

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA
INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL
Y SEGURIDAD ALIMENTARIA



PROGRAMA DE DOCTORADO EN SANIDAD ANIMAL
Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

NUEVOS ASPECTOS EN LA BIOLOGÍA DE
PHOTOBACTERIUM DAMSELA* SUBSP. *PISCICIDA
Y SU INFLUENCIA EN LA RELACIÓN HUESPED-
HOSPEDADOR CON LA DORADA (*SPARUS AURATA*)

Belinda Vidina Vega Gutiérrez

TESIS DOCTORAL
Julio 2017

UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN CANARIA

INSTITUTO UNIVERSITARIO DE SANIDAD ANIMAL
Y SEGURIDAD ALIMENTARIA



PROGRAMA DE DOCTORADO EN SANIDAD ANIMAL
Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS ASPECTOS EN LA BIOLOGÍA DE
PHOTOBACTERIUM DAMSELA SUBSP. *PISCICIDA*
Y SU INFLUENCIA EN LA RELACIÓN HUESPED-
HOSPEDADOR CON LA DORADA (*SPARUS AURATA*)**

Belinda Vidina Vega Gutiérrez

Directores:

Dr. Félix Acosta Arbelo

Dr. José Ramos Vivas

Julio 2017

Las Palmas de Gran Canaria

El trabajo realizado ha sido posible gracias a una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

A mis padres y mi hermana

Y en recuerdo de mis abuelos y mi guaryn

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	I
ABREVIATURAS.....	IX
RESUMEN/SUMMARY.....	Pág.1
INTRODUCCIÓN.....	Pág.4
1. La acuicultura.....	Pág.5
1.1. Situación actual e importancia.....	Pág.5
1.2. Principales especies de cultivo.....	Pág.10
1.3. Enfermedades.....	Pág.11
2. Fotobacteriosis.....	Pág.13
2.1. Etiología, epidemiología, patología, diagnóstico y control	Pág.13
2.2. Factores de virulencia.....	Pág.28
3. Fimbrias.....	Pág.32
3.1. Tipos, función, estructura y biogénesis.....	Pág.32
3.2. Fimbrias tipo IV.....	Pág.38
3.3. Twitching motility.....	Pág.43
OBJETIVOS.....	Pág.46
MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pág.49
1. Determinación de la presencia de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pág.50
1.1. Cepas bacterianas.....	Pág.50
1.2. Hemaglutinación (HA).....	Pág.52
1.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	Pág.52
1.4. Inmunofluorescencia indirecta (IFI).....	Pág.52
1.5. Ensayos de motilidad bacteriana.....	Pág.53
1.6. Formación de biocapas.....	Pág.54

1.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	Pág.55
1.8. Microscopía láser confocal de barrido (MLC).....	Pág.55
2. Establecimiento de las condiciones adecuadas para el desarrollo de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en <i>Photobacterium</i> <i>damselae</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pág.56
2.1. Cepas bacterianas.....	Pág.57
2.2. Ensayos de motilidad bacteriana.....	Pág.57
2.2.1. Temperatura de incubación.....	Pág.57
2.2.2. pH.....	Pág.58
2.2.3. Concentración de nutrientes.....	Pág.58
2.2.4. Salinidad del medio.....	Pág.58
2.2.5. Concentración de agar.....	Pág.58
2.2.6. Textura del sustrato.....	Pág.58
2.2.7. Presencia de restos celulares en el medio.....	Pág.58
2.3. Análisis estadístico.....	Pág.59
3. Estudio <i>in vitro</i> de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la capacidad de adherencia e invasión de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en línea celular SAF-1.	Pág.59
3.1. Cepas bacterianas y línea celular.....	Pág.60
3.2. Experimentos de adherencia e invasión.....	Pág.61
3.3. Experimento de adherencia e invasión con cepas piliadas de <i>Phdp</i>	Pág.62
3.4. Inmunofluorescencia indirecta.....	Pág.62
3.5. Análisis estadístico.....	Pág.63
4. Estudio <i>in vitro</i> de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la modulación de la respuesta inmunitaria en dorada.....	Pág.63
4.1. Cepas bacterianas.....	Pág.63

4.2. Extracción de leucocitos de riñón anterior de dorada.....	Pág.64
4.3. Infección <i>in vitro</i>	Pág.66
4.4. PCR cuantitativa.....	Pág.66
4.5. Estudio de la explosión respiratoria.....	Pág.68
4.6. Contenido en peroxidasa celular.....	Pág.69
4.7. Análisis estadístico.....	Pág.69
RESULTADOS.....	Pág.71
1. Determinación de la presencia de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pág.72
1.1. Hemaglutinación.....	Pág.72
1.2. MET, MEB e inmunofluorescencia.....	Pág.72
1.3. Motilidad bacteriana.....	Pág.74
1.4. Formación de biocapas.....	Pág.76
2. Establecimiento de las condiciones adecuadas para el desarrollo de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pág.79
2.1. Temperatura de incubación.....	Pág.79
2.2. pH.....	Pág.80
2.3. Concentración de nutrientes.....	Pág.81
2.4. Salinidad del medio.....	Pág.81
2.5. Concentración de agar.....	Pág.82
2.6. Textura del sustrato.....	Pág.83
2.7. Presencia de restos celulares en el medio.....	Pág.83
2.8. Medio “twitching”.....	Pág.84

3. Estudio <i>in vitro</i> de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la capacidad de adherencia e invasión de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en línea celular SAF-1.....	Pág.85
3.1. Adherencia e invasión bacteriana.....	Pág.85
3.2. Adherencia e invasión de cepa piliada.....	Pág.87
4. Estudio <i>in vitro</i> de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la modulación de la respuesta inmunitaria en dorada.....	Pág.90
4.1. Expresión génica de citoquinas y proteínas Mx y Casp-3.....	Pág.90
4.2. Explosión respiratoria y contenido en peroxidasa.....	Pág.95
DISCUSIÓN.....	Pág.97
1. Determinación de la presencia de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad y a la formación de biocapas en <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pág.98
2. Establecimiento de las condiciones adecuadas para el desarrollo de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pág.100
3. Estudio <i>in vitro</i> de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la capacidad de adherencia e invasión de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en línea celular SAF-1.....	Pág.103
4. Estudio <i>in vitro</i> de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la modulación de la respuesta inmunitaria en dorada.....	Pág.105
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	Pág.110
BIBLIOGRAFÍA.....	Pág.115
ANEXO: ARTÍCULOS.....	Pág.163
AGRADECIMIENTOS.....	Pág.180

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1.- Evolución de la producción acuícola y pesquera regional mundial.....	Pág.7
TABLA 2.- Características bioquímicas de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pág.19
TABLA 3.- Métodos de diagnóstico de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Pág.25
TABLA 4.-Tipos de fimbrias en bacterias gram-negativas y gram-positivas.....	Pág.33
TABLA 5.- Nomenclatura de los componentes de fimbriación en bacterias gram-negativas y gram-positivas. Modificado del artículo de Melville y Craig (2013).....	Pág.39
TABLA 6.- Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.....	Pág.51
TABLA 7.- Cebadores utilizados en el análisis por qPCR.....	Pág.67
TABLA 8.- Tasa de adherencia y eficiencia de la invasión de las distintas cepas de <i>Phdp</i> estudiadas.....	Pág.86

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.- Evolución de la producción acuícola mundial de animales y plantas acuáticos (FAO, 2016).....	Pág.5
FIGURA 2.- Número de instalaciones de acuicultura en España en 2014, clasificados por localización y tipo de agua (MAGRAMA /APROMAR, 2016). A la izquierda, se relaciona un esquema de los distintos sistemas de cultivo existentes en España.....	Pág.8
FIGURA 3.- Contribución relativa de la acuicultura y la pesca de captura al pescado para consumo humano.....	Pág.9
FIGURA 4.- Posición filogenética de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> . Sacado del artículo de Gauthier <i>et al.</i> , 1995.....	Pág.17
FIGURA 5.- Cultivo en BHIA suplementado con 1,5% NaCl (a) y tinción Gram (b) de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>Piscicida</i>	Pág.18
FIGURA 6.- Modelo esquemático de la biosíntesis de pili tipo I por la vía de la chaperona. Esquema sacado del artículo de Nishiyama <i>et al.</i> (2005).....	Pág.34
FIGURA 7.- Modelo de nucleación extracelular en la formación de curli. Esquema modificado sacado del artículo Lo <i>et al.</i> (2013).....	Pág.34
FIGURA 8.- Esquema de la biogénesis de fimbrias mediada por sortasas, característica de bacterias gram-positivas. Extraído del artículo de Danne y Dramsi (2012).....	Pág.37
FIGURA 9.- Modelo esquemático de los sistemas de biogénesis de pili tipo IV y de secreción tipo II. Obtenido del artículo de Melville y Craig (2013).....	Pág.40
FIGURA 10.- Mapa genético del grupo de genes <i>pil</i> de <i>Myxococcus xanthus</i> . El nombre de los genes son los homólogos en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , excepto <i>pilG</i> , <i>pilH</i> y <i>pilI</i> , que sólo están presentes en <i>M. xanthus</i> . Imagen modificada a partir del artículo de Wall y Kaiser (1999).....	Pág.40
FIGURA 11.- Modelo de motilidad por fimbrias tipo IV para <i>Neisseria</i>	

<i>gonorrhoeae</i> (Nature reviews/ Microbiology).....	Pág.44
FIGURA 12.- Esquema de los ensayos realizados en la primera fase del estudio.....	Pág.50
FIGURA 13.- Imagen de electroforesis en gel de agarosa (2%) teñido con midori green después de una PCR para identificación de <i>Phdp</i> . Banda esperada de 267 pb (flecha). M: marcador de peso molecular 50-2000 pb (Biorad); C-: blanco; 1-4: cepas de <i>Phdp</i> : C2, 94/99, DI21 y PP3; 5: <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i> CECT 5061 (bandas a 267 y 448 pb).....	Pág.51
FIGURA 14.- Esquema del ensayo de motilidad bacteriana en distintas condiciones de cultivo.....	Pág.56
FIGURA 15.- Esquema de las fases 3 y 4 de este estudio.....	Pág.59
FIGURA 16.- Línea celular SAF-1.....	Pág.60
FIGURA 17.- Colonias de <i>Phdp</i> obtenidas tras la lisis de los cultivos celulares para el recuento de bacterias totales e internas tras las infecciones de una infección <i>in vitro</i> con <i>Phdp</i> de un cultivo celular de SAF-1.....	Pág.61
FIGURA 18.- Dibujo esquemático de un gradiente de Ficoll con Lymphoprep™ para el aislamiento de macrófagos.....	Pág.65
FIGURA 19.- Cultivo de macrófagos de riñón anterior de dorada.....	Pág.65
FIGURA 20.- Esquema de la reacción de reducción del NBT.....	Pág.68
FIGURA 21.- Esquema de la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno celular por acción de las enzimas peroxidasa y catalasa.....	Pág.70
FIGURA 22.- Aglutinación de eritrocitos humanos. A: <i>Acinetobacter</i> (control positivo); B: cepa de <i>Phdp</i> que no producía HA; C: cepa DI-21, que produce hemaglutinación.....	Pág.72

FIGURA 23.- Presencia de pili en cepas de <i>Phdp</i> . A-B: microfotografías de MEB de cepas 94/99 y DI-21, respectivamente; C-F: microfotografías de MET de cepas ATCC 17911 y DI-21, respectivamente (cabezas de flecha: pili en C y pili cortos en F; flecha: pilus largo polar en F); D-E: imagen aumentada del área señalada por la flecha en C; G-H: Imágenes de inmunofluorescencia de cepas 94/99 y C2, respectivamente. Aumentos: A-C: ×5000; D: ×12000; E: ×80000; G-H: ×400. Escala: A-B: 1 μm; C: 2 μm; D: 250 nm; F: 10μm.....	Pág.73
FIGURA 24.- Ensayos de motilidad de <i>Phdp</i> en medio BHIA con 0,3% glucosa, después de 48 h de incubación a 25°C. Cepas: 94/99 (A), C2 (B) y PP3 (C). Línea discontinua naranja: expansión de la bacteria en superficie del agar; línea de puntos roja: zonas de twitching.....	Pág.74
FIGURA 25.- Ensayos de motilidad de <i>Phdp</i> (cepa C2) en medio BHI con 0,2% (A) y 0,3% (B) de agarosa, y posterior tinción con CV (0,7%) (C: 0,2% agarosa; D: 0,3% agarosa).....	Pág.75
FIGURA 26.- Bacterias adheridas tras la motilidad de <i>Phdp</i> , teñidas con CV (0,7%). Adjunto: detalles del borde liso de cepa C2 (D) y rizoide de cepa 94/99 (E).....	Pág.75
FIGURA 27.- Formación de biocapa de las distintas cepas de <i>Phdp</i> a lo largo del tiempo. Cada barra indica los valores medios con las desviaciones estándar. De negro a blanco, cepas: 94/99, C2, PP3, ATCC 17911 y DI-21.....	Pág.76
FIGURA 28.- Formación de biocapa de <i>Phdp</i> después de 6 días en presencia y ausencia de glucosa, teñido con CV.....	Pág.77
FIGURA 29.- Imágenes por MLC de biocapas –no fijadas- de 6 días (A-D y F). A-D: teñidas con LIVE/DEAD (verde: bacterias vivas; rojo: muertas). Cepas de <i>Phdp</i> : 94/99 (A), PP3 (B), ATCC 17911 (C) y DI-21 (D). F: teñidas con FilmTracer™	

SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (cepa 94/99) (puntos púrpuras: componentes proteínicos de una supuesta matriz extracelular; puntos azules: bacteria). E: Máxima intensidad de proyección de una biocapa de 4 días de la cepa 94/99, expuesto a Ac anti-*Phdp* y preparado como para estudios estándar de inmunofluorescencia. Aumentos: A-D y F: 200x; E: 400x. Escala: 20 µm..... **Pág.78**

FIGURA 30.- Efecto de la temperatura en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h;letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo días de incubación)..... **Pág.79**

FIGURA 31.- Efecto del pH en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letrasmayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo días de incubación)..... **Pág.80**

FIGURA 32.- Efecto de la disponibilidad de nutrientes en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números:compara en cada grupo días de incubación)... **Pág.81**

FIGURA 33.- Efecto de la salinidad del medio en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo días de incubación)..... **Pág.82**

FIGURA 34.- Efecto de la concentración de agarosa del medio en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas:

compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo días de incubación).....	Pág.83
FIGURA 35.- Efecto de la textura de la placa en la motilidad de distintas cepas de <i>Phdp</i> . *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números:compara en cada grupo días de incubación).....	Pág.84
FIGURA 36.- Efecto de la presencia de restos celulares en el medio en la motilidad de distintas cepas de <i>Phdp</i> . *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo días de incubación).....	Pág.84
FIGURA 37.- Adherencia e invasión de distintas cepas de <i>Phdp</i> en línea celular SAF-1 tras una infección <i>in vitro</i>	Pág.86
FIGURA 38.- Motilidad de <i>Phdp</i> (cepa PP3) en medio “twitching” después de 3 días de incubación a 25°C en oscuridad.....	Pág.87
FIGURA 39.- Efecto de la motilidad y presencia de fimbrias en la adherencia e internalización de <i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> en células SAF-1. PP3S: cepa PP3 cultivada en condiciones normales; PP3T: cepa PP3 inoculada previamente a la infección <i>in vitro</i> en medio “twitching”. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$)...	Pág.88
FIGURA 40.- Proporción de bacterias adheridas a células SAF-1 tras la infección <i>in vitro</i> con PP3S y PP3T, contadas en las preparaciones para inmunofluorescencia.....	Pág.88
FIGURA 41.- Imágenes de inmunofluorescencia de cultivos de células SAF-1 infectados con <i>Phdp</i> (cepa PP3) durante 90 minutos. A: bacterias teñidas con el Ac 2º Alexa 594 (rojo), núcleos de células SAF-1 teñidos con DAPI (azul) y fibras de actina del soma de la célula con Alexa Fluor® 488 Phalloidin	

(verde). B-F: bacterias teñidas con el Ac 2^o Alexa 488 anti-conejo (verde) y núcleos celulares con DAPI (azul). B: Imagen montada sobre otra de los cuerpos celulares obtenida por contraste de fase. Las flechas amarillas señalan pili (en A aparece fragmentado). E-F: Proporción aproximada de bacterias adheridas a las células tras la infección con PP3S (E) y con PP3T (F)..... **Pág.89**

FIGURA 42.- Expresión génica de Mx en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **Pág.90**

FIGURA 43.- Expresión génica de IL-1 β en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **Pág.91**

FIGURA 44.- Expresión génica de IL-1r2 en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) **Pág.92**

FIGURA 45.- Expresión génica de IL-6 en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **Pág.92**

- FIGURA 46.- Expresión génica de IL-10 en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). **Pág.93**
- FIGURA 47.- Expresión génica de TNF- α en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)... **Pág.94**
- FIGURA 48.- Expresión génica de Casp-3 en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$)... **Pág.95**
- FIGURA 49.- Explosión respiratoria (A) y contenido en peroxidasa (B) de los cultivos de macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con *Phdp* con (PP3T; barra gris) y sin fimbrias (PP3S; barra negra). Los resultados están expresados como índice de estimulación, obtenidos de dividir cada valor de la muestra entre la media de su control..... **Pág.96**

ABREVIATURAS

~	aproximadamente
≈	similar
∅	diámetro
%	porcentaje
× <i>g</i>	fuerza de gravedad
€/ M€	euros /millones de euros
°C	grados Celsius
Ac	Anticuerpo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
AIP	Factor inductor de apoptosis
ANOVA	Análisis de la varianza
API (20E)	Índice analítico de perfil (para enterobacterias)
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr (16S)	ARN ribosómico subunidad 16S
AS	Agar sangre
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo
BFP	Pili formando grupos
BHIA	Agar infusión cerebro corazón
BHIB	Caldo infusión cerebro corazón
BSA	Albúmina sérica bovina
Ca	Calcio
Casp	Caspasa

CCO	Ovario del bagre de Canal (línea celular)
CD	Cúmulo de diferenciación
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CHSE-214	Embrión de salmón real (línea celular)
cm/cm³	centímetros/ centímetros cúbicos
Co	Cobalto
comb. nov.	Nueva combinación
Ct	Valores de umbral de ciclo
CTAB	Cetiltrimetilamonio bromuro
Cu	Cobre
CV	Cristal violeta
D	días
DAPI	4 ',6-diamino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Superóxido dimetilsulfóxido
DL₅₀	Dosis letal
DO	Densidad óptica
e⁻	electrones
ECP	Producto extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEUU	Estados Unidos
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima
EPC	Epitelioma papuloso de carpa (línea celular)
<i>et al.</i>	y colaboradores
FAME	Perfil de ácidos grasos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FD	Factor de dilución
Fe	Hierro
FHM	Piscardo (lineacelular)

FN075	ring-fused 2-pyridone
FREE	sin/ libre de
g	gramos
GM	Monosialogangliósido
h	horas
H⁺	Ión hidrógeno
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂SO₄	Ácido sulfúrico
HA	Hemaglutinación
HBS	Híbrido de lubina (<i>Morone saxatilis</i> x <i>Morone chrysops</i>)
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
HK	Riñón anterior
HPR	Región altamente polimórfica
HPR0	Gen HPR de longitud total
IL	Interleuquina
IL-1r2	Receptor 2 de interleuquina-1
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN	Interferón
Kb	kilobase
KDa	kiloDaltons
Kg	kilogramos
KHCO₃	Hidrogenocarbonato de potasio
KOH	Hidróxido potásico
kV	kilovoltios
L	litros
L.	Linnaeus
LPS	Lipopolisacáridos
M	Molar

