vázquez Barca

Director: Carlos Rodríguez Osorio

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN AVANCES EN BIOLOGÍA  
MICROBIANA Y PARASITARIA**

SANTIAGO DE COMPOSTELA



## AGRADECEMENTOS

Hai cinco anos comezaba esta etapa chea de ganas e ilusión e mentiría se non dixese que, a pesar das dificultades, a felicidade e a ilusión do comezo están intactas a día de hoxe. Pero isto non é só merito meu. Acariciando xa o final deste traballo, gustaríame aproveitar este espazo para transmitir o meu agradecemento a todos aqueles que fixeron posible que hoxe esté escribindo estas liñas.

En primeiro lugar, quero agradecerlle ó meu director Carlos Rodríguez Osorio a oportunidade de formar parte do seu grupo. Grazas por ser un director excelente, polos consellos, coñecementos, motivación e apoio dende o minuto un. Por ter a porta do despacho sempre aberta e valorar as nosas ideas e opinións. Por ser un gran mentor, pero sobre todo, unha gran persoa. Grazas de corazón.

En segundo lugar, á miña compañeira e amiga Ana, por estar sempre no bo e no menos bo. Grazas por ser a mellor compañeira de laboratorio e de vivenda. Por ser a miña guía e mentora no laboratorio. Polo teu apoio continuo e a tua xenerosidade. Ogallá máis xente coma ti no mundo, Ana!

Gustaríame tamén agradecer a todos os compañeiros do Instituto de Acuicultura e do laboratorio cos que compartín grandes momentos nestes cinco anos. En especial a Mateus, pola súa bondade. A Xose e a Laura, polo seu apoio e as risas compartidas. A Saqr, polas longas e valiosas conversas sobre a vida. Grazas tamén a Placeres, por ser coma unha nai para nós neste edificio, e a todas persoas que pasaron polo laboratorio. En especial a Ecren, a Alberto e ás recién graduadas Alejandra, Laura e Soraya pola súa predisposición, entusiasmo e vitalidade. Grazas porque de todos vós saquei unha aprendizaxe persoal e académica enorme.

Grazas tamén á Dra. Ana do Vale e ós investigadores do seu grupo no Instituto de Investigación e Inovação em Saúde (I3s) da Universidade de Porto (Portugal). Grazas por recibirme tan ben durante a estancia, por darme a oportunidade de ampliar os meus coñecementos e obter resultados valiosos para a tese.

Quero dedicarlle tamén un espazo á Dra. Ysabel Santos para agradecerlle os seus consellos e a súa axuda desinteresada.

Tamén a todos os meus amigos, e de xeito moi especial a Alba e a Alejandra, por estar sempre aí.

A David...as palabras quédanme curtas. Grazas por ser o mellor compañeiro de vida. Polos sacrificios, por acompañarme e apoiarme sempre en todo. Por alegrarte dos meus logros coma se fosen teus. Pola tua paciencia e comprensión. Por ser luz nos días grises, grazas infinitas.

Finalmente, quero agradecerlle este traballo á miña familia e a quen es lles debo todo: ós meus pais Delfina e Manolo. Polo seu amor incondicional, por transmitirme valores de respecto, empatía e xenerosidade. Por todos os sacrificios e esforzos para que eu puidese chegar ata aquí. Porque podo sentirme afortunada cada día polos pais que teño.

En último lugar, quero dedicarlle este traballo a aquelas persoas que xa non poden compartir isto comigo pero que sempre están presentes. En especial ó meu avó Arturo e ó meu padriño Santiago.

A todos, de corazón, moitísimas grazas.

## FINANCIACIÓN

Esta tesis doctoral ha sido financiada por la Agencia Estatal de Investigación (AEI) y cofinanciada por el programa FEDER (Fondo Europeo de Desarrollo Regional) “Una manera de hacer Europa”, de la Unión Europea en el ámbito del proyecto PID2019-110558RB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) y por la Xunta de Galicia en el ámbito de los proyectos ED431C 2018/18 Y ED431C 2022/23.



UNIÓN EUROPEA

Fondo Europeo de Desarrollo Regional  
"Una manera de hacer Europa"



XUNTA  
DE GALICIA

Durante la realización de la presente tesis la autora ha sido beneficiaria de unha beca IACOBUS apoyada por el programa INTERREG VI A España-Portugal (POPTEC) 2021-2027 para la realización de una estancia de 3 meses en el Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3s) da Universidade de Porto (Portugal).



Interreg  
España - Portugal

Fondo Europeo de Desarrollo Regional  
Fundo Europeu de Desenvolvemento Regional



UNIÓN EUROPEA  
UNIÃO EUROPEIA



"Life is like riding a bike.  
To keep your balance,  
you must keep moving"  
**Albert Einstein**



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>25</b>
<b>1.1. La acuicultura: estado actual y futuros desafíos</b>	<b>25</b>
1.1.1. Los patógenos bacterianos en la acuicultura	26
1.1.2. Medidas de prevención: las vacunas en la acuicultura	27
<b>1.2. <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i></b>	<b>29</b>
1.2.1. Características generales y taxonomía	29
1.2.2. <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> : un patógeno versátil y generalista	32
1.2.3. Tratamiento y medidas de prevención	38
<b>1.3. Mecanismos de virulencia descritos en <i>Pdd</i></b>	<b>39</b>
1.3.1. Citotoxinas, fosfolipasas y colagenasas	40
1.3.2. Mecanismos de captación de hierro	45
1.3.3. Presencia de cápsula polisacáridica	46
<b>1.4. Regulación de los mecanismos de virulencia en <i>Pdd</i></b>	<b>47</b>
1.4.1. Sistemas reguladores de dos componentes	47
1.4.2. Influencia de la temperatura	49
<b>1.5. Influencia de la salinidad en la fisiología y virulencia de las bacterias de la familia <i>Vibrionaceae</i></b>	<b>52</b>
<b>1.6. Herramientas genéticas esenciales para la manipulación genética de vibrios: los vectores plasmídicos</b>	<b>55</b>
<b>2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>61</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>65</b>
<b>3.1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo</b>	<b>65</b>
<b>3.2. Extracción de ADN genómico y plasmídico</b>	<b>65</b>
<b>3.3. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCR Y RT-PCR)</b>	<b>67</b>
<b>3.4. Clonación de fragmentos de ADN y construcción de los vectores plasmídicos pVibexp y pA-162-Vibexp</b>	<b>70</b>
<b>3.5. Transformación de ADN por choque térmico en <i>E. coli</i></b>	<b>70</b>

<b>3.6. Técnicas de secuenciación y herramientas bioinformáticas</b>	<b>71</b>
3.6.1. Secuenciación clásica o de Sanger	71
3.6.2. Secuenciación y anotación del genoma completo de RM-71	71
3.6.3. Secuenciación del ARN (RNA-Seq)	72
<b>3.7. Técnicas proteómicas</b>	<b>74</b>
3.7.1. Análisis SDS-PAGE de proteínas de membrana externa	74
3.7.2. Análisis SDS-PAGE de los sobrenadantes	74
3.7.3. Cuantificación de proteínas por densitometría	75
<b>3.8. Otras herramientas bioinformáticas empleadas</b>	<b>75</b>
<b>3.9. Construcción de mutantes por intercambio alélico</b>	<b>76</b>
<b>3.10. Complementación de mutantes con el gen salvaje</b>	<b>80</b>
<b>3.11. Microscopía</b>	<b>80</b>
3.11.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	80
3.11.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	80
<b>3.12. Experimentos de crecimiento y viabilidad</b>	<b>81</b>
3.12.1. Crecimiento en microcosmos marino	82
3.12.2. Crecimiento en medio mínimo suplementado con carbohidratos	82
3.12.3. Crecimiento en presencia de antibióticos	83
3.12.4. Actividad antimicrobiana de la piscidina frente a <i>Pdd</i>	83
3.12.5. Ensayos de supervivencia a pH ácido	83
3.12.6. Crecimiento en sangre y plasma de peces	84
<b>3.13. Ensayos de actividad hemolítica y fosfolipasa</b>	<b>85</b>
<b>3.14. Prueba de la arginina decarboxilasa/dihidrolasa</b>	<b>85</b>
<b>3.15. Ensayos de motilidad</b>	<b>85</b>
<b>3.16. Experimentos <i>in vivo</i></b>	<b>86</b>
3.16.1. Ensayos de virulencia en peces	86
3.16.2. Ensayos de infección competitiva	87
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>91</b>
<b>4.1. Estudio de las respuestas transcriptómica y fenotípica de</b> <b><i>P. damselae</i> subsp. <i>damselae</i> cultivada al 3% NaCl con respecto</b> <b>al 1% NaCl</b>	<b>91</b>

4.1.1. Vista general del perfil transcriptómico de la cepa de <i>Pdd</i> RM-71 bajo distintas condiciones de salinidad	92
4.1.2. Los cambios en la salinidad afectan ligeramente a la morfología celular y a la producción de cápsula en <i>Pdd</i>	106
4.1.3. El metabolismo energético y de los carbohidratos están sobrerregulados en <i>Pdd</i> a salinidades próximas a las del medio marino	108
4.1.4. El crecimiento al 3% de NaCl regula al alza los genes implicados en la captación de solutos compatibles y en el uso de trehalosa y fructosa como fuentes de carbono	110
4.1.5. El crecimiento de <i>Pdd</i> al 3% NaCl, induce la tolerancia a los antibióticos kanamicina, vancomicina y ampicilina	113
4.1.6. La regulación del metabolismo de los aminoácidos mediada por NaCl en <i>Pdd</i> , pone de relieve importantes cambios en el catabolismo de la arginina	118
4.1.7. La expresión de los mecanismos de respuesta al estrés y los sistemas de eflujo se inducen a baja salinidad en <i>Pdd</i>	126
4.1.8. La baja salinidad desencadena en <i>Pdd</i> un perfil genético de virulencia, con un gran impacto en la sobrerregulación del secretoma dependiente del SST2	127
4.1.9. Los sistemas de captación de hierro están sobrerregulados a baja salinidad en <i>Pdd</i>	133
4.1.10. La baja salinidad induce en <i>Pdd</i> posibles factores de virulencia adicionales codificados en el plásmido pPHDD1	133
<b>4.2. Caracterización genética y funcional de TbpD: una proteína de adquisición de hierro codificada en el plásmido de virulencia pPHDD1</b>	<b>139</b>
4.2.1. TbpD es una proteína de membrana externa (OMP) regulada por hierro	140
4.2.2. La mutación del gen <i>tbpD</i> compromete drásticamente la virulencia de <i>Pdd</i> para rodaballo	143

4.2.3. El mutante $\Delta tbpD$ está afectado en el crecimiento en sangre y plasma de rodaballo y lubina	147
4.2.4. El mutante $\Delta tbpD$ muestra un defecto en la colonización de los órganos internos de rodaballo y lubina.	150
4.2.5. El contexto del gen <i>tbpD</i> está altamente conservado en las cepas de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	152
<b>4.3. Diseño y construcción del plásmido <i>Vibrioexpress</i> (pVibexp): un nuevo vector modular para la manipulación genética de vibrios y la expresión de genes</b>	<b>160</b>
4.3.1. Descripción de los módulos que constituyen el plásmido pVibexp	164
4.3.2. El vector pVibexp es replicativo en <i>E. coli</i> y puede movilizarse por conjugación a distintos vibrios	168
4.3.3. El vector pVibexp permite la expresión y secreción eficiente de la fosfolipasa Dly en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i> y en la subsp. <i>piscicida</i>	171
4.3.4. Construcción del vector pA-162-Vibexp, un vector de clonación basado en un plásmido MRB-like nativo de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	178
4.3.5. El vector pA-162-Vibexp permite la expresión de genes nativos y heterólogos en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	181
4.3.6. El vector pA-162-Vibexp: una herramienta genética con potencial para la producción de proteínas recombinantes en <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	185
4.3.7. El vector pA-162-Vibexp es estable en la cepa de <i>Pdd</i> LD-07 e inestable en la cepa RM-71	187
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>191</b>
<b>6. CONCLUSIONS</b>	<b>195</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>199</b>
<b>8. ANEXO</b>	<b>245</b>
<b>8.1. Declaraciones: conflicto de intereses, aspectos éticos, uso de imágenes y contenido publicado</b>	<b>245</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- Amp:** Ampicilina  
**ATP:** Adenosín trifosfato  
**CC:** Licencia Creative Commons  
**Cm:** Cloranfenicol  
**CM9-1:** Medio mínimo al 1% NaCl  
**CM9-3:** Medio mínimo al 3% NaCl  
**DMSO:** Dimetil sulfóxido  
**dNTP:** Desoxinucleótido 5' trifosfato  
**DO<sub>600</sub>:** Densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.  
**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético  
**ECPS:** Productos extracelulares bacterianos  
**FDR:** Tasa de descubrimiento falso (del inglés *False Descovey Rate*)  
**Gent:** Gentamicina  
**Kan:** Kanamicina  
**Kb:** Kilobase  
**KDa:** Kilodaltons  
**LB:** Medio Luria Bertani  
**O/F:** Medio de Oxidación/Fermentación  
**ORF:** Marco de lectura abierta (del inglés *open reading frame*)  
**pb:** Pares de bases  
**PTS:** Sistema fosfotransferasa (del inglés: *phosphotransferase system*)  
**Rif:** Rifampicina  
**rpm:** revoluciones por minuto  
**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*)  
**SST2:** Sistema de secreción de tipo II  
**TAE:** Tampón Tris-EDTA  
**TCBS:** Tiosulfato citrato bilis sacarosa  
**Tet:** Tetraciclina  
**Tm:** Temperatura de fusión  
**TSA-1:** Agar de soja y Triptona al 1% NaCl  
**TSA-3:** Agar de soja y Triptona al 3% NaCl  
**TSB-1:** Caldo de soja y Triptona al 1% NaCl  
**TSB-3:** Caldo de soja y Triptona al 3% NaCl  
**UFC:** Unidades formadoras de colonias  
**WT:** tipo salvaje (del inglés *wild-type*)



## RESUMEN

La familia *Vibrionaceae* comprende un grupo de bacterias genética y metabólicamente muy diversas que se distribuyen ampliamente en el entorno acuático, preferiblemente en aguas saladas. La mayoría de especies viven en libertad en el ambiente oceánico, donde prosperan adheridas a partículas en suspensión y colonizando superficies bióticas y abióticas. Sin embargo, algunas especies también presentan fases patógenas en su ciclo de vida, suponiendo una amenaza considerable para la salud animal y humana.

Dentro de este grupo se incluye *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (*Pdd*), un patógeno versátil y generalista causante de infecciones severas en un amplio rango de especies animales y en el ser humano. Así mismo, *Pdd* es una bacteria autóctona de los ecosistemas marinos siendo aislada de fuentes tan diversas como aguas oceánicas, sedimentos, plancton, mucílago flotantes, moluscos y como parte de la microbiota de animales marinos. Las infecciones causadas por *Pdd* comprometen gravemente el cultivo de diversas especies de gran importancia en la acuicultura, tanto de peces como de crustáceos, y en los últimos años se ha registrado un aumento en su expansión tanto a nivel geográfico como en su rango de hospedadores. Además, en su papel como patógeno zoonótico y oportunista, *Pdd* puede causar fascitis necrosante y septicemias en humanos que en muchos casos solo se solventan con la amputación de la extremidad afectada.

La patogenicidad de *Pdd* se atribuye fundamentalmente a la producción de cuatro citotoxinas: Dly, PhlyP, PhlyC y PlpV. Dos de ellas, la fosfolipasa Dly y la toxina PhlyP, están codificadas en el plásmido de virulencia pPHDD1, mientras que las otras dos, PhlyC y PlpV, están codificadas en el cromosoma. Cabe destacar que los brotes causados por *Pdd* están generalmente compuestos por poblaciones multiclonales en las que coexisten cepas con y sin plásmido, evidenciando la elevada heterogeneidad que presenta esta subespecie. Además, otros factores de virulencia de *Pdd* incluyen la producción de una cápsula polisacáridica implicada en la resistencia a los mecanismos de defensa del hospedador.

En la actualidad no existe ninguna vacuna comercial disponible frente a *Pdd* y el tratamiento con antibióticos es altamente ineficaz tanto en peces como en humanos. Por este motivo, determinar los factores que modulan la fisiología y la virulencia de *Pdd*, resulta crucial para minimizar su daño y diseñar herramientas para su tratamiento y prevención. En los últimos años, numerosos estudios han relacionado el incremento de la temperatura y la reducción de la salinidad, derivados del efecto del cambio climático, con el aumento en el número de infecciones causadas por vibrios. Sin embargo, la salinidad no solo determina las regiones óptimas para la expansión de las poblaciones de vibrios, sino que también ejerce un papel importante en la regulación de los mecanismos de virulencia. En el ambiente marino, una de las señales ambientales más informativas de la transición de la fase de vida libre a la fase infectiva es la caída en la concentración de NaCl a la que se enfrenta la bacteria en el medio interno del hospedador vertebrado. En este contexto, las bacterias patógenas facultativas, como *Pdd*, deben regular muy finamente la expresión de sus factores de virulencia, de manera que su producción se maximice dentro del hospedador y se minimice fuera de él.

En cuanto al papel de la salinidad en *Pdd*, estudios previos han demostrado que los niveles de NaCl modulan la actividad transcripcional de los promotores de las tres citotoxinas Dly, PhlyP y PhlyC. Aunque estas evidencias previas apuntaban ya a la caída de la concentración de NaCl como una posible señal activadora de la virulencia en *Pdd*, el papel de la salinidad en la regulación genética de este patógeno era todavía desconocido. Por esta razón, en la primera parte de esta tesis nos centramos en estudiar la respuesta de *Pdd* ante los cambios en la concentración de NaCl. Para ello realizamos un análisis comparativo de los perfiles transcriptómicos de la cepa altamente virulenta RM-71 crecida a una salinidad próxima a la del ambiente marino (3% NaCl) y a una salinidad similar a la del medio interno del hospedador (1% NaCl). En este trabajo demostramos además que *Pdd* alcanza una DO<sub>600</sub> ligeramente superior al final de la fase exponencial al 3% NaCl con respecto al 1% NaCl.

Para conocer los cambios en la expresión génica que podrían desencadenarse en *Pdd* al introducirse en un hospedador, se estableció el crecimiento al 3% NaCl como condición control y se comparó con el perfil obtenido al 1% NaCl. De este modo, aquellos genes con valores de cambio de expresión o *Fold Change* (FC) positivos, se corresponderían con genes inducidos o sobrerregulados al 1% NaCl mientras que aquellos con valores FC negativos, se corresponderían con genes infrarregulados al 1% NaCl o, lo que es lo mismo, inducidos al 3% NaCl. El análisis realizado desveló la presencia de 1808 genes expresados diferencialmente (DEGs) de los cuales 888 estaban sobrerregulados ( $FC > 1.5$ ) y 920 estaban infrarregulados ( $FC < -1.5$ ) al 1% NaCl con respecto al 3% NaCl. El número de genes diferencialmente expresados (DEGs) a cada condición estaba equilibrado en los dos cromosomas, así como en el plásmido de virulencia pPHDD1. Curiosamente, la clasificación funcional de los DEGs desveló que la mayoría de los genes inducidos al 1% NaCl se asignaron a la categoría de traducción. Otros genes sobrerregulados a baja salinidad se asignaron principalmente a categorías implicadas en el metabolismo y transporte de iones inorgánicos, biogénesis de membrana y motilidad celular. Por el contrario, entre los genes sobrerregulados al 3% NaCl, las categorías funcionales más abundantes fueron aquellas implicadas en el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos y en la producción de energía.

El análisis comparativo de los perfiles transcriptómicos desveló que genes implicados en la regulación de la forma celular, así como genes implicados en la producción de cápsula, estaban regulados al alza al 1% NaCl. En línea con este resultado, el análisis comparativo de la morfología celular de RM-71 a ambas concentraciones de salinidad mediante microscopía reveló que las células crecidas al 1% NaCl eran significativamente más alargadas y estrechas que las células crecidas al 3% de NaCl. En cuanto a la cápsula, las mediciones realizadas revelaron un aumento moderado, aunque significativo, del grosor de la cápsula al 3% de NaCl. Estos resultados, aparentemente contradictorios, apuntan a la participación de mecanismos adicionales, todavía desconocidos, implicados en la producción de cápsula en *Pdd*.

El análisis del perfil transcriptómico inducido al 3% NaCl desveló la sobrerregulación de genes implicados en el metabolismo de los carbohidratos y de la producción de energía, destacando los genes para las subunidades de la ATP sintasa, que se encontraban entre los 20 genes más inducidos a elevada salinidad. Esta sobrerregulación de la maquinaria de síntesis de ATP podría explicar, al menos en parte, el mayor crecimiento de *Pdd* al 3% NaCl con respecto al 1% NaCl. El crecimiento al 3% NaCl también sobrerreguló genes implicados en la síntesis de solutos compatibles, como el sistema *proU* de captación de glicina betaína y prolina.

Además, encontramos que los genes para dos posibles sistemas PTS, uno específico para trehalosa y otro para fructosa, estaban inducidos a elevada salinidad en la cepa de *Pdd* RM-71. En concordancia con los resultados transcriptómicos, el crecimiento de la cepa RM-71 en placas de medio O/F-trehalosa y O/F-fructosa mostró una mayor producción de ácido al 3% NaCl que al 1% NaCl. Así mismo, los experimentos de crecimiento en medio mínimo demostraron que al 3% NaCl tanto la fructosa como la trehalosa confieren mayores niveles de crecimiento (medido como DO<sub>600</sub>) que la glucosa, mientras que al 1% NaCl, la glucosa permitió mayores tasas de crecimiento. Estas observaciones indican que, a la salinidad del agua de mar, la utilización de trehalosa y fructosa es mayor en comparación con la glucosa. Considerando que la trehalosa y la fructosa son abundantes en el medio marino, estos resultados tienen una notable importancia biológica y abren la puerta a futuros estudios sobre el papel de estos sistemas en *Pdd*.

En este trabajo descubrimos también que la salinidad no solo modula la utilización de determinados carbohidratos en *Pdd*, sino que también causa un efecto drástico en la resistencia a los antibióticos. Los experimentos realizados demostraron que el crecimiento de la cepa RM-71 al 3% NaCl aumenta la tolerancia a los antibióticos ampicilina, kanamicina y vancomicina. Curiosamente, al pasar células crecidas al 3% NaCl en presencia de los antibióticos a medio fresco suplementado observamos que el fenotipo de tolerancia inducida al 3% NaCl se mantiene para los tres antibióticos testados. Este resultado sugiere que esta tolerancia inducida se debe a un mecanismo dependiente de la

salinidad y no a la selección de mutaciones estables que estarían confiriendo resistencia a los antibióticos. En el análisis comparativo del transcriptoma identificamos genes que han sido estudiados en otras especies bacterianas y cuya sobreexpresión al 3% NaCl podría explicar la elevada resistencia de *Pdd* a estos antimicrobianos. El papel de estos genes en el incremento en la resistencia observada al 3% NaCl en *Pdd* todavía se desconoce y sin duda merecerá futuras investigaciones.

*Pdd* es uno de los pocos vibrios positivos para la prueba de la arginina deiminasa/dihidrolasa, un test fenotípico clave en la taxonomía e identificación de vibrios. Curiosamente, el análisis RNA-seq reveló la sobreexpresión de diversas rutas del metabolismo de los aminoácidos al 3% NaCl, con especial énfasis en los genes del operón *arcACBD*, implicados en la ruta de la arginina deiminasa (ADI). Del mismo modo, los genes de otra vía catabólica de la arginina, la ruta de la arginina succinil transferasa, así como el gen para la arginina decarboxilasa, también estaban regulados al alza al 3% NaCl.

Para conocer el papel de la ruta ADI en *Pdd*, mutamos el gen *arcA* mediante intercambio alélico. El mutante para este gen ( $\Delta arcA$ ), mostró un cambio visible en la prueba clásica para la arginina deiminasa y una disminución leve, aunque significativa, en la viabilidad a pH 4 al 3% NaCl en comparación con la cepa salvaje. Paralelamente, este experimento desveló que la supervivencia de *Pdd* a pH 4 al 3% NaCl fue de casi 3 órdenes de magnitud mayor que al 1% NaCl, sugiriendo el papel de la salinidad en la resistencia de *Pdd* a la acidez. La cepa  $\Delta arcA$  no mostró afectación en la motilidad en anaerobiosis al 3% NaCl con respecto a la cepa salvaje, aunque sí al 1% NaCl. Este resultado contradictorio motiva la necesidad de seguir investigando el papel de la ruta ADI en la motilidad de *Pdd*.

Dentro del perfil transcriptómico inducido al 1% NaCl encontramos genes implicados en diversas funciones relacionadas con la virulencia como la quimiotaxis y la motilidad, la síntesis y captación de poliaminas y con especial énfasis, los mecanismos de adquisición de hierro y las citotoxinas. Sorprendentemente, la lista de genes sobreexpresados al 1% NaCl estaba encabezada por dos genes, *pirA* y *pirB*, candidatos a constituir una toxina putativa del tipo PirAB similar a la producida por *Vibrio parahaemolyticus*.

La mutación del gen *pirB* no causó ningún impacto en la virulencia de *Pdd* para rodaballo, sin embargo, sería interesante testar el papel de esta toxina en otros hospedadores en futuros estudios.

En línea con los resultados transcriptómicos, el estudio comparativo de los perfiles SDS-PAGE de los sobrenadantes de RM-71 obtenidos al 1% y al 3% NaCl reveló que la mayoría de las proteínas secretadas eran más abundantes a baja salinidad. Las proteínas que mostraron una mayor abundancia fueron las citotoxinas Dly, PhlyP y PhlyC y las proteínas PirA y PirB. Estos resultados confirman que el cambio de alta a baja salinidad desencadena un perfil de virulencia en *Pdd*.

Además, el análisis del perfil transcripcional del plásmido pPHDD1 en respuesta a baja salinidad reveló la sobregulación de potenciales factores de virulencia de *Pdd* cuyos genes se distribuían en regiones específicas dentro del plásmido. El primer grupo de genes incluía las citotoxinas plasmídicas Dly y PhlyP, así como 5 genes sobrerregulados candidatos a constituir un posible transportador AcrAB-TolC. El segundo grupo de genes incluyó el gen para la proteína de membrana U (OmpU), dos proteínas de función hipotética y dos genes que codifican proteínas homólogas a Vep07 y Vep20, implicadas en la resistencia al suero y en la virulencia en *V. vulnificus*.

Considerando los resultados descritos en esta primera sección, proponemos que la disminución de la concentración de NaCl que experimenta *Pdd* al entrar en el hospedador (del 3% al 1% NaCl), desencadena un programa genético de virulencia a través de la fuerte regulación de la abundancia de citotoxinas en la fracción del secretoma, la traducción de proteínas, la expresión de sistemas de adquisición de hierro y otras funciones relacionadas con la virulencia. Por el contrario, el crecimiento a la salinidad próxima a la del ambiente marino (3% NaCl), regula al alza la captación de solutos compatibles, induce los sistemas de producción de energía, el uso de fructosa y trehalosa como fuentes de carbono, el metabolismo del nitrógeno y de los aminoácidos, con un especial énfasis en las enzimas del sistema ADI (Arginina deiminasa), que podrían desempeñar un papel en la resistencia a pH ácido.

Este estudio nos ha permitido desentrañar la respuesta de *Pdd* a los cambios en la salinidad y ha puesto en primer plano una serie de potenciales factores de virulencia candidatos codificados en el plásmido pPHDD1 cuya expresión genética se induce a bajo NaCl. Un estudio previo ha demostrado que el gen *vep20-like*, que codifica para un receptor putativo de unión a transferrina, también se sobreexpresa en *Pdd* bajo condiciones limitantes de hierro. La sobreexpresión de Vep20-Like, que denominamos TbpD (Transferrin binding protein from *P. damsela*e), bajo dos condiciones ambientales inductoras de la virulencia (baja salinidad y bajo hierro), nos motivaron a investigar su papel en la patogenicidad de *Pdd*.

En la segunda parte de esta tesis, nos propusimos investigar la función biológica de la proteína TbpD en *Pdd*. Para este fin, mutamos por intercambio alélico el gen *tbpD* en la cepa altamente virulenta RM-71 y realizamos numerosos experimentos *in vitro* e *in vivo* para conocer su papel en la fisiología y en la virulencia de *Pdd*. Los resultados obtenidos demostraron que TbpD es una proteína de membrana externa regulada por hierro y necesaria para el crecimiento de *Pdd* en sangre y plasma de peces, probablemente a través de la unión a una proteína quelante de hierro.

Los ensayos de virulencia realizados demostraron que la mutación del gen *tbpD* afecta severamente en la virulencia de *Pdd* para rodaballo, pero no para lubina, sugiriendo que TbpD podría ser un factor de virulencia específico de hospedador. En base a los resultados obtenidos, hipotetizamos que esta disparidad en la virulencia podría estar respaldada por diferencias en la capacidad del mutante para colonizar los órganos internos de rodaballo y lubina. Para demostrarlo realizamos un experimento de colonización competitiva a través de la inoculación intraperitoneal de una mezcla en proporción 1:1 de la cepa salvaje y de la cepa mutante en rodaballo y lubina. En línea con lo esperado, el mutante mostró una clara desventaja con respecto a la cepa salvaje para colonizar los órganos internos del rodaballo, resultado que apoya la severa afectación de  $\Delta$ *tbpD* en la virulencia para esta especie. Teniendo en cuenta que la cepa  $\Delta$ *tbpD* no mostró diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje en la virulencia para lubina, sería esperable que el mutante presentase entonces una capacidad

similar a la cepa salvaje para colonizar los órganos internos del pez. Sin embargo, aunque el número de colonias recuperadas del mutante fue mayor en el bazo que en el riñón, encontramos que la cepa mutante seguía estando en clara desventaja con respecto a la cepa salvaje en su capacidad para colonizar los órganos internos de la lubina. En este caso hipotetizamos que la función del bazo de los peces como reservorio de eritrocitos, podría reducir la presión selectiva sobre la captación de hierro quelado del hospedador, resultando en una menor afectación del mutante en la colonización del bazo con respecto al riñón. Además, se comprobó que la mutación del gen *tbpD* no altera la capacidad hemolítica de la cepa mutante con respecto a la cepa salvaje, de manera que la cantidad de hemoglobina liberada del bazo podría suponer una condición menos restrictiva para la colonización de este órgano por *Pdd*.

El análisis *in silico* en diferentes cepas de *Pdd* reveló que tanto la secuencia aminoacídica de TbpD como el contexto genético de la secuencia flanqueante del gen *tbpD* están altamente conservados en esta subespecie. Mediante RT-PCR demostramos que *tbpD* se cotranscribe con el gen *vep07-like*, homólogo al gen de la proteína Vep07 de *V. vulnificus* y que esta organización genética constituye una característica muy conservada en los aislados de *Pdd*. La búsqueda *in silico* constató la presencia de homólogos a TbpD en plásmidos transferibles de otras especies patógenas de la familia *Vibrionaceae* como *V. vulnificus* (pVvbt2), *V. harveyi* (pVh1) y *Aliivibrio wodanis* (pAWOD920). La presencia de homólogos a TbpD en plásmidos conjugativos sugiere que su adquisición podría favorecer su persistencia en determinadas líneas clonales en el ambiente.

Conocer los puntos débiles de la patobiología de *Pdd* resulta crucial para delinear aplicaciones prácticas destinadas a su prevención y control. El avance y el conocimiento de los mecanismos de virulencia y de su regulación a través de técnicas de ingeniería genética ha propiciado la necesidad de diseñar nuevos vectores para la complementación genética de *Pdd*. Esta necesidad nos motivó a construir en la presente tesis un vector modular como nueva herramienta para la ingeniería genética de *Pdd* y cuyo uso pudiese

extenderse a otras bacterias marinas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*.

Los resultados obtenidos, recogidos en la tercera parte de la presente tesis, condujeron a la construcción de dos vectores: el vector pVibexp y el vector pA-162-Vibexp. El vector pVibexp se compuso de 5 módulos funcionales: (1) un origen de replicación *oriV* del tipo MRB (obtenido del plásmido de virulencia pPHDP10 de la cepa DI-21 de *P. damsela* subsp. *piscicida*; *Pdp*), (2) un origen de transferencia *oriT* del tipo R6K/RP2, (3) el promotor y péptido señal del gen *dly* de la cepa RM-71 de *Pdd* para la clonación de genes de interés (GOIs), (4) la cola de histidina (6-HisTag) y los terminadores T1 y T2 del gen *rrnB* y por último (5), la secuencia correspondiente al sitio de clonación múltiple (MCS). Como marcador de selección se seleccionó el gen de resistencia a cloranfenicol, que fue amplificado desde el plásmido pKD3 y que se clonó en el MCS de la plataforma. De este modo, la secuencia MCS constituye un “módulo de carga”, que más allá de servir de punto de clonación para el marcador de resistencia, le atribuye a este vector diversas utilidades como, por ejemplo, para la complementación genética mediante la clonación de genes con un promotor nativo.

Los resultados obtenidos demostraron que el vector pVibexp es replicativo, seleccionable y movilizable por conjugación a diversas cepas de *Pdd*, de *Pdp* y a *Vibrio natriegens*. Además, para testar la utilidad de pVibexp como vector de expresión de proteínas recombinantes clonamos el gen *dly* de *Pdd* bajo el control del promotor y del péptido señal del vector. Los resultados obtenidos demostraron que el vector pVibexp es un vector funcional para la producción y secreción de la toxina Dly en varias cepas de *Pdd* y *Pdp* y permitieron validar los cebadores diseñados para la clonación de GOIs en la plataforma.

Además, la búsqueda *in silico* permitió identificar, por primera vez, un plásmido del tipo MRB en una cepa de *Pdd*. La clonación de todos los módulos de la plataforma pVibexp, a excepción del *oriV*, en este plásmido nativo aislado de la cepa de *Pdd* A-162, dio lugar al vector pA-162-Vibexp. La clonación del gen *tbpD* en el MCS de esta plataforma ha permitido realizar con éxito la complementación génica del mutante  $\Delta$ *tbpD* de *Pdd*, obtenido durante el transcurso de esta tesis.

Así mismo, los resultados obtenidos demostraron que el vector pA-162-Vibexp es funcional en *P. damsela* subsp. *piscicida* y en *V. natriegens*, de manera que su utilidad podría extenderse a otros miembros de la familia *Vibrionaceae*. Además, la clonación de la fosfolipasa de *Pseudoalteromonas citrea*, bajo el control del promotor y del péptido señal del gen *dly* ha permitido constatar que la plataforma pA-162-Vibexp permite la expresión y secreción de esta fosfolipasa heteróloga en *Pdd*. Estos resultados preliminares demuestran que el vector diseñado es una herramienta genética con potencial para la producción y secreción de proteínas recombinantes en *Pdd*.

Los resultados obtenidos en esta tesis nos han permitido conocer un poco más acerca de la influencia de la salinidad en la modulación de la expresión genética, en la fisiología y en la patobiología de *Pdd* y nos ha llevado a identificar un nuevo mecanismo de adquisición de hierro, implicado en la virulencia, en este patógeno marino. Este avance en el conocimiento sobre *Pdd* ha impulsado la necesidad de diseñar nuevas herramientas para la ingeniería genética de esta bacteria marina. En esta tesis hemos diseñado y construido dos vectores plasmídicos que han demostrado ser replicativos, seleccionables y fácilmente movilizables por conjugación tanto a *Pdd* como a otros vibrios, útiles para la complementación genética de *Pdd* y son herramientas genéticas con potencial para la producción de proteínas recombinantes en *P. damsela* como organismo factoría

## SUMMARY

The family *Vibrionaceae* comprises a genetically and metabolically diverse group of bacteria widely distributed in the aquatic environment, predominantly in saline waters. Most species thrive in a free-living lifestyle in the ocean environment, attached to suspended particles and colonizing biotic and abiotic surfaces. However, some species also present pathogenic stages in their life cycle, representing a considerable threat to animal and human welfare.

Included in this family, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (*Pdd*), is a versatile and generalist pathogen causing severe infections in a wide range of animal species and in humans. Likewise, *Pdd* has been isolated in marine ecosystems from diverse sources such as ocean waters, sediments, plankton, floating mucilages, mollusks and as part of the microbiota of marine animals. In addition, *Pdd* is a pathogen of increasing financial concern that causes primary disease in crustaceans and in countless species of fish, wild as well as cultivated in aquaculture facilities in different parts of the globe. *Pdd* is also an opportunistic human pathogen that causes necrotizing fasciitis and fatal septicemia in humans. In many clinical cases, antibiotic treatment are ineffective and amputation of the affected limb is the only solution.

The pathogenicity of *Pdd* is attributed to the production of up to four cytotoxins with hemolytic activity: Dly, PhlyP, PhlyC and PlpV. Two of them, the phospholipase Dly and the pore-forming toxin PhlyP, are encoded in the virulence plasmid pPHDD1, whereas the other two, the pore-forming toxin PhlyC and the phospholipase PlpV, are encoded in the chromosome. Notably, *Pdd* outbreaks are generally caused by multiclonal populations of both plasmid-harboring and plasmidless strains, evidencing the high heterogeneity of this subspecies. In addition, other virulence factors recently identified in *Pdd* include the production of a polysaccharide capsule involved in resistance to host defense mechanisms.

At present, there is no commercial vaccine available against *Pdd* and antibiotic treatment is highly ineffective in both fish and humans. For this reason, determining the factors that modulate the physiology and virulence of *Pdd* is crucial to minimize its damage and for the design of tools for treatment and prevention. In recent years, several studies have linked the increase in temperature and the reduction in salinity, derived from the effect of climate change, with the increase in the number of infections caused by vibrios. However, salinity not only determines the optimal regions for the expansion of vibrio populations, but also plays an important role in the regulation of virulence. In the marine environment, one of the most informative environmental signal of the transition from the free-living to the infective phase is the drop in NaCl concentration encountered by the bacteria in the internal environment of the vertebrate host. In this context, facultative pathogenic bacteria, such as *Pdd*, have to tightly regulate the expression of virulence factors so that their production is maximized inside the host.

Regarding the role of salinity in *Pdd*, previous studies have shown that NaCl levels modulate the transcriptional activity of the promoters of the three cytotoxins Dly, PhlyP and PhlyC. Although this previous evidence already pointed to the drop in NaCl concentration as a virulence-activating signal in *Pdd*, the role of salinity in the regulation of gene expression was still unknown. For this reason, in the first part of this thesis we focused on studying the response of *Pdd* to changes in NaCl concentration. For this purpose, we performed a comparative analysis of the transcriptomic profiles of the highly virulent strain RM-71 grown at a marine-like salinity (3% NaCl) and at a salinity similar to that of the internal milieu of the host (1% NaCl). In this work we further demonstrate that *Pdd* grown at 3% NaCl reaches a slightly higher OD<sub>600</sub> at the end of the exponential phase when compared to 1% NaCl.

To assess the genetic response of *Pdd* upon host entry, growth at 3% NaCl was established as the control condition and was compared with the transcriptomic profile obtained at 1% NaCl. Thus, genes with positive Fold Change (FC) values would correspond to genes induced or upregulated at 1% NaCl, while those with negative FC values would

correspond to genes downregulated at 1% NaCl or, in other words, induced at 3% NaCl. The analysis identified the presence of 1808 Differentially Expressed Genes (DEGs) of which 888 were upregulated ( $FC > 1.5$ ) and 920 were downregulated ( $FC < -1.5$ ) at 1% NaCl with respect to 3% NaCl. The number of DEGs at each condition was balanced on the two chromosomes as well as on the virulence plasmid pPHDD1. Interestingly, functional classification of DEGs revealed that most of the genes induced at 1% NaCl were assigned to translation category. Other genes upregulated at low salinity were mostly assigned to categories involved in inorganic ion metabolism and transport, membrane biogenesis, and cell motility. In contrast, among the genes upregulated at 3% NaCl, the most abundant functional categories were those involved in amino acid and carbohydrate metabolism and energy production.

The comparative analysis of transcriptomic profiles revealed that genes involved in cell shape regulation and capsule production, were up-regulated at 1% NaCl. In line with these results, comparative analysis of RM-71 cell morphology at both salinity concentrations by microscopy revealed that cells grown at 1% NaCl had a more elongated shape and were narrower than cells grown at 3% NaCl. Regarding the capsule, measurements revealed a moderate but significant increase in capsule thickness at 3% NaCl. These apparently contradictory results point to the participation of additional, as yet unknown, mechanisms involved in capsule production in *Pdd*.

Analysis of the transcriptomic profile induced at 3% NaCl revealed the upregulation of genes involved in carbohydrate metabolism and energy production, with an emphasis on the genes for ATP synthase subunits, which were among the top-20 most upregulated genes. This upregulation of the ATP synthesis machinery might account, at least in part, for the higher growth of *Pdd* at 3% NaCl. Growth at 3% NaCl also upregulated genes involved in the synthesis and transport of compatible solutes, such as the *proU* system for glycine betaine and proline uptake.

In addition, we found that genes for two putative PTS systems, one specific for trehalose and one for fructose, were induced at high salinity in *Pdd*. Consistent with the transcriptomic results, when we

streaked *Pdd* RM-71 on O/F (oxidation–fermentation) plates supplemented with either trehalose or fructose, we observed a visibly higher production of acid at 3% NaCl than at 1% NaCl. In line with these results, growth experiments on minimal medium (CM9) showed that at 3% NaCl, fructose and trehalose conferred higher growth rates (measured as OD<sub>600</sub>) than glucose, whereas at 1% NaCl, glucose allowed higher growth rates. These observations indicate that, at seawater salinity, the utilization of trehalose and fructose is higher compared to glucose. Considering that trehalose and fructose are abundant in the marine environment, these results have notable biological significance and pave the way to future studies on the role of these systems in *Pdd*.

In this work we also discovered that salinity does not only modulates carbohydrate utilization in *Pdd*, but also has a drastic effect on antibiotic resistance. Experiments showed that growth of strain RM-71 at 3% NaCl increases tolerance to the antibiotics ampicillin, kanamycin and vancomycin. Interestingly, when cells grown at 3% NaCl in the presence of the antibiotics were passaged to fresh antibiotic-supplemented medium, the phenotype of increased tolerance at 3% NaCl was maintained for the three antibiotics tested. This result suggests that the NaCl-induced tolerance is a salinity-dependent response and is not a consequence of the selection of stable mutations conferring antibiotic resistance. The analysis of the RNA-seq results identified genes that have been studied in other bacterial species and whose overexpression at 3% NaCl could account for the increased resistance to these antibiotics. The role of these genes in the increased resistance observed at 3% NaCl in *Pdd* is still unknown and will undoubtedly deserve future research.

*Pdd* is one of the few vibrios that produce arginine deiminase/dihydrolase, a key phenotypical test in taxonomy and identification of vibrios. Interestingly, RNA-seq analysis revealed that growth at 3% NaCl upregulates genes for several amino acid metabolism pathways, with a particular emphasis on the genes for the *arcACBD* operon involved in the arginine deiminase (ADI) pathway. Similarly, additional arginine catabolic pathways, such as the arginine

succinyl transferase pathway, as well as the gene for arginine decarboxylase, were also up-regulated at 3% NaCl.

To gain insight into the role of the ADI pathway in *Pdd*, we delete the *arcA* gene by allelic exchange. The mutant for this gene ( $\Delta arcA$ ), showed a visible change in the classical assay for arginine deiminase and a slight, although significant, decrease in viability at pH 4 at 3% NaCl compared to the wild-type strain. In parallel, this experiment unveiled that *Pdd* survival at pH 4 was almost 3 orders of magnitude higher at 3% NaCl than at 1% NaCl, suggesting that salinity has a major impact in *Pdd* survival at pH 4. The  $\Delta arcA$  strain showed no impairment in swimming motility under anaerobiosis at 3% NaCl when compared to the wild-type strain but exhibited significant impairment under aerobiosis in the presence of supplemented L-arginine at 1% NaCl. This contradictory result indicates that the role of ADI pathway in *Pdd* motility needs additional investigation.

We found that 1% NaCl upregulates many gene functions potentially related to virulence in *Pdd*. These functions include motility and chemotaxis, synthesis and uptake of polyamines, stress response mechanisms and efflux systems, and, notably, iron acquisition mechanisms and cytotoxins. Surprisingly, the list of upregulated genes at 1% NaCl was dominated by two genes, *pirA* and *pirB*, candidates to constitute a putative PirAB-type toxin for its similarity to the PirAB toxin produced by some strains of *Vibrio parahaemolyticus*. Mutation of the *pirB* gene had no impact on *Pdd* virulence for turbot; however, considering the broad host range of *Pdd*, it would be interesting to assess the role of this toxin for other animal hosts in future studies.

In line with the transcriptomic results, comparative study of SDS-PAGE profiles of RM-71 supernatants obtained at 1% and 3% NaCl revealed that most of the secreted proteins were more abundant at low salinity. The proteins that showed the highest abundance were the cytotoxins Dly, PhlyP and PhlyC and the proteins PirA and PirB. These results support that the shift from high to low salinity triggers a virulence profile in *Pdd*.

Furthermore, analysis of the transcriptional profile of the pPHDD1 plasmid in response to low salt revealed the upregulation of potential virulence factors of *Pdd* whose genes were distributed in

specific regions within the plasmid. The first set of genes included the plasmid cytotoxins Dly and PhlyP, as well as 5 upregulated genes that constitute a putative multidrug AcrAB-TolC transporter. The second set of genes included the outer membrane protein U (OmpU), two uncharacterized proteins, and two genes encoding proteins homologous to Vep07 and Vep20, involved in serum resistance and virulence in *V. vulnificus*.

Considering the results described in this first section, we propose that the decrease in NaCl concentration experienced by *Pdd* upon entry into the host (from 3% to 1% NaCl), triggers a virulence genetic program by strongly upregulating cytotoxin abundance in the secretome fraction, protein translation, expression of iron acquisition systems and other virulence-related functions. Conversely, growth of *Pdd* at marine-like salinity (3% NaCl), upregulates the uptake of compatible solutes, induces energy production systems, the use of fructose and trehalose as carbon sources and amino acid metabolism, with emphasis on enzymes of the ADS (Arginine deiminase system), which could play a role in acid resistance.

This study has shed light on the response of *Pdd* to changes in salinity and has unveiled the presence of potential candidate virulence factors encoded within pPHDD1 plasmid whose expression was induced at low salt. A previous study has shown that the *vep20-like* gene, which encodes a putative transferrin-binding receptor, is also induced in *Pdd* under iron-limiting conditions. The upregulation of Vep20-Like, named as TbpD (Transferrin binding protein from *P. damsela*), under two virulence-inducing environmental conditions (low salinity and low iron), motivated us to determine its role in the pathogenicity of *Pdd*.

In the second part of this thesis, we aimed to investigate the biological function of the TbpD protein in *Pdd*. To this end, we deleted the *tbpD* gene by allelic exchange in the highly virulent strain RM-71 and performed numerous *in vitro* and *in vivo* experiments to investigate its role in the physiology and virulence of *Pdd*. The results obtained demonstrated that TbpD is an iron-regulated outer membrane protein required for *Pdd* growth in fish blood and plasma, probably through the binding to an iron chelating protein.

The virulence assays performed showed that *tbpD* mutation severely affects the virulence of *Pdd* for turbot, but not for sea bass, suggesting that TbpD could constitute a host-specific virulence factor. Based on the results obtained, we hypothesized that this disparity in virulence could be supported by differences in the ability of the mutant to colonize the internal organs of turbot and sea bass. To demonstrate this, we performed a competitive colonization experiment by intraperitoneal inoculation of a 1:1 mixture of the wild-type and mutant strain in turbot and sea bass. As expected, the mutant showed a clear disadvantage with respect to the wild strain in colonizing the internal organs of turbot, a result that supports the severe impairment of  $\Delta$ *tbpD* in virulence for this species. Considering that  $\Delta$ *tbpD* strain showed no significant differences in virulence for sea bass with respect to the wild-type strain, it would be expected that the mutant would present a similar ability to the wild-type strain to colonize the fish internal organs.

However, although the number of colonies recovered from the mutant was greater in the spleen than in the kidney, we found that the mutant strain was still at a clear disadvantage compared to the wild-type strain in its ability to colonize the internal organs of sea bass. Here we hypothesized that the function of the fish spleen as an erythrocyte reservoir might reduce the selective pressure on the uptake of chelated iron from the host, resulting in a reduced impairment of the mutant in colonizing the spleen relative to the kidney. In addition, it was found that mutation of *tbpD* gene does not affect the hemolytic ability of the mutant with respect to the wild-type strain, so that the amount of hemoglobin released from the spleen could represent a less restrictive condition for the colonization of this organ by *Pdd*.

*In silico* analysis of TbpD in *Pdd* strains revealed that the amino acid sequence and the genetic context of *tbpD* gene are highly conserved in this subspecies. By RT-PCR we demonstrated that *tbpD* is cotranscribed with the *vep07-like* gene, homologous to the *Vep07* protein gene of *V. vulnificus* and that this genetic organization constitutes a conserved feature of *Pdd* isolates. The *in silico* search found the presence of TbpD homologs in transferable plasmids from other pathogenic species of the *Vibrionaceae* family such as *V. vulnificus* (pVvbt2), *V. harveyi* (pVh1) and *Aliivibrio wodanis*

(pAWOD920). The presence of TbpD homologs in conjugative plasmids suggests that their acquisition could favor their persistence in certain clonal lines in the environment.

Identifying the weak points in the pathobiology of *Pdd* is crucial to outline practical applications aimed to its prevention and control. Our understanding on the virulence mechanisms and their regulation through the use of genetic engineering techniques has fueled the need of new plasmid vectors for the genetic complementation of *Pdd*. This necessity prompted us to construct a modular vector as a new tool for the genetic engineering of *Pdd* and that could be potentially extended to other *Vibrionaceae* members.

The results obtained, reported in the third section of the present thesis, led to the construction of two plasmid vectors: the pVibexp vector and the pA-162-Vibexp vector. The pVibexp vector was composed of 5 functional modules: (1) an MRB-like origin of replication (*oriV*), obtained from the virulence plasmid pPHDP10 of *P. damsela* subsp. *piscicida* (*Pdp*) DI-21 strain, (2) an R6K/RP2 origin of transfer (*oriT*), (3) the promoter and the signal peptide of the *dly* gene from *Pdd* RM-71 strain for the cloning of genes of interest (GOIs), (4) the histidine tag (6-HisTag) and the T1 and T2 terminators of the *rrnB* gene and finally (5), the sequence corresponding to a multiple cloning site (MCS). The chloramphenicol resistance gene, which was amplified from plasmid pKD3 and cloned into the MCS of the platform, was selected as a selection marker. In this way, the MCS sequence constitutes a "cargo module", which, beyond serving as a cloning site for the resistance marker, confers various utilities for this vector, such as for genetic complementation by cloning genes with a native promoter.

The results obtained showed that the pVibexp vector is replicative, selectable and mobilizable by conjugation to various strains of *Pdd*, *Pdp* and *V. natriegens*. To test the utility of pVibexp as an expression vector for recombinant proteins, the *dly* gene of *Pdd* was cloned under the control of the promoter and the signal peptide. The obtained findings have provided evidence that pVibexp is a functional vector for the production and secretion of the Dly toxin in several

strains of *Pdd* and *Pdp* and allowed us to validate the primers designed for the cloning of GOIs on the pVibexp platform.

In addition, the *in silico* searches allowed the identification, for the first time, of an MRB-type plasmid in *Pdd*. The cloning of all the modules of the pVibexp platform, with the exception of *oriV* region, into the native plasmid isolated from *Pdd* strain A-162, led to the pA-162-Vibexp vector. The cloning of the *tbpD* gene into the MCS of this platform allowed the successful gene complementation of the  $\Delta$ *tbpD* mutant of *Pdd*, obtained during the course of this thesis. Likewise, the results obtained demonstrated that the pA-162-Vibexp is functional in *P. damsela* subsp. *piscicida* and in *V. natriegens*, so that the utility of this vector could be extended to other members of the *Vibrionaceae* family.

Furthermore, cloning of a phospholipase from *Pseudoalteromonas citrea*, homologous to Dly from *Pdd* RM-71, under the control of the promoter and the signal peptide from the vector has shown that the pA-162-Vibexp platform allows the expression and secretion of this heterologous phospholipase in *Pdd*. These preliminary results demonstrate that the designed vector is a genetic tool with potential for the production and secretion of recombinant proteins in *Pdd*.

The results obtained in this thesis have allowed us to better understand the influence of salinity on the physiology and pathobiology of *Pdd* and have led us to identify a new mechanism of iron acquisition, involved in virulence, in this marine pathogen. This advance in the scientific knowledge about *Pdd* has driven the need to design new tools for the genetic engineering of this marine bacterium. In this thesis we have designed and constructed two plasmid vectors that have been shown to be replicative, selectable and easily mobilized by conjugation to *Pdd* and other vibrios, useful for genetic complementation of *Pdd* and are genetic tools with potential for the production of recombinant proteins in *P. damsela* as a production host.



# 1. INTRODUCCIÓN



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. LA ACUICULTURA: ESTADO ACTUAL Y FUTUROS DESAFÍOS

En un contexto de creciente población mundial, la necesidad de buscar nuevas fuentes de alimento ha propiciado que la acuicultura sea la industria alimentaria que más ha crecido en las últimas décadas (Garlock *et al.*, 2019). Gracias a esta expansión, la acuicultura ha pasado de ser una fuente de alimento prácticamente insignificante antes de los 80, a superar a la pesca en un 14,6 % en 2021 (FAO, 2022). En la actualidad, la acuicultura desempeña un papel fundamental en el desarrollo socioeconómico de regiones costeras y fluviales y supone una fuente primordial de alimento e ingresos para millones de personas en todo el mundo (FAO, 2022).

El crecimiento vertiginoso que ha experimentado la acuicultura a nivel mundial ha llevado a alcanzar un récord histórico en 2020, con una producción de 122,6 millones de toneladas (M t) y superando a la pesca de captura en 31,2 millones de toneladas (Figura 1.1) (Apromar, 2022). China encabeza la producción acuícola mundial con 70,5 millones de toneladas en 2020, estableciendo una gran diferencia con el segundo país de la lista, Indonesia, con 14,9 millones de toneladas producidas (FAO, 2022). En la Unión Europea, España lidera la producción acuícola con 327.309 toneladas en 2021 por un valor de 629 millones de euros. Las principales especies producidas en España son el mejillón (255.303 t en 2021), mayoritariamente en Galicia, donde se produce el 97% del mejillón total nacional, la lubina (23.924 t), la trucha arcoíris (15.357 t), la dorada (9.632 t) y la corvina (6.167 t). Además, la cosecha de rodaballo de acuicultura en España ha alcanzado las 7.629 toneladas en 2021, siendo Galicia la única comunidad autónoma productora (Apromar, 2022).

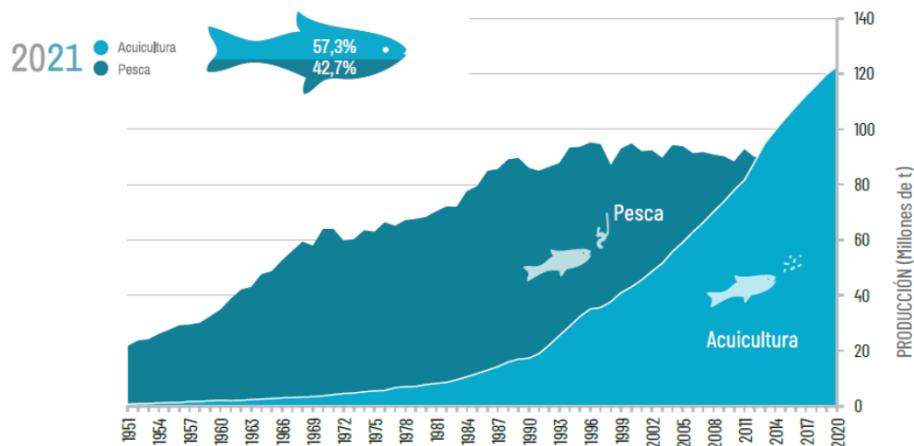


Figura 1.1 Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1951-2020 (Permitida por Apromar, 2022).

Para garantizar una producción sostenible y competitiva, la acuicultura se enfrenta a una serie de desafíos que la Comisión Europea ha identificado en las nuevas Directrices Estratégicas de la UE para el periodo 2021-2030. Entre los principales desafíos de la acuicultura destacan los relacionados con la normativa y el diseño de políticas eficientes (i), la mejora de la gestión del espacio para el desarrollo de la actividad acuícola (ii), garantizar el control de la actividad y la comercialización (iii) y mejorar la sanidad y el bienestar de los animales (iv) (SGP-MAPA, 2022). Con la aplicación de estas estrategias se espera que la acuicultura del futuro sea más resiliente y competitiva y pueda establecerse como un sistema productor seguro y sostenible.

### 1.1.1. Los patógenos bacterianos en la acuicultura

A pesar del extraordinario avance de la acuicultura en los últimos años, esta actividad se enfrenta a una serie de desafíos que ponen en jaque la producción sostenible. En el ámbito de la sanidad y el bienestar animal, las enfermedades animales suponen una de las amenazas más importantes para la producción acuícola (Austin, 2023; FAO, 2022) y se estima que las pérdidas económicas derivadas pueden exceder los 6.000 millones de dólares al año (World Bank, 2014).

Las características propias del proceso de producción acuícola, como son las altas densidades de cultivo, resultan estresantes para las especies cultivadas y aumentan su susceptibilidad a las infecciones. Más allá de las particularidades del sistema de producción, los cambios en las condiciones ambientales, como la temperatura, la salinidad y los niveles de oxígeno, afectan tanto al sistema inmune del hospedador como al patógeno bacteriano, propiciando la aparición de brotes infecciosos (Austin and Austin, 2016).

En el sector acuícola se han reportado infecciones causadas por numerosas especies bacterianas. Entre las bacterias Gram positivas más comunes, destacan los géneros *Lactococcus*, *Nocardia*, *Renibacterium*, *Weisella* y *Streptococcus*. Entre las bacterias Gram negativas más representativas, se incluyen los géneros *Aeromonas*, *Edwardsiella*, *Cryseobacterium*, *Tenacibaculum*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, *Flavobacterium*, *Francisella*, *Piscirickettsia*, *Photobacterium* y *Vibrio* (Pridgeon and Klesius, 2012).

Entre estos destacan los géneros *Photobacterium* y *Vibrio*, pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* que incluye especies patógenas para un amplio rango de especies de importancia económica en el sector acuícola (Ina-Salwany *et al.*, 2019). Entre los miembros del género *Vibrio*, despuntan las especies *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum* y *V. alginolyticus*. Dentro del género *Photobacterium* destaca la especie *Photobacterium damsela* que engloba, por un lado, a la subsp. *piscicida*, causante de pasteurelosis o fotobacteriosis en peces marinos (Romalde, 2002) de creciente importancia en la maricultura mediterránea (Muniesa *et al.*, 2020) y, por otro lado, a la subsp. *damsela*, patógena para un amplio rango de animales marinos y oportunista para el ser humano (Osorio *et al.*, 2018).

### **1.1.2. Medidas de prevención: las vacunas en la acuicultura**

Durante mucho tiempo, el control y el tratamiento de las enfermedades infecciosas en la acuicultura ha recaído en el uso de antibióticos. Sin embargo, la aparición de multiresistencias bacterianas y el impacto negativo a nivel ambiental y sanitario que ha causado el uso generalizado de los antibióticos, ha impulsado la búsqueda de

alternativas eficaces que aseguren la protección y la salud de los animales (Cabello *et al.*, 2013).

Entre estas alternativas destaca la vacunación, uno de los métodos más seguros y eficaces para prevenir y controlar las enfermedades infecciosas (Ma *et al.*, 2019). En la actualidad, son más de 50 las vacunas comerciales disponibles para el uso en peces frente a la infección por bacterias y virus. La mayoría de las vacunas bacterianas comerciales son inactivadas y atenuadas y se administran por inyección o por inmersión (Du *et al.*, 2022). Sin embargo, no todas protegen de manera eficaz y las enfermedades infecciosas continúan causando efectos muy severos en la producción acuícola (Lafferty *et al.*, 2015; Rodger *et al.*, 2016).

Desde las primeras inmunizaciones en peces en los años 40 (Snieszko *et al.*, 1938; Duff, 1942), el avance de la biología molecular ha facilitado el diseño de nuevas vacunas, como las vacunas recombinantes de subunidad. Estas vacunas se obtienen mediante la producción de un antígeno (bien un péptido o bien la proteína completa) en un vector de expresión recombinante. Las características que hacen que una proteína sea la candidata ideal a vacuna son: (i) que esté altamente conservada en las cepas patógenas y (ii) que se exprese en la superficie celular de manera que sea capaz de inducir la respuesta inmune (Du *et al.*, 2022). Hoy en día son varios los ejemplos que demuestran la protección de las vacunas de subunidad frente a distintas especies bacterianas como *V. anguillarum* (Xing *et al.*, 2020), *V. harveyi* (Nguyen *et al.*, 2018) y *Aeromonas hydrophila* (Poobalane *et al.*, 2010).

Las desventajas más relevantes de las vacunas de subunidad recaen en la baja eficacia inmunogénica y en la necesidad de realizar múltiples inmunizaciones y adicionar adyuvantes para potenciar la respuesta inmune (Aly *et al.*, 2021; Mohammadi *et al.*, 2021). Además, estas vacunas están sujetas a la producción de proteínas recombinantes en factorías microbianas, mayoritariamente *Escherichia coli* y levaduras, cuyas modificaciones postraduccionales son distintas a las de la cepa original y que pueden dar lugar a proteínas mal plegadas o mal procesadas que no confieran protección al hospedador (Overton *et al.*, 2014). Cabe destacar que el coste asociado a la producción de las

vacunas recombinantes de subunidad es mucho más elevado, debido principalmente a la naturaleza propia del sistema de producción de las vacunas y a los métodos de procesamiento adicionales requeridos para asegurar su eficacia.

Para hacer frente a estas limitaciones, los retos futuros se centran en buscar sistemas eficientes para la expresión de proteínas recombinantes que permitan abaratar el coste de la producción. Entre algunas de estas estrategias se incluyen: (i) la mejora de las actuales plataformas de expresión, (ii) la búsqueda de nuevos organismos en los que producir las proteínas recombinantes, así como (iii) el diseño de herramientas genéticas complementarias que permitan optimizar su producción (Burdette *et al.*, 2018; Mergulhão *et al.*, 2004).

## **1.2. *PHOTOBACTERIUM DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE***

### **1.2.1. Características generales y taxonomía**

En la década de 1970, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (en adelante *Pdd*) se aisló de infecciones en humanos que se habían originado a través de heridas expuestas al agua del mar (Morris *et al.*, 1982). En la misma época, *Pdd* se aisló de lesiones ulcerosas en la piel de un pez damisela salvaje (*Chromis punctipinnis*) y se asignó al género *Vibrio* (familia *Vibrionaceae*) bajo el nombre de *Vibrio damsela* (Love *et al.*, 1981). Años más tarde, basándose en la comparación de las secuencias de ARNr 5S de varias cepas de la familia *Vibrionaceae*, MacDonell and Colwell (1984) propusieron la inclusión de *Vibrio damsela* y *Vibrio anguillarum* al nuevo género *Listonella* y ambas especies fueron rebautizadas como *Listonella damsela* y *L. anguillara*, respectivamente. Sin embargo, la ausencia de vaina flagelar y la acumulación de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), llevó a la reasignación de *Listonella damsela* al género *Photobacterium* bajo el nombre de *Photobacterium damsela* (Smith *et al.*, 1991). En el año 1995, el análisis de las secuencias del ARNr 16S y las pruebas de hibridación ADN-ADN, confirmaron el elevado nivel de similitud (80%) entre *Pasteurella piscicida* (familia *Pasteurellaceae*), causante de la pasteurelisis en peces, y *Photobacterium damsela*. En consecuencia, ambas pasaron a pertenecer a la especie *Photobacterium damsela* y fueron renombradas como *P. damsela* subsp. *piscicida* y *P. damsela* subsp. *damsela*, respectivamente (Gauthier *et al.*, 1995).

En cuanto a las características generales, *Pdd* es una bacteria marina Gram negativa de la familia *Vibrionaceae* y perteneciente al subgrupo gamma-3 del filo *Proteobacteria* (Gauthier *et al.*, 1995). Esta bacteria presenta morfología bacilar y es móvil por flagelación polar (Figura 1.3). Las características bioquímicas que presenta *Pdd* son: oxidasa positiva, anaerobia facultativa capaz de reducir nitratos a nitritos, crece en medio TCBS (Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa), es sensible al agente vibriostático O/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil fosfato de pteridina) y es positiva para las pruebas de rojo de metilo y Voges-Proskauer. Además, presenta una reacción positiva para la decarboxilación de arginina y negativa para la decarboxilación de lisina y ornitina (Figura 1.2) (Love *et al.*, 1981).

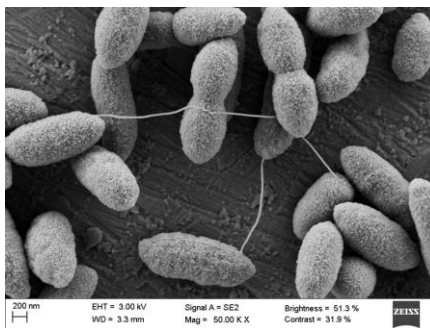


Figura 1.3 Fotografía de microscopía electrónica de barrido (SEM) de *Pdd* RM-71



Figura 1.2 Resultado de la identificación bioquímica de la cepa RM-71 de *Pdd* mediante la prueba API-20E.

*Pdd* fermenta maltosa, manosa y D-glucosa, esta última con producción de gas. Esta bacteria es halófila y crece a concentraciones que van del 1% al 5% NaCl, aunque varios estudios recogen que puede tolerar hasta un 8% NaCl (Fouz *et al.*, 1992; Abdel-Aziz *et al.*, 2013). *Pdd* crece a temperaturas que van de los 15 a los 37 °C (Fouz *et al.*, 1992) aunque algunas cepas pueden incluso crecer a 4 °C y a 40 °C (Botella *et al.*, 2002). El análisis del lipopolisacárido, demostró la elevada diversidad serológica de esta subespecie y la presencia de al menos 4 serogrupos (Fouz *et al.*, 1992). Además, el estudio de las proteínas de membrana mostró diversos patrones cuyas masas moleculares oscilaban entre 20 y 90 kilodalton (Kda) (Fouz *et al.*, 1997). Dado que ese estudio se realizó

hace más de 30 años y con un reducido número de cepas, es posible que el número de serogrupos existentes en esta subespecie sea muy superior. *Pdd* sintetiza una amplia variedad de enzimas degradativas, tales como: hemolisinas (Osorio *et al.*, 2000a; Rivas *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013; Rivas *et al.*, 2014), fosfolipasa (Vences *et al.*, 2017), gelatinasa (Vera *et al.*, 1991; Fouz *et al.*, 1993; Pedersen *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2011, Labella *et al.*, 2010, Vences *et al.*, 2017), amilasa (Labella *et al.*, 2010), lipasa (Pedersen *et al.*, 1997; Labella *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011) acetilcolinesterasa (Pérez *et al.*, 1998), caseinasa (Khouadja *et al.*, 2014) y ureasa (Thyssen *et al.*, 1998; Botella *et al.*, 2002). Cabe destacar que *Pdd* es una subespecie heterogénea y la presencia de estas actividades puede variar en función de la cepa. No obstante, existen una serie de características fenotípicas exclusivas para la subsp. *damselae* y que permiten distinguirla de la subsp. *piscicida* (Tabla 1.1). Entre los caracteres fenotípicos exclusivos para *Pdd* destacan: la motilidad flagelar, la reducción de nitratos a nitritos, la hemólisis de eritrocitos de cordero, la actividad ureasa y la capacidad para crecer a 37 °C; siendo esta última de especial relevancia ya que permite que *Pdd* pueda colonizar e infectar animales homeotermos, como por ejemplo, los humanos.

**Tabla 1.1. Principales diferencias fenotípicas entre *P. damsela* subsp. *damselae* y *P. damsela* subsp. *piscicida***

Carácter fenotípico	subsp. <i>damselae</i>	subsp. <i>piscicida</i>
Motilidad flagelar	+	-
Tinción bipolar	-	+
Crecimiento en TCBS	+ (colonias verdes)	-
Nitrato reductasa	+	-
Lipasa	+	-
Amilasa	+	-
Crecimiento 5% NaCl	+	-
Producción de ácido de maltosa	+	-
Crecimiento a 37 °C	+	-
Hemólisis frente a:		
Eritrocitos de cordero	+	-
Eritrocitos de trucha	+	-
Hospedadores	Peces, Moluscos, Crustáceos, Reptiles, Mamíferos, Ser humano	Peces
Diversidad serológica	+	-

### 1.2.2. *P. damsela* subsp. *damsela*: un patógeno versátil y generalista

La patogenicidad se define como la capacidad de un patógeno para causar daño a un hospedador. La patogenicidad es una característica multifactorial que depende tanto del agente infeccioso como de las interacciones que suceden entre el patógeno y el hospedador, así como de variables ambientales. Así pues, las características genéticas y fisiológicas del microorganismo y del hospedador, así como del ambiente donde suceden estas interacciones, determinan que un individuo infectado enferme o se mantenga sano (Casadevall y Pirofski, 1999; 2003). Entre los atributos que definen la susceptibilidad del individuo y que son claves en la interacción patógeno-hospedador se encuentran: el microbioma, el inóculo, la temperatura, el entorno, la edad, la inmunidad, la nutrición y la genética (Casadevall y Pirofski, 2018).

*Pdd*, antes conocida como *Vibrio damsela*, es una bacteria autóctona de los ecosistemas marinos siendo aislada de fuentes tan diversas como aguas oceánicas costeras (Ortigosa *et al.*, 1989), sedimentos (Cortes y Antillón, 1990), plankton (Montanari *et al.*, 1999), mucílago flotantes (Volterra *et al.*, 1992), moluscos bivalvos (Lozano-León, 2003; Kelly and Stroh, 1989), excrementos de aves marinas (Buck, 1990), tracto digestivo de ballenas (Herwig and Staley, 1986), intestinos de peces y camarones (Yu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2014) y órganos internos de peces aparentemente sanos (Pujalte *et al.*, 2003; Raharjo *et al.*, 2022). Es una bacteria altamente productora de histamina que se aísla con frecuencia de pescado vendido al por menor (Torido *et al.*, 2014; Peters *et al.*, 2021). Además, como se detallará a continuación, *Pdd* es un patógeno versátil y generalista, causante de enfermedad primaria en una amplia gama de animales marinos como crustáceos, innumerables especies de peces, tanto salvajes como cultivados e infecciones oportunistas en humanos (Osorio *et al.*, 2018).

Más allá del primer aislamiento de *Pdd* de las úlceras de un pez damisela (Love *et al.*, 1982), varios estudios han reportado infecciones por esta bacteria en especies salvajes como la dorada (*Sparus aurata*),

la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (Eissa *et al.*, 2018) y la maragota (*Labrus bergylta*) (McMurtrie *et al.*, 2019).

Esta observación demuestra que las condiciones de cautividad no son un requerimiento necesario para el desarrollo de la enfermedad por *Pdd*. En apoyo a esta observación, estudios previos han demostrado que *Pdd* sobrevive a largo plazo en agua de mar y en sedimentos sin perder potencial infeccioso (Fouz *et al.*, 1998, Fouz *et al.*, 2000). Así pues, podemos afirmar que *Pdd* se comporta como una bacteria patógena facultativa, de vida libre y/o asociada a superficies vivas o abióticas en el ambiente marino y con potencial patogénico para una amplia gama de filos animales.

Dentro de las especies de peces cultivadas se han registrado constantemente, a nivel global, brotes infecciosos por *Pdd* en innumerables especies de gran valor económico en el sector acuícola. Entre las especies de peces cultivadas que han sufrido infecciones por *Pdd* destacan, el medregal japonés (*Seriola quinqueradiata*; Sakata *et al.*, 1989), el rodaballo (*Psetta maxima*) en Galicia (España, Fouz *et al.*, 1991; Fouz *et al.*, 1992), la dorada (*Sparus aurata*) y la lubina (*Dicentrarchus labrax*) en el Sur de España así como en toda la costa mediterránea (Egipto, Túnez, Turquía y Grecia) (Vera *et al.*, 1991; Pujalte *et al.*, 2003; Labella *et al.*, 2010; Abdel-Aziz *et al.*, 2013; Khouadja *et al.*, 2014; Uzun and Ogut, 2015; Bellos *et al.*, 2015, Essam *et al.*, 2016; Terceti *et al.*, 2016), el pargo (*Pagrus auriga*), el sargo común (*Diplodus sargus*) y la corvina (*Argyrosomus regius*) en el sur de España (García-Rosado *et al.*, 2007; Labella *et al.*, 2006; Labella *et al.*, 2010), el dentón común (*Dentex dentex*) en Mallorca (España; Company *et al.*, 1999), el pez limón (*Seriola dumerili*) en Murcia (España; Alcaide, 2003), la anguila (*Anguila reinhardtii*), el pargo plateado (*Pagrus auratus*), el atún rojo (*Thunnus macoyii*) y la palometa chilena (*Seriola lalandi*) en Australia (Ketterer and Eaves, 1992; Stephens *et al.*, 2006; Valdenegro-Vega *et al.*, 2013; Gupta *et al.*, 2021), la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) en Dinamarca y Turquía, (Pedersen *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2009; Capkin *et al.*, 2017), percas gigantes (*Lates calcarifer*) en Tailandia y Malasia (Kanchanopas-Barnette *et al.*, 2009; Mohamad *et al.*, 2019), el pargo rojo (*Lutjanus* spp.) y el mero (*Epinephelus* spp.) en Malasia (Mohamad

*et al.*, 2019), la palometa blanca (*Trachinotus ovatus*) en Guangdong (China; Zhao *et al.*, 2009), el fletán (*Paralichthys olivaceus*) en Korea (Kim *et al.*, 2014) y la cobia (*Rachycentron canadum*) en Karwar (India; Sharma *et al.*, 2017).

El impacto en la acuicultura española ha sido tan significativo que *Pdd* ha llegado a aislarse como principal patógeno de peces espáridos en las piscifactorías del sur de España (Labella *et al.*, 2011). Como hemos mencionado anteriormente, la expansión geográfica de este patógeno se constata con la aparición de brotes en piscifactorías de toda la costa mediterránea, concretamente en Egipto, Túnez y Grecia y alcanzando el Mar Negro, donde *Pdd* se ha aislado en Turquía de brotes en piscifactorías de lubina (Terceti *et al.*, 2016; Uzun and Ogut, 2015).

En la actualidad, *Pdd* constituye una amenaza emergente para el cultivo de especies de reciente introducción en la acuicultura asiática como son la palometa plateada (*Pampus argenteus*), el lenguado chino (*Cynoglossus semilaevis*) y el pez roca (*Sebastes schlegeli*) (Tao *et al.*, 2018; Shao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

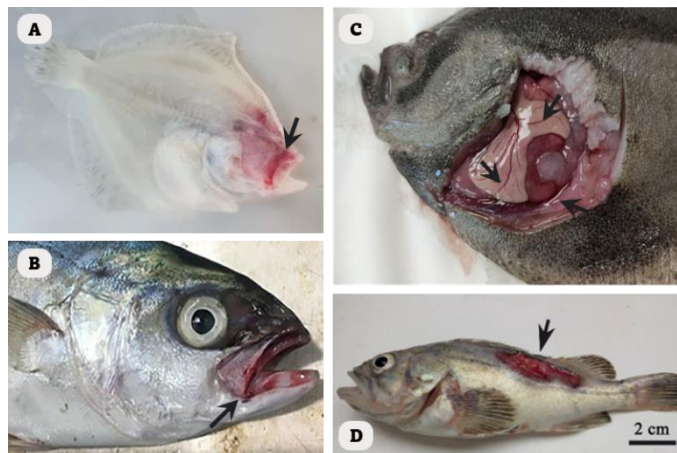
Sin embargo, los problemas ocasionados por *Pdd* no se limitan a la piscicultura. Estudios recientes confirman el peligro que esta bacteria supone para el cultivo de determinadas especies de crustáceos, como son: el camarón limpiador del Pacífico (*Lysmata amboinensis*) en Korea del sur (Choi *et al.*, 2018), el cangrejo de los manglares en China (*Scylla paramamosain*; Xie *et al.*, 2021) y el langostino del Pacífico (*Litopenaeus vannamei*) en México, Estados Unidos y China (Aguilera-Rivera *et al.*, 2019; Bachand *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2020).

Como patógeno generalista, *Pdd* compromete la salud de infinidad de especies de distintos filos. Entre ellos destacan los tiburones (*Carcharhinus plumbeus* y *Squalus acanthias*; Grimes *et al.*, 1984a; Grimes *et al.*, 1984b), el pulpo (*Octopus joubini* and *O. briareus*; Hanlon *et al.*, 1984), la tortuga laúd (*Dermochelys coriacea*; Obendorf *et al.*, 1987; Oliver-Guimerá *et al.*, 2019), la tortuga verde (*Chelonia mydas*; Aguirre *et al.*, 1994) y la tortuga boba (*Caretta caretta*; Alba *et al.*, 2016).

*Pdd* presenta una elevada capacidad para adherirse al mucus y todas las evidencias apuntan a la piel como la vía de entrada más probable. Estudios previos han demostrado que la enfermedad se

transmite a través del agua del mar y que la dispersión de esta bacteria está determinada por la temperatura (Fouz *et al.*, 2000).

Aunque la sintomatología que presentan los animales infectados puede variar en función de la especie y de cada individuo, los síntomas externos más comunes incluyen: hemorragias alrededor de la boca, ano, ojos, base de las aletas, distensión abdominal y úlceras cutáneas. A nivel interno, los síntomas incluyen una gran cantidad de líquido intraperitoneal y en algunos casos, hígado pálido con abundantes petequias hemorrágicas (Fouz *et al.*, 1991; Fouz *et al.*, 1992) (Figura 1.4).



**Figura 1.4** Signos externos e internos en peces por infección de *P. damsela* subsp. *damsela*. La flechas negras indican distintas manifestaciones clínicas como hemorragias alrededor de la boca en rodaballo (A) y en palometa chilena (B) (imagen obtenida con permiso de Gupta *et al.*, 2021), hígado pálido con petequias hemorrágicas y acumulación de líquido intraperitoneal en rodaballo (C) y presencia de úlceras cutáneas en pez roca (D) (imagen obtenida con permiso de Zhang *et al.*, 2019).

Dada la capacidad de algunas de sus cepas para crecer a 37 °C, *Pdd* causa infecciones en numerosas especies de animales homeotermos, como los cetáceos. Por citar un caso reciente, *Pdd* se ha aislado como agente causal de neumonía en un delfín botella varado en la costa mediterránea (*Tursiops truncatus*; Morick *et al.*, 2023).

Lejos de ser un caso aislado, son numerosos los ejemplos que documentan infecciones por *Pdd* en delfines (Buck *et al.*, 1991; Elad *et al.*, 2011) y otros cetáceos como el rorcual de Bryde (*Balaenoptera brydei*; Buck *et al.*, 1991). Además, *Pdd* también se ha aislado de cetáceos sanos, por ejemplo, el delfín botella (Buck *et al.*, 2006) y el delfín listado (*Stenella coeruleoalba*; Godoy-Vitorino *et al.*, 2017).

En su papel como patógeno de animales homeotermos, *Pdd* causa también infecciones oportunistas en humanos. En la mayoría de los casos, las infecciones se originan a través de heridas en contacto con agua salada o salobre (Morris *et al.*, 1982, Nakamura *et al.*, 2008, Hundenborn *et al.*, 2013; Chochlakis *et al.*, 2019; Schwartz *et al.*, 2022) o a través de heridas infligidas durante el manejo de peces (Yamane *et al.*, 2004; Akram *et al.*, 2015; Collins *et al.*, 2017; Martin *et al.*, 2022). Además, en la literatura se han reportado casos inusuales donde la infección por *Pdd* sucede a través del tracto urinario (Morris *et al.*, 1982; Álvarez *et al.*, 2006) o por la ingestión de marisco crudo (Kim *et al.*, 2009).

Las infecciones causadas por *Pdd* suelen progresar rápidamente y pueden llegar a causar una fascitis necrotizante muy agresiva que solo se solventa con la extirpación del tejido o la amputación de la extremidad afectada (Coffey *et al.* 1986; Barber and Swygert, 2000; Nakamura *et al.*, 2008; Collins *et al.*, 2017); aunque en algunos casos puede resultar mortal (Yuen *et al.*, 1993; Tang and Wong, 1999; Goodell *et al.*, 2004; Yamane *et al.*, 2004). En la Figura 1.5, se muestran los signos más frecuentes de las infecciones por *Pdd* en humanos. Las manifestaciones clínicas más comunes incluyen heridas abiertas, edema, eritema, celulitis, lesiones bullosas hemorrágicas o septicemia (Dryden *et al.* 1989; Perez-Tirse *et al.*, 1993; Hundenborn *et al.*, 2013; Chochlakis *et al.*, 2019; Sahu *et al.*, 2020).

Aunque se han notificado casos de fascitis necrotizante en personas sanas (Yuen *et al.*, 1993; Perez-Tirse *et al.*, 1993 Tang and Wong, 1999; Barber and Swygert, 2000; Chochlakis *et al.*, 2019), aquellos individuos con enfermedades subyacentes relacionadas con la sobrecarga de hierro (como diabetes melitus y hepatopatía crónica) parecen ser más susceptibles a la infección por *Pdd* (Yamane *et al.*, 2004; Clarridge y Zighelboim-Daum, 1985; Kim *et al.*, 2009).

En consonancia con estas observaciones, se ha demostrado que la virulencia de *Pdd* aumenta de manera notable para peces y ratones cuando estos son inyectados con un extra de hierro (Fouz *et al.*, 1994; Rivas *et al.*, 2013).

La mayoría de los casos de infección por *Pdd* en humanos han tenido lugar en las áreas costeras de Estados Unidos, Japón y Australia, aunque existe una creciente preocupación por la aparición de casos en regiones europeas como Grecia (Chochlakis *et al.*, 2019), Portugal (Guimaraes *et al.*, 2020), España (Schröttner *et al.*, 2020) y más recientemente, en Italia (Caddia *et al.*, 2022).



**Figura 1.5** Manifestaciones clínicas más comunes en humanos causadas por la infección de *P. damsela* subsp. *damsela*. (A) Edema significativo con lesiones hemorrágicas (imagen obtenida de Schwartz *et al.*, 2022 bajo licencia CC BY-NC-ND). (B) Lesión ulcerosa con hiperemia e hinchazón (imagen obtenida de Caddia *et al.*, 2022 bajo licencia CC BY-NC-SA 4.0) (C) Lesión bullosa y hemorrágica (imagen obtenida con permiso de Akram *et al.*, 2015).

