

Análisis metagenómico del microbioma de *Patella candei* en Fuerteventura asociado a su hábitat

**Javier Quinteiro^{1*}, Gustavo González-Lorenzo²,
Dailos Hernández-Reyes³, Lara Quinteiro¹,
Rogelio Herrera-Pérez⁴, Juan Martínez-Barrio⁴,
José Antonio González³, Manuel Rey-Méndez¹
y Nieves González-Henríquez³**

¹Laboratorio de Sistemática Molecular
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular & Instituto de Acuicultura
Universidad de Santiago de Compostela
A Coruña, España

²Centro Oceanográfico de Canarias. IEO-CSIC. España

³Departamento de Biología
Universidad de Las Palmas de Gran Canaria
Las Palmas de Gran Canaria. España

⁴Dirección General de Lucha contra el Cambio Climático y Medio Ambiente
Consejería de Transición Ecológica, Lucha contra el
Cambio Climático y Planificación Territorial
Gobierno de las Islas Canarias. España

* e-mail: javier.quinteiro@usc.es

RESUMEN

Para estudiar la interacción de la lapa majorera *Patella candei*, especie endémica de Fuerteventura, con microorganismos de su hábitat, se realizó un estudio metagenómico del microbioma de 12 poblaciones con un método no invasivo. Los resultados del estudio muestran que la diversidad taxonómica del microbioma es similar para todas las muestras y no se ha observado una asociación entre su diversidad y la localización geográfica. La metodología es eficaz para la realización de monitorización y vigilancia de las poblaciones de la lapa majorera, detectando la presencia de un posible patógeno, cuya interacción con *Patella candei* debe ser evaluada.

PALABRAS CLAVE: metagenómica, lapa majorera, microbioma, hábitat

INTRODUCCIÓN

La lapa majorera (*Patella candei* d'Orbigny, 1840), históricamente uno de los recursos marisqueros relevantes en el Archipiélago Canario, se encuentra incluida en el Catálogo Español de Especies Amenazadas considerada como “en peligro de extinción” (Real Decreto 139/2011, BOE 46). En el Catálogo Canario de Especies Protegidas se encuentra en la categoría supletoria (Anexo V) de vulnerable, ante el supuesto de una disminución de la protección indicada en el catálogo nacional (Ley 4/2010, BOC 112). Ante esta crítica situación se ha adoptado el Plan de Recuperación de la Lapa Majorera (Decreto 161/2015, BOC 136), con el objetivo fundamental de garantizar la supervivencia de la especie en el archipiélago. En el marco de este Plan se han llevado a cabo análisis que han puesto de manifiesto la diferenciación genética de las poblaciones de Fuerteventura y Salvajes y planteado el rango taxonómico de especie, *P. candei*, para dichas poblaciones (Quinteiro *et al.*, 2022).

MATERIAL Y MÉTODOS

Un total de 12 sitios de muestreo, proveyeron de 104 muestras no-invasivas por hisopado del pie de individuos de *Patella candei* del litoral de Fuerteventura. En su mayoría, con la excepción de la muestra de Costa Calma, los sitios se localizan en el sur de la península de Jandía (Fig. 1).

Las muestras de hisopado del músculo del pie proporcionaron el ADN utilizado en el análisis metagenómico, extraído con el kit EZNA DNA mollusk (EZNA). Se combinaron las muestras individuales por sitio de muestreo generándose 12 pools: Corralito del Cutillo-CC; Costa Calma-CCA; Cueva de la Negra-CN; Joroz-J; Juan Gómez-JG; Punta Coloradas-PC; Punta Jandía-PJ; Norte de Playa La Turbia-PLTN; Sur de Playa La Turbia-PLTS; Punta Percebe-PP; Punta del Tigre-PT; Roque del Moro-RM.

El gen 16S rRNA completo fue amplificado con cebadores universales, siendo purificados los productos de PCR con Mag-Bind Total pure NGS (Omega-BioTek). Los amplicones tratados con NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing Module (NEB) fueron etiquetados mediante ligación con Quick T4 Ligase (NEB) y con los índices contenidos en el PCR Barcoding Expansion 1-12 (ONT). A partir de una mezcla equimolar de amplicones obtenidos para cada uno de los 12 sitios de muestreo, se elaboró una biblioteca con el

protocolo de Ligation sequencing kit (ONT). La biblioteca fue cargada en una célula de flujo de un MinION y mantenido el run hasta obtener en torno a 1,2 M de lecturas. El basecalling se llevó a cabo con dorado v0.3.2 y duplex-tools v0.3.3 y el demultiplexado con Guppy. Finalmente, para el trimming se usó porechop 0.2.4.