MAGRAMA	Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
MCP	Proteína quimiotáctica de monocitos
MEB	Microscopía electrónica de barrido
MET	Microscopía electrónica de transmisión
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
MLC	Microscopía láser confocal de barrido
mm	milímetros
mM	milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
MRHA	Hemaglutinación resistente a la manosa
MSCRAMMs	Componentes de la superficie microbiana reconocedoras de las moléculas de la matriz adherente
MSHA	Hemaglutinación sensible a la manosa
NaCl	Cloruro sódico
NaDP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaDPH	Forma reducida de NaDP
NBT	Nitroazul de tetrazolio
NC	Nombre comercial
ng	nanogramos
NH₄Cl	Cloruro de amonio
nm	nanómetros
μ-/μg/μl/μm	micro-/microgramos/microlitros/micrómetros
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
O₂	Oxígeno molecular
O₂⁻	Anión superóxido
p (p-valor)	nivel de significancia

p./pp.	Página/s
PAMPs	Patrón molecular asociado a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PFA	Paraformaldehído
<i>Phdp</i>	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>
pi	post-infección
plásmidos-R	Plásmidos de resistencia
PMA	Acetato de forbol miristato
pN	piconewton
PP3S	Cepa PP3 sin fimbrias
PP3T	Cepa PP3 con fimbrias
ppm	partes por millón
p/v	masa/volumen
qPCR	PCR cuantitativa
QTL	Locus de un carácter cuantitativo
®	Registrado
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
ROS	Especies de oxígeno reactivas
RTM	Mesotelioma de trucha arcoiris
SAF-1	Fibroblastos de dorada (línea celular)
Se	Selenio
SE	Error estándar
FBS	Suero fetal bovino
SBL	Larvas de lubina estriada
SOD	Superóxido dismutasa
<i>spp./ subsp.</i>	Especies/Subspecies
SPSS	Producto estadístico y soluciones de servicio

SSTII	Sistema de secreción tipo 2
T	Toneladas
T^a	Temperatura
T_a	Temperatura ambiente
TAD	Pili de fuerte adherencia
T4P	Pili tipo IV
TCP	Pili corregulado por toxina
TCBS	Agar tiosulfato citrato bilis sacarosa
™	Marca registrada
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina hidrociorhídrica
TNF	Factor de necrosis tumoral
TSA	Agar soja triptosa
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
UI	Unidad Internacional
UPEC	<i>Eschericchia coli</i> uropatógena

RESUMEN/SUMMARY



RESUMEN

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*) pertenece a la familia *Vibrionaceae*; es una bacteria pleomórfica, gram-negativa, inmóvil, causante de la fotobacteriosis. De gran importancia en la acuicultura marina mundial, y en Canarias, afecta a una amplia variedad de especies de peces de importancia económica y puede ser responsable de una elevada mortalidad (90-100%) en larvas y juveniles, fundamentalmente en los meses de verano, cuando la temperatura del agua supera los 18-20°C. La dorada (*Sparus aurata*), una de las especies con mayor producción en Europa y España, también es una de las especies más susceptibles a esta enfermedad. Por esta razón, se necesitan estudios que proporcionen una mayor comprensión de los mecanismos de patogénesis de este agente, con el objetivo de establecer métodos de control eficaces. El análisis por inmunofluorescencia, microscopía electrónica de transmisión (MET) y de barrido (MEB) reveló la presencia de fimbrias en la superficie de cepas de *Phdp*. Esto supone un nuevo hallazgo para el estudio de su biología y abre nuevas áreas de investigación. Estas estructuras filamentosas son un factor de virulencia en muchas bacterias. En *Phdp* ejercen un papel importante en la adherencia a superficies inertes y vivas, en la formación de biocapas y, además, le confiere la capacidad de moverse sobre superficies sólidas mediante un movimiento conocido como twitching, similar al modulado por pili de tipo IV, e independiente de flagelos. Hemos estudiado su influencia en las etapas iniciales de la infección en células no fagocíticas de dorada y la respuesta inmunológica celular inespecífica del hospedador *in vitro*. La expresión de fimbrias incrementa la adherencia y la eficiencia de la invasión de *Phdp* en células SAF-1. Por otro lado, la cinética de inducción de citoquinas en macrófagos de dorada y la resistencia del patógeno a la explosión respiratoria fue similar con y sin fimbrias. Si bien, la proteína Mx fue inducida únicamente por la cepa piliada. Futuros estudios *in vivo* podrán esclarecer en mayor medida la relevancia de estos hallazgos en la interacción de *Phdp* con el hospedador, y la posible aplicación de estas estructuras en formulaciones vacunales o como diana terapéutica.

SUMMARY

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*) belongs to the family *Vibrionaceae*, it is a non-motile, pleomorphic, Gram-negative bacterium, and the causative agent of photobacteriosis, a serious disease affecting a wide variety of economically important marine fish species in global aquaculture, and in the Canary Islands. Outbreaks of photobacteriosis with high mortality (90-100%) in larvae and juveniles may occur mainly during the summer months, when water temperature is above 18-20°C. Gilthead seabream (*Sparus aurata*) is one of the most productive fish species in Europe and Spain, and very susceptible to infections by *Phdp* as well. For that reason, studies are necessary for a better understanding of the mechanisms of pathogenesis of this agent in order to apply effective control methods. The presence of pilus-like structures on the surface of *Phdp* was revealed by immunofluorescence, transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). This new aspect for the study of the biology of the pathogen opens up new research fields. These filamentous structures are a virulence factor in many bacteria. Pili in *Phdp* play an important role in the adhesion to inert and living surfaces, in biofilm formation, and in twitching motility (a flagella-independent motion), giving the bacterium the ability to move on solid surfaces. We studied *in vitro* the influence of these appendages on the initial stages of infection by *Phdp* in non-phagocytic cells and the non-specific cellular immune response of the host. Fimbriae increase greatly the adherence and the efficiency of invasion of *Phdp* in cell line SAF-1. The kinetics of induction of cytokines in seabream macrophages and the pathogen resistance to respiratory burst within seabream macrophages were similar in both piliated and non-piliated strains, while Mx protein was induced only by piliated strain. Future *in vivo* studies will further elucidate the effect of these fimbriae in the interaction pathogen-host and thus, the possible application of the same in vaccine formulations or as a therapeutic target.

INTRODUCCIÓN



INTRODUCCIÓN

1. La acuicultura

1.1. Situación actual e importancia

El cultivo de organismos acuáticos –peces, moluscos, crustáceos y plantas- es uno de los sectores productivos de alimentos que más ha crecido en los últimos años en todo el mundo, a un ritmo anual medio del 5,8% desde el año 2005. En 2015, se alcanzaron cifras de producción mundial de 106 millones de toneladas, de las cuales 76,7 millones correspondieron a animales; superando a la pesca de captura en suministro de pescado para consumo humano desde 2014 y en producción total desde 2013 (FAO, 2017).

La [figura 1](#), muestra un gráfico extraído del informe de la FAO de 2016 sobre el estado mundial de la pesca y la acuicultura, en el que se muestra la evolución de la producción mundial acuícola desde 1995 a 2014, esto da una idea del rápido desarrollo que este sector ha experimentado a lo largo de estos años.

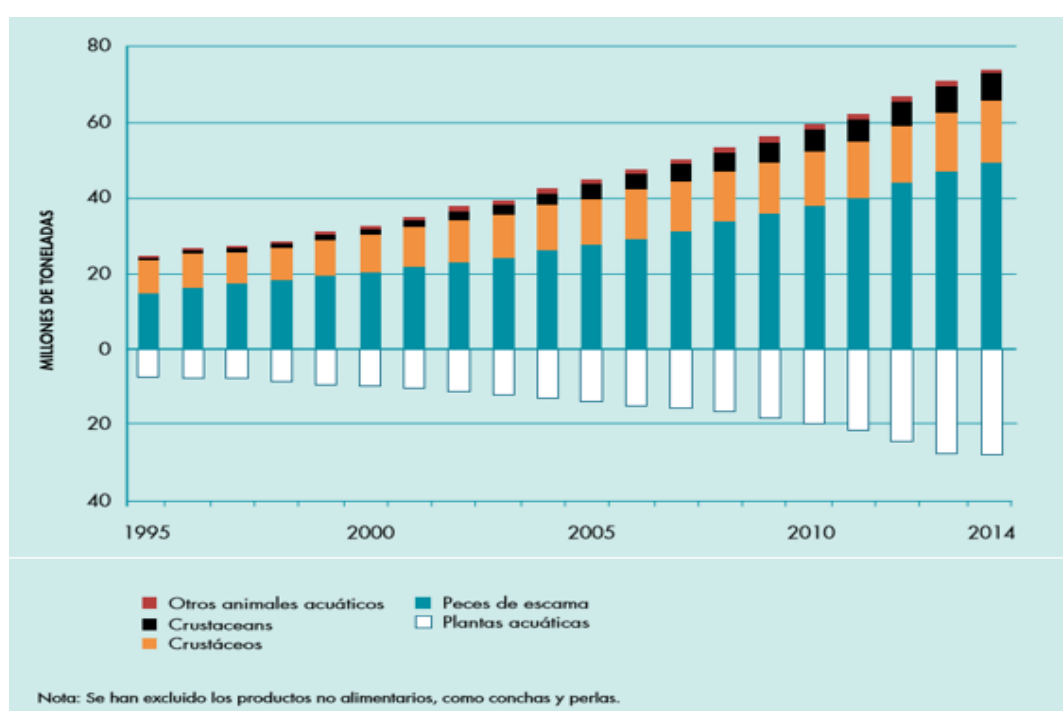


Figura 1.- Evolución de la producción acuícola mundial de animales y plantas acuáticos (FAO, 2016).

Estos volúmenes de producción tuvieron un valor de primera venta de 152.405,87 millones de euros (M€), de los que 4.531,53 M€ corresponden al obtenido de las plantas acuáticas, lo que significa que éstas contribuyen en aproximadamente un 3% al valor total, siendo el cultivo de algas una cuarta parte (29,4 millones de toneladas) del volumen total producido por esta actividad (FAO, 2017).

Las cifras de crecimiento multiplican el propio ritmo de crecimiento demográfico (1,6% en las últimas cinco décadas) lo que hace confiar en la consecución de uno de los compromisos recogidos en la Agenda 2030 para el Desarrollo Sostenible, aprobada en septiembre de 2015 por los Estados miembros de las Naciones Unidas, a pesar del gran reto que supone alimentar a una población mundial que se prevé alcance los 9.600 millones de personas en 2050 (APROMAR, 2016), especialmente en circunstancias de incertidumbre económica, financiera y social, estancamiento de la pesca de captura, problemas medioambientales como el cambio climático y el aumento de la competencia por los recursos naturales (FAO, 2016), y donde, aún hoy, más de 800 millones de personas sufren por desnutrición crónica (APROMAR, 2016).

El 92% de la producción mundial de peces se concentra en el continente asiático. Un solo país, China, produce el 63% del volumen total, seguido de Indonesia (16%), donde se concentra un gran número de plantas acuáticas. Europa contribuyó en cerca de un 3% a la producción mundial acuícola (FAO, 2017). España ocupaba el puesto 22 en la acuicultura mundial en 2014 (FAO, 2016). Actualmente, es el segundo país productor en Europa detrás de Noruega y el primero de la Unión Europea, con una producción en 2015 de 289.821 toneladas, cuyo valor de primera venta fue de 475,8 millones de euros (FAO, 2017).

La [tabla 1](#) recoge las producciones acuícolas y pesqueras mundiales, en Europa, España, Canarias y Gran Canaria en los últimos años. En 2015, en las Islas Canarias, los volúmenes de producción procedentes de la acuicultura fueron de 7,64 miles de toneladas (34 M€ en primera venta), y de la pesca, 11,93 miles de toneladas (25,4 M€). Y en Gran Canaria, se obtuvieron 2,4 miles de toneladas (14,9 M€) y 2,63 miles de toneladas (5,4 M€) de la acuicultura y pesca, respectivamente (datos publicados por el Gobierno de Canarias).

Tabla 1.-Evolución de la producción acuícola y pesquera regional y mundial.

	Año	Acuicultura	Pesca	Total
Mundo^a	2004	54, 6 MT	94 MT	148,6 MT
	2010	78 MT	89,1 MT	167,1 MT
	2014	101,1 MT	92,4 MT	194, 5 MT
	2015	106 MT	93,7 MT	199,7 MT
Europa^a	2004	2,2 MT	14,2 MT	16,4 MT
	2010	2,5 MT	14,1 MT	16,6 MT
	2014	2,93 MT	14 MT	17 MT
	2015	2,97 MT	14,4 MT	17,4 MT
España^a	2004	293.839 T	811.739 T	1,1 MT
	2010	252.352 T	975.300 T	1,2 MT
	2014	282.242 T	1,1 MT	1,4 MT
	2015	289.821 T	975.632 T	1,3 MT
Canarias^b	2006	4.364, 86 T	7.625,28 T	11.990,14 T
	2010	5.698,76 T	11.758,22 T	17.456,98 T
	2014	6.379,11 T	14.690,37 T	20.533 T
	2015	7.648,34 T	11.928,41 T	19.576,75 T
Gran Canaria^b	2006	1.041,1 T	1.738,74 T	2.779,84 T
	2010	2.081 T	4.995,12 T	7.076,12 T
	2014	2.056,93 T	3.255,16 T	5.312,08 T
	2015	2.408,66 T	2.626,46 T	5.035,12 T

T: toneladas. MT: millones de toneladas.

Fuentes: FAO^a, Gobierno de Canarias^b.

A nivel mundial, predomina la acuicultura continental de peces, fundamentalmente en Asia, donde la producción de peces casi duplica a la de mar y costa, 45,5 MT frente a 23 MT, respectivamente. En África también se cultiva bastante más en aguas continentales. En cambio, en Europa, Oceanía y América, la acuicultura marina y costera registra mayores cifras de producción. Por lo tanto, el cultivo en plantas acuáticas se realiza prácticamente en su totalidad en Asia y en medio marino (FAO, 2017).

En España, están funcionando 5.119 instalaciones de acuicultura, 4.933 son de aguas marinas y 186 de agua dulce (Figura 2).

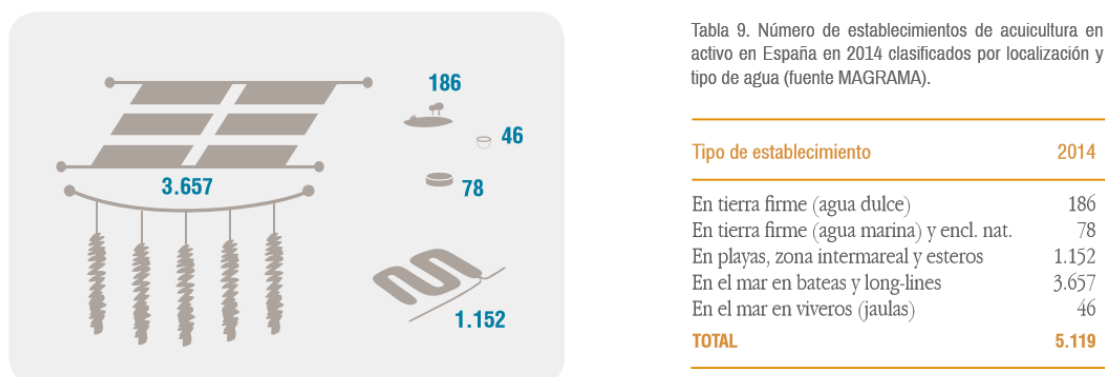


Figura 2.- Número de instalaciones de acuicultura en España en 2014, clasificadas por localización y tipo de agua (MAGRAMA/APROMAR, 2016). A la izquierda, se relaciona un esquema de los distintos sistemas de cultivo existentes en España.

La acuicultura existe hace más de 4000 años, pero sólo en los últimos 50 se ha convertido en una actividad socioeconómica relevante, proporcionando empleo a más de 16 millones de personas en el mundo (FAO, 2017). En Canarias, comenzó a desarrollarse en la década de los 80, pero se estableció como industria hacia finales de los años 90. El sistema de cultivo más utilizado para el engorde de peces son las jaulas marinas flotantes, aunque existe una empresa con instalación en tierra. Los alevines (5-15 g) son importados desde la Península Ibérica y otros países europeos y aquí se realiza la última fase del cultivo hasta salida a mercado. Una ventaja de la acuicultura en Canarias en comparación con el resto de Europa es que la calidad y la temperatura del agua (18-20°C) permiten que las especies puedan alcanzar la talla comercial en menos tiempo y, en consecuencia, las empresas pueden ofrecer sus productos durante todo el año.

La acuicultura juega y jugará un papel muy significativo en la atención de las necesidades de la población y la seguridad alimentaria, motivado entre otras razones, por el aumento en el consumo de pescado *per cápita* a nivel mundial (Figura 3), desde

unos 9,9 Kg en la década de 1960 hasta más de 20 kg de media en la actualidad. Y aunque las cifras de consumo en las regiones en desarrollo y los países de bajos ingresos y déficit de alimento siguen siendo inferiores a la de los países desarrollados, parece que esas diferencias se están reduciendo (FAO, 2016).

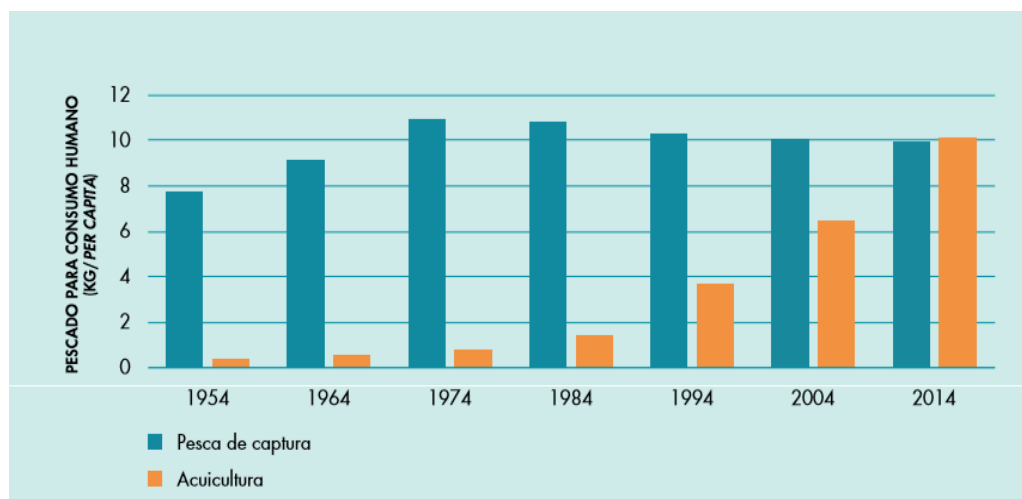


Figura 3.- Contribución relativa de la acuicultura y la pesca de captura al pescado para consumo humano.

Esto ha significado una mejora en la dieta de las personas, al incorporar productos variados y nutritivos. Así, el pescado es extraordinariamente nutritivo, fuente rica en proteínas de alta calidad y digestibilidad, que contiene todos los aminoácidos esenciales y una biodisponibilidad del 5-15%, mayor que la derivada de fuentes vegetales; la composición lipídica del pescado es excepcional, al comprender ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, como por ejemplo, ácidos grasos omega 3, que ofrecen múltiples efectos beneficiosos para la salud en la edad adulta (protección frente a cardiopatías coronarias) y para el desarrollo infantil, contribuyendo al desarrollo del cerebro y el sistema nervioso en fetos y niños. Es, además, una fuente importante de vitaminas (D, A y B), y de micronutrientes minerales (calcio, fósforo, yodo, zinc, hierro y selenio) (FAO, 2016; APROMAR, 2016).

1.2. Principales especies de cultivo

Actualmente, se cultivan unas 580 especies en el mundo: 362 peces de escama, 104 moluscos, 62 crustáceos, 6 ranas y reptiles, 9 invertebrados acuáticos y 37 plantas acuáticas (FAO, 2016).