Además, en la literatura encontramos varios casos en los que se reporta el aislamiento conjunto de *Pdd* y *V. harveyi*. Tres de estos casos se dieron en infecciones humanas (Hundenborn *et al.*, 2013; Akram *et al.*, 2015; Chochlakis *et al.*, 2019) mientras que en otros casos, el aislamiento conjunto de ambas especies bacterianas tuvo lugar en lubina (*Sparus aurata*) y pargo plateado (*Pagrus auratus*; Pujalte *et al.*, 2003; Stephens *et al.*, 2006) y cobia (*Rachycentron canadum*; Sulumane Ramachandra *et al.*, 2021).

### 1.2.3. Tratamiento y medidas de prevención

Como hemos mencionado, el control de los brotes infecciosos en la acuicultura ha recaído históricamente en el uso de antibióticos. Entre los antibióticos comúnmente utilizados en maricultura para el tratamiento de brotes infecciosos destacan la oxitetraciclina, el florfenicol y el sulfametoxazol/trimetoprima (Alday-Sanz *et al.*, 2012). Sin embargo, el tratamiento con antibióticos frente a *Pdd* es poco eficaz en peces y prácticamente ineficaz en humanos (Fraser *et al.*, 1997; Yamane *et al.*, 2004) y su uso generalizado ha propiciado la aparición de multiresistencias en este patógeno. En concreto, varios estudios han reportado el aislamiento de cepas de *Pdd* multirresistentes en piscifactorías de distintas partes del mundo, como en Egipto (Essam *et al.*, 2016), Taiwan (Chiu *et al.*, 2013) y la India (Petchimuthu *et al.*, 2022). Además, el estudio de cepas de *Pdd* multirresistentes procedentes de piscifactorías del Mar Negro, permitió identificar hasta cuatro versiones distintas de un plásmido conjugativo del tipo pAQU1 (Vences *et al.*, 2020) cuya presencia hasta ese momento, se restringía a aislados procedentes de Japón (Nonaka *et al.*, 2012). También se han aislado cepas humanas que mostraban resistencia a aminoglucósidos, sulfamidas y macrólidos (Schrötter *et al.*, 2020; Yamane *et al.*, 2004; Caddia *et al.*, 2022) y en la mayoría de los casos, la base molecular de estas resistencias es todavía desconocida.

Además de la ineficacia de los antibióticos, no existe ninguna vacuna comercial disponible para *P. damsela* subsp. *damsela*. En consecuencia, las medidas preventivas frente a la infección por este patógeno recaen fundamentalmente en el uso de buenas prácticas acuícolas como son la puesta en cuarentena de los individuos y la desinfección de las instalaciones. Por otra parte, para asegurar la salud y el bienestar animal, las medidas se centran en (i) proveer alimento de buena calidad, (ii) prevenir el estrés y (iii) mejorar la resistencia a las enfermedades de los stocks cultivados (Defoirdt *et al.*, 2011). Por estas razones, urge la necesidad de proporcionar una vacuna que sea efectiva para la protección frente a *Pdd* tanto en peces como en humanos.

### 1.3. MECANISMOS DE VIRULENCIA DESCRITOS EN *P. DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE*

La virulencia se describe como el grado o medida de patogenicidad de un determinado microorganismo y que viene determinado, en parte, por la posesión de diferentes factores de virulencia. Un factor de virulencia es cualquier característica genética, bioquímica o estructural cuya presencia permite o potencia la capacidad de un patógeno para causar enfermedad en un hospedador (Casadevall and Pirofski *et al.*, 2001).

Si atendemos a su función, los factores de virulencia pueden promover: la colonización y la invasión, daño directo por toxicidad, daño indirecto por inducción de la respuesta inflamatoria o evasión y modulación del sistema inmune del hospedador (Johnson, 2017). Los factores de virulencia producidos por las bacterias Gram negativas incluyen: adhesinas, enzimas proteolíticas y lipolíticas, exotoxinas, endotoxinas, polisacáridos extracelulares (cápsula), sistemas de secreción, sistemas de adquisición de hierro, flagelos y pili entre muchos otros. Los factores de virulencia pueden estar codificados en el cromosoma, en bacteriófagos, en islas de patogenicidad o en plásmidos (Peterson, 1996). Aunque hay muchos aspectos de la virulencia de *Pdd* que todavía se desconocen, las investigaciones realizadas en los últimos años han proporcionado información muy valiosa sobre los factores de virulencia producidos por este patógeno. Los factores de virulencia descritos en *Pdd* hasta el momento, así como su regulación, se reflejan en la Figura 1.6 y serán detallados a continuación.

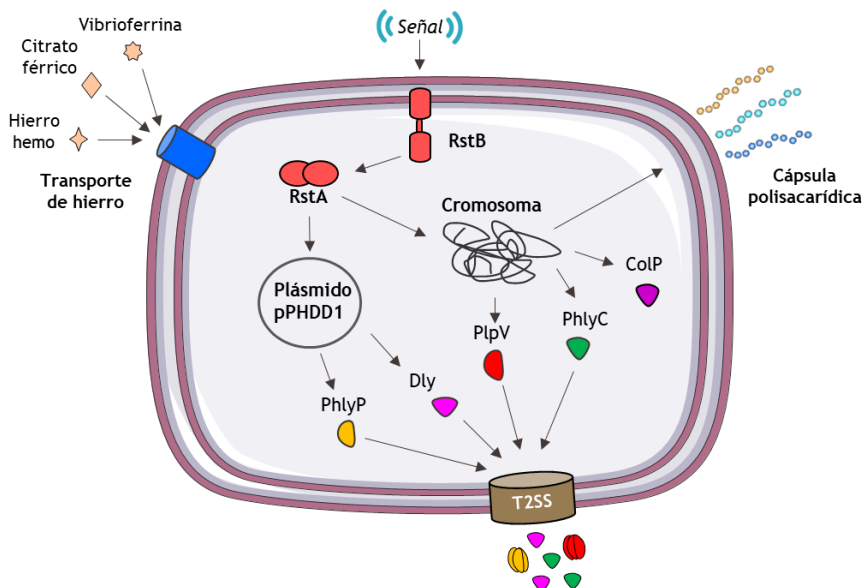


Figura 1.6 Ilustración de una célula en la que se muestran los factores de virulencia de *Pdd* descritos hasta el momento. Los factores de virulencia representados incluyen las cuatro principales citotoxinas (Dly, PhlyP, PhlyC y PlpV), secretadas a través del sistema de secreción de tipo 2 (SST2), la colagenasa ColP, los mecanismos de captación de hierro, la presencia de cápsula polisacárida y el sistema de dos componentes RstAB, un regulador maestro de la virulencia que controla la expresión de genes localizados en el plásmido de virulencia pPHDD1 y en el cromosoma.

### 1.3.1. Citotoxinas, fosfolipasas y colagenasas

La patogenicidad de *Pdd* se atribuye fundamentalmente a la producción de cuatro toxinas diferentes denominadas Dly, PhlyP, PhlyC y PlpV (Osorio *et al.*, 2018) y que se secretan a través del sistema de secreción de tipo II (SST2) (Vences *et al.*, 2017; Rivas *et al.*, 2015). Como detallaremos a continuación, las toxinas Dly y PhlyP están codificadas en el plásmido de virulencia pPHDD1, cuya presencia constituye un sello distintivo de las cepas altamente patógenas, mientras que las otras dos citotoxinas, están codificadas en el cromosoma I. De este modo, la patogenicidad de las cepas negativas para el plásmido pPHDD1, recae principalmente en la producción de las toxinas cromosómicas PhlyC y PlpV.

Las primeras evidencias de la existencia de una toxina citolítica lábil, producida en grandes cantidades por algunas cepas de *Pdd*, se registraron en la década de los 80 (Kreger *et al.*, 1984). Observaciones realizadas en estudios de la época, mostraron que esta toxina causaba la lisis de eritrocitos de ratón, rata, conejo y pez damisela, aunque era casi inactiva frente a eritrocitos de oveja (Kreger, 1984, Kothary and Kreger, 1985). Los estudios consiguientes revelaron que esta toxina, posteriormente denominada damselsina, era una fosfolipasa D con actividad esfingomielinasa (Kreger *et al.*, 1987, Cutter and Kreger, 1990). En los años siguientes, varios trabajos informaron sistemáticamente de la existencia de dos grupos principales de aislados de *Pdd*, los que presentaban fuerte actividad hemolítica, por un lado, y los que tenían una actividad hemolítica débil, por otro, aunque la base genética subyacente era, en aquel momento, desconocida (Osorio *et al.*, 2000; Takahaschi *et al.*, 2008; Pedersen *et al.*, 2009).

Actualmente, sabemos que todos los aislados fuertemente hemolíticos albergan un plásmido de virulencia de 153 kb denominado pPHDD1 (Rivas *et al.*, 2011). La caracterización de pPHDD1, desveló la presencia de 5 bloques de genes en este plásmido: un bloque de partición (genes *par*), un bloque de conjugación (genes *tra*), un bloque de replicación (genes *rep*), un bloque de adhesión (genes *tad*) y un módulo de hemólisis. Este último bloque comprendía los genes *dly* y *hlyApl*, que codificaban para la toxina damselsina (Dly) y para una toxina formadora de poro fobalisina P (PhlyP). Ambos genes están contiguos en la secuencia de pPHDD1, pero se transcriben a partir de hebras divergentes. Las investigaciones demostraron que ambas toxinas actúan de forma sinérgica, causando hemólisis de los eritrocitos y patogenicidad en ratones y peces, aunque cada toxina puede provocar individualmente toxicidad celular y patogenicidad a niveles que difieren en función del hospedador (Rivas *et al.*, 2013).

En cuanto a la distribución del plásmido de virulencia pPHDD1, solo una fracción de las cepas de *Pdd* son positivas, aunque su presencia no se restringe a una única especie animal hospedadora ni a un origen geográfico concreto (Rivas *et al.*, 2011, Rivas *et al.*, 2014). A pesar de que algunas regiones del plásmido presentan homología con secuencias nucleotídicas de otras especies de la familia *Vibrionaceae*, la estructura

genética del plásmido en sí misma, es única de las cepas de *Pdd*. Como hemos mencionado, una de las peculiaridades de este plásmido es que su presencia es fácilmente reconocible, ya que las cepas positivas muestran un halo hemolítico grande en placas de agar sangre de oveja, mientras que las cepas sin plásmido producen un halo estrecho.

Las infecciones experimentales previas han demostrado que las cepas positivas para pPHDD1 son más virulentas que las cepas sin plásmido (Terceti *et al.*, 2016; Vences *et al.*, 2017). Sin embargo, la presencia de un halo hemolítico débil y de cierto grado de virulencia para lubina en las cepas negativas para el plásmido pPHDD1, propició la identificación de un gen en el cromosoma I, denominado *hlyAch* y cuya proteína se denominó PhlyC (Rivas *et al.*, 2013). Los estudios centrados en estudiar el papel de PhlyC en *Pdd*, demostraron que es un factor de virulencia clave en las cepas sin plásmido (Vences *et al.*, 2017). Las secuencias aminoacídicas de PhlyP y PhlyC son idénticas en un 92% y ambas proteínas parecen compartir mecanismos de acción similares. A pesar de esto, PhlyC muestra niveles más bajos de toxicidad para células humanas y de peces con respecto a su homólogo plasmídico PhlyP (Rivas *et al.*, 2015; Vences *et al.*, 2017). La pequeña divergencia existente entre ambas secuencias parece estar detrás de estas diferencias, aunque se precisarían estudios adicionales para demostrarlo.

Hasta la fecha, todos los aislados de *Pdd* hemolíticos son positivos para PhlyC, independientemente de la presencia o ausencia de pPHDD1. Solo unos pocos aislados de *Pdd* no hemolíticos, o bien carecían de *hlyAch*, o bien tenían una versión inactivada por la introducción de una secuencia de inserción (IS). Curiosamente, el gen *hlyAch* se ubica en una región cromosómica muy variable donde cada aislado de *Pdd* parece tener un repertorio genético único (Terceti *et al.*, 2016; Rivas *et al.*, 2014), siendo un ejemplo más de la heterogeneidad de *Pdd*.

En un estudio reciente, la observación de que una cepa de *Pdd* sin plásmido y que carecía de un gen *hlyAch* funcional (truncado por un elemento IS), presentaba cierto grado de virulencia para lubina (Terceti *et al.*, 2016), motivó la búsqueda de factores de virulencia adicionales en esta subespecie. Esta investigación permitió descubrir en las cepas

de *Pdd*, una fosfolipasa ubicua codificada en el cromosoma I, denominada PlpV, que demostró tener un papel importante en la hemólisis, en la toxicidad celular y en la virulencia para peces. Además, el doble mutante *hlyAch plpV* en una cepa de *Pdd* sin plásmido, fue avirulento para lubina (Vences *et al.*, 2017). Curiosamente, la fosfolipasa PlpV es hemolítica para eritrocitos de pez, pero no para eritrocitos de oveja y a diferencia de la Dly, la proteína PlpV presenta homólogos muy cercanos en especies de los géneros *Vibrio* y *Photobacterium* (Vences *et al.*, 2017), algunos de los cuales muestran toxicidad para peces (Hsu *et al.*, 2014).

Con el fin de desvelar el nivel de contribución de cada toxina a la hemólisis y la virulencia de *Pdd* para peces y ratones, Rivas *et al.*, (2013), realizaron varios experimentos con distintas combinaciones de mutantes para las toxinas Dly, PhlyC y PhlyP. Estos ensayos demostraron que la toxina Dly y las dos fobalisinas, PhlyP y PhlyC, actúan de manera sinérgica, mientras que las dos fobalisinas ejercen entre ellas un efecto aditivo (Rivas *et al.*, 2013). En cuanto a los mecanismos subyacentes de interacción entre las toxinas, debemos considerar que las toxinas formadoras de poro, PhlyP y PhlyC, ejercen su función a través de un mecanismo dependiente de colesterol. Se hipotetiza que Dly, a través de su actividad esfingomielinasa, podría facilitar el acceso de PhlyP y PhlyC a las moléculas de colesterol. Del mismo modo, en las cepas sin plásmido, la fosfolipasa PlpV requiere de la acción conjunta con la fobalisina PhlyC para potenciar su papel en la virulencia y en la toxicidad (Vences *et al.*, 2017). Sin duda, elucidar la base molecular de la sinergia entre Dly y PlpV y las dos toxinas formadoras de poro, PhlyP y PhlyC, constituye uno de los principales retos para comprender la patogenicidad de *Pdd*.

Los mecanismos a través de los cuales se secretaban estas toxinas permanecieron desconocidos durante un tiempo. Sin embargo, en el año 2015, se demostró que la mutación de los genes *epsL* y *pilD*, componentes del sistema de secreción de tipo II (SST2) alteraba la hemólisis tanto en cepas sin plásmido pPHDD1 como en cepas con plásmido. En concreto, la mutación de *pilD* (prepilin peptidasa), afectó a la hemólisis incluso más severamente que la mutación de *epsL*.

La evaluación de la expresión de los promotores mediante ensayos de  $\beta$ -galactosidasa (mediante la fusión de los promotores de los genes de las hemolisinas y el gen *lacZ* en el vector pHRP309), indicaron que una deficiencia en la secreción de las hemolisinas en los mutantes *pilD* y *epsL* podría conducir a una menor expresión de las propias hemolisinas y de los genes del sistema de secreción de tipo II. Además, estos mutantes estaban severamente afectados en virulencia para ratones (Rivas *et al.*, 2015a). En un estudio posterior, se investigó si las hemolisinas promovían la adhesión entre las bacterias y las células epiteliales humanas (células HaCat). Los resultados determinaron que en cocultivo, las hemolisinas promovían la asociación de las células bacterianas a las células epiteliales (Rivas *et al.*, 2015b). Con relación a esto, von Hoven *et al.*, (2018), demostraron que la mutación en *Pdd* del gen *cheA*, implicado en quimiotaxis, reducía la asociación con las células epiteliales y la producción de PhlyP.

Como hemos mencionado anteriormente (ver “[Sección 1.2.1](#)”), el repertorio enzimático de *Pdd* no se limita a la producción de fosfolipasas y algunos aislados también muestran actividad proteolítica (Pedersen *et al.*, 2009; Pedersen *et al.*, 1997; Vences *et al.*, 2017). El análisis comparativo de los genomas de *Pdd*, permitió identificar que una fracción de los aislados codificaban para una colagenasa (ColP). Según la base de datos MEROP, ColP se identificó como una colagenasa perteneciente a la clase II de la familia M9 que incluye metaloproteasas de *Vibrio* y *Clostridium*. La delección única de *colP* causó un ligero impacto en la virulencia de *Pdd* para lubina y en la citotoxicidad para líneas celulares humanas y de peces (Vences *et al.*, 2017). Además, los mutantes en los genes del SST2, *pilD* y *epsL*, mostraron un afectación parcial en la actividad colagenasa, sugiriendo que el SST2 podría participar en la secreción de ColP (Vences *et al.*, 2017).

### 1.3.2. Mecanismos de captación de hierro

Para la mayoría de los organismos, incluidas las bacterias, el hierro es un micronutriente indispensable para el crecimiento ya que forma parte de procesos metabólicos cruciales. El hierro puede encontrarse en su forma reducida, como ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) o en su forma oxidada, como ion férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Sheldon *et al.*, 2016). Una de las peculiaridades del hierro ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) es su potencial toxicidad, debido a la formación de radicales libres a través de la reacción de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \text{OH}\cdot$ ). En condiciones de aerobiosis y a pH neutro, el hierro ferroso se oxida rápidamente a hierro férrico, formando precipitados insolubles. Dentro del hospedador, la mayoría del hierro extracelular está unido a transferrina, mientras que el hierro intracelular se encuentra unido a ferritina, hemosiderina y como constituyente de proteínas como la hemoglobina y la mioglobina (Andrews *et al.*, 2003).

La baja disponibilidad de hierro, bien por la formación de complejos insolubles, o bien por la unión a proteínas quelantes en el hospedador, ha propiciado que las bacterias desarrollen mecanismos complejos que les permiten obtener hierro de manera precisa y eficiente (Sheldon *et al.*, 2016). Los mecanismos más comunes incluyen: (i) la captación de hierro de hemoproteínas del hospedador (como hemoglobinas o mioglobinas), (ii) la adquisición de proteínas quelantes de hierro a través de sideróforos o receptores de la superficie celular y (iii) la captura de hierro no quelado a través de reductasas férricas y transportadores de hierro ferroso (Sheldon *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que *Pdd* puede utilizar hemo, hemoglobina y citrato férrico de amonio como únicas fuentes de hierro (Fouz *et al.*, 1994). En consonancia con estos hallazgos, estudios previos han demostrado que la inyección de hierro en ratones y peces aumentaba notablemente la virulencia de *Pdd* (Fouz *et al.*, 1994; Rivas *et al.*, 2013). El sistema para la utilización del grupo hemo fue identificado previamente en este patógeno y comprende las proteínas HutZ, HutX y HutW, el sistema TonB (TonB, ExbB and ExbD) y el receptor de membrana HutA (Rio *et al.*, 2005). Se ha descubierto que el gen para el receptor HutA está presente en aislados de *Pdd* humanos y de peces, con un nivel de identidad a nivel nucleotídico del 97% entre los operones de captación de hemo de ambas subespecies (Rio *et al.*, 2005).

Aunque se desconoce el papel biológico de este sistema en *Pdd*, estos genes son esenciales para la utilización de hemo en la subsp. *piscicida* (Osorio *et al.*, 2010). En 1997, Fouz *et al.*, revelaron que *Pdd* no degrada proteolíticamente la hemoglobina, sino que capta el grupo hemo directamente a través de la interacción célula-hemoglobina. Además, las grandes cantidades de hemolisinas secretadas por *Pdd* en condiciones de bajo hierro, proporcionan una fuente adicional de hemoglobina. Trabajos anteriores han demostrado que, aunque algunas cepas de *Pdd* producen un sideróforo similar a la vibrioferrina en condiciones de bajo Fe (Puentes *et al.*, 2017), la mayoría de ellas producen citrato endógeno para la captación de hierro (Balado *et al.*, 2017).

### 1.3.3. Presencia de cápsula polisacáridica

En el contexto de una infección, la superficie celular bacteriana se establece como una de las primeras líneas de ataque de los mecanismos de defensa del hospedador. Una de las estructuras bacterianas más determinantes en la resistencia a este ataque por parte del sistema inmune, es la cápsula polisacáridica, presente en un amplio rango de especies patógenas.

Hasta hace poco, se desconocía si *Pdd* producía cápsula polisacáridica y si esta tenía algún papel determinante en la virulencia. Sin embargo, la observación de cápsula mediante microscopía TEM en la cepa altamente hemolítica RM-71, desencadenó el estudio de la base genética y la función biológica de la cápsula polisacáridica en la subsp. *damselae*. La búsqueda *in silico* reveló la presencia de dos clústeres aparentemente implicados en la síntesis y exportación de exopolisacáridos (EPS) y polisacáridos capsulares (CPS). El clúster I, contiene los genes *wza*, *wzb* y *wzc* y glucosiltransferasas, entre otras, mientras que el clúster II, contiene los genes *yjBEFGH*. La mutación de los genes *wza* y *wzc*, eliminó la síntesis de cápsula mientras que la mutación del gen *yjBH*, dio lugar a una cápsula significativamente más delgada que la cepa salvaje.

La drástica afectación en la virulencia para rodaballo y lubina de los mutantes acapsulares, junto con la reducción significativa de la supervivencia en presencia de suero y moco de rodaballo, demuestran que la cápsula polisacáridica constituye un factor de virulencia clave en *Pdd* (Matanza *et al.*, 2021).

#### **1.4. REGULACIÓN DE LOS MECANISMOS DE VIRULENCIA EN *PDD***

##### **1.4.1. Sistemas reguladores de dos componentes**

La gran complejidad que presenta el ecosistema acuático ha propiciado que los microorganismos marinos, como las bacterias, desarrollen unos sistemas fisiológicos y bioquímicos complejos que les permiten adaptarse y colonizar exitosamente prácticamente cualquier nicho ecológico (Biswas *et al.*, 2016). Además, la regulación de estos sistemas y más concretamente, de los factores de virulencia, resulta crucial en las bacterias patógenas facultativas, como *Pdd*, que además de prosperar libremente en el ecosistema marino, tienen la capacidad, ante determinadas señales, de colonizar e infectar un hospedador.

Uno de los mecanismos de transducción de señal más sofisticados y que está presente en prácticamente todos los organismos, son los sistemas de regulación de dos componentes (TCS, del inglés “*Two-Component Systems*”). En un TCS clásico, el sensor histidina quinasa (HK), ubicado en la membrana interna de la célula bacteriana, se encarga de recibir la señal externa y fosforilar a un residuo de ácido aspártico de su cognato, denominado regulador de respuesta (RR). Cabe destacar que los sensores HK utilizan fundamentalmente ATP para su propia autofosforilación una vez que reciben la señal activadora (Sureka *et al.*, 2007). En numerosos casos, el regulador de respuesta (RR) es un factor de transcripción que puede modificar la expresión de los genes, bien induciendo, o bien reprimiendo su expresión. En los casos en los que el RR no tiene capacidad para unirse al ADN, este contacta directamente con las proteínas (Hengge, 2008) o con el ARN (Shu and Zhulin, 2002). A pesar de su complejidad, los sistemas TCS están ampliamente conservados en las especies bacterianas (Laub and Goulian, 2007).

Hoy en día, numerosos estudios evidencian el papel de los TCS en la regulación de la expresión de toxinas y de otros factores de virulencia en especies de la familia *Vibrionaceae*. Por ejemplo, en *V. cholerae* ToxRS y VarS/VarA controlan la expresión de ToxT, el activador transcripcional de la toxina colérica (Jang *et al.*, 2011). En *V. parahaemolyticus* ToxRS participa en la regulación de la virulencia mediante el control de las proteínas efectoras del sistema de secreción del tipo III (Whitaker *et al.*, 2012).

Para arrojar luz sobre la regulación de la expresión de las citotoxinas en *Pdd*, Terceti *et al.*, (2017) identificaron por mutagénesis por transposición un clon que presentaba un fenotipo de ausencia de actividad hemolítica, cuya inserción se encontraba en el gen *rstB*, codificante de un gen histidina quinasa perteneciente a un TCS. Este sistema de dos componentes que se denominó RstAB, presentaba homología con el sistema de dos componentes CarSR de *V. cholerae* (Bilecen y Yildiz, 2009). La mutación de *rstB* condujo a una reducción en la expresión de las tres toxinas principales Dly, PhlyP y PhlyC y su inactivación afectó severamente a la virulencia. Los estudios realizados demostraron que el sistema RstAB era necesario para la producción máxima de los factores de virulencia.

Dada la elevada heterogeneidad y la naturaleza multiclonal de *Pdd*, identificar los puntos débiles en su biología es clave para el diseño de herramientas de prevención y control. Con el fin de conocer en profundidad el regulón de RstAB, se realizó un estudio RNA-seq de los mutantes simples  $\Delta rstA$  y  $\Delta rstB$ . En concordancia con los experimentos previos de Terceti *et al.*, 2017, el análisis transcriptómico confirmó que RstAB regulaba positivamente las citotoxinas Dly, PhlyP y PhlyC así como de otras proteínas secretadas a través del SST2. Uno de los hallazgos más sorprendentes de este análisis transcriptómico fue la infrarregulación en los mutantes  $\Delta rstA$  y  $\Delta rstB$ , de 21 genes distribuidos en los clústeres implicados en la síntesis de EPS y de polisacárido capsular. En concordancia con estos resultados, los mutantes RstAB presentaron un fenotipo acapsular (Matanza *et al.*, 2021). Además, la presencia de genes adicionales con implicaciones en la virulencia como parte del regulón de RstAB, refuerza el papel crucial de este regulador en la patogenicidad de *Pdd* (Terceti *et al.*, 2017; Terceti *et al.*, 2019).

### 1.4.2. Influencia de la temperatura

La familia *Vibrionaceae* comprende un amplio número de especies bacterianas acuáticas, muchas de ellas patógenas para animales y/o humanos y que suponen una amenaza potencial para su salud y bienestar (Baker-Austin *et al.*, 2018). En un ambiente tan diverso como el ecosistema acuático, la temperatura y la salinidad, son dos de los factores ambientales más determinantes de la distribución y abundancia de las poblaciones de *Vibrio* (Blackwell & Oliver, 2008; DePaola *et al.*, 2003; Motes *et al.*, 1998; Randa *et al.*, 2004). El aumento de la temperatura y la disminución de la salinidad son, precisamente, dos de los efectos más visibles del cambio climático y numerosos estudios han resaltado el vínculo entre la alteración de estos factores ambientales y la emergencia de infecciones causadas por vibrios patógenos en los últimos años (Baker-Austin *et al.*, 2010; Froelich & Daines, 2020; Martínez-Urtaza *et al.*, 2010). Dada la influencia de ambas variables ambientales, conocer cómo las bacterias patógenas responden a los cambios ambientales resulta crucial no solo para predecir el riesgo de infecciones, sino también, para diseñar medidas de prevención y control de su propagación.

Como hemos mencionado, el sistema de dos componentes RstAB es un elemento clave en la regulación de la virulencia en *Pdd*, pero la señal ambiental que lo activa es totalmente desconocida. En realidad, el conocimiento sobre las señales biológicas y ambientales que regulan la expresión génica en *Pdd* y, en concreto, los factores de virulencia, era escaso; sin embargo, los estudios realizados en los últimos años han aportado numerosas evidencias del impacto de determinadas variables ambientales en la fisiología y la virulencia de este patógeno marino tan versátil.

Entre las variables ambientales de mayor impacto en *Pdd*, destaca la temperatura. La aparición recurrente de brotes de *Pdd* en las piscifactorías cuando la temperatura rondaba los 25 °C, junto con la aparición de casos de infección en regiones en las que nunca se habían detectado antes, motivaron el estudio de la respuesta de *Pdd* a los cambios en la temperatura. Para ello, se realizó un análisis comparativo del transcriptoma de *Pdd* a temperaturas representativas de tres condiciones: vida libre en medio marino en meses fríos (15 °C),

temperaturas típicas de brotes en meses cálidos de verano (25 °C), y temperatura en el medio interno humano (37 °C). El análisis comparativo del transcriptoma a 25 °C vs. 15 °C, desveló la sobregulación a 25 °C de genes implicados en la síntesis, reparación y traducción de ácidos nucleicos que podrían apoyar el acentuado crecimiento de *Pdd* a 25 °C con respecto al crecimiento a 15 °C.

Contrariamente a lo esperado, los niveles de expresión de las citotoxinas no se veían sobrerregulados a 25 °C, sin embargo, al abordar la abundancia de transcritos, encontramos que los genes codificadores para las citotoxinas Dly, PhlyP y PhlyC, estaban entre los más expresados a ambas condiciones de temperatura. Este resultado sugiere que la producción de citotoxinas no es una condición limitante para la aparición de brotes a temperaturas menores que las propias de las épocas estivales. Sin embargo, a diferencia de las hemolisinas, la expresión de potenciales factores de virulencia codificados en el plásmido pPHDD1, sí que estaba sobrerregulada a 25 °C, reforzando el papel de este replicón como parte fundamental de la “artillería molecular” de los aislados muy virulentos. Los resultados obtenidos en ese estudio (Matanza y Osorio, 2018) permitieron concluir que los brotes de *Pdd* durante los picos cálidos no vienen respaldados, como cabría esperar, por un aumento en la expresión de las citotoxinas, sino más bien por la sobrerregulación de otros factores de virulencia, por una mayor velocidad de crecimiento, y por la inducción de funciones relacionadas con la quimiotaxis y la motilidad.

En un estudio posterior, con el fin de conocer la respuesta de *Pdd* a condiciones de temperaturas propias para la virulencia en peces y en el ser humano, se comparó el perfil genético de expresión de *Pdd* a 25 °C y a 37 °C, respectivamente (Matanza y Osorio, 2020). Cabe destacar que el crecimiento a 37 °C permite que *Pdd* cause enfermedad en humanos y constituye una característica clave para diferenciar la subsp. *damselae* de la subsp. *piscicida*. Este estudio desveló que el crecimiento a 37 °C activa la proliferación inicial de *Pdd* con una entrada más temprana en la fase exponencial en comparación con el crecimiento a 25 °C. Una de las peculiaridades de la exposición continuada de *Pdd* a 37 °C consistió en una caída drástica de la DO<sub>600</sub> debido a una pérdida en la viabilidad celular. En particular, a partir de las 30 horas de cultivo

a 37 °C, no se recuperaban células viables mientras que, al mismo tiempo, los cultivos crecidos a 25 °C presentaban los mayores recuentos. El análisis por microscopía electrónica de barrido (SEM), reveló que las células de *Pdd* crecidas a 25 °C presentaban morfología y tamaño normales, mientras que las células crecidas a 37 °C presentaban formas alargadas y encadenadas. El estudio de la composición de la membrana reveló que, a medida que se incrementa la temperatura del cultivo, *Pdd* aumenta la producción de ácidos grasos saturados y se sugirió que este efecto podría favorecer la supervivencia de *Pdd* en distintos ambientes. Durante el transcurso de dicho estudio, se realizaron numerosos intentos para aislar un mutante defectivo en el crecimiento a 37 °C. La imposibilidad de conseguir un clon que no fuese capaz de crecer a la temperatura del cuerpo humano, sugirió que la capacidad de *Pdd* para crecer a 37 °C podría ser una característica multigénica.

El estudio comparativo del transcriptoma de *P. damsela* subsp. *damsela* a ambas temperaturas (37 °C vs. 25 °C), reveló que el crecimiento a 37 °C induce la expresión de genes relacionados con la respuesta a choque térmico, defensa frente al estrés oxidativo, así como genes metabólicos que contribuirían al rápido crecimiento inicial observado para *Pdd* a esta temperatura. Uno de los resultados más llamativos del crecimiento a 37 °C, fue la disminución de la expresión de varios genes relacionados con la virulencia. En lo que respecta a las hemolisinas, el gen de la toxina Dly presentaba una disminución en la expresión a 37 °C, pero al igual que en el crecimiento de *Pdd* a 25 °C y a 15 °C, los valores FPKM obtenidos a 37 °C, posicionaban a las hemolisinas entre los 150 genes más expresados de todo el transcriptoma. El análisis RNAseq, junto con los resultados obtenidos en los experimentos de crecimiento y viabilidad concuerdan con observaciones previas realizadas en casos clínicos de infecciones por *Pdd*. En estos estudios, se hace referencia a la dificultad para aislar *Pdd* de tejidos humanos infectados, aun observando hemólisis en agar sangre. Los resultados obtenidos en ambos estudios (Matanza y Osorio 2018; 2020) profundizan enormemente en el conocimiento de la respuesta de *Pdd* a los cambios en la temperatura, una variable

ambiental que, sin duda, gobierna la fisiología y la virulencia en *P. damsela* subsp. *damsela*.

Además de la temperatura, la disponibilidad de hierro, también modula la expresión génica en numerosos miembros de la familia *Vibrionaceae* (Lages *et al.*, 2019; Mey *et al.*, 2005). La unión del hierro a proteínas quelantes y la restricción generada por el hospedador como respuesta a la infección, hacen que el hierro disponible dentro del hospedador sea muy limitado. La baja disponibilidad de hierro constituye, para los patógenos bacterianos, una señal indicadora de la entrada en el hospedador que modula la expresión de determinados genes. Uno de los protagonistas principales de este sistema regulador es la proteína Fur, un factor de transcripción que regula la expresión de genes implicados en la síntesis de sideróforos y de captación de hierro, entre otros (Mey *et al.*, 2005). A elevadas concentraciones de hierro, el regulador Fur cargado de hierro, se une al ADN e inhibe la transcripción. Las regiones a las que se une Fur son, generalmente, unas secuencias consenso de unas 10 pares de bases, denominadas cajas Fur, o Fur *box*.

Estudios anteriores han demostrado que la limitación de hierro activa en *Pdd* la expresión tanto de los sistemas de captación de hierro, como de los genes de las citotoxinas Dly, PhlyP y PhlyC (Rivas *et al.*, 2013; Puentes *et al.*, 2017). Sorprendentemente, además de los genes de las citotoxinas plasmídicas, Dly y PhlyP, otros genes codificados en el plásmido pPHDD1 también se inducen a bajo hierro. Entre ellos destacan los genes que codifican un homólogo del receptor de transferrina Vep20 de *V. vulnificus* (Pajuelo *et al.*, 2015), un homólogo de Vep07 de *V. vulnificus* y un homólogo de la porina OmpU, con implicaciones en la virulencia en varios patógenos del género *Vibrio* (Bari *et al.*, 2012; Duperthuy *et al.*, 2011) pero cuya función en *Pdd* es totalmente desconocida.

### **1.5. INFLUENCIA DE LA SALINIDAD EN LA FISIOLOGÍA Y VIRULENCIA DE LAS BACTERIAS DE LA FAMILIA *VIBRIONACEAE***

Como hemos mencionado anteriormente, el aumento de la temperatura oceánica no es el único efecto derivado del calentamiento global. El continuo retroceso de los glaciares y los cambios en la intensidad y el patrón de las precipitaciones ocasionan una reducción de la salinidad en muchas zonas costeras (Häkkinen, 2002), contribuyendo a la aparición

de zonas propicias para el crecimiento de vibrios (Johnson *et al.*, 2012; Vezzulli *et al.*, 2013).

Sin embargo, la salinidad no solo determina las regiones óptimas para la expansión de vibrios, sino que también ejerce un papel en la regulación de la virulencia de los patógenos bacterianos.

La mayoría de las especies de la familia *Vibrionaceae* presentan formas de vida libre en el ambiente acuático donde prosperan asociadas a partículas orgánicas en suspensión y colonizando superficies vivas e inertes (Lyons *et al.*, 2007; Takemura *et al.*, 2014). Algunas de estas especies de vida libre, también tienen la capacidad para colonizar y causar enfermedad en distintos hospedadores, siendo la fase patógena una parte opcional de su ciclo de vida. En este contexto, las bacterias patógenas deben regular muy finamente la expresión de sus factores de virulencia, de manera que se garantice la producción de estos factores solo cuando sean necesarios. En el ambiente marino, una de las señales ambientales más informativas de la transición entre la fase de vida libre y la fase infectiva, es la caída drástica de la concentración de NaCl dentro del medio interno del hospedador vertebrado.

En los últimos años, varios estudios han demostrado que la concentración de NaCl regula diversas actividades relacionadas con la virulencia en bacterias de la familia *Vibrionaceae*. Entre las actividades moduladas por la salinidad destacan la producción y secreción de toxinas y proteasas, como sucede en *V. vulnificus* (Lee *et al.*, 2000), *V. parahaemolyticus* (Whitaker *et al.*, 2010) y *V. anguillarum* (Crisafi *et al.*, 2015), la producción de *biofilm* (Marsden *et al.*, 2017), la quimiotaxis y la motilidad (Larsen *et al.*, 2004), la expresión de proteínas de membrana externa (Kao *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2004) y otras como la supervivencia frente a condiciones de acidez (Kalburge *et al.*, 2014). La mayoría de estos estudios se han enfocado en evaluar el efecto de la salinidad en actividades concretas, y en la mayoría de casos en presencia de variables ambientales adicionales como la temperatura o la limitación de nutrientes (Larsen *et al.*, 2004; Marsden *et al.*, 2017).

Aunque las bacterias patógenas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* experimentan cambios continuos en las concentraciones de NaCl a lo largo de su ciclo vital, muy pocas especies han sido objeto

de estudios transcriptómicos destinados a investigar el papel de la salinidad en la modulación de su expresión génica.

Entre estas pocas especies se incluyen *Vibrio cholerae* (Shikuma *et al.*, 2013; Shikuma & Yildiz, 2009), *V. parahaemolyticus* (García *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2010), *V. brasiliensis* (Hu *et al.*, 2022) y *V. fujianensis* (Huang *et al.*, 2020). No obstante, algunos de estos trabajos se enfocaron en el estudio del estrés salino y emplearon condiciones de NaCl que distan de las existentes en la naturaleza (Huang *et al.*, 2020). Otros estudios comparativos incluyeron condiciones que diferían en las concentraciones de NaCl pero también en variables adicionales, como sucede con la comparativa del transcriptoma de *V. vulnificus* en suero humano frente a agua de mar (Williams *et al.*, 2014).

En cuanto al papel de la salinidad en *Pdd*, las primeras evidencias del impacto de la concentración de NaCl en la producción de toxinas se remontan a los estudios de Kreger *et al.*, (1984). Este estudio demostró que la concentración de iones Na<sup>+</sup> en el medio de cultivo tenía un efecto considerable en la producción de toxina en *Pdd*, siendo óptima a concentraciones de Na<sup>+</sup> equivalentes al 1,3% NaCl y reduciéndose significativamente a medida que aumentaba la salinidad. En concordancia con estos resultados, estudios posteriores demostraron que los niveles de NaCl modulaban la actividad transcripcional de los promotores de las tres citotoxinas Dly, PhlyP y PhlyC (Rivas *et al.*, 2013) así como las actividades hemolítica y fosfolipasa (von Hoven *et al.*, 2018). Aunque los datos obtenidos en ambos estudios apuntaban ya a la caída de la salinidad como una posible señal activadora de la virulencia en *Pdd*, no se llegó a profundizar en el estudio del papel de la salinidad en la regulación genética de este patógeno.

Además, los cambios en la salinidad no afectan únicamente al patógeno y tanto el hospedador como la interacción patógeno-hospedador, están severamente influenciadas por los cambios en la concentración de NaCl. En relación a esto, numerosos estudios han demostrado que la disminución drástica de la salinidad, en combinación con otros factores estresantes, puede alterar la respuesta inmune y la microbiota del hospedador, aumentando su susceptibilidad a las enfermedades infecciosas (Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2022).

Considerando la influencia de la salinidad en *Pdd* así como en los hospedadores susceptibles, se ha demostrado que la susceptibilidad del crustáceo *Penaeus monodon* a la infección por *Pdd* es mayor cuando la salinidad disminuye (Wang & Chen, 2006).

### **1.6. HERRAMIENTAS GENÉTICAS ESENCIALES PARA LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE VIBRIOS: LOS VECTORES PLASMÍDICOS**

El término “plásmido”, acuñado por primera vez por el ganador del premio Nobel Joshua Lederberg en 1952 (Lederberg, 1952), se define como un elemento genético extracromosómico, semiautónomo y autoreplicativo ampliamente distribuido en el genoma de las bacterias. Los plásmidos varían enormemente en características como el tamaño, topología (circular o lineal) y número de copia y se aíslan de taxones bacterianos diversos procedentes de una amplia variedad de entornos ecológicos (Li *et al.*, 2012; Stoesser *et al.*, 2016). Además de codificar elementos esenciales para la replicación, el mantenimiento y la conjugación, los plásmidos pueden portar genes accesorios que codifican para un amplio número de funciones clave. Entre estas funciones destacan la resistencia a antibióticos, la producción de factores de virulencia y el metabolismo de nuevos sustratos. La ganancia de estas funciones permite que las bacterias puedan explotar nuevos entornos ecológicos y/o nuevos hospedadores, poniendo de relieve el impacto de la adquisición de plásmidos en la ecología y la evolución microbiana (Hazen *et al.*, 2010; Rodríguez-Beltrán *et al.*, 2021).

Mas allá de su función biológica, el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante, iniciada en la década de los 70 (Cohen *et al.*, 1973), permitió modificar estos plásmidos nativos que pasaron a convertirse en vectores para el transporte y la manipulación de ADN foráneo. En los últimos años, el avance en las técnicas de clonaje molecular y secuenciación han facilitado el diseño de nuevos vectores, en su mayoría optimizados para organismos modelo como *E. coli*. Entre ellos destacan los vectores modulares, organizados en fragmentos de ADN minimizados y separados por sitios de corte para enzimas de restricción inusuales que permiten su modificación e intercambio por otros módulos de interés (Nora *et al.*, 2019).

En general, los vectores plasmídicos deben portar una serie de elementos que permiten su transformación y su selección. Estos elementos son el origen de replicación (*oriV*), que debe ser reconocido por la maquinaria de replicación del hospedador, y el marcador de selección, que confiere una ventaja selectiva para el transformante. Además, para facilitar la clonación de genes de interés, se introduce habitualmente un sitio de clonación múltiple (*MCS*, “*Multiple Cloning Site*”), que contiene diversos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción. Para facilitar su clasificación, los vectores pueden dividirse en los tres grupos más comúnmente utilizados por los investigadores: vectores de clonación, vectores de expresión y vectores indicadores o *reporter* (Nora *et al.*, 2019).

En las últimas décadas, los vectores plasmídicos se han convertido en herramientas indispensables para la manipulación genética de las bacterias marinas (Zeaiter *et al.*, 2018). Sin embargo, a pesar de la trascendencia de estas herramientas en la investigación molecular básica y en la biotecnología, el número de vectores disponibles para su uso en bacterias marinas es muy limitado. Como hemos visto a lo largo de la introducción, gran parte del conocimiento adquirido sobre la fisiología y la virulencia de *Pdd*, ha derivado del uso de técnicas de ingeniería genética basadas, en su mayoría, en el uso de vectores plasmídicos. Una de las principales técnicas utilizadas es la mutagénesis por intercambio alélico, para la cual empleamos, de manera rutinaria el plásmido suicida pNidKan, derivado del plásmido pCVD442 (Terceti *et al.*, 2018; Matanza *et al.*, 2021). La dependencia de este plásmido de la proteína Pir, ausente en el genoma de *Pdd*, permite seleccionar eventos de recombinación homóloga, dando lugar a modificaciones en el genoma de la bacteria.

La mutación por intercambio alélico de un determinado gen puede dar lugar a fenotipos muy diversos que deben confirmarse para descartar la presencia de mutaciones secundarias y/o mutaciones inespecíficas u *off-target*, fuera de la región de interés. Estas mutaciones pueden generarse durante la amplificación por PCR de la secuencia de ADN homóloga, especialmente a través del uso de polimerasas de baja fidelidad, mientras que las mutaciones *off-target* pueden originarse a través de eventos de recombinación inespecífica

durante el proceso de intercambio alélico. Por esta razón, obtener una cepa mutante complementada, es decir, que exprese una copia nativa del gen, es un paso crítico para demostrar su función y descartar la presencia de mutaciones inespecíficas.

La batería de plásmidos lanzadera (*shuttle vectors*) para la complementación genética en *Pdd* es limitada, y actualmente, recae principalmente en el uso de dos plásmidos de la familia de vectores pBBR1-MCS (Kovach *et al.*, 1994), la versión pBBR1-MCS1, de resistencia a gentamicina, y la versión pBBR1-MCS5, de resistencia a kanamicina. Sin embargo, evidencias previas no publicadas de nuestro laboratorio, han demostrado que el crecimiento de los clones de *Pdd* transconjugantes en presencia de estos antibióticos, conduce en numerosas ocasiones a la selección de mutantes espontáneos resistentes, reduciendo la eficiencia de la utilización de estos vectores en la complementación. Otro de los vectores plasmídicos disponibles para su uso en *Pdd* es el plásmido pMRB24 (Le Roux *et al.*, 2011), utilizado en numerosas ocasiones para la complementación genética de mutantes (Terceti *et al.*, 2019; Matanza *et al.*, 2021), pero que es altamente inestable y se cura tan pronto desaparece la selección positiva por antibiótico.

Además, el número de plásmidos replicativos en *Pdd* y otros miembros de la familia *Vibrionaceae* para su uso como vectores de clonaje, de expresión o *reporter* es limitada, encontrando unos pocos ejemplos del diseño de vectores en la bibliografía para su uso en algunos vibrios (Bina *et al.*, 2014; Klevanskaa *et al.*, 2014; Le Roux *et al.*, 2007). En consecuencia, existe una necesidad urgente tanto por descubrir plásmidos bacterianos nativos para el diseño de nuevos vectores, como de mejorar las herramientas de manipulación genética bacteriana ya existentes.



## **2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## 2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La temperatura y la salinidad son dos de las variables ambientales de mayor impacto en las bacterias de la familia *Vibrionaceae*. El efecto del cambio climático ha tenido consecuencias visibles en ambas variables y tanto el incremento de la temperatura como la reducción de la salinidad se han relacionado con un aumento en el número de infecciones causadas por vibrios patógenos. Si bien ya conocemos que la temperatura regula la expresión genética de *Pdd*, desconocemos su respuesta ante los cambios en las condiciones de NaCl. Siendo la caída de la salinidad una señal informativa de la entrada en el hospedador y determinante de la transición de fase de vida libre a fase infectiva en los patógenos facultativos, resulta determinante conocer el papel de la salinidad en la regulación genética de *Pdd*. Paralelamente, el avance en el conocimiento de los mecanismos de virulencia y de su regulación a través del uso de técnicas de manipulación genética, ha impulsado la necesidad de nuevos vectores para la complementación genética de *Pdd* y que, a su vez, podrían servir de base para el diseño de vectores con otras aplicaciones biotecnológicas.

Por todo lo descrito anteriormente, en la presente tesis doctoral nos hemos propuesto los siguientes objetivos:

1. Analizar la respuesta transcriptómica y fenotípica de *Pdd* al 3% NaCl (salinidad similar a la existente en la fase de vida libre planctónica) con respecto al 1% NaCl (salinidad próxima a la del medio interno de los hospedadores).
2. Seleccionar, entre los genes regulados por salinidad que puedan ser identificados durante el desarrollo del objetivo 1, candidatos con potencial implicación en la virulencia y de posible interés para el diseño de estrategias de prevención, y analizar su papel en la fisiología y la virulencia de *Pdd*.
3. Diseñar nuevos vectores plasmídicos para la complementación genética de *Pdd* y sentar las bases para futuras plataformas de expresión.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. CEPAS BACTERIANAS, PLÁSMIDOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas y plásmidos utilizados en esta tesis doctoral se detallan en la Tabla 3.1 y Tabla 3.2 respectivamente. Las cepas de *P. damsela* subsp. *damsela* se cultivaron a 25 °C en agar de soja tripticaseína (TSA) o en caldo de soja tripticaseína (TSB) suplementado con NaCl para alcanzar una concentración final del 1% NaCl (TSA-1 y TSB-1) y del 3% NaCl (TSA-3 y TSB-3) en función de cada experimento. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en agar Luria-Bertani (LB) o en caldo LB a 37 °C. Todas las cepas utilizadas a lo largo de este estudio se criopreservaron a -80 °C en TSB-1 suplementado con un 20% (vol/vol) de glicerol. Cuando fue necesario, los medios de cultivo se suplementaron con antibióticos en las siguientes concentraciones: kanamicina (Km; NZYTech) a 50 µg/ml, ampicilina (Amp; NZYTech) a 100 µg/ml, gentamicina (Gm; NZYTech) a 15 µg/ml y cloranfenicol (Cm, NZYTech) a 5 o a 20 µg/ml. Antes de su uso, las soluciones antibióticas se filtraron a través de membranas de ésteres de celulosa de 0,22 µm (Millipore) y se almacenaron a 4 °C.

### 3.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO Y PLASMÍDICO

El ADN genómico utilizado como molde para la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se extrajo utilizando el kit *Easy-DNA* (Invitrogen). El ADN plasmídico se purificó empleando el kit *GeneJet Plasmid Miniprep* (Thermo Fisher Scientific). Todas las extracciones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3.1 Cepas utilizadas en el presente trabajo

Cepas	Descripción	Fuente
<b><i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i></b>		
RM-71	Cepa aislada de rodaballo ( <i>Psetta maxima</i> ); portadora del plásmido pPHDD1	Fouz <i>et al.</i> , 1992
LD-07	Cepa aislada de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ); carente del plásmido pPHDD1	Vera <i>et al.</i> , 1991
A-162	Cepa aislada de anguila ( <i>Anguilla anguilla</i> ); carente del plásmido pPHDD1	Colección del laboratorio
AR89	RM-71-Rf <sup>R</sup> mutante por delección de <i>dly hlyApl hlyAcr</i>	Rivas <i>et al.</i> , 2013
AVL442	AR89 mutante por delección de <i>plpV</i>	Este trabajo
AVZ25	RM-71 mutante por delección de <i>pirB</i>	Este trabajo
AVZ86	RM-71 mutante por delección de <i>arcA</i>	Este trabajo
AVZ159	RM-71 mutante por delección de <i>tbpD</i>	Este trabajo
AVZ410	AVZ159 complementado con pAVZ382, Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i></b>		
DI-21	Cepa aislada de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ) portadora de pPHDP10	Magariños <i>et al.</i> , 1992
PP3	Cepa aislada de seriola ( <i>Seriola quinqueradiata</i> ) portadora de pPHDP10	Abushattal <i>et al.</i> , 2019
AQV27.1	Cepas aisladas de lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) portadoras de pPHDP10	Colección del laboratorio
AQP18.1	Cepas aisladas de lubina ( <i>Dicentrarchus labrax</i> ) portadoras de pPHDP10	Colección del laboratorio
DS11	Cepa aislada de dorada ( <i>Sparus aurata</i> ) carente del plásmido pPHDP10	Colección del laboratorio
<b><i>Pseudoalteromonas citrea</i></b>		
CC37	Cepa aislada de opérculo de caracola en zona intermareal, Illa de Arousa, Galicia	Colección del laboratorio
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	<i>supE4 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15) hsd R17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Colección del laboratorio
S17-1- $\lambda$ pir	<i>recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc: Mu: Km Tn7 λpir, Tp<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup></i>	Herrero <i>et al.</i> , 1990
B-3914	F- RP4-2-Tc::Mu ΔdapA::( <i>erm-pir</i> ) <i>gyrA462 zei-298::Tn10 (Km<sup>R</sup> Em<sup>R</sup> Tc<sup>R</sup>)</i>	Le Roux <i>et al.</i> , 2007
AVZ198	Cepa de <i>E. coli</i> B-3914 donadora del plásmido pVibexp-cat+oriV (pAVZ192), Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
AVZ376	Cepa de <i>E. coli</i> B-3914 donadora del plásmido pA-162-Vibexp (pAVZ368), Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
<b><i>V. natriegens</i></b> CCUG16374	Cepa procedente de la colección sueca CCUG (Culture Collection University of Gothenburg)	CCUG

Rf<sup>R</sup>: resistencia a rifampicina; Cm<sup>R</sup>: resistencia a cloranfenicol; Tp<sup>R</sup>: resistencia a trimetoprima; Sm<sup>R</sup>: resistencia a estreptomycin; Km<sup>R</sup>: resistencia a kanamicina; Em<sup>R</sup>: resistencia a eritromicina; Tc<sup>R</sup>: resistencia a tetraciclina.

Tabla 3.2 Plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido	Descripción	Fuente
pWKS30	Vector de clonación de bajo número de copia, Amp <sup>R</sup>	Wang y Kushner, 1991
pNidKan	Vector suicida derivado de pCVD442, Km <sup>R</sup>	Mouriño <i>et al.</i> , 2004
pKD3	Vector portador del gen de resistencia a cloranfenicol, Cm <sup>R</sup>	Datsenko y Wagner, 2000
pKD4	Vector portador del gen de resistencia a kanamicina, Km <sup>R</sup>	
pAVZ185	Vector pUC57-Simple+Vibexp, Amp <sup>R</sup>	Este trabajo
pAVZ190	Vector pUC57-Simple+Vibexp-cat, Amp <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pAVZ192	Vector de clonación movilizable pVibexp-cat+oriV, Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pAVZ368	Vector de clonación movilizable pA-162-Vibexp, Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pAVZ239	pAVZ192 con <i>dly</i> y su promotor de RM-71, Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pAVZ380	pAVZ368 con <i>dly-like</i> y su promotor de <i>Pseudoalteromonas citrea</i> , Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pAVZ382	pAVZ368 con <i>tbpD</i> y su promotor de RM-71, Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pAVZ402	pAVZ368 con <i>dly-like</i> de <i>P. citrea</i> en fase con el promotor y el péptido señal, Cm <sup>R</sup>	Este trabajo

Amp<sup>R</sup>: resistencia a ampicilina; Km<sup>R</sup>: resistencia a kanamicina; Gent<sup>R</sup>: resistencia a gentamicina; Cm<sup>R</sup>, resistencia a cloranfenicol.

### 3.3. REACCIONES EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR Y RT-PCR)

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en volúmenes de 25 o 50 µl en un termociclador T100TM (Bio-Rad). Para la amplificación por PCR se utilizaron soluciones premezcladas listas para usar que contenían: ADN polimerasa, dNTPs, tampón y la concentración óptima de MgCl<sub>2</sub>. Rutinariamente, se utilizó la mezcla *NZY Taq II 2x Green Master Mix* (NZYTech), pero para la amplificación de fragmentos para la construcción de mutantes por intercambio alélico, se utilizó la mezcla *NZYProof 2x Green Master Mix* (NZYTech), de alta fidelidad (la polimerasa que contiene exhibe actividad exonucleasa 3'-5'). La composición de las reacciones y los parámetros de amplificación se muestran en la Tabla 3.3 y Tabla 3.4, respectivamente.

Para cada grupo de reacciones de PCR incluimos un control negativo, que incluyó todos los componentes de la reacción excepto el ADN molde.

Tabla 3.3 Componentes de las reacciones de PCR empleando las soluciones premezcladas *NZY Taq II 2x Green Master Mix* o *NZYProof 2x Green Master Mix*

	NZY Taq II 2x Green Master Mix	NZYProof 2x Green Master Mix
Cebadores	0.2 - 0.5 $\mu$ M	0.3 - 0.5 $\mu$ M
ADN molde	5 pg - 0.5 $\mu$ g	10 ng - 0.5 $\mu$ g
Mix	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	Hasta 50 $\mu$ l	Hasta 50 $\mu$ l

Tabla 3.4 Parámetros de amplificación por PCR empleando *NZY Taq II 2x Green Master Mix* o *NZYProof 2x Green Master Mix*

NZYTaq II 2x Green Master Mix			
Ciclo	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	94 °C	30 - 50 s	
<i>Annealing</i>	*	30 - 60 s	25 - 35
Extensión	72 °C	15 - 30 s/kb	
Extensión final	72 °C	5 - 10 min	1
NZYProof 2x Green Master Mix			
Ciclo	Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
Desnaturalización inicial	95 °C	3 min	1
Desnaturalización	95 °C	30 s	
<i>Annealing</i>	*	30 s	20 - 40
Extensión	72 °C	60 s/kb	
Extensión final	72 °C	5 - 10 min	1

\* La temperatura de *annealing* se optimizó para cada pareja de cebadores

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa. Para la preparación de los geles, la agarosa se disolvió en tampón TAE 1X (Tris 40 mM, 0,5 mM EDTA, pH 8,0) a concentraciones que oscilaron entre 0,7 y 2%, dependiendo del tamaño de los fragmentos de ADN a separar. Para la detección del ADN se añadió a los geles un volumen correspondiente a una concentración de 0,5 µg/ml de *Realsafe Nucleic Acid Staining Solution* (Intron Biotechnology). Los geles se visualizaron en un transiluminador (Gelprinter Plus) a una longitud de onda de 254 nm. La purificación de los fragmentos de ADN se realizó con el kit *NZYGelpure* (NZYtech) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las reacciones en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se llevaron a cabo con 2 objetivos: (1) verificar la cotranscripción del gen *tbpD* y el gen *vcp-07-like* en *Pdd* y (2) confirmar la ausencia de efectos polares derivados de la mutación de *tbpD* en la expresión del gen *vcp-07-like*. Para ello, cultivos de la cepa salvaje y la cepa  $\Delta$ *tbpD* crecidos en TSB-1 hasta una DO<sub>600</sub> de 0,6 (fase exponencial) se centrifugaron a 9000 x g durante 10 minutos y se lavaron dos veces con solución salina (0,85% NaCl). Las células se resuspendieron vigorosamente en 100 µl de tampón TE con lisozima (1 mg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. El ARN total de la muestra se aisló utilizando el kit *NucleoSpin* (Macherey-Nagel) y se trató con DNasa I (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, 0,2 µg de ARN molde se retrotranscribieron a ADNc empleando la enzima *M-MLV-Reverse Transcriptase* (Invitrogen). La reacción de PCR se realizó utilizando la polimerasa *NZY taq II 2X Green Master Mix* (NZY-tech) siguiendo las indicaciones del fabricante y las condiciones de la Tabla 3.4. Para descartar la presencia de ADN residual, las muestras de ARN se amplificaron por PCR y se utilizaron como control negativo. Como control positivo se empleó ADN genómico de la cepa salvaje y de la cepa mutante para *tbpD*. Los cebadores empleados en la RT-PCR se especifican en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5 Cebadores utilizados para las reacciones RT-PCR

PCR - gen diana	Secuencia (5'-3')	Amplicón
RT	GTCACTCACGGTCACTACAA	-
<b>PCR A - <i>vep07-like</i></b>		
P1	GCGGATCCTAGGCCAATTGAGGCATCA	192 pb
P2	TCTGCTTGTAAATGGAGGTGG	
<b>PCR B - <i>tbpD</i></b>		
P3	CCAGCTTTCCAATTAACACC	374 pb
P4	AAAGGAAGTGATGGCGACTC	
<b>PCR C - <math>\Delta</math><i>tbpD</i></b>		
P3	GCGGATCCTAGGCCAATTGAGGCATCA	338 pb
P4	AGCTGTAATCTCCATGCCGA	

### 3.4. CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN Y CONSTRUCCIÓN DE LOS VECTORES PLASMÍDICOS pVIBEXP Y PA-162-VIBEXP

Para la construcción del ADN recombinante, se emplearon distintos vectores plasmídicos a los que se clonaron fragmentos de ADN (insertos) previamente digeridos con las mismas enzimas de restricción (New England Biolabs). Además, para evitar la autoligación y facilitar la unión con el inserto, los plásmidos cortados con una sola enzima de restricción se trataron con fosfatasa alcalina *FastAP* (Thermo Fischer Scientific) para eliminar los grupos fosfato del extremo 5'. Los insertos y plásmidos, en diferentes proporciones según cada caso, se unieron mediante la adición de la ADN ligasa T4 (Thermo Fischer Scientific). Las ligaciones se incubaron toda la noche a 16 °C y se transformación por choque térmico, siguiendo el protocolo descrito en la siguiente sección.

### 3.5. TRANSFORMACIÓN DE ADN POR CHOQUE TÉRMICO EN *E. COLI*

Para la obtención de células de *E. coli* químicamente competentes (cepas DH5 $\alpha$ , S17-1- $\lambda$ -pir o  $\beta$ -3914), se inoculó una colonia aislada de un cultivo fresco en 5 ml de LB y se creció toda la noche a 37 °C en agitación. A continuación, el precultivo se inoculó en un matraz con 500 ml de medio LB y se creció a 37 °C en agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,2 - 0,4.

En este punto, el crecimiento se detuvo introduciendo el matraz en hielo y las células se centrifugaron a 5000 rpm a 4 °C.

Las células precipitadas se lavaron con 25 ml de una solución de CaCl<sub>2</sub> (0,1M) fría y estéril. Una vez resuspendidas, las células se centrifugaron de nuevo y se resuspendieron en una solución de CaCl<sub>2</sub> (0,1M) con glicerol al 10%. Finalmente, las células se repartieron en alícuotas de 100 µl y se almacenaron hasta su uso en tubos Eppendorf de 1,5 ml a -80 °C.

Para la transformación por choque térmico, se añadieron 20 µl de la ligación a un vial con 100 µl de células competentes previamente descongeladas en frío y se incubaron durante media hora en hielo. A continuación, se realizó el choque térmico en un baño de agua a 42 °C durante 90 s e inmediatamente después, se incubó 3 minutos de nuevo en hielo. Posteriormente, se añadió 1 ml de LB fresco y las células se incubaron en agitación continua a 150 rpm durante 1 h a 37 °C. Por último, el cultivo se centrifugó y las células resuspendidas en 100 µl de LB se sembraron en placas de LB suplementadas con los antibióticos adecuados.

### **3.6. TÉCNICAS DE SECUENCIACIÓN Y HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS**

#### **3.6.1. Secuenciación clásica o de Sanger**

La secuenciación de plásmidos y productos de PCR, se realizó por una empresa externa (*Eurofins Genomics*, Luxemburgo) a través del método de terminación de cadena o dideoxi de Sanger. Los productos de amplificación y/o las bandas recortadas desde geles de agarosa, se purificaron con el kit *NZYGelpure* (NZYtech). Para el análisis bioinformático de las secuencias obtenidas, se utilizaron los programas BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) y SnapGene software v 4.1.9. Para la búsqueda de homologías, las secuencias nucleotídicas y/o aminoácidas resultantes se analizaron mediante el algoritmo BLASTn y/o BLASTp de la base de datos NCBI.

#### **3.6.2. Secuenciación y anotación del genoma completo de RM-71**

Para la secuenciación del genoma de la cepa de *Pdd* RM-71, el ADN genómico de la cepa se extrajo utilizando el kit *G NOME DNA Kit* (MP Biomedicals), siguiendo las instrucciones del fabricante. El genoma de

la cepa RM-71 se secuenció por SNPsaurus utilizando secuenciadores PacBio Sequel II (Pacific Biosciences) y HiSeq 4000 (Illumina). El control de calidad de las lecturas de Illumina se realizó utilizando Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2004), filtrando las lecturas y recortando las bases de baja calidad. El ensamblaje de las lecturas de PacBio se realizó con el ensamblador *de novo* de lecturas largas Flye 2.4.1 (Kolmogorov *et al.*, 2019) y se pulió con Racon (Vaser *et al.*, 2017). Por último, el ensamblaje resultante fue curado por las lecturas de Illumina utilizando la herramienta Pilon (Walker *et al.*, 2014). La anotación de las secuencias codificantes (CDS) se realizó utilizando el servidor NCBI (Tatusova *et al.*, 2016). La secuencia obtenida del genoma de la cepa de *Pdd* RM-71 se depositó en la base de datos GenBank con el número de acceso GCA\_001708035.2.

### 3.6.3. Secuenciación del ARN (RNA-Seq)

Para la extracción del ARN, se prepararon tres precultivos independientes en medio TSB de la cepa de *Pdd* RM-71 para cada condición de salinidad (1% NaCl y 3% NaCl) hasta que alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 0,3. A continuación, cada precultivo se diluyó (1:100) y se cultivó en 10 ml de TSB a cada salinidad, hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,55. En este punto, los cultivos se trataron con el reactivo *RNAprotect Bacteria* (Qiagen) para estabilizar el ARN. El *pellet* celular se resuspendió en tampón TE (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) con 10- $\mu$ L de lisozima (15 mg/ml) (Sigma-Aldrich) y 15  $\mu$ L de proteinasa K (20 mg/ml) (Qiagen). Para la extracción del ARN se utilizó el kit *RNeasy Mini* (Qiagen) mientras que la digestión con DNasa I se realizó utilizando el kit *RNase-free DNase* (Qiagen). La integridad y la cantidad del ARN total se evaluaron utilizando un Bioanalyzer 2100 (RNA 6000 Nano chip assay) y el Qubit 3.0 (Quant-It dsRNA BR Assay). La eliminación del ARNr se llevó a cabo con el kit *Ribo-Zero rRNA Removal* (Gram-negative bacteria) (Illumina), y las bibliotecas de ADNc se generaron utilizando el kit *TruSeq RNA* de acuerdo con las instrucciones de Illumina. En primer lugar, el ARN libre de ARNr se fragmentó químicamente y se sometió a transcripción reversa para la síntesis del ADNc. Se realizó un proceso reparativo añadiendo una única base "A" al extremo 3' de los fragmentos de ADNc y a

continuación se ligaron los adaptadores. Por último, los productos limpios se enriquecieron mediante PCR para generar las bibliotecas de ADNc de doble cadena para su posterior secuenciación mediante Illumina HiSeq 2500.

Una vez realizado el control de calidad con el programa FastQC, las lecturas se mapearon frente al genoma de la cepa de *Pdd* RM-71 (RefSeq assembly accession no.: GCF\_001708035.2) utilizando el algoritmo Bowtie2 v2.2.6 (Langmead and Salzberg, 2012). Las lecturas de baja calidad se eliminaron utilizando la herramienta PicardTools (<http://picard.sourceforge.net>). Además, se realizaron varios pasos de control para determinar la calidad de los procesos de secuenciación y mapeo. Se evaluó la distribución del contenido de GC y la proporción de duplicados de las lecturas mapeables y la cuantificación genética se realizó mediante el software HTSeq (versión 0.6.1) (Anders *et al.*, 2015). Para evaluar si las distintas muestras obtenidas podrían considerarse réplicas biológicas, se realizó un estudio de correlación y distancia entre muestras procedentes de una misma condición. Para ello, se analizó el transcriptoma normalizado en base al tamaño de la librería con el programa estadístico R.

El análisis de la expresión diferencial se realizó mediante el método DESeq2 (versión 1.18.1) (Love *et al.*, 2014) y se aplicó una distribución binomial negativa diferencial para determinar la significación estadística. Se empleó un *script* en Python desarrollado por Sistemas Genómicos (Valencia, España) para generar una matriz de datos con los recuentos obtenidos para cada muestra (cada una de las tres réplicas en cada una de las dos salinidades). Los genes se consideraron expresados diferencialmente cuando los valores de cambio de expresión o *Fold Change* (FC) fueron inferiores a -1,5 o superiores a 1,5 con un valor-*p* ajustado por FDR menor o igual a 0,05. Los genes expresados diferencialmente (DEG) se mapearon frente a las bases de datos Uniprot, COG (Cluster of Orthologous Groups), GO (Gene Ontology) y KEGG (Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) y se analizaron mediante la prueba hipergeométrica. Se utilizó un valor-*p* ajustado a FDR de 0,05 para determinar una categoría funcional como estadísticamente significativa o sobrerrepresentada (Benjamini and Hochberg, 1995).

### 3.7. TÉCNICAS PROTEÓMICAS

#### 3.7.1. Análisis SDS-PAGE de proteínas de membrana externa

Para la extracción de proteínas periplasmáticas (PPs) y proteínas de membrana externa (OMPs) se utilizó el protocolo descrito por Lee *et al.*, (2007). Para obtener el perfil de proteínas de membrana de *Pdd* en respuesta a una baja disponibilidad de hierro (Fe), cultivamos las cepas en medio mínimo CM9-1 suplementado con el quelante 2,2'-dipiridil (CM9-1+Dip) a una concentración final de 40  $\mu\text{M}$ . Como condición control se incluyó el crecimiento de la cepa RM-71<sup>wt</sup> en medio CM9-1 sin quelante (condición no limitante en Fe).

Teniendo en cuenta que la baja disponibilidad de hierro activa la expresión de la proteína TbpD (Puentes *et al.*, 2017), el análisis del perfil de proteínas de membrana externa del mutante *tbpD* (AVZ159) y del mutante complementado (AVZ410), se realizó cultivando las cepas en CM9-1 suplementado con 40  $\mu\text{M}$  de 2,2'-dipiridil. Las proteínas periplasmáticas y las proteínas de membrana externa obtenidas se analizaron por SDS-PAGE en geles Mini-Protean al 10% de poliacrilamida (Bio-Rad) utilizando el sistema de tampón discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Para la tinción de las proteínas se utilizó Coomassie Brilliant Blue R250.

#### 3.7.2. Análisis SDS-PAGE de los sobrenadantes

Para analizar el efecto de los cambios de la salinidad en la abundancia de proteínas secretadas, se recolectaron los productos extracelulares (ECPs) de la cepa de *Pdd* RM-71 de tres cultivos independientes crecida en medio TSB-1 y TSB-3. En un primer intento, para correlacionar los perfiles de proteínas con los resultados del análisis transcriptómico, se obtuvieron los ECPs de cultivos crecidos en las mismas condiciones utilizadas para el análisis RNA-seq (DO<sub>600</sub> de 0,55). Sin embargo, la cantidad de proteína obtenida de los sobrenadantes en fase exponencial fue muy baja y por ello se decidió analizar el perfil del secretoma de cultivos crecidos en fase estacionaria (DO<sub>600</sub> de 1,7). Las suspensiones bacterianas se centrifugaron (13.000  $\times g$ , 5 minutos, 4 °C) y los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania).

La precipitación de proteínas de los sobrenadantes se realizó como se ha descrito previamente, mediante TCA (ácido tricloroacético) (Terceti *et al.*, 2019), y las proteínas precipitadas se sometieron a análisis SDS-PAGE en geles al 14% de poli(acrilamida) utilizando el sistema de tampón discontinuo de Laemmli (Laemmli, 1970). Para la tinción de proteínas se utilizó Coomassie Brilliant Blue R250.

### 3.7.3. Cuantificación de proteínas por densitometría

Los geles SDS-PAGE correspondientes al análisis de los sobrenadantes, se escanearon en un densitómetro calibrado GS-900 (Bio-Rad) y se analizaron utilizando el software Image Lab v. 6.0.1 (Bio-Rad). La detección de las bandas se realizó de manera automática por el programa informático, seleccionando el ajuste de alta sensibilidad. Los valores del disco rodante (*rolling disk*) se fijaron para el carril del gel con menor intensidad, se aplicaron a todos los carriles y se ajustaron para determinar la intensidad a sustraer del fondo para cada banda. La normalización entre carriles se determinó utilizando la banda de sialidasa como proteína secretada constitutiva o *housekeeping* (HKP) dada su expresión estable en las condiciones experimentales testadas. Para ello, se calculó el factor de normalización de carril (LNF) para cada gel dividiendo la señal HPK de cada carril por el valor HPK de mayor intensidad. A continuación, se determinó la intensidad de banda normalizada para cada proteína diana dividiendo su valor de señal por el LNF correspondiente. Para cada proteína, se calculó la media de las intensidades de banda normalizadas de tres réplicas procedentes de cultivos independientes para cada condición (1% NaCl y 3% NaCl) en un total de tres geles. Los datos densitométricos se analizaron estadísticamente con el programa GraphPad Prism 9 Software mediante una prueba *t* de Student no emparejada, de dos colas.

### 3.8. OTRAS HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS EMPLEADAS

La predicción estructural de la proteína TbpD se realizó empleando el servidor AlphaFold2 (DeepMind Technologies, London, UK) (Jumper *et al.*, 2021). Para ello, la secuencia aminoacídica se recuperó de la base de datos NCBI (WP\_176455483.1) y la libreta Colab se utilizó para predecir la estructura 3D (Mirdita *et al.*, 2022).

Para el análisis comparativo de los contextos genéticos de TbpD en los homólogos presentes en *Pdd* y en otros miembros de la familia *Vibrionaceae*, se realizó una búsqueda mediante BLASTP en la base de datos NCBI. Los homólogos a TbpD con un *query cover* superior al 95% y un porcentaje de identidad superior al 30% se seleccionaron y se representaron empleando la herramienta Clinker (Gilchrist *et al.*, 2021).

### 3.9. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES POR INTERCAMBIO ALÉLICO

Durante el transcurso de este trabajo se construyeron mutantes por intercambio alélico para los genes de la  $\delta$ -endotoxina PirB (A0J47\_RS13275), de la arginina deiminasa ArcA (A0J47\_RS14010) y del receptor putativo de transferrina TbpD (A0J47\_RS20555). Para estudiar si la toxina PirAB tenía un impacto en la virulencia de *Pdd* para peces, construimos un mutante de la cepa RM-71 defectivo para las cuatro toxinas previamente caracterizadas Dly, PhlyP, PhlyC y PlpV (Rivas *et al.*, 2013, Vences *et al.*, 2017). Este tetramutante (denominado aquí AVL442) carece de estas cuatro toxinas pero mantiene intactos los genes *pirA* y *pirB*. El mutante AVL442 se construyó delecionando el gen *plpV* con los cebadores descritos previamente (Vences *et al.*, 2017) en el triple mutante (Dly, PhlyP, PhlyC) AR89 construido previamente (Rivas *et al.*, 2013).

Mediante la técnica de intercambio alélico, la copia nativa de un gen concreto se intercambia por una construcción que contiene una delección en la región central del gen. Para ellos se amplificaron por PCR regiones de aproximadamente 2 kb de los extremos 5' y 3' del gen diana utilizando la polimerasa *NZYProof 2x Green*. A cada cebador diseñado se le añade, a modo de adaptador, una secuencia diana para un enzima de restricción que garantiza que los fragmentos se clonen en la orientación correcta. Para este fin, los cebadores 2 y 3 presentan el mismo sitio de restricción. Posteriormente, estos fragmentos se ligan de manera que el alelo reconstruido sufre una delección de más del 90% de su secuencia codificante. Los cebadores utilizados para la construcción y el *screening* de los distintos mutantes se describen en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6 Lista de cebadores empleados para el screening de genes y la construcción de mutantes por intercambio alélico

Nombre	Secuencia (5'-3')*	Amplificación	Fuente
<b>Mutación de genes por intercambio alélico</b>			
<b>Mutación del gen <i>pirB</i> (A0J47_RS13275)</b>			
Mut_ <i>pirB</i> _1_BamHI	G <u>CGGATCCG</u> CAAAGTTCAAATCAAGAGT	2020	Este estudio
Mut_ <i>pirB</i> _2_SmaI	G <u>CCCCGGG</u> AGGTTTTCTTGGGTCCGC		
Mut_ <i>pirB</i> _3_SmaI	G <u>CCCCGGG</u> TTCTCTTATTTCTCCAAA	2011	
Mut_ <i>pirB</i> _4_XhoI	G <u>CCTCGAGT</u> CAGCGAGCTATTAGGTGTT		
<b>Mutación del gen <i>arcA</i> (A0J47_RS14010)</b>			
Mut_ <i>arcA</i> _1_XhoI	G <u>CCTCGAGT</u> CTTCACCGTGGAAATGCAG	1998	Este estudio
Mut_ <i>arcA</i> _2_PstI	G <u>CCTGCAGC</u> GTGCATGAGCTGCCAAT		
Mut_ <i>arcA</i> _3_PstI	G <u>CCTGCAGC</u> ACGATGAACAAGAAGCTCGGC	1985	
Mut_ <i>arcA</i> _4_NotI	G <u>CGCGCCGC</u> GGAAGCGGCTGCCATTGACGT		
<b>Mutación del gen <i>tbpD</i> (A0J47_RS20555)</b>			
Mut_ <i>tbpD</i> _1_BamHI	G <u>GGATCCG</u> GCCCAAATCCTCATAACA	1994	Este estudio
Mut_ <i>tbpD</i> _2_SmaI	G <u>CCCCGGG</u> ACAGCTCCTGGTGTAAATG		
Mut_ <i>tbpD</i> _3_SmaI	G <u>CCCCGGG</u> TTCCGGCATGGAGATTACAGC	2005	
Mut_ <i>tbpD</i> _4_ApaI	G <u>GGGCCCT</u> GAACTTTGACTAGCACCT		
<b>Screening de genes</b>			
<b>Screening del gen <i>pirB</i></b>			
Mut_ <i>pirB</i> _int_5'	TCCATTTCGTTCTTGTTCGA	WT: 1440	Este estudio
Mut_ <i>pirB</i> _int_3'	GATTTTTCAACGGACGATAT	$\Delta$ <i>pirB</i> :370	
<b>Screening del gen <i>arcA</i></b>			
Mut_ <i>arcA</i> _int_5'	GCGTTACCGCCAAGTGCAAC	WT: 1380	Este estudio
Mut_ <i>arcA</i> _int_3'	TAAGCTGGCATGATGCTGGC	$\Delta$ <i>arcA</i> :158	
<b>Screening del gen <i>tbpD</i></b>			
Mut_ <i>tbpD</i> _5'	GACGTAGAGATCGCTTTATC	WT: 2644	Este estudio
Mut_ <i>tbpD</i> _3'	GACAATTAATACTAGTGCCGT	$\Delta$ <i>tbpD</i> :523	
<i>tbpD</i> _int_5'	GAGATAGACTTACCATTCT	750	
<i>tbpD</i> _int_3'	TCTTAAGCAAGACTTCGGTG		
<b>Screening de genes de <i>P. damsela</i> subsp. <i>damsela</i></b>			
<i>colP</i> _F	CCTGCTACAGTTCGAGCTCA	1617	Vences <i>et al.</i> , 2017
<i>colP</i> _R	TCAACCACTCGAGATATTCC		
<i>ureD</i> _F	TCATACGTATTTACTGCATC	396	Osorio <i>et al.</i> , 2000
<i>ureD</i> _R	AGATAAAGTGATTCAAGAGA		

\*La secuencia subrayada marca las dianas de restricción incluidas en la secuencia del cebador

Los dos fragmentos amplificados (región 5' y 3' del gen diana) se clonaron en el plásmido pWKS30 de manera secuencial, utilizando la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Esta construcción se liberó con las enzimas ApaI y NotI y se ligó al vector suicida pNidKan derivado del plásmido pCVD442.

Este vector plasmídico, almacenado en la cepa de *E. coli* S17-1- $\lambda$ *pir*, contiene dos elementos característicos: el origen de replicación R6K dependiente del gen *pir*, y el gen *sacB* que le confiere sensibilidad a la sacarosa. Cada construcción clonada en el pNidKan se transfirió por conjugación desde *E. coli* S17-1- $\lambda$ *pir* a la cepa de *Pdd* RM-71 en placas de TSA-Agua de Mar durante 48 h a 25 °C.

Para forzar el primer evento de recombinación, se seleccionaron los clones transconjugantes en medio TCBS suplementado con kanamicina. Cabe destacar que la incapacidad de este plásmido para replicarse en *P. damsela*, carente del gen *pir*, hace que solo pueda perpetuarse si se integra en el cromosoma bacteriano por un proceso de recombinación homóloga.

A continuación, los clones resistentes a kanamicina (denominados primeros recombinantes) se incubaron en medio TSB-1 sin presión selectiva y tras varios pases, se sembraron las diluciones en medio TSA suplementado con un 15% de sacarosa. Las células capaces de formar colonias en medio suplementado con sacarosa son las que han perdido el plásmido suicida y, por tanto, el gen *sacB*. Una vez que la construcción se integra en el cromosoma, la segunda recombinación se producirá, en un 50% de los casos, en la misma región, de manera que el plásmido suicida se liberará arrastrando la copia delecionada. Los clones obtenidos se denominan clones revertientes. En el otro 50% de los casos, la recombinación se producirá en el otro fragmento, y el plásmido arrastrará la copia intacta del gen, dejando la copia delecionada en el cromosoma. El mecanismo de obtención de mutantes por intercambio alélico se esquematiza en la Figura 3.1.

La identificación de los clones mutantes y los clones revertientes se realizó mediante amplificación por PCR. Para ello se utilizaron cebadores que amplifican la región delecionada, de manera que los mutantes dan lugar a amplicones más pequeños, mientras que los clones revertientes muestran tamaños correspondientes al gen nativo. Por último, las regiones del genoma implicadas en la deleción de cada gen se amplificaron por PCR y se comprobaron por secuenciación para descartar la presencia de mutaciones polares.

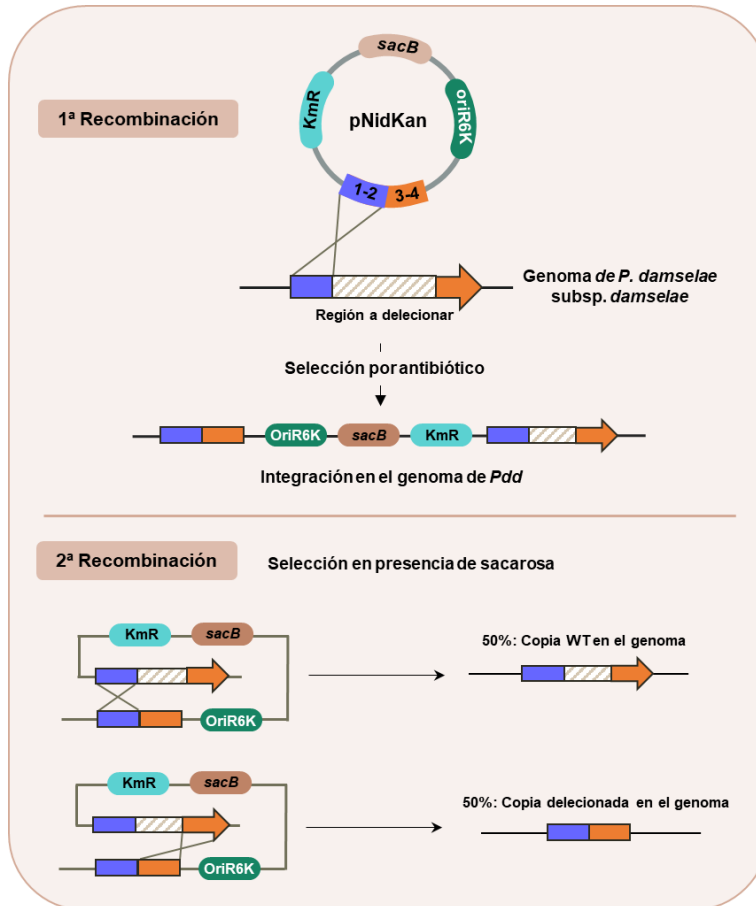


Figura 3.1 Esquema del proceso de mutación por intercambio alélico. Los fragmentos aguas arriba (1-2) y aguas abajo (3-4) del gen diana se amplifican por PCR y se clonan en el plásmido suicida pNidKan que alberga el gen de resistencia a kanamicina (*Km<sup>R</sup>*), el gen *sacB* de sensibilidad a sacarosa y el origen de replicación R6K, que requiere del gen *pir* para replicarse. Una vez que este plásmido se transfiere a *Pdd* por conjugación, se ve obligado a integrarse en el cromosoma mediante recombinación homóloga. Mediante selección por antibiótico, se generan recombinantes de *Pdd* resistentes a *Km*. El segundo evento de recombinación, forzado por la selección en presencia de sacarosa conduce a dos escenarios posibles. En el 50% de los casos, si la recombinación sucede en el mismo sitio, el plásmido suicida se liberará portando la copia delecionada. Sin embargo, en el otro 50%, el plásmido lleva consigo la copia salvaje (WT) dejando el alelo delecionado en el genoma de la bacteria.