El análisis metagenómico fue realizado a través de pipelines basadas en Qiime (Bolyen *et al.*, 2019). Como base de datos de referencia de secuencias 16S rRNA se usó GreenGenes 2022.10.



Figura 1.- Localización geográfica de los puntos de muestreo en las costas de la península de Jandía seleccionados para obtener muestras no invasivas de individuos de *Patella candei*.

Las muestras para el análisis del microbioma deben ser de muestras incruentas, en consecuencia, las posibilidades analíticas se limitan a las muestras de hisopados del pie. Esta muestra destinada al análisis del microbioma sólo permite obtener una caracterización parcial, pero justificable por las dificultades de muestreo de una especie en peligro de extinción y la imposibilidad de obtener muestras tisulares internas. La actual falta de muestras, inicialmente considerados como probables y provenientes de tejidos de algún individuo irrecuperable, fruto de especímenes requisados de actividades de captura ilícitas ha limitado, hasta este momento, la tipología de este análisis al microbioma externo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de las dificultades metodológicas, tras el filtrado y normalización de las lecturas brutas se obtuvieron entre 75.000 y 225.000 lecturas para cada sitio de muestreo (Fig. 2.A). En cuanto a la calidad, las secuencias filtradas presentaron un $Q>20$ en su mayoría (Fig. 2B).

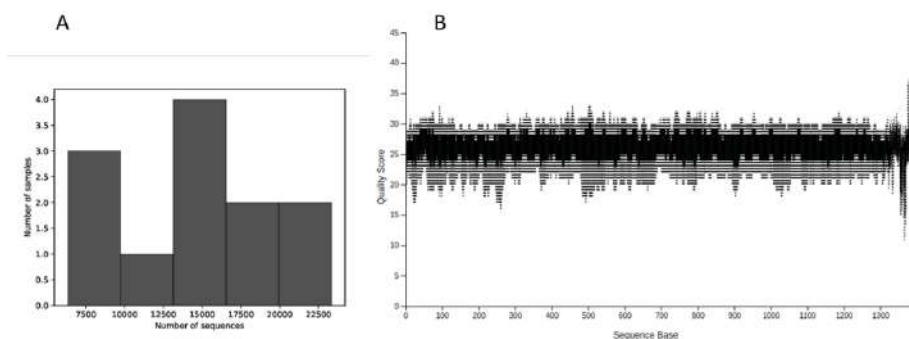


Figura 2.- A) Número de secuencias obtenidas para las 12 muestras de hisopado de pie de *Patella candei*. B) Calidad de las secuencias del gen completo del 16 rRNA ($Q>20$) obtenidas con la metodología portátil de Oxford Nanopore Technologies.

Fueron definidas 3.420 secuencias consenso en el juego completo de muestras. A partir de ellas, fue inferida la taxonomía para las secuencias con un match positivo en la base de datos GreenGenes. Un porcentaje entre el 1 y el 9% se mantuvieron como no asignadas a ningún taxa bacteriano. Entre las familias más representadas se encuentran Fusobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Rhodobacteriaceae, Vibrionaceae y Nostocaceae.

Existe diversidad en la frecuencia de diversos taxa en cada población muestreada, con especies recientemente caracterizadas en elevada frecuencia. La presencia de un Gram-negativo, anaeróbico estricto, *Psychrilyobacter atlanticus*, destaca en las muestras de PT (72%), PP (33%) y CCA (27%). El aeróbico estricto, *Spongiivirga citrea*, se recuperó en alta frecuencia en todas las muestras, destacando su frecuencia en PJ (40%), CN (32%) y CC (19%). El también aeróbico estricto *Litoreibacter roseus*, y otras especies del género, representan elevados porcentajes, especialmente en J (48%). Es también destacable la presencia del enigmático clado SAR324 que llega a representar el 20% de los taxa recuperados en la muestra JG (Fig. 3).