Las especies de acuicultura más productivas en 2014 en Europa fueron el mejillón (*Mytilus spp.*) (493.192 T), la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (194.081 T), el salmón atlántico (*Salmo salar*) (175.090 T), la ostra japonesa (*Crassostrea gigas*) (86.371 T) y la dorada (*Sparus aurata*) (85.483 T). En España, la principal especie producida es el mejillón (220.449 T; 97% en Galicia), seguida por la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (21.324 T), la dorada (16.231 T) y la trucha arcoíris (15.111 T). Los precios medios de primera venta de dorada y lubina en 2015 fueron de 5,84 euros/Kg (mayor que en 2014) y 5,64 euros/Kg, respectivamente, lo que las convierte en la tercera y cuarta entre las especies de peces de escama cultivados más cotizados de Europa (APROMAR, 2016).

Otras especies de peces marinos de escama cultivadas en España son: el rodaballo (*Scophthalmus maximus*), con 7.715 toneladas de producción en 2015, siendo el 98,6% cultivado en Galicia y el otro 1,4%, en Cantabria; la corvina (*Argyrosomus regius*), el 97,4% de las 1.642 toneladas totales fueron producidas en la Comunidad Valenciana y el 2,6% en Murcia; el lenguado (*Solea senegalensis*) que es la especie de más reciente incorporación a la producción acuícola en España después de muchos años de investigación científica y desarrollo tecnológico, se cultiva en Galicia, Andalucía y Canarias y en total se alcanzaron 664 T de producción, un 20,5% más que en 2014; el atún rojo (*Thunnus thynnus*) (320 T); la anguila (*Anguilla anguilla*), con 380 T producidas por la Comunidad Valenciana; y el besugo (*Pagellus bogaraveo*) (104 T), cuyo cultivo a nivel europeo se concentra en Galicia, aunque otras comunidades españolas están estudiando su implantación (APROMAR, 2016).

España destaca en Europa y el mundo por el cultivo de moluscos bivalvos, con una producción en 2015 de 227.807 toneladas, el 78,6% de la producción acuícola total nacional. Otras especies distintas del mejillón son: ostra plana (*Ostrea edulis*) (427 T), ostra japonesa (558 T), almeja babosa (*Venerupis pullastra*) (70 T), almeja fina (*Ruditapes decussatus*) (167 T), almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) (883 T), y

abalón (conocida como oreja de mar; *Haliotis spp.*). En 2015, el cultivo de microalgas se incorporó al Reglamento Europeo de producción ecológica, con nuevas perspectivas de comercialización; en España se produjeron 3 toneladas para alimentación –humana y animal–, biocombustibles y cosmética. El cultivo de macroalgas para la obtención de agar y gelatinas y como fertilizante agrícola sólo cuenta con algunas iniciativas; la producción de langostinos, aunque no es generalizada, cuenta con pequeñas granjas especializadas en Medina del Campo (Valladolid), y existe, además, otra iniciativa más reciente en el Castillo del Romeral (Las Palmas, GC) (APROMAR, 2016).

Por último, la trucha arcoíris, el esturión Adriático y Siberiano (*Acipenser naccarii*, *Acipenser baerii*) y la tenca (*Tinca tinca*) son las especies de acuicultura continental que podemos encontrar a nivel nacional. El crecimiento del cultivo de esturiones se debe a la prohibición del comercio internacional de caviar, ahora sólo puede obtenerse de peces de acuicultura; en España se producen 80 toneladas de filete y 4 toneladas de caviar. La tenca se cultiva en charcas, principalmente en Castilla-León, pero las producciones actuales de 23 toneladas nada tienen que ver con las 460 toneladas de finales de la década de 1980 (APROMAR, 2016).

En Canarias, las especies autorizadas para cultivo son: dorada, lubina y atún (*Thunnus obesus* y *Thunnus albacares*; en Lanzarote) en jaulas flotantes, y lenguado en tanques en tierra. Es más, Canarias es la segunda comunidad autónoma en producción de lubina (27%) y la cuarta para dorada (11,6%) (APROMAR, 2016). Existen experiencias muy prometedoras con medregal (*Seriola dumerili*), almeja canaria (*Haliotis tuberculata coccinea*), jurel (*Pseudocaranx dentex*), bocinegro (*Pagrus pagrus*) y pulpo (*Octopus vulgaris*) (Gobierno de Canarias).

1.3. Enfermedades

La acuicultura, como cualquier actividad de cría animal, conlleva la aparición de enfermedades de diferente naturaleza, que suelen intensificarse y diversificarse a medida que los procesos de producción también lo hacen, por lo que surge la necesidad de estudiarlas en profundidad e implantar medidas encaminadas a salvaguardar la salud de los animales y evitar pérdidas económicas.

La alteración de los parámetros físico-químicos del agua puede derivar en enfermedad o/y favorecer una infección posterior. Así, temperaturas extremas durante periodos largos producen estrés, disminuyen las defensas, provocan pérdida de apetito y pueden causar la muerte. Valores de pH fuera del rango 6-8 acarrearán problemas, y aunque los peces pueden soportar niveles altos de pH, no toleran los cambios bruscos. Además, a pH ácidos los peces presentan disfunción respiratoria con posibilidad de muerte, otras veces pueden observarse lesiones en piel, aletas y córnea, con disminución de la tasa de crecimiento de los supervivientes. La sobresaturación de oxígeno origina la denominada “enfermedad de las burbujas” que, como su nombre indica, se caracteriza por la formación de pequeñas burbujas en los tejidos, principalmente bajo la piel, en ojos y aletas, e implican mortalidad elevada por embolias. La presencia de sólidos en suspensión y el efecto tóxico de los desechos del metabolismo –amoníaco y nitritos- de los peces afectan a branquias, y niveles altos de bióxido de carbono producen nefrocalcinosis con posterior disfunción renal. Por último, otras toxinas de origen exógeno desarrollan lesiones en branquias, piel, hígado y riñón (Balbuena *et al.*, FAO, 2011).

Deficiencias nutricionales manifiestan pérdida de peso, malformaciones del esqueleto, baja tasa de crecimiento y problemas reproductivos, además de que los peces se vuelven agresivos, con aumento del canibalismo. También, la manipulación de los animales puede ocasionar descamaciones y lesiones en piel, que pueden complicarse con úlceras profundas y fallos en el control osmorregulador del pez, e infecciones (Balbuena *et al.*, FAO, 2011).

Las enfermedades de peces de escama de declaración obligatoria recogidas en la lista de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) de 2017 son las víricas: herpesvirosis de la carpa koi, infección por alfavirus en salmónidos, infección por las variantes con supresión en la HPR y HPR0 del virus de la anemia infecciosa del salmón, iridovirosis de la dorada japonesa (*Chrysophyrus major*), necrosis hematopoyética infecciosa, necrosis hematopoyética epizootica, septicemia hemorrágica viral y viremia primaveral de la carpa (*Cyprinus carpio*); síndrome ulcerante epizootico producida por el hongo *Aphanomyces invadans*, y la infestación por el ectoparásito *Gyrodactylus salari*. Los moluscos padecen la herpesvirosis del abalón, la infección por los protozoos *Perkinsus marinus*, *Perkinsus olseni*, *Bonamia exitiosa*, *Bonamia ostreae* y *Marteilia*

refringens, y por la bacteria *Xenohaliotis californiensis*. En crustáceos las enfermedades más relevantes son: enfermedad de la cola blanca, enfermedad de la necrosis hepatopancreática aguda, enfermedad de las manchas blancas, hepatopancreatitis necrotizante, infección por el virus de la cabeza amarilla, mionecrosis infecciosa, necrosis hipodérmica y hematopoyética infecciosa, plaga del cangrejo de río (*Aphanomyces astaci*) y síndrome de Taura, y en anfibios, infección por ranavirus y por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* (OIE, 2017).

En el medio acuático existen relativamente pocas bacterias que sean consideradas patógenos obligados, destacando las oportunistas, que en determinadas condiciones -variaciones de pH, temperatura, cohabitación de distintas especies, densidad elevada, estrés- desencadenan patologías en los peces (Snieszko, 1973; Wedemeyer *et al.*, 1976), debido a los cambios y desequilibrios que surgen o que provocan en las poblaciones bacterianas y en sus interacciones con el hospedador.

Las infecciones bacterianas de peces son numerosas (Austin y Austin, 1993; Inglis *et al.*, 1993; Toranzo *et al.*, 2005; Plumb y Hanson, 2010). Pero las más comunes que afectan a especies marinas y continentales en España y áreas cercanas son las producidas por bacilos gram-negativos aerobios y anaerobios facultativos, como *Yersinia spp.*, *Edwardsiella spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Listonella spp.* y *Photobacterium spp.*; cocos y bacilos gram-positivos, *Streptococcus spp.*, *Lactococcus spp.* y *Renibacterium spp.*; *Mycobacterium spp.*, *Nocardia spp.*, y *Flavobacterium spp.*, entre otros (Padrós y Furones, 2002; Sierra *et al.*, 2005).

2. Fotobacteriosis

2.1. Etiología, epidemiología, patología, diagnóstico y control

La fotobacteriosis, antes denominada pasteurelosis, es una de las enfermedades de peces marinos -la primera en Canarias- más importante y que más mortalidad produce en el sector de la acuicultura. Afecta a diferentes especies de importancia comercial en Europa, Japón, EE.UU. y países del Mediterráneo (Romalde y Magariños, 1997; Romalde, 2002), como son la lubina (*Dicentrarchus labrax*), la lubina estriada (*Morone saxatilis*), híbrido de lubina estriada con lubina blanca (HBS; *Morone saxatilis*

x *Morone chrysops*), el medregal del Japón (*Seriola quinqueradiata*), la dorada (*Sparus aurata*) (Thune *et al.*, 1993), y el lenguado (*Solea solea*) (Zorrilla *et al.*, 1999; Magariños *et al.*, 2003; Arijo *et al.*, 2005). Es una enfermedad estacional, que se pone de manifiesto cuando la temperatura del agua supera los 18-20°C. Sin embargo, debido a este perfil de temperatura, en Canarias es una enfermedad endémica todo el año.

Apareció por primera vez en 1963 en una población silvestre de perca blanca (*Roccus americanus*) y lubina estriada (*Morone saxatilis*) en un brote endémico ocurrido en la bahía de Chesapeake (EEUU) y que entrañó una mortalidad del 50% (Snieszko *et al.*, 1964). En 1969, las pérdidas económicas causadas por la fotobacteriosis eran ya de interés mundial, afectando sobre todo los cultivos de medregal (*Seriola quinqueradiata*) en Japón (Kusuda y Yamaoka, 1972). Europa se consideró libre de esta enfermedad hasta la década de los 90 cuando empezaron a aparecer casos en lubina (*Dicentrarchus labrax*) en Francia (Baudin Laurencin *et al.*, 1991), en dorada (*Sparus aurata*) en Italia (Ceschia *et al.*, 1991) y España (Toranzo *et al.*, 1991), en salmón atlántico (*Salmo salar*) en Noruega (Speilberg *et al.*, 1991), en lubina en Grecia (Bakopoulos *et al.*, 1995) y Turquía (Candan *et al.*, 1996), en dorada en Portugal (Baptista *et al.*, 1996) y Malta (Bakopoulos *et al.*, 1997), en salmón atlántico en Escocia (Jones y Cox, 1999), y en Canarias fue descrita por primera vez en 1997 (Real *et al.*).

Esta enfermedad afecta a peces marinos tanto de vida silvestre como de cultivo. Aparte de los casos mencionados en los párrafos anteriores, el agente causal ha sido aislado de lubina estriada y HBS de cultivo en EE.UU. (Snieszko *et al.*, 1964; Robohm, 1983; Hawke *et al.*, 1987; Hawke *et al.*, 2003). En Japón, además de los cultivos de medregal (Kubota *et al.*, 1970; Kimura y Kitao, 1971; Egusa, 1980) afecta a otras especies de interés comercial en el país, éstas son el ayu (*Plecoglossus altevelis*), dorada negra (*Mylio macrocephalus*), pargo japonés (*Pagrus major*), pez lija (*Navodon modestus*), largescale blackfish (*Girella punctata*), mero de Hong Kong (*Epinephelus okaara*), blénidos (*Pictiblennius yatabei*) y jurel (*Pseudocaranx dentex*). La fotobacteriosis ha causado también importantes pérdidas económicas en Israel en los cultivos de estanque de híbrido de lubina estriada (Nitzan *et al.*, 2001). La importancia que esta enfermedad en Japón y Europa ha sido informada en distintos artículos de revisión de autores como Austin y Austin (1993), Magariños (1996), y Plumb y Hanson (2007). Un caso en pez cabeza de serpiente (*Channa maculata*) de cultivo, alimentados

con productos contaminados de peces marinos, fue registrado en Taiwan (Tung *et al.*, 1985). Otros dos casos posteriores en Taiwan se dieron en cultivo de cobia (*Rachycentron canadum*) (Lopez *et al.*, 2002) y en pez del paraíso (*Macropodus opercularis*) (Liu *et al.*, 2011).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*), perteneciente a la familia *Vibrionaceae*, es su agente etiológico. Previamente fue clasificado dentro del género *Pasteurella* (Snieszko *et al.*, 1964), otorgándole posteriormente el nombre *Pasteurella piscicida* (Janssen y Surgalla, 1968) (también conocido como “fish killer”). Pero, debido a que existían características fisiológicas y bioquímicas que no coincidían con el género, algunos autores japoneses propusieron otros, como *Corynebacterium* (Kimura y Kitao, 1971) y *Arthrobacter* (Simidu y Egusa, 1972). Sin embargo, técnicas inmunológicas probaron que no presenta antígenos comunes con estos dos géneros (Kusuda *et al.*, 1978). Además, se observó cierta relación con un aislado de *Pasteurella plecoglosicida* de ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*), lo que justificó la asignación inicial del Género *Pasteurella*. No obstante, con este nombre, este patógeno nunca fue incluido en el Manual de Bergey (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology) (Mannheim, 1984) o el “Approved List of Bacterial Names” (Skerman *et al.*, 1989), aunque fue el término empleado en la literatura hasta 1995.

Magariños *et al.* (1992a) afirmaron que *Pasteurella piscicida* compartía más características fenotípicas con otros patógenos de peces como *Listonella anguillarum* y *Aeromonas salmonicida* que con *Pasteurella multocida* y *Pasteurella haemolytica*. Por el contrario, Romalde *et al.* (1995c) realizaron un estudio de perfiles de ácidos grasos metiléster (FAME) por cromatografía de gases y obtuvieron diferencias significativas en la cantidad –mayor- de ácidos grasos en varias cepas de *Pasteurella piscicida*, compararon estos resultados con los obtenidos en cepas de origen clínico, como *Listonella anguillarum* y *Aeromonas salmonicida*, concluyendo que este agente era más cercano a *Pasteurella*.

Más tarde, estudios de ARN ribosómico motivaron la reclasificación de la hasta ese momento *Pasteurella piscicida* como una nueva subespecie de *Vibrio damsela* (Nicolas *et al.*, 1994). Y tras un exhaustivo estudio de la Familia *Vibrionaceae* y organismos afines mediante técnicas de secuenciación del ARN ribosómico 16S e

hibridación ADN-ARN, Gauthier *et al.* (1995) propusieron corregir nuevamente su taxón (Figura 4) (con posterior corrección de la nomenclatura –del sustantivo *damsela* al genitivo *damselae*- por Trüper y De'Clari (1997)). Una nueva subespecie de la recientemente creada *Photobacterium damsela* comb. nov. (antes *Vibrio damsela*) (Smith *et al.*, 1991), diferenciándose ambas en un sólo nucleótido en la secuencia ARN ribosómico 16S y con una hibridación ADN-ARN de aproximadamente un 80%. Estos resultados fueron después confirmados por otros autores (Osorio *et al.*, 1999), donde fue demostrada la gran similitud en la secuencia de ARN ribosómico de otros miembros del género *Photobacterium* (98,1% a *Photobacterium histaminum*). También, la caracterización de cepas de *Phdp* mediante la técnica “*Amplified fragment length polymorphism*” (AFLP) reveló una homología del 77% entre *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (Thyssen *et al.*, 2000), lo que evidencia la proximidad taxonómica de ambas especies bacterianas (Figura 4).

Phdp es una bacteria pleomórfica, gram-negativa (Koike *et al.*, 1975) (Figura 5). Al principio, la tinción se mostraba variable (Yasunaga, 1983, 1984; Tung *et al.*, 1985; Ueki *et al.*, 1990; Toranzo *et al.*, 1991; Balebona *et al.*, 1992; Kusuda y Yamaoka, 1992; Candan *et al.*, 1996, Baptista *et al.*, 1996; Real *et al.*, 1997; Kawakami *et al.*, 1999; Jones y Cox, 1999). Por ejemplo, Kimura y Kitao (1971) afirmaron que las bacterias se tiñen inicialmente como gram-positivas, y después se vuelven negativas; Simidu y Egusa (1972) defendían que el cristal violeta queda retenido y que la decoloración posterior no es igual de efectiva que en otros gram- negativos; así mismo, según Kubota *et al.* (1972), si la tinción de la bacteria es realizada sobre muestras de tejido, el resultado observado será gram-positivo. Se caracteriza por presentar tinción bipolar (Romalde, 2002).

Por otra parte, su tamaño y morfología varían dependiendo de las condiciones de cultivo, pero se han descrito tamaños desde 0,6-1,2 x 0,8-2,6 µm. (Koike *et al.*, 1975), de forma bacilar (Figura 5b), pudiendo observarse desde micrococcos hasta bacilos largos.

Crece bien en los medios de cultivo convencionales como Agar Infusión Cerebro Corazón (BHIA), Agar Triptona-Neopeptona, Agar Levadura-Peptona, Agar leche y Agar Sangre (AS), todos suplementados con un 1,5-2% de cloruro de sodio

(Egusa, 1992), y Agar de Soja Triptosa (TSA); forma colonias redondas, incoloras, semi-transparentes en forma de “gotas de rocío” y de consistencia pegajosa (Figura 5a). Presenta un metabolismo anaerobio facultativo (Austin y Austin, 1999).

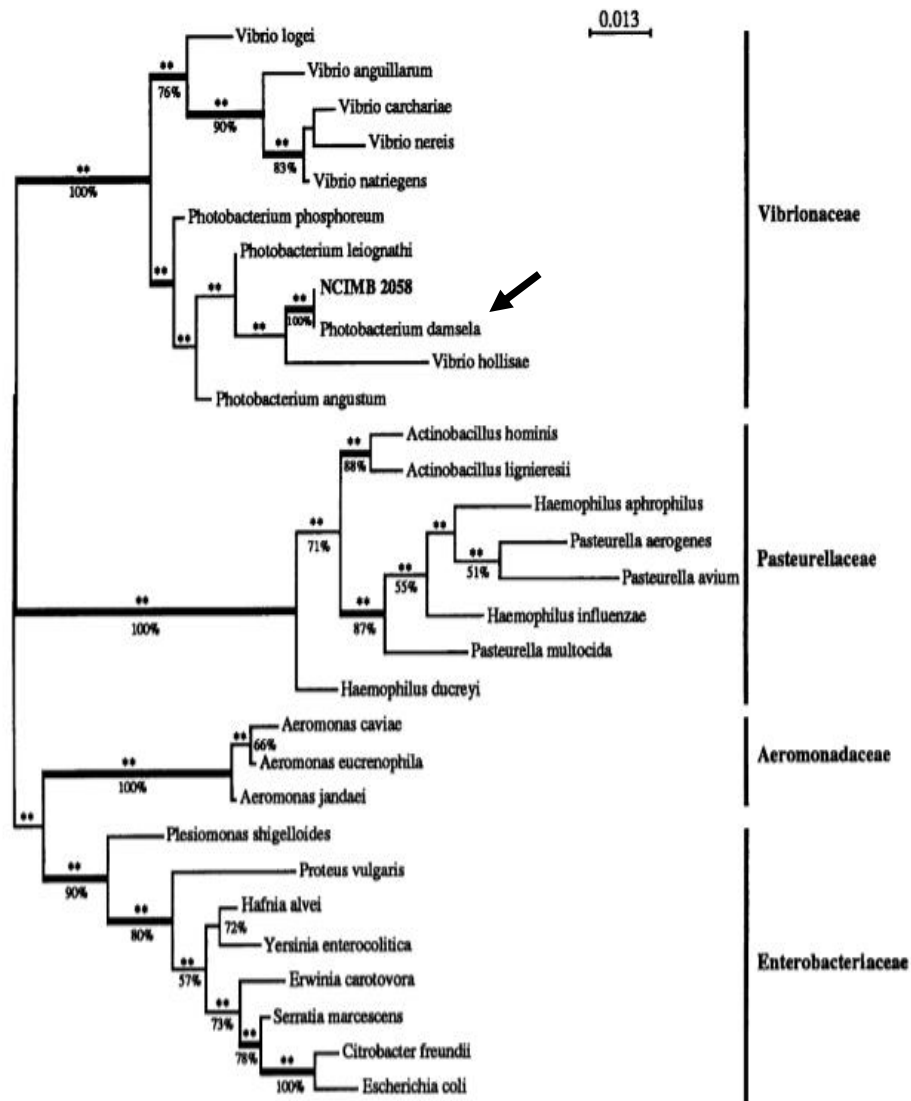


Figura 4.- Posición filogenética de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Sacado del artículo de Gauthier *et al.*, 1995.