### **3.10. COMPLEMENTACIÓN DE MUTANTES CON EL GEN SALVAJE**

Para la complementación genética de los mutantes se empleó el plásmido pA-162-Vibexp (pAVZ368) construido en el presente trabajo. Para ello los genes amplificados por PCR, incluida la región promotora, se clonaron en el MCS del vector. Los cebadores diseñados para la complementación y el *screening* de los genes se reflejan en la Tabla 3.5 y en la Tabla 3.6. Las construcciones se transformaron por choque térmico en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  y en la cepa auxótrofa  $\beta$ -3914 y se movilizaron por conjugación a los clones de la cepa RM-71 defectivos para el gen diana. Los clones transconjugantes se seleccionaron en cloranfenicol, resistencia conferida por el vector pA-162-Vibexp. La presencia de la versión nativa del gen se comprobó mediante amplificación por PCR con cebadores específicos que hibridan en la región interna del gen.

### **3.11. MICROSCOPIA**

#### **3.11.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)**

Para la microscopía electrónica de barrido (SEM), cultivos de *Pdd* crecidos en TSB-1 y TSB-3 se detuvieron al alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,55. Las células se centrifugaron (4000 g, 5 min a 4 °C) y se fijaron durante 3 h a 4 °C en paraformaldehído al 4% y glutaraldehído al 2% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4) y posteriormente se fijaron durante 1,5 h en tetróxido de osmio al 1% en el mismo tampón. Las muestras se lavaron tres veces en agua destilada, se deshidrataron con una serie gradual de alcohol etílico, se secaron químicamente con hexametildisilazano (HMDS, Sigma) y se recubrieron con iridio mediante pulverización catódica.

Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de barrido Ultra Plus ZEISS. Para determinar la longitud y la anchura de las células de *Pdd* RM-71 crecidas a ambas salinidades (1% y 3% NaCl) se utilizó el software Fiji (ImageJ version 1.51n) (Schindelin *et al.*, 2012).

#### **3.11.2. Microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

Para la microscopía electrónica de transmisión (TEM), las cepas de *Pdd* se cultivaron en TSA-1 durante 24 h a 25 °C. A continuación, se resuspendió una colonia en TSB-1 y se dejó crecer hasta alcanzar una

DO<sub>600</sub> de 0,5. Diluciones seriadas del cultivo se sembraron en placas de TSA-1 y TSA-3 y se cultivaron durante 14 h a 25 °C para obtener colonias aisladas. Las placas se cubrieron con 10 ml de una solución fijadora que contenía paraformaldehído al 2%, glutaraldehído al 2,5% y rojo de rutenio al 0,075% en tampón de cacodilato 0,1 M (pH 7,4) y se incubaron 3 h a temperatura ambiente. A continuación, la colonias se separaron suavemente del agar, se lavaron tres veces con tampón de cacodilato 0,1 M (pH 7,4) con 0,075% de rojo de rutenio y se fijaron durante 1 h con una solución de tetróxido de osmio al 1% y rojo de rutenio al 0,075% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4). Las colonias se lavaron con solución tamponada de cacodilato 0,1 M (pH 7,4) con rojo de rutenio al 0,075%, se deshidrataron mediante una serie graduada de etanol y se incrustaron en resina Epon. Mediante el uso de un Ultramicrotomo RMC (PowerTome) con cuchillas de diamante Diatome, se obtuvieron secciones ultrafinas (40-60 nm de grosor) de varias colonias que se contrastaron con acetato de uranilo (2%) durante 5 minutos. Las muestras se visualizaron en un Microscopio TEM JEOL JEM 1400 y las imágenes se capturaron con una cámara digital CCD Orius 1100 W (Gatan Inc.). El espesor de la cápsula de la cepa RM-71 credida al 1% y al 3% NaCl se determinó midiendo la cápsula de 30 células por cepa utilizando el software Fiji (ImageJ versión 1.51n; Schindelin *et al.*, 2012). Para cada célula individual, la cápsula se midió en seis puntos diferentes y el espesor de la cápsula para cada célula se calculó como la media de las seis mediciones. Para determinar la significación estadística se utilizó la prueba *t* de Student.

### **3.12. EXPERIMENTOS DE CRECIMIENTO Y VIABILIDAD**

Para los ensayos de crecimiento, un preinóculo de la cepa RM-71 de *Pdd* ajustado a una DO<sub>600</sub> de 0,3 se diluyó (1:100) en 100 µl de medio en una placa de 96 pocillos. Los cultivos bacterianos se incubaron a 25 °C en condiciones de agitación, y el crecimiento se monitorizó durante 24-48 h utilizando el lector de microplacas Epoch2 (BioTek). Para cada ensayo se realizaron dos experimentos independientes y se incluyeron al menos dos réplicas por condición. Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo al propósito de cada experimento y quedan detallados a continuación.

### **3.12.1. Crecimiento en microcosmos marino**

Para evaluar el crecimiento de *Pdd* en microcosmos marino, se recogieron muestras de agua de mar en la playa de Lodeiro, Rianxo, Galicia. Una muestra constituida por agua de mar sin partículas macroscópicamente visibles se esterilizó en el autoclave y se denominó como NSW (*Natural Seawater*, agua de mar natural). A una segunda muestra de 100 ml de agua de mar se le añadieron 30 g (peso húmedo) de macroalgas (*Ulva lactuca*) presentes en el propio lugar de recogida. La mezcla se trituró mecánicamente, se hirvió a 95 °C durante 1 minuto y se etiquetó como ESW (*Eutrophicated Seawater*, agua de mar eutrofizada). Los dos tipos de muestras se suplementaron con 0,2% de casaminoácidos (Difco) según fue necesario.

### **3.12.2. Crecimiento en medio mínimo suplementado con carbohidratos**

En este experimento se evaluó la capacidad de la cepa RM-71 para fermentar los carbohidratos fructosa y trehalosa bajo diferentes concentraciones de NaCl. Para ello, se suplementó primero el medio basal OF (Oxidación/Fermentación) (Difco) con agar (15 g/L) y NaCl hasta una concentración final del 1% y del 3% NaCl. Una vez autoclavado, las soluciones de fructosa y trehalosa (Sigma-Aldrich) se añadieron individualmente hasta una concentración final del 0,5%. A continuación, se sembró la cepa RM-71 en cada uno de los medios desde una placa de TSA-1 de 16 h de crecimiento. Las placas se incubaron a 25 °C y se monitorizaron durante 3 días. La capacidad para fermentar los azúcares se manifestó por un cambio de color verde a amarillo en el medio de cultivo. Para los experimentos de crecimiento en líquido, se preparó medio mínimo CM9 con trehalosa y un medio CM9 con fructosa, substituyendo la glucosa por un 0,5% de cada carbohidrato. Las concentraciones finales de NaCl se ajustaron al 1% y al 3%, según fue necesario. El crecimiento en medio mínimo CM9 con 0,5% de glucosa en ambas concentraciones de NaCl se incluyó en el experimento como control.

### 3.12.3. Crecimiento en presencia de antibióticos

Para evaluar el impacto de la salinidad en el crecimiento en presencia de antibióticos, la cepa RM-71 se cultivó en TSB-1 y TSB-3 suplementados con kanamicina (50  $\mu\text{g/ml}$ ), ampicilina (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y vancomicina (25  $\mu\text{g/ml}$ ). Tras 40 h de incubación, las células cultivadas en TSB-3 en presencia de los antibióticos se diluyeron (1:100) en TSB-1 y TSB-3 frescos suplementados con antibióticos en una placa de 96 pocillos. El crecimiento se monitorizó durante otras 40 h.

### 3.12.4. Actividad antimicrobiana de la piscidina frente a *Pdd*

Para investigar si la salinidad tendría algún efecto en la resistencia de *Pdd* al péptido antimicrobiano Piscidina 1 (PP1), se diseñó un experimento de crecimiento en presencia de PP1 bajo distintas concentraciones de NaCl. El péptido PP1 se diseñó y elaboró según lo descrito por Barroso *et al.* (2020). Partiendo de una concentración de 15  $\mu\text{M}$  de PP1 (concentración mínima inhibitoria determinada previamente), se realizaron diluciones en serie (1:2) hasta una concentración de 0,12  $\mu\text{M}$ . A continuación, se inoculó la cepa RM-71 ( $10^8$  UFC/ml) en TSB-1 y TSB-3 en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$  en placas de 96 pocillos. Los pocillos sin inóculo y los pocillos sin péptido añadido se utilizaron como blanco y control, respectivamente.

### 3.12.5. Ensayos de supervivencia a pH ácido

Para investigar el efecto de la salinidad sobre la sensibilidad de *Pdd* a la acidez, se determinó la cinética de crecimiento a varios niveles de pH y se realizaron ensayos de supervivencia bajo diferentes concentraciones de NaCl. Para los ensayos de crecimiento a distintas condiciones de pH, se inocularon tres réplicas de la cepa RM-71 ajustada a una  $\text{DO}_{600}$  de 0,3 (1:100) en 100  $\mu\text{l}$  de TSB-1 y TSB-3 ajustados a pH 7, 6, 5 y 4. El crecimiento se monitorizó durante 48 h utilizando el lector de microplacas Epoch2 (BioTek) bajo condiciones de agitación constante. Para determinar la viabilidad de *Pdd* en la exposición al pH ácido, cultivos de las cepas RM-71 y  $\Delta\text{arcA}$  que se habían dejado crecer toda la noche en 5 ml de TSB-1 (pH 7) se diluyeron en TSB-1 y TSB-3 frescos y se cultivaron hasta una  $\text{DO}_{600}$  de 0,3.

Las células bacterianas se centrifugaron ( $4.000 \times g$ , 5 min.), se resuspendieron en 1 ml de TSB-1 y TSB-3 ajustados a pH 4 y se inocularon (1:100) en TSB-1 y TSB-3 (pH 4,0), con y sin L-arginina extra (10 mM) (Sigma-Aldrich), en placas de 96 pocillos.

El recuento de colonias se realizó mediante el método de recuento en gota. Para ello se prepararon diluciones decimales a  $t=0$  h y tras 16 h de incubación, en placas de 96 pocillos y se colocaron gotas de 5  $\mu$ l de cada dilución en placas de TSA-1. Las placas se incubaron a 25 °C durante 24 h y se determinó el número de células viables (UFC/ml) a cada tiempo.

### 3.12.6. Crecimiento en sangre y plasma de peces

Para determinar el impacto de la mutación del gen *tbpD* en la capacidad de *Pdd* para crecer en sangre, se realizaron experimentos de crecimiento en sangre y plasma de rodaballo y lubina. Para la extracción de sangre, los peces se sacaron del tanque de aclimatación y se anestesiaron individualmente con metanosulfonato de tricaina (MS-222, Sigma-Aldrich). Las muestras de sangre se extrajeron por punción de la vena caudal y se recogieron en tubos heparinizados.

A continuación, una parte de la sangre se centrifugó ( $4000 \times g$ , 4 °C, 7 min) y se recogió la fracción correspondiente al plasma. Para descartar el efecto bactericida del complemento, el plasma se inactivó a 56 °C durante 30 minutos. Del mismo modo, y para excluir un efecto bacteriostático derivado del secuestro de hierro de la transferrina del hospedador, el plasma crudo y el plasma inactivado se suplementaron con 100  $\mu$ M FeCl<sub>3</sub>. Para los experimentos de crecimiento, se mezclaron 50  $\mu$ L de suspensiones bacterianas que contenían  $1,6 \times 10^3$  UFC/ml cultivadas durante la noche en CM9-1 con 50  $\mu$ L de sangre y plasma en placas de 96 pocillos y se incubaron a 25 °C durante 7 h con agitación (160 rpm). Los recuentos bacterianos se determinaron a las 0 y 7 h post-inoculación en medio TSA-1 utilizando el método de recuento en gota. Los resultados obtenidos en UFC/ml se transformaron en Log<sub>10</sub> y se utilizó la prueba *t* de Student no apareada, para evaluar las diferencias significativas en el crecimiento (\*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ns: no significativo).

### **3.13. ENSAYOS DE ACTIVIDAD HEMOLÍTICA Y FOSFOLIPASA**

Las actividades hemolítica y fosfolipasa se evaluaron en placas de TSA suplementadas con agar sangre de oveja al 5% (Thermo Scientific) y extracto de yema de huevo al 3% (Oxoid), respectivamente. Para determinar el impacto de la concentración de NaCl en la observación fenotípica de estas dos actividades, se añadió NaCl a una concentración final del 1% o del 3% durante la preparación de los medios. Las placas se inocularon con una gota de 2  $\mu$ l de cultivos de RM-71 crecidos en TSB-1 y TSB-3 a una DO<sub>600</sub> de 1,2 y se incubaron a 25 °C durante 24-48 h. Ambas actividades enzimáticas se calcularon dividiendo el diámetro del halo de actividad entre el diámetro de la colonia. Para determinar la significación estadística se utilizó una prueba *t* de Student.

### **3.14. PRUEBA DE LA ARGININA DECARBOXILASA/DIHDROLASA**

El medio Arginina de Moeller se utilizó para comprobar la actividad arginina dihidrolasa/decarboxilasa disolviendo 10 g/L de Medio Base Decarboxilasa de Moeller (Difco), 10 g/L de L-arginina (Sigma-Aldrich), y suplementado con 1% o 3% de NaCl. Los tubos se inocularon con bacterias precultivadas en medio TSB-1 o TSB-3 hasta una DO<sub>600</sub> de 1,4 y se cubrieron con 1 ml de aceite mineral estéril. Se incluyó un tubo no inoculado como control negativo. Los tubos se incubaron a 25 °C durante 48 h y se monitorizaron cada 12 h para comprobar si se producían cambios.

### **3.15. ENSAYOS DE MOTILIDAD**

La motilidad se determinó mediante el ensayo de migración natatoria (Adler,1973). Para ello, se inocularon verticalmente 4  $\mu$ l de cultivos crecidos en TSB-1 o TSB-3 hasta una DO<sub>600</sub> de 0,2 en una placa TSA semisólida, que contenía 0,25% de agar, 10 mM de L-arginina (Sigma-Aldrich) y 1% o 3% de NaCl. Las placas se incubaron a 25 °C en condiciones aeróbicas y anaeróbicas y tras 24 h de incubación se midieron los halos de motilidad. Para las condiciones de anaerobiosis se utilizó un recipiente AnaeroJar, sobres AnaeroGen (Thermo Fisher Scientific) y tiras de resazurina (Thermo Fisher Scientific) para confirmar la ausencia de oxígeno durante la incubación.

### 3.16. EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Los experimentos con peces se realizaron en el Animalario Experimental de la Facultad de Biología de la Universidade de Santiago de Compostela (USC) (código del centro: 15004AE: ES150780263301). Los protocolos de experimentación animal empleados en este estudio han sido revisados y aprobados por el Comité de Ética Animal de la USC (ver “Anexo”). Los peces utilizados para los experimentos fueron cedidos por Insuñía S.L. (Oia, Galicia). Para evaluar el bienestar, los peces en aclimatación y sometidos al procedimiento experimental se monitorizaron diariamente a través del control de: indicadores físicos (aparición externa de los peces), indicadores de comportamiento (patrón natatorio) e indicadores ambientales (temperatura, pH, oxígeno y fotoperiodo).

#### 3.16.1. Ensayos de virulencia en peces

Para determinar si la mutación de los genes *pirB* y *tbpD* podría causar algún impacto en la virulencia de *Pdd* para peces, realizamos infecciones experimentales en modelos animales altamente susceptibles a la infección por la cepa RM-71: rodaballo (*Schophtalmus maximus*) y lubina (*Dicentrarchus labrax*). Para los ensayos experimentales de infección, 30 peces de rodaballo y 30 peces de lubina ( $6 \pm 1,2$  g), se dividieron aleatoriamente en 3 grupos (10 peces de cada especie/grupo) en tanques de 50 l y se aclimataron a 18 °C y a 24 °C, respectivamente, durante 1 semana antes del experimento.

Las infecciones se realizaron mediante inyección intraperitoneal de un volumen de 0,1 ml de suspensiones bacterianas preparadas en solución salina (0,85% NaCl) a dosis de  $4 \times 10^5$  UFC/pez en rodaballo y de  $2 \times 10^5$  UFC/pez en lubina, de la cepa salvaje RM-71 y de la cepa mutante. Un grupo control de 10 peces se inoculó con 0,1 ml de solución salina estéril. El análisis de potencia indica que, suponiendo una prueba bilateral y un nivel de significancia ( $\alpha$ ) de 0,05, un tamaño de muestra de 10 peces por grupo tiene una potencia del 80 % para detectar un tamaño de efecto estandarizado (SES) de 1.3 (Cohen, 1988; Festing, 2018). El análisis de potencia se realizó utilizando el software online EDA (<https://eda.nc3rs.org.uk/eda/login/auth>).

Las mortalidades se monitorizaron diariamente por un periodo de 7 días. En los peces muertos, el reaislamiento de *Pdd* en TSA-1 y TCBS se confirmó mediante PCR empleando los cebadores específicos para el gen *ureD* (Osorio *et al.*, 2000). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba log-rank (Mantel-Cox) (\* $p < 0,03$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns: no significativo) usando el programa GraphPad Prism 9. Este estadístico contrasta las funciones de supervivencia de dos grupos independientes cuando la variable relevante es el tiempo discurrido, en este caso, días post-inoculación.

### 3.16.2. Ensayos de infección competitiva

Para los experimentos de competición *in vivo*, se mezclaron en una proporción 1:1 suspensiones bacterianas de las cepas RM-71<sup>wt</sup> (WT) y  $\Delta tbpD$  en solución salina (0,85% NaCl) que contenían  $4 \times 10^6$  UFC/ml. Grupos de rodaballos juveniles ( $n=7$ ,  $4 \pm 1,4$  g) y lubinas ( $n=9$ ,  $6 \pm 1,5$  g) se inyectaron por vía intraperitoneal con 0,1 ml de la mezcla 1:1 de  $\Delta tbpD$ :WT y se realizó un seguimiento de la mortalidad. Las muestras obtenidas de bazo y riñón de peces recién muertos se diluyeron en solución salina y se sembraron en placas TSA-1.

La proporción de  $\Delta tbpD$ :WT en cada órgano se determinó analizando 50 colonias mediante PCR utilizando cebadores internos dirigidos al gen *tbpD* (Tabla 3.6). El índice de competitividad (IC) se calculó dividiendo la proporción  $\Delta tbpD$ :WT obtenida en cada órgano por la proporción en el inóculo inicial.

Los resultados del IC se analizaron estadísticamente con el programa GraphPad Prism 9. Los datos se transformaron en  $\log_{10}$  para normalizar su distribución y dado que ambos grupos presentaban homogeneidad de varianzas, se utilizó la prueba *t* de Student para determinar la significación estadística (\*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ns: no significativo). Cabe señalar que un valor  $\log_{10}CI$  de 0 indica igual grado de competitividad; es decir, la relación  $\Delta tbpD$ :WT del inóculo inicial.



## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ESTUDIO DE LAS RESPUESTAS TRANSCRIPTÓMICA Y FENOTÍPICA DE *P. DAMSELAE* SUBSP. *DAMSELAE* CULTIVADA AL 3% NaCl CON RESPECTO AL 1% NaCl\*

\*Los resultados de esta sección ya han sido publicados en el artículo: Barca, A. V., Vences, A., Terceti, M. S., do Vale, A., & Osorio, C. R. (2023). Low salinity activates a virulence program in the generalist marine pathogen *Photobacterium damselae* subsp. *damselae*. *mSystems*, 8(3), e0125322. Más información en el [Anexo](#): “Publicaciones derivadas de la tesis doctoral”.

Para garantizar el éxito, las bacterias patógenas facultativas deben responder de manera eficiente a las señales ambientales, de manera que la expresión de sus factores de virulencia se maximice dentro del hospedador y se infrarregule fuera de él (Thomas & Wigneshweraraj, 2014). En las bacterias marinas, una de las señales ambientales más informativas de la transición entre el entorno marino y el hospedador, es la caída de concentración de NaCl a la que se enfrentan al entrar en un hospedador vertebrado.

Nuestro conocimiento acerca de la señales ambientales y biológicas que regulan la expresión de los factores de virulencia en *Pdd* es escaso y se restringe a la influencia de la temperatura (Matanza *et al.*, 2018, 2020) y a la disponibilidad de hierro (Puentes *et al.*, 2017) en este patógeno marino. En cuanto a la salinidad, estudios previos en *Pdd* han demostrado que la concentración de NaCl modula la actividad transcripcional de los promotores de las citotoxinas principales Dly, PhlyP y PhlyC (Rivas *et al.*, 2013), así como de la actividad hemolítica y fosfolipasa (von Hoven *et al.*, 2018). No obstante, al margen de estas evidencias, poco se conoce acerca del papel de la salinidad en la regulación genética de *Pdd*. En este trabajo nos propusimos analizar la respuesta transcriptómica y fenotípica que se desencadena en *Pdd* a una salinidad próxima a la del agua del mar (3% NaCl) en comparación con el crecimiento a una salinidad similar a la del medio interno del hospedador vertebrado (1% NaCl).

#### **4.1.1. Vista general del perfil transcriptómico de la cepa de *Pdd* RM-71 bajo distintas condiciones de salinidad**

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* requiere de la adición de NaCl para su crecimiento y es capaz de crecer a concentraciones del 1%, 3%, 5% y 6% de NaCl (Love *et al.*, 1981). Para evaluar el impacto de la concentración de NaCl en la dinámica de crecimiento de *Pdd*, precultivos en medio TSB-1 de la cepa altamente virulenta RM-71, se utilizaron como iniciadores de nuevos cultivos (1:100) al 1% y al 3% de NaCl. Como se refleja en la Figura 4.1A, *Pdd* alcanzó una densidad óptica ligeramente superior al 3% de NaCl al final de la fase exponencial.

Para investigar la respuesta transcripcional de *Pdd* a los cambios en la concentración de NaCl, purificamos el RNA de cultivos exponenciales de la cepa RM-71 crecida, por triplicado, en TSB-1 y en TSB-3 y generamos seis bibliotecas de ADNc que se sometieron a secuenciación Illumina. De la secuenciación obtuvimos una media de 54,27 millones de lecturas brutas que se compararon con el genoma completo de alta calidad de la cepa RM-71, secuenciado durante el transcurso de esta tesis y depositado en GenBank con el número de acceso GCA\_001708035.2. El análisis de componentes principales (PCA) demostró una clara distinción entre los dos grupos de muestras (1% NaCl y 3% NaCl) (Figura 4.2). La información detallada sobre los datos de RNA-seq para cada réplica se describe en la Tabla 4.1.

Con el propósito de estudiar los cambios en la expresión génica que se desencadenan en *Pdd* cuando pasa del medio marino al medio interno del hospedador, establecimos como condición control el crecimiento al 3% de NaCl, que se comparó con el crecimiento al 1% de NaCl. El análisis comparativo de los perfiles transcriptómicos identificó 1.808 genes expresados diferencialmente (DEGs): 888 sobrerregulados ( $FC > 1,5$ ) y 920 infrarregulados ( $FC < -1,5$ ) al 1% de NaCl en comparación con el 3% de NaCl (Figura 4.1B). La lista completa de los DEGs a cada condición de salinidad se recogen en el siguiente enlace: [Tabla S1](#).

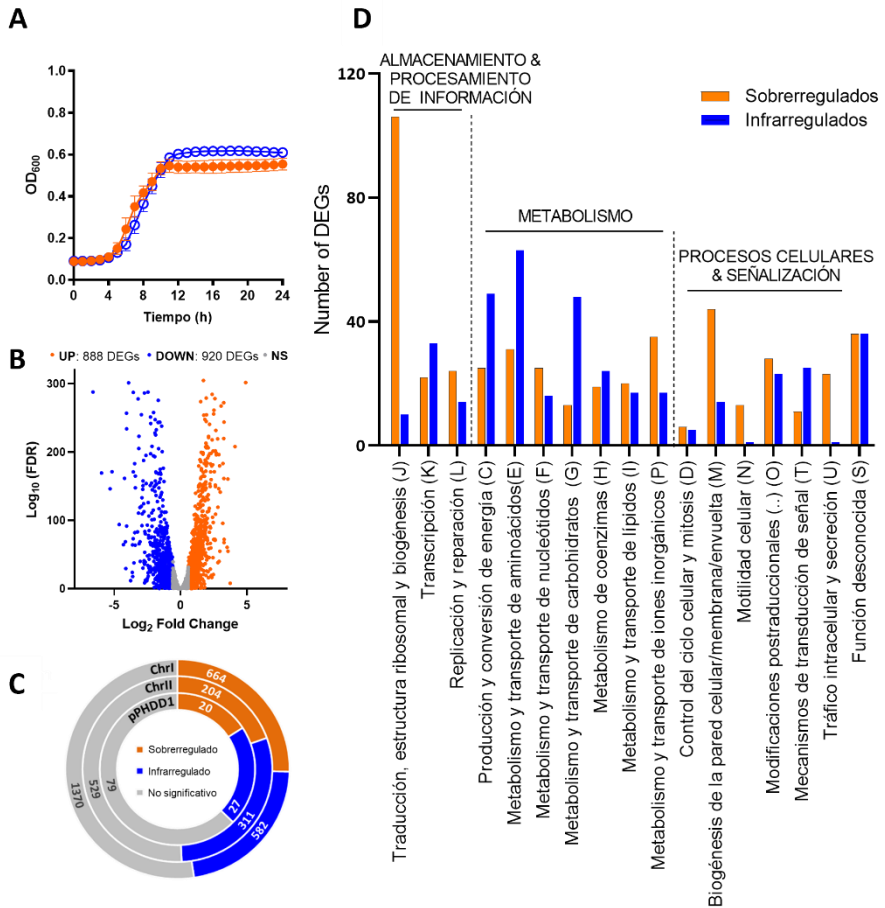


Figura 4.1 (A) Curva de crecimiento de la cepa de *Pdd* RM-71 en medio TSB al 1% y al 3% NaCl. Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y tres experimentos independientes. (B) *Volcano plot* en el que se muestra la significancia estadística de los valores de expresión diferencial o valores Fold Change (FC). Los genes con un *p*-valor ajustado por FDR  $\leq$  0.05 y con valores Log<sub>2</sub>FC  $\geq$  0.59 y  $\leq$  -0.59, se consideraron DEGs sobreexpresados (puntos naranjas) o infraexpresados (puntos azules) al 1% NaCl con respecto al 3% NaCl. (C) Distribución del número de genes sobreexpresados (naranja), infraexpresados (azul) y genes no expresados diferencialmente (gris) en el genoma de la cepa RM-71 al 1% de NaCl frente al 3% de NaCl. La distribución de los DEGs está equilibrada en ambos cromosomas, así como en el plásmido de virulencia pPHDD1. (D) Categorización funcional de los DEGs sobreexpresados (naranja) e infraexpresados (azul) al 1% de NaCl frente al 3% de NaCl según la base de datos COG (*Cluster of Orthologous Groups*).

Tabla 4.1 Información detallada sobre los resultados de la secuenciación del RNA para cada réplica biológica

Muestra (código)	Réplica	Lecturas totales	Lecturas mapeadas HQ*	% Lecturas mapeadas HQ
1% NaCl (RM_25)	R1	58686274	57205008	97.48
	R2	62550784	61038519	97.58
	R3	55938626	54690361	97.77
3% NaCl (RM_3_salt)	R1	47728092	46264033	96.93
	R2	46402608	45491032	98.04
	R3	54320954	53172666	97.89

\*HQ: alta calidad.

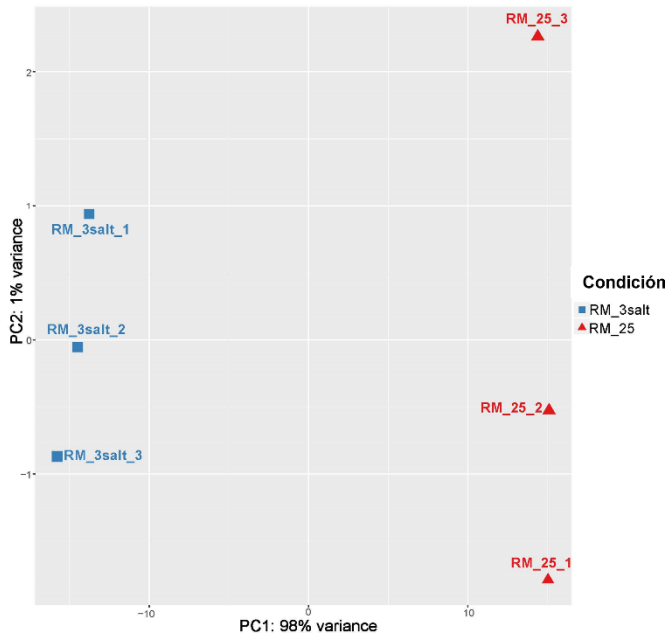


Figura 4.2 Agrupación jerárquica de todos los genes mediante Análisis de Componentes Principales (PCA) que demuestra la separación entre los grupos de muestras al 1% NaCl (RM\_25) y al 3% NaCl (RM\_3salt).

El análisis de la distribución de los genes regulados por NaCl en el genoma de la cepa RM-71 mostró que el número de genes regulados al alza y a la baja estaba equilibrado en los dos cromosomas, así como en el plásmido de virulencia pPHDD1 (Figura 4.1C).

Con el objetivo de obtener una visión general de las funciones más influenciadas por los cambios en la concentración de NaCl en *Pdd*, las proteínas codificadas por los distintos DEGs se mapearon frente a las bases de datos COG, KEGG y GO. Curiosamente, según la base de datos COG, la traducción (J) fue la categoría funcional más abundante asignada dentro del perfil de baja salinidad (Figura 4.1D).

Además, los genes sobreexpresados al 1% de NaCl se asignaron mayoritariamente a categorías funcionales implicadas en el metabolismo y transporte de iones inorgánicos (P), biogénesis de membrana (M), motilidad celular (N), y secreción y tráfico intracelular (U). Por el contrario, las categorías relacionadas con el metabolismo general, como la producción y conversión de energía (C) y el metabolismo y transporte de aminoácidos y carbohidratos (E y G, respectivamente) fueron las más representadas entre los genes sobreexpresados al 3% de NaCl. Las 15 rutas KEGG y las categorías GO más representativas del transcriptoma se detallan en la Figura 4.3.

En una visión general, el estudio comparativo de los transcriptomas reveló la regulación al alza de genes implicados en el metabolismo energético, la biosíntesis de aminoácidos, el sistema de la arginina deiminasa (ADI) y la captación de solutos compatibles al 3% de NaCl (Tabla 4.2), mientras que el crecimiento al 1% de NaCl reguló al alza genes que codifican citotoxinas y otras proteínas secretadas a través del SST2, los sistemas de captación de hierro y otros factores de virulencia (Tabla 4.3). Por lo tanto, proponemos que el crecimiento al 3% de NaCl regula al alza un "perfil ambiental" en *Pdd*, mientras que el cambio al 1% de NaCl regula al alza un "perfil de virulencia" (Figura 4.4). El estudio de la distribución de los DEGs a lo largo de los dos cromosomas del genoma de la cepa de *Pdd* RM-71 reveló que algunos de los DEGs más afectados correspondían a operones multigénicos (Figura 4.5). Los resultados más relevantes del análisis detallado de los transcriptomas se discuten en los siguientes apartados.

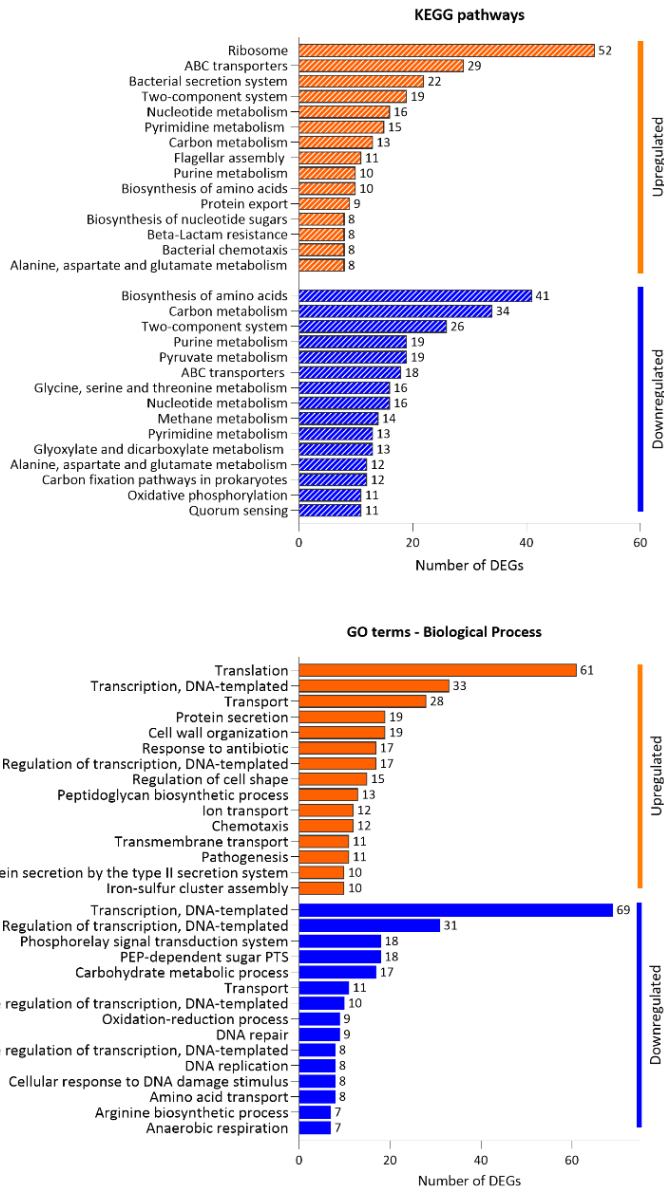


Figura 4.3 Gráficos que muestran las 15 rutas KEGG (A) y categorías GO (B) más representativas que se encuentran sobrerreguladas (naranja) e infrarreguladas (azul) en *Pdd* RM-71 al 1% NaCl con respecto al 3% NaCl.

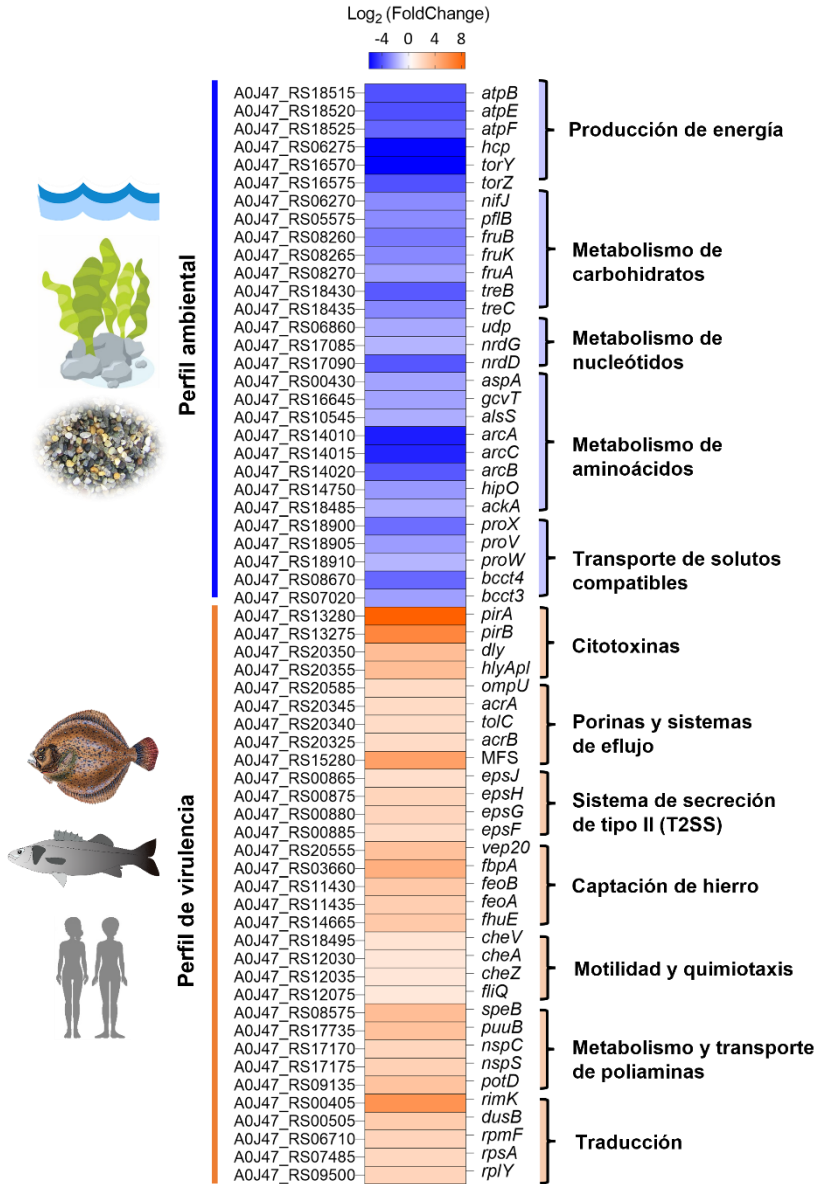


Figura 4.4 Heat map de la respuesta transcripcional global de *Pdd* al 1% NaCl (regulación al alza de un perfil de virulencia) en comparación con el 3% NaCl (regulación al alza de un perfil ambiental). La expresión diferencial para cada gen se representa en una escala de colores basada en los valores  $\text{Log}_2\text{FC}$ . Los segmentos naranjas representan la expresión inducida (FC positivos), mientras que los segmentos azules representan la regulación a la baja (FC negativos).

Tabla 4.2. Lista de DEGs sobreexpresados al 3% NaCl en RM-71

<i>Locus_tag</i>	Producto/Función	FC	Log <sub>2</sub> FC	P-value	Localiz <sup>a</sup>
<b>Metabolismo energético</b>					
A0J47_RS18510	Hypothetical protein	-19.83	-4.31	4.52E-66	ChrII
A0J47_RS18515	F <sub>o</sub> F <sub>1</sub> ATP synthase subunit a	-16.75	-4.07	1.31E-93	ChrII
A0J47_RS18520	F <sub>o</sub> F <sub>1</sub> ATPase subunit c	-17.46	-4.13	7.67E-31	ChrII
A0J47_RS18525	F <sub>o</sub> F <sub>1</sub> ATPase subunit b	-12.28	-3.62	1.12E-65	ChrII
A0J47_RS18540	F <sub>o</sub> F <sub>1</sub> ATPase subunit gamma	-10.65	-3.41	4.22E-82	ChrII
A0J47_RS00375	Fumarate reductase flavoprotein subunit FrdA	-3.95	-1.98	4.53E-76	ChrI
A0J47_RS16570	Cytochrome c-type subunit TorY	-62.18	-5.96	1.56E-17	ChrII
A0J47_RS16575	Putative molybdoenzyme reductase TorZ	-16.80	-4.07	1.86E-23	ChrII
A0J47_RS08095	Anaerobic sulfite reductase subunit AsrA	-2.20	-1.14	2.52E-07	ChrI
<b>Metabolismo del nitrógeno y respuesta al estrés nitrosativo</b>					
A0J47_RS06275	Hydroxylamine reductase	-58.34	-5.87	0	ChrI
A0J47_RS17605	Nitrite reductase (NADH) small subunit	-6.58	-2.72	1.61E-09	ChrII
A0J47_RS06260	Nitrous oxide-stimulated promoter family protein	-18.74	-4.23	2.83E-162	ChrI
A0J47_RS00170	Nitric oxide-sensing transcriptional repressor NsrR	-1.60	-0.68	5.44E-30	ChrI
<b>Metabolismo de carbohidratos</b>					
<b>Metabolismo del piruvato y producción de acetato</b>					
A0J47_RS00915	Phosphoenolpyruvate carboxykinase PckA	-2.13	-1.09	2.41E-61	ChrI
A0J47_RS06270	Pyruvate-ferredoxin/flavodoxin oxidoreductase NifJ	-6.59	-2.72	4.31E-37	ChrI
A0J47_RS07640	Alcohol dehydrogenase	-2.69	-1.43	1.88E-41	ChrI
A0J47_RS13735	Pyruvate-formate lyase GrcA	-27.94	-4.80	0	ChrI
A0J47_RS05575	Formate C-acetyltransferase PflB	-6.60	-2.72	3.94E-287	ChrI
A0J47_RS05580	Formate efflux transporter FocA	-6.10	-2.71	6.74E-196	ChrI
A0J47_RS18485	Acetate kinase AckA	-3.80	-1.93	3.18E-84	ChrII
<b>Metabolismo de fructosa y manosa</b>					
A0J47_RS05660	Mannose-6-phosphate isomerase ManA	-1.58	-0.66	2.77E-41	ChrI
A0J47_RS05670	PTS system, fructose-specific IIA component	-4.47	-2.16	9.64E-21	ChrI
A0J47_RS08255	Fructose operon transcriptional repressor FruR	-3.74	-1.90	1.58E-67	ChrI
A0J47_RS08260	PTS system, fructose-specific IIA component FruB	-8.93	-3.16	1.91E-20	ChrI
A0J47_RS08265	1-phosphofructokinase FruK	-6.91	-2.79	1.44E-12	ChrI
A0J47_RS08270	PTS system, fructose-specific IIB/C component FruA	-4.48	-2.16	2.19E-77	ChrI

<sup>a</sup>ChrI, cromosoma I; ChrII, cromosoma II; pPHDD1, plásmido de virulencia.

**Tabla 4.2.** Lista de DEGs sobrerregulados al 3% NaCl en RM-71 (*Continuación*)

<i>Locus_tag</i>	Producto/Función	FC	Log2FC	P-value	Localiz <sup>a</sup>
<b><i>Metabolismo del almidón y la glucosa</i></b>					
A0J47_RS15340	Glycogen phosphorylase	-3.14	-1.65	2.10E-67	ChrII
A0J47_RS18420	Trehalose operon repressor TreR	-2.13	-1.09	3.69E-51	ChrII
A0J47_RS18430	PTS system, trehalose-specific IIBC component PTS system TreB	-14.92	-3.90	0	ChrII
A0J47_RS18435	Trehalose-6-phosphate hydrolase TreC	-7.00	-2.81	1.83E-30	ChrII
<b><i>Metabolismo de amino azúcares y nucleótidos</i></b>					
A0J47_RS17085	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein NrdG	-3.39	-1.76	8.82E-58	ChrII
A0J47_RS17090	Anaerobic Ribonucleoside-triphosphate reductase (thioredoxin) NrdD	-15.70	-3.97	0	ChrII
A0J47_RS06860	Uridine phosphorylase Udp	-4.12	-2.04	4.58E-20	ChrI
A0J47_RS11155	N -acetylneuraminate lyase NanA	-4.65	-2.22	1.38E-75	ChrI
<b><i>Metabolismo de los aminoácidos</i></b>					
A0J47_RS14010	Arginine deiminase ArcA	-39.70	-5.31	6.85E-15	ChrI
A0J47_RS14015	Carbamate kinase ArcC	-35.99	-5.17	7.93E-17	ChrI
A0J47_RS14020	Ornithine carbamoyltransferase ArcB	-15.11	-3.92	3.70E-30	ChrI
A0J47_RS14005	Arginine/ornithine antiporter ArcD	-2.20	-3.12	0	ChrI
A0J47_RS02700	Arginine N-succinyltransferase AstA	-2.28	-1.19	1.46E-60	ChrI
A0J47_RS02705	Succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase AstD	-2.35	-1.23	4.96E-40	ChrI
A0J47_RS01975	Arginine decarboxylase AdiA	-2.20	-1.14	8.73E-29	ChrI
A0J47_RS00430	Aspartate ammonia-lyase AspA	-4.51	-2.17	1.73E-11	ChrI
A0J47_RS04485	Glutaminase GlsA	-2.99	-1.58	4.10E-17	ChrI
A0J47_RS16645	Glycine cleavage system aminomethyltransferase GcvT	-4.54	-2.18	1.08E-16	ChrII
A0J47_RS10545	Acetolactate synthase I/II/III large subunit AlsS	-3.84	-1.94	5.49E-72	ChrI
A0J47_RS14750	Hippurate hydrolase HipO	-5.31	-2.41	6.95E-76	ChrII

<sup>a</sup>ChrI, cromosoma I; ChrII, cromosoma II; pPHDD1, plásmido de virulencia.

Tabla 4.2. Lista de DEGs sobrerregulados al 3% NaCl en RM-71 (Continuación)

Locus_tag	Producto/Función	FC	Log <sub>2</sub> FC	P-value	Localiz <sup>a</sup>
<b>Sistemas de captación de solutos compatibles</b>					
A0J47_RS18900	Glycine betaine/proline transport system substrate-binding protein	-10.69	-3.42	1.02E-17	ChrII
A0J47_RS18905	Glycine betaine/proline transport system permease protein	-5.00	-2.32	3.06E-31	ChrII
A0J47_RS18910	Glycine betaine/proline transport system ATP-binding protein	-3.36	-1.75	1.76E-51	ChrII
A0J47_RS08670	Betaine/Carnitine/Choline Transporter (BCCT) family transporter	-11.85	-3.57	5.68E-29	ChrI
A0J47_RS07020	Betaine/Carnitine/Choline Transporter (BCCT) family transporter	-4.80	-2.26	2.82E-20	ChrI
<b>Producción de histamina</b>					
A0J47_RS13250	Histidine-histamine antiporter HdcT	-3.98	-1.99	3.24E-28	ChrI
A0J47_RS13255	Histidine decarboxylase HdcA	-2.76	-1.46	1.66E-33	ChrI
A0J47_RS13260	Histidine--tRNA ligase HisRS	-1.59	-0.67	8.24E-13	ChrI
<b>Peptidasas</b>					
A0J47_RS07600	M20 family metallopeptidase	-26.89	-4.75	0	ChrI
A0J47_RS13435	U32 family peptidase	-8.41	-3.07	1.55E-12	ChrI
A0J47_RS19220	C69 family dipeptidase	-5.32	-2.41	1.27E-78	ChrII
<b>Porinas, permeasas y transportadores</b>					
A0J47_RS05530	Outer Membrane Protein C	-12.49	-3.64	0	ChrI
A0J47_RS14790	Maltoporin LamB	-11.89	-3.57	9.44E-17	ChrII
A0J47_RS06290	Uncharacterized membrane protein YjiH	-12.44	-3.64	1.67E-24	ChrI
A0J47_RS08595	C4-dicarboxylate transporter DcuC	-9.03	-3.17	2.11E-11	ChrI
<b>Proteínas hipotéticas y no caracterizadas</b>					
A0J47_RS17280	Hypothetical protein	139.01	-7.12	0	ChrII
A0J47_RS17285	Hypothetical protein	-84.29	-6.40	0	ChrII
A0J47_RS12415	Helix-turn-helix domain-containing protein	-97.17	-6.60	1.31E-29	ChrI
A0J47_RS10160	Hypothetical protein	-24.70	-4.63	0	ChrI
A0J47_RS04560	Hypothetical protein	-24.69	-4.63	1.10E-94	ChrI

<sup>a</sup>ChrI, cromosoma I; ChrII, cromosoma II; pPHDD1, plásmido de virulencia.

Tabla 4.3. Lista de DEGs sobrerregulados al 1% NaCl en RM-71

<i>Locus_tag</i>	Producto/Función	FC	Log <sub>2</sub> FC	P-value	Localiz <sup>a</sup>
<b>Virulencia y resistencia a antimicrobianos</b>					
A0J47_RS13280	PirA-like	348.13	8.44	0	Chrl
A0J47_RS13275	PirB-like	83.44	6.38	0	Chrl
A0J47_RS20355	Pore-forming toxin PhlyP	11.13	3.48	0	pPHDD1
A0J47_RS10995	Pore-forming toxin PhlyC	2.32	1.22	1.29E-59	Chrl
A0J47_RS20350	Damselysin	11.01	3.46	0	pPHDD1
A0J47_RS20585	Outer membrane protein OmpU	3.70	1.89	9.76E-100	pPHDD1
A0J47_RS20130	RNAase toxin Ntox44	4.77	2.25	1.14E-89	pPHDD1
A0J47_RS20325	AcrB/MacB-like ABC transporter ATP-binding protein	3.64	1.86	1.78E-153	pPHDD1
A0J47_RS20340	TolC family protein	3.60	1.85	6.53E-189	pPHDD1
A0J47_RS20345	AcrA/MacA-like membrane fusion protein	3.72	1.90	9.20E-173	pPHDD1
A0J47_RS20135	PAAR domain-containing protein	3.55	1.83	7.77E-79	pPHDD1
A0J47_RS11245	Putative lipoprotein	9.43	3.24	0	Chrl
A0J47_RS20555	TonB-dependent transferrin receptor Vep20-like	9.50	3.25	1.08E-220	pPHDD1
A0J47_RS20550	Serum resistance protein Vep07-like	4.69	2.23	2.21E-150	pPHDD1
A0J47_RS03660	Fe <sup>3+</sup> ABC transporter substrate-binding protein FbpA	18.74	4.23	0	Chrl
A0J47_RS11430	Fe <sup>2+</sup> transporter permease subunit FeoB	7.40	2.89	4.37E-197	Chrll
A0J47_RS11435	Fe <sup>2+</sup> transport protein FeoA	5.98	2.58	6.13E-73	Chrll
A0J47_RS14665	TonB-dependent siderophore receptor FhuE	7.05	2.82	0	Chrll
<b>Exportación y secreción de proteínas</b>					
A0J47_RS19585	Preprotein translocase subunit SecD	8.10	3.02	0	Chrll
A0J47_RS00865	Type II secretion system protein EpsJ	2.88	1.52	2.55E-50	Chrl
A0J47_RS00870	Type II secretion system protein EpsI	3.21	1.68	1.14E-34	Chrl
A0J47_RS00875	Type II secretion system protein EpsH	4.66	2.22	1.06E-91	Chrl
A0J47_RS00880	Type II secretion system protein EpsG	4.54	2.18	2.82E-198	Chrl
A0J47_RS00885	Type II secretion system protein EpsF	3.55	1.83	2.28E-88	Chrl
<b>Quimiotaxis y motilidad flagelar</b>					
A0J47_RS12245	Chemotaxis protein CheV	1.69	0.75	3.38E-53	Chrll
A0J47_RS12040	Chemotaxis response regulator CheY	2.69	1.43	3.47E-80	Chrl
A0J47_RS05380	Methyl-accepting chemotaxis protein	2.58	1.37	8.54E-152	Chrl
A0J47_RS12030	Chemotaxis protein histidine kinase CheA	2.42	1.28	4.93E-56	Chrl
A0J47_RS12035	Chemotaxis regulator CheZ	2.42	1.28	2.59E-51	Chrl

**Tabla 4.3. Lista de DEGs sobrerregulados al 1% NaCl en RM-71 (Continuación)**

A0J47_RS12075	Flagellar biosynthetic protein FlhQ	2.31	1.21	3.72E-07	ChrI
A0J47_RS12200	Flagellar P-ring protein precursor FlgI	1.98	0.98	4.34E-26	ChrI
A0J47_RS12210	Flagellar basal-body rod protein FlgG	1.84	0.88	2.08E-20	ChrI
<b>Traducción, estructura y biogénesis ribosómica</b>					
A0J47_RS00405	30S ribosomal protein S6--L- glutamate ligase RimK	52.24	5.71	0	ChrI
A0J47_RS16560	2OG-Fe(II) oxygenase	11.78	3.56	3.93E-161	ChrII
A0J47_RS00505	tRNA-dihydrouridine synthase B DusB	6.43	2.69	1.13E-196	
A0J47_RS06710	50S ribosomal protein L32 RpmF	4.73	2.24	1.70E-29	ChrI
A0J47_RS07485	Small subunit ribosomal protein S1 RpsA	4.29	2.10	3.66E-195	ChrI
A0J47_RS02550	50s ribosomal protein L31 RpmE	3.85	1.94	2.64E-102	ChrI
A0J47_RS09500	50S ribosomal protein L25 RplY	4.71	2.24	0	ChrI
<b>Metabolismo y transporte</b>					
A0J47_RS17020	Glutathione synthase GshB	38.42	5.26	0	ChrII
A0J47_RS15265	Class I SAM-dependent methyltransferase	29.87	4.90	1.43E-302	ChrII
A0J47_RS12810	Myo-inositol-1(or 4)- monophosphatase ShuB	26.88	4.75	0	ChrI
A0J47_RS08575	Agmatinase SpeB	11.13	3.48	0	ChrI
A0J47_RS17735	Gamma-glutamylputrescine oxidase	9.63	3.27	1.30E-244	ChrII
A0J47_RS01525	Glutamine--fructose-6- phosphate transaminase GlmS	7.50	2.91	9.23E-41	ChrI
A0J47_RS17685	Cysteine desulfurase	7.34	2.87	3.41E-147	ChrII
A0J47_RS17170	Carboxynorspermidine decarboxylase	4.47	2.16	1.99E-118	ChrII
A0J47_RS17175	Carboxynorspermidine synthase	5.42	2.44	0	ChrII
<b>Transportadores</b>					
A0J47_RS09135	Spermidine/putrescine binding protein PotD2	9.02	3.17	2.40E-96	ChrI
A0J47_RS10120	Energy-coupling factor ATP- binding protein EcfA	8.28	3.05	4.99E-268	ChrI
A0J47_RS01035	7-cyano-7-deazaguanine/7- aminomethyl-7-deazaguanine transporter YhhQ	22.65	4.50	0	ChrI
A0J47_RS11695	ToIC family protein CusC	9.73	3.28	8.73E-73	ChrI
A0J47_RS07645	GPR1/FUN34/yaaH putative acetate transporter	23.91	4.58	0	ChrI
A0J47_RS19570	NupC/NupG family nucleoside CNT transporter	9.46	3.24	7.88E-273	ChrII
A0J47_RS13535	Magnesium transporter MgtE	5.35	2.42	3.37E-182	ChrI
A0J47_RS06610	Na+/H+-dicarboxylate symporter	7.76	2.96	1.58E-55	ChrI
A0J47_RS10440	Na+-driven multidrug efflux pump (MATE)	6.13	2.62	1.92E-152	ChrI
A0J47_RS15280	MFS transporter	32.63	5.03	0	ChrII

Tabla 4.3. Lista de DEGs sobreexpresados al 1% NaCl en RM-71 (Continuación)

A0J47_RS08650	MFS transporter	17.63	4.14	0	ChrI
A0J47_RS15440	MFS transporter	6.17	2.62	3.73E-150	ChrII
<b>Peptidasas</b>					
A0J47_RS12990	Putative protease YegQ	11.93	3.58	0	ChrI
A0J47_RS08645	Peptidoglycan DD-metalloendopeptidase	9.97	3.32	0	ChrI
A0J47_RS18555	Trypsin-like serine protease	5.67	2.50	5.84E-262	ChrII
A0J47_RS03380	Do family serine endopeptidase	4.26	2.09	9.46E-17	ChrI
<b>Reguladores transcripcionales</b>					
A0J47_RS00510	DNA-binding transcriptional regulator Fis	5.81	2.54	5.61E-172	ChrI
A0J47_RS12800	Fe-S cluster assembly transcriptional regulator IscR	5.61	2.49	1.82E-256	ChrI
A0J47_RS01530	DeoR family transcriptional regulator	5.51	2.46	1.99E-21	ChrI
A0J47_RS08475	LysR family transcriptional regulator	2.78	1.47	2.60E-51	ChrI
<b>Acetilación de histonas y unión/modificación de RNAt</b>					
A0J47_RS19900	Histone acetyltransferase HPA2	17.18	4.10	1.21E-208	ChrII
A0J47_RS09065	tRNA 2-thiocytidine(32) synthetase TtcA	6.59	2.72	0	ChrI
A0J47_RS00505	tRNA dihydrouridine synthase DusB	6.43	2.69	1.13E-196	ChrI
A0J47_RS11195	tRNA 5-methoxyuridine(34)/uridine 5-oxyacetic acid(34) synthase CmoB	5.17	2.37	1.27E-218	ChrI
<b>Proteínas hipotéticas y no caracterizadas</b>					
A0J47_RS17025	Flavoheмоglobin expression-modulating QEGLA motif protein	27.51	4.78	0	ChrII
A0J47_RS17005	Hypothetical protein	18.64	4.22	0	ChrII
A0J47_RS10190	Hypothetical protein	13.27	3.73	1.35E-08	ChrI
A0J47_RS10185	Hypothetical protein	11.90	3.57	1.16E-55	ChrI
A0J47_RS19195	Uncharacterized membrane protein	9.61	3.27	3.45E-68	ChrII
A0J47_RS19225	DUF3316 domain-containing protein	9.59	3.26	5.71E-162	ChrII
A0J47_RS20565	Uncharacterized protein	4.78	2.26	9.38E-172	pPHDD1

<sup>a</sup>ChrI, cromosoma I; ChrII, cromosoma II; pPHDD1, plásmido de virulencia.

**CROMOSOMA I**

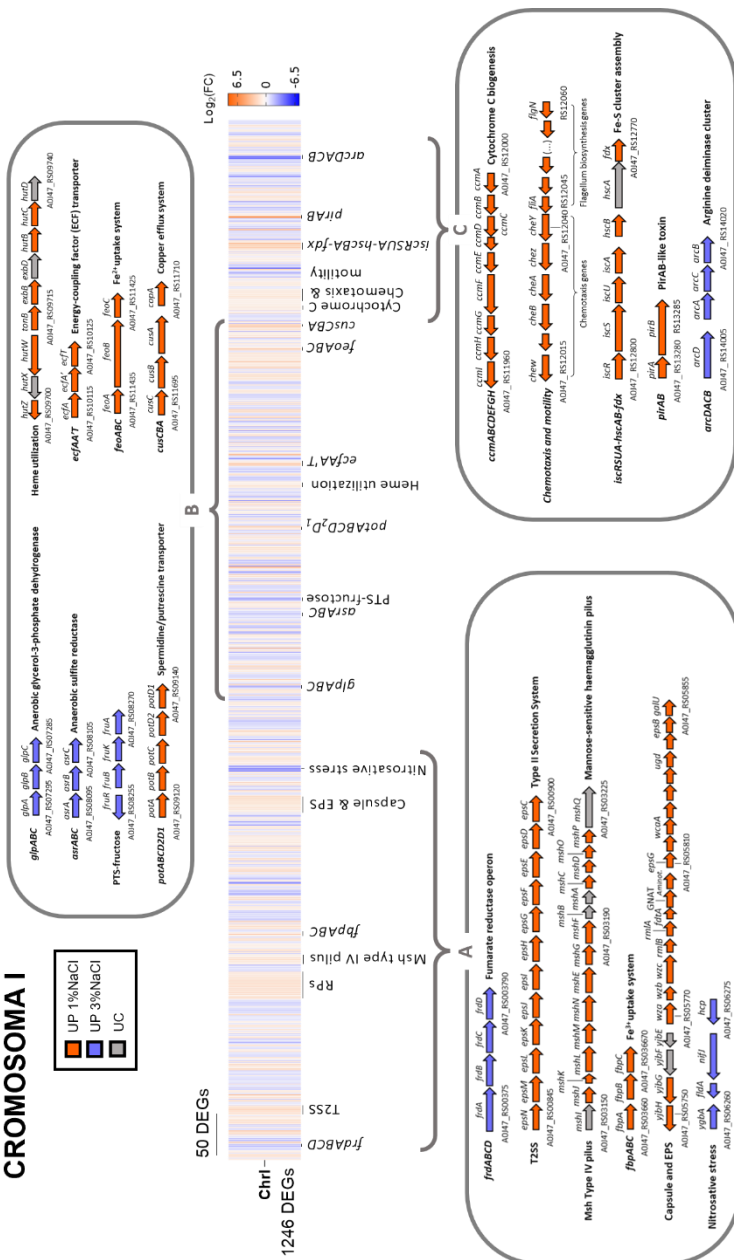
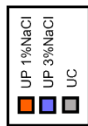


Figura 4.5 Mapeo de los genes expresados diferencialmente (DEGs) en respuesta a los cambios de NaCl en el cromosoma I y en el cromosoma II del genoma de la cepa de *Pdd* RM-71. La expresión diferencial se representa en una escala de colores basada en los valores Log<sub>2</sub>FC. En la vista detallada, los DEGs anotados con el correspondiente locus tag del NCBI del genoma de RM-71 (GCA\_001708035.2), se muestran en naranja (sobreexpresados al 1% de NaCl), azul (sobreexpresados al 3% de NaCl) y gris (sin cambios). A la derecha se muestran las funciones predichas de cada operón.



#### **4.1.2. Los cambios en la salinidad afectan ligeramente a la morfología celular y a la producción de cápsula en *Pdd***

El análisis comparativo de los transcriptomas reveló que algunos genes implicados en la regulación de la forma celular estaban inducidos a baja salinidad ([Tabla S1](#)). Entre estos genes se incluyen la proteína RodA (A0J47\_RS14950) y la peptidoglicano (PG) glicosiltransferasa MrdB (A0J47\_RS05095), ambas pertenecientes a una familia de proteínas implicadas en la regulación de la forma, elongación, división y esporulación (SEDS) (Meeske *et al.*, 2016). En consonancia con estos hallazgos, el gen de *V. cholerae* (*pbpB*, VCA0870) homólogo a la D-alanil-D-alanina endopeptidasa PbpG de la cepa RM-71 (A0J47\_RS09265), se indujo en ausencia de NaCl y se sugirió que participaba en la modulación de PG (Möll *et al.*, 2015; Shikuma & Yildiz, 2009).

Para evaluar fenotípicamente el efecto de los cambios en la salinidad en la morfología de *Pdd*, las células de la cepa RM-71 se analizaron mediante microscopía electrónica de barrido y de transmisión (SEM y TEM). Las imágenes SEM revelaron que las células cultivadas a baja salinidad exhibían una forma significativamente más alargada y eran más estrechas que las células crecidas al 3% de NaCl (Figura 4.6A y B). La cápsula polisacáridica constituye un factor de virulencia en RM-71, desempeñando un papel crucial en la protección frente al suero de pez y un clúster de genes implicado en la síntesis de cápsula ha sido caracterizado funcionalmente en este patógeno (Matanza *et al.*, 2021). En este estudio, descubrimos que los genes de biogénesis de la cápsula están ligeramente regulados al 1% de NaCl (Figura 4.5, panel cromosoma I; Tabla S2) con valores de FC que oscilan entre 1,7 y 3,57. Sin embargo, el análisis TEM reveló un aumento moderado, aunque significativo, del grosor de la cápsula al 3% de NaCl (grosor medio de 65,55 y 69,43 nm al 1% y al 3% de NaCl, respectivamente) (Figura 4.6C)

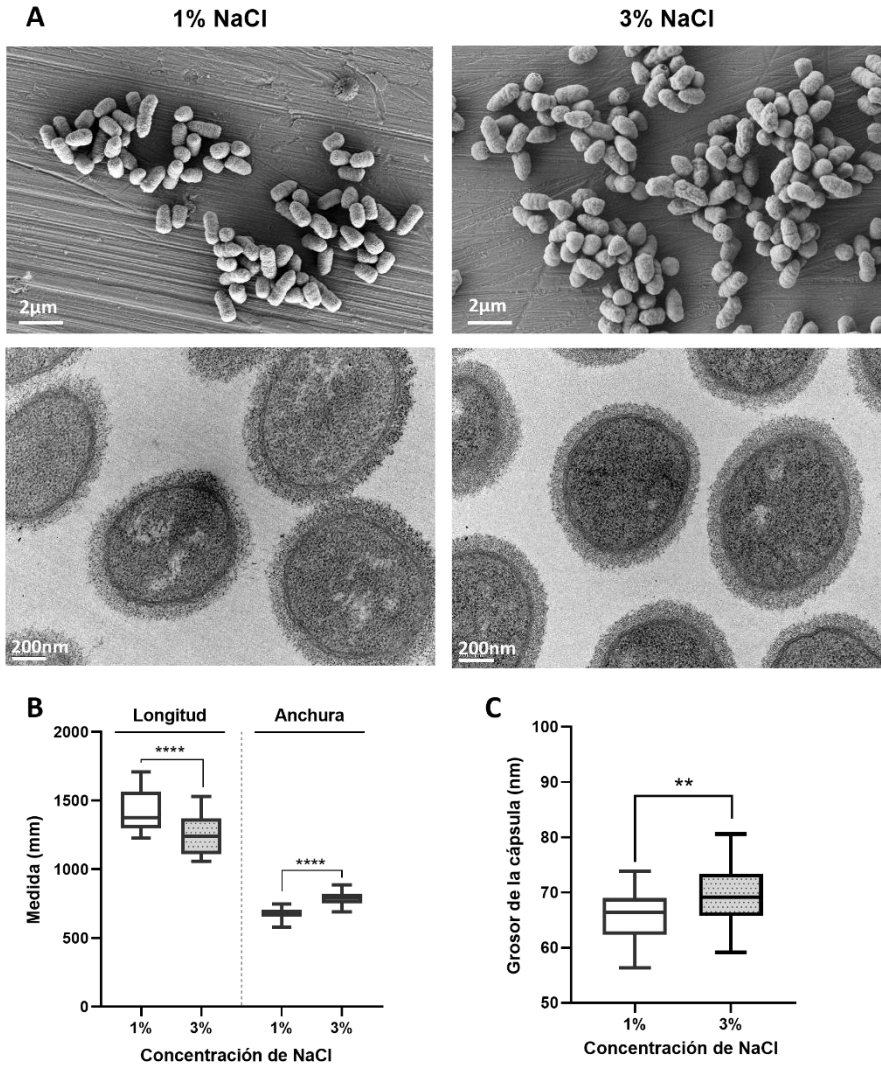


Figura 4.6 (A) Análisis de la morfología celular y de la cápsula polisacáridica mediante SEM (panel superior) y TEM (panel inferior) de la cepa RM-71 cultivada al 1% de NaCl y al 3% de NaCl. (B) Diagrama de cajas que muestra la longitud y anchura de las células de *Pdd* RM-71 a las dos salinidades testadas. Las células son significativamente más largas y estrechas cuando se cultivan al 1% NaCl en comparación con el 3% NaCl. (C) Grosor de la cápsula (en nm) de RM-71 al 1% NaCl y al 3% NaCl. La cápsula es más compacta y significativamente más gruesa al 3% de NaCl. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Estas observaciones, aparentemente contradictorias, apuntan a la participación de mecanismos reguladores adicionales, aún desconocidos, en la producción de cápsula de *Pdd*. La presencia de células completamente capsuladas a cualquiera de las condiciones de salinidad sugiere que *Pdd* expresa la cápsula polisacáridica durante las fases de vida libre en el ambiente marino, así como durante la infección. Aunque la función protectora de la cápsula de *Pdd* en la infección se ha demostrado previamente (Matanza *et al.*, 2021), el papel que ejerce la cápsula durante el estilo de vida planctónico, fuera del hospedador, todavía se desconoce. Estudios previos han demostrado que *Pdd* puede ser depredada por *Bdellovibrio bacteriovorus* (Schoeffield & Williams, 1990) y por flagelados marinos heterótrofos y microzooplancton (Landry *et al.*, 1995; Nagata & Kirchman, 1992), de manera que podría ser que la cápsula desempeñe una función protectora contra la depredación en el medio marino. Cabe destacar que no todas las cepas de *Pdd* son capsuladas (A. V. Barca, A. do Vale y C. R. Osorio, datos no publicados), lo que subraya la necesidad de estudios adicionales para aclarar el papel de la cápsula en escenarios de depredación.

#### **4.1.3. El metabolismo energético y de los carbohidratos están sobrerregulados en *Pdd* a salinidades próximas a las del medio marino**

*Pdd* es una subespecie muy heterogénea y se considera que las poblaciones causantes de enfermedades en animales marinos son de naturaleza multiclonal (Terceti *et al.*, 2016, 2018). No obstante, existen características bioquímicas conservadas que definen esta subespecie. *Pdd* es heterótrofa, no fijadora de nitrógeno, anaerobia facultativa, capaz de reducir el nitrato a nitrito, fermentadora de glucosa con producción de gas, produce arginina deiminasa y la mayoría de las cepas producen ureasa (Love *et al.*, 1981). El estudio comparativo de los perfiles transcriptómicos de *Pdd* reveló la regulación al alza, al 3% de NaCl, de genes implicados en la producción de energía y en el metabolismo de carbohidratos y aminoácidos (Figura 4.4, Tabla 4.1), destacando los genes para las subunidades de la ATP sintasa  $F_0F_1$ , que se encontraban entre los 20 genes más sobrerregulados.

Este aumento de la maquinaria de síntesis de ATP podría explicar, al menos en parte, el mayor crecimiento observado al 3% de NaCl (Figura 4.1A). Las enzimas implicadas en la respiración aeróbica y anaeróbica se incrementaron notablemente al 3% de NaCl, incluyendo el operón fumarato reductasa *frdABCD*, el operón sulfito reductasa *asrABC* y las subunidades de la nitrito-reductasa (Tabla 4.1). En concordancia con estas observaciones, en *Shewanella* sp. y *Escherichia coli* también se ha observado una mayor expresión de enzimas de respiración aeróbica y anaeróbica en condiciones de salinidad elevada (Liu *et al.*, 2005; Rozen *et al.*, 2002).

Curiosamente, durante el estudio de los transcriptomas observamos una fuerte sobreexpresión de los genes implicados en la respuesta a las especies reactivas del nitrógeno. Entre ellos destaca el gen que codifica para una hidroxilamina reductasa, que aumentó 58 veces su expresión al 3% de NaCl con respecto al 1% NaCl. Esta enzima, homóloga a la proteína clúster híbrida Hcp de *E. coli*, cataliza la reducción de hidroxilamina a NH<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O y se hipotetiza que pueda desempeñar un papel en la protección contra el estrés nitrosativo (Wang *et al.*, 2016). Además, se observó la regulación al alza de una proteína homóloga a la proteína de *E. coli* YgbA, perteneciente a una familia de proteínas estimuladas por óxido nitroso. Estos dos genes están bajo el control de la proteína reguladora NsrR, un regulador de transcripción sensible al óxido nítrico, caracterizado en *E. coli* (Filenko *et al.*, 2007) y cuyo homólogo en *Pdd*, identificado en el presente estudio (A0J47\_RS00170), también está regulado al 3% NaCl (Tabla 4.1). Estos hallazgos sugieren que la salinidad del agua de mar podría aumentar el metabolismo del nitrógeno en *Pdd*, conduciendo a la activación de los mecanismos de respuesta al estrés nitrosativo.

Además de estos genes, cuando *Pdd* crece a la salinidad del agua del mar, la subunidad del citocromo tipo c TorY (56% de identidad aminoacídica con TorY/Yeck de *E. coli*) y una molibdoenzima reductasa (68% de identidad aminoacídica con TorZ/BisZ de *E. coli*) se inducen 62 y 16 veces más, respectivamente (Tabla 4.1). Este sistema se describió por primera vez en *E. coli* como un sistema adicional de respiración anaeróbica que utiliza el N-óxido de trimetilamina (TMAO) y sulfóxido de biotina como aceptores alternativos de electrones (Gon

*et al.*, 2000). Cabe destacar que un trabajo previo demostró que *Pdd* es capaz de reducir el TMAO a TMA (trimetilamina) (Malle *et al.*, 1998). Además, los genes implicados en la glucólisis/gluconeogénesis y en el metabolismo del piruvato y del acetato aumentaron al 3% de NaCl en *Pdd* (Tabla 4.1). En línea con esto, genes que codifican para una acetato quinasa y una alcohol deshidrogenasa, aumentan su expresión al 3% NaCl, sugiriendo que la producción de acetato podría inducirse en *Pdd* a una salinidad próxima a la del agua del mar. Curiosamente, la regulación al alza de genes implicados en la producción de acetato se ha descrito en *V. vulnificus* como una estrategia antidepredación contra protozoos (Rasheedkhan *et al.*, 2022).

Teniendo en cuenta todas las funciones reguladas al 3% de NaCl, parece que los sistemas de producción de energía, incluidos los sistemas de respiración aeróbica y anaeróbica, así como el metabolismo del carbono, podrían ser prioritarios cuando *Pdd* crece en un modo de vida libre o planctónico. El aumento de la expresión de genes implicados en estas funciones se observó también en *P. damsela* subsp. *piscicida* al pasar de baja a alta salinidad (Chuang *et al.*, 2016) y en *E. coli* en respuesta al crecimiento en agua de mar (Rozen *et al.*, 2002).

#### **4.1.4. El crecimiento al 3% de NaCl regula al alza los genes implicados en la captación de solutos compatibles y en el uso de trehalosa y fructosa como fuentes de carbono**

Para prosperar en entornos de alta osmolaridad, las células bacterianas acumulan solutos compatibles (osmolitos) en el citoplasma, ya sea por mecanismos de captación o biosíntesis (Csonka, 1989; Gregory *et al.*, 2020). Los osmolitos pueden ser azúcares (como la trehalosa), aminoácidos (como prolina y glutamina) y aminos cuaternarios (como glicina betaína y colina). En términos de “economía celular”, la adquisición de solutos compatibles del medio ambiente es preferible, ya que la biosíntesis de estos compuestos supone un coste energético muy elevado. En línea con esto, observamos que el crecimiento de *Pdd* al 3% de NaCl aumentó la expresión de sistemas de captación de solutos compatibles (Figura 4.4; Tabla 4.1), concretamente del sistema ProU, codificado en el cromosoma II e implicado en la captación de glicina betaína y L-prolina.

El aumento en la expresión de los genes *proXVW* para el sistema ProU en condiciones de alta salinidad se ha descrito también en otras bacterias marinas como *V. parahaemolyticus* (Yang *et al.*, 2010) y *V. vulnificus* (Rao *et al.*, 2013).

Aunque en investigaciones previas se ha reportado que la cepa tipo de *Pdd* (ATCC33539) es incapaz de fermentar la trehalosa (Love *et al.*, 1981), en este estudio hemos identificado en el genoma de RM-71, tres genes (*treB*, *treC* y *treR*) del sistema fosfotransferasa (PTS) específico para la trehalosa (genes ausentes en la cepa tipo) cuya expresión aumenta entre 2 y 15 veces más en condiciones de alta salinidad. Esta observación sugiere que la cepa de *Pdd* RM-71 puede utilizar la trehalosa como soluto compatible (osmolito), de forma similar a lo descrito en otros miembros de la familia *Vibrionaceae* (Gregory *et al.*, 2020), y que la trehalosa también puede utilizarse como fuente de carbono (Amaral *et al.*, 2014). Curiosamente, cuando sembramos la cepa RM-71 en placas de medio O/F (oxidación-fermentación) suplementado con trehalosa, observamos una producción mayor de ácido al 3% de NaCl que al 1% (Figura 4.7A). Para medir cuantitativamente la posible preferencia de la trehalosa frente a la glucosa al 3% de NaCl por parte de *Pdd*, monitorizamos el crecimiento de RM-71 en cada condición de salinidad en presencia de glucosa o trehalosa, utilizando CM9 (medio mínimo M9 suplementado con casaminoácidos). Curiosamente, al 3% de NaCl, la trehalosa confirió mayores niveles de crecimiento que la glucosa, mientras que al 1% de NaCl la glucosa fue la fuente de carbono que permitió mayores tasas de crecimiento (Figura 4.7A).

En lo que respecta a la fructosa, un estudio previo informó de que la cepa tipo de *Pdd* codifica un sistema PTS putativo para la utilización de este monosacárido (Meadow *et al.*, 1987). Nuestros datos transcriptómicos también revelaron que la alta salinidad (3% NaCl) provoca la regulación al alza de genes de un posible sistema PTS para la fructosa (Tabla 4.1). De forma similar a la trehalosa, observamos que el crecimiento de *Pdd* RM-71 al 3% de NaCl en presencia de fructosa es mayor que en presencia de glucosa, mientras que al 1% de NaCl la glucosa es la fuente de carbono preferente y permite mayores tasas de crecimiento (Figura 4.7B).

Todas estas observaciones indican claramente que, a la salinidad del agua de mar, el uso de trehalosa y fructosa es mayor en comparación con la glucosa en *Pdd*. Este resultado tiene una importancia biológica muy notable ya que la trehalosa y la fructosa son azúcares muy abundantes en los ambientes marinos (Mopper *et al.*, 1980; Sogin *et al.*, 2019; 2022). En concreto, la trehalosa constituye el azúcar principal en algunas especies de macroalgas (Leyton *et al.*, 2019) y también es un oligosacárido importante en la hemolinfa de algunos crustáceos (Johnston & Davies, 1972). La disponibilidad de fructosa en el ambiente marino provendría principalmente de la hidrólisis de la sacarosa, abundante en las praderas marinas (Sogin *et al.*, 2022) y también es producida por algas verdes y cianobacterias (Lunn, 2002).

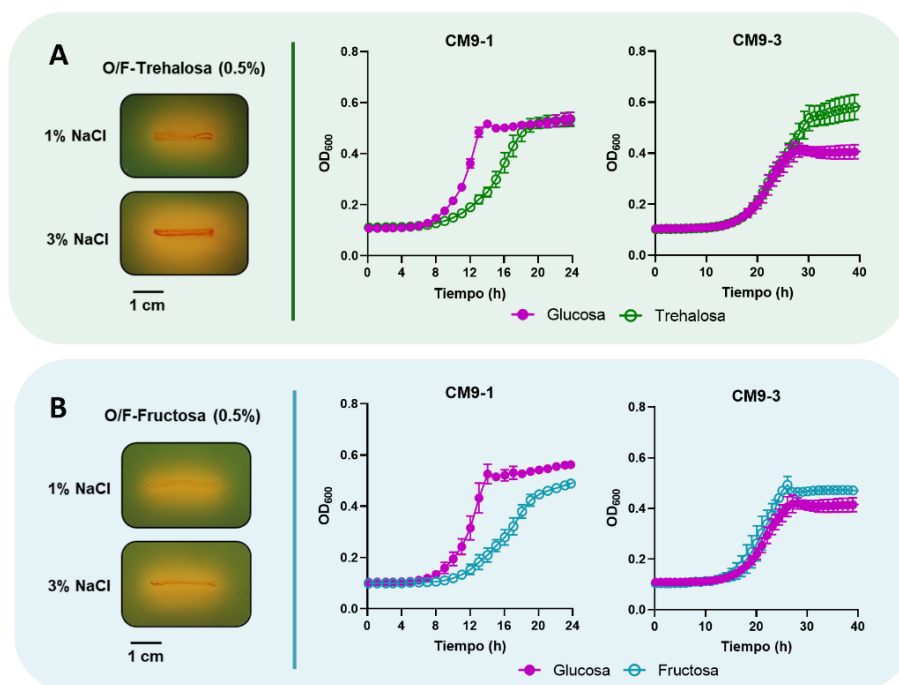


Figura 4.7 Producción de ácido de *Pdd* RM-71 (panel izquierdo) en placas de medio OF (oxidación-fermentación) como resultado de la fermentación de la trehalosa (A) y fructosa (B) al 1% y al 3% NaCl. Curvas de crecimiento de RM-71 en medio CM9 (panel derecho) en presencia de 0,5% de glucosa en comparación con el crecimiento en CM9 suplementado con 0,5% de trehalosa (A) o 0,5% de fructosa (B) al 1% NaCl y al 3% NaCl. Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y dos experimentos independientes.

#### 4.1.5. El crecimiento de *Pdd* al 3% NaCl, induce la tolerancia a los antibióticos kanamicina, vancomicina y ampicilina

Durante el transcurso de este estudio observamos que la cepa de *Pdd* RM-71 cultivada en condiciones estándar de 1% NaCl muestra resistencia intrínseca a ampicilina y vancomicina, similar a lo que sucede en otras especies de la familia *Vibrionaceae* (Dörr *et al.*, 2016; Kapetanović *et al.*, 2023) mientras que es sensible a kanamicina (Figura 4.8). Sorprendentemente, la cepa RM-71 mostró una mayor tolerancia a los antibióticos kanamicina, ampicilina y vancomicina al 3% de NaCl en comparación con el crecimiento al 1% de NaCl (Figura 4.8). El aumento más drástico se observó con la kanamicina, ya que a una concentración de 50 µg/ml, la bacteria alcanzó una DO<sub>600</sub>: 0,8 al 3% NaCl, mientras que al 1% NaCl fue incapaz de crecer.

Para demostrar que la tolerancia a los antibióticos inducida por el NaCl constituye una respuesta dependiente de la salinidad y no es consecuencia de la selección de mutaciones estables que confieren resistencia a los antibióticos, las células de *Pdd* en fase estacionaria cultivadas al 3% de NaCl en presencia de cada antibiótico se pasaron a medios frescos suplementados con antibióticos a las dos concentraciones de NaCl. Como se muestra en la Figura 4.8, el fenotipo de mayor tolerancia al 3% de NaCl con respecto al 1% de NaCl se mantiene para los tres antibióticos testados, lo que sugiere que la tolerancia a los antibióticos inducida por NaCl en *Pdd* se debe a un mecanismo regulador y adaptativo.

