



20° CONGRESO INTERNACIONAL

CNB COLEGIO NACIONAL DE BACTERIOLOGÍA

Sostenibilidad, Globalización y Responsabilidad en el Diagnóstico.

Bucaramanga



FACTORES DE VIRULENCIA DE *Vibrio neptunius*, PATÓGENO DE MOLUSCOS BIVALVOS

Nestor Fabián Galvis Serrano



INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BIVALVOS
3. ENFERMEDADES EN BIVALVOS
4. VIBRIOS PATÓGENOS DE MOLUSCOS
5. FACTORES DE VIRULENCIA
6. *Vibrio neptunius*

II. OBJETIVOS

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS
2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA
3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

IV. CONCLUSIONES

INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS



Los alimentos de origen acuático son una de las fuentes más importantes de proteína animal del mundo, representando el 17% de la ingesta de proteína animal mundial y el 7% de toda la proteína consumida (APROMAR, 2020).

INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS

El cultivo de bivalvos ocupa un lugar importante en la producción acuícola mundial y se encuentra en rápida expansión

Esta producción de bivalvos se da mediante la acuicultura

- Mejora su rendimiento
- Produce alimentos con menor impacto ambiental
- Oportunidad económica



<http://www.ipacuicultura.com/>

Aumentar la producción de manera rentable demanda de mejoras en los métodos y tecnologías de cultivo

Sin embargo uno de los principales problemas son las infecciones causadas por vibrios que ocasionan grandes pérdidas económicas

INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS

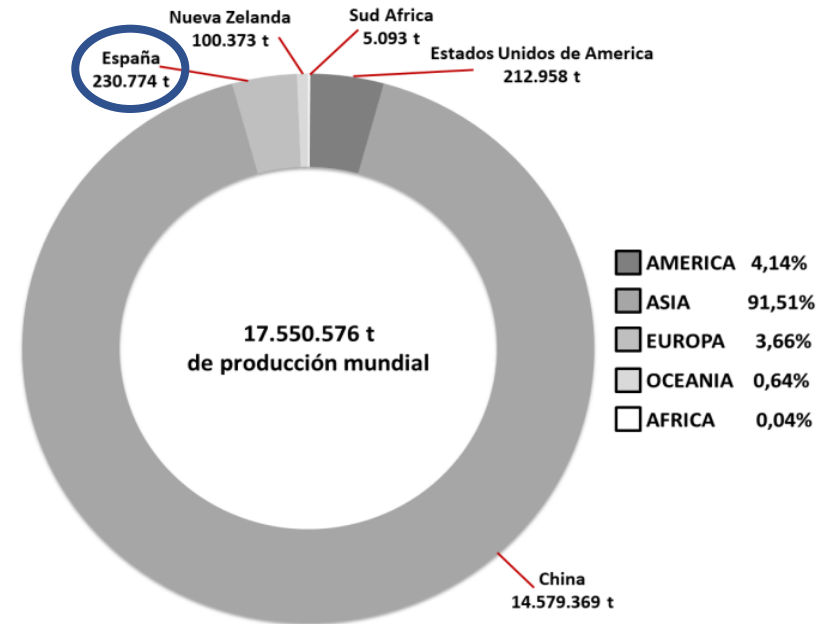
En el 2019 la acuicultura alcanzó una producción de 17.550.576 t de moluscos (FAO, 2019).

España es el principal productor de moluscos bivalvos en Europa

Casi la totalidad de la producción corresponde al mejillón en Galicia



<http://acuiculturaymiticultura.blogspot.com/>



La producción de bivalvos es un sector significativo en la economía de Galicia

La búsqueda de nuevos conocimientos son necesarios para promover su desarrollo y poder implementar la producción de otras especies de bivalvos

INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS



En Colombia, la acuicultura representa el 75% de la producción acuícola total, con 171.026 t en el 2019 (Gutiérrez & Marino, 2020).

Los productos más importantes son:

- Tilapia (*Oreochromis sp.*)
- Cachama (*Colossoma macropomun*)
- Trucha (*Oncorhynchus mykiss*)
- Camarón (*Litopenaeus sp.*)

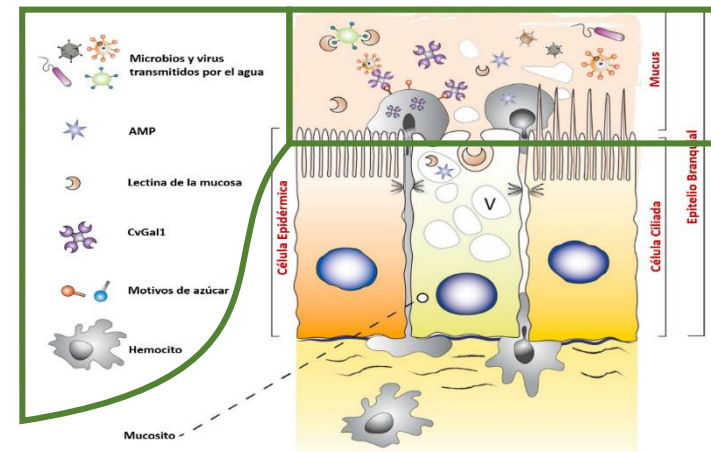
Se reportaron dos estudios para establecer cultivo sostenible de bivalvos (Velasco y Barros, 2008; Velasco, 2013).

INTRODUCCIÓN

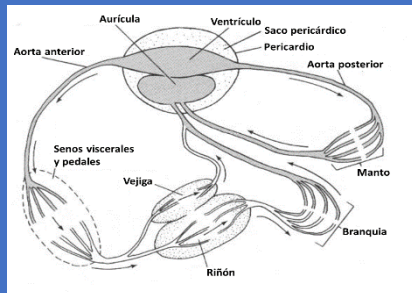
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BIVALVOS

Son animales filtradores que tienden acumular materia orgánica en su interior, y parte de los microorganismos acumulados son microbiota residente, la otra se digiere.

Su sistema inmune está compuesto por células efectoras centrales conocidas como hemocitos que fagocitan a las bacterias y otros microorganismos



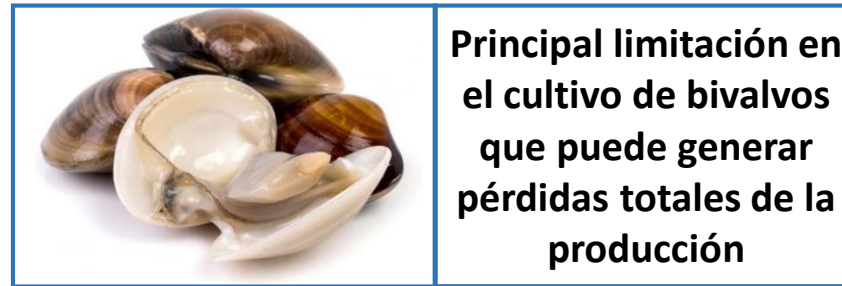
SISTEMA CIRCULATORIO



A diferencia de los animales homeotérmicos la hemolinfa de los moluscos bivalvos no está estéril por tener un sistema circulatorio abierto

INTRODUCCIÓN

3. ENFERMEDADES EN BIVALVOS



VIRUS

AVNV, GNV, HIV,
OVVD, OsHV



BACTERIAS

Vibrio sp., *Pseudomonas* sp.
Alteromonas sp.



EUCARIOTAS

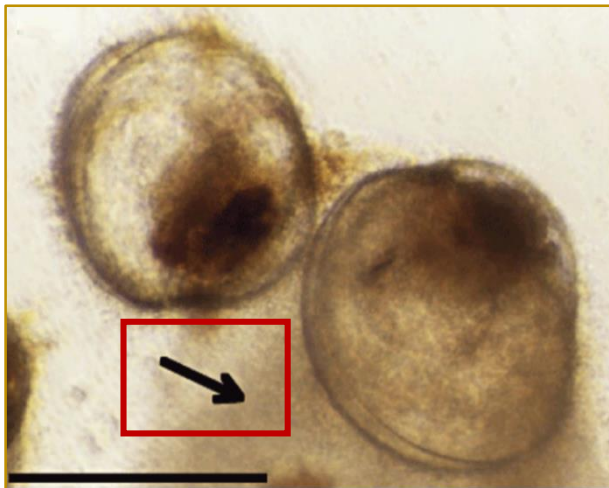
Perkinsus marinus, *Bonamia* sp
Haplosporidium sp. *Marteilia refringens*
Mytilicola intestinalis, *M. orientalis*

INTRODUCCIÓN

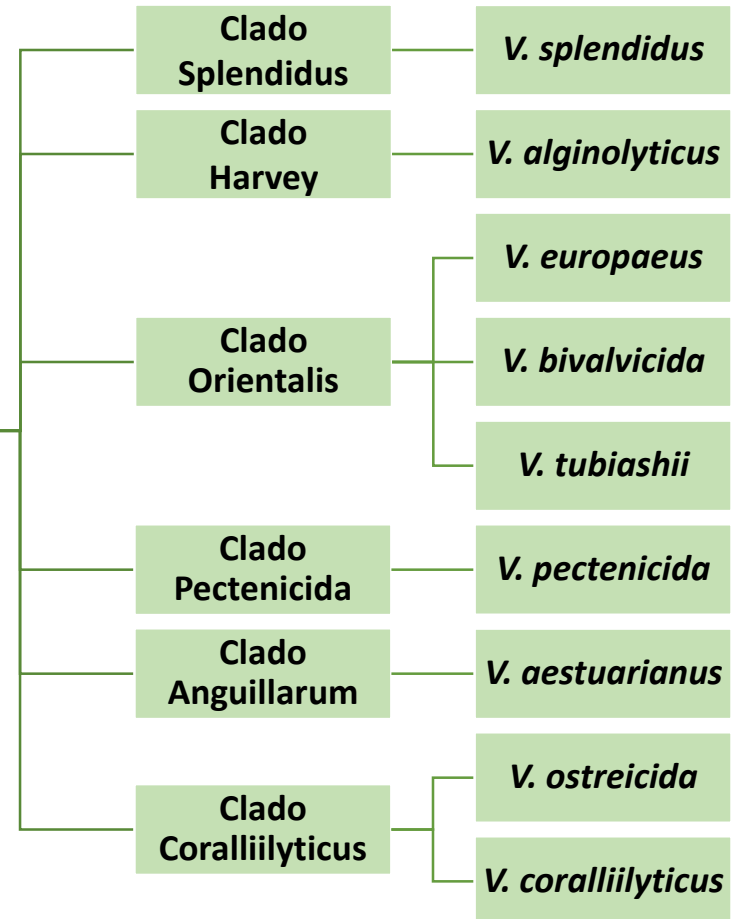
4. VIBRIOS PATÓGENOS DE MOLUSCOS

VIBRIOSIS

Enfermedad bacteriana que afecta principalmente a larvas de diferentes especies de bivalvos en la acuicultura



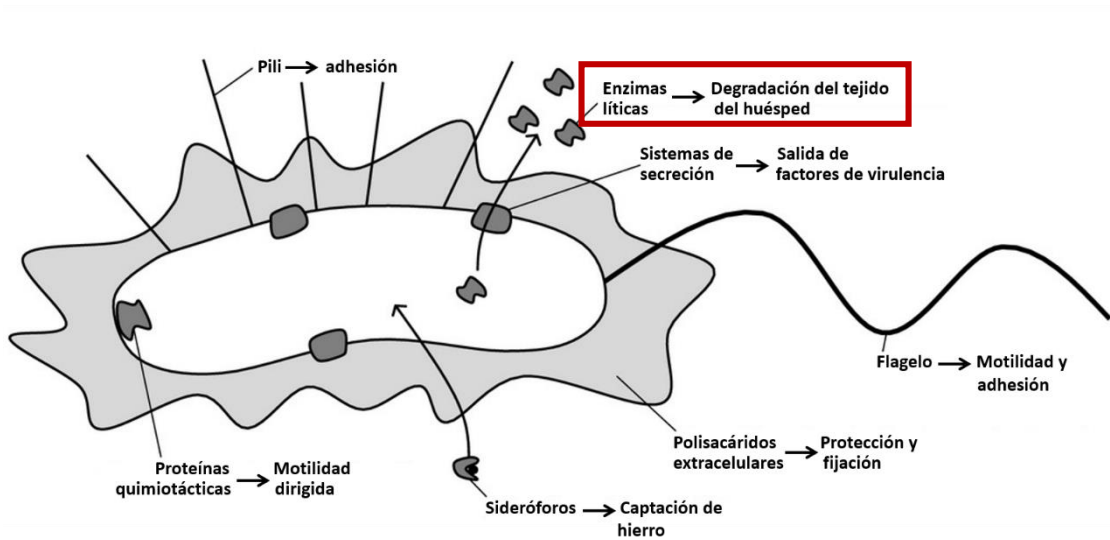
VIBRIOS PATOGENOS DE BIVALVOS



- Reducción de la motilidad de las larvas
- Natación errática
- Cierre de las valvas
- Desprendimiento del velo
- **Swarming bacteriano**