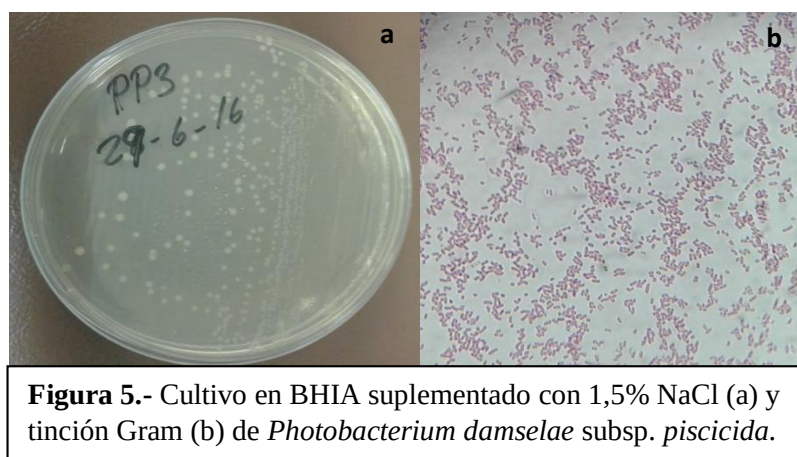


Figura 5.- Cultivo en BHIA suplementado con 1,5% NaCl (a) y tinción Gram (b) de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Las características bioquímicas de *Phdp* (Tabla 2) fueron descritas por Sniezko *et al.* (1964), Janssen y Surgalla (1968), Kimura y Kitao (1971), Simidu y Egusa (1972), y Kusuda y Yamaoka (1972). Es una bacteria inmóvil, oxidasa y catalasa positivas, tiene metabolismo fermentativo, es sensible al agente vibriostático O/129 (Austin y Austin, 1999), no produce gas a partir de la glucosa y es halófila (Janssen y Surgalla, 1968; Magariños *et al.*, 1992a). Presenta actividad de las enzimas arginina dehidrolasa, lipasa y fosfolipasa, pero no de lisina descarboxilasa y ornitina descarboxilasa. También, manifiesta resultado negativo para las pruebas del indol, ureasa, gelatinasa, amilasa, producción de sulfhídrico y no es capaz de reducir los nitratos a nitritos (Magariños *et al.*, 1996c). Puede producir ácido a partir de sólo cuatro carbohidratos: glucosa, manosa, galactosa y fructosa. Con sacarosa y maltosa se obtienen resultados variables, al igual que en las pruebas rojo de metilo y Voges-Proskauer (Robohm, 1983) quizás debido al uso de diferentes medios basales (Koike *et al.*, 1975).

Es capaz de producir hemólisis de eritrocitos de oveja, salmón y rodaballo, pero no de trucha. Ha sido descrita como una bacteria no hemaglutinante (Magariños *et al.*, 1996b; Yoshida *et al.*, 1997). Algunos aislados del estudio de Sakai *et al.* (1993), que presentaban una superficie hidrofóbica, fueron capaces de aglutinar débilmente eritrocitos de oveja.

Tabla 2.- Características bioquímicas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Tinción de Gram	-	Crecimiento en:	
Movilidad	-	Agar Marino	+
Oxidasa	+	BHIA + NaCl	+
Catalasa	+	AS + NaCl	+
O/F Glucosa	+	Agar McConkey	-
Arginina dehidrolasa	+	TSA	+
Lisina descarboxilasa	-	Agar TCBS + NaCl	-
Ornitina descarboxilasa	-	Agar/Caldo nutritivo	+
Gas glucosa	-	Agua de peptona	+
Nitrato	-	Crecimiento a:	
Sensibilidad a:		5°C	-
Vibriostático O/129	+	10°C	-
Novobiocina	+	15°C	+
Hemólisis	+	25°C	+
		30°C	+
Producción de ácido a partir de:		37°C	-
Glucosa	+	Crecimiento con:	
Manitol	-	0% NaCl	-
Inositol	-	1,5% NaCl	+
Sorbitol	-	7% NaCl	-
Ramnosa	-	10% NaCl	-
Sacarosa	V	β-galactosidasa	-
Melibiosa	-	Citrato	-
Amigdalina	-	Sulfhídrico	-
Arabinosa	-	Indol	-
Esculina	-	Ureasa	-
Lactosa	-	Triptófano desaminasa	-
Maltosa	V	Gelatinasa	-
Manosa	+	Lipasa	+
Salicina	-	Amilasa	-
Trehalosa	-	Rojo de metilo	V
Xylosa	-	Voges- Proskauer	V
Glicerol	-		
Galactosa	+		
Fructosa	+		

(+): Reacción positiva; (-): Reacción negativa; V: Reacción variable.

Las cepas aisladas en Europa, Japón y Estados Unidos resultaron ser casi idénticas bioquímicamente y antigénicamente (Magariños *et al.*, 1992a), mostrando también similares patrones electroforéticos en sus lipopolisacáridos y en sus perfiles de proteínas de membrana. Sin embargo, el análisis genético con técnicas moleculares, tales como el ribotipado y la amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD), ha demostrado la existencia de dos linajes clonales o genogrupos, uno en las cepas procedentes de Europa y otro en las de Japón y EEUU (Magariños *et al.*, 1997, 2000; Thyssen *et al.*, 1999; Kvitt *et al.*, 2002; Romalde, 2002; Hawke *et al.* 2003; Juárez-Río *et al.*, 2005). Si bien, se observó homogeneidad dentro del linaje clonal en cepas aisladas de especies piscícolas diferentes (Magariños *et al.*, 2003).

Bacterias cultivadas *in vitro* e *in vivo* expresan diferentes perfiles de glicoproteínas (Jung *et al.*, 2008), poniendo de manifiesto la influencia de las condiciones del medio sobre el fenotipo. Las bandas de carbohidratos observadas pueden corresponder a ácidos siálicos (Jung *et al.*, 2001), mientras que los carbohidratos de alto peso molecular hallados en *Phdp* podrían estar relacionados con la cápsula generada por la bacteria *in vivo* (Magariños *et al.*, 1996a y b; Jung *et al.*, 2008).

Además, se observó que aislados de *Phdp* de la Costa del Golfo de Louisiana presentan un perfil de banda de plásmido único, en comparación con cepas aisladas de otros lugares geográficos que poseen dos plásmidos de peso molecular >30 kb, uno de 8 kb y otro de 5 kb; por su parte, aislados de Grecia e Israel expresaron dos bandas de 10 y 8 kb, mientras que el perfil de cepas japonesas fue de 5 y 3,5 kb (Hawke *et al.*, 1996). Las cepas de Louisiana resultaron resistentes a los antibióticos Romet® (sulfonamida) y Terramicina® (oxitetraciclina) debido a un plásmido-R adquirido (Hawke *et al.*, 2003, Kim *et al.*, 2008).

Este patógeno ataca principalmente en fases tempranas del desarrollo de los peces (larvas y juveniles) (Noya *et al.*, 1995b), si bien, están apareciendo brotes de la enfermedad en peces con talla comercial, siendo mayor el impacto económico. Se transmite horizontalmente, de pez a pez (Toranzo *et al.*, 1982; Magariños *et al.*, 2003) o verticalmente, a través del fluido ovárico y seminal (Romalde *et al.*, 1999). Y pueden producirse brotes de fotobacteriosis en un amplio rango de temperatura (14-30°C) y salinidad (3000-21000 ppm), siendo los óptimos, 18-25°C y 5000-15000 ppm (Hawke, 2012).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* es considerado un patógeno obligado, pues su supervivencia fuera del hospedador es corta, incluso en agua salada. Janssen y Surgalla (1968) señalaron que la cepa aislada del primer caso de la Bahía de Chesapeake logró sobrevivir sólo tres días en agua salina estéril. Sin embargo, hay evidencias de que bacterias viables, aunque no cultivables, podrían permanecer durante largos periodos en agua de mar y sedimentos (Magariños *et al.*, 1993). En cualquier caso, las especies no son igual de susceptibles a infectarse por esta vía, así, en doradas se ha obtenido una DL_{50} de 10^5 - 10^6 ufc/ml en infección experimental por baño, mientras que el rodaballo (*Scophthalmus maximus* L.) se ha mostrado resistente (Magariños *et al.*, 1994a). La susceptibilidad/resistencia de ambas especies de peces podría deberse a la resistencia de la bacteria a la acción del mucus de piel de dorada (también de lubina) y sensibilidad al del rodaballo (Magariños *et al.*, 1995). Otra vía de entrada del patógeno podría ser por ingestión (Magariños *et al.*, 1995). Robohm (1983) sugirió que otras especies de peces e invertebrados que cohabiten con especies susceptibles a la enfermedad podrían operar como portadores asintomáticos o reservorios de la infección, pero hasta el momento no se ha podido demostrar (Toranzo *et al.*, 1991).

Los peces enfermos por un cuadro agudo de septicemia suelen presentar letargia, natación lenta y próxima a la superficie, para luego hundirse y permanecer en el fondo antes de morir (Kubota *et al.*, 1970a,b, 1972; Hawke, 2012). También puede observarse un aumento de la respiración y pérdida del equilibrio.

Puede cursar como una enfermedad aguda, con elevada mortalidad que puede alcanzar el 90-100%, o crónica, con una mortalidad en goteo, aunque esta última forma es menos frecuente y tiene lugar cuando los animales se encuentran fuera del rango óptimo de temperatura o después de un tratamiento antibiótico (Thune, 1993). En la forma aguda, es infrecuente la aparición de lesiones macroscópicas, con independencia de la especie afectada (Bullock, 1978; Toranzo, 1991), aunque en lubina estriada e híbrido de lubina estriada (HBS) se ha observado alguna vez palidez de branquias, petequias en la región del opérculo y aumento de la pigmentación de la piel. Internamente, puede observarse inflamación y friabilidad del bazo. También son órganos diana el hígado y riñón, pudiendo desarrollar petequias y hemorragias, respectivamente. Y en lubina, hinchazón de la cavidad abdominal (Balebona *et al.*, 1992), lesiones ulcerativas en piel y hemorragias en boca, ojos y musculatura (Fouz *et*

al., 2000). Otras especies, como el medregal, han mostrado signos de edema y pigmentación anormal; la perca blanca, ligeras hemorragias en los opérculos y base de aletas (Snieszko *et al.*, 1964). La dorada no suele desarrollar lesiones externas, salvo excepciones en las que se observa pigmentación de la piel y leves hemorragias en cabeza y región opercular (Toranzo, 1991, Baptista *et al.*, 1996). En salmón Atlántico, tras una infección experimental, se observaron hemorragias petequiales en intestino grueso y superficie peritoneal, y puntos blancos en hígado, bazo y corazón; con el tiempo también se desarrolló una peritonitis generalizada y se formaron pseudomembranas difteroides entre los órganos y la vejiga natatoria (Jones y Cox, 1999). Y algunos lenguados han presentado exoftalmia hemorrágica, pequeñas úlceras en piel, palidez branquial (Zorrilla *et al.*, 1999), esplenomegalia y palidez de hígado y riñón; pero normalmente se detecta pigmentación oscura de la piel e hinchazón abdominal, como en otras especies. Por otro lado, la forma crónica varía dependiendo de la especie afectada, la temperatura del agua y de si el pez ha sido sometido a tratamiento antibiótico. Se caracteriza por la presencia de puntos o gránulos blanquecinos de unos 1-2 mm en bazo y riñón (y ocasionalmente en hígado, páncreas, vejiga natatoria, branquias, mesenterio y peritoneo) que se asemejan a granulomas, compuestos por bacterias, células epiteliales y fibroblastos. De ahí que esta enfermedad sea también conocida como “pseudotuberculosis” (Kubota *et al.*, 1970, 1972; Wolke, 1975; Bullock, 1978; Daly, 1999).

Wolke (1975) describió las lesiones histopatológicas observadas en los peces infectados de manera natural en el primer caso reportado de fotobacteriosis ocurrido en la Bahía de Chesapeake. Las lesiones aparentemente crónicas consistían en acumulaciones de células linfoides y de sangre periférica con necrosis en bazo, áreas focales de hepatocitos con necrosis coagulativa y una marcada falta de respuesta de células inflamatorias. En muestras de lubina estriada y su especie híbrida afectadas por la forma aguda de la enfermedad, se observó necrosis multifocal aguda del tejido linfóide del bazo, con pérdida de células, necrosis coagulativa, cariorrexis, y grandes colonias de bacteria. En hígado es frecuente encontrar necrosis multifocal aguda con evidente cariorrexis. Ausencia de acumulaciones de células inflamatorias (Hawke *et al.*, 1987). Lesiones microscópicas similares fueron descritas en dorada durante el estudio del primer brote de la enfermedad en España. Se encontraron animales con lesiones

crónicas sólo en los casos de infección natural, que revertían una vez tratados con antibióticos y superada la infección (Toranzo *et al.*, 1991). En salmón Atlántico, se han descrito áreas de necrosis coagulativa en hígado, bazo y riñón (Jones y Cox, 1999).

La respuesta en medregal es muy diferente, pues las colonias bacterianas presentes en el bazo están rodeadas por células inflamatorias. Las lesiones granulomatosas que se forman en el bazo están constituidas por eosinófilos circulantes. Es común a todas las especies de peces el bloqueo del flujo sanguíneo en los espacios intersticiales de los órganos internos, debido a la acumulación de bacterias en los capilares.

En un caso de infección experimental de híbrido de lubina, la muerte de los animales se atribuyó a la embolia producida por los acúmulos de bacteria en los capilares de las branquias, con la consecuente asfixia debido a la incapacidad de que la sangre fluya para realizar el intercambio gaseoso (Hawke, 1996).

En doradas inoculadas con cepas vivas y productos extracelulares (ECPs) de *Phdp* (Noya *et al.*, 1993) se observó un aumento de los leucocitos en sangre de ambos grupos, principalmente neutrófilos y eosinófilos, además de leucocitos inmaduros y eritrocitos degenerados. Algunos peces inoculados con la bacteria mostraron septicemia, pudiéndose ver gran cantidad de bacterias fagocitadas por neutrófilos y monocitos, y un porcentaje elevado de estas células presentaba necrosis.

El diagnóstico de la enfermedad se realiza mediante cultivo e identificación por métodos bacteriológicos, serología y/o técnicas de biología molecular, como la PCR. También se puede hacer análisis histopatológico, pero al no existir signos o lesiones patognomónicas de la fotobacteriosis, se deberá igualmente realizar diagnóstico por alguno de los métodos mencionados anteriormente.

La bacteria puede ser aislada a partir de hígado, bazo y riñón en los medios de cultivo indicados anteriormente, en la parte que hace referencia a la morfología y bioquímica del patógeno. Usualmente, se emplean los siguientes: agar soja triptosa (TSA), infusión cerebro corazón suplementado con cloruro sódico (BHIA+1,5% NaCl) y agar sangre con sal, con un 5% de sangre de oveja (AS+1,5% NaCl). Se incuba a 25°C durante 48 horas, que es lo que tardan en crecer las colonias y cuya apariencia ya ha

sido comentada. Posteriormente, se procede con alguno de los métodos de identificación.

La morfología bacteriana y los resultados de la bioquímica deberán ser los propios de la especie. Se puede realizar mediante el empleo de pruebas en tubo o de galerías API 20E (bioMérieux, Durham, NC) cuyo único código resultante será 2005004.

Otras técnicas para el diagnóstico son la secuenciación parcial del ARN ribosómico 16S y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para el primero, es necesario generar un producto de PCR, utilizando cebadores universales para el gen ARNr 16S, que será secuenciado y comparado con las secuencias depositadas en GenBank. Alternativamente se puede utilizar una PCR múltiple basada en los genes ARNr 16S y *Ure C* (Osorio *et al.*, 1999) y otra muy similar, en la que se amplifica un fragmento del gen que codifica para la proteína 1A de unión a la penicilina en vez del 16S ARNr (Amagliani *et al.*, 2009), permite identificar y diferenciar entre ambas subespecies de *Photobacterium damsela*. El último protocolo está diseñado para utilizar muestras de peces, con el objetivo de agilizar el diagnóstico. También puede elegirse un método combinado de PCR, donde se genera un amplicón del gen del polisacárido capsular común a ambas subespecies, seguido de cultivo en agar TCBS-1 para diferenciarlas.

Existe un sistema de inmunodiagnóstico, el Bionor Aquarapid Pp test kit, que utiliza un anticuerpo específico de *Phdp* en un formato de ensayo de inmunoabsorción enzimática y que es empleado para detectar infecciones subclínicas (Romalde *et al.*, 1995a y b).

La [tabla 3](#), modificada a partir del artículo de Andreoni y Magnani (2014), resume los métodos de identificación directa de *Phdp*.

Tabla 3.- Métodos de diagnóstico de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Técnica	Diana	Paso de cultivo adicional	Especificidad	Disponibilidad en el mercado	Referencias
Método de detección basado en la PCR	Gen RNAr 16S	-	<i>P. damsela</i>		Osorio <i>et al.</i> , 1999.
PCR múltiple	Genes 16S y <i>ureC</i>	-	<i>P. damsela</i> subespecies		Osorio <i>et al.</i> , 2000.
PCR múltiple	Genes <i>Pbp-1A</i> y <i>ureC</i>	-	<i>P. damsela</i> subespecies	Kit de detección por PCR (Diatheva)	Amagliani <i>et al.</i> , 2009.
Método combinado de PCR y cultivo	Gen <i>cps</i>	Agar TCBS-1	<i>P. damsela</i> subespecies		Rajan <i>et al.</i> , 2003.
Inmunoensayo enzimático	Anticuerpos policlonales anti- <i>Phdp</i>	-	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> *	Kit Aquaeia-Pp (BIONOR)	Romalde <i>et al.</i> , 1999.
PCR-RFLP	Secuencias GenBank AY191120 y AY191121.	-	<i>P. damsela</i> , análisis de restricción para la identificación de las subespecies.		Zapulli <i>et al.</i> , 2005.

*Reacciones cruzadas con *P. damsela* subsp. *damsela* y *P. histaminum*.

En unos pocos años, este agente ha desarrollado resistencia a varios antibióticos, debido a la adquisición de plásmidos-R que contienen genes de resistencia a kanamicina, sulfonamida, tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, florfenicol y eritromicina (Kim y Aoki, 1993, 1994, 1996a y b; del Castillo *et al.*, 2013; Morii *et al.*, 2004, 2003; Morii e Ishikawa, 2012). Pero es sensible a los agentes antibacterianos enrofloxacina (Martínez-Manzanares *et al.*, 2008), bicozamicina y fosfomicina (Kawanishi *et al.*, 2005). Otro punto a indicar es que al tratarse de una bacteria que podemos encontrar intracelularmente en macrófagos, la efectividad de los antibióticos puede verse mermada (Andreoni y Magnani, 2014).