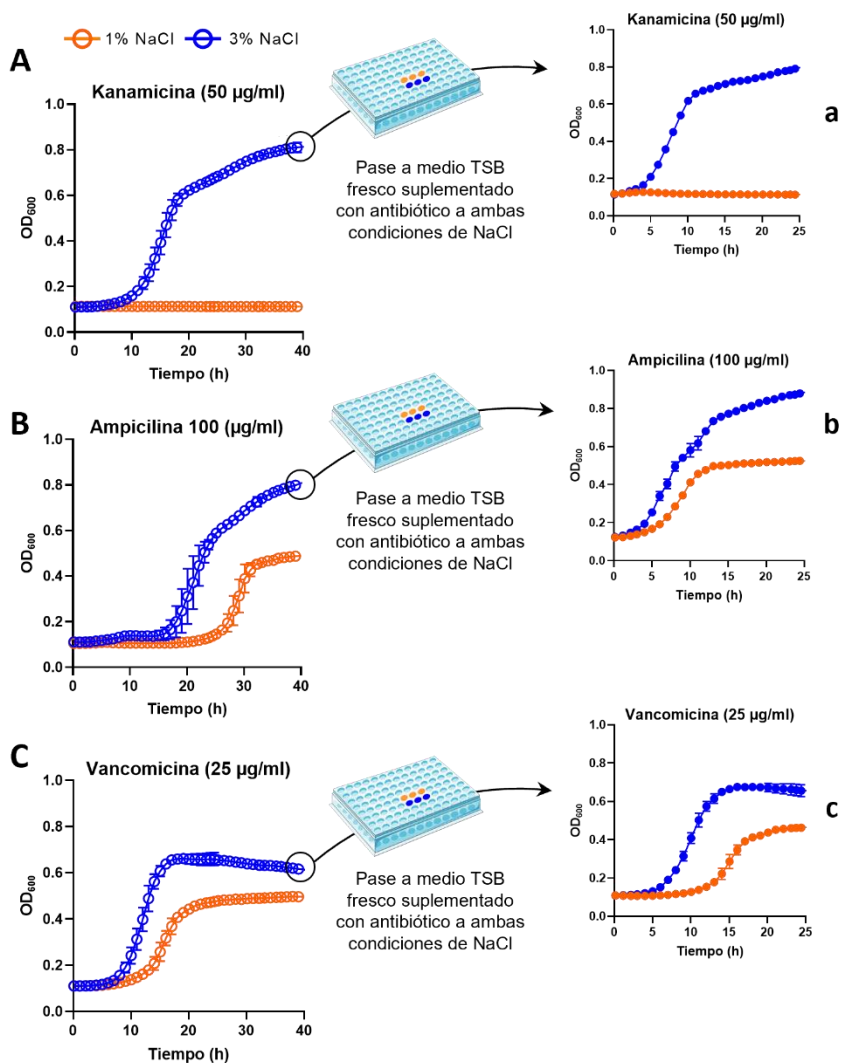


Figura 4.8 Los cambios en la concentración de NaCl influyen en la resistencia de *Pdd* a los antibióticos. Curvas de crecimiento de RM-71 en medio TSB-1% NaCl y TSB-3% NaCl en presencia de kanamicina (50 µg/ml) (A), ampicilina (100 µg/ml) (B) y vancomicina (25 µg/ml). Después de 40 h de crecimiento, las células de RM-71 cultivadas al 3% de NaCl en cada antibiótico se pasaron a medio TSB fresco suplementado con antibióticos a ambas condiciones de NaCl (a, b y c). Los datos se representan como la media ± SD de tres réplicas biológicas y dos experimentos independientes.

La tolerancia inducida a los antibióticos a elevada salinidad se ha reportado también en otros vibrios (Coronado *et al.*, 1995; Ottaviani *et al.*, 2001), pero los mecanismos moleculares subyacentes son muy poco conocidos. En cuanto a la resistencia a los betalactámicos, se han descrito varios mecanismos de resistencia en vibrios (Dörr *et al.*, 2015; Weaver *et al.*, 2018). Por el contrario, en este trabajo, la mayoría de los genes categorizados en la resistencia a los betalactámicos (vía ko01501 en KEGG), como las proteínas de unión a la penicilina (PBP), las bombas de eflujo de múltiples fármacos (A0J47\_RS15280, A0J47\_RS08650) y las proteínas de la membrana externa (OM) se incrementaron en *Pdd* a baja salinidad (Tabla 4.2; [Tabla S1](#)). Sin embargo, los ligandos de estas bombas putativas de múltiples fármacos siguen sin descifrarse en *Pdd*, y las funciones que cumplen pueden no estar relacionadas con la resistencia a antibióticos.

Al margen de la sobreexpresión observada para estos genes a baja salinidad, se identificaron genes cuya inducción al 3% de NaCl podría explicar el aumento de la resistencia a la ampicilina. Entre ellos se incluye un gen para una D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa (A0J47\_RS09080) (Pbp5) (FC: -1,94) ([Tabla S1](#)) cuya delección en *E. coli* condujo a un aumento de la susceptibilidad a la ampicilina (Sarkar *et al.*, 2010). Además, investigaciones anteriores han reportado que algunas peptidasas del peptidoglicano (PG) de *V. cholerae*, en particular ShyA, son críticas para mantener la viabilidad celular en el tratamiento con betalactámicos (Dörr *et al.*, 2015). En apoyo a los resultados obtenidos de mayor tolerancia a la ampicilina en presencia del 3% de sal, detectamos que la endopeptidasa PG de *Pdd* (A0J47\_RS18260), homóloga a ShyA de *V. cholerae* (52% ID, VCA0079), aumentó considerablemente su expresión a elevada salinidad (FC: -3,01).

Los mecanismos de resistencia a los aminoglucósidos son diversos e incluyen la adquisición de plásmidos de resistencia, cambios en la permeabilidad de la membrana y/o eflujo activo de antibióticos (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016). Hemos observado que la expresión de una bomba de eflujo de múltiples fármacos impulsada por Na<sup>+</sup> (A0J47\_RS00420) está regulada al alza al 3% de NaCl en *Pdd* (FC: -1,82). Esta proteína es homóloga a la proteína VcmA de *V. cholerae* (VC1540; 27% de identidad, 65% de cobertura), descrita como

responsable del aumento de la resistencia a la kanamicina (Huda *et al.*, 2001).

La regulación del metabolismo bacteriano se ha identificado como un mecanismo adicional que favorece la resistencia a los antibióticos en *Vibrio* y otras especies (Keller *et al.*, 2023; Su *et al.*, 2018; Y. Su *et al.*, 2015). De hecho, un trabajo reciente ha demostrado que el NaCl regula negativamente la fuerza protón motriz (PMF) en *Vibrio alginolyticus*, conduciendo a la reducción en la captación de aminoglucósidos y un posterior aumento de la resistencia a los antibióticos a elevada salinidad (Yang *et al.*, 2018). Sin embargo, nuestros datos transcriptómicos no revelaron una clara contribución del NaCl a los cambios en la PMF y en su posible impacto en la absorción de aminoglucósidos.

La membrana externa de los Gram-negativos es una barrera extraordinaria para los antibióticos de alto peso molecular, como la vancomicina (Stokes *et al.*, 2016). En *V. cholerae*, la proteína de membrana interna VigA le confiere resistencia a vancomicina (Dörr *et al.*, 2016), sin embargo, no se han identificado homólogos de VigA en el genoma de la cepa RM-71. La vancomicina ejerce su acción uniéndose a los residuos D-Ala-D-Ala del peptidoglicano (PG) bacteriano, afectando al crecimiento normal de la célula. La enzima D-Ala-D-Ala ligasa (Ddl) cataliza la ligación de estos residuos en el ensamblaje del PG bacteriano, pero ligasas Ddl alternativas (denominadas Van ligasas) producen otros precursores de PG con menor afinidad por el antibiótico (Stogios & Savchenko, 2020). Curiosamente, encontramos un gen (A0J47\_RS04780) regulado al alza al 3% NaCl en *Pdd* (FC: -1,73) ([Tabla S1](#)), cuya proteína comparte un 33% de identidad con la proteína VanL de *Enterococcus faecalis* (ABX54687.1), (búsquedas BLASTP en CARD: *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) una ligasa que sintetiza el sustrato alternativo D-Ala-D-Ser con menor afinidad por la vancomicina (Boyd *et al.*, 2008). La contribución de este gen a la mayor resistencia a la vancomicina a alta salinidad no se ha descrito anteriormente en *Pdd* y sin duda merece futuras investigaciones.

Resulta interesante señalar que *Pdd* es sensible a los péptidos antimicrobianos producidos por peces marinos y artrópodos, como la hepcidina (Huang *et al.*, 2007), la pleurocidinamida y la taquipesina (Dorrington & Gomez-Chiarri, 2008), y la piscidina (Barroso *et al.*, 2020). Durante el transcurso de este trabajo testamos el posible efecto de la salinidad en la sensibilidad de la cepa de *Pdd* RM-71 a la piscidina, pero no encontramos diferencias al 3% de NaCl frente al 1% de NaCl (Figura 4.9). Teniendo en cuenta que se cree que la piscidina actúa a nivel de la membrana celular (Park *et al.*, 2011), nuestros resultados sugieren que la salinidad no causa una regulación diferencial apreciable de las funciones celulares que podrían estar implicadas en la susceptibilidad a este péptido antimicrobiano derivado de lubina.

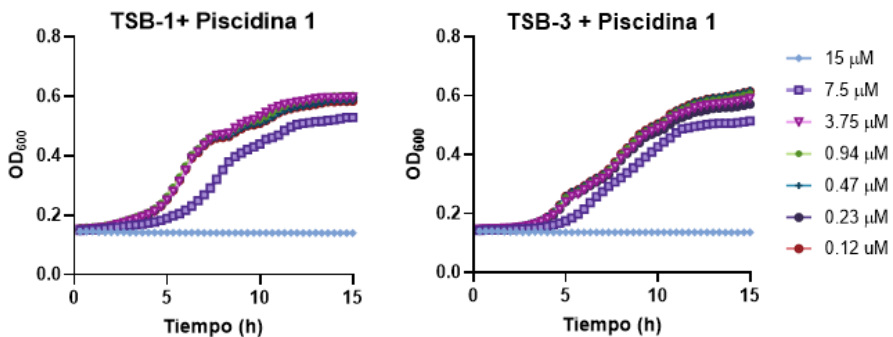


Figura 4.9 Curvas de crecimiento de la cepa de *Pdd* RM-71 en presencia de diferentes concentraciones del péptido antimicrobiano Piscidina 1 al 1% NaCl y al 3% NaCl. El crecimiento se monitorizó a una  $DO_{600}$  durante 15 h. Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y dos experimentos independientes.

#### **4.1.6. La regulación del metabolismo de los aminoácidos mediada por NaCl en *Pdd*, pone de relieve importantes cambios en el catabolismo de la arginina**

Uno de los rasgos mejor estudiados del metabolismo de los aminoácidos en *Pdd* es su elevada capacidad de producción de histamina (>1.000 ppm), capaz de liberar niveles tóxicos de este compuesto incluso a temperaturas de refrigeración (4°C) y suponiendo un riesgo considerable para la salud humana (Bjornsdottir-Butler *et al.*, 2018). En particular, el análisis transcriptómico reveló que al 3% de NaCl *Pdd* sobrerregula los genes *hdcT*, *hdcA* e *hisRS* implicados en la producción de histamina (Tabla 4.1). Este hallazgo es bastante coherente ya que la producción de histamina puede tener lugar en peces en descomposición en el medio marino, y por tanto, a salinidades próximas al 3% NaCl.

Para comprender mejor qué rutas del metabolismo de *Pdd* experimentan cambios significativos en respuesta al NaCl, mapeamos los genes diferencialmente expresados (DEGs) en la base de datos KEGG. En este análisis, observamos un aumento generalizado de los genes implicados en las rutas de los aminoácidos al 3% de NaCl (Figura 4.10), sugiriendo que el metabolismo de los aminoácidos es clave para el crecimiento bacteriano y la supervivencia en un estilo de vida libre. La modulación del metabolismo de aminoácidos en respuesta al NaCl también se ha descrito en otras especies como *V. parahaemolyticus* (Ma *et al.*, 2021) y *E. coli* (Li *et al.*, 2021).

Aunque un estudio previo ha demostrado que *Pdd* sobrevive en microcosmos de agua de mar a 14°C y 22°C durante más de 1 año (Fouz *et al.*, 1998), observamos que el agua de mar costera natural no soporta un crecimiento detectable de la cepa RM-71 (medido como un aumento de la densidad óptica) después de 40 horas, incluso cuando se utiliza agua de mar eutrofizada (ESW) (Figura 4.11A). Curiosamente, la adición de casaminoácidos mejoró sustancialmente el crecimiento, pero sólo en agua eutrofizada (Figura 4.11A). También observamos que RM-71 es capaz de crecer en medio mínimo con glucosa en presencia de iones NH<sub>4</sub><sup>+</sup> como única fuente de nitrógeno al 1% de NaCl, pero no al 3% de NaCl (Figura 4.11B). Este resultado sugiere que el nitrógeno

inorgánico no es utilizado rutinariamente por *Pdd* bajo condiciones ambientales en agua de mar, pero sí bajo estrés por baja salinidad.

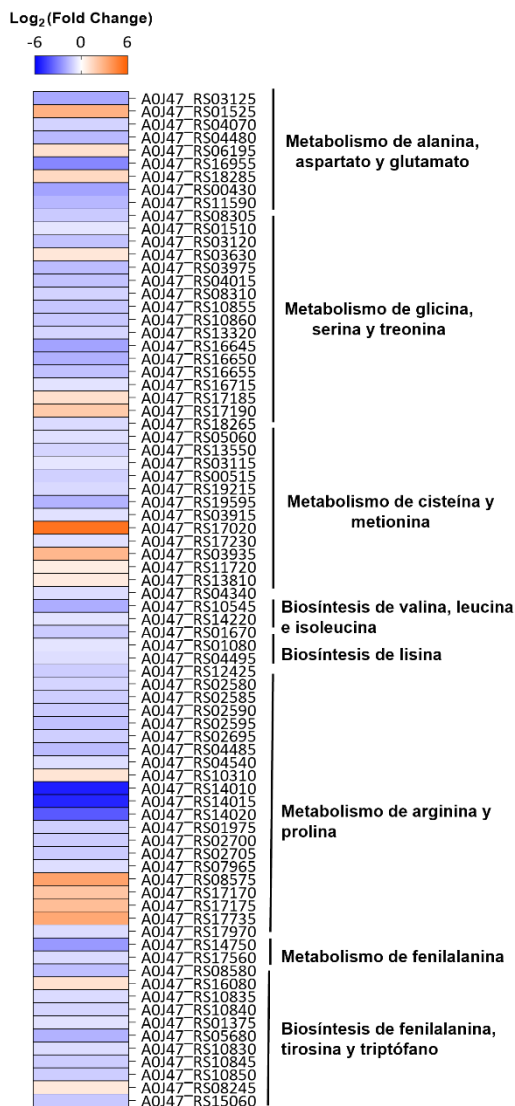


Figura 4.10 *Heat map* que representa los valores de expresión diferencial (Log<sub>2</sub>FC) de los genes implicados en las rutas de metabolismo de los aminoácidos en *Pdd* RM-71. Se observó una sobrerregulación generalizada de todas las vías del metabolismo de aminoácidos al 3% de NaCl (FCs negativos, en azul) en comparación con el 1% de NaCl (FCs positivos, en naranja).

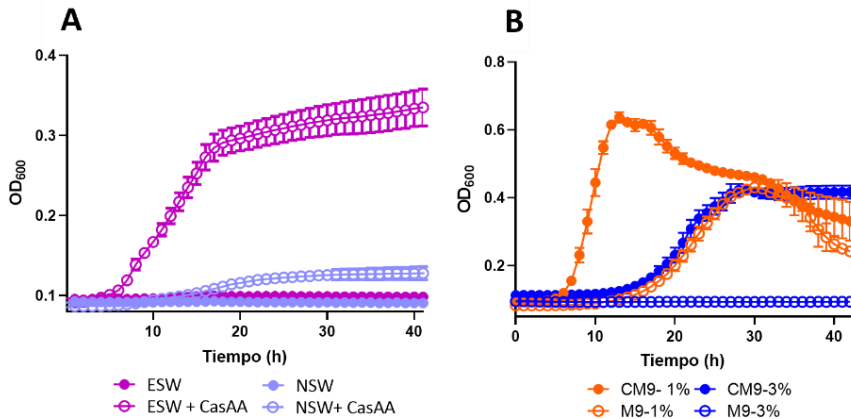


Figura 4.11 (A) Crecimiento de *Pdd* RM-71 en agua de mar costera (NSW) y agua de mar eutrofizada (ESW) con o sin casaminoácidos (CasAA). (B) Crecimiento de RM-71 en medio mínimo M9 al 1% NaCl o al 3% NaCl suplementado (CM9) o no (M9) con casaminoácidos. El crecimiento (DO<sub>600</sub>) se monitorizó durante 40 h. Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y dos experimentos independientes.

Todas estas observaciones sugieren que *Pdd* prospera en microambientes ricos en materia orgánica, pero no tanto en agua de mar pelágica y escasa en nutrientes, donde la disponibilidad de aminoácidos puede constituir un factor limitante para la acumulación de poblaciones de *Pdd*. En consonancia con estas observaciones, un estudio del vibrioplancton costero reveló que la presencia de *Pdd* era menor en comparación con, por ejemplo, el grupo *Vibrio splendidus* (Thompson *et al.*, 2005). De hecho, aunque *Pdd* se aísla ocasionalmente de agua de mar costera, su aislamiento es más frecuente de nichos y superficies ricas en nutrientes, como los tractos gastrointestinales de tiburones y peces teleósteos (Juste-Poinapen *et al.*, 2019; Pacheco-Sandoval *et al.*, 2022), microbiota branquial de los peces (Itay *et al.*, 2022), peces en descomposición (Peters *et al.*, 2021) y, sobre todo, en el medio interno de los hospedadores animales que sufren una infección por *Pdd*, donde puede constituir el principal patógeno aislado y en muchos casos como cultivo puro (Pedersen *et al.*, 1997).

*Pdd* es uno de los pocos vibrios que produce arginina deiminasa (también conocida como arginina dihidrolasa), una prueba fenotípica clave empleada en la taxonomía e identificación de vibrios (Holt *et al.*, 1994). De hecho, *Pdd* (que antes se conocía como *V. damsela*) se incluía clásicamente en los "vibrios del grupo F" o "grupo EF6" junto con *Vibrio furnissii* y *Vibrio fluvialis* (Seidler *et al.*, 1980), positivos para la arginina deiminasa. A través de la vía de la arginina deiminasa (ADI), la L-arginina se convierte en L-ornitina, produciendo ATP, dióxido de carbono y amoníaco a través de tres pasos metabólicos (Figura 4.13A). Curiosamente, nuestro análisis de RNA-seq reveló que el operón *arcACBD* que codifica el sistema de la arginina deiminasa (ADS), responsable de la internalización y catabolismo de la L-arginina, se encuentra entre los genes más regulados al 3% de NaCl, con los genes *arcA* y *arcC* sobreexpresados hasta 40 veces más (Tabla 4.1; Figura 4.13B). Además, genes implicados en otra vía catabólica de la L-arginina, el sistema arginina succiniltransferasa (AST), también están sobreexpresados a salinidades próximas a las del medio marino (Tabla 4.1).

Con el propósito de investigar las implicaciones de la ruta de la arginina deiminasa (ADI) en *Pdd*, decidimos eliminar, mediante intercambio alélico, el gen *arcA* en la cepa de *Pdd* RM-71. La deleción de *arcA* causó un cambio fenotípico visible en la prueba clásica de la arginina deiminasa, que detecta la alcalinización del medio indicada con un cambio a coloración púrpura (Figura 4.13C). Cabe destacar que este medio detecta la alcalinización causada por más de una actividad enzimática, incluyendo tanto la arginina deiminasa (también conocida como arginina dihidrolasa) como la arginina descarboxilasa (otra de las vías catabólicas de la L-arginina), hecho que podría explicar por qué el mutante *arcA* sigue produciendo color púrpura residual en esta prueba. Las curvas de crecimiento obtenidas demuestran que el mutante *arcA* no presenta un crecimiento defectivo ni en medio TSB al 1% de NaCl ni al 3% de NaCl (Figura 4.12A) ni en presencia de un suplemento de L-arginina (Figura 4.12B) con respecto a la cepa parental.

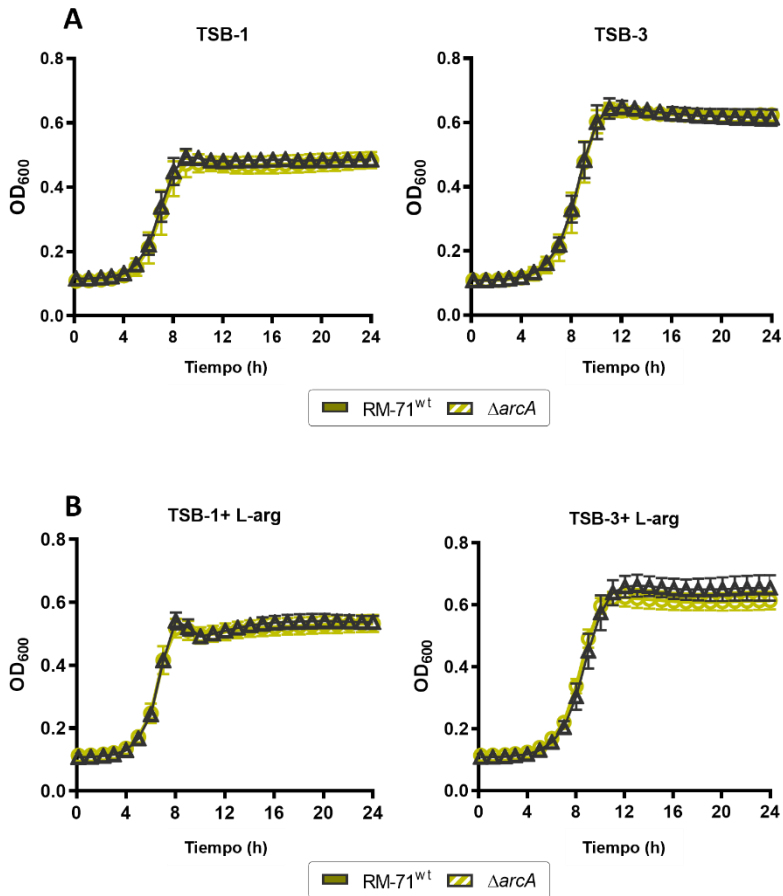


Figura 4.12 (A) Curvas de crecimiento de RM-71 y  $\Delta arcA$  en medio TSB al 1% NaCl y al 3% NaCl. (B) Curvas de crecimiento de RM-71 y  $\Delta arcA$  en medio TSB suplementado con 10 mM de L-arginina al 1% de NaCl y 3% de NaCl.  $\Delta arcA$  no mostró diferencias en el crecimiento con respecto a la cepa salvaje ni en medio TSB-1 o TSB-3, ni en presencia de L-arginina. Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y dos experimentos independientes

En numerosos estudios se ha demostrado que la vía ADI desempeña un papel clave en la supervivencia al estrés ácido en muchas especies bacterianas (Casiano-Colón & Marquis, 1988; Ryan *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2014). Por este motivo, nos propusimos investigar si la mutación de *arcA* ejercía algún efecto sobre la resistencia al pH ácido en *Pdd*. Primero analizamos el crecimiento de la cepa RM-71 en TSB-1 y TSB-3 a varios niveles de pH (pH 7, pH 6, pH 5 y pH 4) y observamos que el pH 4 no permitía la replicación de *Pdd* ni al 1% de NaCl ni al 3% de NaCl (datos no mostrados). A continuación, evaluamos la viabilidad de RM-71 y  $\Delta arcA$  en estrés ácido (pH 4) en TSB-1 y TSB-3 suplementadas o no con L-arginina (10 mM). Curiosamente, la supervivencia de RM-71 y  $\Delta arcA$  tras 16 horas de exposición a condiciones ácidas fue de, aproximadamente, 3 órdenes de magnitud mayor al 3% NaCl que al 1% NaCl (Figura 4.13D), demostrando así que la salinidad tiene un impacto importante en la supervivencia de *Pdd* a pH 4. En línea con estos hallazgos, estudios previos han demostrado que la alta salinidad aumenta la supervivencia de *V. parahaemolyticus* frente al estrés ácido (Kalburge *et al.*, 2014; Whitaker *et al.*, 2010). Además, se observó que la cepa  $\Delta arcA$  presentaba un deterioro leve, pero significativo, de la resistencia al ácido en comparación con RM-71, lo que sugiere un papel de la vía ADI en la resistencia de *Pdd* a condiciones ácidas (Figura 4.13D). Este deterioro se detectó en TSB-3 sin suplemento adicional de L-arginina, pero en presencia de un exceso de L-arginina no se mostraron diferencias significativas. Esta última observación sugiere que un exceso de arginina podría permitir que otras vías de degradación de la arginina (por ejemplo, el sistema de descarboxilación de la arginina) contribuyan a la resistencia al ácido y compensen así la ausencia de una vía ADI funcional.

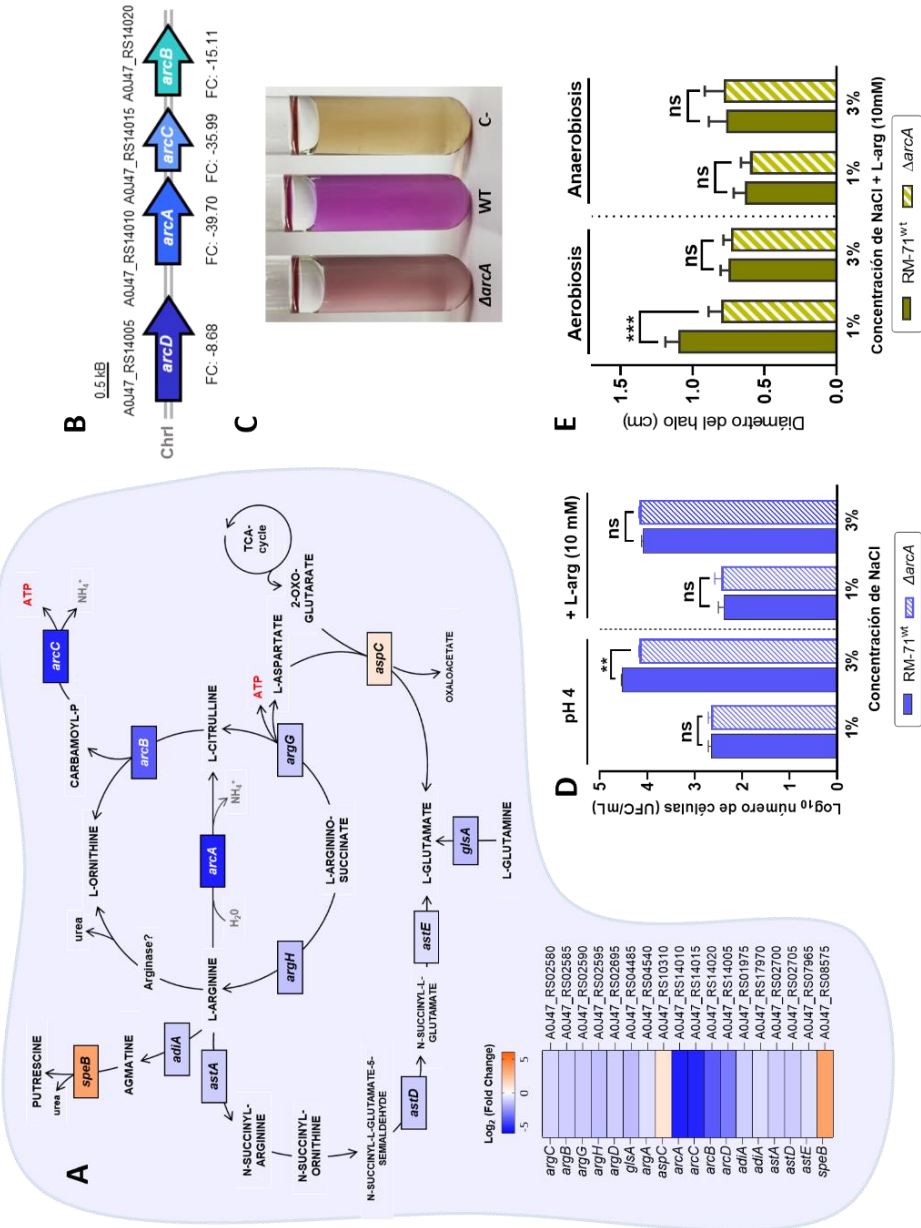


Figura 4.13 (A) Mapa metabólico en el que se muestran los genes diferencialmente expresados (DEGs) implicados en el catabolismo de la arginina. Los DEGs se localizan en la reacción metabólica correspondiente coloreados en función de un *heat map* establecido para los valores de expresión diferencial ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ). Los genes más sobreexpresados al 3% NaCl (en azul) se corresponden a la ruta de la arginina deiminasa (*arcABCD*). Los genes implicados en la vía de la arginina succiniltransferasa (AST), también están regulados al alza al 3% NaCl. (B) Organización genética del sistema arginina deiminasa en el genoma de RM-71. Para cada gen se muestra el código *Locus tag* (NCBI) correspondiente y el valor de Fold Change (FC). (C) Resultados de la prueba de Moeller para la descarboxilación/desaminación de arginina de  $\Delta\text{arcA}$ , RM-71<sup>wt</sup> (WT) y el control negativo no inoculado (C-). El color violeta claro observado en la cepa  $\Delta\text{arcA}$  sugiere la actividad de otras enzimas alcalinizantes en el catabolismo de la arginina. (D) Gráfico que muestra la viabilidad de las cepas RM-71<sup>wt</sup> y  $\Delta\text{arcA}$  tras 16 h de incubación a pH ácido (pH 4) en TSB-1 y TSB-3 y en presencia de un suplemento de L-arginina (10mM). Se utilizó una prueba *t* de Student para evaluar la significación estadística (\*\*p <0,001, \*p <0,01; ns: no significativo). (E) Gráfico que muestra los diámetros de motilidad de RM-71 y  $\Delta\text{arcA}$  en TSB-1 y TSB-3 en presencia de L-arginina (L-arg, 10 mM) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. La motilidad de  $\Delta\text{arcA}$  al 1% NaCl se reduce significativamente en presencia de L-arg. Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y dos experimentos independientes.

*Pseudomonas aeruginosa* utiliza la vía ADI para generar ATP fermentativamente (Vander Wauven *et al.*, 1984) y para mantener la motilidad en condiciones de anaerobiosis (Shoesmith & Sherris, 1960). Observamos que el mutante *arcA* no estaba afectado en la motilidad en anaerobiosis en ninguna de las condiciones de salinidad, pero mostraba un deterioro significativo en aerobiosis en presencia de L-arginina al 1% de NaCl (Figura 4.13E), una observación aparentemente contradictoria (los genes de la vía ADI se encontraron aquí sobreexpresados al 3% de NaCl) que indica que la implicación de la vía ADI en la motilidad de *Pdd* requiere de investigaciones adicionales. No obstante, la observación previa de que la arginina deiminasa también se regula al alza en *Pdd* en condiciones de exceso de hierro (Puentes *et al.*, 2017) apoya la hipótesis de un papel preferencial de esta actividad enzimática durante el estilo de vida planctónico frente al estilo de vida patógeno. Se ha demostrado que la absorción y la respiración de L-arginina se mantienen en *Vibrio* sp. en condiciones de limitación de nutrientes (Faquin & Oliver, 1984).

Esta estrategia podría ser importante para la supervivencia de *Pdd* durante largos periodos en agua de mar pobre en nutrientes (Fouz *et al.*, 1998).

#### **4.1.7. La expresión de los mecanismos de respuesta al estrés y los sistemas de eflujo se inducen a baja salinidad en *Pdd***

Durante el análisis transcriptómico identificamos que distintos sistemas de ensamblaje de clústeres de hierro-azufre [Fe-S] estaban sobrerregulados a baja salinidad, incluyendo los operones *isc* de hierro-azufre y el operón *suf* de asimilación de azufre (Figura 4.5). Ambos sistemas están implicados en *E. coli* en la síntesis/reparación de [Fe-S] bajo condiciones de estrés oxidativo y de bajo hierro (Outten *et al.* 2004). Cabe destacar que la expresión de *sufA* se multiplica por 11 en condiciones de baja salinidad en *Pdd*, y que su homólogo en *Shigella flexneri* se regula al entrar en contacto con las células del hospedador (Runyen-Janecky y Payne, 2002), sugiriendo que el operón *suf* podría desempeñar un papel en la adaptación a condiciones de baja disponibilidad de hierro y en las interacciones con el hospedador. Curiosamente, la cochaperona HcsB, implicada en la maduración de la proteína del clúster Fe-S, se reguló al alza en *Vibrio anguillarum* bajo condiciones de estrés similares a las encontradas dentro del hospedador (Skåne *et al.*, 2022). La sobrerregulación de los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo a baja concentración de NaCl se ha reportado previamente en *Chromohalobacter salexigens* (Salvador *et al.*, 2018) y *E. coli* (Li *et al.*, 2021).

Además de genes asociados a funciones de respuesta al estrés oxidativo, encontramos que la baja salinidad sobrerregula, de manera muy notable, la expresión de genes cromosómicos para dos bombas de eflujo pertenecientes a una superfamilia de transportadores de membrana denominados MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (A0J47\_RS15280, A0J47\_RS08650) (Tabla 4.2). Las proteínas pertenecientes a esta familia desempeñan diversas funciones en el eflujo de moléculas potencialmente dañinas para las células (Pasqua *et al.*, 2019). La sobrerregulación a bajo NaCl de estas bombas MFS, cuya función se desconoce en *Pdd*, impulsará futuras investigaciones sobre su papel en la resistencia, por ejemplo, de *Pdd* a los antimicrobianos.

#### 4.1.8. La baja salinidad desencadena en *Pdd* un perfil genético de virulencia, con un gran impacto en la sobreexpresión del secretoma dependiente del SST2

Una de las señales ambientales más informativas para la bacteria de la entrada en un hospedador, es el descenso brusco de la salinidad al que se enfrenta la bacteria cuando pasa del medio marino (salinidad aproximada del 3% NaCl) al medio interno del hospedador (1% NaCl). Los resultados obtenidos del análisis transcriptómico a ambas condiciones de salinidad mostraron que la caída de la salinidad sobreexpresa en *Pdd* muchas funciones genéticas potencialmente relacionadas con la virulencia. Estas funciones incluyen la motilidad y la quimiotaxis, la síntesis y captación de poliaminas, los mecanismos de respuesta al estrés y los sistemas de eflujo y, sobre todo, los mecanismos de adquisición de hierro y las citotoxinas (Figura 4.4; Tabla 4.2).

La glutatión sintetasa GshB se encuentra entre los genes más inducidos a baja salinidad, con un valor de FC de 38,4. La mutación de este gen se ha asociado en *V. cholerae* con un fuerte deterioro de la capacidad de colonización (Merrell *et al.*, 2002). Estudios previos han informado de la presencia en *Pdd* de las poliaminas putrescina, cadaverina, norespermidina y espermidina (Bjornsdottir-Butler *et al.*, 2018; Hamana, 1997; Yamamoto *et al.*, 1991). Encontramos que la baja salinidad regula al alza los genes para la síntesis y el transporte de putrescina y norspermidina (Tabla 4.3). La implicación de la espermidina y la putrescina en la virulencia se ha descrito en varios patógenos bacterianos (Goforth *et al.*, 2013; Jelsbak *et al.*, 2012; Shah *et al.*, 2011), sin embargo, el papel de las poliaminas en la virulencia de *Pdd* todavía se desconoce.

Los rasgos distintivos de la infección por *Pdd* en animales y humanos incluyen extensas hemorragias y daños tisulares causados por la secreción, en cantidades muy elevadas, de una fosfolipasa D, denominada Dly, y de dos toxinas formadoras de poro PhlyP y PhlyC, siendo las tres secretadas por el SST2 (Osorio *et al.*, 2018). Un estudio pionero sobre la producción de toxinas en *Pdd* informó de que la actividad citolítica era máxima cuando las bacterias crecían al 1% de

NaCl (Kreger, 1984). De acuerdo con estos resultados, encontramos que los genes plasmídicos que codifican para las citotoxinas Dly (*dly*, A0J47\_RS20350) y PhlyP (*hlyApl*, A0J47\_RS20355) se sobrerregularon 11 veces más a baja salinidad, mientras que el gen *hlyAch*, para la hemolisina cromosómica PhlyC (A0J47\_RS10995), duplicó su expresión (Tabla 4.3).

Para nuestra sorpresa, la lista de genes inducidos al 1% de NaCl estaba encabezada por dos genes que codifican una pequeña proteína de 11 kDa (A0J47\_RS13280) (PirA) y una  $\delta$ -endotoxina (A0J47\_RS13275) (PirB) (Tabla 4.3). Por su similitud con la toxina PirAB producida por las cepas de *V. parahaemolyticus* causantes de la enfermedad de necrosis hepatopancreática aguda en crustáceos (Lee *et al.*, 2015), estas dos proteínas identificadas en *Pdd* son candidatas a constituir una toxina binaria del tipo PirAB. Sin embargo, la función de esta toxina putativa sigue siendo desconocida en *Pdd*.

Las proteínas 11-kDa y  $\delta$ -endotoxina se identificaron previamente (Terceti *et al.*, 2019). Un estudio posterior confirmó que ambos genes forman parte del regulón de RstAB, un sistema de dos componentes que constituye un regulador maestro de la virulencia en *Pdd* (Matanza *et al.*, 2021).

Cabe mencionar que los genes de la 11-kDa (PirA) y la  $\delta$ -endotoxina (PirB) no son ubicuos en esta subespecie. Los genes *pirA-like* y *pirB-like* están presentes en algunos aislados de *Pdd* y se localizan en una región muy variable del cromosoma II, lo que sugiere que su adquisición podría tener lugar mediante transferencia horizontal de genes (Terceti *et al.*, 2018). Esta fuerte regulación de los genes de la 11-kDa y  $\delta$ -endotoxina a condiciones de salinidad similares a las que se encuentran en el medio interno de los hospedadores, nos impulsó a construir un mutante *knockout* de la proteína más grande ( $\delta$ -endotoxina o PirB) y evaluar su impacto en la virulencia para rodaballo, el hospedador de la cepa altamente virulenta de *Pdd* RM-71. Encontramos que la delección del gen de la  $\delta$ -endotoxina no causaba un deterioro detectable en la virulencia para rodaballo (Figura 4.14A). El mutante  $\delta$ -endotoxina mostró niveles de actividad hemolítica idénticos a la cepa parental (Figura 4.14B) además de un crecimiento normal (Figura 4.14C).

Para evaluar el papel individual de la  $\delta$ -endotoxina en la virulencia, introducimos como control, en los ensayos de virulencia, un mutante cuádruple de *Pdd* defectuoso para las cuatro citotoxinas Dly, PhlyP, PhlyC y PlpV, pero con el gen de la  $\delta$ -endotoxina intacto. Como vemos en la Figura 4.14A, el cuádruple mutante no fue virulento en las condiciones testadas.

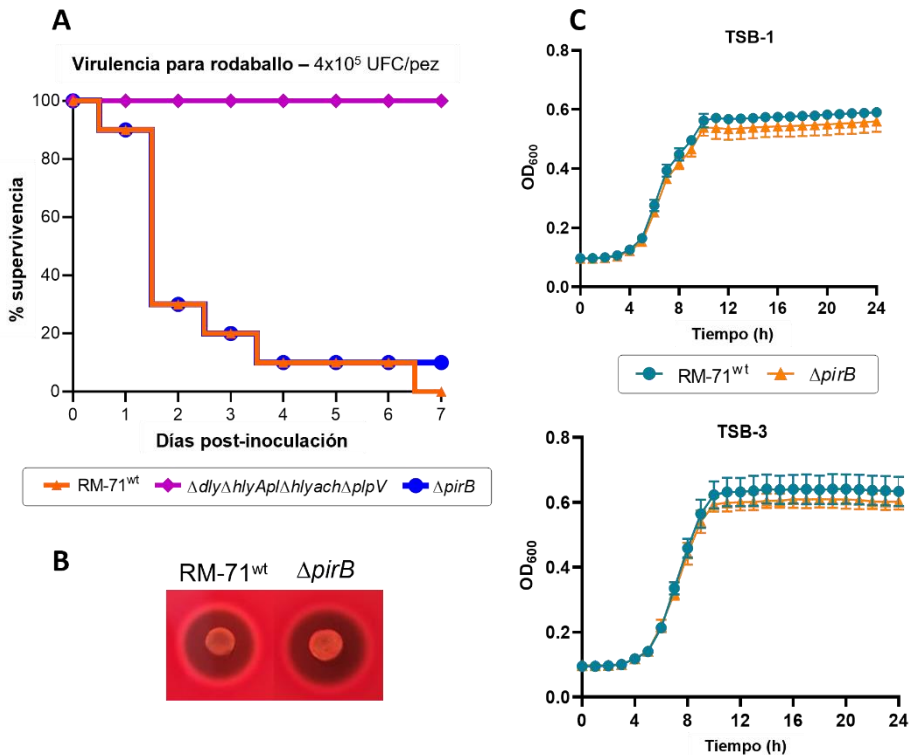


Figura 4.14 (A) Supervivencia (%) de rodaballos inyectados intraperitonealmente con las cepas RM-71<sup>wt</sup>,  $\Delta pirB$  y  $\Delta dly\Delta hlyApl\Delta hlyAch\Delta plpV$ .  $\Delta pirB$  no está afectado en la virulencia para el rodaballo. (B) Fenotipo hemolítico en agar sangre de oveja de RM-71<sup>wt</sup> y  $\Delta pirB$ .  $\Delta pirB$  mostró un halo de hemólisis muy similar al de la cepa parental. (C) Curvas de crecimiento de las cepas RM-71<sup>wt</sup> y  $\Delta pirB$  en medio TSB al 1% de NaCl y al 3% de NaCl. Los datos se presentan como media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y dos experimentos independientes. La cepa  $\Delta pirB$  no mostró diferencias en el crecimiento con respecto a la cepa parental

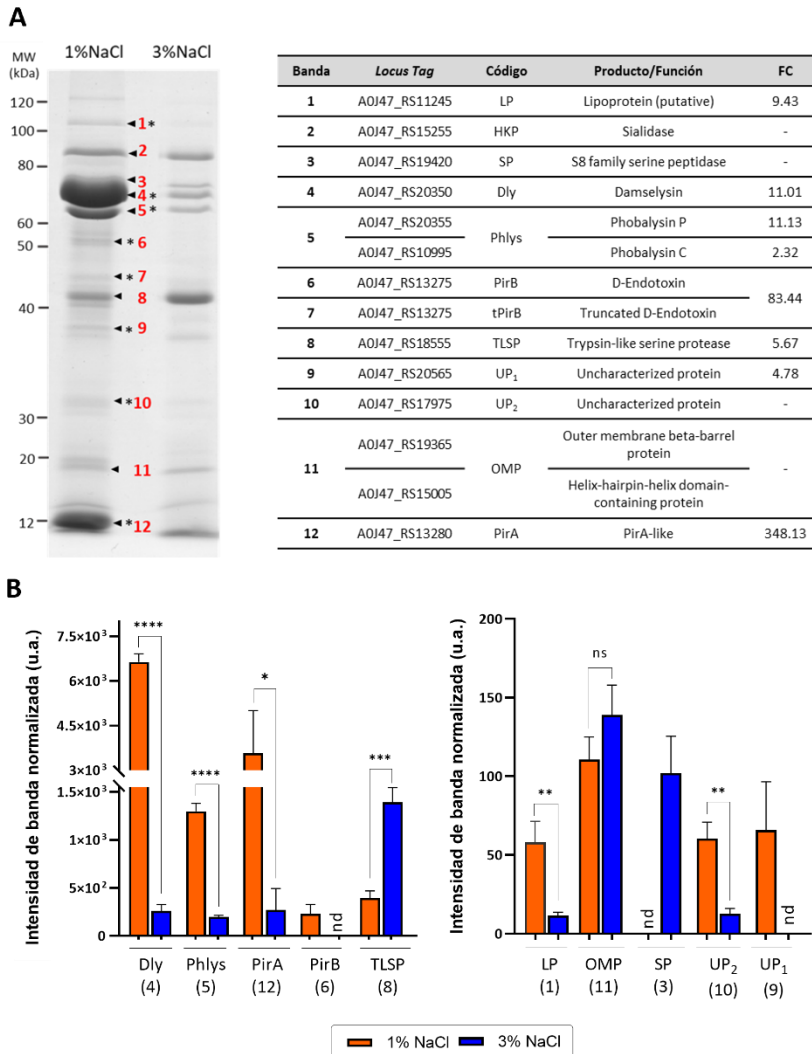
Estos resultados sugieren que el gen de la  $\delta$ -endotoxina es prescindible para la máxima virulencia de *Pdd* RM-71 para rodaballo. No obstante, teniendo en cuenta el amplio rango de hospedadores de *Pdd*, sería interesante llevar a cabo futuros estudios para evaluar el papel de esta toxina putativa similar a PirAB en otros hospedadores animales, incluyendo otras especies de peces y crustáceos.

Conviene tener en cuenta que los cambios en la expresión a nivel transcripcional pueden no reflejar necesariamente los cambios en la cantidad final de proteína, ya que existen mecanismos reguladores adicionales que pueden ajustar su abundancia total (Taggart *et al.*, 2021). Para comprender mejor el efecto de la salinidad en el secretoma de *Pdd*, los sobrenadantes de cultivos de la cepa RM-71 obtenidos al 3% de NaCl y al 1% de NaCl se examinaron mediante SDS-PAGE, y las bandas de proteínas se sometieron a un análisis cuantitativo.

Como se muestra en la Figura 4.15A, la mayoría de las proteínas secretadas fueron significativamente más abundantes al 1% de NaCl que al 3% de NaCl. En particular, las citotoxinas Dly, PhlyP y PhlyC y las proteínas de la toxina putativa PirAB-like fueron más abundantes en el perfil a baja salinidad. Las bandas de proteínas más abundantes correspondieron a Dly y a la proteína PirA-like de 11-kDa (A0J47\_RS13280), que fueron 25 y 13 veces más abundantes, respectivamente, al 1% que al 3% de NaCl (Figura 4.15B). En conjunto, estos resultados confirman que un cambio de alta a baja salinidad desencadena un perfil de virulencia en *Pdd*. En concordancia con los resultados del análisis de las proteínas secretadas, las pruebas fenotípicas en placa para la detección de hemólisis (un fenotipo atribuible a los efectos sinérgicos de Dly con PhlyP y PhlyC) y fosfolipasa (un fenotipo atribuible principalmente a Dly) mostraron un aumento de las actividades al 1% en comparación con el 3% de NaCl (Figura 4.16A). Estas observaciones concuerdan con estudios previos en otros vibrios en los que demostraron que la baja salinidad induce la expresión de citotoxinas, como la hemolisina *vvhA* de *V. vulnificus* (Lee *et al.*, 2000). De manera similar, se ha demostrado que la citotoxicidad de *V. parahaemolyticus* es mayor cuando se cultiva al 1% de NaCl en comparación con el 3% de NaCl (Whitaker *et al.*, 2010).

Otras proteínas secretadas que también fueron más abundantes a baja salinidad fueron una lipoproteína (A0J47\_RS11245) y una proteína hipotética dependiente de RstAB (A0J47\_RS20565). En concordancia con estos resultados, los genes para estas dos proteínas también incrementaron su expresión al 1% de NaCl en el estudio transcriptómico. Sin embargo, la serina proteasa similar a la tripsina (banda 8 en la Figura 4.15A), que estaba inducida 5,67 veces más al 1% de NaCl en los datos de RNA-seq, mostró más abundancia de proteína al 3% de NaCl. Es pertinente destacar que, debido a la baja cantidad de proteína obtenida de cultivos crecidos en fase exponencial (DO<sub>600</sub> de 0,55), el análisis comparativo del secretoma en las dos condiciones de NaCl se realizó utilizando cultivos crecidos hasta la fase estacionaria (DO<sub>600</sub> de 1,7). Por lo tanto, cabría esperar que los niveles relativos de algunas proteínas en el secretoma de *Pdd* al comparar las dos condiciones de salinidad no imiten exactamente los niveles relativos en los datos transcriptómicos.

En conjunto, la observación de que las proteínas secretadas se producen más abundantemente a baja salinidad (Figura 4.15) indica que las células de *Pdd* asignan numerosos recursos para la producción de altísimas cantidades de proteínas. En consonancia con estas observaciones, varios genes implicados en la síntesis y regulación de proteínas se sobrerregularon transcripcionalmente a baja salinidad (Figura 4.4 y Tabla 4.3). Entre ellos destaca la sobrerregulación al 1% NaCl, de hasta 52 genes que codifican para proteínas ribosómicas en *Pdd*. Además, los genes que codifican la proteína de modificación ribosómica de RpsF, RimK (A0J47\_RS00405), así como YegQ (A0J47\_RS12990), implicada en la hidroxilación del tRNA, se encontraban entre los 20 genes más diferencialmente expresados bajo esta condición.



**Figura 4.15** La salinidad modula la abundancia de proteínas secretadas en *Pdd*. (A) Análisis comparativo de los perfiles SDS-PAGE de los sobrenadantes de cultivos de RM-71 al 1% NaCl y al 3% NaCl. Las bandas numeradas (1-12) se corresponden con proteínas previamente identificadas (Terceti *et al.*, 2019). Las bandas con mayor abundancia a baja salinidad se marcan con un asterisco, \*. La identificación y etiquetado de las proteínas se muestra en la tabla adyacente. (B) Resultados de la cuantificación de proteínas mediante análisis densitométrica. La banda de la Sialidasa (2, HKP) se utilizó como control para la normalización. Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de la intensidad normalizada (expresadas como unidades arbitrarias, u.a.) de tres réplicas y tres experimentos independientes. Entre paréntesis se indica la banda correspondiente en el gel SDS-PAGE mostrado en (A). nd: no detectado. Las diferencias estadísticas se evaluaron mediante la prueba *t* de Student; \*\*\*\**p* < 0,0001, \*\*\**p* < 0,001, \*\* *p* < 0,01, \**p* < 0,05.

#### **4.1.9. Los sistemas de captación de hierro están sobrerregulados a baja salinidad en *Pdd***

El hierro (Fe) es un micronutriente esencial para la mayoría de los microorganismos, pero su disponibilidad en el hospedador está muy limitada, debido a que se encuentra unido a proteínas quelantes como la transferrina y la lactoferrina (Murdoch & Skaar, 2022). En un hospedador vertebrado, la mayor parte del Fe está unido al hemo mientras que la hemoglobina se encuentra dentro de los eritrocitos. Estudios previos han demostrado que *Pdd* puede utilizar citrato férrico, hierro ferroso, transferrina y hemo como fuentes de hierro (Fouz *et al.*, 1994, 1997). Siendo la baja salinidad una señal informativa de entrada en un hospedador, cabría esperar que los sistemas de captación de hierro estuvieran inducidos al 1% NaCl en *Pdd*. Confirmando esta hipótesis, el estudio RNA-seq reveló la sobrerregulación a baja salinidad, de los sistemas Fbp y Feo, implicados en el transporte de hierro férrico y ferroso, respectivamente (Tabla 4.3). El gen *fbpA* fue el más inducido a baja salinidad con un FC de 18,74 (Tabla 4.3), pero también se observó la sobrerregulación del gen que codifica el receptor sideróforo dependiente de TonB, FhuE, y para algunos genes del clúster que codifica el sistema de utilización de hierro hemo (Figura 4.5, panel cromosoma I). Paralelamente a la sobrerregulación de estos sistemas de captación de hierro, sería esperable que la regulación al alza de las hemolisinas Dly y PhlyP a baja salinidad, contribuya a la liberación de hierro hemo. Además de estos genes y como veremos más adelante, las condiciones de baja salinidad aumentaron, 9,5 veces, la expresión de un receptor dependiente de TonB codificado en el plásmido pPHDD1 (A0J47\_RS20555) homólogo) a Vep20 (60% de identidad aminoacídica), un receptor de transferrina clave para la virulencia de *V. vulnificus* en anguilas (Pajuelo *et al.*, 2015).

#### **4.1.10. La baja salinidad induce en *Pdd* posibles factores de virulencia adicionales codificados en el plásmido pPHDD1**

Estudios previos han demostrado que una cepa derivada de RM-71 a la que se le han delecionado los genes de las citotoxinas *dly* y *hlyApl* codificados en el plásmido pPHDD1, sigue siendo más virulenta que una cepa nativa de *Pdd* sin plásmido (Vences *et al.*, 2017).

Este resultado apunta a la implicación de otros posibles factores de virulencia, codificados en el plásmido pPHDD1, todavía no caracterizados. Como se ha mencionado anteriormente, las actividades hemolítica y fosfolipasa, atribuibles principalmente a las citotoxinas codificadas en pPHDD1, se incrementan a baja salinidad (Figura 4.16).

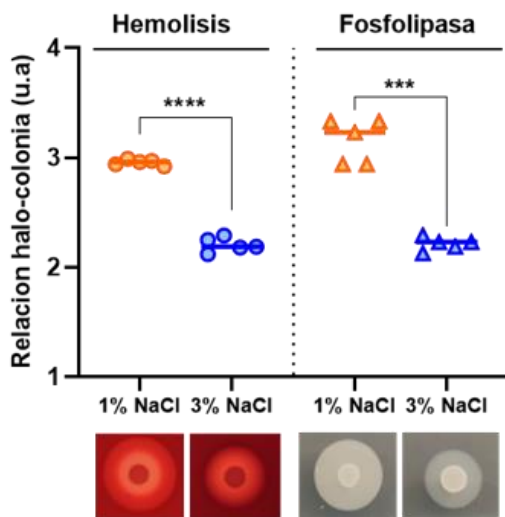


Figura 4.16 Actividades hemolítica y fosfolipasa (expresadas como u.a., unidades arbitrarias, de la relación halo-colonia) de RM-71 al 1% NaCl y al 3% NaCl. La significación estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student: \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Al estudiar el perfil transcripcional comparativo del plásmido pPHDD1 en respuesta a baja salinidad, detectamos la sobregulación de potenciales factores de virulencia (Figura 4.17), cuyos genes se distribuyen en regiones específicas dentro del plásmido y que diferenciamos como grupo A y grupo B (Figura 4.18A y B).

El grupo A de genes incluye las proteínas AcrAB, TolC y dos permeasas adicionales, en el que AcrAB-TolC constituye un transportador de eflujo de múltiples fármacos. El grupo B incluye dos potenciales factores de virulencia cuya función, hasta el momento, es desconocida en *Pdd*. El primer gen codifica una lipoproteína de membrana externa (A0J47\_RS20550) homóloga a Vep07 implicada en *V. vulnificus* biotipo 2 en la resistencia al suero de anguila y cuya mutación se correlaciona con la pérdida de virulencia (Roig & Amaro, 2009). El segundo gen codifica para un receptor de transferrina dependiente de TonB, similar a Vep20, mencionado con anterioridad (A0J47\_RS20555).

Además, A0J47\_RS20585, que codifica una proteína de membrana externa OmpU, también forma parte del perfil inducido a baja salinidad (FC 3.7). Varios estudios han revelado el papel crucial de OmpU en la proliferación, colonización y adhesión en diferentes vibrios (Ganie *et al.*, 2022). De acuerdo con nuestros resultados, la baja salinidad también aumentó la expresión del gen para OmpU en *V. parahaemolyticus* (Yang *et al.*, 2010). Por último, dos proteínas no caracterizadas codificadas en el plásmido pPHDD1 también forman parte del perfil transcriptómico inducido a baja salinidad y se corresponden con el gen A0J47\_RS20580, inducido 3,6 veces al 1% de NaCl, y a la proteína dependiente de RstAB secretada por el SST2 (A0J47\_RS20565) (Terceti *et al.*, 2019), inducida 4,7 veces más a baja salinidad con respecto al 3% NaCl.

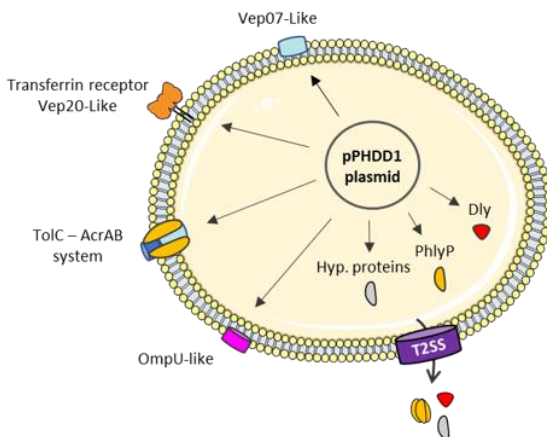


Figura 4.17 Ilustración de una célula de RM-71 en la que se muestran los genes del plásmido pPHDD1 inducidos en condiciones de baja salinidad (modificada de *Servier Medical Art* bajo licencia Creative Commons Attribution 3.0 Unported License).

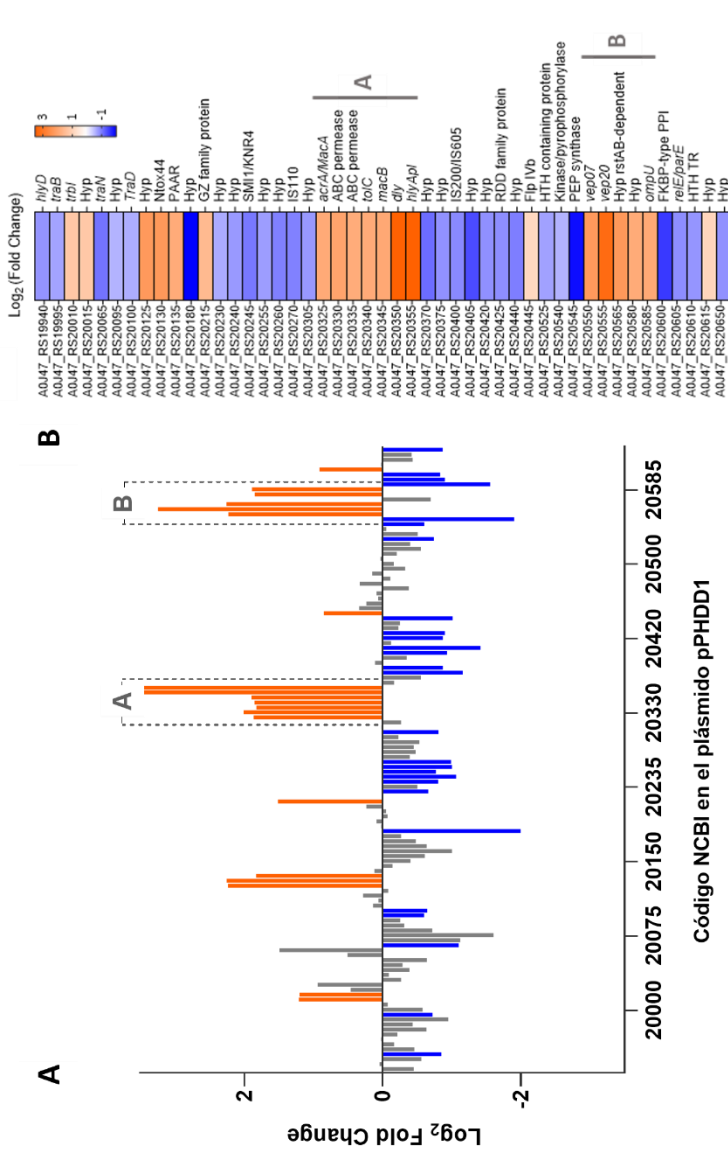


Figura 4.18 (A) Gráfico de la distribución de genes sobrerregulados (naranja), infrarregulados (azul) y sin cambios (gris) en el plásmido de virulencia pPHDD1 de RM-71 al 1% de NaCl frente al 3% de NaCl. Los códigos NCBI del eje X, van precedidos por "A0J47\_RS". "A" y "B" denotan los grupos donde se concentra la mayoría de los genes sobrerregulados. (B) Mapa de calor que representa los DEGs sobrerregulados e infrarregulados en el plásmido RM-71 pPHDD1 al 1% de NaCl frente al 3% de NaCl. Los valores de expresión se representan como  $\text{Log}_2$  Fold Change; las proteínas hipotéticas se denotan como "Hyp".

Considerando los resultados descritos en este capítulo, proponemos que la disminución de la concentración de NaCl que experimenta *Pdd* al entrar en el hospedador (del 3% al 1% NaCl), desencadena un programa genético de virulencia a través de la fuerte regulación de la abundancia de citotoxinas en la fracción del secretoma, la traducción de proteínas, la expresión de sistemas de adquisición de hierro y otras funciones relacionadas con la virulencia. Por el contrario, el crecimiento a la salinidad próxima a la del ambiente marino (3% NaCl), regula al alza la captación de solutos compatibles, induce los sistemas de producción de energía, el uso de fructosa y trehalosa como fuentes de carbono, el metabolismo del nitrógeno y de los aminoácidos, con un especial énfasis en las enzimas del sistema ADI (Arginina deiminasa), que podrían desempeñar un papel en la resistencia a pH ácido. Uno de los resultados más llamativos derivados de este estudio es que el regulón de la salinidad no se solapa con el regulón RstAB descrito previamente en *Pdd*, sugiriendo que este sistema de dos componentes no es responsable de la transmisión de la información ante cambios en la concentración de NaCl. Por ejemplo, mientras que la mutación del sistema RstAB causó una infrarregulación de 1.300 veces de los genes de la biogénesis de la cápsula (Matanza *et al.*, 2021), el impacto de los cambios de NaCl en la transcripción de los genes de la cápsula, en el presente estudio, fue muy discreto (con FCs que oscilaron entre 1,6 y 3,57).

En las especies pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*, se conocen pocos ejemplos acerca de los mecanismos reguladores que transducen la información de los cambios en la concentración de NaCl, pero es evidente que la respuesta del transcriptoma a los cambios en la salinidad se transduce a través de varios mecanismos y no a través de un único regulador global. En *V. cholerae*, OscR (Shikuma *et al.*, 2009), CosR (Shikuma *et al.*, 2013) y EnvZ/OmpR (Xi *et al.*, 2020) constituyen reguladores que responden a la osmolaridad, y recientemente se han descrito nuevos genes reguladores de respuesta a los cambios en la salinidad que median en la modulación de la expresión génica en *V. parahaemolyticus* (Gregory *et al.*, 2019).

La fuerte inducción de un programa genético de virulencia en *Pdd* tras la exposición a baja salinidad, impulsará sin duda futuros estudios dirigidos a identificar nuevos sistemas de respuesta a la salinidad en este patógeno versátil y generalista, e inspirarán investigaciones en otras especies próximas de la familia *Vibrionaceae*.

Además, más allá de la sobreexpresión de las citotoxinas plasmídicas Dly y PhlyP a baja salinidad, este estudio transcriptómico ha puesto en primer plano una serie de genes codificados en el plásmido de virulencia pPHDD1 que podrían constituir potenciales factores de virulencia y cuya función en *Pdd* es todavía desconocida. Entre ellos, identificamos el gen que codifica para la proteína Vep20-like, un receptor putativo de transferrina dependiente de TonB (WP\_176455483.1), cuya sobreexpresión en *Pdd* también sucede a condiciones limitantes de hierro (Puentes *et al.*, 2017). La sobreexpresión de Vep20-Like bajo dos condiciones ambientales inductoras de la virulencia (baja salinidad y bajo hierro), nos motivaron a investigar su papel en la patogenicidad de *Pdd*. El estudio de la función biológica del receptor Vep20-like en *Pdd* se abordará en el siguiente capítulo.

## 4.2. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y FUNCIONAL DE TBPD: UNA PROTEÍNA DE ADQUISICIÓN DE HIERRO CODIFICADA EN EL PLÁSMIDO DE VIRULENCIA PPHDD1

El hierro es un nutriente indispensable para el crecimiento bacteriano, siendo esencial para el correcto funcionamiento de procesos metabólicos como el ciclo de Krebs o la síntesis de aminoácidos. En el hospedador, la mayoría del hierro se encuentra unido a proteínas quelantes, como la transferrina y la lactoferrina y formando parte de proteínas como la hemosiderina, la ferritina y la hemoglobina. En consecuencia, la disponibilidad de hierro libre en el hospedador es muy limitada. Las bacterias patógenas reconocen esta limitación de hierro como una señal indicadora de la entrada en el hospedador, induciendo la expresión de los sistemas de captación de hierro y de otros factores de virulencia (Sheldon *et al.*, 2016).

Estudios recientes en *P. damsela* subsp. *damsela* (*Pdd*) han demostrado que la limitación de hierro induce las citotoxinas Dly y PhlyP, así como otros posibles factores de virulencia codificados en el plásmido pPHDD1 (Puentes *et al.*, 2017). Entre estos factores de virulencia candidatos, destaca el gen que codifica para un receptor putativo de unión a transferrina (A0J47\_RS20555), homólogo a la proteína Vep20 de *V. vulnificus* y que, además, se ha identificado como parte del estímulo inducido a baja salinidad en la primera parte de esta tesis (ver “[Sección 4.1](#)”). Dada la homología de esta proteína plasmídica con TbpA (~35% de identidad aminoacídica en un 68% de secuencia alineada), la proteína A de unión a transferrina de *Neisseria meningitidis* (3V89\_A), denominamos a este receptor putativo de *Pdd* como TbpD (Transferrin binding protein from *P. damsela*).

En este estudio, nos propusimos investigar la función biológica de la proteína TbpD en *Pdd*. Para este fin, mutamos por intercambio alélico el gen *tbpD* en la cepa altamente virulenta RM-71 y realizamos numerosos experimentos *in vitro* e *in vivo* para conocer su papel en la fisiología y en la virulencia de *Pdd*.

#### 4.2.1. TbpD es una proteína de membrana externa (OMP) regulada por hierro

De acuerdo con la base de datos PSORTb e InterProScan, la proteína TbpD, anotada en el genoma de la cepa RM-71 como “receptor putativo de Hb/Tf/Lf dependiente de TonB”, es una proteína de membrana externa de 746 aminoácidos (85 kDa) que presenta dos dominios: un dominio barril beta dependiente de TonB, que forma un poro a través de la membrana externa, y un dominio *plug*, plegado en el interior de barril que actúa como tapón, bloqueando el poro hasta que sucede la unión con el ligando. El análisis de la secuencia mediante SignalP (v. 6.0) desveló la presencia, de una secuencia señal de 16 aminoácidos en el extremo N-terminal (Figura 4.19).

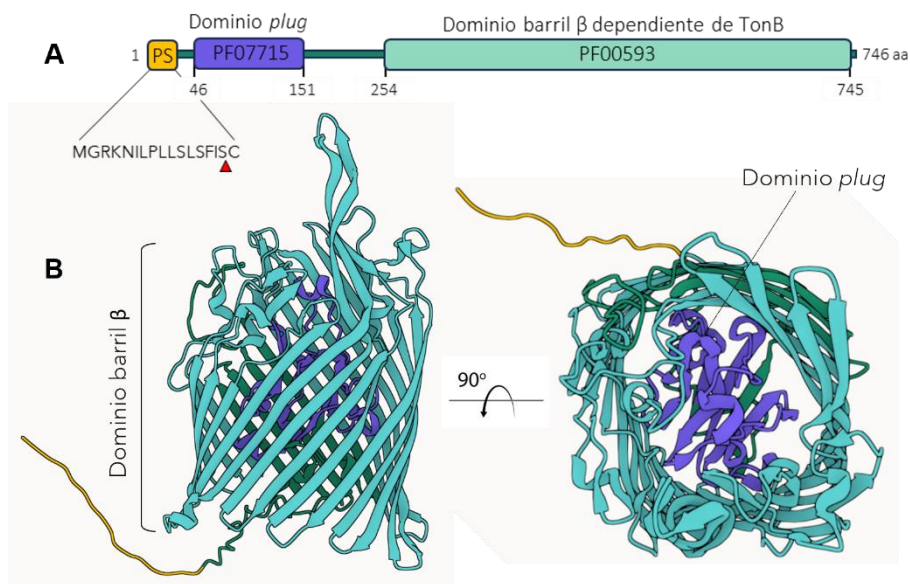


Figura 4.19. Dominios y predicción estructural de la proteína TbpD de RM-71. (A) Representación esquemática de los dominios identificados mediante la base de datos InterProScan. Dentro de cada dominio se indican los códigos Pfam. En el extremo N-terminal se indica la secuencia señal predicha por el servidor Signal P (v. 6.0). (B) Modelo de la estructura secundaria de la proteína TbpD de RM-71 utilizando AlphaFold2. Los colores se corresponden con los dominios identificados en la secuencia. A la derecha, vista lateral de la proteína mostrando el dominio *plug*.

El análisis de la secuencia promotora de TbpD de la cepa RM-71 desveló la presencia de la secuencia consenso de reconocimiento, o Fur box, del regulador Fur (*Ferric uptake regulator*) (GATAAATATTATCATTATC). Estudios previos han demostrado que este represor transcripcional, dependiente de la concentración de Fe, regula en *Pdd* la expresión de genes de captación del grupo hemo, así como genes de proteínas de unión a hierro (Rivas, 2012). La presencia de esta secuencia consenso para la unión de Fur, sugiere que TbpD es una proteína regulada por hierro. Para demostrarlo, analizamos mediante SDS-PAGE las proteínas de membrana externa de la cepa RM-71 salvaje, de la cepa mutante para TbpD (*ΔtbpD*) y del clon complementado (cTbpD) en condiciones limitantes de hierro (CM9-1+Dip). Como condición control, incluimos el crecimiento de la cepa RM-71 salvaje en presencia de hierro (CM9-1).

Como vemos en la Figura 4.20, el crecimiento de la cepa salvaje RM-71 en presencia de 2-2'-dipiridil (40 μM), indujo la expresión de tres proteínas, dos de ellas de alto peso molecular (entre 82-85 kDa) y otra de aproximadamente 30 kDa (Figura 4.20A). Los pesos moleculares de estas tres proteínas concuerdan con los identificados previamente al analizar el perfil de la cepa RM-71 en presencia de transferrina humana y EDDHA (Fouz *et al.*, 1997). Como vemos en el perfil de la cepa salvaje, estas tres proteínas también se expresan en presencia de hierro (CM9-1), sin embargo, su expresión es mayor en condiciones restrictivas (CM9-1+ 40 μM de 2-2'-dipiridil). La banda de mayor peso molecular, correspondiente a la proteína TbpD (85 kDa), está ausente en el perfil del mutante (*ΔtbpD*), mientras que se recupera al introducir una copia salvaje del gen (cTbpD). La inducción de esta banda en condiciones limitantes de hierro demuestra que TbpD es una proteína de membrana externa regulada por hierro en *Pdd*. Al inspeccionar el perfil de proteínas en la franja de 50 kDa a 75 kDa (Figura 4.20A), observamos una banda de aproximadamente 65 kDa, que también parece estar inducida a bajo Fe en la cepa RM-71 salvaje (WT). Sin embargo, esta banda está ausente tanto en el mutante como en el clon complementado.

Esta alteración en el patrón de bandas de la cepa  $\Delta tbpD$ , aun cuando introducimos una copia salvaje del gen, sugiere que la mutación de la proteína TbpD podría estar desencadenando algún tipo de modificación en el perfil OMP de *Pdd*.

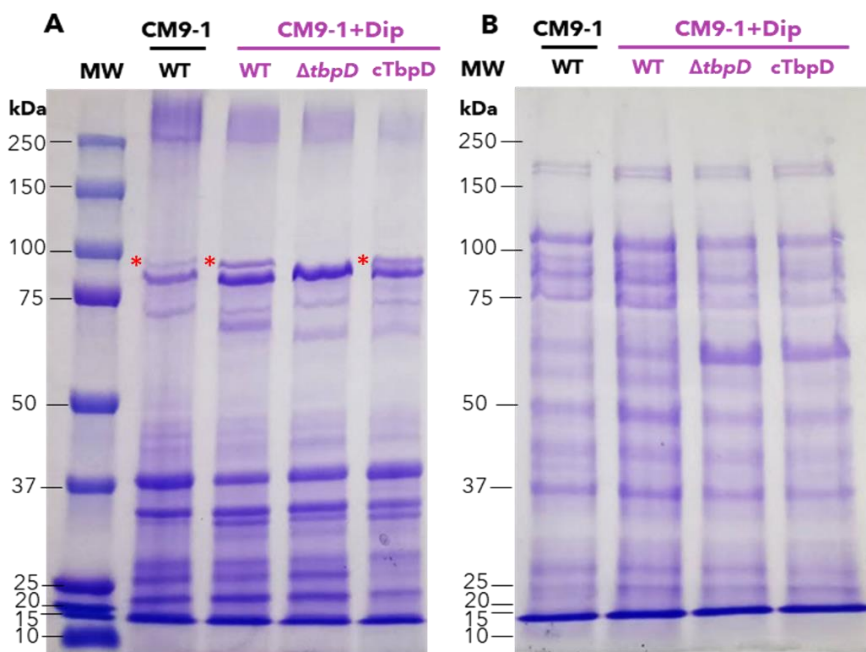


Figura 4.20 Análisis SDS-PAGE de las proteínas de membrana externa (A) y proteínas periplasmáticas (B) de las cepas de *Pdd* RM-71 (WT),  $\Delta tbpD$  y  $\Delta tbpD$  complementado con el vector pA-162-Vibexp+TbpD (cTbpD), crecidas en medio mínimo CM9-1 y CM9-1+ 40  $\mu$ M de 2,2'-dipiridil (CM9-1+Dip). A la izquierda se indica el peso molecular en kilodaltons (kDa) del marcador utilizado. La banda correspondiente a la proteína TbpD se indica con un asterisco rojo.

Aunque las proteínas de membrana externa (OMPs) ejercen un papel crucial en la captación de hierro en las bacterias Gram-negativas, las proteínas periplasmáticas, encargadas de transportarlo a través del periplasma, también desempeñan una función esencial en la homeostasis del hierro (Andrews *et al.*, 2003; Payne *et al.*, 2016). En línea con esto, un estudio previo ha demostrado que la baja disponibilidad de hierro induce la expresión de algunas proteínas

periplasmáticas de unión a hierro en *Pdd* (Puentes *et al.*, 2017). Sin embargo, el análisis SDS-PAGE de las proteínas periplasmáticas de la cepa RM-71 (Figura 4.20B), no reveló grandes diferencias al comparar los perfiles obtenidos en CM9-1 y en CM9-1+ 2-2'-dipiridil. En el perfil del mutante ( $\Delta tbpD$ ) y del mutante complementado (cTbpD), destaca la banda de una proteína de aproximadamente 60 kDa que parece inducirse con respecto a la cepa parental a condiciones de bajo hierro. Desconocemos la identidad de esta proteína, pero de nuevo, podemos hipotetizar que la mutación de TbpD podría inducir algún efecto pleiotrópico, como por ejemplo, el aumento de la expresión de proteínas periplasmáticas.

#### **4.2.2. La mutación del gen *tbpD* compromete drásticamente la virulencia de *Pdd* para rodaballo**

En numerosos patógenos bacterianos de peces, la capacidad para causar enfermedad está determinada, en gran medida, por su capacidad para captar hierro del hospedador (Lemos y Balado, 2020). Por ejemplo, en un estudio previo se demostró que la mutación del receptor de transferrina codificado en el plásmido pVvbt2 de *V. vulnificus* disminuía considerablemente la virulencia de este patógeno en anguila (Pajuelo *et al.*, 2015). En cuanto a los mecanismos de *Pdd* para la captación de hierro, un trabajo reciente ha demostrado que la cepa RM-71 no produce vibrioferrina, sino que libera cantidades considerables de citrato al medio externo para la captación de hierro (Balado *et al.*, 2017). Además del citrato, también se han identificado en *Pdd* los genes para un sistema de captación de hemo (Río *et al.*, 2005); sin embargo, se desconoce el papel de estos mecanismos en la patogénesis de *Pdd*.

Para investigar el papel de TbpD en la virulencia de *Pdd* para peces, realizamos infecciones experimentales inoculando la cepa salvaje y la cepa mutante por delección para *tbpD* ( $\Delta tbpD$ ) en rodaballo y lubina. Como se muestra en la Figura 4.21, el mutante  $\Delta tbpD$  no mostró diferencias significativas en la virulencia para la lubina en comparación con la cepa salvaje ( $p > 0,03$  por Log-rank, prueba de Mantel-cox). A una dosis de  $2 \times 10^5$  UFC/pez, sólo el 10% de los peces inoculados con la cepa parental sobrevivió frente al 30% que sobrevivió cuando se les inyectó la cepa  $\Delta tbpD$ .

Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones testadas, la proteína TbpD tiene una contribución menor en la virulencia de *Pdd* para lubina.

Sorprendentemente, a diferencia de lo observado en lubina, la mutación del gen *tbpD* redujo la virulencia de *Pdd* para rodaballo de manera muy drástica (Figura 4.21). A una dosis de  $4 \times 10^5$  UFC/pez, la cepa salvaje causó la muerte del 100% de los peces inoculados mientras que en el grupo de peces inoculados con la cepa  $\Delta tbpD$  no se registró ninguna muerte ( $p < 0,0001$  por log-rank, test de Mantel-Cox). Para cada experimento de virulencia, se obtuvieron cultivos puros de las cepas inoculadas del riñón anterior de los peces muertos. Las colonias se confirmaron mediante PCR para el marcador específico de *Pdd ureC* (Osorio *et al*, 2000).

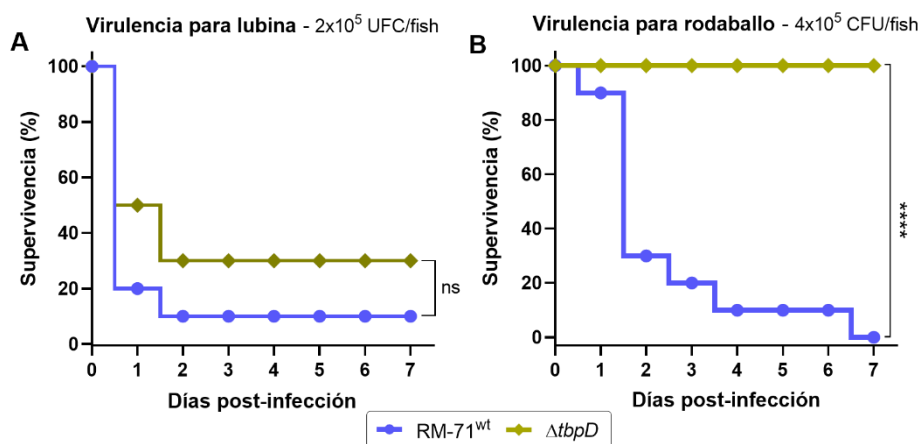


Figura 4.21 La mutación del gen *tbpD* afecta severamente a la virulencia de *Pdd* para rodaballo. Curvas de supervivencia de lubinas (A) y rodaballos (B) inyectados por vía intraperitoneal con las cepas RM-71<sup>wt</sup> y  $\Delta tbpD$ . Para realizar el análisis estadístico se utilizó la prueba log-rank (Mantel-Cox) (\* $p < 0,03$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns: no significativo).

Cabe destacar que la cepa  $\Delta tbpD$  no mostró diferencias en el crecimiento ni en medio rico (TSB-1, TSB-3) ni en medio mínimo (CM9-1) con respecto a la cepa salvaje (Figura 4.22). Además, para investigar si la mutación de *tbpD* podría causar algún efecto en la producción de hemolisinas, evaluamos la actividad hemolítica en agar sangre. Como se muestra en la Figura 4.23, no se observaron diferencias significativas en la actividad hemolítica ni en sangre de oveja ni en sangre de rodaballo entre  $\Delta tbpD$  y la cepa salvaje ( $p > 0,05$  mediante la prueba *t*).

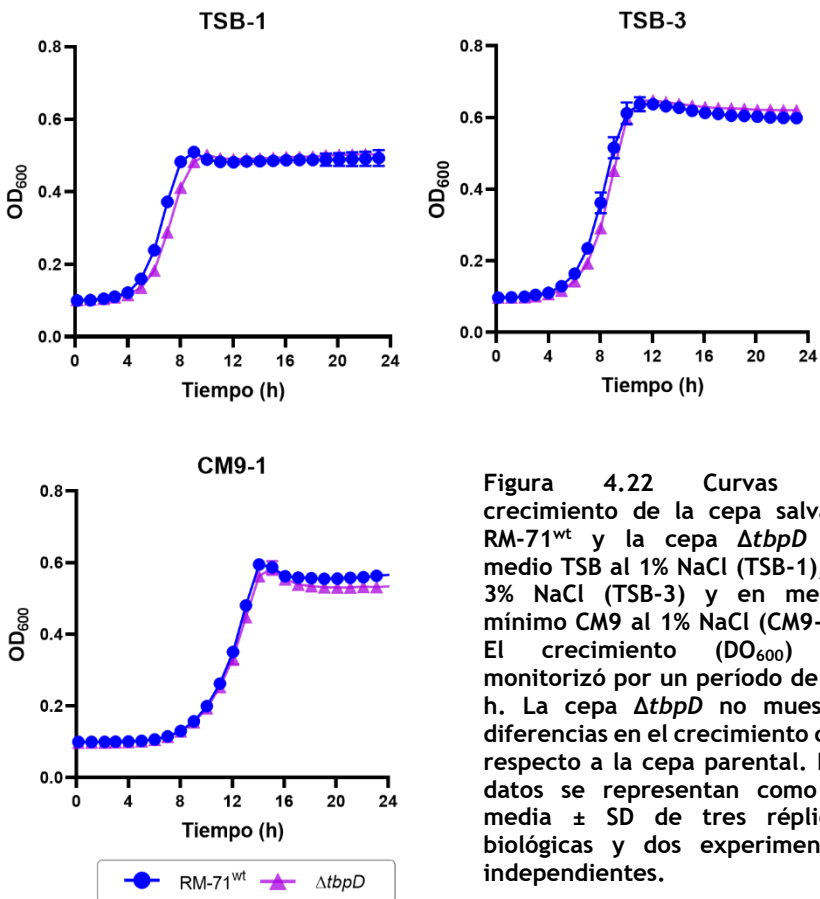


Figura 4.22 Curvas de crecimiento de la cepa salvaje RM-71<sup>wt</sup> y la cepa  $\Delta tbpD$  en medio TSB al 1% NaCl (TSB-1), al 3% NaCl (TSB-3) y en medio mínimo CM9 al 1% NaCl (CM9-1). El crecimiento (OD<sub>600</sub>) se monitorizó por un periodo de 24 h. La cepa  $\Delta tbpD$  no muestra diferencias en el crecimiento con respecto a la cepa parental. Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y dos experimentos independientes.