INTRODUCCIÓN

5. FACTORES DE VIRULENCIA



Producción de enzimas líticas

Proteínas extracelulares que producen daños en las estructuras de los tejidos facilitando la invasión, diseminación y adquisición de nutrientes

Metaloproteasas

Vibriolisina

Colagenasa

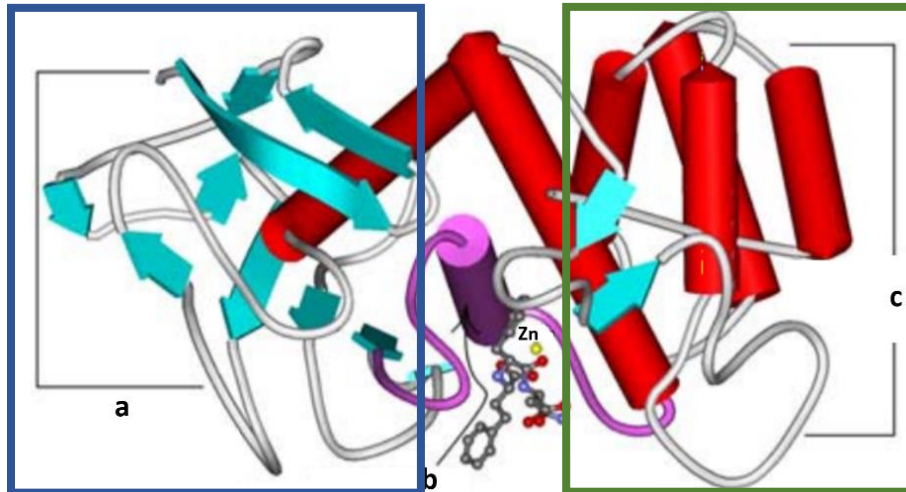
V. splendidus,
V. aestuarianus,
V. tubiashii y
V. coralliilyticus

No hay estudios de la contribución de las colagenasas

INTRODUCCIÓN

5. FACTORES DE VIRULENCIA

VIBRIOLISINAS



La vibríolisina madura consta de dos dominios funcionales.

Dominio N-terminal: participa en la acción catalítica

Dominio C-terminal: es esencial para la fijación eficiente a sustratos proteicos

Metaloproteasas del tipo M4, son muy activas e hidrolizan una amplia variedad de proteínas del hospedador como la caseína, albúmina, hemoglobina, colágeno, elastina, fibrina y fibrinógeno

La vibríolisina provoca daños tisulares hemorrágicos a través de la digestión de la membrana basal alrededor de las células endoteliales vasculares

También forma lesiones edematosas a través de la generación de los mediadores inflamatorios histamina y bradiquinina

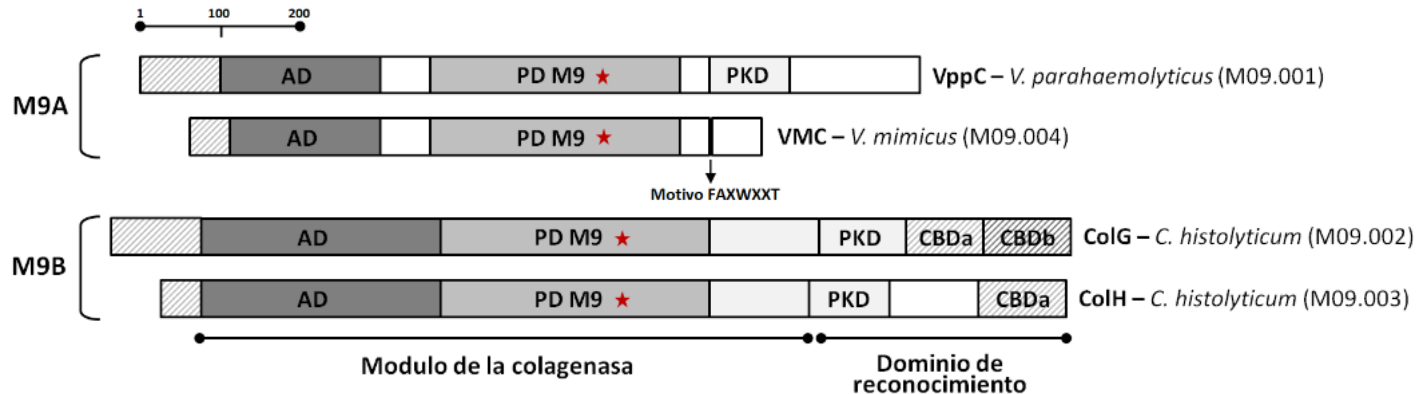
INTRODUCCIÓN

5. FACTORES DE VIRULENCIA

COLAGENASAS

Enzimas proteolíticas pertenecientes a la familia M9 de las metaloproteasas, y son características de bacterias patógenas de los géneros *Vibrio* y *Clostridium*

Se encargan de romper el tejido conectivo extracelular, permitiendo la diseminación del patógeno

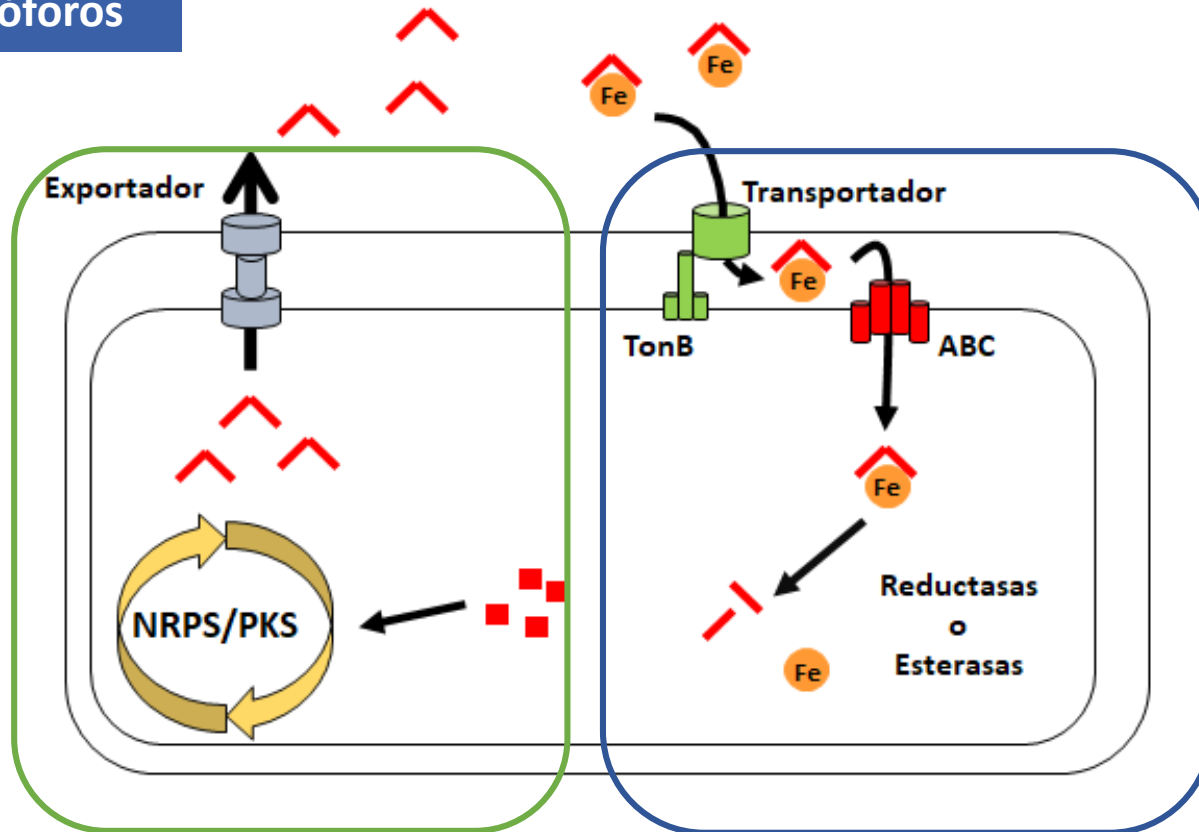


Se clasifican en las subfamilias M9A y M9B por las diferencias en su secuencia de aminoácidos y en su función catalítica

INTRODUCCIÓN

5. FACTORES DE VIRULENCIA

Sideróforos



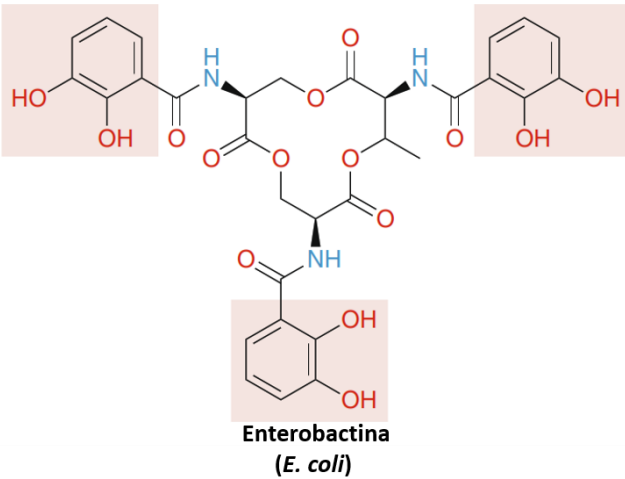
Biosíntesis: Sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs)
Secreción: Superfamilia ABC

Captación del Fe-sideróforo: Transportadores situados en la parte exterior de la membrana externa dependientes de TonB