Estas razones, junto al deseo de reducir el uso de antibióticos en las piscifactorías, con los beneficios biológicos y medioambientales que supone, sitúa a la prevención como un método fundamental para el control de la fotobacteriosis. Siendo posible mediante la investigación y desarrollo de vacunas efectivas o el empleo de probióticos.

Las vacunas convencionales están basadas en la inactivación del patógeno con calor o formol, y en el empleo de antígenos solubles, como el lipopolisacárido (LPS), pero no han resultado efectivas (Barnes *et al.*, 2005; Romalde *et al.*, 2002; Kawakami *et al.*, 1997; Hamaguchi y Kusuda, 1989).

Se han descrito bacterinas formuladas con proteínas obtenidas de ECPs, involucradas en la internalización de la bacteria, que han logrado efecto protector en lubina y medregal cuando son administradas mediante inmersión, debido a que se produce una fuerte respuesta de los anticuerpos en branquias y mucosa que impiden la entrada y colonización del patógeno (Barnes *et al.*, 2005). Sin embargo, sólo existe disponible una vacuna comercial enriquecida con ECPs que ha sido empleada en varios países europeos con distinto resultado, desde bueno en España, Turquía y Grecia hasta pobre en Italia (Hastein *et al.*, 2005; Magariños *et al.*, 1994). El protocolo de vacunación recomendado consiste en realizar dos baños en intervalos mensuales, que comienzan en la fase larvaria (50 mg), y revacunar por vía oral cuando el pez haya alcanzado los 2 g de peso (Romalde *et al.*, 2002).

Mediante técnicas de inmunoproteómica, se pueden identificar antígenos potenciales que luego pueden ser clonados y producidos como proteínas recombinantes. Tres antígenos han mostrado efecto protector en cobia, pero no han sido probados en otras especies ni contra otras cepas de *Phdp* (Ho *et al.*, 2011). Un estudio en el que se probaron combinaciones de antígenos reveló que las vacunas bivalentes eran más eficaces que las monovalentes y las trivalentes (Ho *et al.*, 2014). La biotecnología basada en la “vacunología inversa” ha sido utilizada con el mismo objetivo de identificar y seleccionar antígenos de membrana, para ser aplicada en el diseño de una vacuna contra la fotobacteriosis (Andreoni *et al.*, 2013). La lipoproteína recombinante fue probada en lubina con buenos resultados, la inmunización del pez indujo la producción de anticuerpos específicos que le confirieron protección contra el patógeno

y, además, la vida de esos anticuerpos *in vivo* fue larga, con una única administración del antígeno. Estos resultados hacen a la lipoproteína recombinante una buena candidata para el desarrollo de una vacuna, sin embargo, son necesarios estudios adicionales sobre su eficacia en el tiempo, dosis y su uso en combinación con diferentes adyuvantes.

Debido a la ausencia de vacunas eficaces contra la enfermedad, se hace necesaria la búsqueda de métodos alternativos. Es el caso del empleo de probióticos para mejorar la salud de los peces. Una cepa de *Pediococcus pentosaceus*, una bacteria ácido láctica aislada de intestino de ejemplares adultos de cobia, introducida en la dieta de esos peces, aumenta la tasa de crecimiento y el metabolismo respiratorio de los leucocitos de sangre periférica. También incrementó la tasa de supervivencia en una infección experimental de *Phdp* en cobia. Previamente, *in vitro*, el pH ácido resultante del metabolismo de la bacteria había inhibido el crecimiento de *Phdp* (Xing *et al.*, 2013).

La administración oral de las cepas de *Shewanella* –bacteria marina- *Pdp11* y *Pdp13*, aisladas del mucus de dorada (Chabrilón, 2003; Chabrilón *et al.*, 2005a y b), incrementa el metabolismo respiratorio de los fagocitos de lenguado y dota al animal de mayor protección contra infecciones experimentales, respectivamente (Díaz-Rosales, 2006), además de modular la microbiota intestinal del lenguado, con mejoras en el crecimiento, la composición nutritiva y la tolerancia al estrés (Lobo *et al.*, 2014; Tapia Paniagua *et al.*, 2014; Lobo, 2015; Tapia Paniagua, 2015). El primer efecto también se consigue con la microalga roja *Porphyridium cruentum*, combinada con la inoculación intraperitoneal de una bacterina frente al patógeno (Díaz-Rosales, 2006).

La técnica de cartografía genética puede ser aplicada para detectar regiones del genoma del hospedador asociadas con la resistencia a la enfermedad (Moen *et al.*, 2009; Houston *et al.*, 2010; Baerwald *et al.*, 2011). Se han identificado en dorada dos importantes loci de carácter cuantitativo (QTL), uno que afecta a la supervivencia tardía y otro que influye en la supervivencia media, y un potencial marcador para la resistencia a la enfermedad (Massault *et al.*, 2011). Estos hallazgos abren una vía de investigación nueva para el control de enfermedades, a la par que podrían ser utilizados para una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia a la enfermedad y respuesta defensiva. Además, el mapa genómico puede ser comparado con otras especies susceptibles de padecer fotobacteriosis (Andreoni y Magnani, 2014).

2.2. Factores de virulencia

Distintos estudios revelan que *Phdp* posee factores de virulencia involucrados en la patogénesis de la enfermedad, aunque éstos no están totalmente definidos. Éstos son: presencia de cápsula (Magariños *et al.*, 1996a, 1996b), síntesis de productos extracelulares (ECPs) y mecanismos de captación de hierro (Magariños *et al.*, 1992, 1994), factores codificados por plásmidos (Do Vale *et al.*, 2005), proteínas con actividad apoptótica (Do Vale *et al.*, 2003) y otras enzimas (Díaz-Rosales *et al.*, 2006; Naka *et al.*, 2007), resistencia al suero sanguíneo de diferentes especies de peces (Acosta *et al.*, 2006).

La capacidad de adherencia e invasión, esencial en los primeros estadios de la infección de *Phdp* en algunas líneas celulares de varias especies de peces (epiteliales y embrionarias) se considera débil o moderada (Magariños *et al.*, 1996b, Romalde y Magariños, 1997). Pero, ha presentado una fuerte adherencia a las células intestinales de dorada, lubina y rodaballo (Magariños *et al.*, 1996b; López-Dóriga *et al.*, 2000).

Los resultados de investigaciones sobre la interacción de este patógeno con fagocitos han sido contradictorios. Bacterias morfológicamente intactas han sido encontradas en el interior de macrófagos *in vivo* (Kubota *et al.*, 1970; Nelson *et al.*, 1981; Kusuda y Salati, 1993; Noya *et al.*, 1995a, b), pudiendo sobrevivir y multiplicarse en el interior de estas células en lubina, sin sufrir cambios morfológicos aparentes (Elkamel *et al.*, 2003), lo que la convierte en un patógeno intracelular muy eficiente. Sin embargo, estudios *in vitro* indicaron que macrófagos de trucha arcoiris, lubina y dorada son capaces de eliminar la bacteria (Skarmeta *et al.*, 1995; Arijo *et al.*, 1998), mientras que puede resistir en fagocitos de lenguado durante 5 horas (Díaz-Rosales *et al.*, 2006). Barnes *et al.* (1999) confirmaron que *Phdp* es incapaz de soportar el ataque oxidativo que tiene lugar durante el metabolismo respiratorio del macrófago.

Por otro lado, la bacteria podría ser capaz de eludir los mecanismos de defensa del hospedador y agentes antimicrobianos mediante la invasión de células no fagocíticas (Magariños *et al.*, 1996b), ya que ha sido demostrada su capacidad de invadir distintas líneas celulares de peces (Magariños *et al.*, 1996b; Yoshida *et al.*, 1997; Elkamel y Thune, 2003). La habilidad de invadir células epiteliales es un factor determinante en la virulencia de diversas bacterias patógenas, como algunas cepas de *Escherichia coli* y

especies de los géneros *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella* (Galán, 1994; Zierler y Galán, 1995), *Bacillus anthracis* (Russell *et al.*, 2006) y *Hafnia alvei* (Padilla *et al.*, 2008), entre otras. Esta característica ha sido demostrada también en *Aeromonas hydrophila* (Leung *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1998), *Listonella anguillarum* (o *Vibrio anguillarum*) (Wang *et al.*, 1998), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Acosta *et al.*, 2009) y *Streptococcus iniae* (El Aamri *et al.*, 2012).

La adherencia de la bacteria a las células parece estar mediada por un receptor proteico o glucoproteico de la superficie bacteriana, y su internalización parece producirse por un mecanismo dependiente de microfilamentos de actina (Magariños *et al.*, 1996a,b; Acosta *et al.*, 2009). Aunque estos autores han afirmado que el patógeno es capaz de permanecer viable en el interior de la célula durante unos dos días y de pasar de una célula a otra, no ha sido encontrado ningún mecanismo específico de internalización a esas líneas celulares de peces. No obstante, sí ha sido demostrada la capacidad de adherencia e invasión de *Phdp* a células epiteliales de carpa (EPC) y dorada (SAF-1), mediante la visualización de bacteria intracelular, que se mantuvo viable de 7 a 9 horas y hasta 7 días, respectivamente (López-Dórica *et al.*, 2000; Acosta *et al.*, 2009), siendo capaz de multiplicarse dentro de la célula después de 48 horas, como ocurre con otras bacterias intracelulares (Finlay y Falkow, 1988; Acosta *et al.*, 2009).

Los ECPs de *Phdp* son letales para la trucha (*Salmo trutta*) y el rodaballo (Magariños *et al.*, 1992a), y muy tóxicos por vía intraperitoneal (Noya *et al.*, 1995a; Bakopoulos *et al.*, 2004). Presentan actividad fosfolipasa, citotóxica y hemolítica sobre eritrocitos de oveja, salmón y rodaballo, pero no de trucha (Magariños *et al.*, 1992b). La actividad de los ECPs se ve incrementada en condiciones limitantes de hierro (Bakopoulos *et al.*, 1997). Estudios histológicos han relacionado estas acciones, en particular la actividad fosfolipasa, con la patogénesis durante la fotobacteriosis (Noya *et al.*, 1995b).

La cápsula, formada por polisacáridos, parece estar compuesta por un material denso y de finos filamentos proyectados sobre la superficie de la célula. Que la bacteria la produzca parece depender de las condiciones de crecimiento (Bonet *et al.*, 1994), de la disponibilidad de hierro y la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria.

Así, la limitación de hierro en la fase temprana de crecimiento genera una cápsula distinta, con menor cantidad de material capsular (do Vale *et al.*, 2001). También depende de la disponibilidad de glucosa en el medio (Acosta *et al.*, 2006). La presencia de cápsula le confiere resistencia e incrementa la virulencia en comparación con cepas no encapsuladas (Arijo *et al.*, 1998; do Vale *et al.*, 2001), pudiendo reducir la DL₅₀ hasta en cuatro logaritmos (Magariños *et al.*, 1996a).

Sin embargo, según el estudio de López-Dóriga *et al.* (2000), la presencia de cápsula en *Phdp* no tuvo efecto en la invasión celular de la línea EPC, al igual que en otras bacterias gram-negativas, como *Haemophilus influenzae* (Lipuma y Gilsdorf, 1987; Roberts *et al.*, 1984) y *E. coli* (Guerina *et al.*, 1983), por lo que este factor por sí sólo no explica las bases que capacitan a la bacteria para invadir células. Los resultados a este respecto son contradictorios, hay estudios que concluyen que la formación de cápsula puede reducir la adherencia de varias especies bacterianas (Runnels y Moon, 1984; St Geme y Falkow, 1991; Virji *et al.*, 1991; Jacques *et al.*, 1991, 1993); otros defienden todo lo contrario (Davis *et al.*, 1981; Chan *et al.*, 1982), y estudios posteriores en *H. influenzae* describen que el nivel de encapsulación y no la mera presencia de cápsula es lo que influye en las interacciones de adherencia bacteria-célula (St Geme y Cutter, 1996). Esta última afirmación parece ser importante también en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, pues, aunque la cápsula constitutiva de las cepas virulentas (Magariños *et al.*, 1996b) le confiere resistencia a la inactivación por suero e incrementa el grado de virulencia (Magariños *et al.*, 1996b; Acosta *et al.*, 2006), además de reducir la fagocitosis por parte de los macrófagos (Arijo *et al.*, 1998), no influye en la adherencia; por otro lado, una cápsula muy densa reduce la adherencia a los tejidos (Magariños *et al.*, 1996b), quizás debido a una menor exposición de las adhesinas a la superficie, involucradas en la colonización. También se ha observado que induciendo la síntesis de cápsula en cepas no virulentas se incrementa su resistencia a la acción bactericida del suero (Magariños *et al.*, 1997; Arijo *et al.*, 1998).

Este patógeno posee un sistema de captación de hierro, esencial para el crecimiento de la bacteria en el hospedador y, por tanto, para el desarrollo de la infección. Está mediado por sideróforos de alta afinidad, que le confiere la habilidad de adquirir hierro de la hemina y hemoglobina como única fuente de hierro (Magariños *et*

al., 1994). La inyección intraperitoneal de hemina antes de una infección experimental aumenta la letalidad de este agente (Magariños *et al.*, 1994). Igualmente, el sistema de transporte del grupo hemo se expresa en rodaballo durante la infección de *Phdp*, y cuya base genética muestra una clara diversidad (Juíz-Río, 2006).

Los polisacáridos capsulares ejercen un papel secundario en la unión de la hemina y, por tanto, la presencia de cápsula parece estar involucrada en la capacidad de la bacteria de adquirir hierro (do Vale *et al.*, 2001; Romalde, 2002). A su vez, como se comentó anteriormente, la síntesis de la cápsula depende de la disponibilidad de hierro (do Vale *et al.*, 2001); de ahí que se sospeche la necesidad de la bacteria de activar y de expresar este sistema de captación de hierro durante su recorrido por el sistema circulatorio, para resistir a los mecanismos de defensa del hospedador una vez alcanzado los órganos diana, probablemente mediante la síntesis de polisacáridos capsulares (Díaz Rosales, 2006).

Además, el hierro juega un papel regulador en la expresión de actividades enzimáticas como la actividad gelatinasa y la caseinasa, que se expresan cuando las cepas se cultivan en condiciones restrictivas en hierro (Magariños *et al.*, 1994; Romalde, 2002). Se ha observado que en la infección con bacterias cultivadas en condiciones restrictivas de hierro se produce una mayor respuesta inmunológica, en comparación con la desarrollada por la bacteria cultivada en condiciones no limitantes, debido probablemente al distinto perfil antigénico que ambas expresan (Jung *et al.*, 2007).

Diferentes cepas virulentas de *Phdp* producen proteínas pro-apoptóticas, como la exotoxina AIP56, codificadas por plásmidos, con capacidad de inducir apoptosis en neutrófilos y macrófagos peritoneales de lubina, que conduce a una necrosis secundaria (do Vale *et al.*, 2005).

Este patógeno presenta una única isoenzima con actividad catalasa y otra con actividad superóxido dismutasa, ambas con hierro en su centro activo. Se ha descrito que niveles altos de actividad catalasa aumentan la resistencia a los radicales oxidativos de las células del hospedador. La limitación de hierro reduce la actividad de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa, aumentando la susceptibilidad al peróxido de hidrógeno y jugando un papel importante en la supervivencia de la bacteria (Díaz-Rosales *et al.*, 2006).

3. Fimbrias

3.1. Tipos, función, estructura y biogénesis.

Las fimbrias son estructuras proteicas filamentosas, no flagelares, ancladas a la membrana (Houvink *et al.*, 1950; Ottow, 1975) de bacterias gram-negativas y gram-positivas (Duguid *et al.*, 1955; Brinton, 1965; Yanagawa *et al.*, 1968), involucradas en la adhesión a otras bacterias, a células del hospedador o a superficies ambientales (Scott y Zahner, 2006; Fronzes *et al.*, 2008). También están implicadas en las interacciones patógeno-hospedador, colonización, tropismo, formación de biocapas, invasión y señalización (Proft y Baker, 2009; Klines *et al.*, 2009). Están constituidas por subunidades de pilina (Brinton, 1965; Salit y Gotschlich, 1977a), unidas a adhesinas localizadas normalmente en el extremo distal del pilus.

Se han descrito diferentes tipos de fimbrias (Tabla 4), tipos I, II, III, IV, P y curli en bacterias gram-negativas, y fimbrias ensambladas por sortasas y tipo IV –similar a las de gram-negativas- en gram-positivas (Kline *et al.*, 2010).

La síntesis de fimbrias tipo I, II, III y P es por la vía de la chaperona (Figura 6) (Zavialov *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004; Sauer *et al.*, 2004; Pettigrew *et al.*, 2004; Piatek, 2005; Proft y Baker, 2009; Kline *et al.*, 2010). Este sistema suele ser ejemplarizado mediante los mecanismos de los pili tipo I y P de *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) (Nuccio y Baumler, 2007), pues son los más caracterizados de este grupo, especialmente el tipo I.

Las subunidades de pilina que conforman la fimbria (forma helicoidal) tipo I se conocen como FimA (subunidad mayor; 500-3000 copias), FimG, FimF, FimH (adhesina), y las homólogas en el tipo P, PapA (subunidad mayor), PapH, PapF, PapK, PapE, PapG (adhesina). Estas subunidades de pilina son translocadas a través de la membrana citoplasmática por la translocasa sec (Jones *et al.*, 1993, 1995), la chaperona periplasmática (FimC/PapD) se une a las distintas subunidades y se dirige a la plataforma de ensamblaje (FimD/PapC), donde el complejo es reconocido específicamente, la subunidad translocada a través del poro y FimC/PapD devuelta al periplasma para unirse a otra subunidad. La polimerización de las subunidades proteicas del pilus se produce mediante uniones no covalentes. Hay varias adhesinas que se

asocian a este pilus, una proteína específica que se une a carbohidratos de la superficie celular del hospedador (Sauer *et al.*, 2004; Capitani *et al.*, 2006), la subunidad proteica Afa/Dr de *E. coli* y el antígeno polimérico capsular F1. Por otra parte, las pilicidas (piridona) inhiben la biogénesis de las fimbrias impidiendo que las interacciones de las proteínas del sistema de secreción tengan lugar (Lo *et al.*, 2013).

Tabla 4.- Tipos de fimbrias en bacterias gram-negativas y gram-positivas.

Tipo	Genes	Biosíntesis	Características	Microorganismos
I	<i>fimA-fimH</i>	Mediada por chaperonas	Aglutinación de eritrocitos (MSHA y MRHA)	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Vibrio spp.</i> y otras enterobacterias.
II		Mediada por chaperonas	No hemaglutinantes	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>
III	<i>mrkA-mrkF</i> (<i>K. pneumoniae</i>)	Mediada por chaperonas	MRHA de eritrocitos pre-tratados con ácido tánico.	<i>Klebsiella spp.</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Yersinia spp.</i> , <i>Proteus spp.</i> , <i>Providencia spp.</i>
IV	<i>pil</i>	SSTII	Twitching	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>M. xanthus</i>
P	Operón <i>Pap</i> (<i>papA-papK</i>)	Mediada por chaperonas	<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC) o asociada a pielonefritis.	<i>Escherichia coli</i>
Curli		Nucleación/precipitación	Soluble. Apariencia enroscada.	<i>E. coli</i> , <i>Salmonella spp.</i>
Fibras		ND	Cortas (0,07-0,5 µm) y finas. 1-2 nm Ø	Estreptococos de la cavidad oral
Fimbrias		Sortasas (algunas)	Alargadas y flexibles.	<i>Corynebacterium spp.</i> , <i>Streptococcus spp.</i>

Fuente: Nature Reviews/ Microbiology. ND=no determinado.