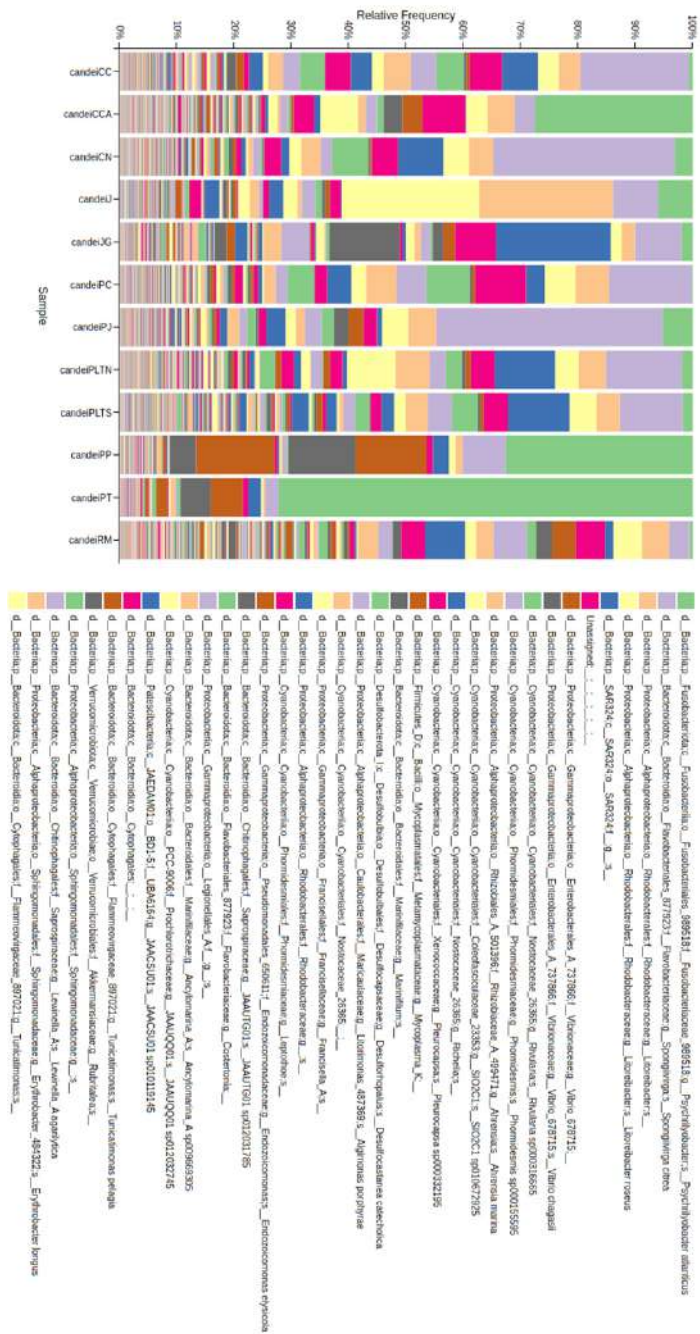


Figura 3.- Perfiles de abundancia taxonómica al mayor nivel de resolución posible de especie, para las 12 muestras analizadas de hisopados del pie de *Patella candei* en Fuerteventura.

No se observa una obvia distribución diferencial del patrón de perfil taxonómico bacteriano a lo largo de los puntos de muestreo (Fig. 4), aunque sí se mantienen perfiles y taxa comunes. Los análisis de la diversidad alfa de Faith (test de Kruskal-Wallis; $H = 4,94$; $P = 0,18$), no detecta diferencias significativas cuando son considerados 4 grupos (NE, S, W, NW) definidos en función de las costas de Fuerteventura donde se localizaron los sitios de muestreo, y en torno a la península de Jandía (Fig. 4).