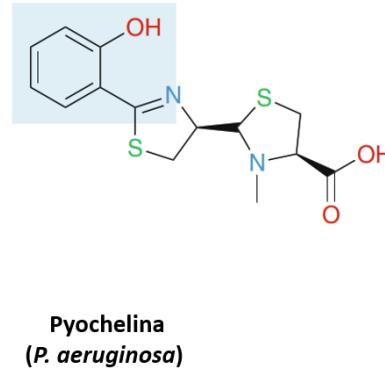
INTRODUCCIÓN

5. FACTORES DE VIRULENCIA

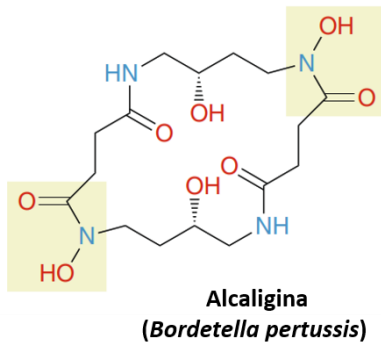
Catecolatos



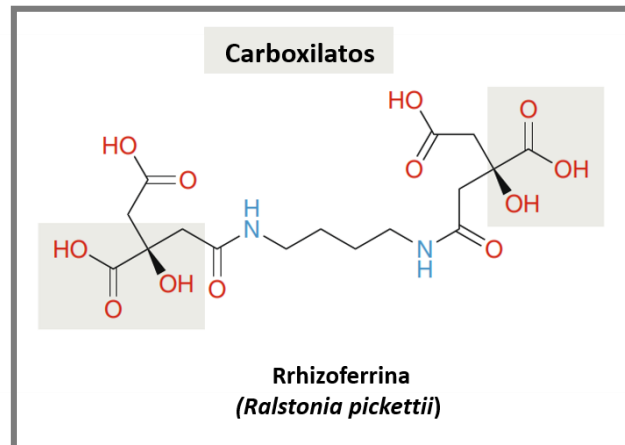
Fenolatos



Hidroxamatos



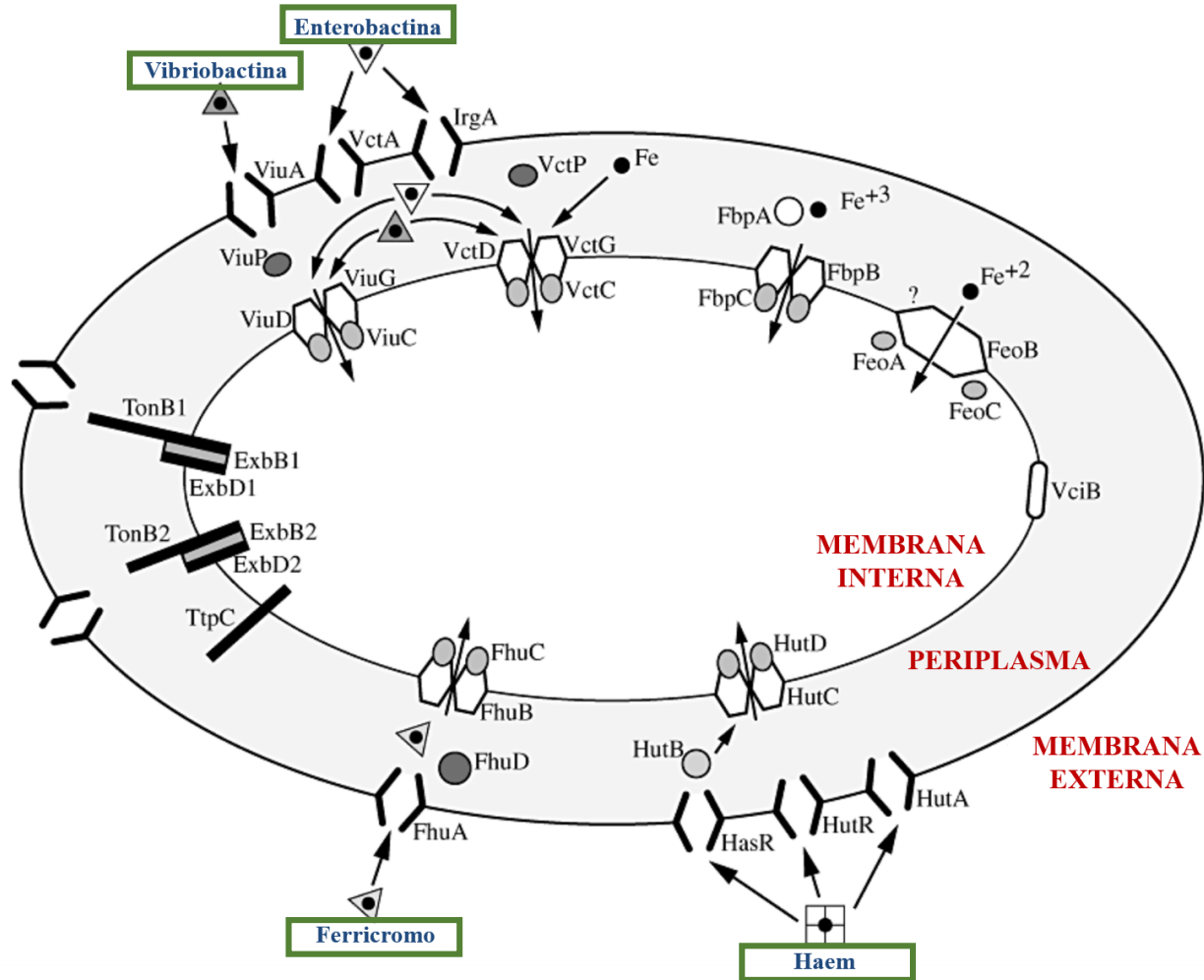
Carboxilatos



Los cuatro tipos principales se distinguen en función del grupo funcional que intervienen en la quelación del hierro, que incluyen grupos funcionales de tipo catecolato (rojo), fenolato (azul), hidroxamato (verde) y carboxilato (gris)

INTRODUCCIÓN

5. FACTORES DE VIRULENCIA



Se muestran las localizaciones en la envoltura celular de los componentes de los principales sistemas de transporte de hierro y los compuestos transportados a través de cada sistema

INTRODUCCIÓN

6. *Vibrio neptunius*

Bacilo Gram-Negativo

Tamaño de 1 μm de ancho por 2 a 3 μm de largo, y colonias de 3mm de diámetro, aproximadamente

Se agrupa con *V. coralliilyticus* y *V. ostreicida* dentro del clado Coralliilyticus

Descrito como patógeno de moluscos bivalvos

Sin embargo, no se han realizado estudios funcionales y se desconoce la influencia de estos factores en la virulencia de *V. neptunius* en moluscos bivalvos

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BIVALVOS
3. ENFERMEDADES EN BIVALVOS
4. VIBRIOS PATÓGENOS DE MOLUSCOS
5. FACTORES DE VIRULENCIA
6. *Vibrio neptunius*

II. OBJETIVOS

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS
2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA
3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

IV. CONCLUSIONES

OBJETIVOS

SE PLANTEARON LOS SIGUIENTES OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar metaloproteasas que puedan estar relacionadas con la virulencia
- Identificar el/los sistemas de sideróforos de *V. neptunius* y estudiar la implicación de la producción de sideróforos en la virulencia de los vibrios patógenos de moluscos bivalvos

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BIVALVOS
3. ENFERMEDADES EN BIVALVOS
4. VIBRIOS PATÓGENOS DE MOLUSCOS
5. FACTORES DE VIRULENCIA
6. *Vibrio neptunius*

II. OBJETIVOS

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS
2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES:
ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA
3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

IV. CONCLUSIONES

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Vibrio neptunius

Colección de 19 cepas patógenas de *V. neptunius*

Aisladas en tres diferentes brotes infecciosos en criaderos de ostra y almeja ubicados en las costas de Galicia

Cepa de <i>V. neptunius</i>	Origen
PP-145.98	Oe
PP-255	Rp
PP-256	Rp
PP-258	Rp
PP-259	Rp
PP-266	Rp
PP-267	Rp
PP-269	Rp
PP-273	Rp
PP-302	Oe
PP-307	Oe
PP-309	Oe
PP-312	Oe
PP-313	Oe
PP-315	Oe
PP-322	Oe
PP-323	Oe
PP-325	Oe
PP-326	Oe

Oe: *Ostrea edulis*
Rp: *Ruditapes philippinarum*



Se seleccionó *V. neptunius* PP-145.98 como cepa modelo
Se observó una mortalidad del 100% en larvas de ostra a las 96 h
posteriores a la inoculación con *V. neptunius* PP-145.98

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS

Las cepas de *V. neptunius* muestran actividades proteolíticas y lipolíticas

Cepa de <i>V. neptunius</i>	Origen	Actividad			
		Gelatinasa	Esterasa	Fosfolipasa	Hemolisis
PP-145.98	Oe	+++	+++	++	+
PP-255	Rp	+++	++	++	+++
PP-256	Rp	+++	-	+	(+)
PP-258	Rp	+	++	++	(+)
PP-259	Rp	++	++	++	+
PP-266	Rp	++	+++	++	-
PP-267	Rp	++	++	++	++
PP-269	Rp	++	++	++	++
PP-273	Rp	++	++	++	-
PP-302	Oe	++	++	++	++
PP-307	Oe	++	+++	++	++
PP-309	Oe	++	++	++	++
PP-312	Oe	++	++	++	++
PP-313	Oe	++	++	++	++
PP-315	Oe	++	++	++	+
PP-322	Oe	++	++	++	+
PP-323	Oe	++	++	++	+
PP-325	Oe	++	++	++	++
PP-326	Oe	++	++	++	+

Todas las cepas presentaron actividad gelatinasa y fosfolipasa

La cepa PP-256 no presentó actividad esterasa

15 cepas presentaron actividad β -hemolítica

Las cepas PP-256 y PP-258 mostraron actividad α -hemolítica

Las cepas PP-266 y PP-273 no presentaron actividad hemolítica

Estos diferentes brotes estarían asociados a bacterias endémicas y no a una expansión clonal

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS

Búsqueda de genes

Se secuenciaron las cepas PP-145.98, PP-256, PP-259, PP-307 y PP-313 de *V. neptunius*

Cepa de <i>V. neptunius</i>	Origen	Actividad			
		Gelatinasa	Esterasa	Fosfolipasa	Hemolisis
PP-145.98	Oe	+++	+++	++	+
PP-255	Rp	+++	++	++	+++
PP-256	Rp	+++	-	+	(+)
PP-258	Rp	+	++	++	(+)
PP-259	Rp	++	++	++	+
PP-266	Rp	++	+++	++	-
PP-267	Rp	++	++	++	++
PP-269	Rp	++	++	++	++
PP-273	Rp	++	++	++	-
PP-302	Oe	++	++	++	++
PP-307	Oe	++	+++	++	++
PP-309	Oe	++	++	++	++
PP-312	Oe	++	++	++	++
PP-313	Oe	++	++	++	++
PP-315	Oe	++	++	++	+
PP-322	Oe	++	++	++	+
PP-323	Oe	++	++	++	++
PP-325	Oe	++	++	++	++
PP-326	Oe	++	++	++	+

Oe: *Ostrea edulis*; Rp: *Ruditapes philippinarum*



GENOME SEQUENCES



Draft Genome Sequences of Five *Vibrio neptunius* Strains Isolated from Hatcheries of Bivalve Mollusks

Fabian Galvis,^a Susana Prado,^a Juan L. Barja,^a Manuel L. Lemos,^a Miguel Balado^a

^aDepartamento de Microbiología y Parasitología, Instituto de Acuicultura y CIBUS-Facultad de Biología, Universidade de Santiago de Compostela, A Coruña, Spain

Characteristic	Data for strain:				
	PP-145.98	PP-256	PP-259	PP-307	PP-313
Raw sequencing results					
Total no. of reads	2,607,130	3,517,632	3,895,514	2,228,868	3,364,076
Total bases (Mbp)	611.6	821.9	913.6	525.5	786.6
Avg read length (bp)	233.5	232.6	234	234.8	232.9
Avg coverage depth (x)	104.8	141.3	160.4	90.4	135.1
Assembly results					
No. of contigs	169	178	151	186	171
Genome size (bp)	5,275,089	5,276,515	5,147,033	5,276,531	5,273,268
<i>N</i> ₅₀ (bp)	129,442	129,040	188,696	138,645	129,198
GC content (%)	45.1	45.1	45.2	45.1	45.1
Annotation results					
No. of CDS ^a	4,795	4,809	4,670	4,819	4,799
No. of genes	4,920	4,936	4,802	4,942	4,926
No. of RNA genes	125	127	132	127	127
No. of rRNAs	16	16	26	19	16
No. of tRNAs	105	107	102	104	107
Accession no.					
BioSample	SAMN18024316	SAMN18024317	SAMN18024318	SAMN18024319	SAMN18024320
SRA	SRR14089945	SRR14089942	SRR14089941	SRR14089943	SRR14089944
GenBank	JAFHLB010000000	JAFHLC000000000	JAFHLD000000000	JAFHLE000000000	JAFHLF000000000

^a CDS, coding DNA sequences.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS

Búsqueda de genes

Se secuenciaron las cepas PP-145.98, PP-256, PP-259, PP-307 y PP-313 de *V. neptunius*

5 Vibriolisinas hipotéticas

Proteína	Id. Proteína	Peptidasa/famiia	Locus del gen
Zinc metaloproteasa	MBN3577120.1	M4	JYA62_05490
Zinc metaloproteasa	MBN3579346.1	M4	JYA62_16920
Zinc metaloproteasa	MBN3580107.1	M4	JYA62_20845
Zinc metaloproteasa	MBN3580162.1	M4	JYA62_21125
Zinc metaloproteasa	MBN3580509.1	M4	JYA62_23080
Colagenasa	MBN3578544.1	M9	JYA62_12825
Colagenasa	MBN3578547.1	M9	JYA62_12840

Homología con VcpA de *V. corallilyticus* y VtpA de *V. tubiashii*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS

Identificación de VnpA

Análisis *in silico* del genoma de *V. neptunius* PP-145.98 (Accession No. JAFHLB000000000)



 Motivo Fungalisina/ Termolisina Propeptido

 Peptidasa propeptido y dominio YPEB

 Peptidasa_M4

 Peptidasa_M4_C

 PPC: Dominio bacteriano pre - peptidasa C-terminal

 Dominio N-terminal

 Dominio C-terminal

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS

Búsqueda de genes

Se secuenciaron las cepas PP-145.98, PP-256, PP-259, PP-307 y PP-313 de *V. neptunius*

Se identificaron 2 colagenasas hipotéticas

Proteína	Id. Proteína	Peptidasa/famiia	Locus del gen
Zinc metaloproteasa	MBN3577120.1	M4	JYA62_05490
Zinc metaloproteasa	MBN3579346.1	M4	JYA62_16920
Zinc metaloproteasa	MBN3580107.1	M4	JYA62_20845
Zinc metaloproteasa	MBN3580162.1	M4	JYA62_21125
Zinc metaloproteasa	MBN3580509.1	M4	JYA62_23080
Colagenasa	MBN3578544.1	M9	JYA62_12825
Colagenasa	MBN3578547.1	M9	JYA62_12840