### 4.2.3. El mutante $\Delta tbpD$ está afectado en el crecimiento en sangre y plasma de rodaballo y lubina

Estudios previos han demostrado que la mutación del receptor de transferrina Vep20 en *V. vulnificus* compromete de manera significativa el crecimiento de la bacteria en presencia de sangre y plasma de anguila (Pajuelo *et al.*, 2015). Para demostrar el papel de TbpD en la supervivencia de *Pdd* en sangre, evaluamos el crecimiento de la cepa salvaje y de la cepa  $\Delta tbpD$  en presencia de sangre y plasma de rodaballo y lubina.

A la vista de los resultados obtenidos en el experimento de virulencia y bajo la hipótesis de que TbpD podría constituir un receptor de transferrina específico para rodaballo, cabría esperar que el crecimiento de  $\Delta tbpD$  sólo se viese afectado en sangre y plasma de rodaballo. Sin embargo, la mutación del gen *tbpD* redujo significativamente la capacidad de *Pdd* para crecer en sangre y plasma tanto de rodaballo como de lubina (Figura 4.24 y Figura 4.25, A y B). Para descartar el efecto bactericida de la acción del complemento, el plasma de ambas especies se inactivó a 45 °C durante 30 minutos. Del mismo modo, para descartar un efecto bacteriostático por el secuestro de hierro a través de la transferrina de los peces, evaluamos el crecimiento de las cepas en plasma fresco y plasma inactivado suplementados con hierro. Como se muestra en la Figura 4.25, el crecimiento de la cepa mutante en plasma inactivado seguía viéndose afectado en comparación con la cepa salvaje, permitiendo descartar un efecto inhibitorio por acción del complemento. Cabe destacar que la adición de hierro al plasma y al plasma inactivado permitió el crecimiento de la cepa mutante, lo que apoya el papel de la proteína TbpD en la adquisición de hierro quelado del hospedador. La afectación de  $\Delta tbpD$  en el crecimiento en sangre y plasma tanto de lubina como de rodaballo sugiere que TbpD es un elemento necesario para el crecimiento de *Pdd* en sangre de peces.

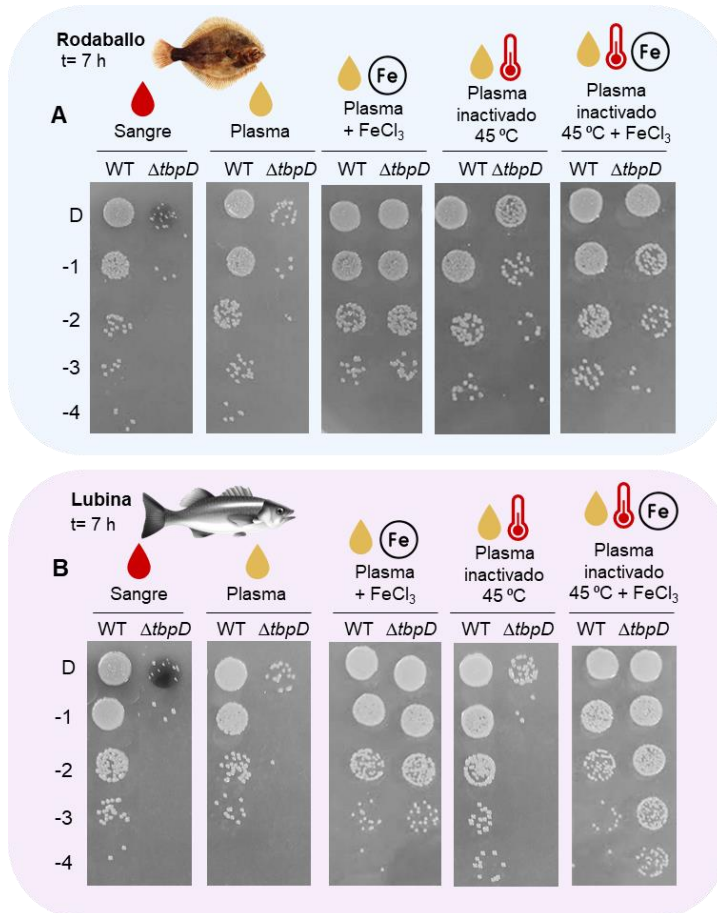


Figura 4.24 Crecimiento de *Pdd* en sangre y plasma. Ensayo de dilución en gota de la cepa RM-71 salvaje (WT) y de la cepa  $\Delta tbpD$  tras 7 h de incubación en sangre y plasma de rodaballo (A) y lubina (B). El plasma crudo y el plasma inactivado se suplementaron con FeCl<sub>3</sub> a una concentración final de 100  $\mu$ M. Las diluciones seriadas se sembraron en placas de TSA-1 y se incubaron a 25 °C durante 20 h.

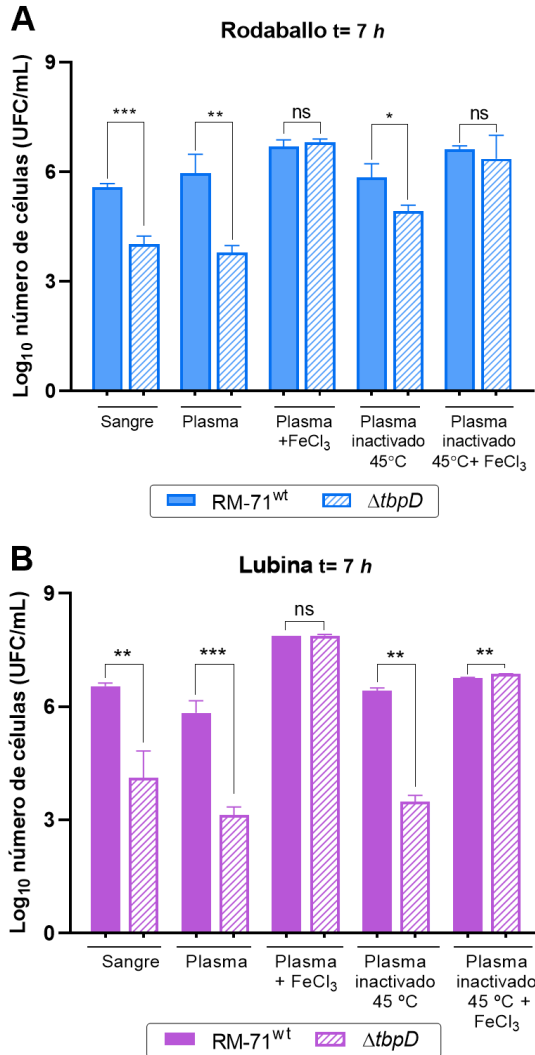


Figura 4.25 Crecimiento de *Pdd* en sangre y plasma. El crecimiento de la cepa salvaje RM-71 y de la cepa  $\Delta tbpD$  se determinó mediante recuento en gota tras 7 h de incubación en sangre y plasma de rodaballo (A) y lubina (B). Los datos se representan como la media  $\pm$  SD de tres réplicas biológicas y 2 experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student (\*\*\**p* <0,001, \*\* *p* <0,02, \**p* <0,05, ns: no significativo).

Estudios anteriores han sugerido que el receptor de transferrina Vep20 de *V. vulnificus*, específico para anguila, podría unirse también a la transferrina de otras especies, como trucha y tilapia, pero de forma menos eficiente, lo que apoyaría la menor virulencia de *V. vulnificus* para estas dos especies (Pajuelo *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta estas observaciones, podríamos considerar la posibilidad de que el receptor TbpD de *Pdd*, pudiera unirse también a la transferrina de lubina, pero de forma mucho menos eficiente, apoyando el menor impacto que la mutación de TbpD tiene en la virulencia para esta especie (Figura 4.21).

#### **4.2.4. El mutante $\Delta tbpD$ muestra un defecto en la colonización de los órganos internos de rodaballo y lubina**

Para examinar si los diferentes patrones de virulencia observados para  $\Delta tbpD$  en rodaballo y en lubina podrían deberse a un defecto en la colonización interna de los órganos, se realizaron ensayos de infección competitiva *in vivo* mediante la inoculación intraperitoneal de una mezcla 1:1 de la cepa salvaje y de la cepa  $\Delta tbpD$ .

Como se observa en la Figura 4.26A, el mutante *tbpD* se vio superado de manera muy considerable por la cepa salvaje en el bazo y el riñón del rodaballo. Además, los valores de índice de competitividad (IC) obtenidos en ambos órganos fueron similares, apoyando la severa afectación de  $\Delta tbpD$  en la virulencia para rodaballo. De manera llamativa, la cepa salvaje también superó al mutante *tbpD* en lubina, pero los valores de IC para cada órgano fueron significativamente diferentes, de manera que el número de células del mutante *tbpD* con relación al número de células de la cepa salvaje fue significativamente mayor en el bazo que en el riñón (Figura 4.26B,  $p < 0,01$  mediante prueba *t* de Student).

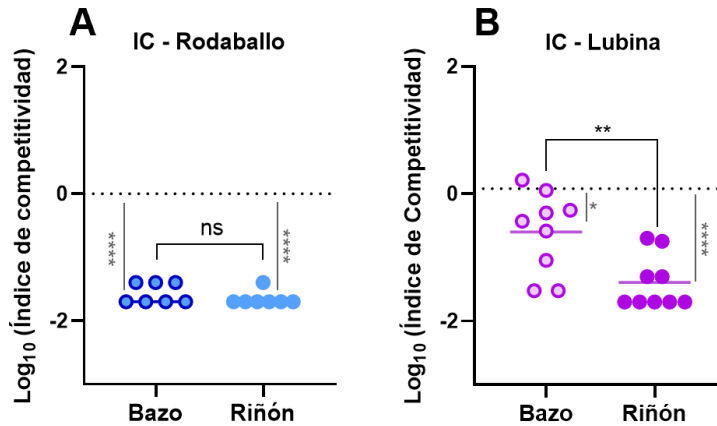


Figura 4.26 Índice de competitividad (IC) *in vivo* de  $\Delta\text{tbpD}$  frente a RM-71<sup>wt</sup> en rodaballo (A) y lubina (B). Grupos de rodaballos juveniles (n= 7) y lubinas (n= 9) se inocularon intraperitonealmente con  $4 \times 10^5$  UFC de RM-71<sup>wt</sup> y  $\Delta\text{tbpD}$  en una proporción 1:1. Los riñones y los bazos de los peces recién muertos se sembraron en placas de TSA-1 y se analizaron 50 colonias de cada muestra mediante PCR. El índice de competitividad (IC) se calculó dividiendo la proporción  $\Delta\text{tbpD}$ :WT obtenida en cada órgano entre la proporción en el inóculo inicial y se transformó en  $\text{Log}_{10}$ . Un  $\text{log}_{10}\text{CI}=0$  indica igual grado de competitividad. Se utilizó la prueba *t* de Student para determinar la significación estadística (\*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , ns: no significativo).

En línea con estos hallazgos, investigaciones previas han demostrado que el contenido de hierro de los centros melanomacrofágicos (MMC) de peces es mayor en el bazo que en el riñón (Tokumaru y Ferri, 1970; Agius, 1979). Curiosamente, una de las principales funciones de estos centros es la fagocitosis celular y la acumulación de restos metabólicos ha llevado a denominar a los MMC como "vertederos metabólicos" (Agius *et al.*, 1980). En consecuencia, la degradación continua de eritrocitos y la acumulación de hierro en su forma de almacenamiento ( $\text{Fe}^{3+}$  en la ferritina), confiere a los MMC del bazo un pigmento característico, la hemosiderina, reforzando el papel crucial de este órgano en el reciclaje y almacenamiento del hierro (Agius, 1979, Wolke, 1992). Además, los centros melanomacrofágicos también desempeñan funciones inmunológicas y varios trabajos han demostrado que las infecciones bacterianas, como las vibriosis, inducen la

acumulación de hierro en el bazo de algunas especies (Agius, 1979; Agius y Roberts, 2003).

De este modo, en base a los resultados obtenidos en los experimentos de colonización competitiva en lubina, podría ser que la disponibilidad de un exceso de hierro en el bazo compense en cierta medida la falta de proteína TbpD en *Pdd*. De esta forma, en presencia de hierro extra, la presión selectiva sobre la captación de hierro quelado del hospedador se reduce, de manera que el mutante estaría menos afectado en la colonización del bazo con respecto al riñón. Como se refleja en la Figura 4.23, aunque el mutante *tbpD* carece de proteína TbpD funcional, sigue produciendo una elevada cantidad de hemolisinas. En este contexto, aunque *Pdd* sería presumiblemente incapaz de unir hierro a través del receptor TbpD, la cantidad extra de hemoglobina derivada de la hemólisis podría ser, en parte, una condición propicia para la colonización del bazo por *Pdd*. Sin embargo, partiendo de esta hipótesis, los motivos por los cuales la competitividad del mutante con respecto a la cepa salvaje es mayor en el bazo de lubina con respecto al bazo del rodaballo, son totalmente desconocidos, y desde luego, requieren de más investigaciones.

#### **4.2.5. El contexto del gen *tbpD* está altamente conservado en las cepas de *P. damselae* subsp. *damselae***

El gen que codifica para la proteína TbpD en *Pdd*, se localiza en el plásmido de virulencia pPHDD1, cuya presencia se restringe a una fracción de los aislados de esta subespecie. Con el objetivo de comprender mejor la distribución de los homólogos de TbpD en la familia *Vibrionaceae*, realizamos una búsqueda en la base de datos BLASTP del NCBI. En línea con lo descrito previamente por Pajuelo *et al.*, (2015), nuestro análisis constató la presencia de homólogos a TbpD en plásmidos transferibles de otras especies patógenas como *V. vulnificus* (pVvbt2) y *V. harveyi* (pVh1). Además, esta búsqueda desveló la presencia de homólogos en plásmidos de dos cepas de *Aliivibrio wodanis* (pAWOD920 y pAWOD\_1 en las cepas *A. wodanis* 06/09/139 y 06/09/160, respectivamente; GenBank: LN554848.1 and LR721752.1) que presentaron un 56% de identidad aminoacídica con TbpD.

Aunque estos plásmidos todavía no han sido caracterizados, el análisis de la secuencia de pAWOD920 ha permitido identificar un conjunto de genes *tra*, sugiriendo que puede tratarse de un plásmido transferible. Teniendo en cuenta que el plásmido pPHDD1 de *Pdd* también es transferible por conjugación (Rivas *et al.*, 2011), este hallazgo sugiere que la adquisición de la proteína TbpD mediante transferencia horizontal de genes (HGT) podría conferir una ventaja adaptativa en los ambientes de producción acuícola. Curiosamente, la búsqueda en la base de datos BLASTP también reveló la presencia de un homólogo a TbpD en una cepa de *Photobacterium carnosum*, que presentó un 70% de identidad aminoacídica.

El análisis de las secuencias flanqueantes del gen *tbpD*, reveló que, tanto la proteína TbpD como su contexto genético están altamente conservados en *Pdd* (Figura 4.27). El alineamiento de la secuencia aminoacídica de TbpD de la cepa RM-71 con los homólogos de *Pdd* disponibles en la base de datos NCBI, mostró como mucho diferencias en un solo aminoácido (99% de identidad aminoacídica), resultado de la sustitución de una base nucleotídica y que varía en su posición en las distintas cepas (datos no mostrados).

En el contexto de las cepas de *Pdd*, destaca la presencia de un gen que parece transcribirse en la misma dirección que *tbpD* y cuya proteína mostró un 33% de identidad aminoacídica con la proteína Vep07 de *V. vulnificus* (Figura 4.27). El análisis comparativo de los contextos genéticos de los homólogos de TbpD en miembros de la familia *Vibrionaceae*, desveló que la cepa de *P. carnosum* presentaba también un homólogo a la proteína Vep07 de RM-71 (70% de identidad aminoacídica) y mantenía la organización genética de proximidad entre los genes *tbpD* y *vep07*. Sin embargo, los genes que codifican para Vep07 en las dos cepas de *V. vulnificus* analizadas (CECT4999 y VV180806) están alejados del gen *tbpD* y su posición no está conservada entre ellas (Figura 4.28). Mientras que en la cepa CECT4999 el gen *vep07* se localiza corriente arriba del gen *tbpD* y se transcribe en la misma dirección, en la cepa VV180806, el gen Vep07 se localiza corriente abajo y se transcribe en dirección contraria al gen *tbpD* (Figura 4.28).



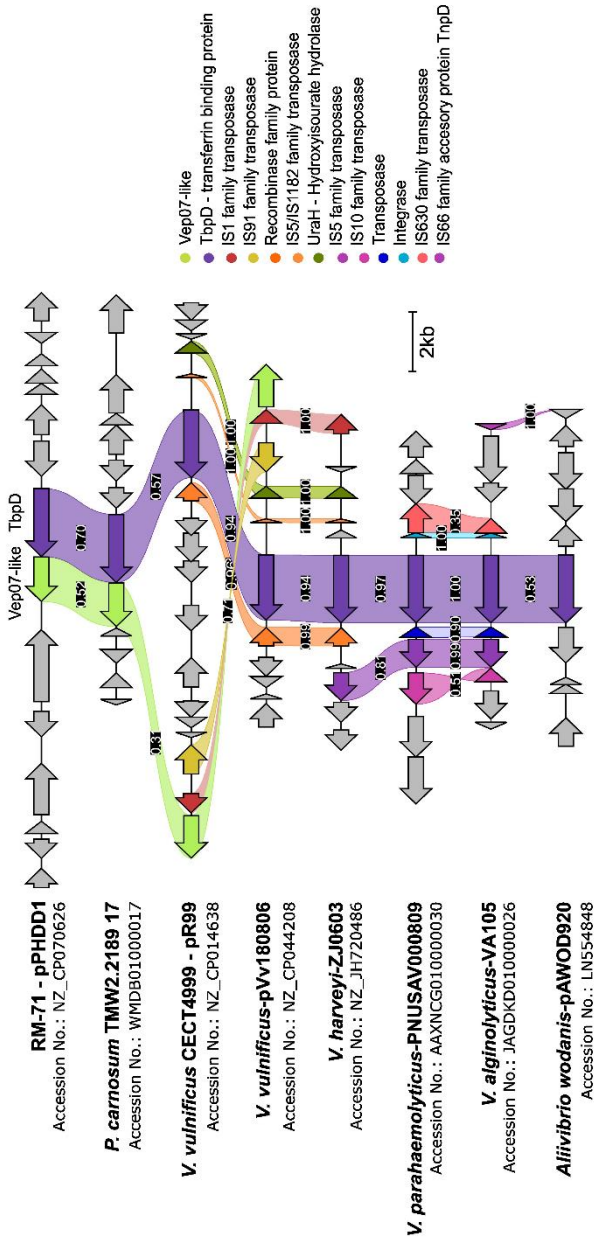


Figura 4.28 Análisis comparativo del contexto genético de los homólogos de TbpD en especies de la familia *Vibrionaceae*. La visualización de los contextos se realizó utilizando la herramienta Clinker. En el centro se indican los valores de identidad aminoacídica. Los números de acceso al GenBank se indican debajo del nombre de cada cepa.

La proximidad de estos dos genes en el genoma de *Pdd*, con una distancia intergénica de sólo 23 pares de bases, sugiere que ambos genes podrían cotranscribirse desde un mismo promotor. Para demostrar esta hipótesis se realizó un experimento de RT-PCR (PCR de transcripción inversa) utilizando los cebadores listados en la Tabla 3.5. Como se muestra en la Figura 4.29, la amplificación obtenida para las combinaciones A y B, demuestra que *tbpD* y *vep07* se cotranscriben a partir de un único promotor situado aguas arriba de *tbpD*. Este resultado sugiere que la cotranscripción de *tbpD* y *vep07*-like es una característica conservada de las cepas de *Pdd* portadoras del plásmido de virulencia pPHDD1 y anecdóticamente, de la cepa de *P. carnosum* identificada en la base de datos BLASTP.

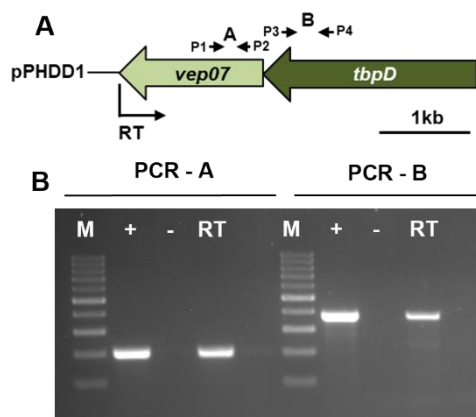


Figura 4.29 Análisis RT-PCR de la cotranscripción de los genes *tbpD* y *vep07* en la cepa RM-71. (A) Mapa genético de *tbpD* y *vep07* en el que se indican los cebadores para la transcripción inversa (RT) y la amplificación mediante PCR (A, B). La secuencia de los cebadores se detalla en la Tabla 3.5. (B) Análisis electroforético de los productos resultantes de la reacción RT-PCR y de los controles (+: ADN genómico; -: control negativo, RT: reacción estándar de RT).

Además, para descartar efectos polares en la expresión de *vep07* derivados de la mutación del gen *tbpD*, realizamos un análisis RT-PCR en la cepa mutante  $\Delta$ *tbpD* (Figura 4.30). La amplificación resultante dio lugar a amplicones del tamaño esperado, demostrando que la mutación del gen *TbpD* no ejerce ningún efecto polar en el gen *vep07*.

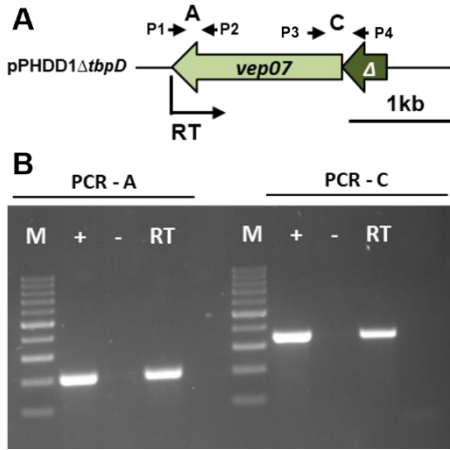


Figura 4.30 Análisis RT-PCR para confirmar la ausencia de efectos polares en la cepa RM-71 mutante para TbpD ( $\Delta tbpD$ ) (A) Mapa genético de  $\Delta tbpD$  en el que se indican los cebadores utilizados para la transcripción inversa (RT) y la amplificación mediante PCR (A, C). La secuencia de los cebadores se muestra en la Tabla 3.5. (B) Análisis electroforético de los productos resultantes de la reacción RT-PCR y de los controles (+: ADN genómico; -: control negativo, RT: reacción estándar de RT).

Aunque no se ha llegado a identificar el ligando específico de unión al receptor TbpD de RM-71, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que TbpD es una proteína de membrana externa regulada por hierro y necesaria para el crecimiento de *Pdd* en sangre y plasma de peces, probablemente a través de la unión a una proteína quelante de hierro.

La severa afectación del mutante para el gen *tbpD* en la virulencia para rodaballo, pero no para lubina, sugiere que TbpD podría ser un factor de virulencia específico de hospedador. En base a los resultados obtenidos, hipotetizamos que esta disparidad en la virulencia podría estar respaldada por diferencias en la capacidad del mutante para colonizar los órganos internos de rodaballo y lubina. Para demostrarlo realizamos un experimento de colonización competitiva a través de la inoculación intraperitoneal de una mezcla en proporción 1:1 de la cepa salvaje y de la cepa mutante en rodaballo y lubina. En línea con lo esperado, el mutante mostró una clara desventaja con respecto a la cepa salvaje para colonizar los órganos internos del rodaballo, resultado que apoya la severa afectación de  $\Delta tbpD$  en la virulencia para esta especie. Teniendo en cuenta que la cepa  $\Delta tbpD$  no mostró diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje en la virulencia para lubina, sería esperable que el mutante presentase entonces una capacidad similar a la cepa salvaje para colonizar los órganos internos del pez.

Sin embargo, aunque el número de colonias recuperadas del mutante fue mayor en el bazo que en el riñón, encontramos que la cepa mutante sigue estando en clara desventaja con respecto a la cepa salvaje en su capacidad para colonizar los órganos internos de la lubina. En este caso hipotetizamos que la función del bazo de los peces como reservorio de eritrocitos, podría reducir la presión selectiva sobre la captación de hierro quelado del hospedador, resultando en una menor afectación del mutante en la colonización del bazo con respecto al riñón. Además, se comprobó que la mutación del gen *tbpD* no altera la capacidad hemolítica de la cepa con respecto a la cepa salvaje, de manera que la cantidad de hemoglobina liberada del bazo podría suponer una condición menos restrictiva para la colonización de este órgano por *Pdd*. Sin embargo, desconocemos los motivos por los cuales la competitividad del mutante con respecto a la cepa salvaje es mayor en el bazo de lubina que en el del rodaballo y si esta diferencia podría explicar que el mutante siga siendo virulento para lubina.

El análisis *in silico* de TbpD en las cepas de *Pdd* reveló que tanto la secuencia aminoacídica como su contexto genético están altamente conservados en esta subespecie. Mediante RT-PCR demostramos que *tbpD* se cotranscribe con un gen para una proteína homóloga a Vep07 de *V. vulnificus* y que denominamos *vep07-like*. Además, en el transcurso de este trabajo se han encontrado homólogos a TbpD en plásmidos de otras especies patógenas como *V. vulnificus* (pVvbt2), *V. harveyi* (pVh1) y *A. wodanis* (pAWOD920). Para este último, todavía no caracterizado, hemos identificado un conjunto de genes *tra*, sugiriendo que se trata de un plásmido transferible.

La presencia de homólogos a TbpD en plásmidos conjugativos de vibrios patógenos sugiere que la adquisición de estos replicones por transferencia genética horizontal podría favorecer la persistencia de determinadas cepas o líneas clonales en el ambiente. En concordancia con esta observación, aunque la mayoría de los brotes de *Pdd* en piscifactorías son causados por poblaciones multiclonales, existen evidencias que sugieren que clones altamente virulentos (es decir, portadores del plásmido pPHDD1) pueden convertirse ocasionalmente en clonales.

Este parece ser el caso de una serie de brotes ocurridos entre 1987 y 1989 en piscifactorías de rodaballo en Galicia, en los cuales todos los aislados de la misma granja eran positivos para el plásmido pPHDD1 y estaban relacionados antigénicamente (Fouz *et al.*, 1992).

Además, el análisis comparativo del contexto genético de estos homólogos reveló que la cotranscripción de *tbpD* y *vep07-like* es una característica conservada de los aislados de *Pdd* y aunque se desconoce la función que ejerce Vep07-like en *Pdd*, este hallazgo sugiere la existencia de una posible asociación funcional entre ambas proteínas. Aunque todavía queda mucho por investigar, podemos decir que TbpD constituye un nuevo mecanismo de adquisición de hierro en aquellas cepas de *Pdd* portadoras del plásmido pPHDD1 y su existencia enfatiza una vez más el papel del hierro en la virulencia de este versátil patógeno marino.

### **4.3. DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DEL PLÁSMIDO *VIBRIOEXPRESS* (pVIBEXP): UN NUEVO VECTOR MODULAR PARA LA MANIPULACIÓN GENÉTICA DE VIBRIOS Y LA EXPRESIÓN DE GENES**

Como se ha visto a lo largo de la introducción de esta tesis, gran parte del conocimiento sobre la fisiología y la virulencia de *Pdd* se ha obtenido a través del uso de técnicas de ingeniería genética. Para el desempeño de estas metodologías, los vectores plasmídicos se constituyen como herramientas moleculares esenciales, siendo ampliamente utilizadas para la manipulación genética de las bacterias marinas (Zeaiter *et al.*, 2018). En el caso concreto de *Pdd*, observaciones obtenidas a lo largo de los años en el laboratorio sugieren que los vectores utilizados en la actualidad para la ingeniería genética de *Pdd* son, en muchos casos, poco eficientes, inestables y requieren de la adición de antibióticos que, en algunos casos, conducen a la selección de mutantes espontáneos y/o interfieren en el desempeño de determinados ensayos. Las limitaciones observadas nos motivaron, en la presente tesis, a construir un vector modular como nueva herramienta para la ingeniería genética de *Pdd* y cuyo uso pudiese extenderse a otras bacterias marinas pertenecientes a la familia *Vibrionaceae*.

En cuanto a la construcción del vector pVibexp, las secuencias correspondientes a los módulos: (1) origen de transferencia (*oriT*) del tipo R6K/RP2 (obtenido de los plásmidos pSEVA), (2) promotor y péptido señal de *P. damselae* subsp. *damselae*, (3) la cola de histidina (6-HisTag) y los terminadores T1 y T2 del gen *rrnB* (obtenidos del plásmido pTrc-His2A) y por último (4), la secuencia correspondiente al sitio de clonación múltiple (MCS) (del plásmido pWKS30), se diseñaron *in silico* mediante el programa SnapGene v4.1.9.

A esta secuencia de ADN de 1895 pb se le añadió en sus extremos la secuencia diana de NheI, y la molécula completa resultante se sintetizó químicamente y se clonó en la posición EcoRV del vector pUC57-Simple (Amp<sup>R</sup>) (GenScript). La construcción obtenida se transformó por choque térmico en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, que se seleccionaron en TSA-Amp (resistencia conferida por el vector pUC57-Simple) dando lugar al clon pAVZ185 (pUC57-Vibexp). A continuación, la secuencia de ADN correspondiente al vector pVibexp se marcó mediante la clonación del gen de resistencia a cloranfenicol (*cat*), en el sitio BamHI del MCS. Este gen se amplificó desde el plásmido pKD3 con los cebadores indicados en la Tabla 4.2 (PC3 Y PC4). La ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes que se seleccionaron en TSA-Cm20. De los clones transformantes positivos, se decidió continuar el procedimiento con el clon pAVZ190.

La secuencia de la plataforma, marcada con el gen de resistencia a cloranfenicol, se liberó del plásmido pAVZ190 (pUC57-Vibexp-Cm<sup>R</sup>) mediante el corte con NheI y se ligó con el *oriV* del plásmido pPHDP10 amplificado con los cebadores PC1 y PC2 (OriV\_NheI\_F y R, respectivamente) desde la cepa DI-21. La selección de los transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  se realizó en placas de TSA-Cm20 y las colonias crecidas se sembraron en TSA-Amp para verificar la pérdida de la secuencia correspondiente al pUC57-Simple. Aquellos clones que crecieron en TSA-Cm20, pero no en TSA-Amp, fueron confirmados por PCR, dando lugar al clon pAVZ192.

A continuación, este plásmido se transformó por choque térmico a la cepa de *E. coli*  $\beta$ -3914 auxótrofa para DAP dando lugar al clon AVZ198. El esquema ilustrativo del proceso de construcción del vector pVibexp se muestra en la Figura 4.31.

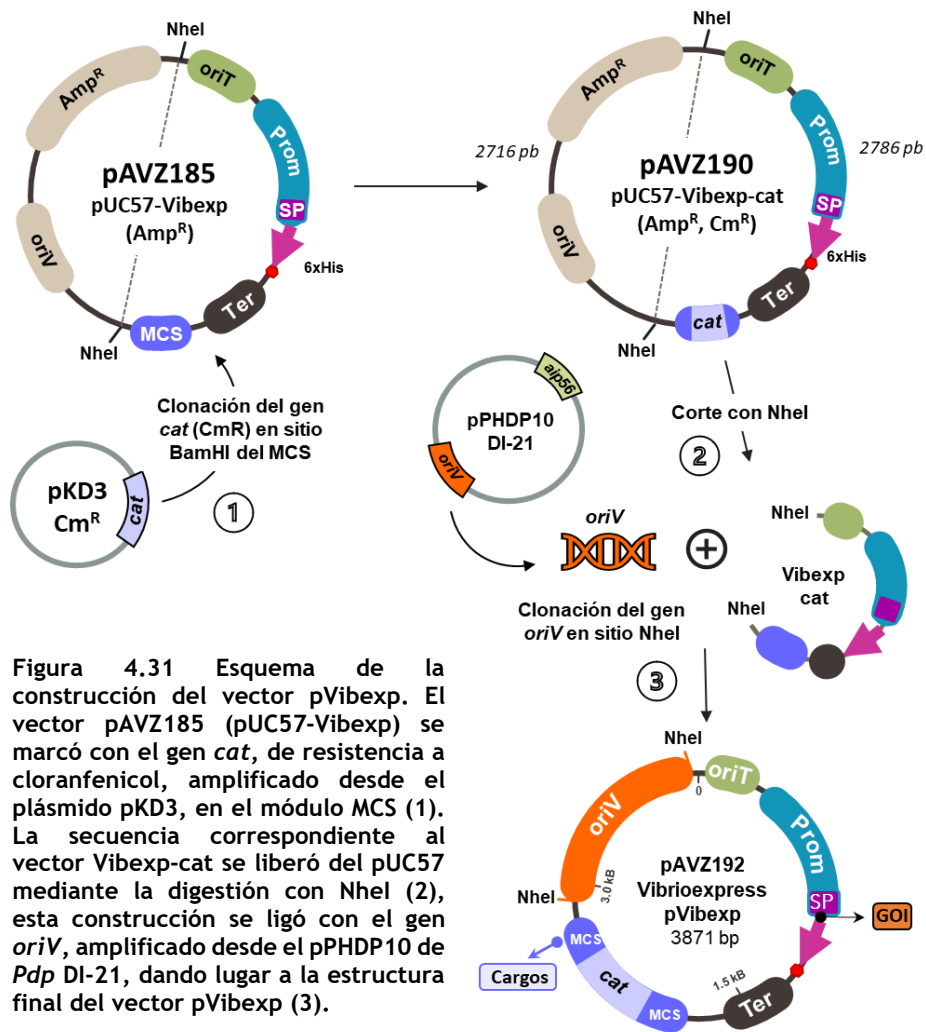


Figura 4.31 Esquema de la construcción del vector pVibexp. El vector pAVZ185 (pUC57-Vibexp) se marcó con el gen *cat*, de resistencia a cloranfenicol, amplificado desde el plásmido pKD3, en el módulo MCS (1). La secuencia correspondiente al vector Vibexp-*cat* se liberó del pUC57 mediante la digestión con NheI (2), esta construcción se ligó con el gen *oriV*, amplificado desde el pPHDP10 de *Pdp* DI-21, dando lugar a la estructura final del vector pVibexp (3).

Tabla 4.2 Cebadores utilizados para la construcción y *screening* de las plataformas pVibexp y pA-162-Vibexp

Código	Nombre	Secuencia (5'-3')*	Amplificón (pb)	
			A	B
<b>Screening del vector pVibexp (A) y pA-162-Vibexp (B)</b>				
P1	Check_Vibexp_F	GGTTATATGGACATTTACTT	3013	4796
P2	OriV_Seq_R	TTGATTGCCTTTTCGGCTGCG		
P3	Prom+ps_primer_check_R	CGAGCCTCATCTATACATTC	2197	4146
P4	M13_F	GTTTTCCAGTCACGAC		
P5	oriT_pSEVA_F	CTTTTCCGCTGCATAACCCT	1240	1240
P6	Check_Vibexp_R	TCTCATCCGCCAAAACAGCC		
P7	M13_R	CAGGAAACAGCTATGACCAT	573	573
P8	Cat_int_R	ATCCCATATCACCAGCTCAC		
P9	rrnB_pVibexp_Seq_F	GGGCCTTTCGTTTTATCTGT		
P10	rrnB_pVibexp_check_R	ACAGATAAAAACGAAAGGCC		
<b>Clonación de módulos intercambiables - oriV y marcadores de resistencia Ab<sup>R</sup></b>				
PC1	oriV_NheI_F	gcGCTAGCccaccagaaaactcctcata	1090	
PC2	oriV_NheI_R	gcGCTAGCggtcaggatctttggatgat		
PC3	Cat_BamHI_pkD3_F	gcGGATCCtacctgtgacggaagatcac	1080	
PC4	Cat_BamHI_pkD3_R	gcGGATCCggaactcatttaaatggcg		
PC5	Kan_BamHI_pkD4_F	gcGGATCCtagaaagccagtcgccagaa	1202	
PC6	Kan_BamHI_pkD4_R	gcGGATCCgaagcccaacctttcataga		
<b>Construcción y screening de la plataforma pA-162-pVibexp</b>				
PC7	Contig_Pd_F	GGTCTTCGGGAAAATGACGT	152	
PC8	Contig_Pd_R	TGTCTTTACCCTTTTCGGGC		
PC9	InverseA_NheI_pA-162_F	gcgGCTAGCtgtcgtgtgcttagggatt	2864	
PC10	InverseA_NheI_pA-162_R	gcgGCTAGCgggcacgacgattaaacaaac		
PC11	InverseB_NheI_pA-162_F	gcgGCTAGCtgatcccgtagtgcgtgaaa	2864	
PC12	InverseB_NheI_pA-162_R	gcgGCTAGCgtgttcgctgaaaattaacg		
PC13	pPHDP10-Like_ORF_1_F	GTTCTATGGTTCGTCTGT	423	
PC14	pPHDP10-Like_ORF_2_R	TCTGTTCGTGTTTTCCCTGC		
<b>Clonación y screening del gen <i>dly</i> de <i>P. damselae</i> subsp. <i>damselae</i></b>				
PC13	Dly_NdeI/NsiI_F	CTCAAATGCATATGCTTTTacacaa	1688	
PC14	Dly_NdeI_R	CTACCGTACATATGgttattaatatcttt attha		
PC15	Dly_Int_F	CTCCTATGGGACATGAATGG	390	
PC16	Dly_Int_R	GCTCTAGGCTAAATGAATC		
<b>Clonación y screening del gen <i>dly-like</i> de <i>Pseudoalteromonas citrea</i></b>				
PC17	Dly-like_NdeI/NsiI_F	CTCAAATGCATATGCTTTTcaattaggt ggcgggtg	1221	
PC18	Dly-like_NdeI_R	CTACCGTACATATGtggaaacttgcfaat cagtag		
PC19	Dly-like_int_F	CTTTATGCGCGTTATGACG	240	
PC20	Dly-like_int_R	GACCAACCAAGCTGTTTACG		
<b>Clonación y screening de "cargos" en el MCS</b>				
PC21	Dly-like_EcoRI_F	gcGAATTCggcttctactctagcgcga	1967	
PC22	Dly-like_EcoRI_F	gcGAATTCgtcgtagcaggtttcgtg		
PC23	TbpD_Comp_Apal_F	gcGGGCCcagcatcatcaccacctccat	2846	
PC24	TbpD_Comp_Apal_R	gcGGGCCccaattaagcctccaat		

\* La secuencia coloreada marca las dianas de restricción incluidas en la secuencia del cebador.

#### 4.3.1. Descripción de los módulos que constituyen el plásmido pVibexp

Para que un plásmido pueda ser transformado y seleccionado en el organismo hospedador, este debe cumplir con una serie de características esenciales: el vector debe ser replicativo y seleccionable y, si además es movilizable, puede ser introducido en la célula hospedadora mediante conjugación. Para cumplir con estos requisitos, el vector construido, que se denominó Vibrioexpress (pVibexp), está compuesto por 5 módulos funcionales, de los cuales, el origen de replicación (*oriV*) y el marcador de antibiótico ( $Ab^R$ ), son además módulos intercambiables, flanqueados por sitios de restricción NheI y BamHI, respectivamente (Figura 4.32).

El primer componente esencial de cualquier vector, es el origen de replicación (*oriV*), que deber ser reconocido por la maquinaria de replicación celular y que determina el número de copia del plásmido en las células del hospedador bacteriano (Nora *et al.*, 2019). Como se mencionó anteriormente, para la construcción del vector pVibexp, se seleccionó el origen de replicación del plásmido pPHDP10 de la cepa de *P. damsela* subsp. *piscicida* (*Pdp*) DI-21. Este plásmido, de casi 10 kB, codifica para el principal factor de virulencia de *Pdp*, la toxina AIP56, siendo un determinante clave de la patogenicidad de esta subespecie (Do Vale *et al.*, 2005).

La región mínima de *oriV* necesaria para la replicación de este plásmido, de unas 1080 pb, fue identificada previamente (Osorio CR, no publicado) y constituye el elemento base de nuestra plataforma (corresponde a las posiciones nucleotídicas 20-1100 de la secuencia depositada en GenBank con número de acceso NZ\_AKYG01000457). Cabe señalar que cuando se demostró por primera vez la funcionalidad de este *oriV* mínimo, los mecanismos que controlaban su replicación eran todavía desconocidos. Sin embargo, investigaciones publicadas casi de manera simultánea años después (Le Roux *et al.*, 2011; Pan *et al.*, 2010), permitieron clasificar a pPHDP10 como integrante de una nueva familia de plásmidos, cuya presencia se restringía a la familia *Vibrionaceae*.

Una de las principales características de esta nueva familia de plásmidos es que su mecanismo de replicación depende de dos moléculas de ARN, razón por la cual fueron bautizados como plásmidos MRB (Marine RNA-based) (Le Roux *et al.*, 2011). No obstante, dada la semejanza de este sistema dependiente de RNA, con el sistema de replicación Col-E1 de *E. coli*, otros autores designaron a estos replicones como plásmidos CLV (ColE1-like *Vibrionaceae*) (Pan *et al.*, 2010).

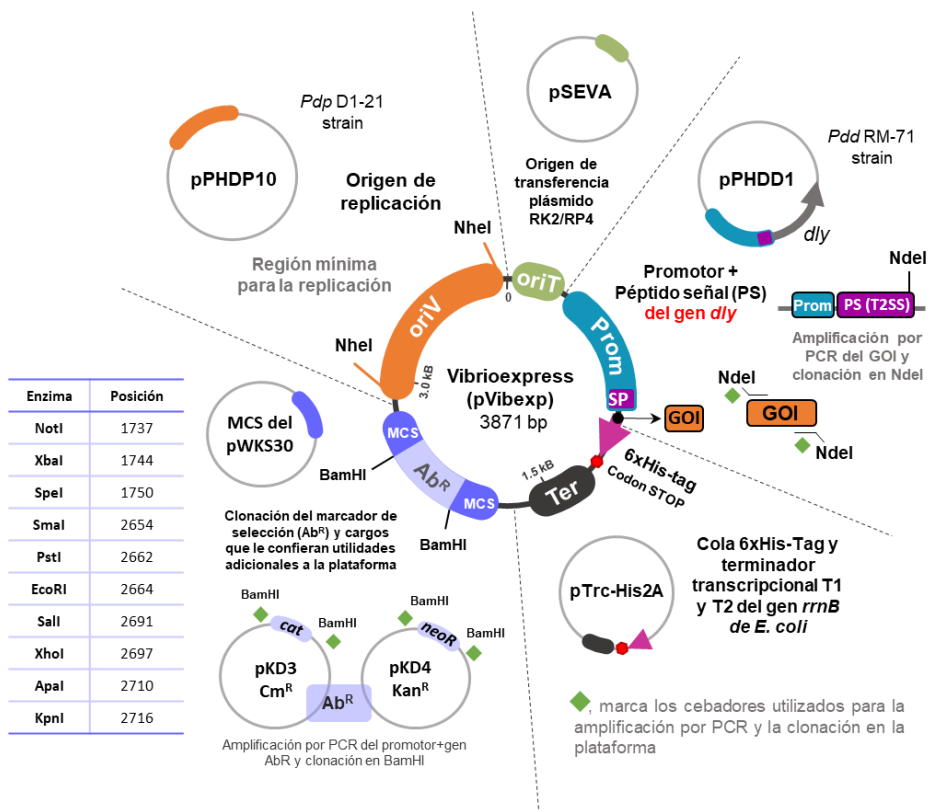


Figura 4.32 Esquema en el que se muestra la estructura del vector pVibexp y la procedencia de cada módulo. El vector está compuesto por 5 módulos: un origen de replicación (*oriV*), un origen de transferencia (*oriT*), un promotor y un péptido señal para la clonación de GOIs, una cola His-Tag, un terminador transcripcional *rrnB* y un sitio de clonación múltiple (MCS) con numerosas enzimas de corte único. De estos módulos, el *oriV* (en naranja) y el marcador de selección (*Ab<sup>R</sup>*) (azul claro) son módulos intercambiables, flanqueados por *NheI* y *BamHI*, respectivamente.

Las particularidades de los replicones del tipo MRB hacen que el origen de replicación del plásmido pPHDP10 de *Pdp*, cumpla con una serie de características que lo hacen idóneo para el diseño de un vector. Las propiedades intrínsecas que motivaron a utilizar este *oriV* como armazón del vector diseñado fueron las siguientes:

- **Alto número de copia.** A pesar del amplio conocimiento sobre la heterogeneidad de *Pdd*, poco se sabe acerca de los sistemas que gobiernan la replicación de sus plásmidos o de su número de copia. Sin embargo, la visualización del plásmido pPHDP10 en un gel de agarosa sugiere que se trata de un plásmido de alto número de copia (dato no mostrado). Los plásmidos multicopia se utilizan ampliamente como vectores de expresión de proteínas ya que, cuanto mayor es el número de copia del plásmido, mayor es la expresión del gen diana (Rouches *et al.*, 2022). Esta propiedad del pPHDP10 nos motivó a utilizar su secuencia *oriV* como elemento base para el diseño de un vector de expresión.
- **Estabilidad.** Como se mencionó anteriormente, el plásmido pPHDP10 de *Pdp* codifica para la exotoxina AIP56, uno de los principales factores de virulencia de esta subespecie (Do Vale *et al.*, 2005). Investigaciones recientes en nuestro laboratorio evidencian que, a diferencia de otros plásmidos inestables, como el plásmido pPHDPT3, que codifica un sistema de secreción de tipo 3 (T3SS), el plásmido pPHDP10 constituye un elemento móvil altamente estable y prevalente, casi en un 100 %, en los aislados de la subsp. *piscicida* (Abushattal *et al.*, 2020, 2022). Además, en apoyo a esta enorme estabilidad, la organización genética del plásmido pPHDP10 está altamente conservada en los aislados de *Pdp* con independencia de su origen geográfico (Baseggio *et al.*, 2021).
- **Sensible a la temperatura.** Estudios previos han demostrado que la replicación de este plásmido es sensible a la temperatura, siendo su número de copia significativamente mayor a temperaturas de 30 °C con respecto a los 37 °C (Le Roux *et al.*, 2011). Aunque se desconoce la base genética de esta termorregulación, esta característica ofrece la posibilidad de utilizar este vector como replicón condicional en vibrios (Le Roux *et al.*, 2011).

- **Posibilidad de generar vectores compatibles con modificaciones mínimas en el *oriV*.** Le Roux *et al.*, (2011) demostraron que plásmidos de la misma familia con modificaciones mínimas en sus orígenes de replicación llegaban a ser compatibles. Esta inusual característica le proporcionaría una utilidad adicional al vector ya que, empleando plásmidos con regiones *oriV* mínimamente modificadas, se podrían coexpresar proteínas de interés e incluso regular su nivel de expresión. Con la finalidad de poder generar versiones de Vibexp modificadas en su *oriV*, la secuencia mínima utilizada fue flanqueada por un sitio de restricción NheI.

Además del origen de replicación (*oriV*), la ausencia de un protocolo de transformación en *Pdd*, requiere de la incorporación en pVibexp de un origen de transferencia (*oriT*) que permita la movilización del plásmido por conjugación. La secuencia para el *oriT*, de 246 pb, procedente del plásmido conjugativo RK2/RP4 de amplio rango de hospedadores, se seleccionó desde los plásmidos pSEVA (Silva-Rocha *et al.*, 2013).

Con el fin de obtener una región en la que clonar el marcador de selección, así como cualquier otro gen de interés, se incluyó el sitio de clonación múltiple (MCS) del plásmido pWKS30, que proporciona un amplio número de dianas de restricción de corte único en nuestro vector (Figura 4.32) (Rong Fu Wang & Kushner, 1991). En los extremos de este módulo, de 248 pares de bases, hibridan los cebadores universales M13, que se emplearon para la amplificación y secuenciación de los genes clonados. En el sitio BamHI del MCS, se clonó el segundo módulo intercambiable de nuestra plataforma, el marcador de resistencia a antibiótico ( $Ab^R$ ). Como se muestra en la Figura 4.32, las secuencias de ADN que codifican los marcadores de selección incluyen el gen estructural de resistencia al antibiótico ( $Ab^R$ ) y su promotor nativo. En este caso se incluyeron marcadores comúnmente utilizados en la selección de las bacterias Gram-negativas, como son el gen de resistencia a cloranfenicol (Cm, el gen *cat*, desde el plásmido pKD3; Datsenko & Wanner, 2000) y como opción alternativa, el gen de resistencia a kanamicina (Km, gen *kanR* desde el plásmido pKD4; Datsenko & Wanner, 2000).

De este modo, la secuencia MCS constituye un “módulo de carga”, que más allá de servir de punto de clonación para el marcador de resistencia ( $Ab^R$ ), le atribuye a este vector un sinfín de utilidades, como, por ejemplo, para la complementación genética mediante la clonación de genes con un promotor nativo, o para la clonación de “gadgets” adicionales, es decir, secuencias de ADN prescindibles pero que confieran una utilidad añadida a nuestra plataforma.

Estos módulos funcionales constituyen la versión inicial del vector pVibexp y como se verá más adelante, sirve de esqueleto para el diseño de una plataforma preliminar para la producción y secreción de proteínas y péptidos recombinantes en *P. damsela*.

#### **4.3.2. El vector pVibexp es replicativo en *E. coli* y puede movilizarse por conjugación a distintos vibrios**

Como se mencionó en la sección anterior, la funcionalidad de la secuencia *oriV* seleccionada para el vector pVibexp ya había sido demostrada con anterioridad en *E. coli* (Osorio CR, no publicados). Curiosamente, cuando este replicón mínimo, marcado con un gen de resistencia a cloranfenicol, se transformaba en *E. coli*, las colonias transformantes crecidas a 37 °C, eran negativas para el plásmido, sugiriendo que este replicón podría ser termosensible. En concordancia con estas observaciones, los estudios posteriores de Le Roux *et al.*, (2011), demostraron empíricamente que el número de copia para el *oriV* mínimo de un plásmido del tipo MRB de *V. cholerae* era mucho mayor cuando las células se cultivaban a 30 °C con respecto a los 37 °C. Por esta razón, durante el transcurso de este trabajo, se estableció una temperatura de 25 °C para la selección y crecimiento de los clones de *E. coli* transformantes con la plataforma pVibexp.

La transformación del plásmido Vibexp ( $Cm^R$ ) en *E. coli* dio lugar a clones que fueron positivos por PCR para el vector (Figura 4.33), demostrando que pVibexp es un vector seleccionable y replicativo en *E. coli*. Este paso inicial de transformación se realizó en la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , utilizada comúnmente en el laboratorio como cepa de almacenamiento de plásmidos. El siguiente paso consistió en demostrar la funcionalidad del origen de transferencia (*oriT*) del pVibexp.

Cabe mencionar que la ausencia de un protocolo de transformación en *Pdd*, hace que la transferencia por conjugación sea, por el momento, un paso indispensable para testar la funcionalidad de nuestro constructo en *P. damselae*. Para ello fue necesario transformar primero la plataforma pVibexp en dos de las cepas conjugativas más comúnmente empleadas en el laboratorio, la cepa de *E. coli* S-17-1- $\lambda$ -*pir* y la cepa  $\beta$ -3914, auxótrofa esta última para DAP.

El análisis por PCR de los clones transformantes de *E. coli* S-17-1- $\lambda$ -*pir* para el pVibexp, reveló que una proporción de las colonias seleccionadas presentaban amplicones de un tamaño mayor al esperado para la PCR P1+P2 (Figura 4.33B). La secuenciación de algunos de estos amplicones desveló la presencia de una secuencia de inserción IS1 en la region correspondiente al MCS. La inserción de este elemento transponible en una secuencia no funcional como el polilinker sugiere que esta mutación no confiere ninguna ventaja para la replicación del vector. Por el contrario, cuando pVibexp se transformó en la cepa de *E. coli*  $\beta$ -3914, no se detectó ningún evento de inserción en la secuencia del vector.

Estos resultados parecen indicar que la cepa de *E. coli* S-17-1- $\lambda$ -*pir* parece ser más propensa al salto de elementos de inserción en la secuencia del plásmido. En línea con estos hallazgos, el salto de elementos IS1 en plásmidos albergados en cepas  $\lambda$ -*pir* ya ha sido reportado previamente en otros vectores diseñados para la manipulación genética de bacterias Gram-negativas (pCVD442) (Philippe *et al.*, 2004). Dentro de los elementos de inserción de *E. coli*, el elemento IS1 parece ser el más activo, con una tasa de  $2.79 \times 10^{-5}$  transposiciones/generación (Sousa *et al.*, 2013). Sin embargo, los motivos por los cuales la cepa de *E. coli* S-17-1- $\lambda$ -*pir* parece ser más proclive al salto de elementos de inserción en la secuencia del pVibexp con respecto a la cepa de *E. coli*  $\beta$ -3914 son desconocidos y requieren de investigaciones adicionales.

La posibilidad de que se introduzcan estas secuencias IS en la plataforma pVibexp debe tenerse en cuenta ya que puede conducir a eventos de recombinación inespecífica que limiten la utilidad de nuestro vector (Philippe *et al.*, 2004). Dado que el uso de la cepa de *E. coli*  $\beta$ -3914 no pareció conducir a ningún evento de inserción en la secuencia

de pVibexp, esta se utilizó como cepa donadora de la plataforma en las posteriores conjugaciones. Como cepas receptoras se seleccionaron diversas cepas de *Pdd* (cepas RM-71 y LD-07), de *P. damsela* subsp. *piscicida* (cepas PP3, AQV27.1 y AQP18.1) y la cepa de *V. natriegens* CCUG16374. El análisis mediante PCR de los clones transconjugantes crecidos en TSA-1-Cm5, desveló que todos los clones eran positivos para la plataforma (Figura 4.33). Además, la integridad y la ausencia de elementos transponibles en los clones transconjugantes se verificó mediante PCR y secuenciación. Los resultados obtenidos demuestran que el plásmido pVibexp es un vector movilizable, fácil de introducir por conjugación en diversas cepas de vibrios.

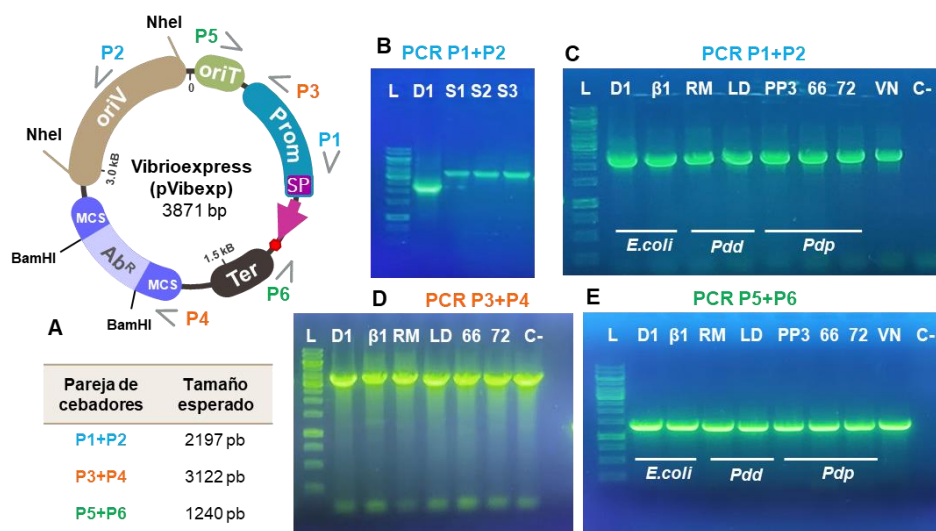


Figura 4.33 (A) Esquema de la estructura del plásmido pVibexp y los puntos donde hibridan los cebadores empleados en el análisis por PCR. El tamaño esperado de los amplicones se especifica en la tabla inferior. Electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados por PCR con las combinaciones P1+P2 (B, C), P3+P4 (D), P5+P6 (E) de los clones transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (D1), S-17- $\lambda$ -pir (S1, S2 y S3) y  $\beta$ -3914 ( $\beta$ 1) así como de los transconjugantes de *Pdd* RM-71 (RM) y LD-07 (LD), de *Pdp* (PP3, AQV27.1, AQP18.1) y de *V. natriegens* CCUG16374 (VN). C-, control negativo. L, marcador de peso molecular 1 Kb.

#### 4.3.3. El vector pVibexp permite la expresión y secreción eficiente de la fosfolipasa Dly en *P. damsela* subsp. *damsela* y en la subsp. *piscicida*

Una vez se demostró que el plásmido pVibexp modular es replicativo, seleccionable y movilizable a diversos vibrios, se testó su funcionalidad como vector de expresión de proteínas recombinantes.

Con este objetivo en mente, las secuencias correspondientes a un promotor fuerte y a un péptido señal nativo de *P. damsela* dependiente del sistema de secreción de tipo II (SST2) se incluyeron en el diseño de la plataforma. Se seleccionaron para dicho fin, el promotor y el péptido señal del gen *dly* codificador de la fosfolipasa Damselisina, por tratarse de un promotor de alto nivel de expresión (Matanza y Osorio, 2018), y por las evidencias de que esta toxina se secreta muy eficientemente por el SST2, tal y como hemos demostrado en nuestro estudio sobre la secreción de Dly al 1% de NaCl (ver “[Sección 4.1.7](#); Figura 4.15”). De esta manera, la clonación de un gen de interés (GOI, “*Gene of Interest*”) bajo el control de ambos componentes, dirigirá la secreción de la proteína diana al sobrenadante del cultivo, simplificando en gran medida los procedimientos posteriores de recuperación de la proteína.

Además, para facilitar la detección de la proteína mediante anticuerpos His-Tag así como la purificación con resinas quelantes, se adicionó en el diseño *in silico* una cola de polihistidina (6xHis) en el extremo C terminal de la proteína recombinante. Con el propósito de evitar la transcripción de secuencias adyacentes al GOI y de estabilizar el ARNm producido, se incluyeron los terminadores transcripcionales T1 y T2 del gen *rrnB* de *E. coli*, frecuentemente utilizados en los vectores de expresión. La secuencia correspondiente a la cola de polihistidina (6xHis) y al terminador transcripcional, se seleccionaron desde la secuencia del plásmido de expresión pTrcHis2A (Invitrogen) (Figura 4.32).

Una de las limitaciones principales de la producción de proteínas recombinantes en factorías microbianas, como *E. coli* o levaduras, es que las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas, pueden ser distintas a las que suceden en el hospedador original.

Por este motivo, la utilización de esta plataforma modificable, diseñada a la carta y con elementos nativos, nos ofrecería la posibilidad de producir las proteínas recombinantes en *P. damselae* como organismo factoría, lo que aportaría numerosas ventajas. En primer lugar, las proteínas y péptidos recombinantes se producirían en el mismo contexto celular nativo, de manera que se garantiza la introducción de aquellas modificaciones postraduccionales que aseguran la antigenicidad y funcionalidad de la proteína. En segundo lugar, el uso de un promotor fuerte y de un péptido señal del SST2, permite que la proteína/péptido recombinante producido sea secretado de manera eficiente al medio extracelular. Como mencionamos previamente, esto constituye una ventaja técnica considerable ya que minimiza la necesidad de romper las células y facilita los procesos posteriores de purificación. En tercer lugar, tenemos un conocimiento muy extenso acerca de los requerimientos nutricionales de las cepas de *Pdd* y *Pdp*, de manera que sería posible crecerlas en un medio mínimo con una composición definida y establecer aquellas condiciones óptimas para la producción de las proteínas de interés.

Para testar la funcionalidad de la plataforma pVibexp como vector para la expresión de proteínas recombinantes, y para demostrar que la inserción de un gen de interés (GOI) amplificado por PCR en el sitio NdeI mantiene intacta la pauta de lectura que permita la expresión del gen clonado, realizamos la primera prueba con un amplicón del propio gen *dly* nativo de *Pdd* RM-71, sin promotor ni péptido señal. Una de las ventajas de clonar una fosfolipasa es que su fenotipo es fácilmente testable y monitorizable en placas suplementadas con yema de huevo. Como se recoge en la Tabla 4.2, los cebadores para la clonación de cualquier gen de interés (GOI), llevan una secuencia universal que incluye la secuencia diana para la enzima de restricción NdeI/NsiI en el primer *forward*, y la secuencia para la diana NdeI en el cebador *reverse*.

La baja eficiencia de clonación obtenida en los primeros intentos en el sitio NdeI (datos no mostrados), llevó a introducir ciertas modificaciones en el diseño de los cebadores. Estas mejoras consistieron en la introducción de una grapa de 8 nucleótidos en el extremo 5' de la secuencia de reconocimiento de NdeI.

La incorporación de esta secuencia no palindrómica, cuyo análisis *in silico* no reveló la formación de dímeros de cebadores, mejoró considerablemente la eficiencia de corte y de clonaje del gen de la Damselisina. Por este motivo, se trasladó esta modificación a los cebadores diseñados para cualquier otro gen clonado en posición NdeI. Teniendo en cuenta estas secuencias universales, se diseñaron unos *primers* específicos para la clonación del gen *dly* en la plataforma pVibexp (Tabla 4.2).

El cribado inicial para la selección de los transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  positivos para la plataforma pVibexp+*dly* permitió visualizar un elevado porcentaje de clones con halo de fosfolipasa en placas de TSA-1-Cm20 suplementadas con yema de huevo (Figura 4.34B). Cabe destacar que este halo de actividad fosfolipasa empezó a visualizarse en *E. coli* a partir de las 72 h y en algunos clones incluso después de 5 días de incubación. Estos resultados ponen de manifiesto una de las desventajas principales del uso de *E. coli* como factoría microbiana de proteínas recombinantes: la limitada capacidad de su maquinaria de transporte para secretar proteínas al medio extracelular. Lo mismo sucedió cuando la plataforma se transformó en la cepa conjugativa de *E. coli*  $\beta$ -3914, donde el número de clones con actividad fosfolipasa fue incluso menor (datos no mostrados).

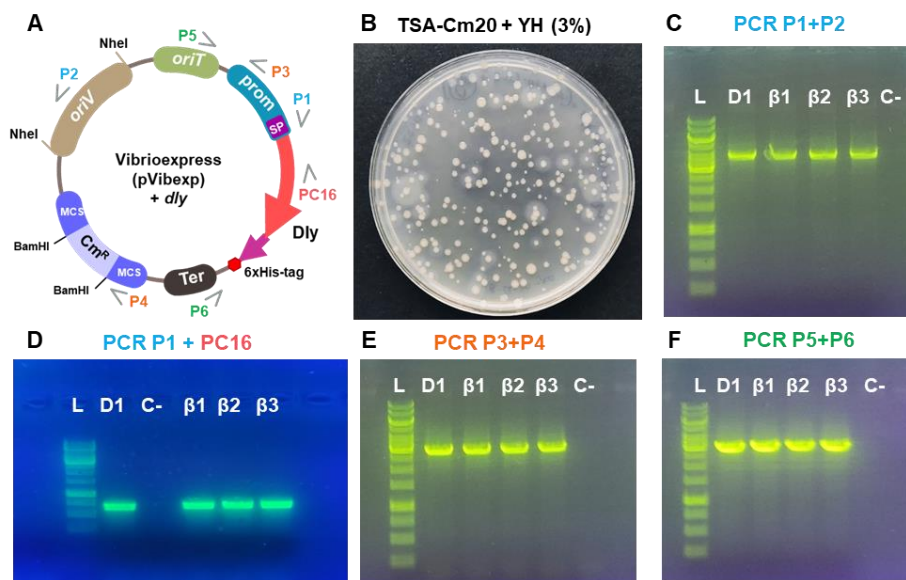
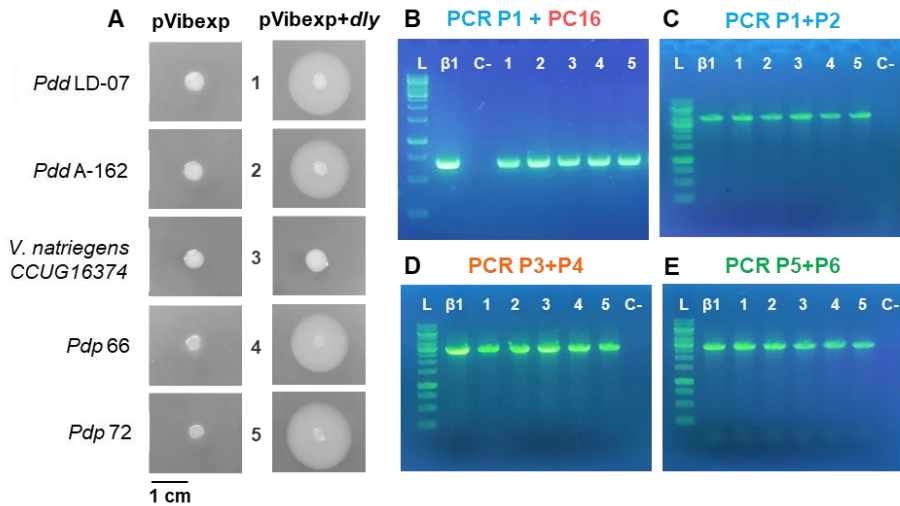


Figura 4.34 (A) Esquema en el que se muestra la estructura del constructo pVibexp+dly y los puntos donde hibridan los cebadores empleados en el análisis por PCR. El tamaño esperado de los amplicones se especifica en la Tabla 4.2. (B) Fotografía de los clones transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  del plásmido pVibexp+dly en placas de TSA-1-Cm20 suplementadas con yema de huevo (YH) (3 %). Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR de los clones transformantes de *E. coli* DH5 $\alpha$  (D1) y B-3914 ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2 y  $\beta$ 3) con las combinaciones (C) P1+P2, (D) P1+PC16, (E) P3+P4 Y (F) P5+P6. C-, control negativo. L, marcador de peso molecular 1 Kb.

A continuación, la plataforma pVibexp+dly se movilizó por conjugación a *V. natriegens* y a diversas cepas de *P. damsela*e. En este caso, como cepas receptoras se seleccionaron aquellas a las que se había transferido previamente la versión vacía del vector pVibexp y que además, eran negativas o presentaban una baja actividad fosfolipasa. Como se muestra en la Figura 4.35A, los transconjugantes de *Pdd* y *Pdp* obtenidos para el pVibexp+dly, presentaron una elevada actividad fosfolipasa en comparación con los clones transconjugantes para el vector vacío (pVibexp). El análisis por PCR con los cebadores específicos para la plataforma y para el gen *dly*, constató la presencia del constructo en todos los clones analizados (Figura 4.35).

Este resultado demuestra que el vector pVibexp es un vector funcional para la producción y secreción de la toxina Dly en varias cepas de *P. damsela*.



**Figura 4.35** (A) Fotografía representativa de la actividad fosfolipasa de los clones transconjugantes de *Pdd*, *Pdp* y *V. natriegens* para el pVibexp y pVibexp+dly en placas de TSA-1-Cm5 suplementadas con yema de huevo (YH) (3 %) tras 24 h de incubación. Electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados por PCR de los transconjugantes de *Pdd* A-162 (1) y LD-07 (2), de *V. natriegens* CCUG16374 (3), de *Pdp* AQP27.1 (4), AQP18.1 (5) con las combinaciones (B) P1+PC16, (C) P1+P2, (D) P3+P4 Y (E) P+P6. Los tamaños esperados se especifican en la tabla X. C-, control negativo. L, marcador de peso molecular 1 Kb.

Curiosamente, como se muestra en la Figura 4.35A, los clones de *V. natriegens* CCUG16374, positivos para el constructo pVibexp+dly, no presentaron halo de degradación de fosfolípidos. Este hallazgo resulta sorprendente ya que varios estudios recientes han descrito a *V. natriegens* como un prometedor organismo factoría para la producción de proteínas recombinantes (Xu *et al.*, 2021; 2022).

Esta ausencia de actividad fosfolipasa podría atribuirse a una sobrecarga de la maquinaria de secreción de *V. natriegens* y que podría estar conduciendo a la retención de la proteína Dly recombinante (rDly) en el citoplasma. De hecho, aunque la secreción Sec-dependiente se utiliza muy ampliamente en las estrategias de producción de proteínas

recombinantes secretadas, existen ejemplos en los que el translocón Sec se bloquea, provocando la acumulación de proteína diana e incluso toxicidad celular (Feilmeier *et al.*, 2000). Cabe destacar que, la presencia del vector pVibexp+dly en *V. natriegens*, no parece influir en el crecimiento de la cepa, de manera que esta posible acumulación de proteína recombinante no estaría alterando la viabilidad celular.

En lo que respecta a los transconjugantes de *P. damsela* subsp. *piscicida*, un estudio previo ha demostrado que las cepas receptoras AQV27.1 y AQP18.1 son positivas por PCR para los marcadores del plásmido pPHDP10 (Abushattal *et al.*, 2020). Teniendo en cuenta que el origen de replicación del plásmido pVibexp procede del plásmido pPHDP10 y considerando el principio de incompatibilidad plasmídica, sería esperable que al ejercer presión selectiva con antibiótico la plataforma pVibexp se mantuviese en los transconjugantes, provocando la curación del plásmido pPHDP10. Sin embargo, todos los transconjugantes analizados de ambas cepas de *Pdp*, fueron positivos para el gen *aip56*, indicando la presencia del plásmido pPHDP10 (Figura 4.36A). Cabría esperar entonces que estos clones fuesen negativos para el pVibexp, sin embargo, el análisis por PCR reveló que algunos clones eran positivos para los módulos de la plataforma (Figura 4.36 B y C), sugiriendo la posibilidad de que ambos plásmidos estuviesen coexistiendo en algunos clones.

Teniendo en cuenta que, replicones del tipo MRB con modificaciones mínimas en la secuencia del RNAI del *oriV* podrían coexistir (Le Roux *et al.*, 2011), sería posible que, al forzar la selección por antibiótico, y a costa de no perder el plásmido pPHDP10, la secuencia *oriV* del pVibexp estuviese sufriendo alguna mutación puntual, que permita la coexistencia de ambos plásmidos. Sin embargo, al margen de aquellos clones en los que parecían coexistir el plásmido pVibexp y el plásmido pPHDP10, otros clones transconjugantes fueron negativos para la amplificación de la región correspondiente al *oriV* del pVibexp (Figura 4.36B), sugiriendo la presencia de reorganizaciones en la estructura del plásmido o de una posible integración.

Curiosamente, a pesar de estas posibles reorganizaciones, aquellos clones de *Pdp* positivos para el constructo pVibexp+dly, mostraban una fuerte actividad fosfolipasa, sugiriendo que los módulos determinantes para la expresión y secreción de la Damselisina, estaban intactos, resultado que además fue confirmado por PCR (datos no mostrados).

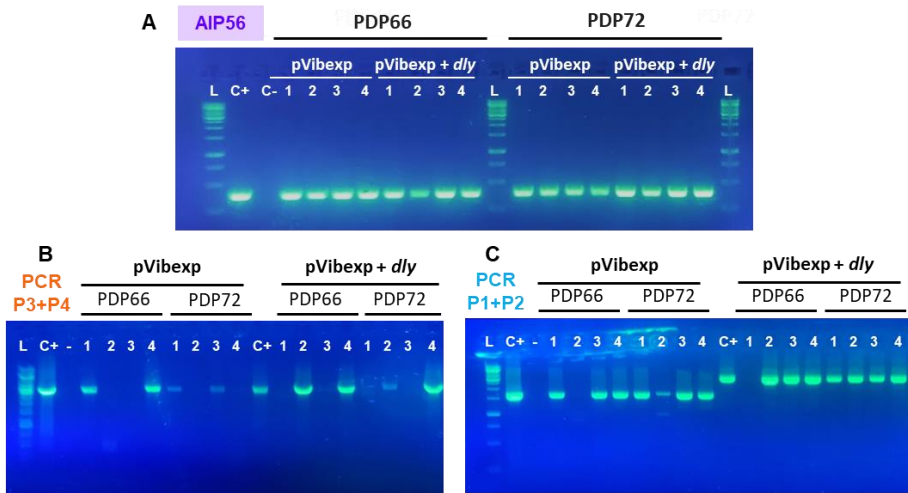


Figura 4.36 Electroforesis en gel de agarosa de los clones transconjugantes (1-4) de *P. damselae* subsp. *piscicida* AQV27.1 (PDP66) y AQP18.1 (PDP72) para el vector pVibexp y para el vector pVibexp+dly amplificados por PCR con los cebadores específicos para la toxina *aip56* codificada en el plásmido de virulencia pPHDP10 (A), con las combinaciones P3 y P4 (B) y combinaciones P1 y P2 (C).

Estos resultados constatan una vez más, la enorme estabilidad que muestra el plásmido pPHDP10, altamente prevalente en los aislados de *Pdp* (Abushattal *et al.*, 2020) y cuya estructura está altamente conservada en los distintos aislados (Baseggio *et al.*, 2021).

#### 4.3.4. Construcción del vector pA-162-Vibexp, un vector de clonación basado en un plásmido MRB-like nativo de *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

Los estudios simultáneos de Pan *et al.*, (2010) y de Le Roux *et al.*, (2011), demostraron la presencia de replicones del tipo MRB (Marine RNA-based) en diversos miembros de la familia *Vibrionaceae*. Sin embargo, desde estos trabajos solo un plásmido MRB adicional ha sido descrito recientemente en un aislado de *V. cholerae* (Ceccarelli *et al.*, 2017) y a día de hoy, no se ha reportado la presencia de plásmidos de esta familia en ninguna cepa de *Pdd*.

Con el fin de investigar la presencia de replicones del tipo MRB en los genomas de *Pdd* depositados en la base de datos NCBI, se realizó una búsqueda BlastN introduciendo como *query* la secuencia mínima correspondiente al origen de replicación del plásmido pPHDP10 de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Esta búsqueda desveló la presencia de regiones homólogas a este *oriV* en dos cepas de *P. damsela* subsp. *damsela*: la cepa A-162 y la cepa TW250/03.

La secuencia identificada en el genoma de la cepa A-162 (2863 pb) (Contig\_53; [LZFN01000155.1](#)), presentaba una región homóloga al *oriV* mínimo de pPHDP10, así como dos ORFs para proteínas hipotéticas y que denominamos ORF1 (636 pb) y ORF2 (405 pb). Para cerrar esta secuencia y verificar su naturaleza circular, se diseñaron unos cebadores en los extremos del cóntigo (PC7 y PC8, Tabla 4.2) y el amplicón resultante de la PCR se analizó por secuenciación de Sanger. El resultado obtenido permitió confirmar que la secuencia identificada en el genoma de la cepa de *Pdd* A-162 constituye un plásmido del tipo MRB.

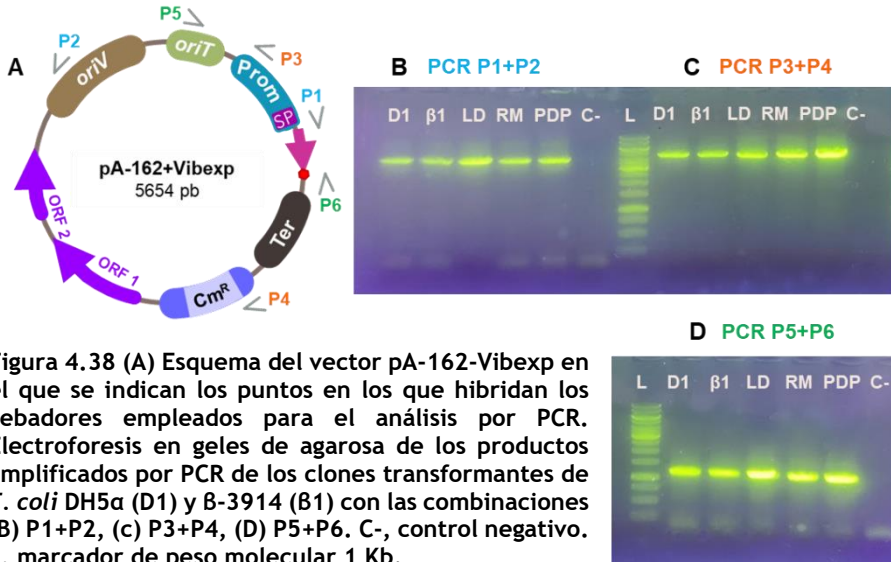
La secuencia de este plásmido nativo, que se denominó pA-162, se utilizó para diseñar un vector de expresión. Para ello, la secuencia completa de pA-162 se amplificó mediante PCR inversa con dos parejas de cebadores diseñados en distintas posiciones intergénicas del plásmido: PC9 y PC10 (diseñados entre la ORF2 y la región *oriV*); PC11 y PC12 (entre el *oriV* y la ORF1).

El producto resultante de la amplificación con la segunda pareja de cebadores, se clonó en la construcción Vibexp-CmR, previamente liberada con NheI desde la molécula AVZ190 (pUC57-Vibexp-CmR). Esta clonación dio lugar a un nuevo vector, que se denominó pA-162-Vibexp (Figura 4.37) (pAVZ368) compuesto por diversos módulos: un origen de replicación del tipo MRB, las dos ORFs de función desconocida codificadas en la secuencia del plásmido nativo de *P. damsela*e y el resto de módulos procedentes de la secuencia correspondiente al plásmido pVibexp (*oriT*, promotor y péptido señal dependiente del SST2, terminador, polilinker y marcador de resistencia a cloranfenicol).

La transformación de este vector en células de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, dio lugar a numerosos clones transformantes que fueron confirmados por PCR (Figura 4.38). Para evitar el salto de secuencias de inserción (IS), la plataforma pA-162-Vibexp se transformó en la cepa conjugativa de *E. coli*  $\beta$ -3914. Los resultados obtenidos de la amplificación por PCR con los cebadores específicos demuestran que la plataforma pA-162-Vibexp, cuyo origen de replicación procede del plásmido nativo de *Pdd* pA-162, es replicativa y seleccionable en *E. coli*.

A continuación, el vector pA-162-Vibexp se movilizó por conjugación a distintos vibrios. Como bacterias receptoras se seleccionaron diversas cepas de *Pdd* (cepas RM-71 y LD-07), una cepa de *P. damsela*e subsp. *piscicida* (cepa DS11, negativa para el pPHDP10; Abushattal *et al.*, 2020) y la cepa de *V. natriegens* CCUG16374. Los transconjugantes seleccionados en TSA-1-Cm5 fueron positivos por PCR para el vector pA-162-Vibexp, dando amplicones del tamaño esperado (Figura 4.38). Los resultados obtenidos demuestran que la secuencia *oriV* del plásmido MRB nativo de la cepa de *Pdd* A-162 es funcional en *Pdd* y en otros vibrios. Aunque la región mínima de *oriV* que asegura la replicación todavía se desconoce, la estructura del plásmido ha permitido diseñar un nuevo vector movilizable a *P. damsela*e y a *V. natriegens* y que abre camino a su uso como una nueva herramienta para la expresión de genes en bacterias marinas.





#### 4.3.5. El vector pA-162-Vibexp permite la expresión de genes nativos y heterólogos en *P. damsela* subsp. *damsela*

Para testar la aplicabilidad de pA-162-Vibexp como vector de expresión de genes en *Pdd*, se clonó un gen nativo y un gen heterólogo, ambos con su promotor propio, en el MCS del vector (Figura 4.37).

Como gen nativo, se seleccionó el gen *tbpD*, mutado por deleción en la cepa de *Pdd* RM-71 en este trabajo. Los clones transformantes de *E. coli*  $\beta$ -3914 analizados fueron positivos por PCR para el constructo pA-162-Vibexp+*tbpD* (Figura 4.39A y C). A continuación, el vector pA-162-Vibexp+*tbpD* se movilizó por conjugación al clon de la cepa RM-71 mutante para *tbpD* (AVZ159). Los transconjugantes de  $\Delta$ *tbpD* complementados con el vector pA-162-Vibexp+*tbpD* fueron confirmados por PCR con cebadores específicos para la región interna del gen (*Mut\_tbpD\_5'* y *3'*, Figura 4.39B) y con cebadores específicos para el constructo (Figura 4.39A y C).

Teniendo en cuenta que TbpD es una proteína de membrana externa regulada por hierro, la complementación genética del mutante se evaluó mediante el análisis de las proteínas de membrana externa, en condiciones limitantes de hierro, de uno de los clones complementados obtenidos (AVZ410). Este análisis demostró que la banda correspondiente a la proteína TbpD, ausente en el perfil del mutante *tbpD*, se recuperaba en el clon complementado AVZ410, demostrando que el vector pA-162-Vibexp es un vector de expresión funcional en *Pdd* (ver “[Sección 4.2.1.](#); Figura 4.20”). Este resultado demuestra que el vector pA-162-Vibexp, construido en la presente tesis, es una herramienta útil para estudios de complementación genética en *Pdd*. Además, dado que este vector plasmídico también es funcional en la subsp. *piscicida*, así como en *V. natriegens*, las utilidades ofrecidas por esta plataforma podrían extenderse también a otros miembros de la familia *Vibrionaceae*.

Como gen heterólogo, se clonó el gen de la fosfolipasa de la bacteria marina *Pseudoalteromonas citrea*, homóloga a la fosfolipasa Dly de *Pdd* y que bautizamos como Dly-like. Como sucede con la Damselisina, el sistema para trazar la producción de esta fosfolipasa heteróloga es fácilmente detectable en placas suplementadas con yema de huevo.

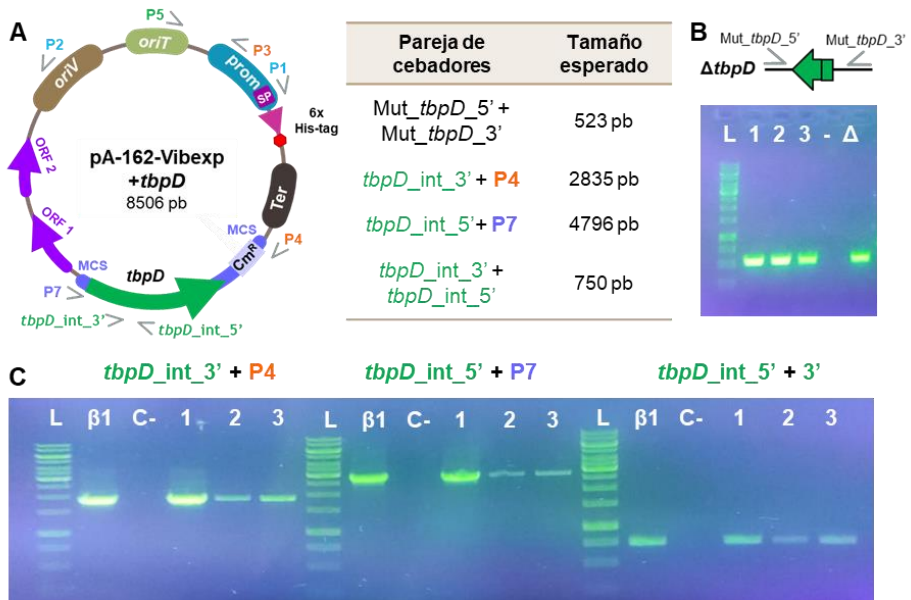


Figura 4.39 (A) Esquema de la construcción pA-162-Vibexp+*tbpD*. A la derecha se indica el tamaño esperado de los amplicones para cada pareja de cebadores. Electroforesis en gels de agarosa de los productos de PCR obtenidos tras amplificar los clones transconjugantes  $\Delta$ *tbpD* complementados (1, 2 y 3) con los cebadores específicos para la región delecionada del gen *tbpD* (B), y para distintas regiones del constructo (C).  $\Delta$ , clon AVZ159 mutante por deleción  $\Delta$ *tbpD*. B1, clon de *E. coli* B-3914 donador de la construcción pA-162-Vibexp+*TbpD*. C-, control negativo. L, marcador de peso molecular 1 kB.