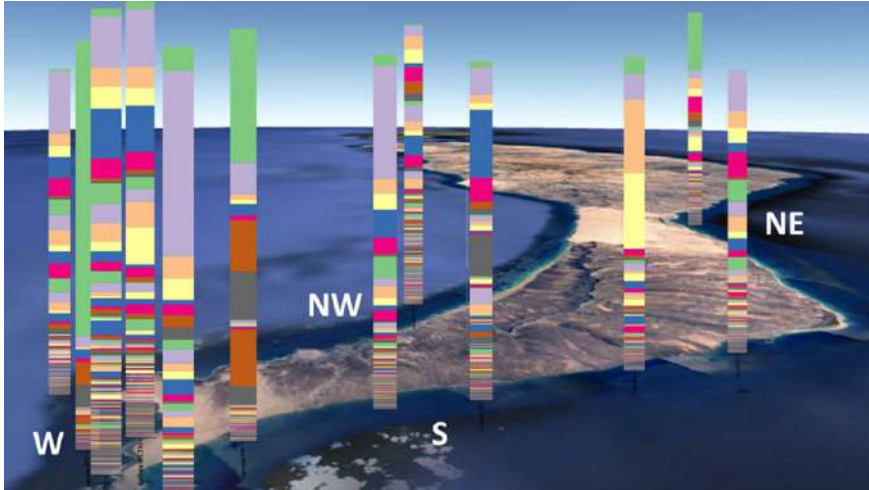


Figura 4.- Distribución de los perfiles taxonómicos a lo largo de los puntos de muestreo.

Los análisis de diversidad beta basados en las distancias de Jaccard y UniFrac, no mostraron un agrupamiento de las localidades asociadas a cada costa y en función de las diferencias en su diversidad taxonómica. No obstante, sí se aprecia una similitud entre aquellas muestras muy cercanas, tales como las 2 muestras (norte y sur) de la Playa de la Turbia (Fig. 5).

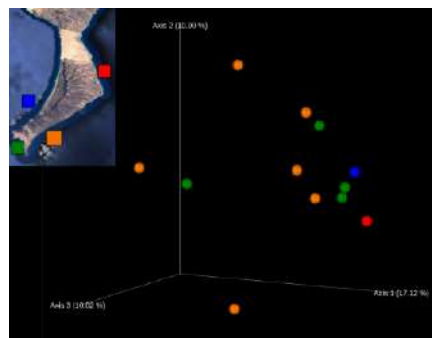


Figura 5.- Gráfico basado en distancia no balanceada UniFrac, mostrando las relaciones entre las muestras considerando la diversidad taxonómica de su microbioma.

El estudio metagenómico del microbioma de muestras no-invasivas del pie de la lapa mayorera, ha permitido caracterizar la diversidad del microbioma de ese específico hábitat. La diversidad taxonómica es similar para todas las muestras y no se ha observado una asociación entre la diversidad y la localización geográfica de dichas muestras. Se han detectado tanto taxa asociados al organismo, como taxa asociados al ambiente abiótico marino. La metodología ha mostrado su eficiencia para la realización de monitorización y vigilancia detectando la presencia de un posible patógeno *Vibrio chagasii*, identificado como agente causal de enfermedades desarrolladas en vieiras y sus larvas, ostras y mejillones (Teng *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2019; Dégremonet *et al.*, 2021; Urtubia *et al.*, 2023) y cuya interacción con *Patella candei* debe ser evaluada.

CONCLUSIONES

Las muestras aquí analizadas pueden ser consideradas muestras ambientales, contienen tanto taxa asociados al medio, como al hábitat de la epidermis y mucus del pie de la lapa mayorera. La ausencia de una significativa relación entre la diversidad y abundancia taxonómica y las áreas costeras de muestreo puede deberse a esta combinación de la naturaleza de los taxa.

La metodología ha demostrado su eficiencia, rapidez y bajo coste, siendo implementable en el control rutinario del microbioma externo de la lapa, sin sacrificio.

En cuanto a la posible patogenicidad de taxa, se ha detectado la presencia de *Vibrio chagasii* en todas las muestras, destacando su recuperación de la muestra PP (12%) y PT (5%).

AGRADECIMIENTOS

Contrato del Gobierno de Canarias, cofinanciado por el programa operativo FEDER Canarias (2014-2020)

REFERENCIAS

- Bolyen E., *et al.* 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37: 852–857.
- Dégremonet L., Morga B., Maurouard E. y Travers M.-A. 2021. Susceptibility variation to the main pathogens of *Crassostrea gigas* at the larval, spat and juvenile stages using unselected and selected oysters to OsHV-1 and/or *V. aestuarianus*. *Journal of Inverte-*