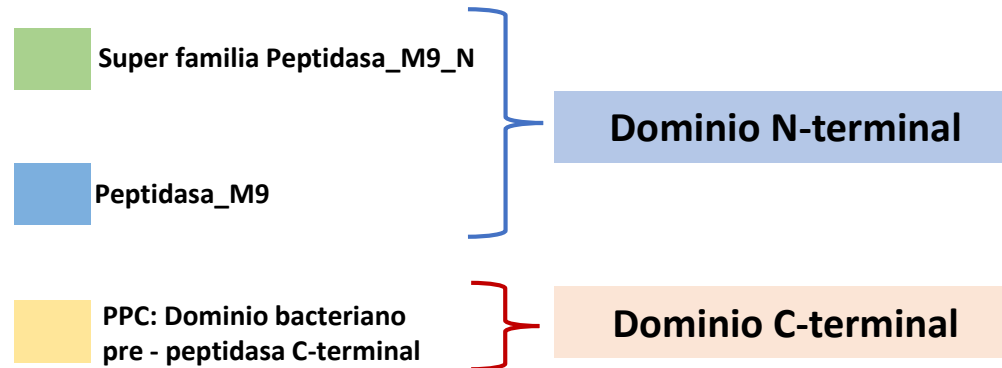
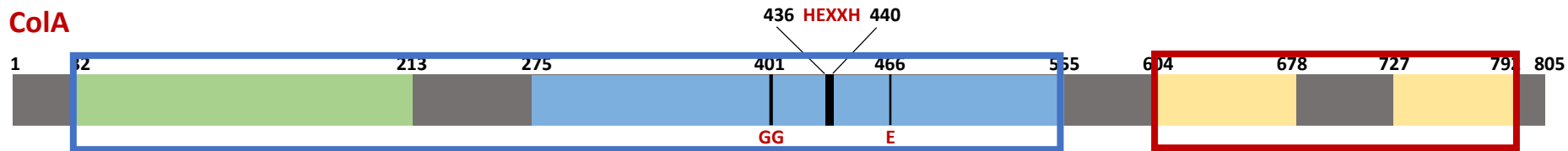
Se seleccionó esta colagenasa por su homología a la colagenasa de *P. damsela*e y se prevé que tiene relación con la virulencia

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS

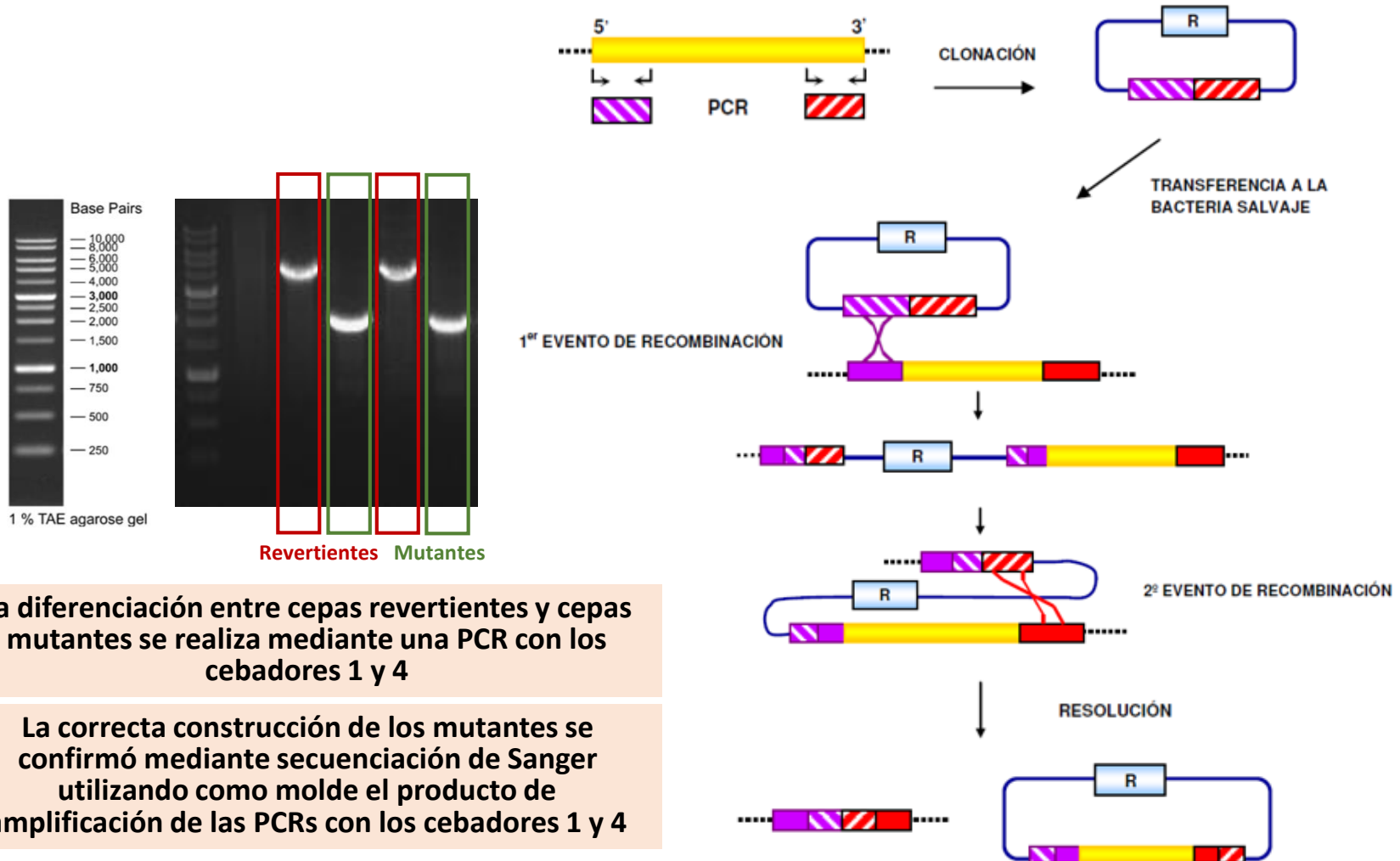
Identificación de CoIA

Análisis *in silico* del genoma de *V. neptunius* PP-145.98 (Accession No. JAFHLB000000000)



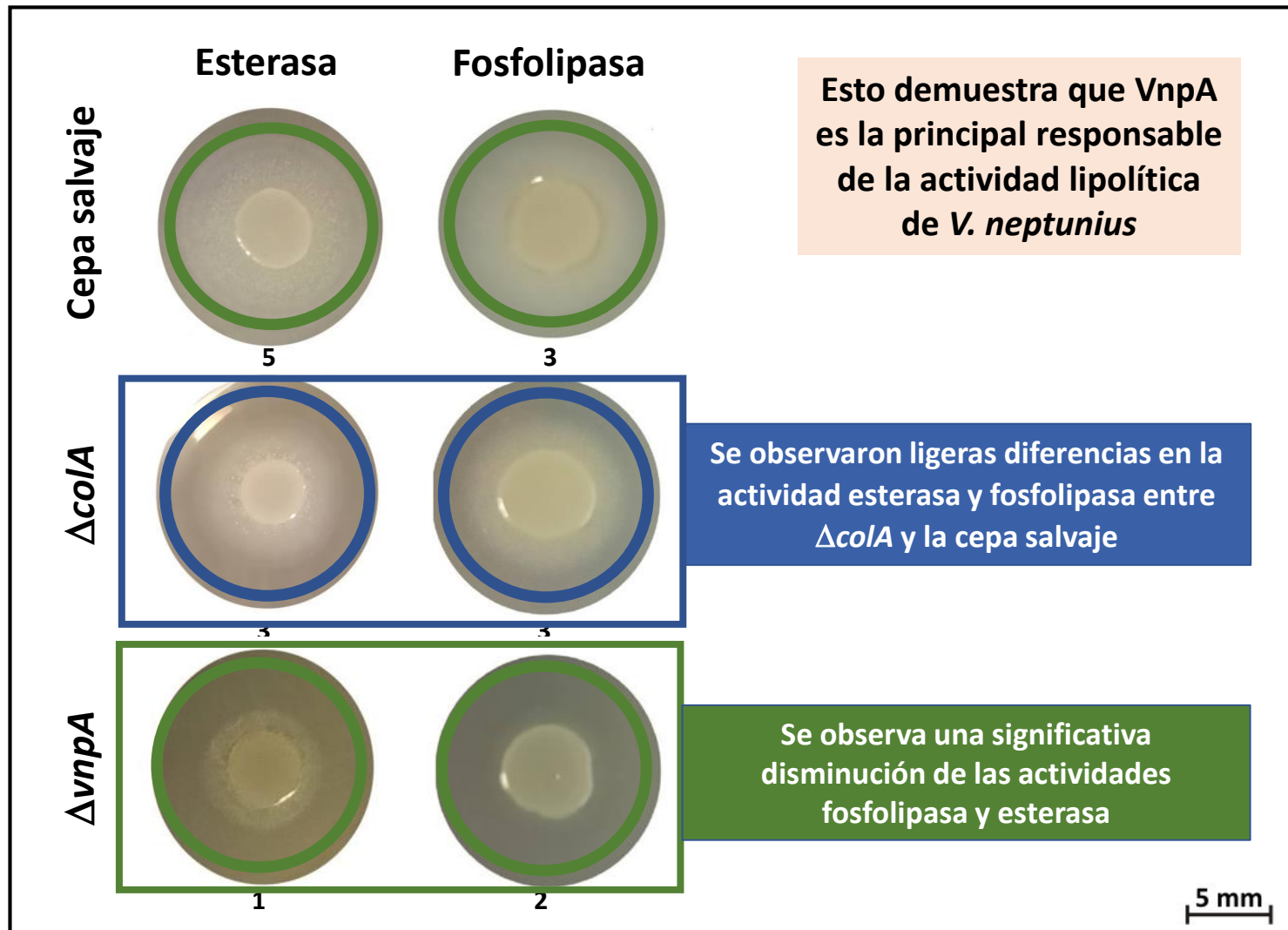
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Construcción de mutantes por intercambio alélico



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA ColA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS

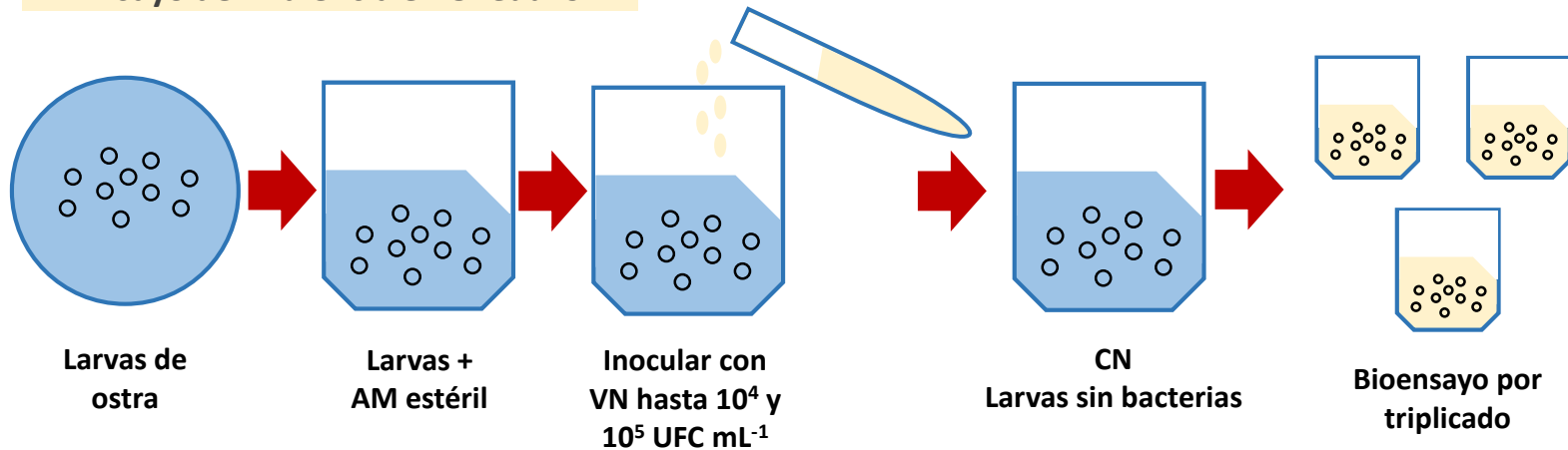


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

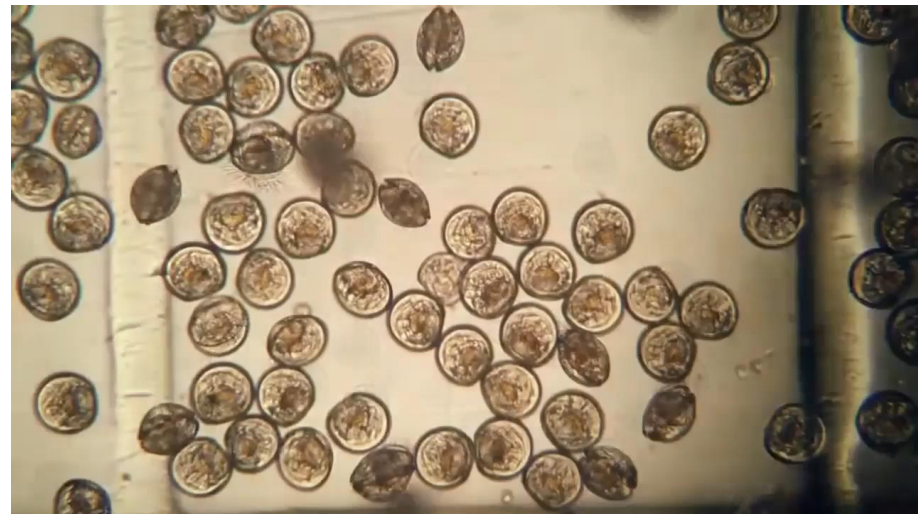
VnpA y CoIA TIENEN UN PAPEL IMPORTANTE EN LA VIRULENCIA DE *V. neptunius*

¿ Participan VnpA y CoIA en la virulencia de *V. neptunius* en bivalvos ?