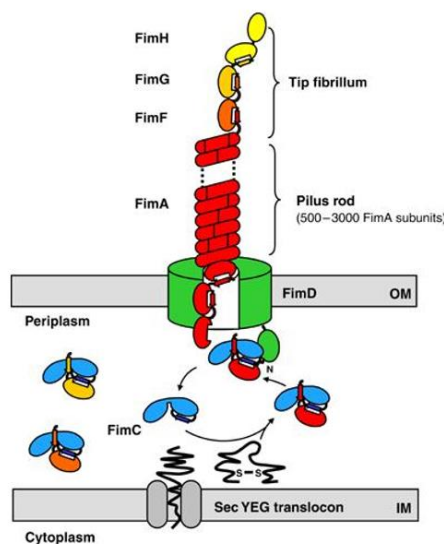


Figura 6.- Modelo esquemático de la biosíntesis de pili tipo I por la vía de la chaperona. Esquema sacado del artículo de Nishiyama *et al.* (2005).

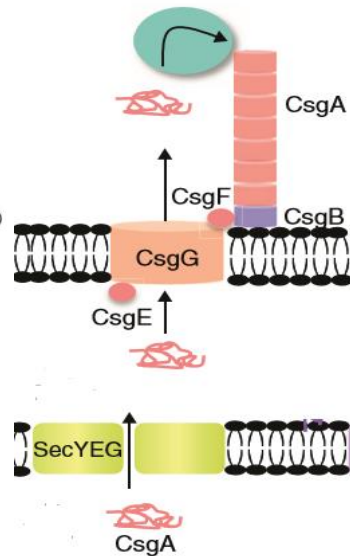


Figura 7.- Modelo de nucleación extracelular en la formación de curli. Esquema modificado sacado del artículo Lo *et al.* (2013).

Causan aglutinación sensible a la manosa (MSHA) de eritrocitos de cobaya (Duguid *et al.*, 1955; Brinton, 1965; Salit y Gotschlich, 1977a). Los antígenos del factor de colonización de *E. coli* son morfológicamente similares a las fimbrias tipo I, pero causan aglutinación resistente a la manosa (MRHA) en eritrocitos de humano y bovino. Sin embargo, ninguna cepa de *Phdp* descrita en la literatura ha sido capaz de aglutinar eritrocitos de rata, conejo, oveja, caballo, gallina, trucha y medregal (Yoshida *et al.*, 1997).

Los pili P de *E. coli* alcanzan 5-7 μm de longitud y 6,8 nm de diámetro (Kuehn *et al.*, 1992) y se consideran fundamentales en la virulencia de procesos de pielonefritis. Las fimbrias tipo I son apéndices rígidos, salvo en la posición de la adhesina que es flexible, y miden unos 7 nm de diámetro y 1-2 μm de largo. La adhesina se une específicamente al componente D-manosa de los receptores glucoproteicos y glucolipídicos de las células epiteliales; una mutación en el sitio de unión (Hung *et al.*, 2002) resulta en una atenuación de la virulencia del microorganismo (Chen *et al.*, 2009).

Mediante microscopía electrónica de alta resolución se ha comprobado la capacidad de las bacterias piliadas de adherirse e invadir las células diana, así como formar comunidades bacterianas intracelulares con propiedades como las de las biocapas (Mulvey *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 2003), lo que influye en la virulencia durante la patogénesis de infecciones por UPEC.

El pili denominado curli, de 1-2 μm de largo y 1-2 nm de diámetro, se genera mediante la polimerización de subunidades de proteína mayor –CsgA o curlina-, que no se parecen a ninguna otra pilina conocida, por un proceso de nucleación extracelular y precipitación (Bian y Normark, 1997) (Figura 7). La subunidad mayor es nucleada por una subunidad CsgB extracelularmente, previamente secretadas por la lipoproteína CsgG presente en la membrana externa; dos subunidades más –CsgF y CsgE-, que interactúan con la CsgG, son requeridas. El pili comparte características bioquímicas y estructurales con las fibras amiloides de eucariotas encontradas en algunas enfermedades degenerativas, como el Alzheimer, el Parkinson y enfermedades priónicas (Chapman *et al.*, 2002); sin embargo, a diferencia de estas fibras, su biosíntesis es un proceso altamente regulado y no todas las cepas de *E. coli* que codifican la subunidad estructural son capaces de generarla (Olsen *et al.*, 1989).

Los curli, se relacionan con los procesos de formación de biocapas, agregación celular, adhesión e invasión de células hospedadoras, y como un importante inductor de la respuesta inflamatoria. Son capaces de unirse a la fibronectina de la matriz extracelular del hospedador (Olsen *et al.*, 1989), ayudando en la colonización, y al plasminógeno, transformándolo en plasmina, cuya actividad anticoagulante degrada la fibrina de los coágulos sanguíneos facilitando la propagación de la bacteria (Proft y Baker, 2009). Estas estructuras también han sido caracterizadas como un patrón molecular asociado a patógeno (PAMPs), que activa la respuesta inmunológica innata del hospedador y estimula la expresión de IL-8 (Tukel *et al.*, 2005). Los curlicidas inhiben la formación de biocapas mediadas por curli, y vuelven a las cepas causantes de infección avirulentas (FN075) (Lo *et al.*, 2013).

Por otro lado, las fimbrias expresadas por las bacterias gram-positivas están constituidas por una única subunidad mayor de pilina y normalmente una o dos subunidades accesorias, de naturaleza adherente o no, localizadas al final o en la base.

Son biosintetizadas mediante un mecanismo de ensamblaje por enzimas sortasas (Telford *et al.*, 2006; Proft y Baker, 2009; Kline *et al.*, 2010; Danne y Dramsi, 2012) (Figura 8). Cada locus de pilina posee al menos una enzima sortasa C asociada, y casi todas las bacterias gram-positivas presentan además una clase de sortasa A, denominada sortasa housekeeping (de mantenimiento). Estas transpeptidasas reconocen la secuencia LPXTG de las subunidades proteicas translocadas por sec y se unen entre la treonina y la glicina formando una acil-enzima intermedia. Posteriormente, el lípido II precursor del péptidoglicano rompe ese enlace y la pilina se une covalentemente por el extremo C-terminal a la pared celular (Marraffini *et al.*, 2006). La unión entre subunidades se produce entre la treonina y glicina de la secuencia LPXTG con una lisina conservada de la subunidad vecina (Ton-That y Schneewind, 2003; Ton-That *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2007, 2009), hasta formar un pilus flexible de 0,3-3 μm de largo y 3-10 nm de diámetro (Telford, 2006). Cuanto más alta sea la expresión y disponibilidad de la subunidad mayor, esencial para la fimbriación, mayor longitud podrá alcanzar el pilus (Ton-That y Schneewind, 2003; Lauer *et al.*, 2005; Rosini *et al.*, 2006). Adicionalmente, una subfamilia de proteínas superficiales, conocida como MSCRAMMs (componentes bacterianos superficiales reconocedores de moléculas adherentes de la matriz), también son covalentemente unidas a los peptidoglicanos de la pared celular por la acción de sortasas, con capacidad de adherirse a proteínas de la matriz extracelular del hospedador, como fibrinógeno, fibronectina y colágeno (Vengadesan y Narayana, 2011) y polisacáridos relacionados con heparina (Patti *et al.*, 1994), importante para la colonización e invasión celular.

Además, estos pili pueden adherirse a los sustratos permitiendo que la bacteria forme microcolonias; la maduración de la biocapa implica la producción de una matriz adherente y protectora, compuesta por polisacárido extracelular, proteínas y ADN, capaz de resistir la acción de los antibióticos y planteando importantes problemas de salud (Beloin *et al.*, 2008). Su papel en la modulación de la respuesta inmunitaria del hospedador todavía requiere de más investigación, pero se ha descrito un aumento de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α y IL-6 en infecciones con cepas piliadas de *S. pneumoniae* en comparación con cepas no piliadas (Barocchi *et al.*, 2006); pili de *S. agalactiae* han sido involucrados en la modulación de la fagocitosis por macrófagos y

neutrófilos (Jiang *et al.*, 2012). Con todo esto, se explica su función en la virulencia de los patógenos.

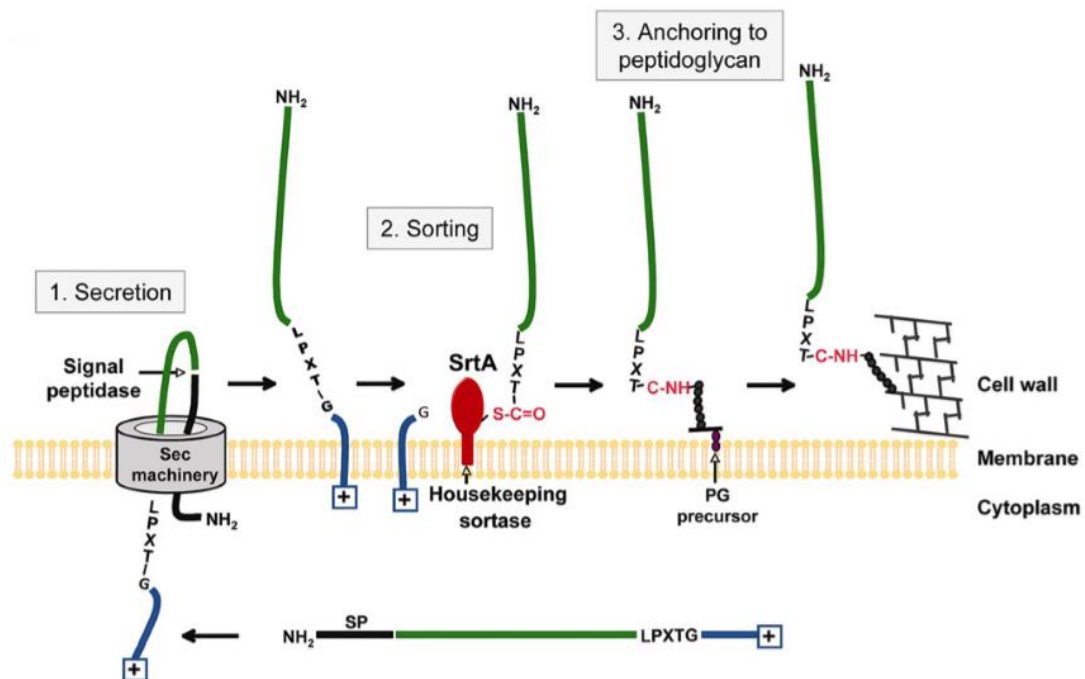


Figura 8.- Esquema de la biogénesis de fimbrias mediada por sortasas, característica de bacterias gram-positivas. Extraído del artículo de Danne y Dramsi (2012).

La biosíntesis de fimbrias está controlada por reguladores globales y locales de la transcripción y por un control post-transcripcional (Verdonck *et al.*, 2004), e influenciada por factores como la fase de crecimiento (Van der Woude *et al.*, 1990a), la composición del medio de cultivo (Girardeau *et al.*, 1982a y b), la temperatura (Van der Woude *et al.*, 1990b), el pH y la osmolaridad (Schwan *et al.*, 2002). Por lo que se trata de un proceso complejo e inestable, con niveles de expresión heterogéneos, que se pierden con frecuencia (Campal Espinosa *et al.*, 2008).

Estas estructuras son dianas prometedoras para el desarrollo de terapias contra la infección producida por microorganismos que presentan estos apéndices (Langermann *et al.*, 1997, 2000; Barreto *et al.*, 2001; Piatek *et al.*, 2005; Maresso y Schneewind, 2008; Cegelski *et al.*, 2009).

3.2. Fimbrias tipo IV.

Los pili tipo IV (T4P) son el tipo de fimbria que más frecuentemente se encuentra en bacterias gram-negativas y gram-positivas (Marrs *et al.*, 1985; Taylor *et al.*, 1987; Giron *et al.*, 1991; Mattick *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1998; Merz y So, 2000; Zhang *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2000; Gil *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2007; Pelicic, 2008), siendo las mejor estudiadas *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Myxococcus xanthus*.

Son filamentos finos y flexibles de 6-9 nm de diámetro y varios μm de longitud (Thanassi *et al.*, 2012), pero tienen una gran fuerza mecánica, pudiendo soportar fuerzas de 100 pN (Maier *et al.*, 2002). Se localizan a uno o ambos polos de la bacteria (Henrichsen 1975, Henrichsen 1983, Kaiser 1979), como apéndices individuales o formando grupos.

Las pilinas que los constituyen son proteínas estructurales de pequeño tamaño (7-20 KDa) con un extremo N-terminal α -hélice hidrofóbico conservado, que es un dominio transmembrana y de interacción proteína-proteína. Se expresan en forma de pre-pilina y luego son procesadas por una peptidasa especializada, PilD, localizada en el interior de la membrana (Strom *et al.*, 1993). La estructura del pilus la conforman, predominantemente -cientos de copias-, una subunidad mayor de pilina –PilA- (Parge *et al.*, 1995; Craig *et al.*, 2003, 2006; Ramboarina *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2011), codificada por el gen *pilA*, y otras subunidades menores, cuya nomenclatura varía según la especie bacteriana (Giltner *et al.*, 2012). Los componentes de estos sistemas –T4P, SSTII, TAD- se señalan en la [tabla 5](#).

Los T4P son producidos mediante una vía similar al sistema de secreción tipo II (SSTII) (Nunn, 1999; Sandkvist, 2001) ([Figura 9](#)). Algunos genes reguladores del proceso, aparte de *pilA*, son *pilB*, involucrado en la unión de nucleótidos que controlan la extensión del pili por polimerización de las subunidades de pilina (Villar *et al.*, 2001); *pilC*, que codifica la proteína transmembrana perteneciente a la familia GspF involucrada en el ensamblaje y adherencia (Winther-Larsen *et al.*, 2001), y *pilD*, que codifica para la enzima que procesa los precursores PilA y N-metila el primer aminoácido de la proteína madura ([Figura 10](#)). Pero ningún producto del gen *pil*

interviene en la inserción de la pilina dentro de la membrana interna, la ausencia de otros requerimientos sugiere que la inserción es espontánea (Bernstein, 1998). En total, unos 30 componentes aproximadamente forman parte de la maquinaria de ensamblaje de este pilus.

Tabla 5.- Nomenclatura de los componentes de fimbriación en bacterias gram-negativas y gram-positivas. Modificado del artículo de Melville y Craig (2013).

Proteína	Proteínas del sistema de ensamblaje			
	Bacterias gram-negativas		Gram-positivas	
	T4P ^a	SSTII ^b	TAD pili ^a	T4P ^c
Subunidades mayores de pilina/ pseudopilinas	PilA	GspG	Flp	PilA
Subunidades menores de pilina/ pseudopilinas	FimU, PilV, PilW, PilX, PilE	GspH, GspI, GspJ, GspK	TadE, TadF, TadG	Varias proteínas
ATPasa de ensamblaje	PilB	GspE	TadA	PilB
Proteína de membrana interna	PilC	GspF	TadB, TadC	PilC
Peptidasa pre-pilina	PilD	GspO	TadV	PilD
Secretina de membrana externa	PilQ	GspD	RcpA	
ATPasa de retracción	PilT, PilU			PilT
Proteína accesoria de membrana interna	PilM, PilN, PilO	GspL, GspM	TadG, TadZ	PilM, PilN, PilO

^aNomenclatura para *P. aeruginosa*; ^bNomenclatura general del sistema de secreción;

^cNomenclatura de *C. perfringens*.

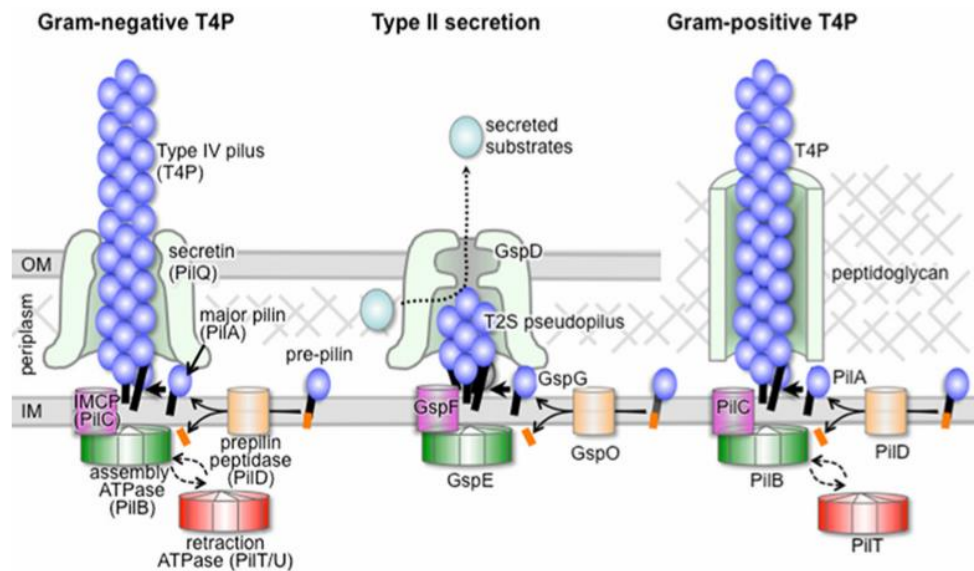


Figura 9.- Modelo esquemático de los sistemas de biogénesis de pili tipo IV y de secreción tipo II. Obtenido del artículo de Melville y Craig (2013).

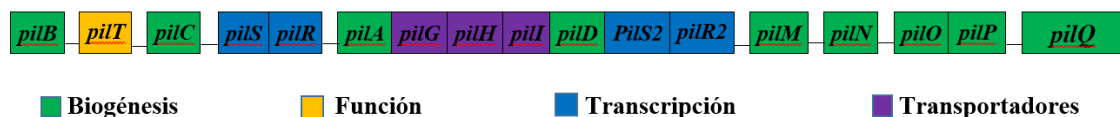


Figura 10.- Mapa genético del grupo de genes *pil* de *Myxococcus xanthus*.

El nombre de los genes son los homólogos en *Pseudomonas aeruginosa*, excepto *pilG*, *pilH* y *pilI*, que sólo están presentes en *M. xanthus*. Imagen modificada a partir del artículo de Wall y Kaiser (1999).

Estos pili se dividen en dos subgrupos, tipo IVa y IVb, atendiendo a las características de la subunidad mayor de pilina y a la organización y composición génica del pilus (Pelicic, 2008); los sistemas de *P. aeruginosa* y *Neisseria spp.* son los prototipos del subgrupo IVa, y los pili formando grupos (BFP) de *E. coli*

enteropatógeno y corregulada por toxina (TCP) de *Vibrio cholerae*, del IVb. Y aunque la estructura de la fimbria en ambos grupos es similar, diferencias en el tamaño de las subunidades constituyen fibras de distinto tamaño, siendo mayores las del tipo IVb (Craig *et al.*, 2004, 2006; Ramboarina *et al.*, 2005); existiendo también diferencias en la dirección de conformación de la hélice (Campos *et al.*, 2011).

Están involucrados en un amplio abanico de procesos bacterianos (Burrows, 2005; Hansen y Forest, 2006; Craig y Li, 2008; Pelicic, 2008), algunos comunes a los otros tipos de fimbrias, como son la adhesión y colonización de superficies –bióticas e inertes- (Manning y Meyer, 1997; Darzins y Russell, 1997; Stabb y Ruby, 2003; Boyd *et al.*, 2008; Hadi *et al.*, 2012), determinación de tropismo (Parkinson, 1993), formación de biocapas (Hadi *et al.*, 2012), y virulencia de la bacteria (Masada *et al.*, 2002; Josenhans y Suerbaum, 2002; Krukoniš y DiRita, 2003). Otras funciones propias de estos pili son captación de ADN y fagos (Manning y Meyer, 1997), “social gliding motility” (Wall y Kaiser, 1999) o “twitching motility” (Darzins y Russell, 1997; Mattick, 2002), y transferencia de electrones (Reguera *et al.*, 2005; Malvankar y Lovley, 2012). Sin embargo, su relación con las distintas secuencias y estructuras de las pilinas es un aspecto de la biología del pilus que aún se conoce poco.