- brate Pathology*, 183, 107601.
- Liang X., Wang J.-S., Liu Y.-Z., Peng L.-H., Li Y.-F., Batista F. M., Power D.M., Gui L. y Yang J.-L. 2019. Complete genome of a marine bacterium *Vibrio chagasii* ECSMB14107 with the ability to infect mussels. *Marine Genomics*, 48: 100683.
- Quinteiro J., González-Lorenzo G., Hernández-Reyes D., Quinteiro L., Herrera-Pérez R., Martínez-Barrio J., González J. A., Rey-Méndez M. y González-Henríquez N. 2022. Genetic differentiation of a critically endangered population of the limpet *Patella candei candei* d'Orbigny, 1840, in the Canary Islands. *Conservation Genetics*, 23: 807–819.
- Teng W., Li W., Zhang M., Yu Z., Li S., Liu X., Li H. y Fu C. 2012. Isolation, identification and pathogenicity of *Vibrio chagasii* from *Patinopecten yessoensis*. *Journal of Fisheries of China*, 36: 937–943.
- Urtubia R., Miranda C.D., Rodríguez S., Dubert J., Barja J.L. y Rojas R. 2023. First report, characterization and pathogenicity of *Vibrio chagasii* isolated from diseased reared larvae of Chilean scallop, *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Pathogens*, 12: 183.



Análisis metagenómico del microbioma de *Patella caudei* en Fuerteventura asociado a su hábitat

Javier Quintero¹, Gustavo González-Lorenzo, Dulce Hernández-Rodríguez¹, Lara Quintero¹, Rogelia Hernández-Rodríguez¹, Julián Martínez-Barril¹, José Antonio González¹, Manuel Roy Méndez¹ & Nieves González-Hernández²

¹ Instituto Tecnológico de Canarias, ITC, Departamento de Investigación Biológica Molecular, B-100, Avda. de Andalucía, s/n, 35011, San Bartolomé de Guzmán, C/COEVA, s/n, 35011, San Bartolomé de Guzmán, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria, España, ² Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Unidad de Genómica y Bioinformática, Instituto de Genética Humana, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España

INTRODUCCIÓN

La lapa majoreña (*Patella caudei* d'Orbigny, 1840), históricamente uno de los recursos marisqueros relevantes en el Archipiélago Canario, se encuentra incluida en el Catálogo Español de Especies Amenazadas considerada como "en peligro de extinción" (Real Decreto 139/2011; BOE 48). En el Catálogo Canario de Especies Protegidas se encuentra en la categoría supletoria (Anexo V) de vulnerable, ante el supuesto de la disminución de la protección indicada en el catálogo nacional (Ley 4/2010 BOC 112). Ante esta crítica situación se ha adoptado el Plan de Recuperación de la Lapa Majoreña (Decreto 163/2015; BOC 138) con el objetivo fundamental de garantizar la supervivencia de la especie en el archipiélago. En el marco de este Plan se han llevado a cabo análisis genéticos que han puesto de manifiesto la diferenciación genética de las poblaciones de Fuerteventura y Salazjes y planteado el rango taxonómico de especie, *P. caudei*, para dichas poblaciones (Quintero et al., 2022)

MATERIAL Y MÉTODOS



Figura 1. Localización geográfica de las zonas de muestreo en las costas de la península de Jandia (encontradas) y zona de muestreo no invasiva de la zona de la Playa de la Turbia (no invasiva).

Un total de 13 sitios de muestreo, proveyeron de 104 muestras no-invasivas por raspado del pie de individuos de *Patella caudei* del litoral de Fuerteventura. En su mayoría con la excepción de la muestra de Costa Calma, los sitios se localizan en el sur de la península de Jandia (Figura 1). Las muestras de raspado del músculo del pie proveyeron del ADN utilizado en el análisis metagenómico, extraído con el kit EZNA DNA lysis (EZNA). Se combinaron las muestras individuales por sitio de muestreo generando 12 pools (Corralto del Cofre-CC, Costa Calma-CCA; Cueva de la Negra-CN; Joroz-J; Juan Gómez-JG; Punta Colorada-PC; Punta Jandia-PJ; Norte de Playa La Turbia-PLN; Sur de Playa La Turbia-PLS; Punta Prieta-PP; Punta del Tigre-PT; Roque del Moro-RLM).