Ensayo de virulencia en *O. edulis*



El resultado de patogenicidad se evaluó a las 96 h y se expresó como porcentaje de supervivencia

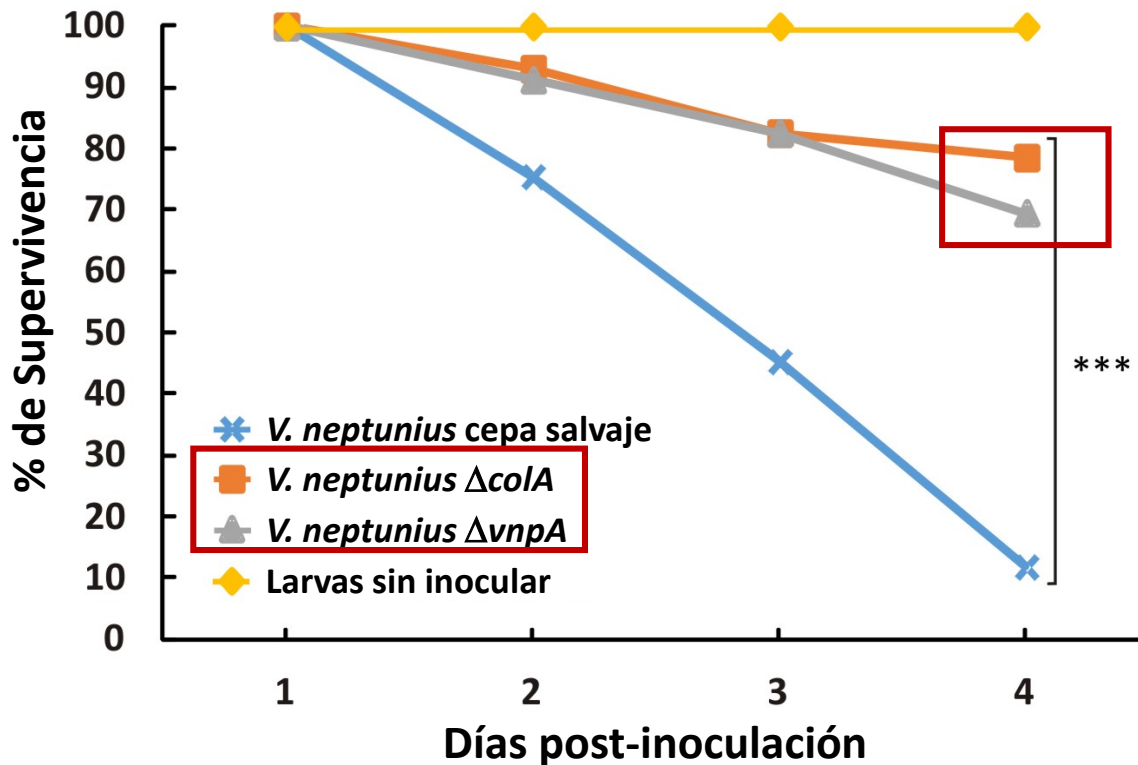


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VnpA y CoIA TIENEN UN PAPEL IMPORTANTE EN LA VIRULENCIA DE *V. neptunius*

¿ Participan VnpA y CoIA en la virulencia de *V. neptunius* en bivalvos ?

Ensayo de virulencia en larvas de ostra (*Ostreae edulis*)



La mutación de una u otra enzima induce una reducción significativa en la mortalidad

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RECAPITULANDO

vnpA* codifica una proteína responsable en gran parte de las actividades fosfolipasa y esterasa en *V. neptunius



Tanto VnpA como ColA son necesarias para la plena virulencia de *V. neptunius* en larvas de *Ostrea edulis*

Este trabajo proporciona la primera evidencia del papel de una colagenasa en la virulencia de este tipo de patógeno



Article

The Vibriolysin-Like Protease VnpA and the Collagenase ColA Are Required for Full Virulence of the Bivalve Mollusks Pathogen *Vibrio neptunius*

Fabián Galvis , Juan L. Barja, Manuel L. Lemos  and Miguel Balado *

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BIVALVOS
3. ENFERMEDADES EN BIVALVOS
4. VIBRIOS PATÓGENOS DE MOLUSCOS
5. FACTORES DE VIRULENCIA
6. *Vibrio neptunius*

II. OBJETIVOS

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS
2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES:
ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA
3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

IV. CONCLUSIONES

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

Crecimiento en déficit de hierro

1. Resuspender el inóculo de la bacteria en 5 ml de TSB. Dejar en crecimiento en agitación a 25°C. 2 a 3 horas.

2. Preparar 1 ml de las soluciones de Dipiridil en CM9, para una concentración final de 50, 100 y 150 μ M.

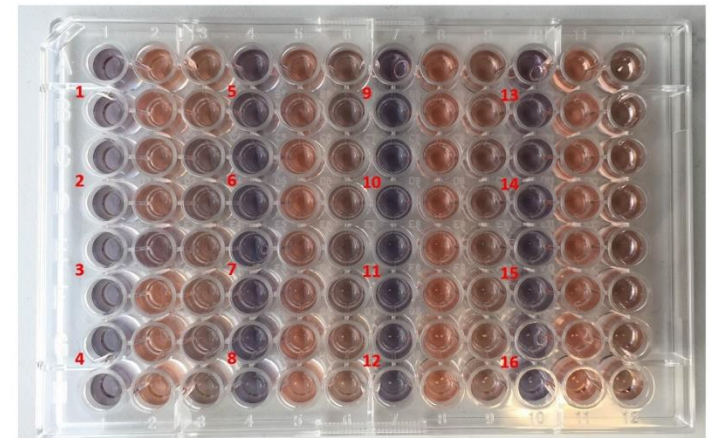
3. Preparar 1 ml de la solución con Fe, utilizando Cloruro Férrico 10 mM, hasta alcanzar una concentración de 10 μ M en CM9. Ejemplo. 3 μ l FeCl_3 10 mM + 2997 CM9: FeCl_3 10 μ M.

6. En una placa de microtítulo, por duplicado, colocar 100 μ l de la solución con Fe y 100 μ l de cada concentración de Dipiridil. Adicionar 100 μ l del inóculo del cultivo con la absorbancia ajustada a 0.5.

5. Preparar el inóculo a una concentración final de 1/50: 40 μ l + 960 μ l CM9 (1/25)

4. Ajustar (con TSB, si es necesario) la absorbancia de las bacterias a 0.5.

7. Colocar la placa en agitación 3 a 4 horas a 25°C. Luego colocar en el lector de placas.



1. VN145 2. VN255 3. VN256 4. VN258 5. VN259 6. VN266 7. VN267 8. VN323
9. VN302 10. VN307 11. VN309 12. VN312 13. VN273 14. VN313 15. VN315 16. VN322

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

Crecimiento en déficit de hierro

La variabilidad de las 19 cepas de *V. neptunius* en la producción de sideróforos y en la capacidad de crecimiento en déficit de hierro, confirma que los brotes infecciosos son causados por bacterias endémicas y no por expansión clonal

Cepas de <i>V. neptunius</i>	Producción de sideróforos	Capacidad de crecimiento		
		50 µM	100 µM	150 µM
PP-145.98	++	0,914	0,957	0,3714
PP-255	+	0,967	0,417	0,3
PP-256	++	1	1	0,7755
PP-258	+	0,972	0,75	0,3056
PP-259	+	1	0,923	0,4231
PP-266	+	0,969	0,656	0,375
PP-267	+	0,825	0,725	0,325
PP-269	+	0,878	0,571	0,3061
PP-302	++	0,961	0,667	0,3922
PP-307	++	1	1	0,3721
PP-309	+	0,896	0,938	0,5417
PP-312	+	1	0,847	0,4068
PP-273	+	0,946	0,696	0,0893
PP-313	+	1	0,828	0,4483
PP-315	+	0,952	0,903	0,5
PP-322	++	1	1	0,6061
PP-323	+	1	1	0,566
PP-325	+	1	1	0,6724
PP-326	+	0,913	0,365	0,1153

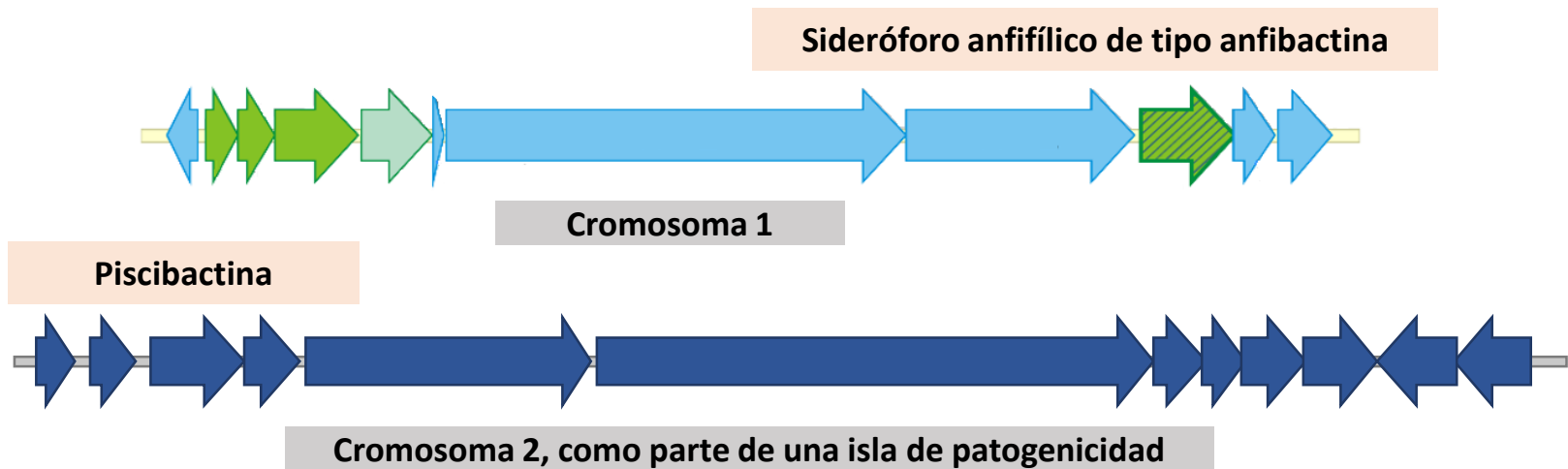
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

Rastreo de sistemas de sideróforos

Análisis *in silico* de las cepas secuenciadas PP-145.98, PP-256, PP-259, PP-307 y PP-313 de *V. neptunius*