Se ha descrito como un importante factor de virulencia en patógenos de humanos, de plantas y animales e incluso, peces (*Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, *Vibrio anguillarum*) (Kang *et al.*, 2002; Masada *et al.*, 2002; Craig *et al.*, 2004; Essex-Lopresti *et al.*, 2005; Paranjpye *et al.*, 2007; Boyd *et al.*, 2008; Frans *et al.*, 2013). Pueden estar involucrados también en relaciones de simbiosis bacteria-hospedador, como es el caso de *Vibrio fischeri* (Browne-Silva y Nishiguchi, 2008).

Estas estructuras son capaces de adherirse a distintas superficies, desde metal, vidrio y plástico hasta rocas, plantas y tejidos animales (Giltner *et al.*, 2012). La fijación a superficies inertes parece ocurrir por una vía no específica (Sun *et al.*, 2000; Skerker y Berg, 2001).

Se ha indicado la capacidad de las subunidades mayores de pilina de actuar como adhesinas (Lee *et al.*, 1994; Scheuerpflug *et al.*, 1999; Tsui *et al.*, 2003; Hyland *et al.*, 2008). La adhesina del pilus de *P. aeruginosa* se une específicamente a glucolípidos asialo-GM1 expresados por las células epiteliales (Lee *et al.*, 1994; Hazes *et al.*, 2000),

pero no está claro que use este receptor durante la adherencia *in vivo* (Schroeder *et al.*, 2001), es más, hay evidencias de que la proteína PilY1 asociada al pilus ejerce de adhesina bastante más que la subunidad principal de pilina (Heiniger *et al.*, 2010). Por otro lado, las fimbrias tipo IV de *Neisseria* sp. se unen a los receptores específicos CD46 y MCP de células endoteliales (Kallstrom, 1997; Weyand *et al.*, 2006), al contrario de lo que afirma Kirchner *et al.* (2005), y son capaces de aglutinar eritrocitos (Scheuierpflug *et al.*, 1999).

Las subunidades menores pueden también influir en las interacciones mediadas por fimbrias para la agregación y formación de microcolonias (Helaine *et al.*, 2005, 2007), no afectando a la constitución del pilus, pero sí a la longitud del mismo, al incorporar subunidades de pilina con distintos sitios de unión y confiriendo especificidad al T4P.

Los pili tipo IV intervienen asimismo en la invasión celular, incluso atravesando barreras en el hospedador (Coureuil *et al.*, 2009), y en la diseminación de la infección (Tanassi *et al.*, 2012).

La capacidad de formar biocapas se reduce en cepas que no presentan pili (O'Toole y Kolter, 1998), dejando patente su participación en la adherencia y agregación bacteriana. Además, el “twitching” (se explica en el apartado 3.3 de la Introducción), parece jugar un papel importante en la formación y arquitectura de la biocapa, permitiendo que las bacterias se muevan a zonas concretas del mismo (Klausen *et al.*, 2003a y b; Chiang y Burrows, 2003; Saville *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha puntualizado que la estimulación de la motilidad en etapas tempranas del desarrollo de la biocapa puede reducir las uniones irreversibles y, por tanto, la formación de la propia biocapa (Glick *et al.*, 2010).

Estas fimbrias también funcionan como un importante sistema de adquisición de ADN exógeno, actuando de receptores de fagos y participando en los procesos de competencia y conjugación (Chen y Dubnau, 2003; Averhoff, 2004) en respuesta a señales específicas del medio (Meibom *et al.*, 2005). Y aunque el mecanismo exacto no está claro, se sabe que se requiere de todos los componentes de este sistema para que ocurra. De hecho, alguno de ellos -PilQ y PilG, entre otros- se pueden unir directamente

al ADN y no sólo participar de forma indirecta mediante la biogénesis del pilus (Assalkhou *et al.*, 2007; Lang *et al.* 2009). Pueden participar además en la transferencia de genes de resistencia a antibióticos y toxinas presentes en transposones, contribuyendo a la propagación de resistencias. Se ha observado que la ausencia de pili, incluso la delección de algún locus completo, hace que se pierda competencia (Burton y Dubnau, 2010) y disminuya la virulencia en ratones (Collyn *et al.*, 2002).

Existen bacterias medioambientales, *Geobacter sulfurreducens* y *Geobacter metallireducens*, que tienen la propiedad de conducir electrones (Reguera *et al.*, 2005; Malvankar y Lovley, 2012), lo que les permite crecer en condiciones anaerobias gracias al contacto del pilus con receptores de electrones terminales (vivos y no vivos, en el caso de biocapas) externos a la célula. Además, tienen la capacidad de reducir hierro y óxido de manganeso insolubles y precipitar otros metales potencialmente tóxicos, como el uranio, jugando un papel importante en la biogeoquímica y biorremediación (Lovley *et al.*, 2011). Otra característica de estas fimbrias de *Geobacter* es que pueden formarse incluso en ausencia de la subunidad mayor de pilina PilA, pero no cuando los genes de las subunidades menores están inactivados, lo que sugiere que esta especie presenta múltiples tipos de T4P.

3.3. Twitching motility

El término “twitching motility” fue introducido por Lautrop (1961) y es como se denomina al tipo de motilidad (Ottow, 1975; Strom y Lory, 1993; Wall y Kaiser, 1999), independiente de la movilidad flagelar, que se produce sobre superficies sólidas por la acción de pili tipo IV (IVa), mediante una rápida y reversible extensión y retracción del mismo (Figura 11) (Mattick, 2002; Nudleman y Kaiser, 2004; Burrows, 2005; Thanassi *et al.*, 2012). No se asocia a ningún otro tipo de fimbria, sólo a esta clase de pili (Ottow, 1975), y el desplazamiento se puede describir como: a modo de “tirones” o “saltos”.

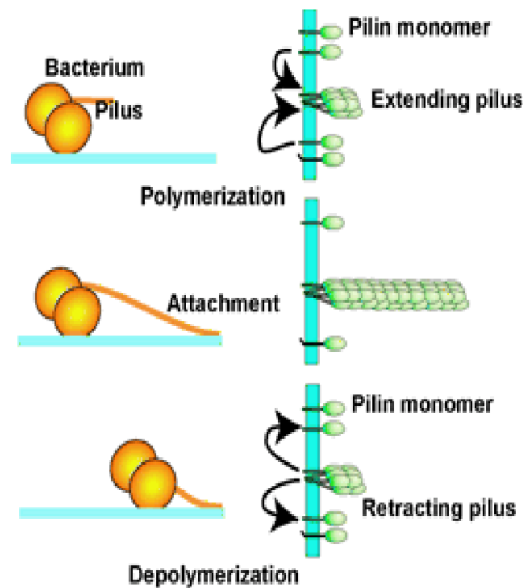


Figura 11.- Modelo de motilidad por fimbrias tipo IV para *Neisseria gonorrhoeae* (Nature reviews/ Microbiology).

La acción de una segunda ATPasa hexamérica citoplasmática, la ATPasa de desensamblaje PilT (Figura 9), es lo que hace que el pilus se retraiga (Satyshur *et al.*, 2007; Misic *et al.*, 2010). Se cree que actúa desmontando las subunidades de pilina desde la base del pilus, liberándolas de regreso a la membrana citoplasmática (Morand *et al.*, 2004). Las bacterias mutantes que carecen de esta enzima aparecen hiperpiliadas, debido a que la ATPasa de ensamblaje PilF todavía presenta actividad, pero no sucede su retracción. En consecuencia, la bacteria no es capaz de moverse.

Bradley (1972a y b, 1980) descubrió la retracción del pilus al observar cómo se acortaba tras el acoplamiento de un bacteriófago, haciendo que entrara en contacto con la superficie de la bacteria. De ahí afirmó que esa retracción era la responsable del movimiento del microorganismo. Por otro lado, hay evidencias de que el IVb BFP de UPEC, aun siendo retráctil (Humphries *et al.*, 2010; Zahavi *et al.*, 2011; Aroeti *et al.*, 2012), no está involucrado en el twitching.

El desplazamiento puede ser aleatorio o dirigido, por ejemplo, por fenómenos de quimiotaxis y tropismo, pudiéndose modificar la dirección del mismo (Henrichsen, 1972), incluso en vertical (“walk upright”), facilitando la exploración de la superficie y favoreciendo la formación de biocapas (Gibiansky *et al.*, 2010). La cianobacteria

Synechocystis se mueve hacia fuentes de luz, y *M. xanthus* y *P. aeruginosa*, hacia gradientes de fosfolípidos (Bonner y Shimkets, 2006; Burriesci y Bhaya; 2008; Miller *et al.* 2008). Parece, además, una estrategia de la bacteria para migrar en ambientes con escaso contenido de agua y colonizar superficies hidratadas (Mattick, 2002).

El “twitching” puede ser esencial durante la patogénesis. Errores en la retracción de la fimbria pueden preservar la capacidad de la bacteria para adherirse a la célula huésped, pero atenúan las interacciones posteriores y reducen la citotoxicidad (Bieber *et al.*, 1998; Comolli *et al.*, 1999; Merz *et al.*, 1999; Pujol *et al.*, 1999; Han *et al.* 2008; Zahavi *et al.* 2011). Mientras que una correcta retracción del pilus, permite un mayor acercamiento y adherencia de la bacteria a la célula del hospedador y la formación de microcolonias tridimensionales estables en la superficie celular (Pujol *et al.*, 1999; Jude y Taylor, 2011), además de inducir las respuestas celulares durante la colonización bacteriana (Merz *et al.*, 1999; Howie *et al.*, 2005; Dietrich *et al.*, 2011).

Macroscópicamente, la manifestación de la motilidad “twitching” puede visualizarse por el crecimiento en agar de colonias planas extendidas, con apariencia rugosa y con una pequeña área periférica de “twitching”, que consiste en una fina capa de células (Mattick *et al.*, 1996; Semmler *et al.*, 1999). En algunas especies, la zona que se describe sólo es visible microscópicamente (Wolfgang *et al.*, 1998). Pero se consigue mayor actividad en el espacio entre el agar y el plástico o cristal, con velocidades de expansión de 1mm/h, obteniendo halos (zonas de twitching) largos pero delgados, de aproximadamente 2-3 cm de diámetro, después de una noche de incubación (Semmler *et al.*, 1999), sugiriendo que la superficie del agar normalmente secada al aire puede actuar como un factor de inhibición, debido presumiblemente a irregularidades en la superficie que no ocurren cuando solidifica por la parte que contacta con una superficie sólida uniforme. Para una mejor observación de la zona de twitching, no desarrollada en bacterias mutantes carentes de pili/twitching motility, se puede teñir con, por ejemplo, Coomassie blue (Alm y Mattick, 1995).

Aunque esta motilidad se define como “social”, se ha observado que bacterias individuales pueden realizar limitados movimientos por twitching en contacto con superficies inertes –vidrio, cuarzo, poliestireno-, o a bajas concentraciones de agar (Merz *et al.*, 2000; Skerker y Berg, 2001; Sun *et al.*, 2000).

OBJETIVOS



OBJETIVOS

La acuicultura es uno de los sectores productivos con mayor ritmo de crecimiento. Es, además, responsable de más de la mitad del suministro de pescado para consumo humano. Sin embargo, la incidencia de enfermedades en este sector comporta en ocasiones importantes pérdidas económicas.

La fotobacteriosis es una de las enfermedades de peces más importantes, la primera en Canarias, y que más mortalidad produce en la acuicultura marina. Afecta fundamentalmente a los cultivos de dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y lenguado (*Solea solea*), que son algunas de las especies más cotizadas por los consumidores, principalmente en Europa y España.

Se ha descrito la presencia de apéndices largos, similares en apariencia a pili en varias cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Remuzgo-Martínez *et al.*, 2014), por lo que nuevas características de este patógeno, como motilidad y adherencia a superficies sólidas, podrían estar mediadas por estas estructuras. Estos hallazgos fueron nuestro punto de partida para la realización de este trabajo y serán desarrollados a lo largo del mismo.

A continuación, los objetivos que nos hemos planteado han sido:

1.-Objetivo general

Estudio de factores de patogenicidad en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

2.-Objetivos específicos

- Determinar la presencia en *Phdp* de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad.
- Establecer qué condiciones de cultivo son las más adecuadas para el desarrollo de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en *Phdp*.

- Estudiar la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la capacidad de adherencia e invasión de *Phdp* a líneas celulares.
- Estudiar la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la capacidad de modulación de la respuesta inmunitaria en dorada.

MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Determinación de la presencia de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

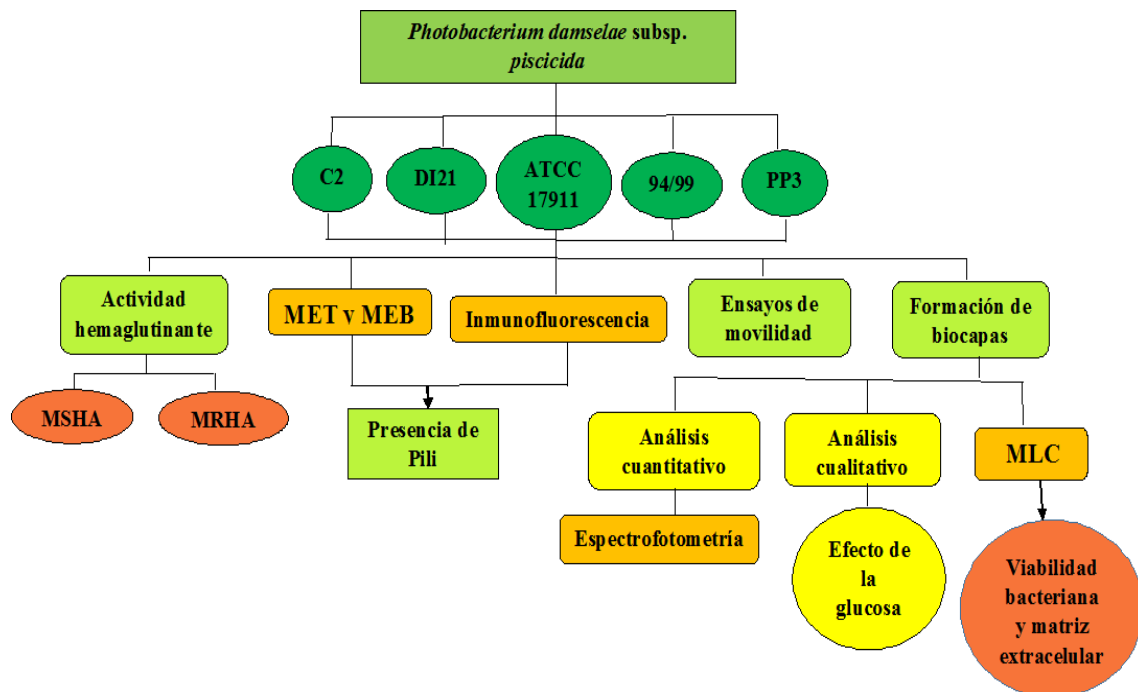


Figura 12.- Esquema de los ensayos realizados en la primera fase del estudio.

1.1. Cepas bacterianas

Las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*) estudiadas se recogen en la [tabla 6](#).

Tabla 6.-Cepas bacterianas utilizadas en este estudio.

Cepa	Fuente de aislamiento	País de aislamiento	Fuente/Referencia
94/99	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	España	Real <i>et al.</i> , 1997.
C2	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	España	Real <i>et al.</i> , 1997.
PP3	Medregal del Japón (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Japón	Cedida por el Dr. Andrew Barnes.
ATCC 17911	Perca americana (<i>Roccus americanus</i>)	EE.UU.	Snieszko <i>et al.</i> , 1964.
DI-21	Dorada (<i>Sparus aurata</i>)	España	Toranzo <i>et al.</i> , 1991.

Se realizó la identificación de todas las cepas mediante pruebas microbiológicas en tubo y placa, para determinar morfología, fisiología y bioquímica, y por técnicas moleculares (PCR) (Osorio *et al.*, 2000) (Figura 13).

Los medios de cultivo utilizados fueron infusión cerebro-corazón agar (BHIA) o caldo (BHIB) suplementados con 1,5% de cloruro sódico (NaCl), y la temperatura de incubación, 25°C.

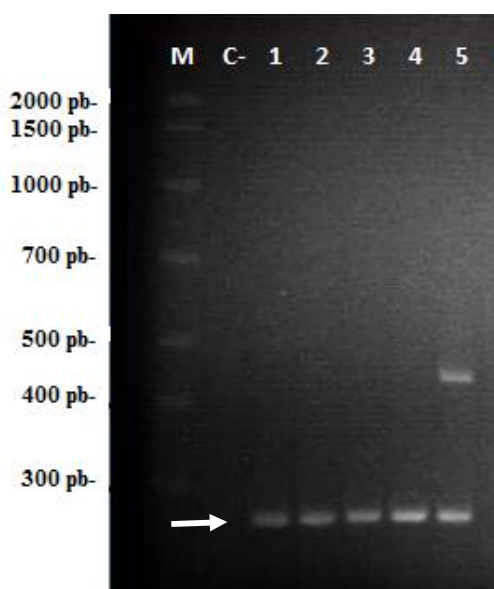


Figura 13.- Electroforesis en gel de agarosa (2%) teñido con Midori Green después de una PCR para identificación de *Phdp*. Banda esperada de 267 pb (flecha). M: marcador de peso molecular 50-2000 pb (Biorad); C-: blanco; 1-4: cepas de *Phdp*: C2, 94/99, DI21 y PP3; 5: *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* CECT 5061 (bandas de 267 y 448 pb).

1.2. Hemaglutinación (HA)

Se evaluó la actividad hemaglutinante de las distintas cepas con eritrocitos humanos del grupo sanguíneo A y con eritrocitos de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) cultivados en Santander. A su vez, se determinó la sensibilidad de esas aglutinaciones a la D-manosa. Los eritrocitos humanos fueron obtenidos de voluntarios sanos, previo consentimiento informado, en el Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander. Los peces para la extracción de sangre fueron cedidos por Inés García de la Banda, del Instituto Oceanográfico Español (Santander).

Tras 48 horas de crecimiento de las cepas en BHIA, varias colonias fueron resuspendidas en tampón fosfato salino (PBS). Volúmenes iguales de 25 µl de estas suspensiones fueron mezcladas con una suspensión de eritrocitos al 10%, con y sin D-manosa (1%) (Sigma), sobre un portaobjetos. La mezcla se mantuvo a temperatura ambiente (T_a) y en constante balanceo durante un tiempo máximo de un minuto. El examen de cada reacción fue visual y la hemaglutinación fue considerada resistente a la D-manosa (MRHA) cuando ésta ocurría aún con la adición de D-manosa a la mezcla.

1.3. Microscopía electrónica de transmisión (MET)

Las cepas de *Phdp* fueron examinadas mediante MET con el objetivo de confirmar la presencia de fimbrias. Para las preparaciones se usaron rejillas de cobre de 100 celdillas recubiertas de formvar (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, Pennsylvania, USA). Se secaron bien las muestras con un papel de filtro y se tiñeron con ácido fosfotúngstico al 1% en agua destilada durante 20 segundos. Finalmente, se observaron con un microscopio JEOL (JEM-1011), operando a 80 kV y equipado con una cámara digital ORIUS SC 1000 CCD (GATAN).