El gen 16S rRNA completo fue amplificado con cebadores universales, siendo purificados los productos de PCR con Mag-Bind Total pure NGS (Omega-BioTex). Los amplicones tratados con NEBNext Ultra II End Repair / dA-tailing Module (NEB) fueron etiquetados mediante ligación con Quick-T4 Ligase (NEB) y con los índices contenidos en el PCR Barcoding Expansion 2-12 (Illumina). A partir de una mezcla equimolar de amplicones obtenidos para cada uno de los 12 sitios de muestreo se elabora una biblioteca con el protocolo de Ligation Sequencing (ONT). La biblioteca fue cargada en una célula de flujo en un MinION y mantenido el run hasta obtener en torno a 1.2 M de lecturas.

El basecalling se llevó a cabo con dorado v0.3.2 y duplex-tools v0.3.3 y el de-multiplexado con Guppy. Finalmente, para el trimming se usó porechop 0.2.4.

El análisis metagenómico fue realizado a través de pipelines basadas en QIIME (Boyer et al., 2019). Como base de datos de referencia de secuencias 16S rRNA se usó Greengenes 2021.10.

La muestra destinada al análisis del microbioma no es ideal, pero justificable por las dificultades de muestreo de una especie en peligro de extinción y la imposibilidad de obtener muestras tisulares internas.

Las muestras para el análisis del microbioma deben ser de muestras incruentas, en consecuencia, las posibilidades analíticas se limitan a las muestras de raspado del pie. La falta de muestreo, inicialmente considerados como probables, provenientes de tejidos de algún individuo inoperable, fruto de aspersiones reguladas de actividades de captura ilícitas ha limitado la tipología de este análisis al microbioma externo.

RESULTADOS

A pesar de las dificultades metodológicas, tras el filtrado y normalización de las lecturas brutas se obtuvieron entre 75.000 y 225.000 lecturas para cada sitio de muestreo (Figura 2.A). En cuanto a la calidad, las secuencias filtradas presentaron un QD-20 en su mayoría (Figura 2. B). Fueron definidas 3.420 secuencias consenso en el juego completo de muestras. A partir de ellas fue inferida la taxonomía para las secuencias con un match positivo en la base de datos Greengenes. Un porcentaje entre 1 y 3% se mantuvieron o no asignadas a ningún taxón bacteriano. Entre las familias más representadas se encuentran Fusobacteriaceae, Flavobacteriaceae, Rhodobacteriaceae, Vibrionaceae y Nostocaceae.

Existe diversidad en la frecuencia de diversos taxa en cada población muestreada, con especies recientemente caracterizadas en elevada frecuencia. La presencia de un Gram negativo, anaerobio estricto, *Psychrobacter atlanticus*, destaca en las muestras de PT (72%), PP (33%) y CCA (27%). El aerobio estricto, *Spargovirga citrea*, se recuperó en alta frecuencia en todas las muestras, destacando su frecuencia en PI (40%), CN (32%) y CC (13%). El también aerobio estricto *Litorea bacterius*, y otras especies del género, presentaron elevados porcentajes, especialmente en (48%). Es también destacable la presencia del enigmático clado SAR324 que llega a representar el 20% de los taxa recuperados en la muestra JG (Figura 3).

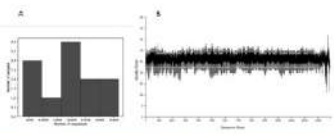


Figura 2. Número de secuencias obtenidas para las 12 muestras de raspado de pie de musculo de las costas de las penínsulas de Jandia (encontradas) y zona de muestreo no invasiva de la zona de la Playa de la Turbia (no invasiva).

No se observó una obvia distribución diferencial del patrón de perfil taxonómico bacteriano a lo largo de los puntos de muestreo (Figura 4), aunque sí se mantienen perfiles y taxa comunes. Los análisis de la diversidad alfa de Faith (test de Kruskal-Wallis, H=4.54; P=0.18), no detecta diferencias significativas cuando son considerados 4 grupos (NE, S, W, NW) definidos en función de las costas de Fuerteventura donde se localizaron los sitios de muestreo, y en torno a la península de Jandia (Figura 4).

Los análisis de diversidad beta basados en las distancias de Jaccard y UniFrac, no mostraron un agrupamiento de las localidades asociadas a cada costa y en función de las diferencias en su diversidad taxonómica. No obstante, sí se aprecia una similitud entre aquellas muestras muy cercanas, tales como las 2 muestras (norte y sur) de la Playa de la Turbia (Figura 5). El estudio metagenómico del microbioma de muestras no-invasivas del pie de la lapa majoreña, ha permitido caracterizar la diversidad del microbioma de este específico hábitat. La diversidad taxonómica es similar para todas las muestras y no se ha observado una asociación entre la diversidad y la localización geográfica de dichas muestras. Se han detectado tanto taxa asociados al organismo como taxa asociados al ambiente abiótico marino. La metodología ha mostrado su eficiencia para la realización de monitorización y vigilancia detectando la presencia de un posible patógeno, cuya interacción con *Patella caudei* debe ser evaluada.