La clonación del gen para la fosfolipasa Dly-like de *P. citrea* con su promotor propio, en el MCS del vector pA-162-Vibexp (Figura 4.40A), dio lugar a clones de *E. coli* con actividad fosfolipasa, mostrando una eficiencia de clonaje bastante satisfactoria (Figura 4.40B). Estos clones fueron positivos por PCR para el constructo pA-162-Vibexp+*dly-like* (Figura 4.40A). A continuación, el constructo se movilizó por conjugación a la cepa de *Pdd* LD-07, negativa para el plásmido pPHDD1 y que presenta un nivel bajo de actividad fosfolipasa. Como se muestra en la Figura 4.40C, los clones LD-07 transconjugantes para la plataforma pA-162+*dly-like* mostraron elevada actividad fosfolipasa, mientras que la cepa portadora del vector vacío mostró un halo estrecho de degradación de fosfolípidos.

Este resultado demuestra que la fosfolipasa heteróloga Dly-like clonada en el vector pA-162-Vibexp se expresa y se secreta en *Pdd*. Curiosamente, la cepa positiva para la fosfolipasa Dly-like de *P. citrea*, mostró un crecimiento menor con respecto a la cepa portadora del vector vacío (Figura 4.40C). Esta observación sugiere que la expresión de esta fosfolipasa podría suponer un coste metabólico capaz de reducir la *fitness* de la cepa LD-07. En concordancia con estas observaciones, numerosos estudios han reportado que la expresión de determinados genes plasmídicos puede desviar recursos inicialmente destinados a la replicación bacteriana, provocando estrés en las células y reduciendo su capacidad para sobrevivir en diferentes ambientes (Baltrus, 2013).

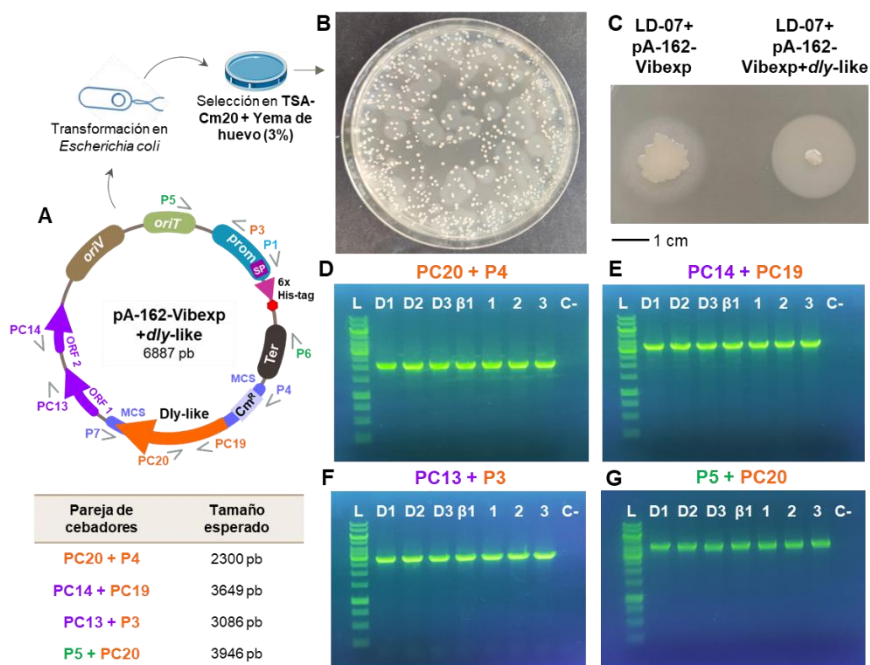


Figura 4.40 (A) Esquema del constructo pA-162-Vibexp+dly-like mostrando los puntos en donde hibridan los cebadores empleados para el análisis por PCR. En la tabla inferior se indica el tamaño esperado de los amplicones para cada pareja de cebadores. (B) Fotografía en la que se muestran los clones transformantes de *E. coli* DH5a de pA-162-Vibexp+dly-like en placas de TSA-1-Cm20 suplementadas con yema de huevo (YH) (3 %) y (C) de un transconjugante de LD-07 portador del plásmido vacío y del constructo pA-162-Vibexp+dly-like. Electroforesis en geles de agarosa de los productos amplificados por PCR de los clones transformantes de *E. coli* DH5a (D1) y B-3914 (B1) y los clones transconjugantes de la cepa LD-07 (1,2 y 3) con las distintas combinaciones de cebadores (D, E, F y G). C-, control negativo. L, marcador de peso molecular 1 Kb.

#### 4.3.6. El vector pA-162-Vibexp: una herramienta genética con potencial para la producción de proteínas recombinantes en *P. damsela* subsp. *damsela*

Más allá de su uso como herramientas genéticas en la investigación molecular básica, los vectores de expresión son esenciales en la industria biotecnológica y tanto su diseño como su optimización constituyen un reto fundamental para la producción eficiente de proteínas recombinantes. Como se mencionó previamente, el diseño de un vector plasmídico que permita la producción de proteínas recombinantes directamente en *P. damsela* como organismo factoría, ofrecería una serie de ventajas muy interesantes. Para ello, la secuencia nativa correspondiente a un promotor fuerte y a un péptido señal Sec dependiente de *Pdd*, se incluyó en el diseño del vector pA-162-Vibexp.

Como prueba de concepto, se clonó el gen de la fosfolipasa heteróloga Dly-like de *P. citrea* (Figura 4.41A). Para el diseño de los cebadores, se realizó una predicción del sitio de corte del péptido señal de la proteína nativa mediante el servidor SignalP (v. 6. 0). El cebador con la secuencia universal adecuada (Tabla 4.2), se diseñó a partir del residuo de corte predicho por el servidor. La clonación del gen *dly-like* bajo el control del promotor y de la secuencia señal del vector pA-162-Vibexp, dio lugar a clones de *E. coli* DH5 $\alpha$  que fueron positivos por PCR para la plataforma. No obstante, las colonias de *E. coli* positivas para el constructo no presentaron actividad fosfolipasa, ni después de 4 días de incubación. Esta ausencia de actividad fosfolipasa podría estar relacionada con la limitada capacidad de *E. coli* para secretar proteínas al espacio extracelular, de manera que la proteína recombinante producida podría quedar retenida en el citoplasma.

Teniendo en cuenta que *Pdd* presenta una elevada capacidad para secretar proteínas al medio extracelular, el constructo se movilizó a la cepa de *Pdd*, LD-07. La transferencia de pA-162-Vibexp-*rDly-like* por conjugación dio lugar a clones de LD-07 con un halo de fosfolipasa ligeramente mayor que la cepa control, portadora del plásmido vacío.

Como se observa en la Figura 4.41B, el halo de degradación de fosfolípidos fue mucho menor que cuando esta fosfolipasa heteróloga se clonó con su propio promotor en el MCS de la plataforma (Figura 4.40C).

Los motivos subyacentes a este resultado podrían ser diversos y en su mayoría, apoyados por las dificultades que presenta la producción de proteínas recombinantes en hospedadores microbianos (Overton, 2014). Entre las problemáticas principales destacan las relacionadas con la inestabilidad del ADN, como la pérdida del plásmido de expresión o la degradación del ARNm; los relacionados con el plegamiento de las proteínas, como un plegamiento inadecuado, la formación de cuerpos de inclusión o la proteólisis y/o la dificultad para translocar la proteína producida al periplasma.

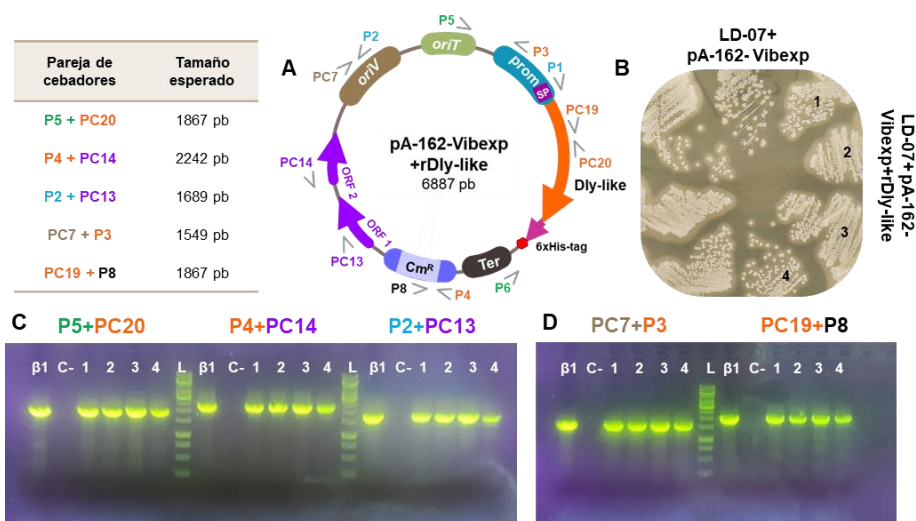


Figura 4.41 (A) Esquema de la construcción pA-162-Vibexp+rDly-like mostrando los puntos donde hibridan los cebadores empleados en el análisis por PCR. El tamaño esperado de los amplicones se especifica en la tabla superior izquierda. (B) Fotografía en la que se muestran los clones transconjugantes de *Pdd* LD-07 para el vector pA-162-Vibexp+rDly-like en placas de TSA-1-Cm5 suplementadas con yema de huevo (YH) (3 %). (C) y (D) Electroforesis en gel de agarosa de los productos amplificados por PCR de los clones transformantes de *E. coli* B-3914 (B1) y de los clones transconjugantes de LD-07 para el vector pA-162-Vibexp+rDly-like (1, 2, 3 y 4) con las combinaciones indicadas en la tabla. C-, control negativo. L, marcador de peso molecular 1 Kb.

A falta de determinar experimentalmente si la ausencia de actividad fosfolipasa recae en un problema de inestabilidad del plásmido de expresión o de degradación del ARNm, los problemas más comunes reportados en la literatura hacen referencia al plegamiento inadecuado de la proteína, a la formación de cuerpos de inclusión y a la dificultad para la translocación al medio externo (Overton, 2013).

Para hacer frente a estas limitaciones, existen una serie de estrategias que se utilizan habitualmente para mejorar la producción de proteínas. Entre ellas destaca la ingeniería de péptidos señal, es decir la modificación o la síntesis *de novo* de secuencias señal diseñadas específicamente para la proteína a secretar y las estrategias encaminadas a modificar las condiciones de cultivo para optimizar la producción de las proteínas recombinantes. Estos son solo unos pocos ejemplos de las múltiples estrategias disponibles, aunque la elección siempre dependerá de las características de la proteína de interés y del organismo hospedador utilizado para la producción (Freudl, 2018; Kleiner-Grote *et al.*, 2018).

#### **4.3.7. El vector pA-162-Vibexp es estable en la cepa de *Pdd* LD-07 e inestable en la cepa RM-71**

Una de las desventajas principales de los vectores plasmídicos es que, en su mayoría, requieren de la adición de antibióticos para garantizar su mantenimiento en la progenie celular bacteriana. Aunque los marcadores de selección son muy potentes, su uso no siempre es práctico, como sucede en los modelos de infección *in vivo* o en los ensayos *in vitro* de complementación genética.

Para determinar si el vector pA-162-Vibexp era estable en las distintas cepas hospedadoras, se crecieron pases (1:100) de las cepas en medio TSB-1 sin antibiótico. Para asegurar que el 100 % de la población celular inicial era positiva para el vector, el inóculo inicial se realizó partiendo de una única colonia aislada crecida en TSA-1-Cm5. En cada pase, las células fueron diluidas y sembradas en placas de TSA-1 y 100 colonias de cada pase se picaron en placas suplementadas con antibiótico (TSA-1-Cm5).

Los resultados obtenidos evidenciaron que mientras que el 100 % de las colonias de la cepa LD-07 mantienen el vector pA-162-Vibexp en el primer pase, solo un 4 % de las colonias de la cepa RM-71 lo mantienen (datos no mostrados). En lo que respecta a la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$ , así como la cepa DS11 de *Pdp*, el plásmido se mantuvo estable en el 100 % de las colonias analizadas procedentes del primer pase.

Teniendo en cuenta que, de las cepas hospedadoras, solo la cepa RM-71 es naturalmente portadora de otro plásmido (el plásmido pPHDD1), se podría hipotetizar que algún mecanismo molecular subyacente podría estar impidiendo la coexistencia de ambos plásmidos en esta cepa. Este resultado apoya la enorme estabilidad del plásmido pPHDD1, cuyos intentos de curación en el laboratorio han resultado siempre fallidos (datos no mostrados). La inestabilidad del vector pA-162-Vibexp en la cepa de *Pdd* RM-71, ya en el primer pase, debe tenerse en cuenta y aunque limita su practicidad, apunta a la necesidad de suplementar siempre el medio de cultivo cuando se realicen experimentos con este vector en esta cepa.

En definitiva, nuestros resultados han conducido al diseño de un vector estable en *Pdd* y *Pdp*, fácilmente seleccionable, y movilizable desde las cepas de uso rutinario de *E. coli* de laboratorio. Como primera prueba de su funcionalidad, el vector pA-162-Vibexp ha permitido realizar con éxito la complementación génica del mutante  $\Delta$ *tbpD* de *Pdd* obtenido en este trabajo de tesis. Además, hemos demostrado que este vector es funcional en *P. damselae* subsp. *piscicida* y en *Vibrio natriegens*. Especialmente interesante ha sido además la constatación de que la plataforma de expresión y secreción, basada en el promotor y el péptido señal del gen de la damselisina, permite la secreción efectiva de una fosfolipasa heteróloga de *Pseudoalteromonas citrea* en cepas de *P. damselae*. Este hallazgo abriría el camino para la utilización de esta plataforma para la producción de proteínas completas o de pequeños péptidos en *P. damselae* y con posibilidades de ser también utilizada con éxito en otros géneros de bacterias marinas. Con este estudio hemos contribuido al diseño de una nueva categoría de vectores para su uso en biotecnología, basados en los plásmidos nativos de tipo MRB.

## **5. CONCLUSIONES**



## 5. CONCLUSIONES

Los resultados recogidos en esta tesis doctoral contribuyen a la expansión del conocimiento sobre la patobiología de *P. damsela* *subsp. damsela*. A partir de este trabajo podemos extraer las siguientes conclusiones:

- 1) La disminución de la concentración de NaCl (del 3% al 1% NaCl) desencadena un programa genético de virulencia en *Pdd* a través de la fuerte regulación de la abundancia de las citotoxinas en el secretoma, la traducción de proteínas, la expresión de sistemas de adquisición de hierro y otras funciones relacionadas con la virulencia.
- 2) Los genes para la  $\delta$ -endotoxina PirB y para la proteína de 11-Kda PirA, son los más inducidos en el perfil a baja salinidad. La mutación de *pirB* no causa ningún impacto en la virulencia de *Pdd* para rodaballo.
- 3) El crecimiento al 3% NaCl regula al alza un “perfil genético ambiental”, dominado por la sobreexpresión de los sistemas de producción de energía, el uso de fructosa y trehalosa como fuentes de carbono y del metabolismo de los aminoácidos, con un especial énfasis en las enzimas del sistema ADI (Arginina deiminasa).
- 4) El crecimiento al 3% NaCl aumenta la resistencia de *Pdd* a la acidez. A esta condición, la mutación del gen *arcA*, para la arginina deiminasa, causa una disminución leve pero significativa en la viabilidad frente a la acidez.
- 5) El crecimiento al 3% NaCl induce la tolerancia de *Pdd* a los antibióticos a través de un mecanismo regulado por salinidad.

- 6) El receptor putativo de unión a transferrina TbpD, codificado en el plásmido pPHDD1, es una proteína de membrana externa inducida a baja salinidad, regulada por hierro e implicada en la virulencia de *Pdd* para rodaballo.
- 7) Los vectores pVibexp y pA-162-Vibexp diseñados en este trabajo permiten la complementación genética de *Pdd*, la expresión de genes heterólogos y sientan las bases para el diseño de una plataforma de expresión.

## **6. CONCLUSIONS**



## 6. CONCLUSIONS

The results obtained in this doctoral thesis contribute to expand our knowledge on the pathobiology of *P. damsela* subsp. *damsela*. This work has drawn the following conclusions:

- 1) Decrease in NaCl concentration (from 3% to 1% NaCl) triggers a virulence genetic program in *Pdd* through the strong regulation of cytotoxin abundance in the secretome, protein translation, expression of iron acquisition systems and other virulence-related functions.
- 2) The genes for the  $\delta$ -endotoxin PirB and for the 11-Kda protein PirA, are the most induced in the low-salt profile. Mutation of *pirB* does not impact the virulence of *Pdd* for turbot.
- 3) Growth at 3% NaCl up-regulates an "environmental genetic profile", dominated by the over-regulation of energy production systems, the use of fructose and trehalose as carbon sources and of amino acid metabolism, with a special emphasis on enzymes of the ADI (Arginine deiminase) system.
- 4) Growth at 3% NaCl increases *Pdd* resistance to acid. At this salinity condition, mutation of the *arcA* gene, for arginine deiminase, causes a slight but significant decrease in viability under acidic conditions (pH 4).
- 5) Growth at 3% NaCl induces *Pdd* tolerance to antibiotics through a salinity-regulated mechanism.

- 6) The putative transferrin-binding receptor TbpD, encoded in the pPHDD1 plasmid, is a low-salinity induced, iron-regulated outer membrane protein involved in the virulence of *Pdd* for turbot.
- 7) The pVibexp and pA-162-Vibexp vectors, constructed in this work, allow the genetic complementation of *Pdd*, the expression of heterologous genes and provide the basis for the design of an expression platform.

## **7. REFERENCIAS**



## 7. REFERENCIAS

- Abdel-Aziz, M., Eissa, A. E., Hanna, M., & Okada, M. A. (2013). Identifying some pathogenic *Vibrio/Photobacterium* species during mass mortalities of cultured Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) from some Egyptian coastal provinces. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1(2), 87–95.
- Abushattal, S., Vences, A., & Osorio, C. R. (2020). A virulence gene typing scheme for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, the causative agent of fish photobacteriosis, reveals a high prevalence of plasmid-encoded virulence factors and of type III secretion system genes. *Aquaculture*, 521.
- Abushattal, S., Vences, A., & Osorio, C. R. (2022). A highly unstable and elusive plasmid that encodes the Type III Secretion System is necessary for full virulence in the marine fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9).
- Abushattal, S., Vences, A., Dos Santos, N. M. S., do Vale, A., & Osorio, C. R. (2019). Draft genome sequences of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* SNW-8.1 and PP3, two fish-isolated strains containing a Type III secretion system. *Microbiology resource announcements*, 8(21), e00426-19.
- Agius C. (1979). The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. *Journal of fish diseases*, 2, 337–43.
- Agius C. (1980). Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *Journal of Zoology*, 191, 11-31.
- Agius, C., & Roberts, R. J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of fish diseases*, 26(9), 499–509.

- Aguilera-Rivera, D., Prieto-Davó, A., Rodríguez-Fuentes, G., Escalante-Herrera, K. S., & Gaxiola, G. (2019). A vibriosis outbreak in the Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* reared in biofloc and clear seawater. *Journal of Invertebrate Pathology*, 167, 107246.
- Aguirre, A. A., Balazs, G. H., Zimmerman, B., & Spraker, T. R. (1994). Evaluation of hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*) for potential pathogens associated with fibropapillomas. *Journal of Wildlife Diseases*, 30(1), 8–15.
- Akram, A., Stevens, R. P., & Konecny, P. (2015). *Photobacterium damsela* and *Vibrio harveyi* hand infection from marine exposure. *Medical Journal of Australia*, 203(5), 224–225.
- Alba, P., Caprioli, A., Cocumelli, C., Ianzano, A., Donati, V., Scholl, F., Sorbara, L., Terracciano, G., Fichi, G., Di Nocera, F., Franco, A., & Battisti, A. (2016). A new multilocus sequence typing scheme and its application for the characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* associated with mortality in cetaceans. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1656.
- Alcaide, E. (2003). Numerical taxonomy of *Vibrionaceae* isolated from cultured Amberjack (*Seriola dumerili*) and surrounding water. *Current Microbiology*, 46(3), 184–189.
- Alday-Sanz V, Corsin F, Irde E, Bondad-Reantaso MG. Survey on the use of veterinary medicines in aquaculture. In: Bondad-Reantaso MG, Arthur JR, Subasinghe RP, eds. Improving biosecurity through prudent and responsible use of veterinary medicines in aquatic food production. *FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 547*. Vol 2012. FAO; 2005:29-44.
- Alvarez, J. R., Lamba, S., Dyer, K. Y., & Apuzzio, J. J. (2006). An unusual case of urinary tract infection in a pregnant woman with *Photobacterium damsela*. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2006, 80682.
- Aly, S. M., Eissa, A. E., ElBanna, N. I., & Albutti, A. (2021). Efficiency of monovalent and polyvalent *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio*

- parahaemolyticus* vaccines on the immune response and protection in gilthead sea bream, *Sparus aurata* (L.) against vibriosis. *Fish & Shellfish Immunology*, *111*, 145–151.
- Amaral, G. R. S., Dias, G. M., Wellington-Oguri, M., Chimetto, L., Campeão, M. E., Thompson, F. L., & Thompson, C. C. (2014). Genotype to phenotype: identification of diagnostic vibrio phenotypes using whole genome sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *64*, 357–365.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, *27*(2-3), 215–237.
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, *31*(2), 166–169.
- Apromar. (2022). Informe de la acuicultura en España (2022). Informe realizado por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR): [www.apromar.es](http://www.apromar.es).
- Austin, B. (2023). The impact of disease on the sustainability of aquaculture. *Sustainable Aquatic Research*, *2*(1), 74–91.
- Austin, B., & Austin, D. A. (2016). *Bacterial fish pathogens: disease of farmed and wild fish..* (6th ed.) Springer.
- Bachand, P. T., Tallman, J. J., Powers, N. C., Woods, M., Azadani, D. N., Zimba, P. V., & Turner, J. W. (2020). Genomic identification and characterization of co-occurring Harveyi clade species following a vibriosis outbreak in Pacific white shrimp, *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, *518*, 734628.
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F., & Martinez-Urtaza, J. (2018). *Vibrio* spp. infections. *Nature Reviews Disease Primers*, *4*(1).
- Baker-Austin, C., Stockley, L., Rangdale, R., & Martinez-Urtaza, J. (2010). Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: A European perspective. *Environmental Microbiology Reports*, *2*(1), 7–18.

- Balado, M., Puentes, B., Couceiro, L., Fuentes-Monteverde, J. C., Rodríguez, J., Osorio, C. R., Jiménez, C., & Lemos, M. L. (2017). Secreted citrate serves as iron carrier for the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp *damsela*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 361.
- Baltrus, D. A. (2013). Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends in Ecology and Evolution*, 28(8), 489–495.
- Barber, G. R., & Swygert, J. S. (2000). Necrotizing fasciitis due to *Photobacterium damsela* in a man lashed by a Stingray. *New England Journal of Medicine*, 342(11), 824.
- Bari, W., Lee, K.-M., & Yoon, S. S. (2012). Structural and functional importance of outer membrane proteins in *Vibrio cholerae* flagellum. *The Journal of Microbiology*, 50(4), 631–637.
- Barroso, C., Carvalho, P., Carvalho, C., Santarém, N., Gonçalves, J. F. M., Rodrigues, P. N. S., & Neves, J. V. (2020). The Diverse Piscidin Repertoire of the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*): Molecular Characterization and Antimicrobial Activities. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4613.
- Baseggio, L., Silayeva, O., Buller, N., Landos, M., Englestädter, J., & Barnes, A. C. (2021). Complete, closed and curated genome sequences of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates from Australia indicate mobilome-driven localized evolution and novel pathogenicity determinants. *Microbial Genomics*, 7(4), 1–14.
- Bellos, G., Angelidis, P., & Miliou, H. (2015). Effect of temperature and seasonality principal epizootiological risk factor on vibriosis and photobacteriosis outbreaks for European sea bass in Greece (1998- 2013). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 6(5).
- Benjamini Y, & Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the royal statistical society. Series B (Methodological)*, 57, 289–300.

- Bilecen, K., & Yildiz, F. H. (2009). Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environmental Microbiology*, *11*(8), 2015–2029.
- Bina, X. R., Wong, E. A., Bina, T. F., & Bina, J. E. (2014). Construction of a tetracycline inducible expression vector and characterization of its use in *Vibrio cholerae*. *Plasmid*, *76*, 87–94.
- Biswas K., Paul D., & Sinha S.N. (2016). Marine bacteria: a potential tool for antibacterial activity. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, *4*(1), 25-19.
- Bjornsdottir-Butler, K., Abraham, A., Harper, A., Dunlap, P. V., & Benner, R. A. (2018). Biogenic Amine Production by and Phylogenetic Analysis of 23 *Photobacterium* Species. *Journal of Food Protection*, *81*(8), 1264–1274.
- Blackwell, K. D., & Oliver, J. D. (2008). The ecology of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio cholerae*, and *Vibrio parahaemolyticus* in North Carolina Estuaries. *Journal of Microbiology*, *46*(2), 146–153.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(15), 2114–2120.
- Botella, S., Pujalte, M.-J., Macián, M.-C., Ferrús, M.-A., Hernández, J., & Garay, E. (2002). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) and biochemical typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology*, *93*(4), 681–688.
- Boyd, D. A., Willey, B. M., Fawcett, D., Gillani, N., & Mulvey, M. R. (2008). Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, vanL. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *52*(7), 2667–2672.
- Buck JD. 1990. Potentially Pathogenic Marine *Vibrio* Species in Seawater and Marine Animals in the Sarasota, Florida, Area. *Journal of Coastal Research*, *6*(4), 943–948.

- Buck, J. D., Overstrom, N. A., Patton, G. W., Anderson, H. F., & Gorzelany, J. F. (1991). Bacteria associated with stranded cetaceans from the northeast USA and southwest Florida Gulf coasts. *Diseases of Aquatic Organisms*, 10(2), 147–152.
- Buck, J. D., Wells, R. S., Rhinehart, H. L., & Hansen, L. J. (2006). Aerobic microorganisms associated with free-ranging bottlenose dolphins in coastal gulf of Mexico and Atlantic Ocean waters. *Journal of Wildlife Diseases*, 42(3), 536–544.
- Burdette, L. A., Leach, S. A., Wong, H. T., & Tullman-Ercek, D. (2018). Developing Gram-negative bacteria for the secretion of heterologous proteins. In *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–16.
- Cabello, F. C., Godfrey, H. P., Tomova, A., Ivanova, L., Dölz, H., Millanao, A., & Buschmann, A. H. (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15(7), 1917–1942.
- Caddia G, Casu MA, Dettori S, Urru R, Paglietti B. 2022. Wound infection caused by *Photobacterium damsela* in a man in Sardinia (the first case in Italy): a case report and review of literature. *Infectious diseases and Tropical Medicine*. 8:e796
- Capkin, E., Ozdemir, S., Ozturk, R. C., & Altinok, I. (2017). Determination and transferability of plasmid-mediated antibiotic resistance genes of the bacteria isolated from rainbow trout. *Aquaculture Research*, 48(11), 5561–5575.
- Casadevall, A., & Pirofski, L. (2001). Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(3), 337–344.
- Casiano-Colón, A., & Marquis, R. E. (1988). Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 54(6), 1318–1324.

- Ceccarelli, D., Garriss, G., Choi, S. Y., Hasan, N. A., Stepanauskas, R., Pop, M., Huq, A., & Colwell, R. R. (2017). Characterization of two cryptic plasmids isolated in Haiti from clinical *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1–9.
- Chiu, T.H., Kao, L.Y., & Chen, M.L. (2013). Antibiotic resistance and molecular typing of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, isolated from seafood. *Journal of Applied Microbiology*, 114(4), 1184–1192.
- Chochlakis, D., Psaroulaki, A., Varveraki, S. P., Kostalas, D. M., & Carouzous, C. K. (2019). Infection due to *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* following injury into a marine environment. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 22(2), 16462– 16466.
- Choi, H. J., Kwon, H. C., Jung, H. J., & Kang, Y. J. (2018). Survey of viral and bacterial pathogens in ornamental aquatic crustaceans imported into South Korea. *Aquaculture*, 495, 668–674.
- Chuang, M.-Y., Tsai, W.-C., Kuo, T.-Y., Chen, H.-M., & Chen, W.-J. (2016). Comparative proteome analysis reveals proteins involved in salt adaptation in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Basic Microbiology*, 56(11), 1234–1243.
- Clarridge, J. E., & Zigelboim-Daum, S. (1985). Isolation and characterization of two hemolytic phenotypes of *Vibrio damsela* associated with a fatal wound infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 21(3), 302–306.
- Coffey, J. A., Harris, R. L., Rutledge, M. L., Bradshaw, M. W., & Williams, T. W. (1986). *Vibrio damsela*: another potentially virulent marine *Vibrio*. *The Journal of Infectious Diseases*, 153(4), 800–802.
- Cohen J. 1988. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Hillsdale NJ: Lawrence Erlbaum Associates.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in

- vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240–3244.
- Collins, H., Lee, K. M., Cheng, P. T.-Y., & Hulme, S. (2017). Soft tissue infections from fish spike wounds: normal commensal bacteria are more common than marine pathogens. *ANZ Journal of Surgery*, 88(1–2), E40–E44.
- Company, R., Sitj, A., Pujalte, M. J., Garay, E., Alvarez-Pellitero, P., & P, J. (1999). Bacterial and parasitic pathogens in cultured common dentex, *Dentex dentex* L. *Journal of Fish Diseases*, 22(4), 299–309.
- Coronado, M.-J., Vargas, C., Kunte, H. J., Galinski, E. A., Ventosa, A., & Nieto, J. J. (1995). Influence of salt concentration on the susceptibility of moderately halophilic bacteria to antimicrobials and its potential use for genetic transfer studies. *Current Microbiology*, 31(6), 365–371.
- Cortés, V.G., & Antillón, F. (1990). Aislamiento de vibrios enteropatógenos de bivalvos y cieno del Golfo de Nicoya, Costa Rica. *Revista De Biología Tropical*, 38, 437-440.
- Crisafi, F., Denaro, R., Yakimov, M., Felice, M. R., Giuliano, L., & Genovese, L. (2015). NaCl concentration in the medium modulates the secretion of active EmpA protease in *Vibrio anguillarum* at post-transcriptional level. *Journal of Applied Microbiology*, 119(6), 1494–1501.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiological Reviews*, 53(1), 121–147.
- Cutter, D. L., & Kreger, A. S. (1990). Cloning and expression of the damselysin gene from *Vibrio damsela*. *Infection and Immunity*, 58(1), 266–268.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6640–6645.

- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., & Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, *14*(3), 251–258.
- DePaola, A., Nordstrom, J. L., Bowers, J. C., Wells, J. G., & Cook, D. W. (2003). Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(3), 1521.
- Do Vale, A., Silva, M. T., Dos Santos, N. M. S., Nascimento, D. S., Reis-Rodrigues, P., Costa-Ramos, C., Ellis, A. E., & Azevedo, J. E. (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Molecular Microbiology*, *58*(4), 1025–1038.
- Dörr, T., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2015). Endopeptidase-mediated beta lactam tolerance. *PLoS Pathogens*, *11*(4), e1004850–e1004850.
- Dörr, T., Delgado, F., Umans, B. D., Gerding, M. A., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2016). A Transposon Screen Identifies Genetic Determinants of *Vibrio cholerae* Resistance to High-Molecular-Weight Antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *60*(8), 4757–4763.
- Dorrington, T., & Gomez-Chiarri, M. (2008). Antimicrobial Peptides for Use in Oyster Aquaculture: Effect on Pathogens, Commensals, and Eukaryotic Expression Systems. *Journal of Shellfish Research*, *27*(2), 365–373.
- Dryden, M., Legarde, M., Gottlieb, T., Brady, L., & Ghosh, H. K. (1989). *Vibrio damsela* wound infections in Australia. *Medical Journal of Australia*, *151*(9), 540–541.
- Du, Y., Hu, X., Miao, L., & Chen, J. (2022). Current status and development prospects of aquatic vaccines. *Frontiers in Immunology*, *13*, 1040336.

- Duff, D. C. B. (1942). The oral immunization of trout against *Bacterium salmonicida*. *The Journal of Immunology*, 44(1), 87–94.
- Duperthuy, M., Schmitt, P., Garzón, E., Caro, A., Rosa, R. D., Le Roux, F., Lautrédou-Audouy, N., Got, P., Romestand, B., De Lorgeril, J., Kieffer-Jaquinod, S., Bachère, E., & Destoumieux-Garzón, D. (2011). Use of OmpU porins for attachment and invasion of *Crassostrea gigas* immune cells by the oyster pathogen *Vibrio splendidus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 2993–2998.
- Eissa, I. A. M., Derwa, H. I., Ismail, M., El-lamie, M., Dessouki, A. A., Elsheshtawy, H., & Bayoumy, E. M. (2018). Molecular and phenotypic characterization of *Photobacterium damsela* among some marine fishes in Lake Tamsah. *Microbial Pathogenesis*, 114, 315–322.
- Elad, D., Morick, D., David, D., Scheinin, A., Yamin, G., Blum, S., & Goffman, O. (2011). Pulmonary fungal infection caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in a Risso's dolphin (*Grampus griseus*). *Medical Mycology*, 49(4), 424–426.
- Essam, H. M., Abdellrazeq, G. S., Tayel, S. I., Torkey, H. A., & Fadel, A. H. (2016). Pathogenesis of *Photobacterium damsela* subspecies infections in sea bass and sea bream. *Microbial Pathogenesis*, 99, 41–50.
- FAO. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura*. (2022). Hacia la transformación azul. Roma, FAO. <https://doi.org/10.4060/cc0461es>.
- Faquin, W. C., & Oliver, J. D. (1984). Arginine Uptake by a psychrophilic marine *Vibrio* sp. during starvation-induced morphogenesis. *Microbiology*, 130(6), 1331–1335.
- Feilmeier, B. J., Iseminger, G., Schroeder, D., Webber, H., & Phillips, G. J. (2000). Green fluorescent protein functions as a reporter for protein localization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(14), 4068–4076.

- Festing M. F. (2018). On determining sample size in experiments involving laboratory animals. *Laboratory animals*, 52(4), 341–350.
- Fileenko, N., Spiro, S., Browning, D. F., Squire, D., Overton, T. W., Cole, J., & Constantinidou, C. (2007). The NsrR regulon of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *Journal of Bacteriology*, 189(12), 4410–4417.
- Fouz, B., Barja, J. L., Amaro, C., Rivas, C., & Toranzo, A. E. (1993). Toxicity of the extracellular products of *Vibrio damsela* isolated from diseased fish. *Current Microbiology*, 27(6), 341–347.
- Fouz, B., Biosca, E. G., & Amaro, C. (1997). High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *Journal of Applied Microbiology*, 82(2), 157–167.
- Fouz, B., Larsen, J. L., Nielsen, B., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1992). Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms*, 12, 155–166.
- Fouz, B., Larsen, J. L., Toranzo, A. E. (1991). *Vibrio damsela* as a pathogenic agent causing mortalities in cultures turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*.
- Fouz, B., Toranzo, A. E., Biosca, E. G., Mazoy, R., & Amaro, C. (1994). Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiology Letters*, 121(2), 181–188.
- Fouz, B., Toranzo, A. E., Marco-Noales, E., & Amaro, C. (1998). Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in seawater under starvation conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 168(2), 181–186.
- Fouz, B., Toranzo, A. E., Milan, M., & Amaro, C. (2000). Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology*, 88(3), 531–535.

- Fraser, S. L., Purcell, B. K., Delgado, B., Baker, A. E., & Whelen, A. C. (1997). Rapidly fatal infection due to *Photobacterium (Vibrio) damsela*. *Clinical Infectious Diseases*, 25(4), 935–936.
- Freudl, R. (2018). Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 1–10.
- Froelich, B. A., & Daines, D. A. (2020). In hot water: effects of climate change on Vibrio–human interactions. *Environmental Microbiology*, 22(10), 1404–1411.
- Ganie, H. A., Choudhary, A., & Baranwal, S. (2022). Structure, regulation, and host interaction of outer membrane protein U (OmpU) of Vibrio species. *Microbial Pathogenesis*, 162, 105267.
- García, K., Yáñez, C., Plaza, N., Peña, F., Sepúlveda, P., Pérez-Reytor, D., & Espejo, R. T. (2017). Gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* growing in laboratory isolation conditions compared to those common in its natural ocean environment. *BMC Microbiology*, 17(1), 118.
- García-Rosado, E., Cano, I., Martín-Antonio, B., Labella, A., Manchado, M., Alonso, M. C., Castro, D., & Borrego, J. J. (2007). Co-occurrence of viral and bacterial pathogens in disease outbreaks affecting newly cultured sparid fish. *International Microbiology*, 10(3), 193–199.
- Garlock, T., Asche, F., Anderson, J., Bjørndal, T., Kumar, G., Lorenzen, K., Ropicki, A., Smith, M. D., & Tveterås, R. (2020). A Global Blue Revolution: Aquaculture growth across regions, species, and countries. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 28(1), 107–116.
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Med Chem Comm*, 7(1), 11–27.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J. L., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Small-Subunit rRNA Sequences and Whole DNA Relatedness Concur for the

- Reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko *et al.*) Janssen and Surgalla to the Genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 139–144.
- Gilchrist, C. L. M., & Chooi, Y. H. (2021). clinker & clustermap.js: automatic generation of gene cluster comparison figures. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 37(16), 2473–2475.
- Godoy-Vitorino, F., Rodriguez-Hilario, A., Alves, A. L., Gonçalves, F., Cabrera-Colon, B., Mesquita, C. S., Soares-Castro, P., Ferreira, M., Marçalo, A., Vingada, J., Eira, C., & Santos, P. M. (2017). The microbiome of a striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) stranded in Portugal. *Research in Microbiology*, 168(1), 85–93.
- Goforth, J. B., Walter, N. E., & Karatan, E. (2013). Effects of polyamines on *Vibrio cholerae* virulence properties. *PLoS One*, 8(4), e60765–e60765.
- Gon, S., Patte, J. C., Méjean, V., & Iobbi-Nivol, C. (2000). The torYZ (*yeck bisZ*) operon encodes a third respiratory trimethylamine N-oxide reductase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(20), 5779–5786.
- Goodell, K. H., Jordan, M. R., Graham, R., Cassidy, C., & Nasraway, S. A. (2004). Rapidly advancing necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium (Vibrio) damsela*: A hyperaggressive variant. *Critical Care Medicine*, 32(1), 278–281.
- Gregory, G. J., Dutta, A., Parashar, V., & Fidelma Boyd, E. (2020). Investigations of dimethylglycine, glycine betaine, and ectoine uptake by a betaine-carnitine-choline transporter family transporter with diverse substrate specificity in *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology*, 202(24).
- Gregory, G. J., Morreale, D. P., Carpenter, M. R., Kalburge, S. S., & Boyd, E. F. (2019). Quorum Sensing regulators AphA and OpaR control expression of the operon responsible for biosynthesis of the compatible solute ectoine. *Applied and environmental microbiology*, 85(22), e01543-19.

- Grimes, D. J., Colwell, R. R., Stemmler, J., Hada, H., Maneval, D., Hetrick, F. M., May, E. B., Jones, R. T., & Stoskopf, M. (1984). *Vibrio* species as agents of elasmobranch disease. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 37(1–4), 309–315.
- Grimes, D. J., Stemmler, J., Hada, H., May, E. B., Maneval, D., Hetrick, F. M., Jones, R. T., Stoskopf, M., & Colwell, R. R. (1984). *Vibrio* species associated with mortality of sharks held in captivity. *Microbial Ecology*, 10(3), 271–282.
- Guimaraes, D., Ribeiro, L., Vieira, L., & Coelho, R. (2021). Necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela*: the first case in Portugal. *Acta Médica Portuguesa*, 34(9), 615–618.
- Gupta, N., Partridge, G. J., Buller, N. B., Pilmer, L., Currie, A., & Lymbery, A. J. (2021). Genetic diversity of Australian isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* is associated with virulence to yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 538, 736552.
- Häkkinen, S. (2002). Surface salinity variability in the northern North Atlantic during recent decades. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 107, 8003.
- Hall T. A. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Oxford University Press*, 41, 95-98.
- Hamana, K. (1997). Polyamine distribution patterns within the families *Aeromonadaceae*, *Vibrionaceae*, *Pasteurellaceae*, and *Halomonadaceae*, and related genera of the gamma subclass of the Proteobacteria. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 43(1), 49–59.
- Hanlon, R. T., Forsythe, J. W., Cooper, K. M., Dinuzzo, A. R., Folse, D. S., & Kelly, M. T. (1984). Fatal penetrating skin ulcers in laboratory-reared octopuses. *Journal of Invertebrate Pathology*, 44(1), 67–83.
- Hazen, T. H., Pan, L., Gu, J. D., & Sobczyk, P. A. (2010). The contribution of mobile genetic elements to the evolution and

- ecology of Vibrios. *FEMS Microbiology Ecology*, 74(3), 485–499.
- Hengge, R. (2008). The two-component network and the general stress sigma factor RpoS ( $\sigma$  S) in *Escherichia coli*. *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*, 40–53.
- Herrero, M., De Lorenzo, V., & Timmis, K. N. (1990). Transposon vector containing non-antibiotic resistance selection markers for cloning and stable chromosomal insertion of foreign genes in gram-negative bacteria. *Journal of bacteriology*, 172(11), 6557–6567.
- Herwig, R. P., & Staley, J. T. (1986). Anaerobic bacteria from the digestive tract of North Atlantic fin whales (*Balaenoptera physalus*). *FEMS Microbiology Letters*, 38(6), 361–371.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath .P.H.A., Staley J.T., & Williams S.T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Hsu, P.Y., Lee, K.K., Hu, C.C., & Liu, P.C. (2013). Purification and characterization of a phospholipase by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* from cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology*, 54(9), 969–975.
- Hu, S., Li, Y., Wang, B., Yin, L., & Jia, X. (2022). Effects of NaCl concentration on the behavior of *Vibrio brasiliensis* and transcriptome analysis. *Foods*, 11(6), 840.
- Huang, P.-H., Chen, J.-Y., & Kuo, C.-M. (2007). Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions. *Molecular Immunology*, 44(8), 1922–1934.
- Huang, Z., Yu, K., Fang, Y., Dai, H., Cai, H., Li, Z., Kan, B., Wei, Q., & Wang, D. (2020). Comparative genomics and transcriptomics analyses reveal a unique environmental adaptability of *Vibrio fujianensis*. *Microorganisms*, 8(4).
- Huda, M. N., Morita, Y., Kuroda, T., Mizushima, T., & Tsuchiya, T. (2001). Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump VcmA from *Vibrio cholerae* non-O1, a non-halophilic bacterium. *FEMS*

*Microbiology Letters*, 203(2), 235–239.

- Hundenborn, J., Thurig, S., Kommerell, M., Haag, H., & Nolte, O. (2013). Severe wound infection with *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* and *Vibrio harveyi*, following a laceration injury in marine environment: a case report and review of the literature. *Case Reports in Medicine*, 2013, 610632.
- Ina-Salwany, M. Y., Al-Saari, N., Mohamad, A., Mursidi, F. A., Mohd-Aris, A., Amal, M. N. A., Kasai, H., Mino, S., Sawabe, T., & Zamri-Saad, M. (2019). Vibriosis in fish: a review on disease development and prevention. *Journal of aquatic animal health*, 31(1), 3–22.
- Itay, P., Shemesh, E., Ofek-Lalzar, M., Davidovich, N., Kroin, Y., Zrihan, S., Stern, N., Diamant, A., Wosnick, N., Meron, D., Tchernov, D., & Morick, D. (2022). An insight into gill microbiome of Eastern Mediterranean wild fish by applying next generation sequencing. *Frontiers in Marine Science*, 9 (September).
- Jang, J., Jung, K.-T., Park, J., Yoo, C.-K., & Rhie, G.-E. (2011). The *Vibrio cholerae* VarS/VarA two-component system controls the expression of virulence proteins through ToxT regulation. *Microbiology*, 157(5), 1466–1473.
- Jelsbak, L., Thomsen, L. E., Wallrodt, I., Jensen, P. R., & Olsen, J. E. (2012). Polyamines are required for virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PloS One*, 7(4), e36149–e36149.
- Johnson, C. N., Bowers, J. C., Griffitt, K. J., Molina, V., Clostio, R. W., Pei, S., Laws, E., Paranjpye, R. N., Strom, M. S., Chen, A., Hasan, N. A., Huq, A., Noriega, N. F., Grimes, D. J., & Colwell, R. R. (2012). Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in the coastal and estuarine waters of Louisiana, Maryland, Mississippi, and Washington (United States). *Applied and Environmental Microbiology*, 78(20), 7249–7257.

- Johnson, D. I. (2017). Bacterial virulence factors. In *Bacterial Pathogens and Their Virulence Factors* (pp. 1–38). Springer International Publishing.
- Johnston, M. A., & Davies, P. S. (1972). Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, *41*(2), 433–443.
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583–589.
- Juste-Poinapen, N. M. S., Yang, L., Ferreira, M., Poinapen, J., & Rico, C. (2019). Community profiling of the intestinal microbial community of juvenile Hammerhead Sharks (*Sphyrna lewini*) from the Rewa Delta, Fiji. *Scientific Reports*, *9*(1), 7182.
- Kalburge, S. S., Whitaker, W. B., & Boyd, E. F. (2014). High-salt Preadaptation of *Vibrio parahaemolyticus* enhances survival in response to lethal environmental stresses. *Journal of Food Protection*, *77*(2), 246–253.
- Kanchanopas-Barnette, P., Labella, A., Alonso, C. M., Manchado, M., Castro, D., & Borrego, J. J. (2009). The first isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from Asian Seabass *Lates calcarifer*. *Fish Pathology*, *44*(1), 47–50.
- Kao, D.-Y., Cheng, Y.-C., Kuo, T.-Y., Lin, S.-B., Lin, C.-C., Chow, L.-P., & Chen, W.-J. (2009). Salt-responsive outer membrane proteins of *Vibrio anguillarum* serotype O1 as revealed by comparative proteome analysis. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(6), 2079–2085.
- Kapetanović, D., Vardić Smrzlić, I., Kazazić, S., Omanović, D., Cukrov, N., Cindrić, A.-M., Rapljenović, A., Perić, L., Orlić, K., Mijošek, T., Redžović, Z., Gavrilović, A., Radočaj, T., & Filipović

- Marijić, V. (2023). A preliminary study of the cultivable microbiota on the plastic litter collected by commercial fishing trawlers in the south-eastern Adriatic Sea, with emphasis on *Vibrio* isolates and their antibiotic resistance. *Marine Pollution Bulletin*, 187, 114592.
- Keller, M., Han, X., & Dörr, T. (2023). Disrupting central carbon metabolism increases  $\beta$ -lactam antibiotic susceptibility in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, 205(3), e0047622–e0047622.
- Kelly, M. T., & Dan Stroh, E. M. (1988). Occurrence of *Vibrionaceae* in natural and cultivated oyster populations in the Pacific Northwest. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 9(1), 1–5.
- Ketterer, P. J., & Eaves, L. E. (1992). Deaths in captive eels (*Anguila reinhardtii*) due to *Photobacterium (Vibrio) damsela*. *Australian Veterinary Journal*, 69(8), 203–204.
- Khouadja, S., Lamari, F., Bakhrouf, A., & Gaddour, K. (2014). Virulence properties, biofilm formation and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolates from cultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microbial Pathogenesis*, 69–70, 13–19.
- Kim, H. R., Kim, J. W., Lee, M. K., & Kim, J. G. (2009). Septicemia progressing to fatal hepatic dysfunction in an cirrhotic patient after oral ingestion of *Photobacterium damsela*: a case report. *Infection*, 37(6), 555–556.
- Kim, M. S., Cho, J. Y., & Choi, H. S. (2014). Identification of *Vibrio harveyi*, *Vibrio ichthyenteri*, and *Photobacterium damsela* isolated from olive flounder *Paralichthys olivaceus* in Korea by multiplex PCR developed using the *rpoB* gene. *Fisheries Science*, 80(2), 333–339.
- Kleiner-Grote, G. R. M., Risse, J. M., & Friehs, K. (2018). Secretion of recombinant proteins from *E. coli*. *Engineering in Life Sciences*, 18(8), 532–550.

- Klevanskaa, K., Bier, N., Stingl, K., Strauch, E., & Hertwig, S. (2014). PVv3, a new shuttle vector for gene expression in *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), 1477–1481.
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nature biotechnology*, 37(5), 540–546.
- Kothary, M. H., & Kreger, A. S. (1985). Purification and characterization of an extracellular cytolysin produced by *Vibrio damsela*. *Infection and Immunity*, 49(1), 25–31.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., & Peterson, K. M. (1994). pBBR1MCS: A broad-host-range cloning vector. *BioTechniques*, 16(5), 800–802.
- Kreger, A. S. (1984). Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infection and Immunity*, 44(2), 326–331.
- Kreger, A. S., Bernheimer, A. W., Etkin, L. A., & Daniel, L. W. (1987). Phospholipase D activity of *Vibrio damsela* cytolysin and its interaction with sheep erythrocytes. *Infection and Immunity*, 55(12), 3209–3212.
- Labella, A., Berbel, C., Manchado, M., Castro, D., & Borrego, J. J. (2011). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen affecting new cultured marine fish species in Southern Spain. *Recent Advances in Fish Farms, November 2011*.
- Labella, A., Sanchez-Montes, N., Berbel, C., Aparicio, M., Castro, D., Manchado, M., & Borrego, J. J. (2010). Toxicity of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* strains isolated from new cultured marine fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(1), 31–40.
- Labella, A., Vida, M., Alonso, M. C., Infante, C., Cardenas, S., Lopez-Romalde, S., Manchado, M., & Borrego, J. J. (2006). First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes, in Spain. *Journal of Fish Diseases*, 29(3), 175–179.

- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lafferty, K. D., Harvell, C. D., Conrad, J. M., Friedman, C. S., Kent, M. L., Kuris, A. M., Powell, E. N., Rondeau, D., & Saksida, S. M. (2015). Infectious diseases affect marine fisheries and aquaculture economics. *Annual Review of Marine Science*, 7(1), 471–496.
- Lages, M. A., Balado, M., & Lemos, M. L. (2019). The expression of virulence factors in *Vibrio anguillarum* is dually regulated by iron levels and temperature. *Frontiers in Microbiology*, 10(1), 1–11.
- Landry, M. R., Kirshtein, J., & Constantinou, J. (1995). A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton. *Marine Ecology Progress Series*, 120(1), 53–63.
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9(4), 357–359.
- Larsen, M. H., Blackburn, N., Larsen, J. L., & Olsen, J. E. (2004). Influences of temperature, salinity and starvation on the motility and chemotactic response of *Vibrio anguillarum*. *Microbiology*, 150(5), 1283–1290.
- Laub, M. T., & Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual review of genetics*, 41, 121–145.
- Le Roux, F., Binesse, J., Saulnier, D., & Mazel, D. (2007). Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(3), 777–784.
- Le Roux, F., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2011). Conserved small RNAs govern replication and incompatibility of a diverse new plasmid family from marine bacteria. *Nucleic Acids Research*, 39(3), 1004–1013.
- Lederberg, J. (1952). Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiological reviews*, 32(4), 403–430.

- Lee, C.-T., Chen, I.-T., Yang, Y.-T., Ko, T.-P., Huang, Y.-T., Huang, J.-Y., Huang, M.-F., Lin, S.-J., Chen, C.-Y., Lin, S.-S., Lightner, D. V., Wang, H.-C., Wang, A. H.-J., Wang, H.-C., Hor, L.-I., & Lo, C.-F. (2015). The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(34), 10798–10803.
- Lee, E. Y., Bang, J. Y., Park, G. W., Choi, D. S., Kang, J. S., Kim, H. J., Park, K. S., Lee, J. O., Kim, Y. K., Kwon, K. H., Kim, K. P., & Gho, Y. S. (2007). Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*, *7*(17), 3143–3153.
- Lee, S. E., Shin, S. H., Kim, S. Y., Kim, Y. R., Shin, D. H., Chung, S. S., Lee, Z. H., Lee, J. Y., Jeong, K. C., Choi, S. H., & Rhee, J. H. (2000). *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator ToxRS stimulating the expression of the hemolysin gene *vvhA*. *Journal of Bacteriology*, *182*(12), 3405–3415.
- Lemos, M. L., & Balado, M. (2020). Iron uptake mechanisms as key virulence factors in bacterial fish pathogens. *Journal of applied microbiology*, *129*(1), 104–115.
- Leyton, A., Flores, L., Mäki-Arvela, P., Lienqueo, M. E., & Shene, C. (2019). *Macrocystis pyrifera* source of nutrients for the production of carotenoids by a marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *Journal of Applied Microbiology*, *127*(4), 1069–1079.
- Li, C. C., Yeh, S. T., & Chen, J. C. (2010). Innate immunity of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* weakened by the combination of a *Vibrio alginolyticus* injection and low-salinity stress. *Fish & Shellfish Immunology*, *28*(1), 121–127.
- Li, F., Xiong, X.-S., Yang, Y.-Y., Wang, J.-J., Wang, M.-M., Tang, J.-W., Liu, Q.-H., Wang, L., & Gu, B. (2021). Effects of NaCl concentrations on growth patterns, phenotypes associated with virulence, and energy metabolism in *Escherichia coli* BW25113. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 705326.

- Li, L. L., Norman, A., Hansen, L. H., & Sørensen, S. J. (2012). Metamobilomics - expanding our knowledge on the pool of plasmid encoded traits in natural environments using high-throughput sequencing. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(Suppl. 4), 5–7.
- Li, X., Yang, B., Shi, C., Wang, H., Yu, R., Li, Q., & Liu, S. (2022). Synergistic interaction of low salinity stress with *Vibrio* infection causes mass mortalities in the oyster by inducing host microflora imbalance and immune dysregulation. *Frontiers in Immunology*, 13(May), 1–13.
- Liu, Y., Gao, W., Wang, Y., Wu, L., Liu, X., Yan, T., Alm, E., Arkin, A., Thompson, D. K., Fields, M. W., & Zhou, J. (2005). Transcriptome analysis of *Shewanella oneidensis* MR-1 in response to elevated salt conditions. *Journal of Bacteriology*, 187(7), 2501–2507.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21.
- Love, M., Teebken-Fisher, D., Hose, J. E., Farmer, J. J., Hickman, F. W., & Fanning, G. R. (1981). *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science*, 214(4525), 1139–1140.
- Lozano-León A, Osorio, CR, Núñez, S, Martínez-Urtaza J, Magariños B. 2003. Occurrence of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in bivalve molluscs from Northwest Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(1), 40–44.
- Lunn, J. E. (2002). Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiology*, 128(4), 1490–1500.
- Ma, J., Bruce, T. J., Jones, E. M., & Cain, K. D. (2019). A review of fish vaccine development strategies: conventional methods and modern biotechnological approaches. *Microorganisms*, 7(11), 569.

- Ma, R., Wang, Y., Huang, L., Zhao, S., Li, L., Yin, M., & Fang, W. (2021). Effects of different salinity on the transcriptome and antibiotic resistance of two *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from *Penaeus vannamei* cultured in seawater and freshwater ponds. *Journal of Fish Diseases*, *44*(12), 2055–2066.
- MacDonell, M. T., & Colwell, R. R. (1984). Nucleotide base sequence of *Vibrionaceae* 5S rRNA. *FEBS Letters*, *175*(1), 183–188.
- Magariños, B., Santos, Y., Romalde, J. L., Rivas, C., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (1992). Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *Journal of general microbiology*, *138*(12), 2491–2498.
- Malle, P., Valle, M., Eb, P., & Tailliez, R. (1998). Optimization of culture conditions for enumeration of H<sub>2</sub>S bacteria in the flesh of seafish. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology*, *6*(2), 129–141.
- Marsden, A. E., Grudzinski, K., Ondrey, J. M., Deloney-Marino, C. R., & Visick, K. L. (2017). Impact of salt and nutrient content on biofilm formation by *Vibrio fischeri*. *PloS one*, *12*(1), e0169521.
- Martin, D. P., Barron, O. A., & Wu, C. H. (2022). Photobacterium damsela Necrotizing Fasciitis of the Arm. *The Journal of Hand Surgery*, *47*(9), 905.e1-905.e8.
- Martinez-Urtaza, J., Bowers, J. C., Trinanes, J., & DePaola, A. (2010). Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International*, *43*(7), 1780–1790.
- Matanza, X. M., & Osorio, C. R. (2018). Transcriptome changes in response to temperature in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*: Clues to understand the emergence of disease outbreaks at increased seawater temperatures. *PloS one*, *13*(12), e0210118.
- Matanza, X. M., & Osorio, C. R. (2020). Exposure of the opportunistic marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* to human body temperature is a stressful condition that shapes the

- transcriptome, viability, cell morphology, and virulence. *Frontiers in microbiology*, 11, 1771.
- Matanza, X. M., López-Suárez, L., do Vale, A., & Osorio, C. R. (2021). The two-component system RstAB regulates production of a polysaccharide capsule with a role in virulence in the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Environmental Microbiology*, 23(9), 4859–4880.
- McMurtrie, J., Verner-Jeffreys, D. W., Cochrane-Dyet, T., White, P., van Aerle, R., Ryder, D., Stone, D., Green, M., Feist, S. W., & Cano, I. (2019). Health assessment of the cleaner fish ballan wrasse *Labrus bergylta* from the British south-west coast. *Diseases of Aquatic Organisms*, 136(2), 133–146.
- Meadow, N. D., Revuelta, R., Chen, V. N., Colwell, R. R., & Roseman, S. (1987). Phosphoenolpyruvate: glyucose phosphotransferase system in species of *Vibrio*, a widely distributed marine bacterial genus. *Journal of Bacteriology*, 169(11), 4893–4900.
- Meeske, A. J., Riley, E. P., Robins, W. P., Uehara, T., Mekalanos, J. J., Kahne, D., Walker, S., Kruse, A. C., Bernhardt, T. G., & Rudner, D. Z. (2016). SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature*, 537(7622), 634–638.
- Mergulhão, F. J. M., Monteiro, G. A., Cabral, J. M. S., & Taipa, M. A. (2004). Design of bacterial vector systems for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(1), 1–14.
- Merrell, D. S., Hava, D. L., & Camilli, A. (2002). Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1471–1491.
- Mey, A. R., Wyckoff, E. E., Kanukurthy, V., Fisher, C. R., & Payne, S. M. (2005). Iron and Fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of Fur in virulence. *Infection and Immunity*, 73(12), 8167–8178.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nature methods*, 19(6), 679–682.

- Mohamad, N., Mustafa, M., Amal, M. N. A., Saad, M. Z., Md Yasin, I. S., & Al-saari, N. (2019). Environmental Factors Associated with the Presence of *Vibrionaceae* in Tropical Cage-Cultured Marine Fishes. *Journal of Aquatic Animal Health*, 31(2), 154–167.
- Mohammadi, Y., Mesbah, M., Dezfoulnejad, M. C., Mehrgan, M. S., & Islami, H. R. (2021). Growth performance, blood biochemical parameters, immune response, and antioxidant defense of Asian seabass (*Lates calcarifer*) fingerlings exposed to monovalent and bivalent vaccines against *Streptococcus iniae* and *Vibrio harveyi*. *Aquaculture International*, 29(6), 2751–2767.
- Möll, A., Dörr, T., Alvarez, L., Davis, B. M., Cava, F., & Waldor, M. K. (2015). A D, D-carboxypeptidase is required for *Vibrio cholerae* halotolerance. *Environmental Microbiology*, 17(2), 527.
- Montanari, M. P., Pruzzo, C., Pane, L., & Colwell, R. R. (1999). Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). *FEMS Microbiology Ecology*, 29(3), 241–247.
- Mopper, K., Dawson, R., Liebezeit, G., & Ittekkot, V. (1980). The monosaccharide spectra of natural waters. *Marine Chemistry*, 10(1), 55–66.
- Morick, D., Blum, S. E., Davidovich, N., Zemah-Shamir, Z., Bigal, E., Itay, P., Rokney, A., Nasie, I., Feldman, N., Flecker, M., Roditi-Elasar, M., Aharoni, K., Zuriel, Y., Wosnick, N., Tchernov, D., & Scheinin, A. P. (2023). *Photobacterium damsela* subspecies *damsela* pneumonia in dead, stranded bottlenose dolphin, eastern Mediterranean Sea. *Emerging Infectious Diseases*, 29(1), 179–183.
- Morris, J. G., Wilson, R., Hollis, D., Weaver, R., Miller, H., Tacket, C., Hickman, F., & Blake, P. (1982). Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. *The Lancet*, 319(8284), 1294–1297.
- Motes, M. L., Depaola, A., Cook, D. W., Veazey, J. E., Hunsucker, J. C., Garthright, W. E., Blodgett, R. J., & Chirtel, S. J. (1998). Influence of water temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* in Northern Gulf and Atlantic Coast oysters (*Crassostrea virginica*).

- Applied And Environmental Microbiology*, 64(4), 1459–1465.
- Mouriño, S., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2004). Characterization of heme uptake cluster genes in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. *Journal of Bacteriology*, 186(18), 6159–6167.
- Muniesa, A., Basurco, B., Aguilera, C., Furones, D., Reverté, C., Sanjuan-Vilaplana, A., Jansen, M. D., Brun, E., & Tavornpanich, S. (2020). Mapping the knowledge of the main diseases affecting sea bass and sea bream in Mediterranean. *Transboundary and Emerging Diseases*, 67(3), 1089–1100.
- Murdoch, C. C., & Skaar, E. P. (2022). Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host-pathogen interface. *Nature Reviews. Microbiology*, 20(11), 657–670.
- Nagata, T., & Kirchman, D. L. (1992). Release of macromolecular organic complexes by heterotrophic marine flagellates. *Marine Ecology Progress Series*, 83, 233–240.
- Nakamura, Y., Uchihira, M., Ichimiya, M., Morita, K., & Muto, M. (2007). Necrotizing fasciitis of the leg due to *Photobacterium damsela*. *The Journal of Dermatology*, 35(1), 44–45.
- Nguyen, H. T., Nguyen, T. T. T., Chen, Y.-C., Vu-Khac, H., Wang, P.-C., & Chen, S.-C. (2018). Enhanced immune responses and effectiveness of refined outer membrane protein vaccines against *Vibrio harveyi* in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*). *Journal of Fish Diseases*, 41(9), 1349–1358.
- Nonaka, L., Maruyama, F., Miyamoto, M., Miyakoshi, M., Kurokawa, K., & Masuda, M. (2012). Novel conjugative transferable multiple drug resistance plasmid pAQU1 from *Photobacterium damsela* subsp. *damselae* isolated from marine aquaculture environment. *Microbes and Environments*, 27(3), 263–272.
- Nora, L. C., Westmann, C. A., Martins-Santana, L., Alves, L. de F., Monteiro, L. M. O., Guazzaroni, M. E., & Silva-Rocha, R. (2019). The art of vector engineering: towards the construction of next-generation genetic tools. *Microbial Biotechnology*, 12(1), 125–147.

- Obendorf, D. L., Carson, J., & McManus, T. J. (1987). *Vibrio damsela* infection in a stranded leatherback turtle (*Dermochelys coriacea*). *Journal of Wildlife Diseases*, 23(4), 666–668.
- Oliver-Guimerá, A., Lourdes Abarca, M., Cuvertoret-Sanz, M., & Domingo, M. (2019). Fatal *Photobacterium damsela*-induced enteritis in a leatherback turtle *Dermochelys coriacea*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 135(2), 151–156.
- Ortigosa, M., Esteve, C., & Pujalte, M. J. (1989). *Vibrio* species in seawater and mussels: abundance and numerical taxonomy. *Systematic and Applied Microbiology*, 12(3), 316–325.
- Osorio, C. R., Romalde, J. L., Barja, J. L., & Toranzo, A. E. (2000). Presence of phospholipase-D (dly) gene coding for damselysin production is not a pre-requisite for pathogenicity in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Microbial Pathogenesis*, 28(2), 119–126.
- Osorio, C. R., Toranzo, A. E., Romalde, J. L., & Barja, J. L. (2000). Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 40, 177–183.
- Osorio, C. R., Vences, A., Matanza, X. M., & Terceti, M. S. (2018). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen with unique virulence factors and high genetic diversity. *Journal of Bacteriology*, 200(15), e00002-e18.
- Ottaviani, D., Bacchiocchi, I., Masini, L., Leoni, F., Carraturo, A., Giammarioli, M., & Sbaraglia, G. (2001). Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 18(2), 135–140.
- Outten, F. W., Djaman, O., & Storz, G. (2004). A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 52(3), 861–872.
- Overton T. W. (2014). Recombinant protein production in bacterial hosts. *Drug discovery today*, 19(5), 590–601.

- Pacheco-Sandoval, A., Lago-Lestón, A., Abadía-Cardoso, A., Solana-Arellano, E., & Schramm, Y. (2022). Age as a primary driver of the gut microbial composition and function in wild harbor seals. *Scientific Reports*, *12*(1), 14641.
- Pajuelo, D., Lee, C. Te, Roig, F. J., Hor, L. I., & Amaro, C. (2015). Novel host-specific iron acquisition system in the zoonotic pathogen *Vibrio vulnificus*. *Environmental Microbiology*, *17*(6), 2076–2089.
- Pan, L., Leung, P. C., & Gu, J. D. (2010). A new ColE1-like plasmid group revealed by comparative analysis of the replication proficient fragments of *Vibrionaceae* plasmids. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *20*(8), 1163–1178.
- Park, N. G., Silphaduang, U., Moon, H. S., Seo, J.-K., Corrales, J., & Noga, E. J. (2011). Structure–activity relationships of Piscidin 4, a piscine antimicrobial peptide. *Biochemistry*, *50*(16), 3288–3299.
- Pasqua, M., Grossi, M., Zennaro, A., Fanelli, G., Micheli, G., Barras, F., Colonna, B., & Prosseda, G. (2019). The varied role of efflux pumps of the MFS family in the interplay of bacteria with animal and plant cells. *Microorganisms*, *7*(9), 285.
- Payne, S. M., Mey, A. R., & Wyckoff, E. E. (2016). *Vibrio* iron transport: evolutionary adaptation to life in multiple environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *80*(1), 69-90.
- Pedersen, K., Dalsgaard, I., & Larsen, J. L. (1997). *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Applied and Environmental Microbiology*, *63*(9), 3711.
- Pedersen, K., Skall, H. F., Lassen-Nielsen, A. M., Bjerrum, L., & Olesen, N. J. (2009). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging pathogen in Danish rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), mariculture. *Journal of Fish Diseases*, *32*(5), 465–472.
- Pérez M.J., Rodríguez L.A., & Nieto T.P. (1998). The acetylcholinesterase ichthyotoxin is a common component in the

- extracellular products of *Vibrionaceae* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 84(1), 47–52.
- Perez-Tirse, J. (1993). *Vibrio damsela*. A cause of fulminant septicemia. *Archives of Internal Medicine*, 153(15), 1838–1840.
- Petchimuthu, M., Rosalind George, M., Riji John, K., & Santhana Kumar, V. (2022). Pathogenicity potential of antimicrobial-resistant *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from maricultured and wild-caught fish of the southeast coast of India. *Aquaculture Research*, 53(12), 4505–4520.
- Peters, L., Chikweto, A., Mckibben, J., & Gibson, K. (2021). Potential for scombroid poisoning from ingestion of *Selar crumenophthalmus* due to increased histamine levels in Grenada, West Indies. *Journal of Food Protection*, 84(3), 368–371.
- Peterson J. W. (1996). Chapter 7: Bacterial Pathogenesis. Baron S. (Ed.). *Medical Microbiology*, 4th edition. Galveston (TX): University of Texas. Medical Branch at Galveston.
- Philippe, N., Alcaraz, J. P., Coursange, E., Geiselmann, J., & Schneider, D. (2004). Improvement of pCVD442, a suicide plasmid for gene allele exchange in bacteria. *Plasmid*, 51(3), 246–255.
- Poobalane, S., Thompson, K. D., Ardó, L., Verjan, N., Han, H.-J., Jeney, G., Hirono, I., Aoki, T., & Adams, A. (2010). Production and efficacy of an *Aeromonas hydrophila* recombinant S-layer protein vaccine for fish. *Vaccine*, 28(20), 3540–3547.
- Pridgeon, J. W., & Klesius, P. H. (2012). Major bacterial diseases in aquaculture and their vaccine development. *CABI Reviews*, 2012, 1–16.
- Puentes, B., Balado, M., Bermúdez-Crespo, J., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2017). A proteomic analysis of the iron response of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* reveals metabolic adaptations to iron levels changes and novel potential virulence factors. *Veterinary Microbiology*, 201, 257–264.

- Pujalte, M. J., Sitjà-Bobadilla, A., Álvarez-Pellitero, P., & Garay, E. (2003). Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Diseases of Aquatic Organisms*, 54, 119–126.
- Raharjo, H. M., Budiyanah, H., Mursalim, M. F., Chokmangmeepisarn, P., Sakulworakan, R., Madyod, S., Sewaka, M., Sonthi, M., Debnath, P. P., Elayaraja, S., Rung-ruangkijkrai, T., Dong, H. T., & Rodkhum, C. (2022). Distribution of *Vibrionaceae* in farmed Asian sea bass, *Lates calcarifer* in Thailand and their high prevalence of antimicrobial resistance. *Journal of Fish Diseases*, 45(9), 1355–1371.
- Randa, M. A., Polz, M. F., & Lim, E. (2004). Effects of temperature and salinity on *Vibrio vulnificus* population dynamics as assessed by quantitative PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5469–5476.
- Rao, N. V, Shashidhar, R., & Bandekar, J. R. (2013). Comparative analysis of induction of osmotic-stress-dependent genes in *Vibrio vulnificus* exposed to hyper- and hypo-osmotic stress. *Canadian Journal of Microbiology*, 59(5), 333–338.
- Rasheedkhan Regina, V., Noorian, P., Sim, C. B. W., Constancias, F., Kaliyamoorthy, E., Booth, S. C., Espinoza-Vergara, G., Rice, S. A., & McDougald, D. (2022). Loss of the acetate switch in *Vibrio vulnificus* enhances predation defense against *Tetrahymena pyriformis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(2), e0166521–e0166521.
- Río, S. J., Osorio, C. R., & Lemos, M. L. (2005). Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of *hutA* pseudogenes. *Archives of Microbiology*, 183(5), 347–358.
- Rivas, A. J., Balado, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2011). The *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* hemolysins damselysin and HlyA are encoded within a new virulence plasmid. *Infection and Immunity*, 79(11), 4617–4627.

- Rivas, A. J., Balado, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2013). Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, 81(9), 3287–3299.
- Rivas, A. J., Labella, A. M., Borrego, J. J., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2014). Evidence for horizontal gene transfer, gene duplication and genetic variation as driving forces of the diversity of haemolytic phenotypes in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *FEMS Microbiology Letters*, 355(2), 152–162.
- Rivas, A. J., Vences, A., Husmann, M., Lemos, M. L., & Osorio, C. R. (2015). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors Dly, plasmid-encoded HlyA, and chromosome-encoded HlyA are secreted via the type II secretion system. *Infection and Immunity*, 83(4), 1246–1256.
- Rivas, A. J., von Hoven, G., Neukirch, C., Meyenburg, M., Qin, Q., Füsler, S., Boller, K., Lemos, M. L., Osorio, C. R., & Husmann, M. (2015). Phobalysin, a Small  $\beta$ -Pore-Forming Toxin of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infection and Immunity*, 83(11), 4335–4348.
- Rivas, A.J. (2012). *Caracterización genética de factores de virulencia en Photobacterium damsela: bases moleculares de la actividad hemolítica*. [Tesis doctoral, Universidade de Santiago de Compostela]. <http://hdl.handle.net/10347/6086>
- Rodger, H. D. (2016). Fish Disease Causing Economic Impact in Global Aquaculture. In *Fish Vaccines* (pp. 1–34). Springer Basel.
- Rodríguez-Beltrán, J., De la Fuente, J., León-Sampedro, R., MacLean, R. C., & San Millán, Á. (2021). Beyond horizontal gene transfer: the role of plasmids in bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 19(6), 347–359.
- Roig, F. J., & Amaro, C. (2009). Plasmid diversity in *Vibrio vulnificus* biotypes. *Microbiology*, 155(2), 489–497.

- Romalde, J. L. (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5(1), 3–9.
- Rouches, M. V., Xu, Y., Cortes, L. B. G., & Lambert, G. (2022). A plasmid system with tunable copy number. *Nature Communications*, 13(1), 1–12.
- Rozen, Y., Larossa, R. A., Templeton, L. J., Smulski, D. R., & Belkin, S. (2002). Gene expression analysis of the response by *Escherichia coli* to seawater. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 15–25.
- Runyen-Janecky, L. J., & Payne, S. M. (2002). Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. *Infection and immunity*, 70(8), 4379–4388.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environmental Microbiology*, 11(2), 432–445.
- Sahu, K. K., Sherif, A. A., & Davaro, R. (2019). A rare cause of cellulitis: *Photobacterium damsela*. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 8(1), 25–26.
- Sakata, T., Matsuura, M., & Shimokawa, Y. (1989). Characteristics of *Vibrio damsela* isolated from diseased yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55(1), 135–141.
- Salvador, M., Argandoña, M., Naranjo, E., Piubeli, F., Nieto, J. J., Csonka, L. N., & Vargas, C. (2018). Quantitative RNA-seq analysis unveils osmotic and thermal adaptation mechanisms relevant for ectoine production in *Chromohalobacter salexigens*. *Frontiers in microbiology*, 9, 1845.
- Sarkar, S. K., Chowdhury, C., & Ghosh, A. S. (2010). Deletion of penicillin-binding protein 5 (PBP5) sensitises *Escherichia coli* cells to  $\beta$ -lactam agents. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(3), 244–249.

- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682.
- Schoenfeld, D. (1981). The asymptotic properties of nonparametric tests for comparing survival distributions. *Biometrika*, 68(1), 316–319.
- Schoeffield, A. J., & Williams, H. N. (1990). Efficiencies of recovery of bdellovibrios from brackish- water environments by using various bacterial species as prey. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(1), 230–236.
- Schröttner P, Tille E, Lück C, Bunk B. (2020). Wound infection caused by *Photobacterium damsela* in a 33-year-old woman: case report and review of literature. *GMS Infectious Diseases*; 8: Doc23.
- Schwartz, J. M., Taleghani, E. R., Natal-Albelo, E. J., Chhabra, A. B., & Freilich, A. M. (2022). Successfully treated upper-extremity necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela*. *Journal of Hand Surgery Global Online*, 5(2), 225–230.
- Seidler, R. J., Allen, D. A., Colwell, R. R., Joseph, S. W., & Daily, O. P. (1980). Biochemical characteristics and virulence of environmental group F bacteria isolated in the United States. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(4), 715–720.
- SGP-MAPA. (2022). *Contribución de España a las Directrices estratégicas para una acuicultura de la UE más sostenible y competitiva 2021-2030*. Secretaría General de pesca. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, España. 170 páginas.
- Shah, P., Nanduri, B., Swiatlo, E., Ma, Y., & Pendarvis, K. (2011). Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology*, 157(2), 504–515.

- Shao, P., Yong, P., Zhou, W., Sun, J., Wang, Y., Tang, Q., Ren, S., Wu, Z., Zhao, C., Xu, Y., & Wang, X. (2019). First isolation of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from half-smooth tongue sole suffering from skin-ulceration disease. *Aquaculture*, *511*, 734208.
- Sharma, S. R. K., Pradeep, M. A., Sadu, N., Dube, P. N., & Vijayan, K. K. (2016). First report of isolation and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from cage-farmed cobia (*Rachycentron canadum*). *Journal of Fish Diseases*, *40*(7), 953–958.
- Sheldon, J. R., Laakso, H. A., & Heinrichs, D. E. (2016). Iron acquisition strategies of bacterial pathogens. *Microbiology spectrum*, *4*(2), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0010-2015.
- Skåne, A., Loose, J. S. M., Vaaje-Kolstad, G., & Askarian, F. (2022). Comparative proteomic profiling reveals specific adaption of *Vibrio anguillarum* to oxidative stress, iron deprivation and humoral components of innate immunity. *Journal of proteomics*, *251*, 104412.
- Shikuma, N. J., & Yildiz, F. H. (2009). Identification and characterization of OscR, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*, *191*(13), 4082–4096.
- Shikuma, N. J., Davis, K. R., Fong, J. N. C., & Yildiz, F. H. (2013). The transcriptional regulator, CosR, controls compatible solute biosynthesis and transport, motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Environmental Microbiology*, *15*(5), 1387–1399.
- Shoesmith, J. G., & Sherris, J. C. (1960). Studies on the Mechanism of Arginine-Activated Motility in a *Pseudomonas* Strain. *Journal of General Microbiology*, *22*(1), 10–24.
- Shu, C. J., & Zhulin, I. B. (2002). ANTAR: an RNA-binding domain in transcription antitermination regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, *27*(1), 3–5.

- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., De Las Heras, A., Páez-Espino, A. D., Durante-Rodríguez, G., Kim, J., Nikel, P. I., Platero, R., & De Lorenzo, V. (2013). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Research*, *41* (Database issue), D666.
- Smith, S. K., Sutton, D. C., Fuerst, J. A., & Reichelt, J. L. (1991). Evaluation of the genus *Listonella* and reassignment of *Listonella damsela* (Love *et al.*) MacDonell and Colwell to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* comb. nov. with an Emended Description. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *41*(4), 529–534.
- Snieszko S, Piotrowska W, Kocylowski B, Marek K. 1938. Badania bakteriologiczne i serologiczne nad bakteriami posocznicy karpi. Memoires de l'Institut d'Ichtyobiologie et Pisciculture de la Station de Pisciculture Experimentale a Mydlniki de l'Universite Jagiellonienne a Cracovie Nr 38.
- Sogin, E.M., Michellod, D., Gruber-Vodicka, H. R., Bourceau, P., Geier, B., Meier, D. V., Seidel, M., Ahmerkamp, S., Schorn, S., D'Angelo, G., Procaccini, G., Dubilier, N., & Liebeke, M. (2022). Sugars dominate the seagrass rhizosphere. *Nature Ecology & Evolution*, *6*(7), 866–877.
- Sogin, E.M., Puskás, E., Dubilier, N., & Liebeke, M. (2019). Marine Metabolomics: a method for nontargeted measurement of metabolites in seawater by gas chromatography-mass spectrometry. *mSystems*, *4*(6), e00638-19.
- Sousa, A., Bourgard, C., Wahl, L. M., & Gordo, I. (2013). Rates of transposition in *Escherichia coli*. *Biology Letters*, *9*(6), 2–5.
- Stephens, F. J., Raidal, S. R., Buller, N., & Jones, B. (2006). Infection with *Photobacterium damsela* subspecies *damsela* and *Vibrio harveyi* in snapper, *Pagrus auratus* with bloat. *Australian Veterinary Journal*, *84*(5), 173–177.

- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Pankhurst, L., de Maio, N., Moore, C. E., Sebra, R., Turner, P., Anson, L. W., Kasarskis, A., Batty, E. M., Kos, V., Wilson, D. J., Phetsouvanh, R., Wyllie, D., Sokurenko, E., Manges, A. R., Johnson, T. J., Price, L. B., Peto, T. E. A., ... Crook, D. W. (2016). Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. *MBio*, 7(2), e02162.
- Stogios, P. J., & Savchenko, A. (2020). Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 29(3), 654–669.
- Stokes, J. M., French, S., Ovchinnikova, O. G., Bouwman, C., Whitfield, C., & Brown, E. D. (2016). Cold stress makes *Escherichia coli* susceptible to glycopeptide antibiotics by altering outer membrane integrity. *Cell Chemical Biology*, 23(2), 267–277.
- Su, Y., Peng, B., Han, Y., Li, H., & Peng, X. (2015). Fructose restores susceptibility of multidrug-resistant *Edwardsiella tarda* to kanamycin. *Journal of Proteome Research*, 14(3), 1612–1620.
- Su, Y.-B., Peng, B., Li, H., Cheng, Z.-X., Zhang, T.-T., Zhu, J.-X., Li, D., Li, M.-Y., Ye, J.-Z., Du, C.-C., Zhang, S., Zhao, X.-L., Yang, M.-J., & Peng, X.-X. (2018). Pyruvate cycle increases aminoglycoside efficacy and provides respiratory energy in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(7), 1578–1587.
- Sulumane Ramachandra, K. S., Dube, P. N., Pandikkadan Sundaran, S., Kalappurakkal Gopalan, M., Mangottil Ayyappan, P., & Nandiath Karayi, S. (2021). Coinfection with two strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* and *Vibrio harveyi* in cage farmed cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). *Aquaculture Research*, 52(4), 1525–1537.
- Sureka, K., Dey, S., Datta, P., Singh, A. K., Dasgupta, A., Rodrigue, S., Basu, J., & Kundu, M. (2007). Polyphosphate kinase is involved in stress-induced mprAB-sigE-rel signalling in mycobacteria. *Molecular Microbiology*, 65(2), 261–276.

- Taggart, J. C., Lalanne, J. B., & Li, G. W. (2021). Quantitative control for stoichiometric protein synthesis. *Annual Review of Microbiology*, 75, 243–267.
- Takahashi, H., Miya, S., Kimura, B., Yamane, K., Arakawa, Y., & Fujii, T. (2008). Difference of genotypic and phenotypic characteristics and pathogenicity potential of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* between clinical and environmental isolates from Japan. *Microbial Pathogenesis*, 45(2), 150–158.
- Tang, W. M., & Wong, J. W. K. (1999). Necrotizing fasciitis caused by *Vibrio damsela*. *Orthopedics*, 22(4), 443–444.
- Tao, Z., Shen, C., Zhou, S.-M., Yang, N., Wang, G.-L., Wang, Y.-J., & Xu, S.-L. (2018). An outbreak of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* infection in cultured silver pomfret *Pampus argenteus* in Eastern China. *Aquaculture*, 492, 201–205.
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., & Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic acids research*, 44(14), 6614–6624.
- Terceti, M. S., Ogut, H., & Osorio, C. R. (2016). *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the black sea: evidence of a multiclonal origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(13), 3736–3745.
- Terceti, M. S., Rivas, A. J., Alvarez, L., Noia, M., Cava, F., & Osorio, C. R. (2017). *rstB* regulates expression of the *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors Damselysin, Phobalysin P and Phobalysin C. *Frontiers in microbiology*, 8, 582.
- Terceti, M. S., Vences, A., Matanza, X. M., Barca, A. V., Noia, M., Lisboa, J., Dos Santos, N. M. S., do Vale, A., & Osorio, C. R. (2019). The RstAB system impacts virulence, motility, cell morphology, penicillin tolerance and production of Type II Secretion System-dependent factors in the fish and human pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Frontiers in Microbiology*, 10, 897.