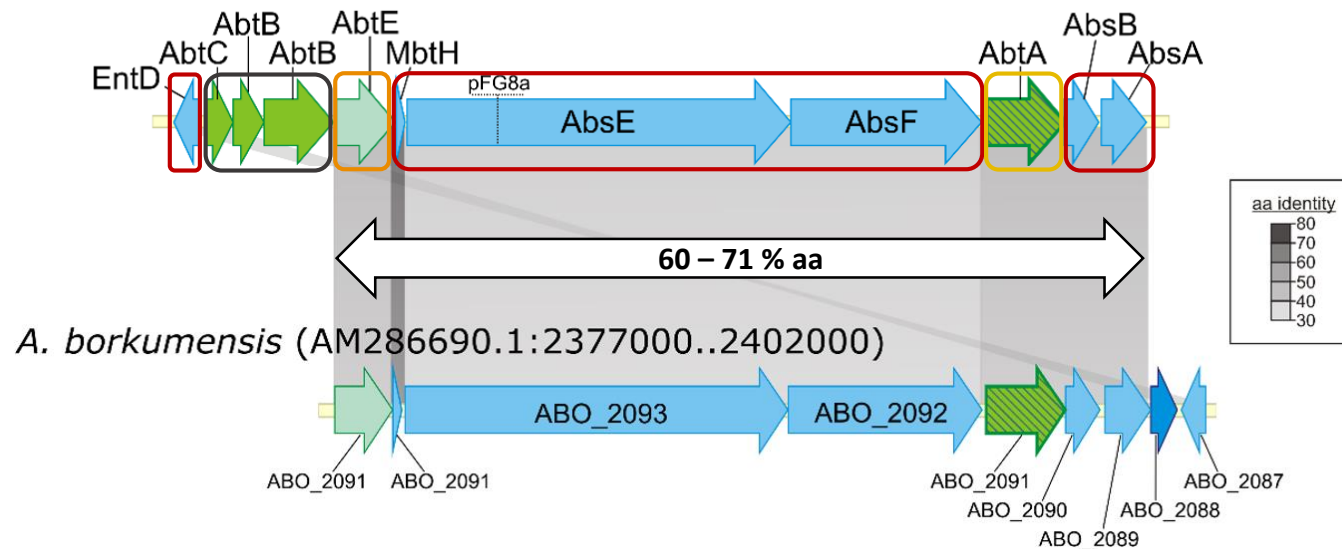
Se identificaron 2 grupos de genes relacionados con la producción de sideróforos



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

Sistema de la anfibactina



El sistema del sideróforo anfifílico tipo anfibactina está formado por 11 genes

- Biosíntesis
- Sistema transportador ABC
- Receptor Ton-B
- Exportador

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

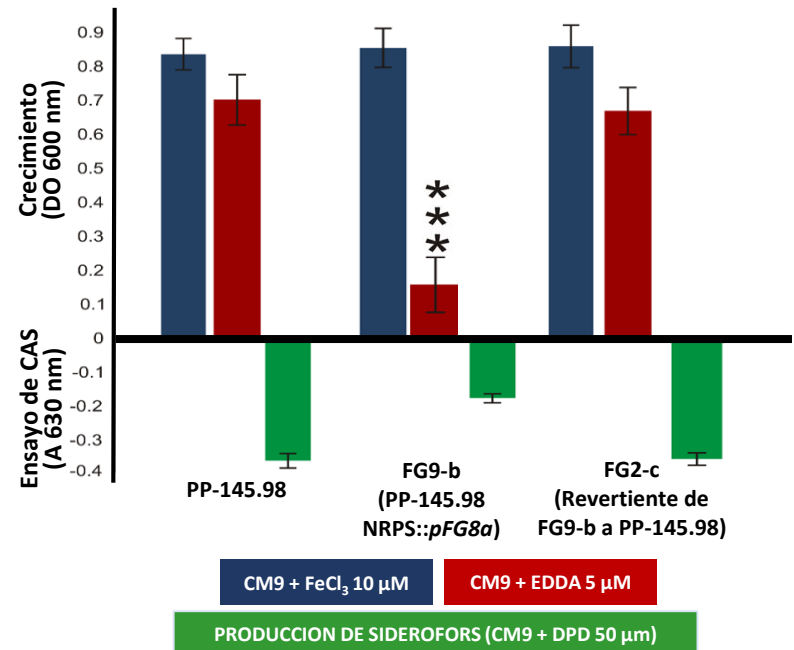
Sistema de la anfibactina

Evaluación de la actividad del sideróforo anfílico tipo anfibactina

Mutante de síntesis
por inserción

Revertiente del
mutante

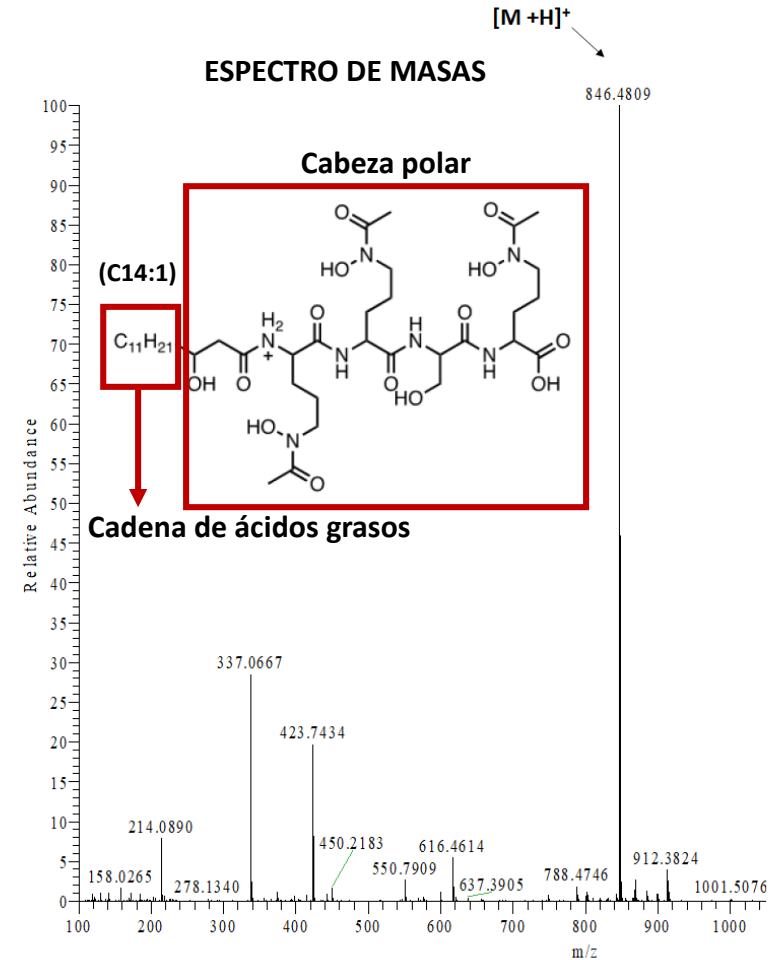
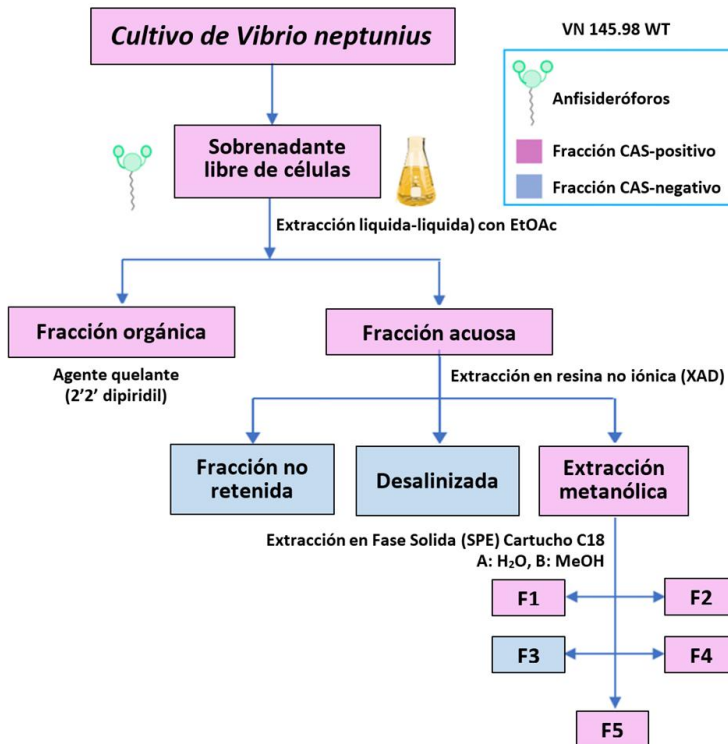
Capacidad de crecimiento en déficit de
hierro y producción de sideróforos



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

Detección de anfibactina mediante HPLC-HRMS



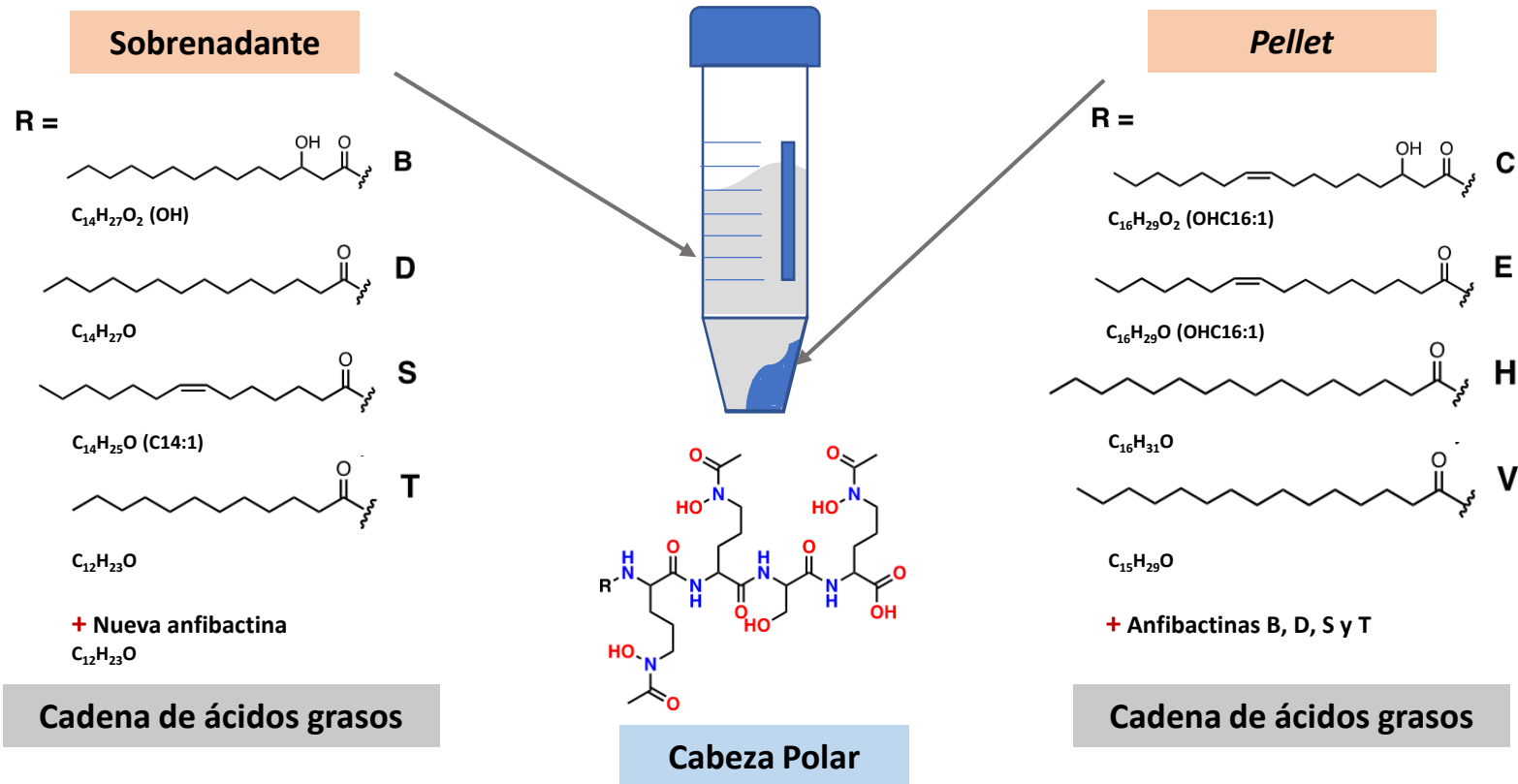
Se detectó la producción de 9 formas de anfibactina