CONCLUSIONES

- Las muestras aquí analizadas pueden ser consideradas muestras ambientales, contienen tanto taxa asociados al medio, como al hábitat de la epidermis y mucus del pie de la lapa majoreña.
- La asociación de una significativa relación entre la diversidad y abundancia taxonómica y las áreas costeras de muestreo puede deberse a esta combinación de la naturalidad de los taxa.
- La metodología ha demostrado su eficiencia, rapidez y bajo costo, siendo implementable en el control rutinario del microbioma externo de la lapa, sin sacrificio.
- En cuanto a la posible patogenicidad de taxa, se ha detectado la presencia de *Vibrio cholerae* en todas las muestras, destacando su recuperación de la muestra PP (12%) y PT (5%). Este taxa ha sido identificado como agente causal de enfermedades desmenuadas en virus y sus larvas, ostras y mejillones (Urtubia et al., 2023; Teng et al., 2012; Liang et al., 2019; Déjeant et al., 2021). Esta detección debe ser estudiada en detalle para evaluar la relación de este taxa con *Patella caudei*.

REFERENCIAS

BOYER, C. et al. (2019). Reproducible, sensitive and scalable microbiome data science using QIIME 2. *Nature Microbiology*, 20, 802-807.

DEJEANT, L., MORA, E., MARQUÉ, C. & TRINICELLI, A. (2021). A modular workflow for the analysis of metagenomic data. *Genome Biology*, 22, 1-12.

QUINTERO, J., GONZÁLEZ-L, G., HERNÁNDEZ-R, D., QUINTERO, L., HERNÁNDEZ-R, R., MARTÍNEZ-B, J., GONZÁLEZ, J., ROY M, M. & GONZÁLEZ-H, N. (2022). Genomic characterization of a novel bacterial species of the genus *Psychrobacter* from the lapa majoreña. *Microorganisms*, 10, 2000.

QUINTERO, J., GONZÁLEZ-L, G., HERNÁNDEZ-R, D., QUINTERO, L., HERNÁNDEZ-R, R., MARTÍNEZ-B, J., GONZÁLEZ, J., ROY M, M. & GONZÁLEZ-H, N. (2022). Genomic characterization of a novel bacterial species of the genus *Psychrobacter* from the lapa majoreña. *Microorganisms*, 10, 2000.

TRINICELLI, A., CHANDLER, A., HERNÁNDEZ-R, D., QUINTERO, L., HERNÁNDEZ-R, R., MARTÍNEZ-B, J., GONZÁLEZ, J., ROY M, M. & GONZÁLEZ-H, N. (2022). Genomic characterization of a novel bacterial species of the genus *Psychrobacter* from the lapa majoreña. *Microorganisms*, 10, 2000.

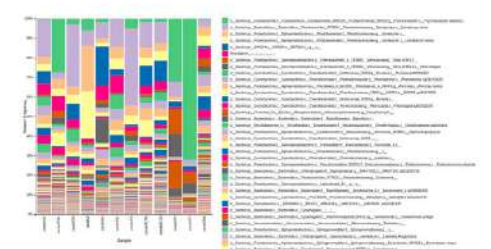


Figura 3. Perfiles de abundancia taxonómica al mayor nivel de resolución posible de especie, para las 12 muestras analizadas de las costas del pie de *Patella caudei* en Fuerteventura.

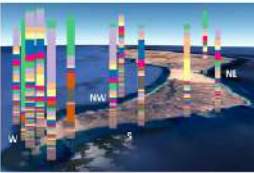


Figura 4. Distribución de los perfiles taxonómicos y la longitud de muestreo.

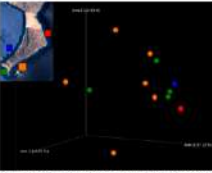


Figura 5. Gráfico basado en distancia no balanceado UniFrac, mostrando las relaciones entre las muestras considerando la diversidad taxonómica de su microbioma.