- Terceti, M. S., Vences, A., Matanza, X. M., Dalsgaard, I., Pedersen, K., & Osorio, C. R. (2018). Molecular epidemiology of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* outbreaks in marine rainbow trout farms reveals extensive horizontal gene transfer and high genetic diversity. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 2155.
- The World Bank Annual Report 2014. In *World Bank Annual Report*. The World Bank.
- Thomas, M. S., & Wigneshweraraj, S. (2014). Regulation of virulence gene expression. *Virulence*, *5*(8), 832–834.
- Thompson, J. R., Pacocha, S., Pharino, C., Klepac-Ceraj, V., Hunt, D. E., Benoit, J., Sarma-Rupavtarm, R., Distel, D. L., & Polz, M. F. (2005). Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science*, *307*(5713), 1311–1313.
- Thyssen, A., Grisez, L., Van Houdt, R., & Ollevier, F. (1998). Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, *48*(4), 1145–1151.
- Tokumar, M., & Ferri, A. G. (1970). Histochemistry of the pigments found in the liver, spleen and kidney of the fresh-water fish. *Revista brasileira de biologia*, *30*(2), 163–171.
- Torido, Y., Ohshima, C., Takahashi, H., Miya, S., Iwakawa, A., Kuda, T., & Kimura, B. (2014). Distribution of psychrophilic and mesophilic histamine-producing bacteria in retailed fish in Japan. *Food Control*, *46*, 338–342.
- Uzun, E., & Ogut, H. (2015). The isolation frequency of bacterial pathogens from sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in the southeastern Black Sea. *Aquaculture*, *437*, 30–37.
- Valdenegro-Vega, V., Naeem, S., Carson, J., Bowman, J. P., Tejedor del Real, J. L., & Nowak, B. (2013). Culturable microbiota of ranched southern bluefin tuna (*Thunnus maccoyii* Castelnau). *Journal of Applied Microbiology*, *115*(4), 923–932.
- Vander Wauven, C., Piérard, A., Kley-Raymann, M., & Haas, D. (1984). *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic

- growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *Journal of Bacteriology*, 160(3), 928–934.
- Vaser, R., Sović, I., Nagarajan, N., & Šikić, M. (2017). Fast and accurate de novo genome assembly from long uncorrected reads. *Genome research*, 27(5), 737–746.
- Vences, A., Abushattal, S., Matanza, X. M., Dubert, J., Uzun, E., Ogut, H., & Osorio, C. R. (2020). Highly transferable pAQU-related plasmids encoding multidrug resistance are widespread in the human and fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in aquaculture areas in the Black Sea. *Microbial Ecology*, 80(3), 507–518.
- Vences, A., Rivas, A. J., Lemos, M. L., Husmann, M., & Osorio, C. R. (2017). Chromosome encoded hemolysin, phospholipase, and collagenase in plasmidless isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* contribute to virulence for fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(11), e00401-17.
- Vera, P. (1991). First isolation of *Vibrio damsela* from sea bream (*Sparus aurata*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11, 112.
- Vezzulli, L., Colwell, R. R., & Pruzzo, C. (2013). Ocean warming and spread of pathogenic *Vibrios* in the aquatic environment. *Microbial Ecology*, 65(4), 817–825.
- Volterra, L., Aulicino, F. A., Bonadonna, L., de Mattia, M., di Girolamo, I., Liberti, R., & Mancini, L. (1992). Microbial analyses of Adriatic Sea mucilages. *Marine Coastal Eutrophication* (pp. 551–556).
- Von Hoven, G., Neukirch, C., Meyenburg, M., Schmidt, S., Vences, A., Osorio, C. R., Husmann, M., & Rivas, A. J. (2018). Cytotoxin- and chemotaxis-genes cooperate to promote adhesion of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2996.

- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS one*, 9(11), e112963.
- Wang, CZ., Lin, GR., Yan, T., Zheng, ZP., Chen, B., & Sun, FL. (2014). The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fisheries Science*, 80(5), 1001–1007.
- Wang, F. I., & Chen, J. C. (2006). Effect of salinity on the immune response of tiger shrimp *Penaeus monodon* and its susceptibility to *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(5), 671–681.
- Wang, J., Vine, C. E., Balasiny, B. K., Rizk, J., Bradley, C. L., Tinajero-Trejo, M., Poole, R. K., Bergaust, L. L., Bakken, L. R., & Cole, J. A. (2016). The roles of the hybrid cluster protein, Hcp and its reductase, Hcr, in high affinity nitric oxide reduction that protects anaerobic cultures of *Escherichia coli* against nitrosative stress. *Molecular Microbiology*, 100(5), 877–892.
- Wang, R. F., & Kushner, S. R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 100, 195–199.
- Wang, Z., Shi, C., Wang, H., Wan, X., Zhang, Q., Song, X., Li, G., Gong, M., Ye, S., Xie, G., & Huang, J. (2020). A novel research on isolation and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* from Pacific white shrimp, *Penaeus vannamei*, displaying black gill disease cultured in China. *Journal of Fish Diseases*, 43(5), 551–559.
- Weaver, A. I., Murphy, S. G., Umans, B. D., Tallavajhala, S., Onyekwere, I., Wittels, S., Shin, J.-H., VanNieuwenhze, M., Waldor, M. K., & Dörr, T. (2018). Genetic determinants of penicillin tolerance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), e01326-18.

- Whitaker, W. B., Parent, M. A., Boyd, A., Richards, G. P., & Boyd, E. F. (2012). The *Vibrio parahaemolyticus* ToxRS regulator is required for stress tolerance and colonization in a novel orogastric streptomycin induced adult murine model. *Infection and Immunity*, 80(5), 1834–1845.
- Whitaker, W. B., Parent, M. A., Naughton, L. M., Richards, G. P., Blumerman, S. L., & Boyd, E. F. (2010). Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4720–4729.
- Williams, T. C., Blackman, E. R., Morrison, S. S., Gibas, C. J., & Oliver, J. D. (2014). Transcriptome sequencing reveals the virulence and environmental genetic programs of *Vibrio vulnificus* exposed to host and estuarine conditions. *PLoS ONE*, 9(12), 1–27.
- Wolke R.E. (1992). Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 91–108.
- Xi, D., Li, Y., Yan, J., Li, Y., Wang, X., & Cao, B. (2020). Small RNA coaR contributes to intestinal colonization in *Vibrio cholerae* via the two-component system EnvZ/OmpR. *Environmental microbiology*, 22(10), 4231–4243.
- Xie, J., Mei, H., Jin, S., Bu, L., Wang, X., Wang, C., Zhao, Q., Ma, R., & Zhou, S. (2021). First report of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* infection in the mud crab *Scylla paramamosain* cultured in China. *Aquaculture*, 530, 735880.
- Xing, J., Zhang, Z., Luo, K., Tang, X., Sheng, X., & Zhan, W. (2020). T and B lymphocytes immune responses in flounder (*Paralichthys olivaceus*) induced by two forms of outer membrane protein K from *Vibrio anguillarum*: Subunit vaccine and DNA vaccine. *Molecular Immunology*, 118, 40–51.
- Xiong, L., Teng, J. L. L., Watt, R. M., Kan, B., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2014). Arginine deiminase pathway is far more important than urease for acid resistance and intracellular survival in *Laribacter hongkongensis*: a possible result of *arc* gene cassette

- duplication. *BMC Microbiology*, *14*, 42.
- Xu, C., Ren, H., Wang, S., & Peng, X. (2004). Proteomic analysis of salt-sensitive outer membrane proteins of *Vibrio parahaemolyticus*. *Research in Microbiology*, *155*(10), 835–842.
- Xu, J., Dong, F., Wu, M., Tao, R., Yang, J., Wu, M., Jiang, Y., Yang, S., & Yang, L. (2021). *Vibrio natriegens* as a pET-Compatible expression host complementary to *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 627181.
- Xu, J., Yang, S., & Yang, L. (2022). *Vibrio natriegens* as a host for rapid biotechnology. *Trends in Biotechnology*, *40*(4), 381–384.
- Yamamoto, S., Chowdhury, M. A. R., Kuroda, M., Nakano, T., Koumoto, Y., & Shinoda, S. (1991). Further study on polyamine compositions in *Vibrionaceae*. *Canadian Journal of Microbiology*, *37*(2), 148–153.
- Yamane, K., Asato, J., Kawade, N., Takahashi, H., Kimura, B., & Arakawa, Y. (2004). Two cases of fatal necrotizing fasciitis caused by *Photobacterium damsela* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(3), 1370–1372.
- Yang, J., Zeng, Z.-H., Yang, M.-J., Cheng, Z.-X., Peng, X.-X., & Li, H. (2018). NaCl promotes antibiotic resistance by reducing redox states in *Vibrio alginolyticus*. *Environmental Microbiology*, *20*(11), 4022–4036.
- Yang, L., Zhan, L., Han, H., Gao, H., Guo, Z., Qin, C., Yang, R., Liu, X., & Zhou, D. (2010). The low-salt stimulon in *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology*, *137*(1), 49–54.
- Yu, J., Kang, M. J., Kim, Y. J., Park, M. J., Lim, J. K., Noh, C. H., Kang, S. G., Lee, H. S., Lee, J. H., & Kwon, K. K. (2021). Comparison of intestine microbiota between wild and farmed korean rockfish, *Sebastes schlegelii*. *Ocean Science Journal*, *56*(3), 297–306.

- Yuen, K.-Y., Ma, L., Wong, S. S. Y., & Ng, W.-F. (1993). Fatal necrotizing fasciitis due to *Vibrio damsela*. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 25(5), 659–661.
- Zeaiter, Z., Mapelli, F., Crotti, E., & Borin, S. (2018). Methods for the genetic manipulation of marine bacteria. *Electronic Journal of Biotechnology*, 33, 17–28.
- Zhang, X.-J., Qin, G.-M., Bing, X.-W., Yan, B.-L., & Bi, K.-R. (2011). Phenotypic and molecular characterization of *Photobacterium damsela*, a pathogen of the cultured tongue sole *Cynoglossus semilaevis* in China. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 45(1), 1–13.
- Zhang, Z., Yu, Y., Wang, K., Wang, Y., Jiang, Y., Liao, M., & Rong, X. (2019). First report of skin ulceration caused by *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in net-cage cultured black rockfish (*Sebastes schlegeli*). *Aquaculture*, 503, 1–7.
- Zhao, D. H., Sun, J. J., Liu, L., Zhao, H. H., Wang, H. F., Liang, L. Q., Liu, L. B., & Li, G. F. (2009). Characterization of two phenotypes of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* isolated from diseased juvenile *Trachinotus ovatus* reared in cage mariculture. *Journal of the World Aquaculture Society*, 40(2), 281–2



## **8. ANEXO**



## **8. ANEXO**

### **8.1. DECLARACIONES: CONFLICTO DE INTERESES, ASPECTOS ÉTICOS, USO DE IMÁGENES Y CONTENIDO PUBLICADO**

#### **DECLARACIONES:**

Yo, Dña. Alba Vázquez Barca, autora de la presente tesis doctoral declaro que:

- No tengo ningún conflicto de interés relevante en lo que respecta al contenido presentado en esta tesis doctoral.

#### **ASPECTOS ÉTICOS**

- Esta tesis incluye estudios en los que se utilizan peces como modelos animales, siguiendo el RD 53/2013. El proyecto de investigación se titula "Inoculaciones experimentales de peces con bacterias patógenas y proteínas bacterianas", en el que el Prof. Dr. Carlos Rodríguez Osorio, tutor y director de esta tesis doctoral, es el investigador responsable.
- El protocolo de experimentación animal utilizado en este estudio ha sido revisado y aprobado por el Comité de Ética Animal de la Universidade de Santiago de Compostela. El número de autorización de este proyecto de experimentación animal es: 15004/2022/002.
- El trabajo se realizó en el Animalario Experimental de la Facultad de Biología de la Universidade de Santiago de Compostela, código del centro: 15004AE: ES150780263301.
- Los experimentos con animales fueron llevados a cabo por el Prof. Dr. Carlos Rodríguez Osorio, tutor y director de la presente tesis.

## USO DE IMÁGENES

Yo, Dña. Alba Vázquez Barca, autora de la presente tesis doctoral declaro que las figuras e imágenes no originales utilizadas en la presente tesis cuentan con los permisos de uso requeridos. Los detalles se recogen a continuación:

- Figura 1.1. APROMAR, 2022. “Evolución de la producción de acuicultura y pesca mundial en el periodo 1951-2020). Todas las imágenes procedentes de este informe cuentan con la autorización de la Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR) para su difusión.

Informe realizado por la Asociación Empresarial de Acuicultura de España (APROMAR).

El objetivo de este informe es dar difusión a la información en él contenida. Con este fin, APROMAR autoriza la utilización por terceros del texto, gráficos y tablas que en él se muestran con la única condición de citar a APROMAR como fuente.

Este documento está disponible en [www.apromar.es](http://www.apromar.es)

Septiembre 2022

- Figura 1.4. “Signos externos e internos en peces por infección de *P. damsela* subsp. *damsela*. (...) en palometa chilena (B) (imagen obtenida **con permiso de Gupta et al., 2021**)”. La figura cuenta con el permiso de Elsevier. Número de licencia: 5636000282138; Fecha de expedición: 25/09/2023.
- Figura 1.4 “Signos externos e internos en peces por infección de *P. damsela* subsp. *damsela*. (...) presencia de úlceras cutáneas en pez roca (D) (imagen obtenida **con permiso de Zhang et al., 2019**)”. La figura cuenta con el permiso de Elsevier. Número de licencia: 5636020700747; Fecha de expedición: 25/09/2023.
- Figura 1.5. “Manifestaciones clínicas más comunes en humanos causadas por la infección de *P. damsela* subsp. *damsela*. (A) Edema significativo con lesiones hemorrágicas (imagen obtenida **de Schwartz et al., 2022 bajo licencia CC BY-NC-ND**).” La figura procede de un artículo de acceso abierto bajo licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

- Figura 1.5 “Manifestaciones clínicas más comunes en humanos causadas por la infección de *P. damsela* subsp. *damsela*. (B) Lesión ulcerosa con hiperemia e hinchazón (imagen **obtenida de Caddia et al., 2022 bajo licencia CC BY-NC-SA 4.0**). La figura procede de un artículo publicado bajo licencia CC BY-NC-SA 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).
  - Figura 1.5 “Manifestaciones clínicas más comunes en humanos causadas por la infección de *P. damsela* subsp. *damsela*. (C) Lesión bullosa y hemorrágica (imagen obtenida **con permiso de Akram et al., 2015**). La figura cuenta con el permiso de John Wiley and Sons. Número de licencia: 5636380337653; Fecha de expedición: 26/09/2023.
- Los justificantes de los permisos obtenidos para cada figura se anexan en las siguientes páginas.

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS DOCTORAL

Barca, A. V.<sup>1</sup>, Vences, A.<sup>1</sup>, Terceti, M. S.<sup>1</sup>, do Vale, A.<sup>2,3</sup>, & Osorio, C. R.<sup>1</sup>. (2023). Low salinity activates a virulence program in the generalist marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *mSystems*, 8(3), e0125322. <https://doi.org/10.1128/mSystems.01253-22>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología e Parasitología, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>Fish Immunology and Vaccinology Group, IBMC-Instituto de Biologia Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>3</sup>i3S-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal

- **Contribución específica:** Alba V. Barca participó en la conceptualización de la investigación, en el análisis formal de los datos y en su validación. Diseñó y realizó el trabajo experimental y elaboró y editó todas las figuras. Alba V. Barca participó con Carlos R. Osorio en la redacción del borrador original, así como en la revisión y en la edición final del manuscrito.
- **Índices de calidad:** la revista en la que se publicó el artículo presenta un factor de impacto de 6.4 (Journal Citation Reports 2022), posicionada en cuartil 1 (Q1) en la categoría de Microbiología.
- **Autorización de la revista:** los artículos de la revista *mSystems* se publican bajo licencia de acceso abierto Creative Commons CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Por lo tanto, está permitido adaptar y compartir contenido de este artículo, incluyendo el texto completo.
- **Reproducción del artículo en la presente tesis:** esta tesis contiene reproducciones de este artículo en las secciones de Resumen, Introducción, Material y Métodos y en el [Apartado 4.1](#) de Resultados y Discusión. El artículo completo se recoge en las siguientes páginas.

**ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS**

Sep 25, 2023

---

---

This Agreement between Alba Vázquez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5636000282138
License date	Sep 25, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Aquaculture
Licensed Content Title	Genetic diversity of Australian isolates of <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> is associated with virulence to yellowtail kingfish ( <i>Seriola lalandi</i> )
Licensed Content Author	Nipa Gupta, Gavin J. Partridge, Nicky B. Buller, Luke Pilmer, Andrew Currie, Alan J. Lymbery
Licensed Content Date	May 30, 2021
Licensed Content Volume	538
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	1
Start Page	736552
End Page	0
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	-
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Dec 2023
Order reference number	25092023
Portions	Figure 5.A (on page 10).
Requestor Location	Alba Vázquez Dpt. of Microbiology and Parasitology Institute of Aquaculture University of Santiago de Compostela Santiago de Compostela, A Coruña 15782 Spain Attn: Alba V. Barca
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at <https://myaccount.copyright.com>).

## GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all

claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

## Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal

publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not

represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.10

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com).

---

---

ELSEVIER LICENSE  
TERMS AND CONDITIONS

Sep 25, 2023

---

This Agreement between Alba Vázquez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5636020700747
License date	Sep 25, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Aquaculture
Licensed Content Title	First report of skin ulceration caused by <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> in net-cage cultured black rockfish ( <i>Sebastes schlegeli</i> )
Licensed Content Author	Zheng Zhang, Yong-xiang Yu, Kai Wang, Yin-geng Wang, Yong Jiang, Mei-jie Liao, Xiao-jun Rong
Licensed Content Date	Mar 30, 2019
Licensed Content Volume	503
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	7
Start Page	1
End Page	7
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	-
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Dec 2023
Order reference number	25092023
Portions	Figure 3D (on page 4)
Requestor Location	Alba Vázquez Dpt. of Microbiology and Parasitology Institute of Aquaculture University of Santiago de Compostela Santiago de Compostela, A Coruña 15782 Spain Attn: Alba Vázquez
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

### INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at <https://myaccount.copyright.com>).

## GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all

claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

### LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

## Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal

publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

**18. For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

**19. Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

#### **Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

#### **Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not

represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

## 20. Other Conditions:

v1.10

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com).

---

---

## JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Sep 26, 2023

---

---

This Agreement between Alba Vázquez ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number 5636380337653

License date Sep 26, 2023

Licensed Content Publisher John Wiley and Sons

Licensed Content Publication MEDICAL JOURNAL OF AUSTRALIA

Licensed Content Title Photobacterium damsela and Vibrio harveyi hand infection from marine exposure

Licensed Content Author Pamela Konecny, Robert P Stevens, Ayesha Akram

Licensed Content Date Sep 7, 2015

Licensed Content Volume 203

Licensed Content Issue 5

Licensed Content Pages 3

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type University/Academic

Format Print and electronic

Portion Figure/table

Number of figures/tables	1
Will you be translating?	No
Title	-
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Dec 2023
Order reference number	26092023
Portions	Figure B (Page 224)
Requestor Location	Alba Vázquez Dpt. of Microbiology and Parasitology Institute of Aquaculture Universidade de Santiago de Compostela Santiago de Compostela, A Coruña 15782 Spain Attn: Alba V. Barca
Publisher Tax ID	EU826007151
Total	0.00 EUR
Terms and Conditions	

### TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

#### Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.

- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach

of this Agreement by you.

- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.

- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

## WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

### The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

### Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

### Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

### Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library  
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

### Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com).



# Low salinity activates a virulence program in the generalist marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*

Alba V. Barca,<sup>1</sup> Ana Vences,<sup>1</sup> Mateus S. Terceti,<sup>1</sup> Ana do Vale,<sup>2,3</sup> Carlos R. Osorio<sup>1</sup>

**AUTHOR AFFILIATIONS** See affiliation list on p. 27.

**ABSTRACT** Facultative marine bacterial pathogens sense environmental signals so that the expression of virulence factors is upregulated on entry into hosts and downregulated during the free-living lifestyle in the environment. In this study, we utilized transcriptome sequencing to compare the transcriptional profiles of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen that causes disease in diverse marine animals and fatal infections in humans at NaCl concentrations that mimic the free-living lifestyle or host internal milieu, respectively. We here show that NaCl concentration constitutes a major regulatory signal that shapes the transcriptome and uncover 1,808 differentially expressed genes (888 upregulated and 920 downregulated in response to low-salt conditions). Growth at 3% NaCl, a salinity that mimics the free-living lifestyle, upregulated genes involved in energy production, nitrogen metabolism, transport of compatible solutes, utilization of trehalose and fructose, and carbohydrate and amino acid metabolism with strong upregulation of the arginine deiminase system (ADS). In addition, we observed a marked increase in resistance to antibiotics at 3% NaCl. On the contrary, the low salinity conditions (1% NaCl) that mimic those encountered in the host triggered a virulence gene expression profile that maximized the production of the type 2 secretion system (T2SS)-dependent cytotoxins damselysin, phobalysin P, and a putative PirAB-like toxin, observations that were corroborated by the analysis of the secretome. Low salinity also upregulated the expression of iron-acquisition systems, efflux pumps, and other functions related to stress response and virulence. The results of this study greatly expand our knowledge of the salinity-responsive adaptations of a generalist and versatile marine pathogen.

**IMPORTANCE** Pathogenic *Vibrionaceae* species experience continuous shifts of NaCl concentration in their life cycles. However, the impact of salinity changes in gene regulation has been studied in a small number of *Vibrio* species. In this study, we analyzed the transcriptional response of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (*Pdd*), a generalist and facultative pathogen, to changes in salinity, and demonstrate that growth at 1% NaCl in comparison to 3% NaCl triggers a virulence program of gene expression, with a major impact in the T2SS-dependent secretome. The decrease in NaCl concentration encountered by bacteria on entry into a host is proposed to constitute a regulatory signal that upregulates a genetic program involved in host invasion and tissue damage, nutrient scavenging (notably iron), and stress responses. This study will surely inspire new research on *Pdd* pathobiology, as well as on other important pathogens of the family *Vibrionaceae* and related taxa whose salinity regulons still await investigation.

**KEYWORDS** *Photobacterium damsela*, salinity, NaCl, transcriptome, secretome, virulence, hemolysin, arginine deiminase, damselysin

**B**acterial pathogens need to orchestrate the expression of virulence factors in a cell economy-driven fashion that guarantees the production of these factors only when

**Editor** E. Maggie Sogin, University of California Merced, Merced, California, USA

Address correspondence to Carlos R. Osorio, cr.osorio@usc.es.

See the funding table on p. 27.

**Received** 14 December 2022

**Accepted** 21 March 2023

**Published** 8 June 2023

Copyright © 2023 Barca et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

and where they are actually needed. This is of special importance in generalist and facultative marine pathogens that thrive in a free-living lifestyle and also are capable of colonizing and infecting animals (1). In marine ecosystems, one of the main environmental signals that is highly informative of the transition from the free-living phase in seawater bodies to an infective stage is the abrupt drop of NaCl concentration encountered on entry into the internal milieu of an animal host.

The family *Vibrionaceae* comprises a genetically and metabolically diverse group of marine bacteria, and many species include animal and human pathogenic strains (2, 3). Most species enjoy a free-living existence in ocean water, attached to organic particles, and colonizing biotic and abiotic surfaces (4, 5). Thus, the association of pathogenic *Vibrios* with animals can be considered an optional part of their life cycle, and only a very reduced number of species might be viewed as obligate pathogens. Though pathogenic *Vibrionaceae* species experience continuous shifts of NaCl concentration in their life cycles, very few species of this family have been the subject of global transcriptomic studies aimed at investigating the role of salinity in gene expression modulation. These include *Vibrio cholerae* (6, 7), *Vibrio parahaemolyticus* (8–10), *Vibrio brasiliensis* (11), and *Vibrio fujianensis* (12). However, some of these studies focused on the study of salt stress and employed NaCl conditions that do not mimic those encountered in nature (12). Other studies compared conditions that differed in NaCl concentrations but also in additional variables, as is the case of a study with *Vibrio vulnificus* grown in human serum versus seawater (13).

*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (hereafter *Pdd*), formerly known as *Vibrio damsela*, is a member of the *Vibrionaceae* that has been isolated in marine ecosystems from diverse sources such as coastal ocean waters (14), sediment (15), shellfish (16), marine bird droppings (17), digestive tract of whales (18), fish and shrimp intestines (19, 20), and internal organs of apparently healthy fish (21, 22). It is also a strong histamine-producing bacterium commonly isolated from the retail fish (23). In addition, *Pdd* is a highly versatile and virulent generalist pathogen of increasing financial concern that causes primary disease in crustaceans and in countless species of fish, wild as well as cultivated in aquaculture facilities in different parts of the globe (24, 25). Of note, *Pdd* is also an opportunistic human pathogen that can cause wound-associated infections on contact with the marine milieu and fatal necrotizing fasciitis (26).

The highly virulent strains of *Pdd* cause massive tissue damage in the infected hosts due to the plasmid (pPHDD1)-encoded cytotoxins damselysin (Dly) and phobalysin P (PhlyP), and the chromosome-encoded phobalysin C (PhlyC), which are secreted in very high amounts by the type 2 secretion system (T2SS) (27). Dly is a phospholipase D active against sphingomyelin, whereas PhlyP and PhlyC are pore-forming toxins. Additional demonstrated virulence factors of *Pdd* include a polysaccharide capsule that contributes to *Pdd* resistance to host defense mechanisms (28).

The biological and environmental signals that regulate gene expression in *Pdd* and, specifically, virulence factors are scarcely understood. Expression of the cytotoxins and biogenesis of the polysaccharide capsule are positively regulated by the two-component system RstAB (27–29), homologous to the *V. cholerae* CarSR (30), but the specific signal that triggers the activation of the RstAB system remains unknown. Previous studies have reported that iron limitation upregulates the expression of genes encoding Dly, PhlyP, and PhlyC cytotoxins (31, 32). Also, NaCl levels were found to modulate the transcriptional activity of the promoters of the three aforementioned cytotoxins (31), as well as phospholipase and hemolytic activities (33), but no further insights have been taken to study the role of salinity in *Pdd* gene regulation. In this study, we use RNA sequencing (RNA-seq) to analyze the transcriptional profiles of the highly virulent *Pdd* strain RM-71 grown at average seawater salinity (3‰ NaCl) and at the salinity of the internal milieu of vertebrate hosts (1‰ NaCl), respectively. Our results reveal that a shift from high to low salinity triggers a virulence gene expression profile with a strong impact in the T2SS-dependent secretome, including the upregulation of cytotoxins, iron-acquisition systems, and other functions potentially involved in pathogenicity.

## MATERIALS AND METHODS

### Standard culture conditions

*Pdd* strains were routinely grown at 25°C on tryptic soy agar (TSA) or tryptic soy broth (TSB) and in M9 minimal medium (34) supplemented with 0.2% casamino acids (Difco) (CM9) and 0.5% glucose. NaCl was adjusted to final concentrations of 1% (TSA-1, TSB-1, CM9-1) or 3% (TSA-3, TSB-3, CM9-3), as necessary. When necessary, antibiotics were supplied at the following final concentrations: kanamycin (Km) at 50 µg/mL and rifampicin (Rif) at 20 µg/mL.

### RNA extraction and RNA-seq

The highly virulent *Pdd* strain RM-71 selected for the present study carries the virulence plasmid pPHDD1 and was isolated from a diseased turbot in 1988 during an outbreak in Galicia (northwest Spain) (35). For RNA-seq, three independent precultures of RM-71 for each salinity condition (1% NaCl and 3% NaCl) in TSB were grown until they reached an optical density at 600 (OD<sub>600</sub>) of 0.3. Then, each preculture was diluted (1:100) and grown in 10-mL TSB until an OD<sub>600</sub> of 0.55. At this point, cultures were instantly treated with RNAProtect Bacteria Reagent (Qiagen) for RNA stabilization. Pelleted cells were resuspended in TE buffer (30 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) with 10-µL lysozyme (15 mg/mL) (Sigma-Aldrich) and 15-µL Proteinase K (20 mg/mL) (Qiagen). The RNeasy Mini Kit (Qiagen) was used for RNA extraction and on-column digestion of DNA with DNase I was performed using the RNase-free DNase kit (Qiagen). The integrity and the amount of the total RNA were evaluated using a Bioanalyzer 2100 (RNA 6000 Nano chip assay) and a Qubit 3.0 (Quant-It dsRNA BR Assay). rRNA depletion was performed with the Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Gram-negative bacteria) (Illumina), and cDNA libraries were generated using the TruSeq RNA kit in accordance with Illumina's instructions. First, rRNA-depleted RNA was chemically fragmented before being subjected to reverse transcription for cDNA synthesis. A reparative process was performed by adding a single "A" base to the 3' end of cDNA fragments following adapters' ligation. Finally, cleaned products were enriched by PCR to generate the double-stranded cDNA library that was sequenced on an Illumina HiSeq 2500 sequencer.

### RNA-seq data analysis

RNA-seq raw reads were analyzed with FastQC program as previously described (36) and mapped against the genome of RM-71 (RefSeq assembly accession no.: [GCF\\_001708035.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_001708035.2)) using the Bowtie2 v2.2.6 algorithm (37). Poor-quality readings were eliminated using PicardTools (<http://picard.sourceforge.net>). Several quality steps were performed to evaluate sequencing and mapping processes. Distribution of GC content and duplicate proportion of mappable readings were evaluated. Genetic quantification was performed by the HTSeq software (0.6.1 version) (38). A correlation and distance study between samples from the same condition was carried out to evaluate them as biological replicates. For this, the transcriptome normalized by the size of the library was analyzed with statistics program R. The analysis of the differential expression was performed using DESeq2 method (1.18.1 version) (39), and a differential negative binomial distribution was applied to determine statistical significance. A Python script developed at Sistemas Genómicos (Valencia, Spain) was employed to generate a data matrix with the counts obtained for each sample (each of the three replicates at each of the two salinities). Genes were considered as differentially expressed when fold change (FC) values were lower than -1.5 or higher than 1.5 and a *P*-value adjusted by false discovery rate (FDR) ≤ 0.05. Differentially expressed genes (DEGs) were mapped against Uniprot, COG (Cluster of Orthologous Groups), GO (Gene Ontology) and KEGG (Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) databases and analyzed using the hyper-geometric test. An FDR-adjusted *P*-value of 0.05 was used to determine a functional category as statistically significant or over-represented (40).

## Growth experiments

For growth assays, an inoculum of *Pdd* RM-71 strain adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.3 was diluted (1:100) in 100  $\mu$ L of the tested media in a 96-well plate. Bacterial cultures were incubated at 25°C under shaking conditions, and growth was monitored for 24–48 hours using the spectrophotometer Epoch2 microplate reader (BioTek). The experiments were independently performed twice, and at least two replicates per condition were included. Growth media were prepared according to the aim of the experiments as detailed below.

- **Growth in seawater microcosms.** To evaluate *Pdd* growth in marine-like microcosms, coastal seawater samples were collected at Lodeiro beach, Rianxo, Galicia (northwest Spain). One sample consisting of plain seawater without macroscopically visible particulate material was sterilized in an autoclave and named as NSW (natural seawater). A second sample of 100-mL seawater was supplemented with 30 g (wet weight) of macroalgae (*Ulva lactuca*) occurring in the surroundings of the same collection site, and the mix was mechanically ground and then boiled at 95°C for 1 minute and labeled as ESW (eutrophicated seawater). The two types of samples were supplemented with 0.2% casamino acids (Difco) when necessary. For growth experiments, three replicates per condition were prepared using an inoculum of *Pdd* RM-71 adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.3 and diluted (1:100) in 100  $\mu$ L of NSW or ESW in a 96-well plate. Bacterial growth was monitored for 24 or 48 hours using the spectrophotometer Epoch2 microplate reader (BioTek) under shaking conditions.
- **Carbohydrate-supplemented minimal medium.** *Pdd* RM-71 strain was tested for the ability to ferment the carbohydrates fructose and trehalose under different NaCl concentrations. For this purpose, OF (Oxidation/Fermentation) basal medium (Difco) was supplemented with agar (15 g/L) and NaCl to a final concentration of 1% or 3%. Fructose and trehalose (Sigma-Aldrich) were added individually to a final concentration of 0.5%, and plates were streaked with RM-71 strain from a freshly grown TSA-1 plate. Plates were incubated at 25°C and monitored for 3 days. The ability to ferment the sugars was indicated by a color change from green to acidic yellow. For growth experiments, trehalose-minimal medium and fructose-minimal medium were prepared by supplementing CM9 minimal medium with 0.5% of each carbohydrate. NaCl concentrations were adjusted to final concentrations of 1% and 3%, as necessary. Growth in CM9-minimal medium with 0.5% glucose at both NaCl concentrations was included in the experiment as a control.
- **Growth with antibiotics under different NaCl concentrations.** To assess the impact of NaCl concentration on growth in the presence of antibiotics, *Pdd* RM-71 was grown in TSB-1 and TSB-3 supplemented with kanamycin (50  $\mu$ g/mL), ampicillin (100  $\mu$ g/mL), and vancomycin (25  $\mu$ g/mL). After 40 hours, cells grown in TSB-3 were passaged (1:100) to fresh antibiotic-supplemented TSB medium at both NaCl conditions in a 96-well plate and growth was monitored for 40 hours.
- **Antimicrobial activity of piscidin peptides against *Pdd*.** Piscidin peptide 1 (PP1) was designed and produced as described by Barroso et al. (41). PP1 at 15  $\mu$ M (previously determined minimum inhibitory concentration) was serially diluted (1:2) up to a concentration of 0.12  $\mu$ M and incubated with *Pdd* RM-71 (10<sup>8</sup> CFU/mL) on TSB-1 and TSB-3 in a final volume of 100  $\mu$ L in 96-well plates. Wells without bacteria and wells with no added peptide were used as blanks and controls, respectively.

## Hemolysis and phospholipase assays

Hemolysis and phospholipase activities were evaluated on TSA plates supplemented with 5% sheep blood agar (Thermo Scientific) and 3% egg yolk extract (Oxoid), respectively. To determine the impact of NaCl concentration in the phenotypical observation of these two activities, NaCl was added to a final concentration of 1% or 3% during plate preparation. RM-71 cultures were grown in TSB-1 and TSB-3 up to an OD<sub>600</sub> of 1.2, and 2  $\mu$ L of the suspension were spotted on each assay plate and incubated at 25°C for 24–48 hours. The hemolytic and phospholipase activities were calculated by dividing the halo diameter by the colony diameter. A Student's *t*-test was used to determine statistical significance.

## Motility assays

Motility was determined using the swim-migration assay (42). For this, 4  $\mu$ L of cultures grown on TSB-1 or TSB-3 up to an OD<sub>600</sub> of 0.2 were vertically inoculated into a semisolid TSA plate, containing 0.25% agar, 10 mM of L-arginine (Sigma-Aldrich), and either 1% or 3% NaCl. Plates were incubated at 25°C under aerobic and anaerobic conditions for 24 hours and motility haloes were measured. An AnaeroJar containing AnaeroGen sachets (Thermo Fisher Scientific) was used to generate the anaerobic conditions, and resazurin strips (Thermo Fisher Scientific) were used to confirm the absence of oxygen during incubation.

## Arginine decarboxylase/dihydrolase test

Arginine Moeller's medium was used to test arginine decarboxylase/dihydrolase activity by dissolving 10 g/L of Decarboxylase Base Moeller (Difco), 10 g/L of L-arginine (Sigma-Aldrich), and supplemented with 1% or 3% NaCl. Tubes were inoculated with bacteria precultured in TSB-1 or TSB-3 medium to an OD<sub>600</sub> of 1.4 and covered with 1 mL of sterile mineral oil. A non-inoculated tube was included as a negative control. Tubes were incubated at 25°C for 48 hours and monitored every 12 hours for changes.

## Acid survival assays under different NaCl conditions

To investigate the effect of salinity on *Pdd* sensitivity to acid, growth kinetics at various pH levels and survival assays were determined under different NaCl concentrations. For growth assays, three replicates of RM-71 adjusted to an OD<sub>600</sub> of 0.3 were inoculated (1:100) in 100  $\mu$ L of TSB-1 and TSB-3 adjusted to pH 7, 6, 5, and 4. Growth was monitored for 48 hours using the spectrophotometer Epoch2 microplate reader (BioTek) under constant stirring. To determine bacterial viability on acid exposure, overnight cultures of RM-71 and  $\Delta$ *arcA* strains in 5-mL of TSB-1 (pH 7) were diluted in fresh TSB-1 and TSB-3 and grown to an OD<sub>600</sub> of 0.3. Bacterial cells were harvested (4,000  $\times$  *g* for 5 minutes) and suspended in 1 mL of acidified TSB-1 and TSB-3 (pH 4). Then, 1:100 dilutions were inoculated in TSB-1 and TSB-3 (pH 4.0), with and without supplemental L-arginine (10 mM) (Sigma-Aldrich), in 96-well plates. For colony counts, 5- $\mu$ L aliquots of 10-fold dilutions at 0 and 16 hours were drop-plated in TSA-1. Plates were incubated at 25°C for 24 hours, and the number of viable cells (CFU/mL) was determined for each time point.

## Scanning and transmission electron microscopy (SEM and TEM)

For SEM, exponentially growing cultures of *Pdd* RM-71 in TSB-1 and TSB-3 (OD<sub>600</sub> of 0.55) were pelleted down by centrifugation (4,000  $\times$  *g*, 5 minutes, 4°C). Cells were fixed as previously described (27), sputter-coated with iridium, and imaged using an Ultra Plus ZEISS scanning electron microscope. For polysaccharide capsule visualization, sample processing and TEM analyses were conducted as previously described (28). Images were digitally recorded using a CCD digital camera Orius 1100 W (Gatan). Cell length, cell width, and capsule thickness at both salinities were determined by measuring 30 cells

with the Fiji software (ImageJ version 1.51n) (43). Capsule thickness for each cell was calculated as the average of six measurements at different points. An unpaired *t*-test was used to determine statistical significance.

### Allelic exchange mutagenesis

Non-polar deletion mutants for  $\delta$ -endotoxin gene *pirB* (A0J47\_RS13275) and arginine deiminase *arcA* (A0J47\_RS14010) were constructed by allelic exchange mutagenesis. Primers used for the construction and screening of mutants are listed in Table S3. In brief, 2-kb DNA fragments upstream and downstream of each gene were obtained by amplification with Hi-Fidelity Kapa Taq (*Kapa*) and subsequently ligated, resulting in an in-frame deletion of >90% of the coding sequence for each target gene. For allelic exchange, the suicide vector pNidKan (Km<sup>R</sup>), bearing the sucrose sensitivity gene *sacB* and the *pir*-dependent R6K *ori*, was used as previously described (28). To select the first event of recombination, 100- $\mu$ L serial dilutions of transconjugants were seeded on thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar supplemented with kanamycin. Colonies that were resistant to kanamycin were seeded on TSA-1 plates supplemented with sucrose (15% [wt/vol]) to select for a second recombination event. As a control to study whether PirAB toxin has an impact on the virulence of *Pdd* for fish, we needed to construct a *Pdd* RM-71 mutant defective for four previously characterized toxins Dly, PhlyP, PhlyC, and PlpV (31, 44). Such a tetra-mutant (dubbed here AVL442) lacks these four toxins but maintains intact *pirA* and *pirB* genes. This tetra-mutant was constructed by deleting *plpV* as previously described (44) on the genetic background of the previously constructed triple (Dly, PhlyP, PhlyC) mutant AR89 (31). All gene deletions were confirmed by PCR, and the DNA regions involved in recombination were sequenced to ensure that no point mutations were generated during the process.

### SDS-PAGE analysis of culture supernatants

To analyze the effect of NaCl changes on the abundance of secreted proteins, the extracellular products (ECPs) from three replicates of *Pdd* RM-71 cultures grown in TSB-1 or TSB-3 were collected. In a first attempt, to be able to correlate the protein profiles with the transcriptomic results, we obtained ECPs from cultures obtained in the same conditions used for RNA-seq analysis (OD<sub>600</sub> of 0.55). However, due to the low protein abundance in these early exponential supernatants, for the analysis of the secretome we used cultures grown to stationary phase (OD<sub>600</sub>: 1.7). Bacterial suspensions were centrifuged (13,000  $\times g$ , 5 minutes, 4°C), and supernatants were filtered through 0.22- $\mu$ m-pore size filters (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). Protein precipitation of cell-free supernatants was performed as previously described (27), and precipitated proteins were subjected to SDS-PAGE in 14% polyacrylamide gels using the Laemmli discontinuous buffer system (45). Coomassie Brilliant Blue R250 was used for protein staining.

### Protein quantification by densitometry

SDS-PAGE gel images acquired in a GS-900 calibrated densitometer (Bio-Rad) were analyzed using the Image Lab Software version 6.0.1 (Bio-Rad). Bands were automatically detected by the software by selecting the high-sensitivity setting. Rolling disk values were set for the lane with less intensity, applied to all lanes, and adjusted to determine the background-subtracted intensity for each band. Normalization between lanes was determined using the sialidase band as a housekeeping secreted protein (HKP) given its stable expression under the experimental conditions tested. For this, the lane normalization factor (LNF) was calculated for each gel by dividing the HPK signal of each lane by the HPK value with the highest intensity. Then, normalized band intensity was determined for each target protein by dividing its signal value by the corresponding LNF. Mean of normalized band intensities of three replicates from independent cultures for each condition (1% NaCl and 3% NaCl) over three gels was calculated for each

protein. An unpaired, two-tailed Student's *t*-test was used for the statistical analysis of densitometric data using the GraphPad Prism 9 Software.

### Fish virulence assays

For experimental infection assays on turbot, groups of 10 fish ( $6 \pm 1.2$  g) were acclimated at 18°C for 1 week before the infection assay. Virulence challenges were conducted by intraperitoneal injection of 0.1 mL of bacterial suspensions in 0.85% NaCl solution at a dose of  $4 \times 10^5$  CFU/fish per all the tested strains. A negative control group of 10 fish was inoculated with 0.1 mL of sterile 0.85% NaCl. Fish mortality was recorded for 7 days. Reisolation on TSA-1 and TCBS and identification of bacteria from the kidney of dead fish was performed by PCR with *ureD* primers (46). The protocols of animal experimentation used in this study have been reviewed and approved by the Animal Ethics Committee of the Universidade de Santiago de Compostela.

## RESULTS AND DISCUSSION

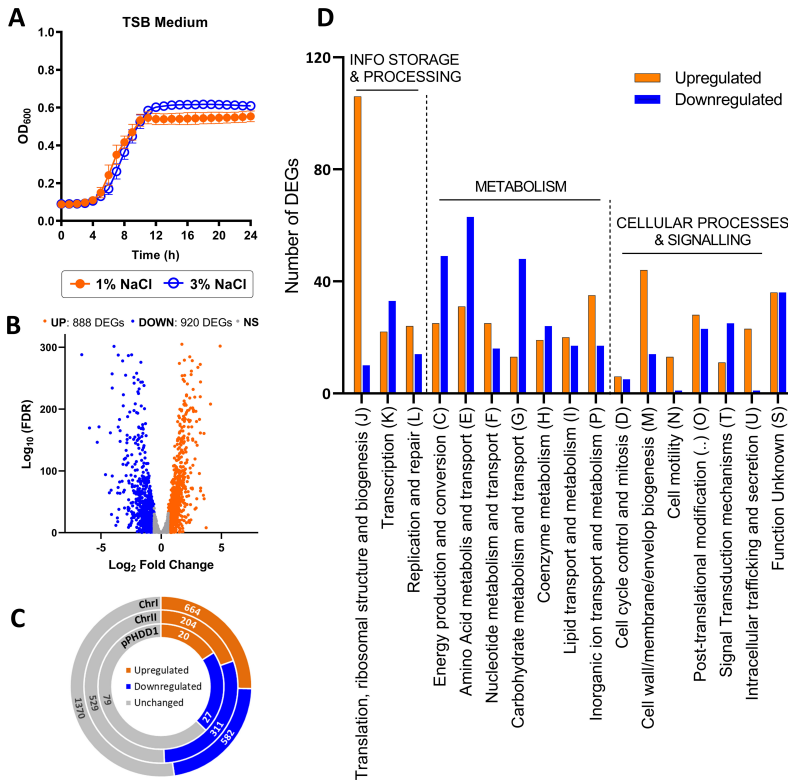
### General overview of the transcriptional profile of *Pdd* RM-71 under different conditions of salinity

*Pdd* requires the addition of NaCl for growth and is capable of growing at 1%, 3%, 5%, and 6% NaCl (47). To assess the impact of NaCl concentration on *Pdd* growth dynamics, precultures of the highly virulent strain RM-71 prepared at 1% NaCl in TSB medium were used as starters (1:100 dilution) of new cultures at two different salinities, 1% or 3% NaCl. *Pdd* achieved a slightly higher optical density at 3% NaCl at the end of the exponential phase (Fig. 1A).

To investigate the transcriptional response of *Pdd* to NaCl changes, triplicates of early exponential RM-71 cultures grown in TSB at 3% NaCl and 1% NaCl were used to purify RNA and to generate six cDNA libraries that were subjected to Illumina sequencing. An average of 54.27 million raw reads were generated and mapped against the complete genome of *Pdd* RM-71. Principal component analysis demonstrated a clear distinction between the two sample groups (1% NaCl and 3% NaCl) (Fig. S1). Detailed information on the RNA-seq data for each replicate is described in Table S1. To visualize the changes in gene expression that might be elicited in *Pdd* on entry into an animal host, growth at 3% NaCl was established as the control condition in comparison to growth at 1% NaCl. The comparative analysis of the transcriptomic profiles identified 1,808 DEGs: 888 upregulated ( $FC > 1.5$ ) and 920 downregulated ( $FC < -1.5$ ) at 1% NaCl compared to 3% NaCl (Fig. 1B). The complete list of DEGs at each salinity condition is summarized in Table S2. The number of upregulated and downregulated genes was balanced in the two chromosomes, as well as in the virulence plasmid pPHDD1 (Fig. 1C).

The proteins encoded by the DEGs were mapped to COG, KEGG, and GO databases. Interestingly, translation (*J*) was the most abundant functional category assigned by the COG database within the low salt-upregulated profile (Fig. 1D). In addition, genes upregulated at 1% NaCl were mostly assigned to functional categories involved in inorganic ion metabolism and transport (*P*), membrane biogenesis (*M*), cell motility (*N*), and intracellular secretion and trafficking (*U*). Conversely, categories related to general metabolism, such as energy production and conversion (*C*), amino acid and carbohydrate metabolism and transport (*E* and *G*, respectively) were the most represented among genes upregulated at 3% NaCl. Figures showing the top 15 enriched KEGG pathways and GO terms involved in biological processes are presented in Fig. S2.

As a general overview, the comparative study of the transcriptomes revealed the upregulation of genes involved in energy metabolism, biosynthesis of amino acids, ADS, and uptake of compatible solutes at 3% NaCl (Table 1), whereas growth at 1% NaCl upregulated genes encoding cytotoxins and other proteins secreted via the T2SS, iron uptake systems, and other virulence factors (Table 2). Therefore, we propose that growth at 3% NaCl upregulates an "environmental profile" in *Pdd*, whereas a shift to 1% NaCl upregulates a "virulence profile" (Fig. 2). Study of DEG distribution along the two



**FIG 1** (A) Growth of *Pdd* RM-71 cultured in TSB medium at 1% and 3% NaCl. Data are presented as mean ± SD from three biological replicates and three independent experiments. (B) Volcano plot showing statistical significance of fold change (FC) values. Genes with FDR adjusted *P*-values ≤ 0.05 and Log<sub>2</sub> FC values ≥ 0.59 and ≤ -0.59 were considered to be upregulated DEGs (orange dots) or downregulated DEGs (blue dots) at 1% NaCl. (C) Distribution of the number of upregulated (orange), downregulated (blue), and unchanged (gray) genes within the genome of strain RM-71 at 1% NaCl versus 3% NaCl. Distribution of DEGs is balanced in both chromosomes as well as in the virulence plasmid pPHDD1. (D) Functional classification of upregulated (orange) and downregulated (blue) DEGs at 1% NaCl versus 3% NaCl based on COG (Cluster of Orthologous Groups) database.

chromosomes of the *Pdd* RM-71 genome revealed that some of the top DEGs mapped to multigene operons (Fig. 3). The most relevant results obtained from the detailed study of the transcriptomes are discussed below.

### Salinity changes slightly impact cell morphology and capsule production in *Pdd* RM-71

Comparative analysis of the transcriptomes revealed that some genes involved in cell shape regulation were upregulated at low salt (Table S2), including the rod shape-determining protein RodA (A0J47\_RS14950) and the peptidoglycan (PG) glycosyltransferase MrdB (A0J47\_RS05095), both part of the shape, elongation, division, and sporulation (SEDS) family (48). In line with these findings, the *V. cholerae* gene (*pbpB*, VCA0870) homologous to *Pdd* RM-71 D-alanyl-D-alanine endopeptidase PbpG (A0J47\_RS09265) was induced in the absence of NaCl and suggested to be involved in PG modulation under no salt (6, 49).

Cell morphology of RM-71 was assessed by SEM and TEM. SEM images revealed that cells grown at low salt exhibited a significantly more elongated shape and were narrower

**TABLE 1** List of selected DEGs significantly altered in samples collected at L upregulated at 3% NaCl

Locus_tag	Product/function	FC	Log <sub>2</sub> FC	P-value	Location <sup>a</sup>
<b>Energy metabolism</b>					
A0J47_RS18510	Hypothetical protein	-19.83	-4.31	4.52E-66	ChrII
A0J47_RS18515	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATP synthase subunit a	-16.75	-4.07	1.31E-93	ChrII
A0J47_RS18520	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATPase subunit c	-17.46	-4.13	7.67E-31	ChrII
A0J47_RS18525	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATPase subunit b	-12.28	-3.62	1.12E-65	ChrII
A0J47_RS18540	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> ATPase subunit gamma	-10.65	-3.41	4.22E-82	ChrII
	Fumarate reductase flavoprotein subunit				
A0J47_RS00375	FrdA	-3.95	-1.98	4.53E-76	ChrI
A0J47_RS16570	Cytochrome c-type subunit TorY	-62.18	-5.96	1.56E-17	ChrII
A0J47_RS16575	Putative molybdoenzyme reductase TorZ	-16.80	-4.07	1.86E-23	ChrII
A0J47_RS08095	Anaerobic sulfite reductase subunit AsrA	-2.20	-1.14	2.52E-07	ChrI
<b>Nitrogen metabolism and nitrosative stress response</b>					
A0J47_RS06275	Hydroxylamine reductase	-58.34	-5.87	0	ChrI
A0J47_RS17605	Nitrite reductase (NADH) small subunit	-6.58	-2.72	1.61E-09	ChrII
	Nitrous oxide-stimulated promoter family protein				
A0J47_RS06260	Nitric oxide-sensing transcriptional repressor NsrR	-18.74	-4.23	2.83E-162	ChrI
A0J47_RS00170		-1.60	-0.68	5.44E-30	ChrI
<b>Carbohydrate metabolism</b>					
<b>Pyruvate metabolism and acetate production</b>					
A0J47_RS00915	Phosphoenolpyruvate carboxykinase PckA	-2.13	-1.09	2.41E-61	ChrI
	Pyruvate-ferredoxin/flavodoxin oxidoreductase NifJ				
A0J47_RS06270		-6.59	-2.72	4.31E-37	ChrI
A0J47_RS07640	Alcohol dehydrogenase	-2.69	-1.43	1.88E-41	ChrI
A0J47_RS13735	Pyruvate-formate lyase GrcA	-27.94	-4.80	0	ChrI
A0J47_RS05575	Formate C-acetyltransferase PflB	-6.60	-2.72	3.94E-287	ChrI
A0J47_RS05580	Formate efflux transporter FocA	-6.10	-2.71	6.74E-196	ChrI
A0J47_RS18485	Acetate kinase AckA	-3.80	-1.93	3.18E-84	ChrII
<b>Fructose and mannose metabolism</b>					
A0J47_RS05660	Mannose-6-phosphate isomerase ManA	-1.58	-0.66	2.77E-41	ChrI
	PTS system, fructose-specific IIA component				
A0J47_RS05670	Fructose operon transcriptional repressor FruR	-4.47	-2.16	9.64E-21	ChrI
A0J47_RS08255	PTS system, fructose-specific IIA component FruB	-3.74	-1.90	1.58E-67	ChrI
A0J47_RS08260		-8.93	-3.16	1.91E-20	ChrI
A0J47_RS08265	1-phosphofructokinase FruK	-6.91	-2.79	1.44E-12	ChrI
	PTS system, fructose-specific IIB/C component FruA				
A0J47_RS08270		-4.48	-2.16	2.19E-77	ChrI
<b>Starch and glucose metabolism</b>					
A0J47_RS15340	Glycogen phosphorylase	-3.14	-1.65	2.10E-67	ChrII
A0J47_RS18420	Trehalose operon repressor TreR	-2.13	-1.09	3.69E-51	ChrII
	PTS system, trehalose-specific IIBC component PTS system TreB				
A0J47_RS18430		-14.92	-3.90	0	ChrII
A0J47_RS18435	Trehalose-6-phosphate hydrolase TreC	-7.00	-2.81	1.83E-30	ChrII
<b>Amino sugar and nucleotide metabolism</b>					
A0J47_RS17085	Anaerobic ribonucleoside-triphosphate reductase activating protein NrdG	-3.39	-1.76	8.82E-58	ChrII
	Anaerobic Ribonucleoside-triphosphate reductase (thioredoxin) NrdD				
A0J47_RS17090		-15.70	-3.97	0	ChrII
A0J47_RS06860	Uridine phosphorylase Udp	-4.12	-2.04	4.58E-195	ChrI
A0J47_RS11155	N-acetylneuraminatase lyase NanA	-4.65	-2.22	1.38E-75	ChrI

(Continued on next page)

**TABLE 1** List of selected DEGs significantly altered in samples collected at L upregulated at 3% NaCl (Continued)

Locus_tag	Product/function	FC	Log <sub>2</sub> FC	P-value	Location <sup>a</sup>
<b>Amino acid metabolism</b>					
A0J47_RS14010	Arginine deiminase ArcA	-39.70	-5.31	6.85E-147	ChrI
A0J47_RS14015	Carbamate kinase ArcC	-35.99	-5.17	7.93E-172	ChrI
A0J47_RS14020	Ornithine carbamoyltransferase ArcB	-15.11	-3.92	3.70E-302	ChrI
A0J47_RS14005	Arginine/ornithine antiporter ArcD	-2.20	-3.12	0	ChrI
A0J47_RS02700	Arginine N-succinyltransferase AstA	-2.28	-1.19	1.46E-60	ChrI
A0J47_RS02705	Succinylglutamic semialdehyde dehydrogenase AstD	-2.35	-1.23	4.96E-40	ChrI
A0J47_RS01975	Arginine decarboxylase AdiA	-2.20	-1.14	8.73E-29	ChrI
A0J47_RS00430	Aspartate ammonia-lyase AspA	-4.51	-2.17	1.73E-111	ChrI
A0J47_RS04485	Glutaminase GlsA	-2.99	-1.58	4.10E-17	ChrI
A0J47_RS16645	Glycine cleavage system aminomethyltransferase GcvT	-4.54	-2.18	1.08E-156	ChrII
A0J47_RS10545	Acetolactate synthase I/II/III large subunit AlsS	-3.84	-1.94	5.49E-72	ChrI
A0J47_RS14750	Hippurate hydrolase HipO	-5.31	-2.41	6.95E-76	ChrII
<b>Compatible solute uptake systems</b>					
A0J47_RS18900	Glycine betaine/proline transport system substrate-binding protein	-10.69	-3.42	1.02E-165	ChrII
A0J47_RS18905	Glycine betaine/proline transport system permease protein	-5.00	-2.32	3.06E-31	ChrII
A0J47_RS18910	Glycine betaine/proline transport system ATP-binding protein	-3.36	-1.75	1.76E-51	ChrII
A0J47_RS08670	Betaine/Carnitine/Choline Transporter (BCCT) family transporter	-11.85	-3.57	5.68E-288	ChrI
A0J47_RS07020	Betaine/Carnitine/Choline Transporter (BCCT) family transporter	-4.80	-2.26	2.82E-198	ChrI
<b>Histamine production</b>					
A0J47_RS13250	Histidine-histamine antiporter HdcT	-3.98	-1.99	3.24E-28	ChrI
A0J47_RS13255	Histidine decarboxylase HdcA	-2.76	-1.46	1.66E-33	ChrI
A0J47_RS13260	Histidine-tRNA ligase HisRS	-1.59	-0.67	8.24E-13	ChrI
<b>Peptidases</b>					
A0J47_RS07600	M20 family metallopeptidase	-26.89	-4.75	0	ChrI
A0J47_RS13435	U32 family peptidase	-8.41	-3.07	1.55E-119	ChrI
A0J47_RS19220	C69 family dipeptidase	-5.32	-2.41	1.27E-78	ChrII
<b>Porins, permeases, and transporters</b>					
A0J47_RS05530	Outer Membrane Protein C	-12.49	-3.64	0	ChrI
A0J47_RS14790	Maltoporin LamB	-11.89	-3.57	9.44E-172	ChrII
A0J47_RS06290	Uncharacterized membrane protein YjiH	-12.44	-3.64	1.67E-24	ChrI
A0J47_RS08595	C4-dicarboxylate transporter DcuC	-9.03	-3.17	2.11E-111	ChrI
<b>Hypothetical and uncharacterized proteins</b>					
A0J47_RS17280	Hypothetical protein	-139.01	-7.12	0	ChrII
A0J47_RS17285	Hypothetical protein	-84.29	-6.40	0	ChrII
A0J47_RS12415	Helix-turn-helix domain-containing protein	-97.17	-6.60	1.31E-288	ChrI
A0J47_RS10160	Hypothetical protein	-24.70	-4.63	0	ChrI
A0J47_RS04560	Hypothetical protein	-24.69	-4.63	1.10E-94	ChrI

<sup>a</sup>ChrI, chromosome I; ChrII, chromosome II.

than cells at 3% NaCl (Fig. 4A and B). Polysaccharide capsule constitutes a virulence factor in *Pdd* RM-71, playing a role in protection against fish serum, and a gene cluster participating in capsule biogenesis has been functionally characterized (28). In the present study, we found that capsule biogenesis genes are slightly upregulated at 1% NaCl (Fig. 3, chromosome I panel; Table S2), with FC values ranging from 1.7 to 3.57. However, TEM

**TABLE 2** List of selected DEGs significantly upregulated at 1% NaCl

Locus_tag	Product/function	FC	Log <sub>2</sub> FC	P-value	Location <sup>a</sup>
<b>Virulence and antimicrobial resistance</b>					
A0J47_RS13280	PirA-like	348.13	8.44	0	ChrI
A0J47_RS13275	PirB-like	83.44	6.38	0	ChrI
A0J47_RS20355	Pore-forming toxin PhlyP	11.13	3.48	0	pPHDD1
A0J47_RS10995	Pore-forming toxin PhlyC	2.32	1.22	1.29E-59	ChrI
A0J47_RS20350	Damselysin	11.01	3.46	0	pPHDD1
A0J47_RS20585	Outer membrane protein OmpU	3.70	1.89	9.76E-100	pPHDD1
A0J47_RS20130	RNAase toxin Ntox44	4.77	2.25	1.14E-89	pPHDD1
A0J47_RS20325	AcrB/MacB-like ABC transporter ATP-binding protein	3.64	1.86	1.78E-153	pPHDD1
A0J47_RS20340	TolC family protein	3.60	1.85	6.53E-189	pPHDD1
A0J47_RS20345	AcrA/MacA-like membrane fusion protein	3.72	1.90	9.20E-173	pPHDD1
A0J47_RS20135	PAAR domain-containing protein	3.55	1.83	7.77E-79	pPHDD1
A0J47_RS11245	Putative lipoprotein	9.43	3.24	0	ChrI
A0J47_RS20555	TonB-dependent transferrin receptor Vep20-like	9.50	3.25	1.08E-220	pPHDD1
A0J47_RS20550	Serum resistance protein Vep07-like	4.69	2.23	2.21E-150	pPHDD1
A0J47_RS03660	Fe <sup>3+</sup> ABC transporter substrate-binding protein FbpA	18.74	4.23	0	ChrI
A0J47_RS11430	Fe <sup>2+</sup> transporter permease subunit FeoB	7.40	2.89	4.37E-197	ChrII
A0J47_RS11435	Fe <sup>2+</sup> transport protein FeoA	5.98	2.58	6.13E-73	ChrII
A0J47_RS14665	TonB-dependent siderophore receptor FhuE	7.05	2.82	0	ChrII
<b>Protein export and secretion</b>					
A0J47_RS19585	Preprotein translocase subunit SecD	8.10	3.02	0	ChrII
A0J47_RS00865	Type II secretion system protein EpsJ	2.88	1.52	2.55E-50	ChrI
A0J47_RS00870	Type II secretion system protein EpsI	3.21	1.68	1.14E-34	ChrI
A0J47_RS00875	Type II secretion system protein EpsH	4.66	2.22	1.06E-91	ChrI
A0J47_RS00880	Type II secretion system protein EpsG	4.54	2.18	2.82E-198	ChrI
A0J47_RS00885	Type II secretion system protein EpsF	3.55	1.83	2.28E-88	ChrI
<b>Flagellar motility and chemotaxis</b>					
A0J47_RS12245	Chemotaxis protein CheV	1.69	0.75	3.38E-53	ChrII
A0J47_RS12040	Chemotaxis response regulator CheY	2.69	1.43	3.47E-80	ChrI
A0J47_RS05380	Methyl-accepting chemotaxis protein	2.58	1.37	8.54E-152	ChrI
A0J47_RS12030	Chemotaxis protein histidine kinase CheA	2.42	1.28	4.93E-56	ChrI
A0J47_RS12035	Chemotaxis regulator CheZ	2.42	1.28	2.59E-51	ChrI
A0J47_RS12075	Flagellar biosynthetic protein FlhQ	2.31	1.21	3.72E-07	ChrI
A0J47_RS12200	Flagellar P-ring protein precursor FlgI	1.98	0.98	4.34E-26	ChrI
A0J47_RS12210	Flagellar basal-body rod protein FlgG	1.84	0.88	2.08E-20	ChrI
<b>Translation, ribosomal structure, and biogenesis</b>					
A0J47_RS00405	30S ribosomal protein S6-L-glutamate ligase RimK	52.24	5.71	0	ChrI
A0J47_RS16560	2OG-Fe(II) oxygenase	11.78	3.56	3.93E-161	ChrII
A0J47_RS00505	tRNA-dihydrouridine synthase B DusB	6.43	2.69	1.13E-196	
A0J47_RS06710	50S ribosomal protein L32 RpmF	4.73	2.24	1.70E-29	ChrI
A0J47_RS07485	Small subunit ribosomal protein S1 RpsA	4.29	2.10	3.66E-195	ChrI
A0J47_RS02550	50s ribosomal protein L31 RpmE	3.85	1.94	2.64E-102	ChrI
A0J47_RS09500	50S ribosomal protein L25 RplY	4.71	2.24	0	ChrI
<b>Metabolism and transport</b>					
A0J47_RS17020	Glutathione synthase GshB	38.42	5.26	0	ChrII
A0J47_RS15265	Class I SAM-dependent methyltransferase	29.87	4.90	1.43E-302	ChrII
A0J47_RS12810	Myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase ShuB	26.88	4.75	0	ChrI
A0J47_RS08575	Agmatinase SpeB	11.13	3.48	0	ChrI
A0J47_RS17735	Gamma-glutamylputrescine oxidase	9.63	3.27	1.30E-244	ChrII
A0J47_RS01525	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase GlnS	7.50	2.91	9.23E-41	ChrI
A0J47_RS17685	Cysteine desulfurase	7.34	2.87	3.41E-147	ChrII
A0J47_RS17170	Carboxynorspermidine decarboxylase	4.47	2.16	1.99E-118	ChrII

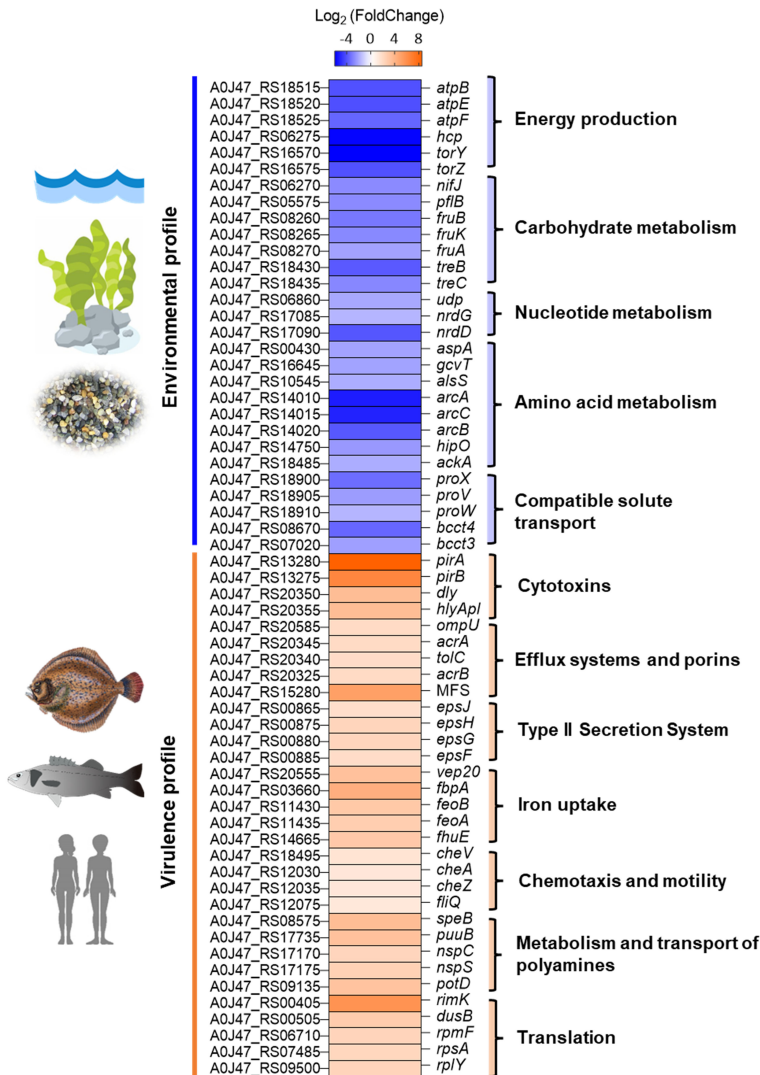
(Continued on next page)

**TABLE 2** List of selected DEGs significantly upregulated at 1% NaCl (Continued)

Locus_tag	Product/function	FC	Log <sub>2</sub> FC	P-value	Location <sup>a</sup>
A0J47_RS17175	Carboxynorspermidine synthase	5.42	2.44	0	ChrII
<b>Transporters</b>					
A0J47_RS09135	Spermidine/putrescine binding protein PotD2	9.02	3.17	2.40E-96	ChrI
A0J47_RS10120	Energy-coupling factor ATP-binding protein EcfA	8.28	3.05	4.99E-268	ChrI
A0J47_RS01035	7-cyano-7-deazaguanine/7-aminomethyl-7-deazaguanine transporter YhhQ	22.65	4.50	0	ChrI
A0J47_RS11695	TolC family protein CusC	9.73	3.28	8.73E-73	ChrI
A0J47_RS07645	GPR1/FUN34/yaaH putative acetate transporter	23.91	4.58	0	ChrI
A0J47_RS19570	NupC/NupG family nucleoside CNT transporter	9.46	3.24	7.88E-273	ChrII
A0J47_RS13535	Magnesium transporter MgtE	5.35	2.42	3.37E-182	ChrI
A0J47_RS06610	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -dicarboxylate symporter	7.76	2.96	1.58E-55	ChrI
A0J47_RS10440	Na <sup>+</sup> -driven multidrug efflux pump (MATE)	6.13	2.62	1.92E-152	ChrI
A0J47_RS15280	MFS transporter	32.63	5.03	0	ChrII
A0J47_RS08650	MFS transporter	17.63	4.14	0	ChrI
A0J47_RS15440	MFS transporter	6.17	2.62	3.73E-150	ChrII
<b>Peptidases</b>					
A0J47_RS12990	Putative protease YegQ	11.93	3.58	0	ChrI
A0J47_RS08645	Peptidoglycan DD-metalloendopeptidase	9.97	3.32	0	ChrI
A0J47_RS18555	Trypsin-like serine protease	5.67	2.50	5.84E-262	ChrII
A0J47_RS03380	Do family serine endopeptidase	4.26	2.09	9.46E-17	ChrI
<b>Transcriptional regulators</b>					
A0J47_RS00510	DNA-binding transcriptional regulator Fis	5.81	2.54	5.61E-172	ChrI
A0J47_RS12800	Fe-S cluster assembly transcriptional regulator IscR	5.61	2.49	1.82E-256	ChrI
A0J47_RS01530	DeoR family transcriptional regulator	5.51	2.46	1.99E-21	ChrI
A0J47_RS08475	LysR family transcriptional regulator	2.78	1.47	2.60E-51	ChrI
<b>Histone acetylation and tRNA binding/modification</b>					
A0J47_RS19900	Histone acetyltransferase HPA2	17.18	4.10	1.21E-208	ChrII
A0J47_RS09065	tRNA 2-thiocytidine(32) synthetase TtcA	6.59	2.72	0	ChrI
A0J47_RS00505	tRNA dihydrouridine synthase DusB	6.43	2.69	1.13E-196	ChrI
A0J47_RS11195	tRNA 5-methoxyuridine(34)/uridine 5-oxyacetic acid(34)synthase CmoB	5.17	2.37	1.27E-218	ChrI
<b>Hypothetical and uncharacterized proteins</b>					
A0J47_RS17025	Flavohemoglobin expression-modulating QEGLA motif protein	27.51	4.78	0	ChrII
A0J47_RS17005	Hypothetical protein	18.64	4.22	0	ChrII
A0J47_RS10190	Hypothetical protein	13.27	3.73	1.35E-08	ChrI
A0J47_RS10185	Hypothetical protein	11.90	3.57	1.16E-55	ChrI
A0J47_RS19195	Uncharacterized membrane protein	9.61	3.27	3.45E-68	ChrII
A0J47_RS19225	DUF3316 domain-containing protein	9.59	3.26	5.71E-162	ChrII
A0J47_RS20565	Uncharacterized protein	4.78	2.26	9.38E-172	pPHDD1

<sup>a</sup>ChrI, chromosome I; ChrII, chromosome II; pPHDD1, virulence plasmid.

analysis revealed a significant, albeit moderate increase in capsule thickness at 3% NaCl (average thickness of 65.55 and 69.43 nm for 1% and 3% NaCl, respectively) (Fig. 4C). These apparently contradictory observations suggest the participation of additional, yet-unknown regulatory mechanisms in *Pdd* capsule production. The presence of fully capsulated cells at either salinity condition indicates that *Pdd* expresses the polysaccharide capsule during its environmental lifestyle as well as during an infection. While the protective role of the capsule during animal infection has been previously established in *Pdd* (28), the function of the capsule during the free-living lifestyle is unknown. Previous studies have shown that *Pdd* can be predated by *Bdellovibrio bacteriovorus* (50) and by heterotrophic marine flagellates and microzooplankton (51, 52). It can be speculated that the capsule may play a protective role against predation in the marine environment. It is pertinent to note that not all *Pdd* strains are capsulated (A. V. Barca, A. do Vale, and C. R.



**FIG 2** Heat map view showing the general transcriptional response of *Pdd* at 1% NaCl (upregulation of a virulence profile) compared to 3% NaCl (upregulation of an environmental profile). Differential expression values are given as Log<sub>2</sub>FC-based color scale. Orange segments represent induced expression (positive FC), whereas blue segments represent downregulation (negative FC).

Osorio, unpublished data), emphasizing the need for in-depth studies to clarify the role of capsule in predation scenarios.

### Energy production and carbohydrate metabolism are upregulated at 3% NaCl

*Pdd* is a highly heterogeneous subspecies, and the populations causing disease in marine animals are considered to be of multiclonal nature (25, 53). Nevertheless, there are

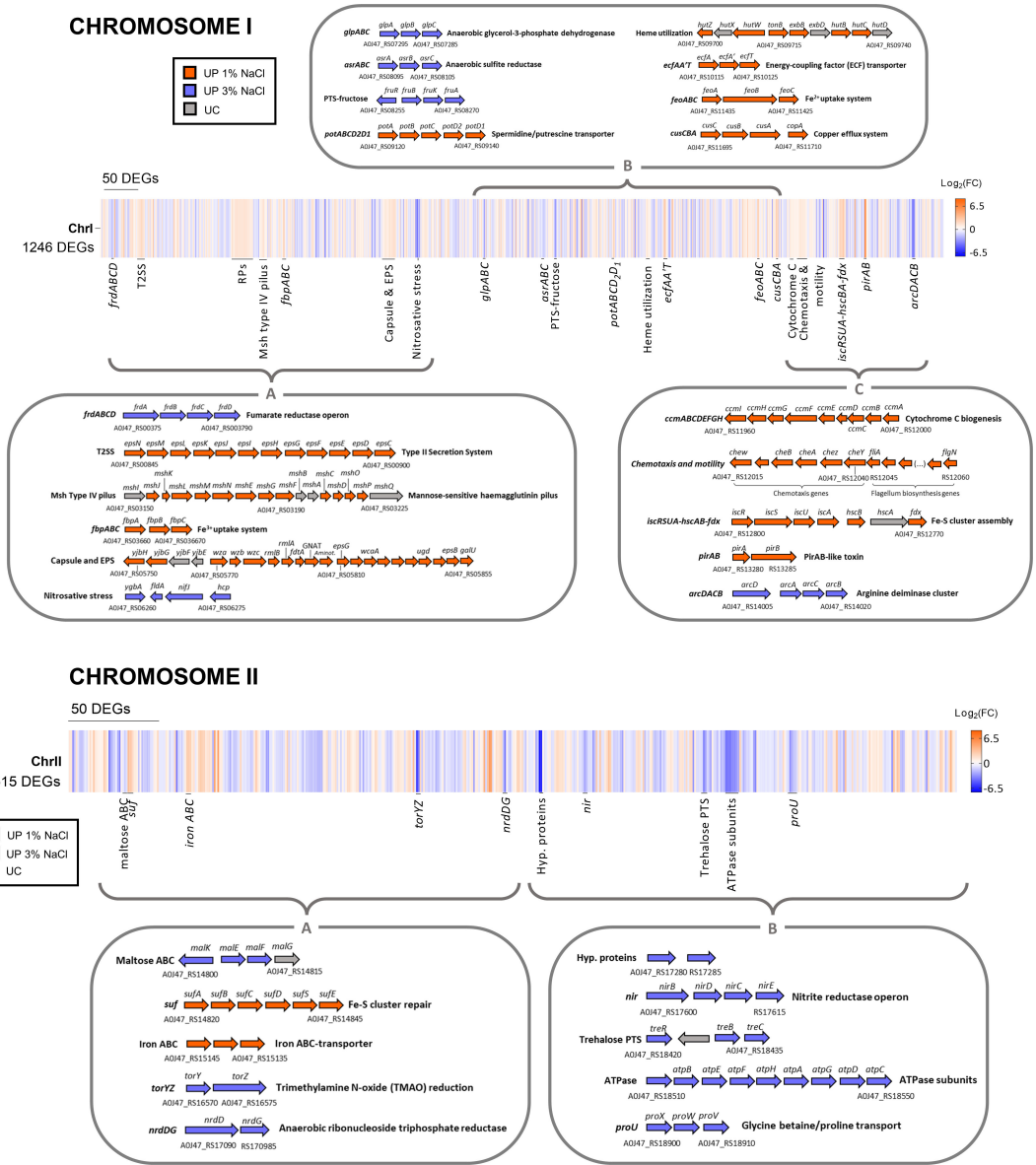
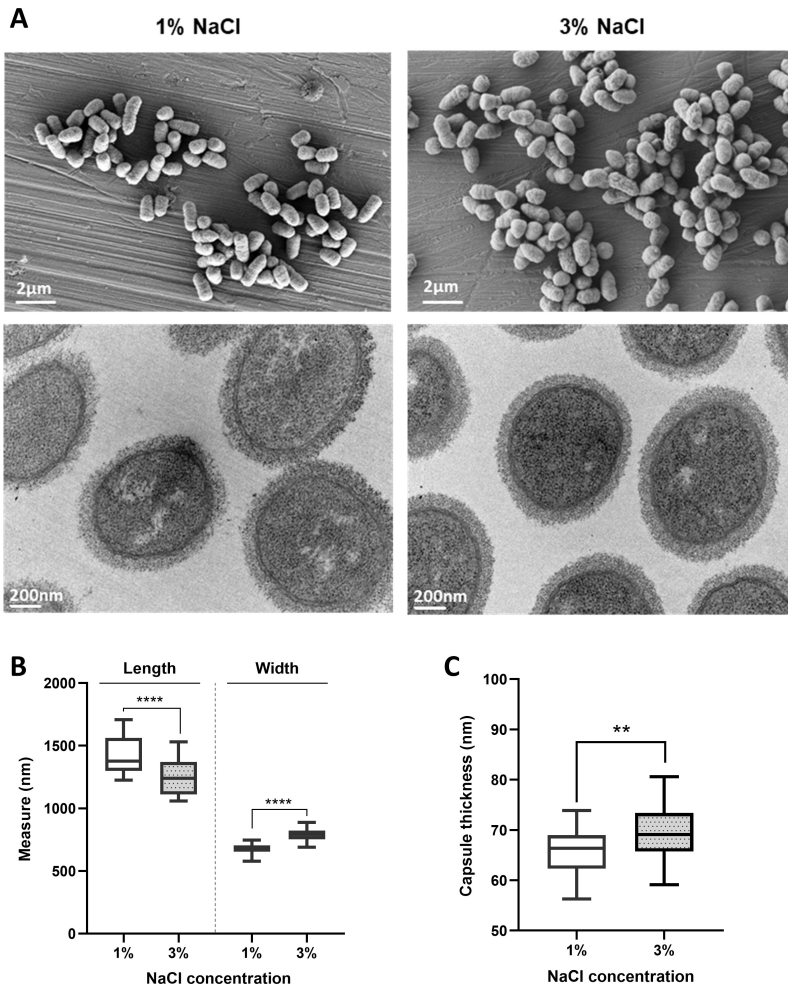


FIG 3 Mapping of differentially expressed genes (DEGs) in response to NaCl changes within chromosome I and chromosome II of *Pdd* RM-71 genome. Expression values are depicted in a color-based scale as Log<sub>2</sub>fold change (FC). In the detailed view, DEGs are shown in orange (upregulated at 1% NaCl), blue (upregulated at 3% NaCl), and gray (unchanged) and annotated with the corresponding National Center for Biotechnology Information (NCBI) Locus Tag of RM-71 genome (GCF\_001708035.2). Operon-predicted functions are shown.

conserved biochemical features that define the subspecies. *Pdd* is heterotrophic, non-nitrogen fixing, facultative anaerobic capable of reducing nitrate to nitrite, ferments glucose with the production of gas, produces arginine deiminase, and most strains produce urease (47). The comparative study of the *Pdd* transcriptomic profiles revealed the upregulation, at 3% NaCl, of genes involved in energy production and carbohydrate



**FIG 4** (A) Cell morphology and polysaccharide capsule of *Pdd* RM-71 grown at 1% NaCl and 3% NaCl, assessed by SEM (top panel) and TEM (bottom panel), respectively. (B) Box plot showing cell length and width of *Pdd* RM-71 cells at two assayed salinities. Cells were significantly longer and narrower at 1% NaCl. (C) Capsule thickness (in nanometer) of *Pdd* RM-71 at both salinities. Capsule was more compact and significantly thicker at 3% NaCl. Statistical difference was assessed by Student's *t*-test: \*\*\*\**P* < 0.0001, \*\**P* < 0.01.

and amino acid metabolism (Fig. 2; Table 1), being notable that the genes encoding F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP synthase subunits were among the top-20 upregulated genes. This upregulation of the ATP synthesis machinery might account, at least in part, for the increased growth observed at 3% NaCl (Fig. 1A). Enzymes involved in aerobic and anaerobic respiration were markedly upregulated at 3% NaCl including the *frdABCD* fumarate reductase operon, the *asrABC* sulfite reductase operon, and nitrite reductase subunits (Table 1). The enhanced expression of aerobic and anaerobic respiration enzymes under high salt has also been reported in *Shewanella* sp. and *Escherichia coli* (54, 55).

We observed a strong upregulation of genes involved in response to reactive nitrogen species. Noteworthy, the gene encoding a hydroxylamine reductase is upregulated 58-fold at 3% NaCl. This enzyme, homologous to hybrid cluster protein Hcp of *E. coli*,

catalyzes the reduction of hydroxylamine to  $\text{NH}_3$  and  $\text{H}_2\text{O}$  and is predicted to have a role in protection against nitrosative stress (56). In addition, it was observed the upregulation of a nitrous oxide stimulated promoter family protein homologous to *E. coli* YgBa. These two genes are under the control of the regulatory protein NsrR, a nitric oxide-sensitive regulator of transcription, characterized in *E. coli* (57) and whose homolog in *Pdd* identified in the present study (AOJ47\_RS00170) is also upregulated at 3% NaCl (Table 1). These findings clearly suggest that seawater salinity boosts nitrogen metabolism in *Pdd*, leading to the potential activation of nitrosative stress response mechanisms.