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

Sistema de la anfibactina

Detección de anfibactina mediante HPLC-HRMS



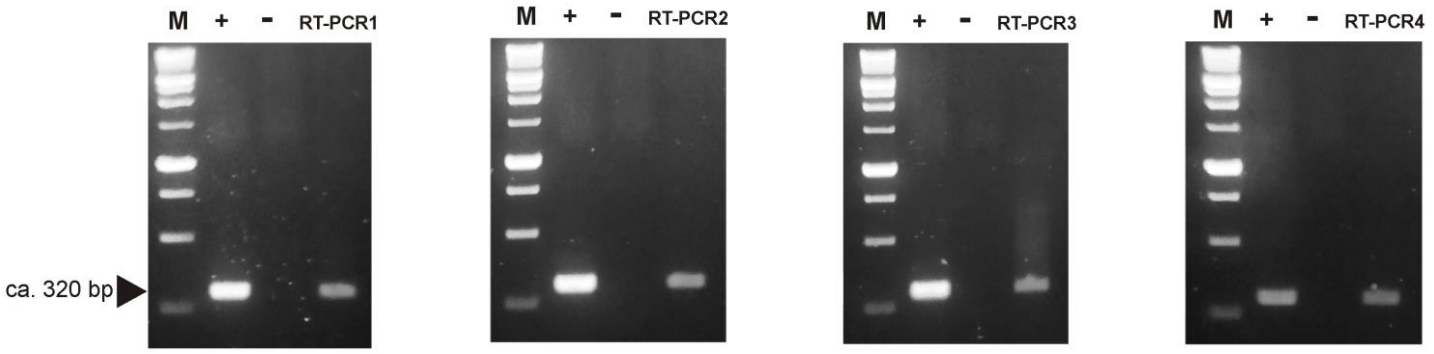
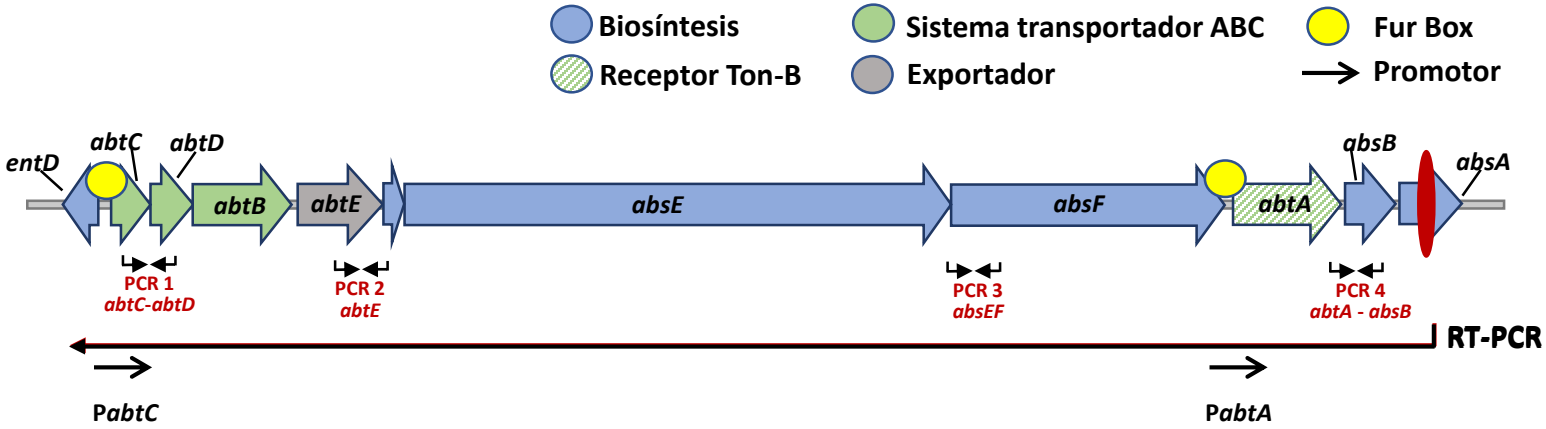
Esto sugiere un paso de asociación con la membrana celular para la secreción de dichas anfibactinas

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

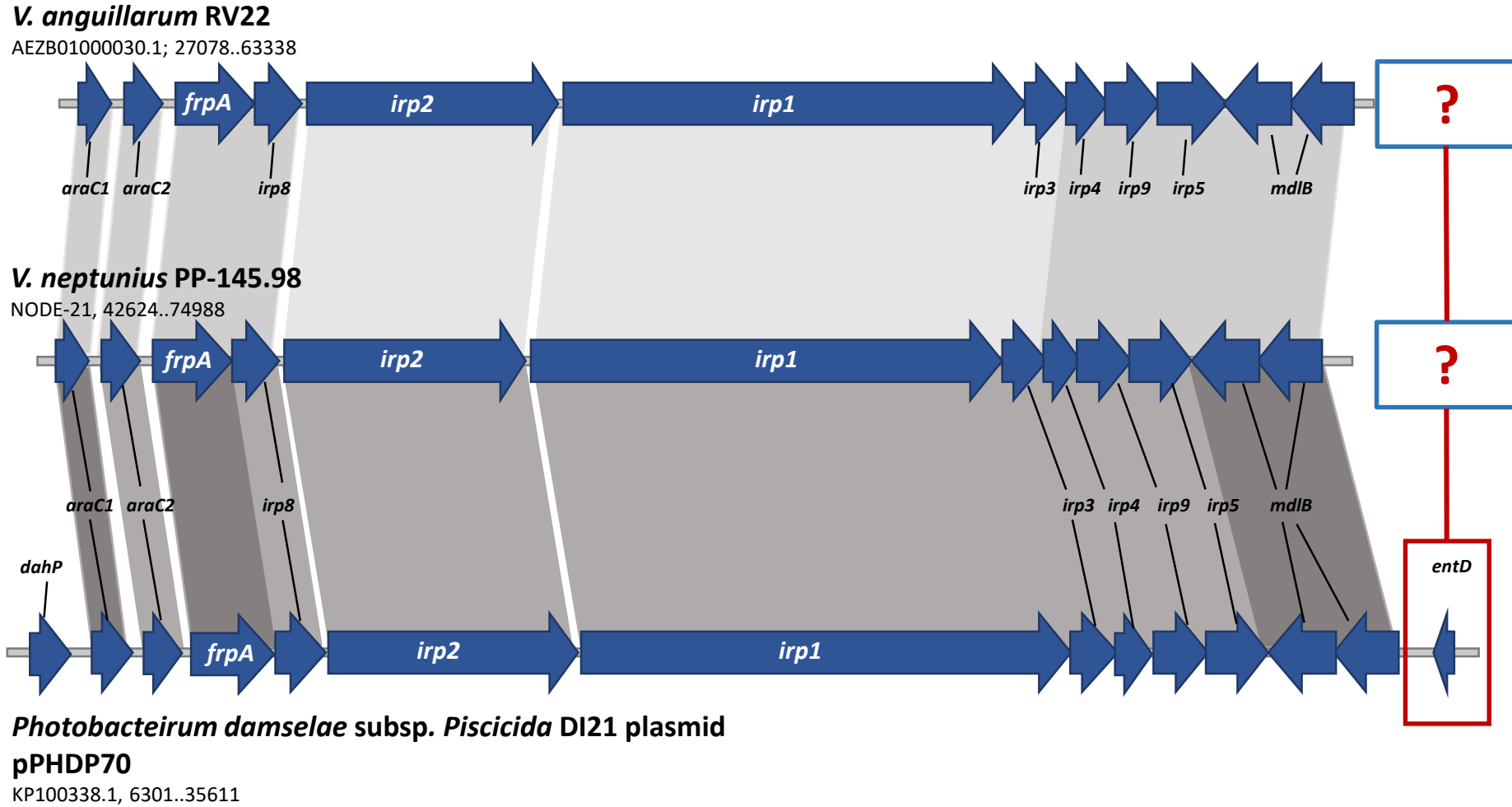
Sistema de la anfibactina

Organización de la expresión de los genes del operón de la anfibactina



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

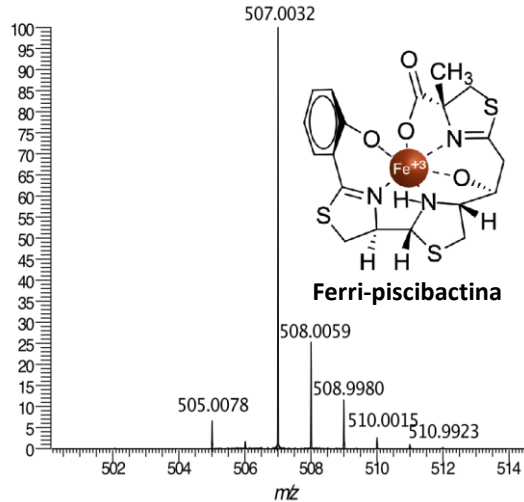
Las islas de *V. neptunius* y *V. anguillarum* no incluyen homólogos del gen *entD* que codifica la enzima 4'- fosfopanteteinil-transferasa (PPTasa) necesaria para la activación de las NRPSs



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

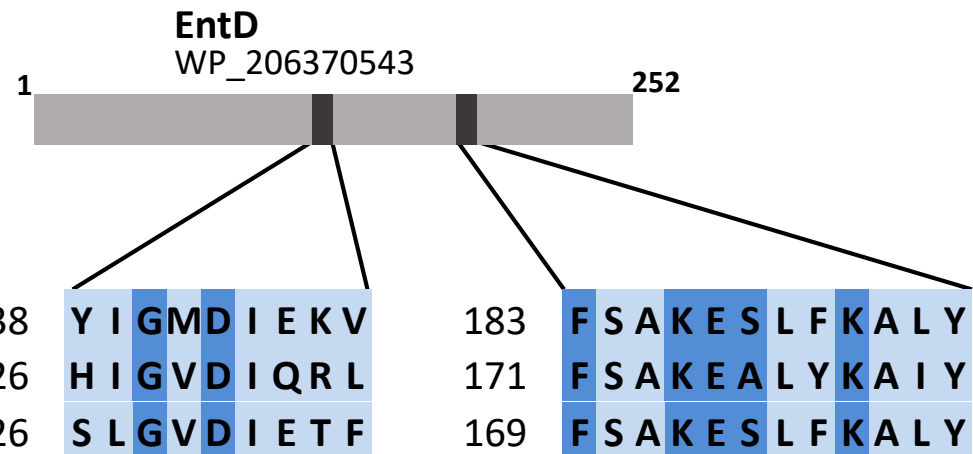
2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA

Sistema de la piscibactina



Detección de la piscibactina mediante HPLC-MS/MS

El genoma de *V. neptunius* incluye dos PPTasa del grupo II homólogas a EntD, por lo tanto una de ellas debe complementar en *trans* la síntesis de piscibactina



V. neptunius (WP_206370543)

V. neptunius (WP_206368753)

E. coli EntD

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RECAPITULANDO

V. neptunius produce dos sideróforos: anfibatina y piscibactina

Desconocemos si se producen simultáneamente y cual es el rol de los sideróforos en la virulencia







environmental
microbiology



Environmental Microbiology (2020) 22(12), 5467–5482

doi:10.1111/1462-2920.15312

The marine bivalve molluscs pathogen *Vibrio neptunius* produces the siderophore amphibactin, which is widespread in molluscs microbiota

Fabián Galvis ^{1†} Lucía Ageitos,^{2†}
Diana Martínez-Matamoras,² Juan L. Barja ¹,
Jaime Rodríguez ^{2*} Manuel L. Lemos ¹,
Carlos Jiménez ^{2*} and Miguel Balado ^{1*}

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BIVALVOS
3. ENFERMEDADES EN BIVALVOS
4. VIBRIOS PATÓGENOS DE MOLUSCOS
5. FACTORES DE VIRULENCIA
6. *Vibrio neptunius*

II. OBJETIVOS

III. RESULTADOS Y DISCUSION

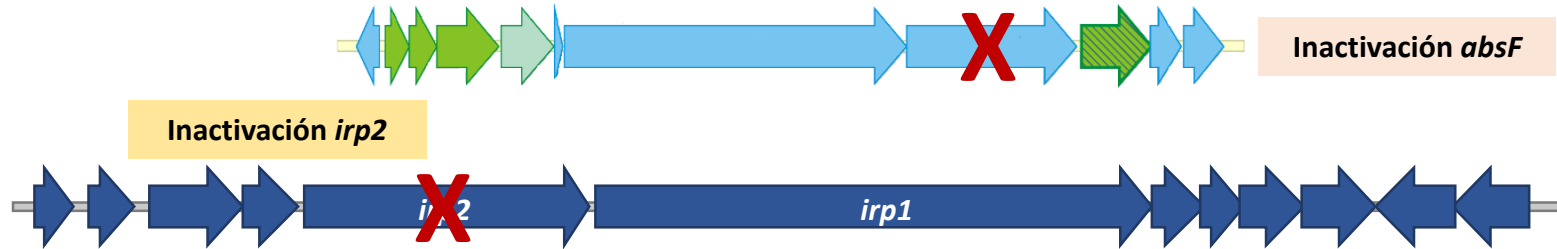
1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS
2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA
3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