The cytochrome c-type subunit TorY (56% amino acid identity to *E. coli* TorY/Yeck) and a molybdoenzyme reductase (68% amino acid identity to *E. coli* TorZ/BisZ) are 62- and 16-fold upregulated at seawater salinity, respectively (Table 1). This system was first described in *E. coli* as an additional anaerobic respiration system that uses trimethylamine *N*-oxide (TMAO) and biotin sulfoxide as alternative electron acceptors (58). Of note, it has been reported in a previous study that *Pdd* is capable of reducing TMAO to TMA (trimethylamine) (59). Additionally, genes involved in glucolysis/gluconeogenesis, pyruvate and acetate metabolism were upregulated at 3% NaCl (Table 1). So are genes encoding an acetate kinase and an alcohol dehydrogenase, suggesting that acetate production is enhanced at seawater salinity in *Pdd*. The upregulation of genes involved in acetate production has been reported in *V. vulnificus* as an antipredation strategy against protozoans (60).

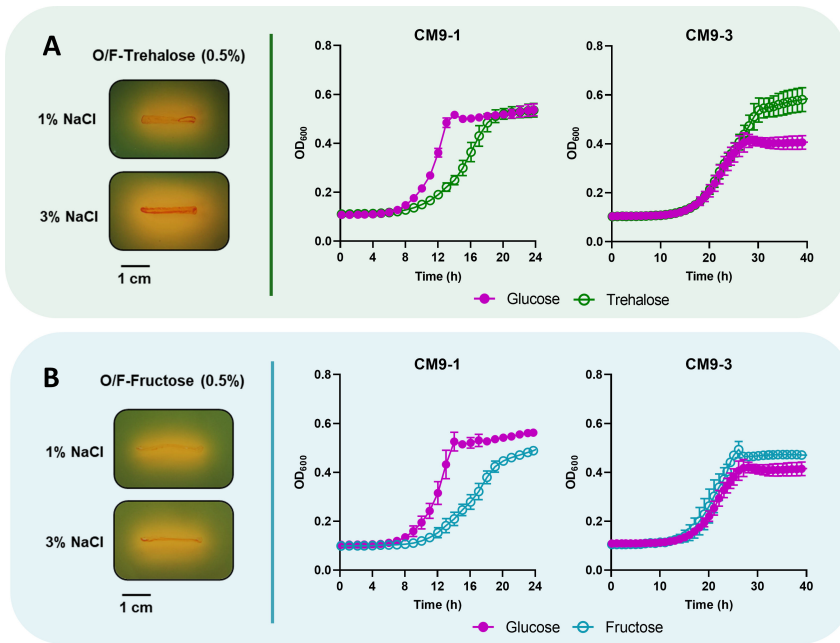
Considering all the functions upregulated at 3% NaCl, energy production systems including aerobic and anaerobic respiration systems as well as carbon metabolism might be of high priority when *Pdd* grows in a free-living state. The enhanced expression of these gene categories was also observed in *P. damsela* subsp. *piscicida* when shifting from low to high salt (61) and in *E. coli* in response to growth in seawater (55).

### Growth at 3% NaCl upregulates genes involved in the uptake of compatible solutes and in the use of trehalose and fructose as carbon sources

To thrive in high-osmolarity environments, bacterial cells accumulate compatible solutes (osmolytes) in the cytoplasm, via either uptake or biosynthesis (62, 63). Osmolytes can be sugars (as trehalose), amino acids (proline and glutamine), and quaternary amines (glycine betaine, choline). Acquisition of compatible solutes from the environment is preferable in terms of cell economy, since the biosynthesis of osmolytes is energetically costly. In line with this, we observed that the growth of *Pdd* at 3% NaCl enhanced the expression of uptake systems for compatible solutes (Fig. 2; Table 1), namely the chromosome II-encoded ProU system for the uptake of glycine betaine and L-proline. The enhanced expression of *proXVW* genes under hyper-osmotic conditions has been reported in *V. parahaemolyticus* (8) and *V. vulnificus* (64).

Albeit the type strain of *Pdd* (ATCC33539) was reported to be unable to use trehalose (47), we here found three genes of the trehalose-specific PTS (phosphotransferase system) (*treB*, *treC*, and *treR*) in the genome of RM-71 (genes absent in the type strain) that were 2- to 15-fold upregulated at high salt. This observation suggests that *Pdd* RM-71 may use trehalose as a compatible solute (osmolyte) similar to what has been described in other members of the family *Vibrionaceae* (63), and trehalose may also be used as a carbon source (65). When we streaked *Pdd* RM-71 on plates of O/F (oxidation-fermentation) medium supplemented with trehalose, we observed a visibly higher production of acid at 3% NaCl than at 1% (Fig. 5A). To quantitatively measure the possible preference of trehalose versus glucose at 3% NaCl by *Pdd*, we monitored the growth of RM-71 at each salinity condition in the presence of either glucose or trehalose, using CM9 (minimal medium M9 supplemented with casamino acids). Interestingly, at 3% NaCl trehalose conferred higher growth levels than glucose, whereas at 1% NaCl glucose was the carbon source that allowed for higher growth rates (Fig. 5A).

An early study reported that the type strain of *Pdd* encodes a putative PTS system for fructose utilization (66). Our RNA-seq data also revealed that 3% NaCl causes the upregulation of genes of a PTS system for fructose (Table 1). Similar to trehalose, we



**FIG 5** Acid production of *Pdd* RM-71 (left panels) by fermentation of trehalose (A) and fructose (B) under 1% NaCl and 3% NaCl in oxidation–fermentation (O/F) medium. Growth curves of RM-71 in CM9 medium (right panels) supplemented with 0.5% glucose compared with the growth in CM9 medium with 0.5% trehalose (A) or 0.5% fructose (B) at 1% NaCl and 3% NaCl. Data are presented as mean  $\pm$  SD from three biological replicates and two independent experiments.

observed that the growth of *Pdd* RM-71 at 3% NaCl in presence of fructose is higher than in presence of glucose, whereas at 1% NaCl glucose is the preferred carbon source and allows higher growth rates (Fig. 5B). All these observations clearly indicate that at seawater salinity, the use of trehalose and fructose is enhanced in comparison to glucose. This poses a notable biological significance, considering that trehalose and fructose are highly abundant sugars in marine environments (67–69). Trehalose constitutes the main sugar in some species of macroalgae (70) and is also a major oligosaccharide in the hemolymph of some crustaceans (71). Fructose availability would come mainly from the hydrolysis of sucrose, which is abundant in seagrass meadows (69, 72) and is produced by green algae and cyanobacteria (73).

### Growth at 3% NaCl enhances tolerance to kanamycin, vancomycin, and ampicillin

We found that *Pdd* RM-71 grown at standard conditions of 1% NaCl exhibits intrinsic resistance to ampicillin and vancomycin, similar to other species of the family *Vibrionaceae* (74, 75) while it is sensitive to kanamycin (Fig. 6). Surprisingly, *Pdd* RM-71 showed increased tolerance to kanamycin, ampicillin, and vancomycin at 3% NaCl compared to 1% NaCl (Fig. 6). The most drastic increase was observed with kanamycin, as RM-71 at 3% NaCl grows up to an OD<sub>600</sub>: 0.8 with antibiotic concentrations (50  $\mu$ g/mL) that resulted inhibitory at 1% NaCl. To demonstrate that the NaCl-promoted antibiotic tolerance constitutes a salinity-dependent response of *Pdd* cells and is not a consequence of the selection of stable mutations conferring antibiotic resistance, late stationary-phase cells grown at 3% NaCl in the presence of each antimicrobial were passaged to fresh antibiotic-supplemented media at the two NaCl concentrations, and the growth was monitored. As shown in Fig. 6, the phenotype of increased tolerance at 3% NaCl with

respect to 1% NaCl is maintained for the three antibiotics tested, suggesting that the NaCl-induced antibiotic tolerance is due to a regulatory, adaptive mechanism in *Pdd*.

The induced tolerance to antimicrobials under high salt has been reported in *Vibrios* (76, 77), but the underlying molecular mechanisms are poorly understood. Several mechanisms have been described for beta-lactam resistance in *Vibrios* (78, 79). Contradictorily, most genes categorized in beta-lactam resistance (ko01501 pathway in KEGG), such as penicillin-binding proteins (PBPs), multidrug efflux pumps (AOJ47\_RS15280, AOJ47\_RS08650), and outer membrane (OM) proteins were upregulated at low salt (Table 2; Table S2). However, it is pertinent to clarify that the ligands of these putative multidrug pumps remain completely undeciphered in *Pdd*, and they may serve functions different from antibiotic resistance.

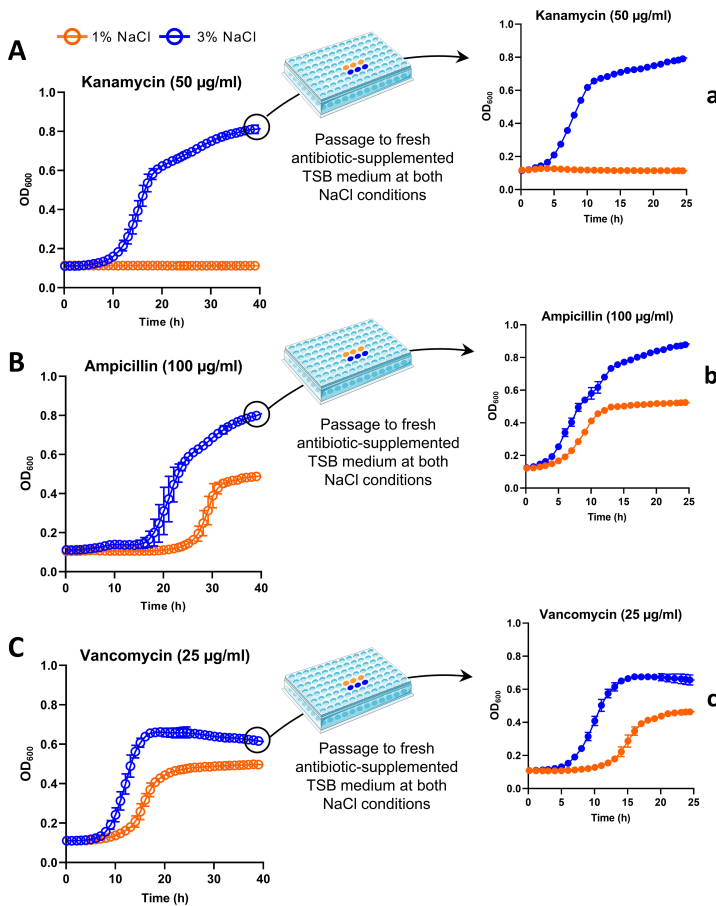
We identified genes whose upregulation at 3% NaCl could account for the increased resistance to ampicillin. These include a gene for a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase (AOJ47\_RS09080) (Pbp5) (FC:  $-1.94$ ) (Table S2) whose deletion in *E. coli* led to an increase in ampicillin susceptibility (80). In addition, previous research reported that some PG peptidases from *V. cholerae*, particularly ShyA, are critical to maintain cell viability on treatment with beta-lactams (79). Supporting our data on growth in the presence of ampicillin at 3% salt, a PG endopeptidase (AOJ47\_RS18260) homologous to *V. cholerae* ShyA (52% ID, VCA0079) was induced under high salt in *Pdd* (FC:  $-3.01$ ).

Mechanisms of aminoglycoside resistance include the acquisition of resistance plasmids, changes in membrane permeability, and/or active efflux of antibiotics (81). We observed that the expression of a Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump (AOJ47\_RS00420) is upregulated at 3% NaCl in *Pdd* (FC:  $-1.82$ ). This protein is homologous to *V. cholerae* VcmA (VC1540; 27% identity, 65% coverage), a protein responsible for increased resistance to kanamycin (82).

Regulation of bacterial metabolism has been identified as an additional mechanism that supports antibiotic resistance in *Vibrio* and other species (83–85). Indeed, a recent work has demonstrated that NaCl negatively regulates proton motive force (PMF) in *Vibrio alginolyticus*, leading to a reduction in aminoglycoside uptake and a subsequent increase in antibiotic resistance at high salt (86). Nevertheless, our transcriptomic data did not reveal a clear contribution of NaCl to PMF changes and its possible impact on aminoglycoside uptake.

Gram-negative OM is an extraordinary barrier to high-molecular-weight antibiotics, such as vancomycin (87). A previous research identified the inner membrane protein VigA conferring vancomycin resistance in *V. cholerae* (74), but no homologs of VigA were identified in the genome of *Pdd* RM-71. Vancomycin exerts its action by binding to D-Ala-D-Ala residues from the bacterial PG, affecting normal cell growth. The enzyme D-ala-D-ala ligase (Ddl) catalyzes the ligation of these residues in the assembly of the bacterial PG, but alternative Ddl ligases (Van ligases) produce other PG precursors with lower affinity for the antibiotic (88). Interestingly, we found a gene (AOJ47\_RS04780) upregulated (FC:  $-1.73$ ) at high salt in *Pdd* (Table S2), whose protein shares 33% identity (BlastP searches in CARD: The Comprehensive Antibiotic Resistance Database) with VanL of *Enterococcus faecalis* (ABX54687.1), a ligase that synthesizes the alternative D-Ala-D-Ser substrate with less affinity for vancomycin (89). The contribution of this gene in the enhanced vancomycin resistance observed at high salt has not been previously reported in *Pdd* and would surely deserve future investigations.

*Pdd* is sensitive to antimicrobial peptides produced by marine fish and arthropoda, such as hepcidin (90), pleurocidin-amide and tachyplesin (91), and piscidin (41). We here tested the possible effect of salinity on the sensitivity of *Pdd* RM-71 to piscidin but did not find differences at 3% NaCl versus 1% NaCl (Fig. S3). Considering that piscidin is believed to act at the level of the cell membrane (92), our results suggest that salinity does not cause appreciable differential regulation of cell functions that might be involved in susceptibility to this fish-derived, antimicrobial peptide.



**FIG 6** NaCl changes impact antibiotic resistance in *Pdd*. Growth curves of RM-71 in TSB-1% NaCl and 3% NaCl supplemented with kanamycin (50 µg/mL) (A), ampicillin (100 µg/mL) (B), and vancomycin (25 µg/mL). After 40 hours, RM-71 cells grown at 3% NaCl in each antibiotic were passaged to fresh antibiotic-supplemented TSB medium at both NaCl conditions (a, b, and c). Data are presented as mean ± SD ( $n = 2$ ).

### Salt-mediated regulation of amino acid metabolism highlights major changes in arginine catabolism

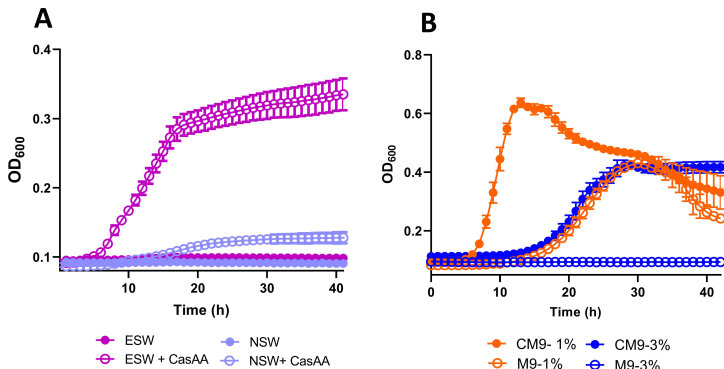
One of the best-studied traits of the amino acid metabolism in *Pdd* is its high histamine-producing ability (>1,000 ppm), being able to release toxic levels of histamine in fish even under refrigeration temperatures (4°C) and hence posing a considerable risk for human health (93). Notably, the transcriptomics analysis revealed that at 3% NaCl *Pdd* upregulates the genes *hdcT*, *hdcA*, and *hisRS* involved in histamine production (Table 1), a finding consistent with histamine production taking place in decomposing fish in the marine environment and, hence, at salinities close to 3% NaCl. To better understand which amino acid pathways undergo significant changes in response to NaCl, salt-regulated pathways were identified by mapping DEGs to KEGG database. We observed a general upregulation of genes involved in amino acid pathways at 3% NaCl (Fig. S4) suggesting that amino acid metabolism is key to support bacterial growth and survival in a free-living lifestyle. The modulation of amino acid metabolism in response to NaCl

has also been reported in *V. parahaemolyticus* (9) and *E. coli* (94). Though *Pdd* survives in seawater microcosms at 14°C and 22°C for longer than 1 year (95), we observed that natural coastal seawater does not support detectable growth of *Pdd* RM-71 (measured as an increase in optical density) after 40 hours, even when using ESW (Fig. 7A). Interestingly, the addition of casamino acids substantially improved growth but only in eutrophicated water (Fig. 7A). We also observed that *Pdd* RM-71 is capable of growing in minimal medium with glucose in presence of  $\text{NH}_4^+$  ions as sole nitrogen source at 1% NaCl but not at 3% NaCl (Fig. 7B). This result suggests that inorganic nitrogen is not routinely used by *Pdd* under environmental conditions in seawater, but it is used under low-salt stress. All these observations suggest that *Pdd* thrives in organic matter-rich microenvironments but not so much in pelagic, nutrient-scarce seawater, and amino acid availability may constitute a limiting factor for the build up of *Pdd* populations in the environment. In a study of coastal vibrioplankton, it was found that the presence of *Pdd* was minor in comparison with, for instance, the *Vibrio splendidus* group (96). In fact, albeit *Pdd* is occasionally isolated from coastal seawater, it is more prevalent in nutrient-rich ecological niches and surfaces, such as gastrointestinal tracts of sharks and teleost fish (97, 98), fish gill microbiota (99), decomposing fish (100), and, especially, in the internal milieu of animal hosts suffering a *Pdd* infection, where it can constitute the major pathogen isolated, in many instances as pure culture (101).

*Pdd* is one of the few vibrios that produces arginine deiminase (also known as arginine dihydrolase), a key phenotypical test employed in taxonomy and identification of vibrios (102). In fact, *Pdd* (which was formerly known as *V. damsela*) was classically included in the “group F vibrios” or “group EF6” together with *Vibrio furnissii* and *Vibrio fluvialis* (103), positive for arginine deiminase. Through the arginine deiminase (ADI) pathway, L-arginine is converted to L-ornithine, yielding ATP, carbon dioxide, and ammonia through three metabolic steps (Fig. 8A). Intriguingly, our RNA-seq analysis revealed that the *arcACBD* operon encoding the ADS, responsible for L-arginine internalization and catabolism, is listed among the top upregulated genes at 3% NaCl, being *arcA* and *arcC* genes ca. 40-fold upregulated (Table 1; Fig. 8B). Additionally, genes of another L-arginine catabolic pathway, the arginine succinyltransferase system, were also upregulated at high salinity (Table 1).

The fitness advantages to *Pdd* in upregulating ADI pathway under marine-like salinity or, to put it the other way, to downregulate it under low salinity, remain unknown. To gain an insight into this, we deleted *arcA* gene in *Pdd* RM-71 by allelic exchange. Deletion of *arcA* caused a visible phenotypical change in the classical test for arginine deiminase, which detects alkalization of the medium indicated by a purple coloration (Fig. 8C). This medium detects alkalization caused by more than one enzymatic activity, including both arginine deiminase (also known as arginine dihydrolase) and arginine decarboxylase, and this may explain why the *arcA* mutant still produces residual purple color in this test. The *arcA* mutant did not show impairment for growth either in TSB medium at 1% NaCl and 3% NaCl (Fig. S5A) or in the presence of supplemented L-arginine (Fig. S5B) with respect to the parental strain.

The ADI pathway has a role in bacterial acid stress survival in many species of bacteria (104–106). We, therefore, aimed at investigating whether the mutation of *arcA* exerted any effect on resistance to acidic pH in *Pdd*. We first analyzed the growth of RM-71 in TSB-1 and TSB-3 at various pH levels (pH 7, pH 6, pH 5, and pH 4) and observed that pH 4 did not allow *Pdd* replication either at 1% NaCl or at 3% NaCl (data not shown). We next evaluated the viability of RM-71 and  $\Delta arcA$  on acid stress (pH 4) in TSB-1 and TSB-3 supplemented or not with L-arginine (10 mM). Interestingly, the survival of RM-71 and  $\Delta arcA$  strains after 16-hour exposure to acid conditions was ca. 3 orders of magnitude higher at 3% NaCl than at 1% NaCl (Fig. 8D), thus demonstrating that salinity has a major impact on *Pdd* survival at pH 4. In line with these findings, previous studies have demonstrated that high salinity increased *V. parahaemolyticus* survival against acid stress (107, 108). In addition, it was observed that the  $\Delta arcA$  strain exhibited a slight, but significant, impairment for acid resistance in comparison to RM-71, suggesting a role of



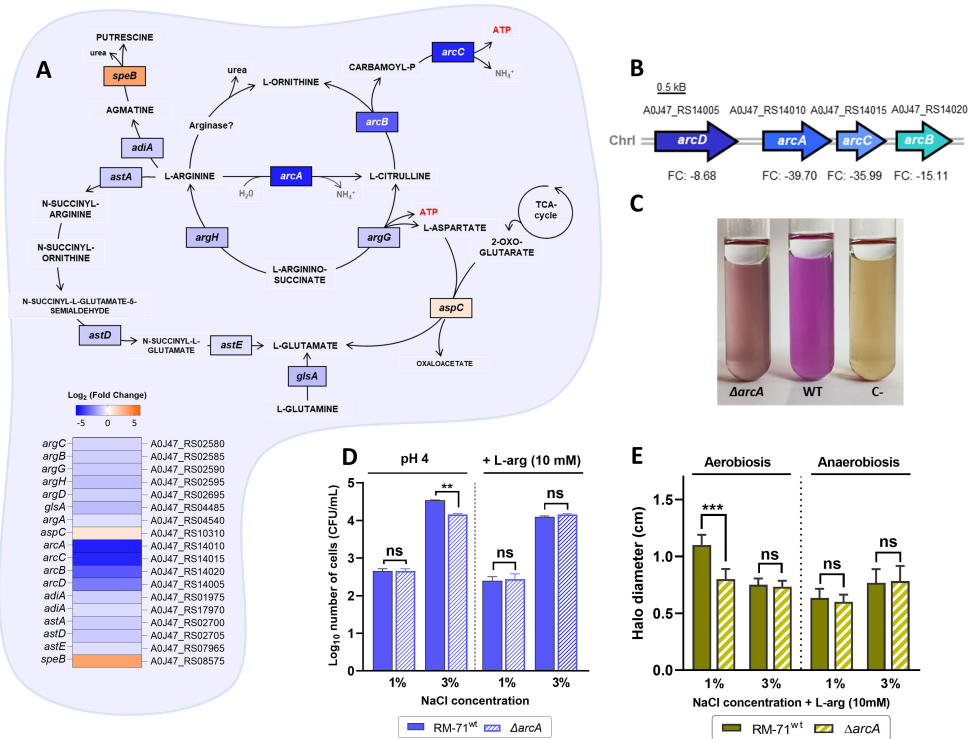
**FIG 7** (A) Growth curves of *Pdd* RM-71 in plain coastal seawater (NSW) and eutrophicated seawater (ESW) with or without casamino acids (CasAA). (B) Growth of *Pdd* RM-71 in minimal medium M9 with 1% NaCl or 3% NaCl supplemented (CM9) or not (M9) with CasAA. The OD<sub>600</sub> was monitored for 24 hours. Data are presented as mean  $\pm$  SD from three biological replicates and two independent experiments.

the ADI pathway on *Pdd* resistance to acidic conditions (Fig. 8D). This impairment was detected in TSB-3 with no additional L-arginine supplement but was not detected in presence of a surplus of L-arginine. This last observation suggests that an excess of arginine might allow other arginine-degrading pathways (e.g., the arginine decarboxylase system) to contribute to acid resistance and thus compensate for the absence of a functional ADI pathway.

*Pseudomonas aeruginosa* uses ADI activity to fermentatively generate ATP (109) and to maintain motility under anaerobiosis (110). We noted that the *arcA* mutant was not affected in swimming motility in anaerobiosis at either salinity condition but exhibited significant impairment under aerobiosis in the presence of supplemented L-arginine at 1% NaCl (Fig. 8E), a seemingly contradictory observation (ADI pathway genes were here found to be upregulated at 3% NaCl) that indicates that the involvement of the ADI pathway in *Pdd* motility needs additional investigation. Nevertheless, the observation that arginine deiminase is also upregulated in *Pdd* under iron-excess conditions (32) supports the hypothesis of a preferential role of this enzymatic activity during the free-living lifestyle versus the pathogenic lifestyle. It has been shown that uptake and respiration of L-arginine are maintained under nutrient starvation in *Vibrio* sp. (111). This strategy might be important for *Pdd* in its survival for long periods in low-nutrient seawater (95).

### Low salt triggers a virulence profile with a major impact on the upregulation of the T2SS-dependent secretome

Entry into the internal milieu of a vertebrate host leads to an abrupt drop in salinity. We found that 1% NaCl upregulates many gene functions potentially related to virulence. These functions include motility and chemotaxis, synthesis and uptake of polyamines, stress response mechanisms and efflux systems, and, notably, iron acquisition mechanisms and cytotoxins (Fig. 2; Table 2). The glutathione synthetase GshB was within the top upregulated functions at low salt, with an FC value of 38.4. Mutation of this gene has been associated with a strong impairment in colonization ability in *V. cholerae* (112). Previous studies reported the presence of polyamines putrescine, cadaverine, norspermidine, and spermidine in *Pdd* cells (93, 113, 114). We found that low salinity upregulates genes for the production of putrescine and norspermidine synthesis and transport (Table 2). The implication of spermidine and putrescine in the virulence of bacterial pathogens has been reported in several studies (115–117). However, the role of polyamines in *Pdd* pathobiology remains unknown.



**FIG 8** (A) Metabolic map showing differentially expressed genes (DEGs) related to arginine catabolism. DEGs are placed in the corresponding metabolic reaction with a color-based scale. Expression values are depicted in the heat map as  $\text{Log}_2\text{FC}$ . Genes most upregulated at 3% NaCl (blue) correspond to the arginine deiminase pathway (*arcABCD*). Genes involved in the arginine succinyltransferase system (AST) were also upregulated at high salinity. (B) Gene map of the arginine deiminase system in RM-71 genome. The NCBI locus tag and the corresponding fold change (FC) value are displayed for each gene. (C) Moeller's test results for arginine decarboxylation/deamination of  $\Delta arcA$ , RM-71<sup>wt</sup> (wild type), and non-inoculated control (C-). The light violet color observed in  $\Delta arcA$  strain suggests the activity of other arginine-based alkalinizing enzymes. (D) Graph showing RM-71<sup>wt</sup> and  $\Delta arcA$  viability after 16 hours of incubation at pH 4 in TSB-1 and TSB-3 and supplemental L-arginine (10 mM). A Student's *t*-test was used to assess statistical significance (\*\*\*\**P* < 0.001, \*\**P* < 0.01; ns, not significant). (E) Graph showing swimming motility diameters of RM-71 and  $\Delta arcA$  in TSB-1 and TSB-3 supplemented with 10-mM L-arginine (L-arg) under aerobic and anaerobic conditions.  $\Delta arcA$  motility is significantly reduced in the presence of L-arg at 1% NaCl. Data represent the mean  $\pm$  SD from three biological replicates and two independent experiments.

The hallmarks of *Pdd* pathobiology in infected animals include the extensive hemorrhages and tissue damage caused by the secretion, in very high amounts, of the T2SS-dependent phospholipase D Dly and the two pore-forming toxins PhlyP and PhlyC (24). A pioneering study on *Pdd* toxin production reported that cytolytic activity was maximal when the bacteria were grown at 1% NaCl (118). In agreement with these findings, the plasmid-borne genes encoding Dly (*dly*, A0J47\_RS20350) and PhlyP (*hlyA<sub>pl</sub>*, A0J47\_RS20355) were 11-fold upregulated at low salt, whereas the *hlyA<sub>ch</sub>* gene encoding the chromosomal hemolysin PhlyC (A0J47\_RS10995) was 2-fold upregulated (Table 2).

Unexpectedly, the list of top-upregulated genes at 1% NaCl was dominated by two genes encoding a small, 11-kDa protein (A0J47\_RS13280) (PirA) and a putative  $\delta$ -endotoxin (A0J47\_RS13275) (PirB), respectively (Table 2). These two proteins are candidates to constitute a PirAB-like binary toxin for its similarity to the PirAB toxin produced by the strains of *V. parahaemolyticus* causing acute hepatopancreatic necrosis disease in crustaceans (119). However, the role of this putative PirAB-like toxin in *Pdd* remains unknown. The 11-kDa and  $\delta$ -endotoxin proteins were previously identified in a study

that characterized the T2SS-dependent secretome of *Pdd* RM-71 (27) and were subsequently confirmed as genes of the RstAB regulon, a two-component system that is a master positive regulator of virulence in *Pdd* (28). The genes for 11-kDa (PirA) and  $\delta$ -endotoxin (PirB) are not ubiquitous in the subspecies. They occur in some *Pdd* isolates and are located within a highly variable region of the *Pdd* chromosome II, suggesting their acquisition by horizontal gene transfer (53).

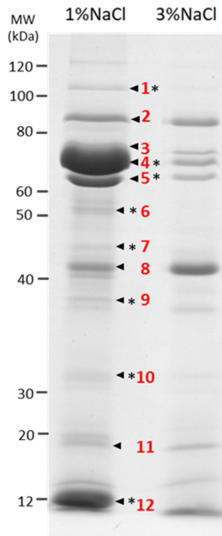
This strong upregulation of the 11-kDa and  $\delta$ -endotoxin genes under salinity conditions that mimic the hosts' milieu prompted us to construct a knockout mutant of the larger protein ( $\delta$ -endotoxin or PirB) and assess its impact in virulence for turbot, the host of *Pdd* RM-71. We found that deletion of the  $\delta$ -endotoxin gene did not cause a detectable impairment in virulence (Fig. S6A). The  $\delta$ -endotoxin mutant produced hemolytic activity at levels identical to the parental strain (Fig. S6B) and exhibited normal growth (Fig. S6C). As a comparison, a quadruple mutant of *Pdd* RM-71 defective in Dly, PhlyP, PhlyC, and PlpV cytotoxins, but with intact  $\delta$ -endotoxin gene, was non-virulent under the conditions tested (Fig. S6A). These results suggest that the  $\delta$ -endotoxin gene is expendable for maximal virulence of *Pdd* RM-71 in a turbot fish model. Notwithstanding, considering the broad host range of *Pdd*, it would be interesting to conduct future studies to assess the role of this putative PirAB-like toxin for other animal hosts, including fish and crustaceans.

Changes in expression at the transcriptional level may not necessarily reflect the final changes in actual protein amounts since other regulatory mechanisms may tune ultimate protein abundance (120). To gain an insight into the effect of salinity in the secretome of *Pdd*, RM-71 culture supernatants obtained at 3% NaCl and 1% NaCl were examined by SDS-PAGE, and protein bands were subjected to quantitative analysis. As shown in Fig. 9A, the majority of the secreted proteins were significantly more abundant at 1% NaCl than at 3% NaCl. Notably, cytotoxins Dly, PhlyP, and PhlyC and proteins of the putative PirAB-like toxin were more abundant in the profile at low salt. The most abundant protein bands corresponded to Dly and the PirA-like 11-kDa protein (AOJ47\_RS13280), which were 25 and 13 times more abundant, respectively, at 1% than at 3% NaCl (Fig. 9B). Altogether, these results clearly confirm that a shift from high to low salinity triggers a virulence profile in *Pdd*. In concordance with the results of the analysis of secreted proteins, the phenotypical plate tests for the detection of hemolysis (a phenotype attributable to synergistic effects of Dly with PhlyP and PhlyC) and phospholipase (a phenotype mainly attributable to Dly) showed increased activities at 1% compared to 3% NaCl (Fig. 10A). These observations are in the same line as previous reports documenting the induction of cytotoxin expression in *Vibrio* species in response to low salt, as seen with *V. vulnificus* *vvhA* hemolysin (121). Similarly, cytotoxicity of *V. parahaemolyticus* has been shown to be higher when grown in 1% NaCl when compared to 3% NaCl (107).

Additional secreted proteins with increased abundance at low salt were a lipoprotein (AOJ47\_RS11245) and an RstAB-dependent hypothetical protein (AOJ47\_RS20565). In accordance with these results, their respective genes were also upregulated at 1% NaCl in the transcriptomic assay. However, the trypsin-like serine protease (band 8 in Fig. 9A), which was 5.67-fold upregulated at 1% NaCl in the RNA-seq data, exhibited more protein abundance at 3% NaCl. It has to be noted that, due to the low amount of protein obtained from cultures grown to the exponential phase (OD<sub>600</sub> of 0.55), the comparative analysis of the secretome at the two NaCl conditions was performed using cultures grown to the stationary phase (OD<sub>600</sub> of 1.7). Therefore, it might be expected that the relative levels of some proteins in the *Pdd* secretome when comparing the two salinity conditions do not exactly mimic their relative levels in the transcriptomic data.

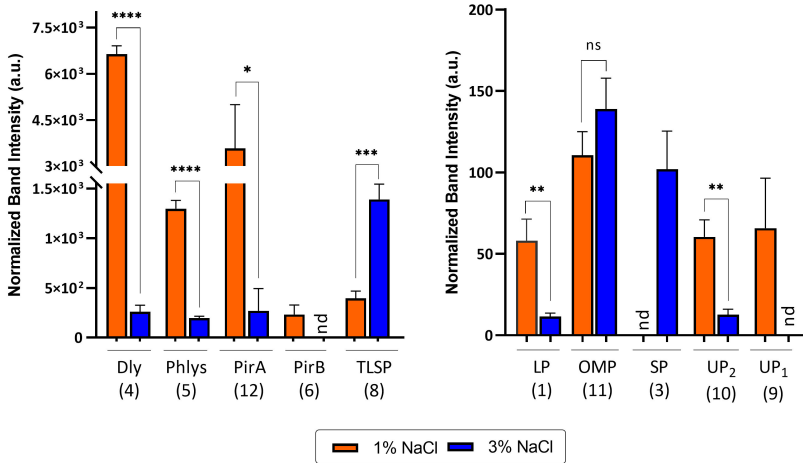
Altogether, our data showing that secreted proteins are much more abundantly produced at low salinity (Fig. 9) indicate that *Pdd* cells allocate valuable resources for the production of high amounts of proteins. Consistent with these observations, several genes involved in protein synthesis and regulation were transcriptionally induced at low salt (Fig. 2 and Table 2), and as many as 52 genes encoding ribosomal proteins were

**A**



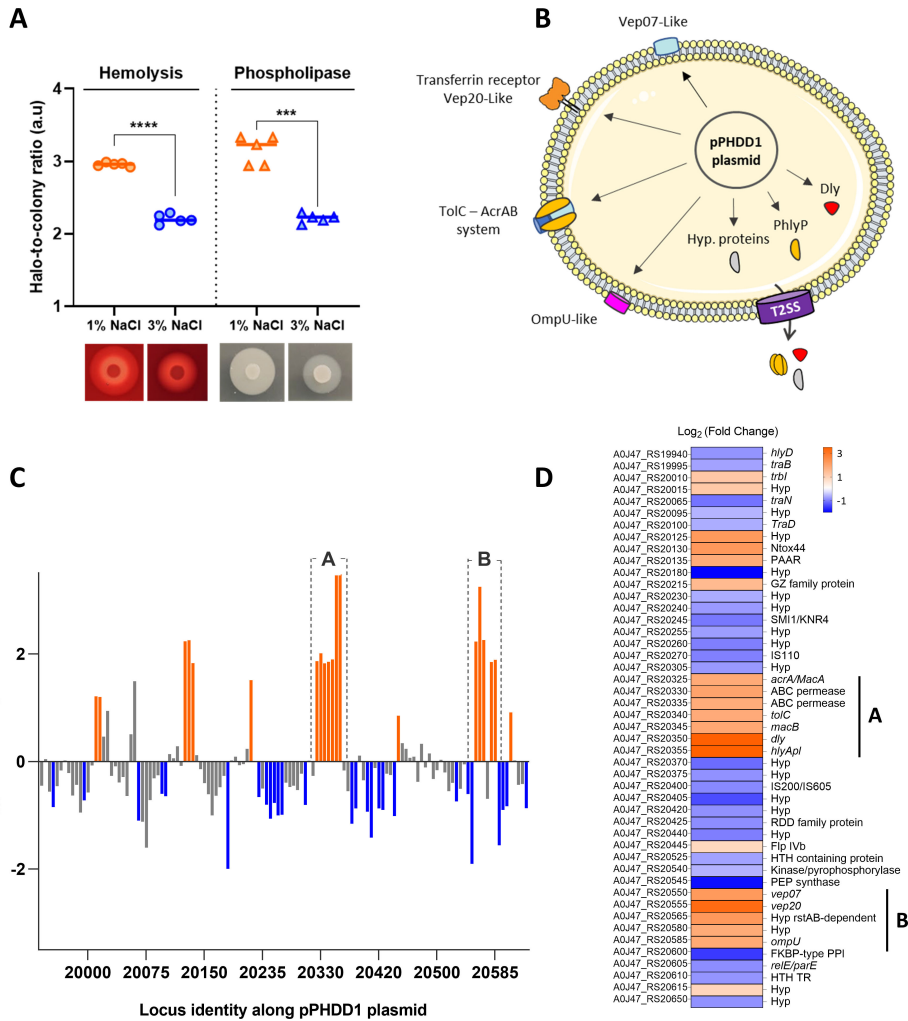
Band	Accession ID	Code	Product/Function	FC
1	A0J47_RS11245	LP	Lipoprotein (putative)	9.43
2	A0J47_RS15255	HKP	Sialidase	-
3	A0J47_RS19420	SP	S8 family serine peptidase	-
4	A0J47_RS20350	Dly	Damselysin	11.01
5	A0J47_RS20355	Phlys	Phobalysin P	11.13
	A0J47_RS10995		Phobalysin C	2.32
6	A0J47_RS13275	PirB	D-Endotoxin	83.44
7	A0J47_RS13275	tPirB	Truncated D-Endotoxin	-
8	A0J47_RS18555	TLSP	Trypsin-like serine protease	5.67
9	A0J47_RS20565	UP <sub>1</sub>	Uncharacterized protein	4.78
10	A0J47_RS17975	UP <sub>2</sub>	Uncharacterized protein	-
11	A0J47_RS19365	OMP	Outer membrane beta-barrel protein	-
	A0J47_RS15005		Helix-hairpin-helix domain-containing protein	-
12	A0J47_RS13280	PirA	PirA-like	348.13

**B**



**FIG 9** Salinity modulates the abundance of secreted proteins in *Pdd*. (A) Comparative analysis of SDS-PAGE profiles of culture supernatants from RM-71<sup>Tt</sup> at 1% NaCl and 3% NaCl. Previously identified protein bands (27) are numbered from 1 to 12. Bands with higher abundance at low salt are marked with an asterisk (\*). Identification and tagging of the proteins is shown in the adjacent table. (B) Protein quantification results were obtained by densitometric analysis using ImageLab Software (Bio-Rad). Sialidase band (2, HKP) was used as a normalization control. Data are presented as mean  $\pm$  SD of normalized protein intensity (expressed as a.u., arbitrary units) from three replicates over three independent experiments. The corresponding band on the SDS-PAGE gel shown in (A) is given in parentheses. nd, not detected. Statistical difference was assessed by Student's *t*-test: \*\*\*\**P* < 0.0001, \*\*\**P* < 0.001, \*\**P* < 0.01, \**P* < 0.05.

upregulated at 1% NaCl (Table S2). Additionally, the genes encoding ribosomal RpsF modification protein RimK (A0J47\_RS00405) as well as YegQ (A0J47\_RS12990), involved in tRNA hydroxylation, were listed among the 20 top DEGs under this condition.



**FIG 10** Differential gene expression patterns in the virulence plasmid pPHDD1 in response to changes in NaCl concentration. (A) Box plot showing hemolytic and phospholipase activities (expressed as a.u., arbitrary units, of the halo-to-colony ratio) of RM-71 at two NaCl conditions. Statistical significance was determined using Student's *t*-test: \*\*\*\**P* < 0.0001, \*\*\**P* < 0.001. (B) Cell illustration depicting pPHDD1-encoded genes that are part of the low-salt stimulation of *Pdd* RM-71. Cellular membrane was used from Servier Medical Art templates, licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. (C) Graph showing the distribution of upregulated (orange), downregulated (blue), and unchanged genes (gray) along pPHDD1 virulence plasmid of RM-71 at 1% NaCl versus 3% NaCl. All NCBI locus tags in x-axis must be preceded by "A0J47\_RS." "A" and "B" denote the groups where most of the upregulated genes are concentrated. (D) Heat map depicting upregulated and downregulated DEGs in RM-71 pPHDD1 plasmid at 1% NaCl versus 3% NaCl. Expression values are represented as Log<sub>2</sub> (Fold Change); hypothetical proteins are denoted as "Hyp."

### Iron acquisition systems are upregulated at 1% NaCl

Iron (Fe) is an essential element for most microorganisms, but its availability within the host is strongly limited, as it is chelated by proteins (122). In a vertebrate host, most Fe is complexed to heme, and hemoglobin is contained within erythrocytes. Previous studies reported that *Pdd* can use ferric citrate, ferrous iron, transferrin, and heme as iron sources (123, 124). Being low salinity an informative signal of entry into a host, it

would be expected that iron uptake systems be upregulated at 1% in *Pdd*. Confirming this hypothesis, RNA-seq unveiled the upregulation, at low salt, of Fbp and Feo systems, involved in ferric and ferrous iron transport, respectively (Table 2). *fbpA* gene was the most upregulated with an FC of 18.74 (Table 2), but the upregulation was also observed for the gene encoding the TonB-dependent siderophore receptor FhuE and for some genes of the cluster encoding the heme iron utilization system (Fig. 3, chromosome I panel). Furthermore, the upregulation of erythrocyte-lysing hemolysins Dly and PhlyP at low salt is expected to contribute to the release of heme iron. Also of note, low salt conditions upregulated (9.5-fold) a plasmid (pPHDD1)-encoded TonB-dependent receptor (A0J47\_RS20555) homologous (60% amino acid identity) to Vep20, a transferrin receptor that is a key element for *V. vulnificus* virulence in eels (125).

### Additional candidate virulence factors encoded within pPHDD1 plasmid are upregulated at low salt

Previous studies have demonstrated that the deletion of the pPHDD1-encoded cytotoxin genes *dly* and *hlyApl* in *Pdd* RM-71 is not sufficient to mimic the low-virulence profile of a naturally plasmidless strain of *Pdd* (44), emphasizing the potential implications of yet uncharacterized virulence factors encoded within pPHDD1 plasmid. As said above, the hemolytic and phospholipase activities are upregulated at low salinity and are mainly attributable to the cytotoxins encoded within pPHDD1 (Fig. 10A). By studying the comparative transcriptional landscape of pPHDD1 plasmid in response to low salt, we detected the upregulation of additional, potential virulence factors (Fig. 10B), whose genes are distributed in specific regions within the plasmid, suggesting that the genes within a cluster may be co-transcribed and co-regulated (Fig. 10C and D). A cluster A of five upregulated genes includes the AcrAB proteins, TolC, and two additional ABC permeases, where AcrAB-TolC constitutes a putative multidrug efflux transporter. Cluster B includes two interesting candidate virulence genes that have not been studied in *Pdd* so far. The first gene encodes an OM lipoprotein (A0J47\_RS20550) homologous to Vep07 involved in resistance to eel serum in *V. vulnificus* biotype 2, and mutations in *vep07* were correlated with loss of virulence for eels (126). The second gene encodes the Vep20-like TonB-dependent transferrin receptor mentioned above (A0J47\_RS20555). It is so far unknown whether these two genes encoding the Vep07- and the Vep20-like proteins play a role in *Pdd* pathobiology, but they certainly will deserve special attention in future studies. In addition, A0J47\_RS20585, encoding an OM protein OmpU, is also part of the low salt-induced profile (FC 3.7). Several studies have disclosed the crucial role of OmpU in proliferation, colonization, and adhesion in different *Vibrios* (127). In accordance with our results, high salt also induced the upregulation of OmpU in *V. parahaemolyticus* (8). Finally, two uncharacterized pPHDD1-encoded proteins are also part of the low-salt stimulon of *Pdd* and correspond to gene A0J47\_RS20580, induced 3.6-fold at 1% NaCl, and the T2SS-secreted RstAB-dependent protein (A0J47\_RS20565; FC: 4.7) (27).

### Concluding remarks

Here, we propose that the decrease in NaCl concentration experienced by *Pdd* on entry into a host (from 3% to 1% NaCl) triggers a virulence program by strongly upregulating cytotoxin abundance in the secretome fraction, protein translation, expression of iron acquisition systems, and additional virulence-related functions. On the contrary, growth at marine salinity upregulates compatible solute uptake and enhances energy production mechanisms, utilization of trehalose and fructose as carbon sources, nitrogen metabolism, and global amino acid metabolism, with emphasis on enzymes of the ADS that might play a role in acid resistance. It is noticeable that the salinity regulon does not overlap with the previously reported RstAB regulon in *Pdd*, suggesting that this two-component system may not be primarily responsible for transducing information on changes in NaCl concentration. As an example, while mutation of RstAB system caused a 1,300-fold downregulation of capsule biogenesis genes (28), the impact of NaCl changes

in the transcription of capsule genes in the present study was very discrete (with FCs ranging from 1.6 to 3.57). Among the species of the *Vibrionaceae*, few examples are known about the regulatory systems that transduce information on NaCl concentrations, but it is evident that transcriptome responses to salinity changes are transduced via several mechanisms in *Vibrios*, rather than via a single global regulator. In *V. cholerae*, OScR (6), CosR (7), and EnvZ/OmpR (128) constitute osmolarity-responsive regulators, and new regulatory genes have recently been described that mediate salinity-responsive modulation of gene expression in *V. parahaemolyticus* (129). The strong induction of a virulence genetic program in *Pdd* on exposure to low salinity, and the conspicuous changes elicited in the T2S5-dependent secretome, will surely boost future studies aimed at identifying novel osmolarity-sensitive systems in this generalist and highly versatile marine bacterium and will inspire studies in other *Vibrionaceae* species.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the grant PID2019-110558RB-I00 funded by Spanish MCIN/AEI/10.13039/501100011033; “ERDF A way of making Europe”; the European Union; and Xunta de Galicia (Spain) (grant nos ED431C 2018/18 and ED431C 2022/23). Alba V. Barca thanks the IACOBUS program (also supported by the INTERREG VI A España-Portugal (POPTec) 2021-2027) for a predoctoral mobility grant for a 3 month research period at IBMC, Porto, Portugal. Ana do Vale was funded by Portuguese national funds through the FCT–Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. and, when eligible, by COMPETE 2020 FEDER funds, under the Scientific Employment Stimulus-Individual Call 2021.02251.CEECIND/CP1663/CT0016.

We are grateful to Insuiña S.L. (Oia, Galicia, Spain) for their valuable support in providing fish for the experiments.

The authors declare no conflict of interest.

### AUTHOR AFFILIATIONS

<sup>1</sup>Departamento de Microbioloxía e Parasitoloxía, Instituto de Acuicultura, Universidade de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

<sup>2</sup>Fish Immunology and Vaccinology Group, IBMC-Instituto de Biología Molecular e Celular, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>3</sup>i3S-Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto, Porto, Portugal

### AUTHOR ORCIDs

Alba V. Barca  <http://orcid.org/0000-0002-1048-0648>

Ana Vences  <http://orcid.org/0000-0002-4229-3134>

Ana do Vale  <http://orcid.org/0000-0002-4044-6328>

Carlos R. Osorio  <http://orcid.org/0000-0002-3099-4064>

### FUNDING

Funder	Grant(s)	Author(s)
<a href="#">MEC   Agencia Estatal de Investigación (AEI)</a>	PID2019-110558RB-I00	Alba V. Barca Ana Vences Carlos R. Osorio
<a href="#">European Commission (EC)</a>	PID2019-110558RB-I00	Alba V. Barca Ana Vences Carlos R. Osorio
<a href="#">MEC   Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT)</a>	2021.02251.CEECIND/CP1663/CT0016	Ana do Vale

Funder	Grant(s)	Author(s)
Xunta de Galicia (Regional Government of Galicia)	ED431C 2022/23	Alba V. Barca Ana Vences Carlos R. Osorio
Xunta de Galicia (Regional Government of Galicia)	ED431C 2018/18	Alba V. Barca Ana Vences Carlos R. Osorio

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Alba V. Barca, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Software, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review and editing | Ana Vences, Investigation, Methodology, Software | Mateus S. Terceti, Investigation | Ana do Vale, Investigation, Methodology, Software, Funding acquisition, Resources, Project administration, Supervision | Carlos R. Osorio, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Supervision, Validation, Writing – original draft, Writing – review and editing

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

A list of all differentially expressed genes (DEGs) is provided in Table S2. The complete genome of Pdd RM-71 strain is available under the accession number [GCF\\_001708035.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/GCF_001708035.2).

## ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

### Supplemental Material

FIG S1 (mSystems01253-22-S0001.tif).  
 FIG S2 (mSystems01253-22-S0002.tif).  
 FIG S3 (mSystems01253-22-S0003.tif).  
 FIG S4 (mSystems01253-22-S0004.tif).  
 FIG S5 (mSystems01253-22-S0005.tif).  
 FIG S6 (mSystems01253-22-S0006.tif).  
 TABLE S1 (mSystems01253-22-S0007.docx).  
 TABLE S2 (mSystems01253-22-S0008.xlsx).  
 TABLE S3 (mSystems01253-22-S0009.docx).

## REFERENCES

- Choi G, Choi SH. 2022. Complex regulatory networks of virulence factors in *Vibrio vulnificus*. Trends Microbiol 30:1205–1216. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.05.009>
- Thompson FL, Iida T, Swings J. 2004. Biodiversity of vibrios. Microbiol Mol Biol Rev 68:403–431. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.3.403-431.2004>
- Baker-Austin C, Oliver JD, Alam M, Ali A, Waldor MK, Qadri F, Martinez J. 2018. *Vibrio* spp. infections. Nat Rev Dis Primers 4:7. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0010-y>
- Lyons MM, Lau Y-T, Carden WE, Ward JE, Roberts SB, Smolowitz R, Vallino J, Allam B. 2007. Characteristics of marine aggregates in shallow-water ecosystems: implications for disease ecology. EcoHealth 4:406–420. <https://doi.org/10.1007/s10393-007-0134-0>
- Takemura AF, Chien DM, Polz MF. 2014. Associations and dynamics of *Vibrionaceae* in the environment, from the genus to the population level. Front Microbiol 5:38. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00038>
- Shikuma NJ, Yildiz FH. 2009. Identification and characterization of OscrR, a transcriptional regulator involved in osmolarity adaptation in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol 191:4082–4096. <https://doi.org/10.1128/JB.01540-08>
- Shikuma NJ, Davis KR, Fong JNC, Yildiz FH. 2013. The transcriptional regulator, CosR, controls compatible solute biosynthesis and transport, motility and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. Environ Microbiol 15:1387–1399. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2012.02805.x>
- Yang L, Zhan L, Han H, Gao H, Guo Z, Qin C, Yang R, Liu X, Zhou D. 2010. The low-salt stimulon in *Vibrio parahaemolyticus*. Int J Food Microbiol 137:49–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.006>
- Ma R, Wang Y, Huang L, Zhao S, Li L, Yin M, Fang W. 2021. Effects of different salinity on the transcriptome and antibiotic resistance of two *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated from *Penaeus vannamei* cultured in seawater and freshwater ponds. J Fish Dis 44:2055–2066. <https://doi.org/10.1111/jfd.13520>
- García K, Yáñez C, Plaza N, Peña F, Sepúlveda P, Pérez-Reytor D, Espejo RT. 2017. Gene expression of *Vibrio parahaemolyticus* growing in laboratory isolation conditions compared to those common in its

- natural ocean environment. *BMC Microbiol* 17:118. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-1030-6>
11. Hu S, Li Y, Wang B, Yin L, Jia X. 2022. Effects of NaCl concentration on the behavior of *Vibrio Brasiliensis* and Transcriptome analysis. *Foods* 11:840. <https://doi.org/10.3390/foods11060840>
  12. Huang Z, Yu K, Fang Y, Dai H, Cai H, Li Z, Kan B, Wei Q, Wang D. 2020. Comparative Genomics and Transcriptomics analyses reveal a unique environmental adaptability of *Vibrio Fujianensis*. *Microorganisms* 8:555. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040555>
  13. Williams TC, Blackman ER, Morrison SS, Gibas CJ, Oliver JD. 2014. Transcriptome sequencing reveals the virulence and environmental genetic programs of *Vibrio Vulnificus* exposed to host and Estuarine conditions. *PLoS One* 9:e114376. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114376>
  14. Ortigosa M, Esteve C, Pujalte MJ. 1989. *Vibrio* species in seawater and mussels: abundance and numerical taxonomy. *Syst Appl Microbiol* 12:316–325. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(89\)80080-3](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(89)80080-3)
  15. Cortés G, Antillón F. 1990. Aislamiento de vibrios enteropatógenos de bivalvos y cieno del golfo de Nicoya, Costa Rica. *Rev Biol Trop* 38:437–440.
  16. Kelly MT, Stroth EM. 1988. Occurrence of *Vibrionaceae* in natural and cultivated oyster populations in the Pacific Northwest. *Diagn Microbiol Infect Dis* 9:1–5. [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(88\)90054-5](https://doi.org/10.1016/0732-8893(88)90054-5)
  17. Buck JD. 1990. Potentially pathogenic marine *Vibrio* species in seawater and marine animals in the Sarasota, Florida, area. *J Coast Res* 6:943–948.
  18. Herwig RP, Staley JT. 1986. Anaerobic bacteria from the digestive tract of North Atlantic fin whales (*Balaenoptera physalus*). *FEMS Microbiol Ecol* 38:361–371. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01749.x>
  19. Yu J, Kang MJ, Kim YJ, Park M-J, Lim JK, Noh CH, Kang SG, Lee HS, Lee J-H, Kwon KK. 2021. Comparison of intestine microbiota between wild and farmed Korean rockfish, *Sebastes schlegelii*. *Ocean Sci J* 56:297–306. <https://doi.org/10.1007/s12601-021-00022-2>
  20. Wang C, Lin G, Yan T, Zheng Z, Chen B, Sun F. 2014. The cellular community in the intestine of the shrimp *Penaeus penicillatus* and its culture environments. *Fish Sci* 80:1001–1007. <https://doi.org/10.1007/s12562-014-0765-3>
  21. Pujalte MJ, Sitjà-Bobadilla A, Alvarez-Pellitero P, Garay E. 2003. Carriage of potentially fish-pathogenic bacteria in *Sparus aurata* cultured in Mediterranean fish farms. *Dis Aquat Organ* 54:119–126. <https://doi.org/10.3354/dao054119>
  22. Raharjo HM, Budiyansah H, Mursalin MF, Chokmangmeepisarn P, Sakulworakan R, Madyod S, Sawaka M, Sonthi M, Debnath PP, Elayaraja S, Rung-Ruangkijkrat T, Dong HT, Rodkhum C. 2022. Distribution of *Vibrionaceae* in farmed Asian sea bass, *Lates calcarifer* in Thailand and their high prevalence of antimicrobial resistance. *J Fish Dis* 45:1355–1371. <https://doi.org/10.1111/jfd.13667>
  23. Torido Y, Ohshima C, Takahashi H, Miya S, Iwakawa A, Kuda T, Kimura B. 2014. Distribution of psychrophilic and mesophilic histamine-producing bacteria in retail fish in Japan. *Food Control* 46:338–342. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.05.045>
  24. Osorio CR, Vences A, Matanza XM, Terceti MS. 2018. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, a generalist pathogen with unique virulence factors and high genetic diversity. *J Bacteriol* 200:e00002–18. <https://doi.org/10.1128/JB.00002-18>
  25. Terceti MS, Ogut H, Osorio CR. 2016. *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*, an emerging fish pathogen in the Black Sea: evidence of a multiclinal origin. *Appl Environ Microbiol* 82:3736–3745. <https://doi.org/10.1128/AEM.00781-16>
  26. Martin DP, Barron OA, Wu CH. 2022. *Photobacterium damsela* necrotizing fasciitis of the arm. *J Hand Surg Am* 47:905. <https://doi.org/10.1016/j.jhssa.2021.07.033>
  27. Terceti MS, Vences A, Matanza XM, Barca AV, Noia M, Lisboa J, Dos Santos NMS, do Vale A, Osorio CR. 2019. The Rstab system impacts virulence, motility, cell morphology, penicillin tolerance and production of type II secretion system-dependent factors in the fish and human pathogen *Photobacterium Damsela* Subsp. *Damsela*. *Front Microbiol* 10:897. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00897>
  28. Matanza XM, López-Suárez L, do Vale A, Osorio CR. 2021. The two-component system RstAB regulates production of a polysaccharide capsule with a role in virulence in the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Environ Microbiol* 23:4859–4880. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15731>
  29. Terceti MS, Rivas AJ, Alvarez L, Noia M, Cava F, Osorio CR. 2017. RstB regulates expression of the *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* major virulence factors damselysin, phobalysin P and phobalysin C. *Front Microbiol* 08:5825. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00582>
  30. Bilecen K, Yildiz FH. 2009. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ Microbiol* 11:2015–2029. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x>
  31. Rivas AJ, Balado M, Lemos ML, Osorio CR. 2013. Synergistic and additive effects of chromosomal and plasmid-encoded hemolysins contribute to hemolysis and virulence in *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Infect Immun* 81:3287–3299. <https://doi.org/10.1128/IAI.00155-13>
  32. Puentes B, Balado M, Bermúdez-Crespo J, Osorio CR, Lemos ML. 2017. A proteomic analysis of the iron response of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* reveals metabolic adaptations to iron levels changes and novel potential virulence factors. *Vet Microbiol* 201:257–264. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.01.040>
  33. von Hoven G, Neukirch C, Meyenburg M, Schmidt S, Vences A, Osorio CR, Husmann M, Rivas AJ. 2018. Cytotoxin- and chemotaxis-genes cooperate to promote adhesion of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Front Microbiol* 9:2996. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02996>
  34. Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
  35. Fouz B, Larsen JL, Nielsen B, Barja JL, Toranzo AE. 1992. Characterization of *Vibrio damsela* strains isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Dis Aquat Org* 12:155–166. <https://doi.org/10.3354/dao012155>
  36. Matanza XM, Osorio CR. 2018. Transcriptome changes in response to temperature in the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*: clues to understand the emergence of disease outbreaks at increased seawater temperatures. *PLoS One* 13: e0210118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210118>
  37. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
  38. Anders S, Pyl PT, Huber W. 2015. HTSeq -- a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>
  39. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
  40. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol* 57:289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
  41. Barroso C, Carvalho P, Carvalho C, Santarém N, Gonçalves JFM, Rodrigues PNS, Neves JV. 2020. The diverse Piscidin repertoire of the European sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*): Molecular characterization and antimicrobial activities. *Int J Mol Sci* 21:4613. <https://doi.org/10.3390/ijms21134613>
  42. Adler J, Hazelbauer GL, Dahl MM. 1973. Chemotaxis toward sugars in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 115:824–847. <https://doi.org/10.1128/jb.115.3.824-847.1973>
  43. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J-Y, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
  44. Vences A, Rivas AJ, Lemos ML, Husmann M, Osorio CR. 2017. Chromosome-encoded Hemolysin, Phospholipase, and collagenase in Plasmidless isolates of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* contribute to virulence for fish. *Appl Environ Microbiol* 83:e00401-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00401-17>
  45. Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
  46. Osorio CR, Toranzo AE, Romalde JL, Barja JL. 2000. Multiplex PCR assay for *ureC* and 16S rRNA genes clearly discriminates between both

- subspecies of *Photobacterium damsela*. *Dis Aquat Organ* 40:177–183. <https://doi.org/10.3354/dao040177>
47. Love M, Teebken-Fisher D, Hose JE, Farmer JJ, Hickman FW, Fanning GR. 1981. *Vibrio damsela*, a marine bacterium, causes skin ulcers on the damselfish *Chromis punctipinnis*. *Science* 214:1139–1140. <https://doi.org/10.1126/science.214.4525.1139>
  48. Meeske AJ, Riley EP, Robins WP, Uehara T, Mekalanos JJ, Kahne D, Walker S, Kruse AC, Bernhardt TG, Rudner DZ. 2016. SEDS proteins are a widespread family of bacterial cell wall polymerases. *Nature* 537:634–638. <https://doi.org/10.1038/nature19331>
  49. Möll A, Dörr T, Alvarez L, Davis BM, Cava F, Waldor MK. 2015. A D, D-carboxypeptidase is required for *Vibrio cholerae* halotolerance. *Environ Microbiol* 17:527–540. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12779>
  50. Schoeffield AJ, Williams HN. 1990. Efficiencies of recovery of bdellovibrios from brackish-water environments by using various bacterial species as prey. *Appl Environ Microbiol* 56:230–236. <https://doi.org/10.1128/aem.56.1.230-236.1990>
  51. Nagata T, Kirchman DL. 1992. Release of macromolecular organic complexes by heterotrophic marine flagellates. *Mar Ecol Prog Ser* 83:233–240. <https://doi.org/10.3354/meps083233>
  52. Landry MR, Kirshtein J, Constantinou J. 1995. A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton, with experimental tests in the central equatorial Pacific. *Mar Ecol Prog Ser* 120:53–63. <https://doi.org/10.3354/meps120053>
  53. Terceti MS, Vences A, Matanza XM, Dalsgaard I, Pedersen K, Osorio CR. 2018. Molecular epidemiology of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* outbreaks in Marine Rainbow Trout farms reveals extensive horizontal gene transfer and high genetic diversity. *Front Microbiol* 9:2155. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02155>
  54. Liu Y, Gao W, Wang Y, Wu L, Liu X, Yan T, Alm E, Arkin A, Thompson DK, Fields MW, Zhou J. 2005. Transcriptome analysis of *Shewanella Oneidensis* MR-1 in response to elevated salt conditions. *J Bacteriol* 187:2501–2507. <https://doi.org/10.1128/JB.187.7.2501-2507.2005>
  55. Rozen Y, Larossa RA, Templeton LJ, Smulski DR, Belkin S. 2002. Gene expression analysis of the response by *Escherichia coli* to seawater. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81:15–25. <https://doi.org/10.1023/a:1020500821856>
  56. Wang J, Vine CE, Balasiny BK, Rizk J, Bradley CL, Tinajero-Trejo M, Poole RK, Bergaust LL, Bakken LR, Cole JA. 2016. The roles of the hybrid cluster protein, HCP and its reductase, HCR, in high affinity nitric oxide reduction that protects anaerobic cultures of *Escherichia coli* against nitrosative stress. *Mol Microbiol* 100:877–892. <https://doi.org/10.1111/mmi.13356>
  57. Filenko N, Spiro S, Browning DF, Squire D, Overton TW, Cole J, Constantinidou C. 2007. The NsrR regulator of *Escherichia coli* K-12 includes genes encoding the hybrid cluster protein and the periplasmic, respiratory nitrite reductase. *J Bacteriol* 189:4410–4417. <https://doi.org/10.1128/JB.00080-07>
  58. Gon S, Patte JC, Méjean V, Iobbi-Nivol C. 2000. The TorYZ (*yeck bisz*) operon encodes a third respiratory trimethylamine N-oxide reductase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:5779–5786. <https://doi.org/10.1128/JB.182.20.5779-5786.2000>
  59. Malle P, Valle M, Eb P, Tailliez R. 1998. Optimization of culture conditions for enumeration of H<sub>2</sub>S bacteria in the flesh of seafish. *J Rapid Methods Auto Microbiol* 6:129–141. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.1998.tb00193.x>
  60. Rasheedkhan Regina V, Noorian P, Sim CBW, Constancias F, Kaliyamoorthy E, Booth SC, Espinoza-Vergara G, Rice SA, McDougald D. 2022. Loss of the acetate switch in *Vibrio Vulnificus* enhances Predation defense against *Tetrahymena Pyriformis*. *Appl Environ Microbiol* 88:e0166521. <https://doi.org/10.1128/AEM.01665-21>
  61. Chuang MY, Tsai WC, Kuo TY, Chen HM, Chen WJ. 2016. Comparative proteome analysis reveals proteins involved in salt adaptation in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Basic Microbiol* 56:1234–1243. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600091>
  62. Csonka LN. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol Rev* 53:121–147. <https://doi.org/10.1128/mr.53.1.121-147.1989>
  63. Gregory GJ, Dutta A, Parashar V, Boyd EF. 2020. Investigations of dimethylglycine, glycine betaine, and ectoine uptake by a betaine-carnitine-choline transporter family transporter with diverse substrate specificity in *Vibrio* species. *J Bacteriol* 202:e00314-20. <https://doi.org/10.1128/JB.00314-20>
  64. Rao NV, Shashidhar R, Bandekar JR. 2013. Comparative analysis of induction of osmotic-stress-dependent genes in *Vibrio vulnificus* exposed to hyper- and hypo-osmotic stress. *Can J Microbiol* 59:333–338. <https://doi.org/10.1139/cjm-2012-0749>
  65. Amaral GRS, Dias GM, Wellington-Oguri M, Chimento L, Campeão ME, Thompson FL, Thompson CC. 2014. Genotype to phenotype: identification of diagnostic *Vibrio* phenotypes using whole genome sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* 64:357–365. <https://doi.org/10.1099/ijso.057927-0>
  66. Meadow ND, Revuelta R, Chen VN, Colwell RR, Roseman S. 1987. Phosphoenolpyruvate:glycose phosphotransferase system in species of *Vibrio*, a widely distributed marine bacterial genus. *J Bacteriol* 169:4893–4900. <https://doi.org/10.1128/jb.169.11.4893-4900.1987>
  67. Mopper K, Dawson R, Liebezeit G, Ittekkot V. 1980. The monosaccharide spectra of natural waters. *Marine Chemistry* 10:55–66. [https://doi.org/10.1016/0304-4203\(80\)90058-4](https://doi.org/10.1016/0304-4203(80)90058-4)
  68. Sogin EM, Puskás E, Dubilier N, Liebecke M. 2019. Marine metabolomics: a method for nontargeted measurement of metabolites in seawater by gas chromatography-mass spectrometry. *mSystems* 4:e00638-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00638-19>
  69. Sogin EM, Michellod D, Gruber-Vodicka HR, Bourceau P, Geier B, Meier DV, Seidel M, Ahmerkamp S, Schorn S, D'Angelo G, Proccacini G, Dubilier N, Liebecke M. 2022. Sugars dominate the seagrass rhizosphere. *Nat Ecol Evol* 6:866–877. <https://doi.org/10.1038/s41559-022-01740-z>
  70. Leyton A, Flores L, Mäki-Arvela P, Lienqueo ME, Shene C. 2019. *Macrocystis pyrifera* source of nutrients for the production of carotenoids by a marine yeast *Rhodotorula mucilaginosa*. *J Appl Microbiol* 127:1069–1079. <https://doi.org/10.1111/jam.14362>
  71. Johnston MA, Davies PS. 1972. Carbohydrates of the hepatopancreas and blood tissues of *Carcinus*. *Comp Biochem Physiol B Biochem* 41:433–443. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(72\)90046-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(72)90046-6)
  72. Martínez-Crego B, Vizzini S, Califano G, Massa-Gallucci A, Andolina C, Gambi MC, Santos R. 2020. Resistance of seagrass habitats to ocean acidification via altered interactions in a tri-trophic chain. *Sci Rep* 10:5103. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61753-1>
  73. Lunn JE. 2002. Evolution of sucrose synthesis. *Plant Physiol* 128:1490–1500. <https://doi.org/10.1104/pp.010898>
  74. Dörr T, Delgado F, Umans BD, Gerding MA, Davis BM, Waldor MK. 2016. A transposon screen identifies genetic determinants of *Vibrio cholerae* resistance to high-molecular-weight antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4757–4763. <https://doi.org/10.1128/AAC.00576-16>
  75. Kapetanović D, Vardić Smrčlić I, Kazazić S, Omanović D, Cukrov N, Cindrić A-M, Rapljenović A, Perić L, Orlić K, Mijošević Z, Redžović Z, Gavrilović A, Radočaj T, Filipović Marijić V. 2023. A preliminary study of the cultivable microbiota on the plastic litter collected by commercial fishing trawlers in the south-eastern Adriatic Sea, with emphasis on *Vibrio* isolates and their antibiotic resistance. *Mar Pollut Bull* 187:114592. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114592>
  76. Coronado MJ, Vargas C, Kunte HJ, Galinski EA, Ventosa A, Nieto JJ. 1995. Influence of salt concentration on the susceptibility of moderately halophilic bacteria to antimicrobials and its potential use for genetic transfer studies. *Curr Microbiol* 31:365–371. <https://doi.org/10.1007/BF00294701>
  77. Ottaviani D, Bacchiocchi I, Masini L, Leoni F, Carraturo A, Giammarioli M, Sbaraglia G. 2001. Antimicrobial susceptibility of potentially pathogenic halophilic vibrios isolated from seafood. *Int J Antimicrob Agents* 18:135–140. [https://doi.org/10.1016/s0924-8579\(01\)00358-2](https://doi.org/10.1016/s0924-8579(01)00358-2)
  78. Weaver AI, Murphy SG, Umans BD, Tallavajhala S, Onyekwere I, Wittels S, Shin JH, VanNieuwenhze M, Waldor MK, Dörr T. 2018. Genetic determinants of penicillin tolerance in *Vibrio Cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01326-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01326-18>
  79. Dörr T, Davis BM, Waldor MK. 2015. Endopeptidase-mediated beta lactam tolerance. *PLoS Pathog* 11:e004850. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004850>
  80. Sarkar SK, Chowdhury C, Ghosh AS. 2010. Deletion of penicillin-binding protein 5 (PBP5) sensitises *Escherichia coli* cells to beta-lactam agents. *Int J Antimicrob Agents* 35:244–249. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.11.004>

81. Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. 2016. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. *Medchemcomm* 7:11–27. <https://doi.org/10.1039/C5MD00344J>
82. Huda MN, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. 2001. Na<sup>+</sup>-driven multidrug efflux pump VcmA from *Vibrio cholerae* non-O1, a non-halophilic bacterium. *FEMS Microbiol Lett* 203:235–239. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10847.x>
83. Su Y, Peng B, Han Y, Li H, Peng X. 2015. Fructose restores susceptibility of multidrug-resistant *Edwardsiella tarda* to kanamycin. *J Proteome Res* 14:1612–1620. <https://doi.org/10.1021/pr501285f>
84. Su Y-B, Peng B, Li H, Cheng Z-X, Zhang T-T, Zhu J-X, Li D, Li M-Y, Ye J-Z, Du C-C, Zhang S, Zhao X-L, Yang M-J, Peng X-X. 2018. Pyruvate cycle increases aminoglycoside efficacy and provides respiratory energy in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E1578–E1587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714645115>
85. Keller M, Han X, Dörr T. 2023. Disrupting central carbon metabolism increases B-lactam antibiotic susceptibility in *Vibrio Cholerae*. *J Bacteriol* 205:e0047622. <https://doi.org/10.1128/jb.00476-22>
86. Yang J, Zeng Z-H, Yang M-J, Cheng Z-X, Peng X-X, Li H. 2018. NaCl promotes antibiotic resistance by reducing redox states in *Vibrio alginolyticus*. *Environ Microbiol* 20:4022–4036. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14443>
87. Stokes JM, French S, Ovchinnikova OG, Bouwman C, Whitfield C, Brown ED. 2016. Cold stress makes *Escherichia coli* susceptible to glycopeptide antibiotics by altering outer membrane integrity. *Cell Chem Biol* 23:267–277. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.12.011>
88. Stogios PJ, Savchenko A. 2020. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Sci* 29:654–669. <https://doi.org/10.1002/pro.3819>
89. Boyd DA, Willey BM, Fawcett D, Gillani N, Mulvey MR. 2008. Molecular characterization of *Enterococcus faecalis* N06-0364 with low-level vancomycin resistance harboring a novel D-Ala-D-Ser gene cluster, *vanL*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2667–2672. <https://doi.org/10.1128/AAC.01516-07>
90. Huang PH, Chen JY, Kuo CM. 2007. Three different hepcidins from tilapia, *Oreochromis mossambicus*: analysis of their expressions and biological functions. *Mol Immunol* 44:1922–1934. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.09.031>
91. Dorrington T, Gomez-Chiarri M. 2008. Antimicrobial peptides for use in oyster aquaculture: effect on pathogens, commensals, and eukaryotic expression systems. *J Shellfish Res* 27:365–373. [https://doi.org/10.2983/0730-8000\(2008\)27\[365:APFUIO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2983/0730-8000(2008)27[365:APFUIO]2.0.CO;2)
92. Park NG, Silphaduang U, Moon HS, Seo JK, Corrales J, Noga EJ. 2011. Structure-activity relationships of piscidin 4, a piscine antimicrobial peptide. *Biochemistry* 50:3288–3299. <https://doi.org/10.1021/bi101395j>
93. Bjornsdottir-Butler K, Abraham A, Harper A, Dunlap PV, Benner RA Jr. 2018. Biotogenic amine production by and phylogenetic analysis of 23 *Photobacterium* species. *J Food Prot* 81:1264–1274. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-022>
94. Li F, Xiong X-S, Yang Y-Y, Wang J-J, Wang M-M, Tang J-W, Liu Q-H, Wang L, Gu B. 2021. Effects of NaCl concentrations on growth patterns, phenotypes associated with virulence, and energy metabolism in *Escherichia Coli* Bw25113. *Front Microbiol* 12:705326. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.705326>
95. Fouz B, Toranzo AE, Marco-Noales E, Amaro C. 1998. Survival of fish-virulent strains of *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* in seawater under starvation conditions. *FEMS Microbiol Lett* 168:181–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13271.x>
96. Thompson JR, Pacocha S, Pharinco C, Klepac-Ceraj V, Hunt DE, Benoit J, Sarma-Rupavarm R, Distel DL, Polz MF. 2005. Genotypic diversity within a natural coastal bacterioplankton population. *Science* 307:1311–1313. <https://doi.org/10.1126/science.1106028>
97. Juste-Poinapen NMS, Yang L, Ferreira M, Poinapen J, Rico C. 2019. Community profiling of the intestinal microbial community of juvenile Hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) from the Rewa Delta, Fiji. *Sci Rep* 9:7182. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43522-x>
98. Pacheco-Sandoval A, Lago-Lestón A, Abadía-Cardoso A, Solana-Arellano E, Schramm Y. 2022. Age as a primary driver of the gut microbial composition and function in wild harbor seals. *Sci Rep* 12:14641. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-18565-2>
99. Itay P, Shemesh E, Ofek-Lalzar M, Davidovich N, Kroin Y, Zrihan S, Stern N, Diamant A, Gossnick N, Meron D, Tchernov D, Morick D. 2022. An insight into gill microbiome of eastern Mediterranean wild fish by applying next generation sequencing. *Front. Mar. Sci* 9:1008103. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1008103>
100. Peters L, Chikweto A, McKIBBEN J, Gibson K. 2021. Potential for scombroid poisoning from ingestion of *Selar crumenophthalmus* due to increased histamine levels in Grenada, West Indies. *J Food Prot* 84:368–371. <https://doi.org/10.4315/JFP-20-255>
101. Pedersen K, Dalsgaard I, Larsen JL. 1997. *Vibrio damsela* associated with diseased fish in Denmark. *Appl Environ Microbiol* 63:3711–3715. <https://doi.org/10.1128/aem.63.9.3711-3715.1997>
102. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST. 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
103. Seidler RJ, Allen DA, Colwell RR, Joseph SW, Daily OP. 1980. Biochemical characteristics and virulence of environmental group F bacteria isolated in the United States. *Appl Environ Microbiol* 40:715–720. <https://doi.org/10.1128/aem.40.4.715-720.1980>
104. Casiano-Colón A, Marquis RE. 1988. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl Environ Microbiol* 54:1318–1324. <https://doi.org/10.1128/aem.54.6.1318-1324.1988>
105. Ryan S, Begley M, Gahan CGM, Hill C. 2009. Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ Microbiol* 11:432–445. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01782.x>
106. Xiong L, Teng JLL, Watt RM, Kan B, Lau SKP, Woo PCY. 2014. Arginine Deiminase pathway is far more important than Urease for acid resistance and intracellular survival in *Laribacter hongkongensis*: a possible result of arc Gene cassette duplication. *BMC Microbiol* 14:42. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-42>
107. Whitaker WB, Parent MA, Naughton LM, Richards GP, Blumerman SL, Boyd EF. 2010. Modulation of responses of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 to pH and temperature stresses by growth at different salt concentrations. *Appl Environ Microbiol* 76:4720–4729. <https://doi.org/10.1128/AEM.00474-10>
108. Kalburge SS, Whitaker WB, Boyd EF. 2014. High-salt preadaptation of *Vibrio parahaemolyticus* enhances survival in response to lethal environmental stresses. *J Food Prot* 77:246–253. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-241>
109. Vander Wauwen C, Piérard A, Kley-Raymann M, Haas D. 1984. *Pseudomonas aeruginosa* mutants affected in anaerobic growth on arginine: evidence for a four-gene cluster encoding the arginine deiminase pathway. *J Bacteriol* 160:928–934. <https://doi.org/10.1128/jb.160.3.928-934.1984>
110. Shoesmith JH, Sherris JC. 1960. Studies on the mechanism of arginine-activated motility in a *Pseudomonas* strain. *J Gen Microbiol* 22:10–24. <https://doi.org/10.1099/00221287-22-1-10>
111. Faquin WC, Oliver JD. 1984. Arginine uptake by a psychrophilic marine *Vibrio* sp. during starvation-induced morphogenesis. *Microbiology* 130:1331–1335. <https://doi.org/10.1099/00221287-130-6-1331>
112. Merrell DS, Hava DL, Camilli A. 2002. Identification of novel factors involved in colonization and acid tolerance of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 43:1471–1491. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02857.x>
113. Yamamoto S, Chowdhury MA, Kuroda M, Nakano T, Koumoto Y, Shinoda S. 1991. Further study on polyamine compositions in *Vibrionaceae*. *Can J Microbiol* 37:148–153. <https://doi.org/10.1139/m91-022>
114. Hamama K, Okada M, Saito T, Nogi Y. 2000. Polyamine distribution profiles among some members of the gamma subclass of the class *Proteobacteria*. *Microbiol Cult Coll* 16:51–61.
115. Jelsbak L, Thomsen LE, Wallrodt I, Jensen PR, Olsen JE. 2012. Polyamines are required for virulence in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS One* 7:e36149. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036149>
116. Goforth JB, Walter NE, Karatan E. 2013. Effects of Polyamines on *Vibrio cholerae* virulence properties. *PLoS One* 8:e60765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060765>
117. Shah P, Nanduri B, Swiatlo E, Ma Y, Pendarvis K. 2011. Polyamine biosynthesis and transport mechanisms are crucial for fitness and pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology (Reading)* 157:504–515. <https://doi.org/10.1099/mic.0.042564-0>

118. Kreger AS. 1984. Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect Immun* 44:326–331. <https://doi.org/10.1128/iai.44.2.326-331.1984>
119. Lee C-T, Chen I-T, Yang Y-T, Ko T-P, Huang Y-T, Huang J-Y, Huang M-F, Lin S-J, Chen C-Y, Lin S-S, Lightner DV, Wang H-C, Wang AH-J, Wang H-C, Hor L-I, Lo C-F. 2015. The opportunistic marine pathogen *Vibrio parahaemolyticus* becomes virulent by acquiring a plasmid that expresses a deadly toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:10798–10803. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503129112>
120. Taggart JC, Lalanne J-B, Li G-W. 2021. Quantitative control for stoichiometric protein synthesis. *Annu Rev Microbiol* 75:243–267. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-041921-012646>
121. Lee SE, Shin SH, Kim SY, Kim YR, Shin DH, Chung SS, Lee ZH, Lee JY, Jeong KC, Choi SH, Rhee JH. 2000. *Vibrio vulnificus* has the transmembrane transcription activator ToxRS stimulating the expression of the hemolysin gene *vwhA*. *J Bacteriol* 182:3405–3415. <https://doi.org/10.1128/JB.182.12.3405-3415.2000>
122. Murdoch CC, Skaar EP. 2022. Nutritional immunity: the battle for nutrient metals at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 20:657–670. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00745-6>
123. Fouz B, Toranzo AE, Biosca EG, Mazoy R, Amaro C. 1994. Role of iron in the pathogenicity of *Vibrio damsela* for fish and mammals. *FEMS Microbiol Lett* 121:181–188. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1994.tb07097.x>
124. Fouz B, Biosca EG, Amaro C. 1997. High affinity iron-uptake systems in *Vibrio damsela*: role in the acquisition of iron from transferrin. *J Appl Microbiol* 82:157–167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1997.tb03568.x>
125. Pajuelo D, Lee C-T, Roig FJ, Hor L-I, Amaro C. 2015. Novel host-specific iron acquisition system in the zoonotic pathogen *Vibrio vulnificus*. *Environ Microbiol* 17:2076–2089.
126. Roig FJ, Amaro C. 2009. Plasmid diversity in *Vibrio vulnificus* biotypes. *Microbiology (Reading)* 155:489–497. <https://doi.org/10.1099/mic.0.023424-0>
127. Ganie HA, Choudhary A, Baranwal S. 2022. Structure, regulation, and host interaction of outer membrane protein U (OmpU) of *Vibrio* species. *Microb Pathog* 162:105267. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105267>
128. Xi D, Li Y, Yan J, Li Y, Wang X, Cao B. 2020. Small RNA *coaR* contributes to intestinal colonization in *Vibrio cholerae* via the two-component system EnvZ/OmpR. *Environ Microbiol* 22:4231–4243. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14906>
129. Gregory GJ, Morreale DP, Carpenter MR, Kalburge SS, Boyd EF. 2019. Quorum sensing regulators Apha and Opar control expression of the Operon responsible for biosynthesis of the compatible solute Ectoine. *Appl Environ Microbiol* 85:e01543-19. <https://doi.org/10.1128/AEM.01543-19>



*Photobacterium damsela* subsp. *damsela* es una bacteria marina patógena causante de enfermedad en un amplio rango de especies animales y en humanos. En esta tesis hemos analizado el efecto de la salinidad combinando el análisis transcriptómico (RNA-seq) y estudios fenotípicos a concentraciones de NaCl próximas a las del medio marino (3% NaCl) y a las del interior del hospedador vertebrado (1% NaCl). Este estudio ha desvelado que la caída de la salinidad desencadena un perfil genético de virulencia y ha permitido identificar y caracterizar un nuevo mecanismo de adquisición de hierro, implicado en la virulencia, en este patógeno marino. Paralelamente, hemos diseñado y construido vectores plasmídicos útiles para la ingeniería genética de *Pdd* y de potencial utilidad biotecnológica.