IV. CONCLUSIONES

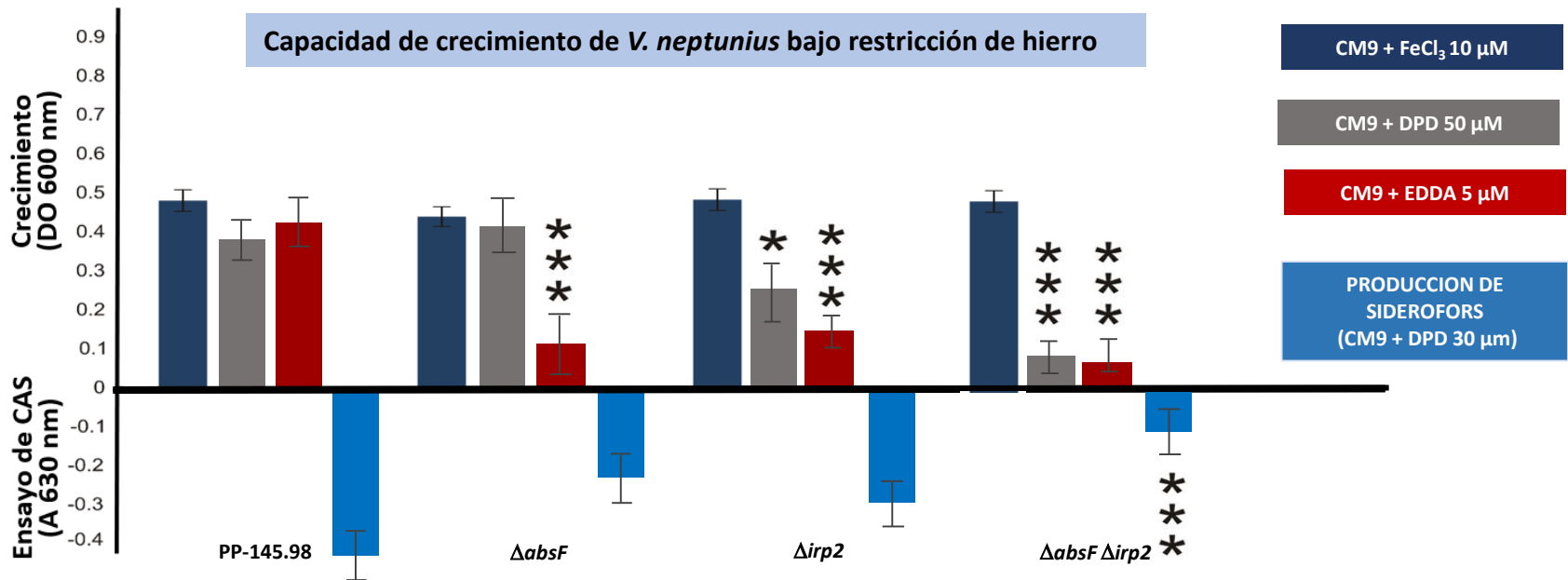
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

Construcción por intercambio alélico de mutantes simples y dobles



Capacidad de crecimiento de *V. neptunius* bajo restricción de hierro

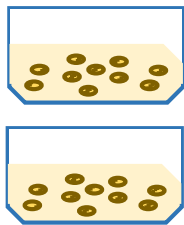
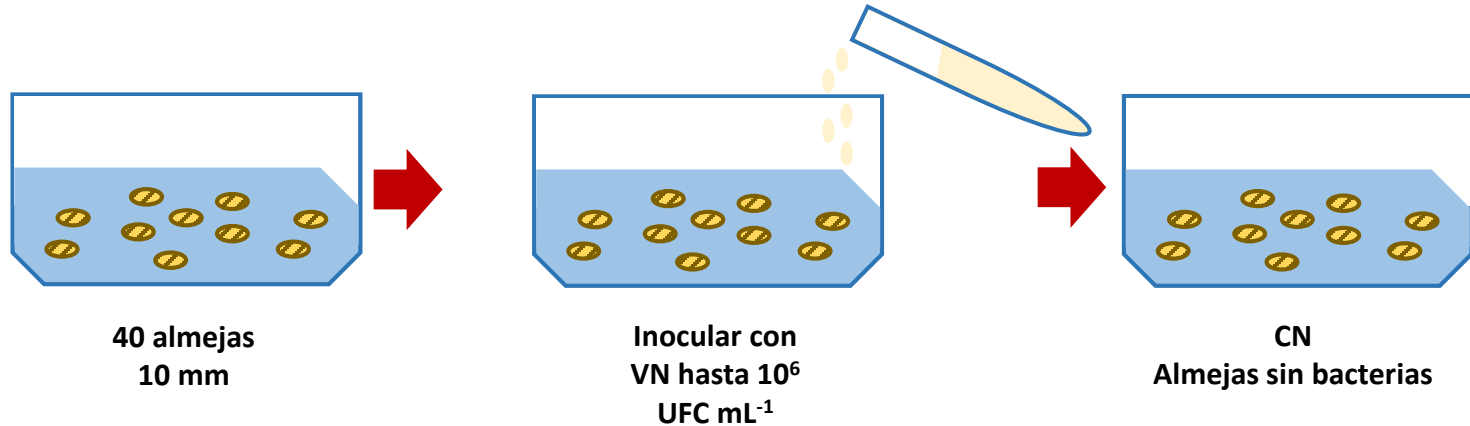


Estos resultados sugieren que la producción de múltiples sideróforos incrementa el potencial de crecimiento de *V. neptunius* cuando es cultivada en déficit de hierro *in vitro*

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

Ensayo de virulencia en *Ruditapes philippinarum*



Bioensayo por
duplicado

El resultado de patogenicidad se
evaluó a las 96 h y se expresó como
porcentaje de supervivencia

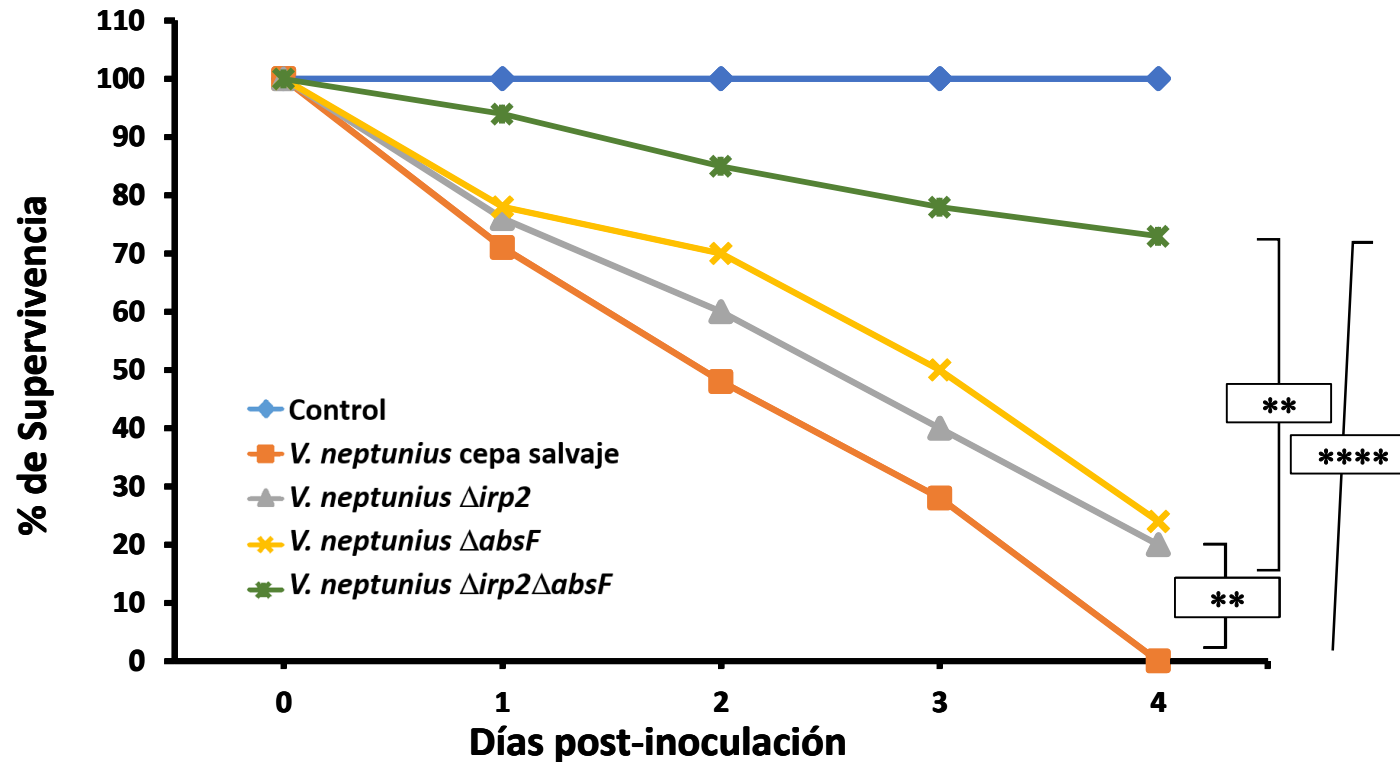


RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

Contribución de los sideróforos en la virulencia de *V. neptunius* en bivalvos

Ensayo de virulencia en juveniles de almeja (*Ruditapes philippinarum*)



La producción simultánea de ambos sistemas de sideróforos maximiza la virulencia de *V. neptunius* en almeja

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RECAPITULANDO

El producir dos sideróforos, anfibactina y piscibactina, le da flexibilidad a *V. neptunius*, ya que dependiendo de la fuente de hierro, un sideróforo u otro funciona mejor

Además la producción simultanea de anfibactina y piscibactina incrementa la virulencia de *V. neptunius*

Vibrio neptunius Produces Piscibactin and Amphibactin and Both Siderophores Contribute Significantly to Virulence for Clams



Fabián Galvis¹, Lucía Ageitos², Jaime Rodríguez², Carlos Jiménez², Juan L. Barja¹,
Manuel L. Lemos^{1*} and Miguel Balado^{1*}

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

1. PRODUCCIÓN MUNDIAL DE BIVALVOS
2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS BIVALVOS
3. ENFERMEDADES EN BIVALVOS
4. VIBRIOS PATÓGENOS DE MOLUSCOS
5. FACTORES DE VIRULENCIA
6. *Vibrio neptunius*

II. OBJETIVOS

III. RESULTADOS Y DISCUSION

1. CARACTERIZACION DE LA VIBRIOLISINA VnpA Y COLAGENASA CoIA COMO FACTORES DE VIRULENCIA ESENCIALES DE *V. neptunius* EN BIVALVOS
2. *V. neptunius* PRODUCE DOS SIDERÓFOROS DIFERENTES: ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA
3. ANFIBACTINA Y PISCIBACTINA CONTRIBUYEN A LA VIRULENCIA DE *V. neptunius* EN ALMEJA

IV. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

LAS CONCLUSIONES MÁS RELEVANTES SE RESUMEN A CONTINUACIÓN:

1. Los aislados de *V. neptunius* poseen actividad lipolítica y proteolítica y sintetizan sideróforos. Además, existe variabilidad entre los aislados lo que podría estar relacionado con diferentes niveles de virulencia en el hospedador
2. El análisis *in silico* de los genomas de *V. neptunius* nos permitió identificar dos *loci* que codifican una vibriolisina (VnpA) y una colagenasa (ColA). Las metaloproteasas VnpA y ColA son responsables de la actividad lipolítica y colagenolítica, respectivamente. Además, ambas son esenciales para la plena virulencia de *V. neptunius* en bivalvos
3. El genoma de *V. neptunius* incluye genes para la síntesis y utilización del sideróforo anfibactina y la isla de patogenicidad *irp*-HPI que codifica el sistema de la piscibactina. Ambos sistemas de sideróforos son funcionales, se expresan simultáneamente cuando la bacteria crece en la hemolinfa de bivalvos y contribuyen significativamente a la virulencia de *V. neptunius* en almeja

CONCLUSIONES

4. El sistema de la anfibactina está compuesto por los genes biosintéticos *absABDEF*, los transportadores *abtCD* y el transportador de membrana externa *abtA*. Los genes de la anfibactina se transcriben en un único ARNm policistrónico a partir de dos promotores aguas arriba a *abtC* y *abtA*
5. *V. neptunius* produce una mezcla de nueve formas de anfibactina, una de ellas no descrita anteriormente, con ácidos grasos de entre 12 y 16 carbonos que permanecen asociadas a la pared celular o más solubles en agua de acuerdo a la longitud de la cadena del ácido graso. Por lo tanto, para caracterizar las anfibactinas producidas por una bacteria es indispensable estudiar tanto la fracción hidrosoluble como la asociada a la membrana bacteriana

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada con los proyectos AGL2017-86183-R y RTI2018-093634-B-C21/C22 de la Agencia Estatal de Investigación (AEI), cofinanciados con el Programa FEDER de la Unión Europea. Y el proyecto PID2019-103891RJ-100 de la Agencia Estatal de Investigación (AEI) de España



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional



COLCIENCIAS
Ciencia, Tecnología e Innovación



**Gobernación
de Norte de
Santander**



El autor fue beneficiario de dos becas condonables otorgadas por Colciencias y la Gobernación de Norte de Santander, y el Icetex, Colombia

GRACIAS