1.4. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Las bacterias fueron fijadas sobre cubreobjetos redondos de vidrio (12 mm) con paraformaldehído (PFA) comercial (Aname, Barcelona, España) al 3,2% (pH 7,4)

durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizaron tres lavados con PBS y se tiñeron con un anticuerpo (Ac) policlonal anti-*Phdp* (hecho en conejo; cepa 94/99) (Acosta *et al.*, 2002) durante 20 minutos. Tras otros tres lavados, se añadieron los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 594 o 488 anti-conejo (Invitrogen). Después de 20 minutos con cada Ac. 2º, las lentillas fueron lavadas nuevamente y se procedió a su montaje sobre un portaobjetos aplicando medio de montaje Fluoroshield que contiene 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) (Sigma Aldrich). Todos los anticuerpos utilizados fueron previamente diluidos 1:1000 en una solución al 1% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) en PBS.

Las preparaciones fueron examinadas con un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axiovert 200 armado con una cámara digital Zeiss Axiocam HRC para la toma de imágenes. Las fotografías se procesaron con el programa Photoshop CS3 (Adobe).

1.5. Ensayos de motilidad bacteriana

Los ensayos de motilidad fueron llevados a cabo como se describen en el trabajo de Vivas *et al.* (2008), con algunas modificaciones. De forma breve, se prepararon placas de Petri y placas de 6 pocillos (Corning) con medio BHIB suplementado con 1,5% NaCl y 0,2-0,4% de agarosa (Pronadisa). Se dejaron secar durante la noche a temperatura ambiente, para, posteriormente, ser inoculadas con la bacteria mediante picadura, usando palillos planos de madera estériles. Las placas se incubaron durante 48 horas a 25°C. Se prepararon los inóculos para las placas mediante dilución (1:1000) con PBS ($DO_{620} \sim 0,05$) de cultivos de 48 horas mantenidos a 25°C en agitación (BHIB+1,5% NaCl).

Las dimensiones de las zonas de swarming y twitching fueron observadas macroscópicamente. La superficie de poliestireno de las placas fue examinada tras retirar cuidadosamente el agar, hacer lavados para arrastrar las bacterias no adheridas y teñir las bacterias adheridas con una solución de cristal violeta al 0,7% (p/v) durante 12 minutos.

1.6. Formación de biocapas

Se realizó la estimación cuantitativa de la formación de biocapas siguiendo el protocolo de Vivas *et al.* (2008), con ligeras modificaciones. Para ello, se preparó una solución bacteriana para cada cepa a partir de 2-3 colonias de un cultivo sólido, con una densidad óptica (DO) final a 620 nm de ~0,05. Por otro lado, se procedió a inocular placas de 96 pocillos –con fondo en U- conteniendo 130 µl de medio de cultivo cada uno, con 20 µl de suspensión de *Phdp*. Las placas fueron incubadas a 25°C durante 48 horas.

A continuación, se desechó el medio de cultivo sobre un papel absorbente por inversión de la placa y tapping, y se realizaron tres lavados con agua destilada. Las bacterias adheridas a los pocillos fueron teñidas durante 12 minutos con 170 µl de cristal violeta (CV; 0,7%, p/v, solución) por pocillo. El exceso de tinción fue eliminado con tres lavados con agua destilada. Las placas se dejaron secar dentro de campana de seguridad biológica durante 12 minutos y posteriormente el cristal violeta fue extraído con 150 µl de ácido acético al 33%. Las placas se dejaron 1 minuto a temperatura ambiente en un agitador orbital de placas a 400 r.p.m. para facilitar la extracción del colorante. A continuación, se transfirieron 100 µl de cada pocillo a una placa de 96 con fondo plano y la cantidad de colorante, proporcional a la cantidad de bacterias adheridas, fue cuantificada espectrofotométricamente a 620 nm en un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Fisher). A cada valor se le restó el valor de los pocillos control (que contenían solo medio de cultivo). Estos experimentos se realizaron por triplicado, con ocho pocillos por cepa en cada ensayo.

Se realizó también análisis cualitativo de la formación de biocapas en placas de 24 pocillos a lo largo de 6 días, mediante tinción con CV, aumentando los volúmenes proporcionalmente.

Para el estudio del efecto de la glucosa en la formación de biocapas, se dejaron los cultivos durante 6 días en medio BHIB suplementado con un 1,5% de glucosa.

1.7. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las bacterias fueron inoculadas en pocillos de placas de 24 que contenían cubreobjetos redondos (12 mm de diámetro). A distintos tiempos, las bacterias fueron fijadas en frío con glutaraldehído al 3% durante 20 minutos. Las muestras fueron deshidratadas mediante pases por diluciones seriadas de etanol (30%, 50%, 70%, 90% y 100%) de 10 min cada uno y sometidas a secado de punto crítico, revestidas luego con oro coloidal en un pulverizador iónico de capa fina JFC-1100 (JEOL) y observadas con un microscopio Inspect S (FEI Company) trabajando a 15-20 kV.

1.8. Microscopía láser confocal de barrido (MLC)

Las cepas fueron inoculadas sobre cubreobjetos de cristal en placas de 24 pocillos o en portaobjetos con 4 μ -cámaras (Ibidi, Martinsried), e incubadas hasta 6 días a 25°C sin agitación. Las bacterias no adheridas fueron retiradas mediante lavado con solución salina (0,85% NaCl) para tinción de vivas y muertas, o con agua destilada para teñir la matriz extracelular con FilmTracer (Invitrogen), indicado para el análisis de biocapas.

Las muestras para MLC fueron preparadas del mismo modo que para inmunofluorescencia, pero sin fijación. Se determinó la viabilidad bacteriana en las biocapas con el kit LIVE/DEAD BackLight (Molecular Probes Inc.). A su vez, para la visualización de la matriz, las biocapas –en las μ -cámaras- fueron teñidas con 200 μ l de FilmTracerTM SYPRO® Ruby BiofilmMatrix (Invitrogen) e incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad, con un único lavado final. El ADN bacteriano fue teñido con una gota de NucBlue (Molecular Probes), aplicada durante 30 minutos. Se utilizó como control positivo un aislado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*, que produce una biocapa densa y compacta con abundante matriz extracelular.

Para la visualización de las biocapas y LIVE/DEAD se utilizó un microscopio Nikon A1R. Las longitudes de onda de excitación y los filtros emisores empleados fueron, para cada tinción: 488/561 nm y 500-550/570-620 nm para LIVE/DEAD, 405 nm y 662-737 nm para FilmTracer, y 375-390 nm y 420-490 nm para NucBlue.

Las imágenes fueron capturadas aleatoriamente con un objetivo Plan Apo 20x NA 0,75. Las reconstrucciones de las secciones verticales fueron ensambladas con el programa NIS-Elements 3.2 y representadas en 3D con el programa de software libre ImageJ (www.imageJ.net).

La figura 12 muestra un esquema de los ensayos realizados en esta primera sección.

2. Establecimiento de las condiciones adecuadas para el desarrollo de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

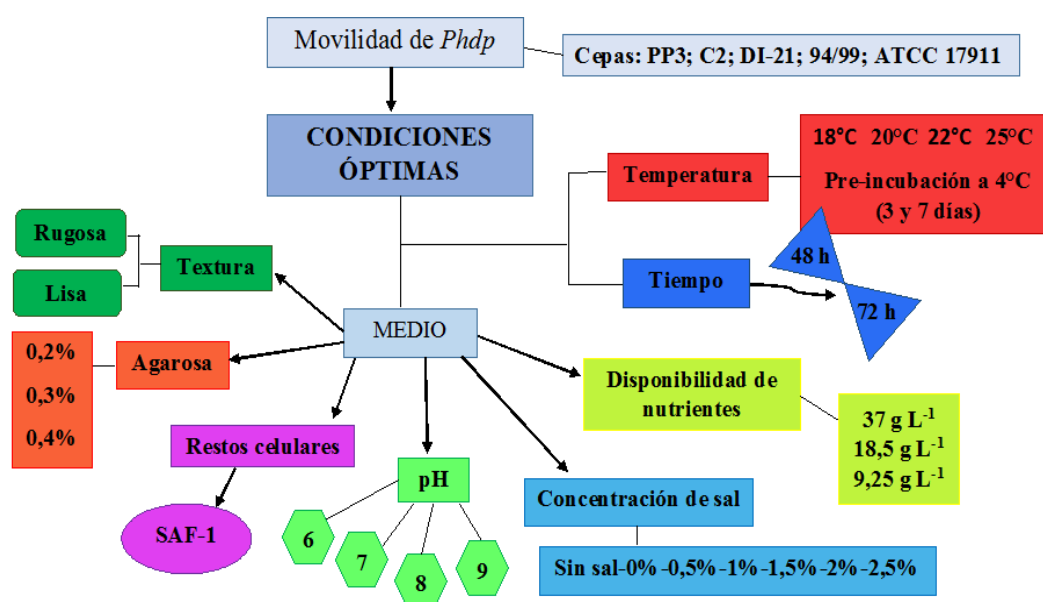


Figura 14.- Esquema del ensayo de motilidad bacteriana en distintas condiciones de cultivo.

2.1. Cepas bacterianas

Se utilizaron para este estudio las mismas cepas que para el estudio anterior (Tabla 6).

Las bacterias fueron cultivadas en BHIA suplementado con 1,5% de cloruro sódico e incubadas a 22°C durante 24 horas. Para la preparación del inóculo de los experimentos, 1-5 colonias fueron resembradas en 10 ml de BHIB con 1,5% NaCl e incubadas durante 24 horas a temperatura ambiente sin agitación y en oscuridad. Finalmente, el cultivo ($DO_{600} \sim 0,45$) fue diluido 1:100 en PBS.

2.2. Ensayos de motilidad bacteriana

Al igual que durante el primer ensayo, se prepararon placas de Petri (90 mm Ø) con medio BHIB suplementado con 1,5% NaCl y 0,3% de agarosa D-1 Low EEO, (Pronadisa) y fueron inoculados al día siguiente mediante picadura, utilizando palillos planos de madera estériles, realizando punciones en tres puntos de la placa. Los cultivos fueron incubados a 22°C durante 48 y 72 horas.

Se modificaron las condiciones de cultivo y las concentraciones de los distintos componentes del medio. Las zonas de twitching fueron medidas a las 48 y 72 horas con el objetivo de determinar qué condiciones favorecen la motilidad en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Los experimentos se realizaron por triplicado.

Para una mejor observación, las zonas de movilidad con las bacterias adheridas fueron teñidas con CV al 0,7% (p/v) durante 12 minutos, previa retirada del medio.

Esta fase se esquematiza en la figura 14.

2.2.1. Temperatura de incubación

Los cultivos fueron incubados a 18°C, 20°C, 22°C y 25°C. Por otra parte, algunas placas fueron mantenidas a 4°C durante 3 y 7 días antes de ser incubados a 22°C.

2.2.2. pH

El medio fue ajustado para un pH final de 6, 7, 8 y 9.

2.2.3. Concentración de nutrientes

La cantidad de BHIB añadida al medio fue reducida a la mitad y a un cuarto para evaluar cómo afecta la disponibilidad de nutrientes a la movilidad bacteriana.

2.2.4. Salinidad del medio

El medio fue suplementado con 0; 0,5; 1; 1,5; 2, y 2,5% de cloruro sódico. También, se usó medio de salinidad que no contenía NaCl (0,3% de agarosa, 0,1% de extracto de levadura, 0,4% de peptona; p/v).

2.2.5. Concentración de agar

Se estudió el efecto producido por el grado de solidificación del medio, para ello se compararon concentraciones de agar del 0,2; 0,3 y 0,4%.

2.2.6. Textura del sustrato

Se examinó la formación de biocapas, la adherencia bacteriana y la motilidad sobre superficies lisas y rugosas. Para crear rugosidad en el fondo de las placas de Petri, éstas fueron raspadas con unas tijeras estériles dibujando una “W” en todas direcciones; posteriormente se añadió el medio de cultivo.

2.2.7. Presencia de restos celulares en el medio

Se sabe que *Phdp* es capaz de adherirse, invadir y sobrevivir en células SAF-1 (Acosta *et al.*, 2009), por lo que se decidió añadir restos celulares al medio de cultivo con la intención de que la bacteria mostrara algún tipo de tropismo o incrementara la expresión de factores de adherencia/motilidad. La línea SAF-1 es una línea celular constituida por células fibroblásticas de aleta de dorada (Bejar *et al.*, 1997).

Las células, cultivadas en frascos de 75 cm³, fueron tripsinizadas y diluidas con PBS hasta una DO₆₀₀ de ~0,4. Y esta dilución fue, a su vez, diluida 1:2, 1:4 y 1:8. Diez mililitros de cada dilución fue mezclada con un volumen de medio de 200 ml.

2.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp.). Se usaron modelos lineales generales multivariante (pruebas de Tukey, Duncan y Hochberg) para comparar los datos de los diferentes grupos experimentales de cada ensayo a las 48 y 72 horas, y univariante para analizar la motilidad habida entre los dos puntos de recogida de datos (48 y 72 horas) para cada grupo. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p \leq 0.05$.

3. Estudio *in vitro* de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la capacidad de adherencia e invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en línea celular SAF-1.

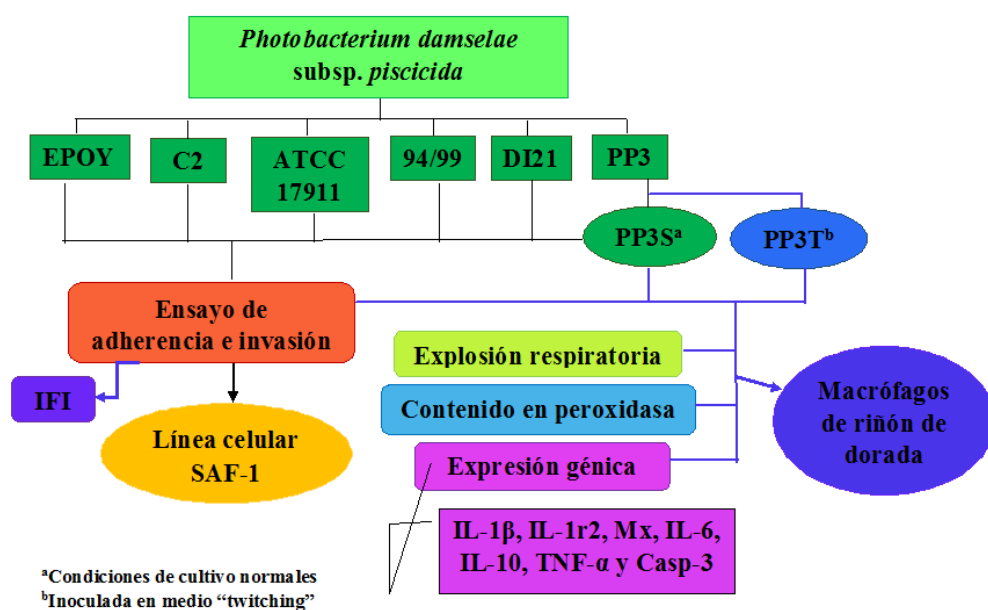


Figura 15.- Esquema de las fases 3 y 4 de este estudio.

3.1. Cepas bacterianas y línea celular

Se examinó la capacidad de adherencia e invasión en células no fagocíticas de las cepas de *Phdp* (Tabla 6) pero, además, se incluyó la cepa EPOY 8803-II, aislada en 1988 de mero (*Epinephelus akaara*) en Japón (Noya *et al.*, 1995b) y cedida por el Dr. K. Muroga (Facultad de Ciencias Biológicas Aplicadas, Universidad de Hiroshima, Japón).

Posteriormente, se seleccionó la cepa PP3 para el estudio de la influencia de las fimbrias en los procesos de adherencia e internalización de la bacteria.

Las cepas fueron cultivadas en BHIA con 1,5% NaCl y se incubaron a 25°C durante 24 horas; posteriormente, en BHIB a 25°C durante otras 24 horas, en agitación para el primer experimento, y en estático y oscuridad para el segundo.

La línea celular utilizada fue la SAF-1 (Figura 16), como se comentó anteriormente, de naturaleza fibroblástica y derivada de la dorada (Bejar *et al.*, 1997). Las células fueron cultivadas en medio Leibovitz L-15 (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) suplementado con un 5% de suero bovino fetal (FBS) y un 1% de una solución antibiótica y micótica (100 U mL⁻¹ de penicilina + 100 mg mL⁻¹ de estreptomicina), e incubadas a 22°C en atmósfera aerobia.

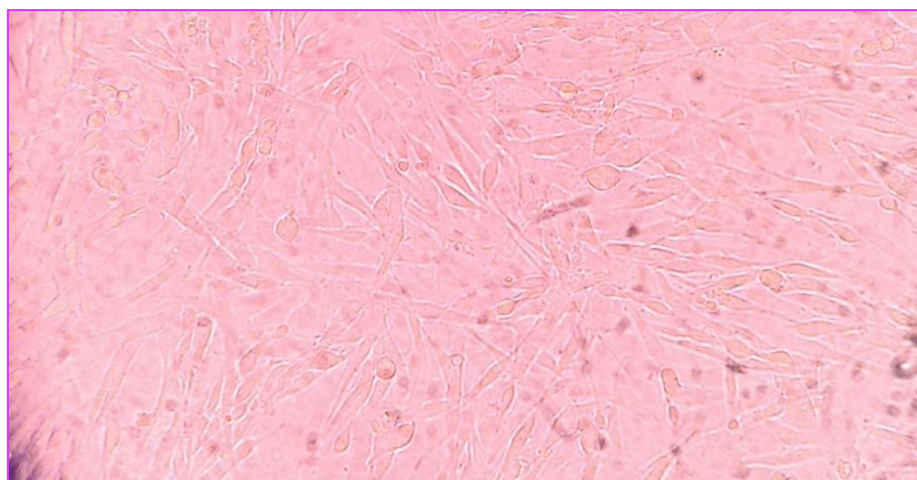


Figura 16.- Línea celular SAF-1.

3.2. Experimentos de adherencia e invasión

Para los experimentos de adherencia e invasión se procedió según Acosta *et al.* (2009), con ligeras modificaciones. Se prepararon cultivos con células SAF-1 en placas de 24 pocillos, con una densidad por pocillo de 10^5 células. Se mantuvieron con medio L-15 suplementado con 2% de FBS, pero sin antibiótico. Los cultivos líquidos de *Phdp* se centrifugaron y las bacterias fueron resuspendidas en PBS hasta una $DO_{600}=1$.

A continuación, se infectó con 25 μ l de una dilución 1:10, se centrifugaron las placas durante 5 minutos a 400 rpm para promover la adherencia de las bacterias a las células y para sincronizar las infecciones. Los cultivos celulares infectados se incubaron durante 90 minutos a 22°C. Posteriormente, se retiró el medio de cultivo de las placas y se realizaron 3 lavados con PBS para eliminar las bacterias no adheridas. Las células fueron lisadas durante 5 minutos con 100 μ l de Tritón X-100 al 1% y se procedió al recuento de bacterias totales, mientras que los pocillos destinados a recuento de bacterias intracelulares fueron incubados otros 90 minutos a 22°C tras un cambio de medio de cultivo y la adición de gentamicina ($150 \mu\text{g mL}^{-1}$). Finalmente, se prepararon diluciones seriadas de cada mezcla, que fueron sembradas para recuento de colonias en placas de BHIA con 1,5% NaCl, tras incubación durante 48 horas a 25°C (Figura 17). Los controles negativos fueron cultivos celulares inoculados con PBS.



Figura 17.- Colonias de *Phdp* obtenidas tras la lisis de los cultivos celulares para el recuento de bacterias totales e internas tras las infecciones de una infección *in vitro* con *Phdp* de un cultivo celular de SAF-1.

El índice de multiplicidad de infección (MOI) fue de ~10:1 (ratio bacteria/célula). Y la eficiencia de la invasión de cada cepa de *Phdp* fue calculada como la media del número total de unidades formadoras de colonias (UFC) internalizadas respecto al número de bacterias presentes en el inóculo inicial, expresado en porcentaje.

3.3. Experimento de adherencia e invasión con cepas piliadas de *Phdp*

Se determinó el efecto de los apéndices asociados a la motilidad observada en *Phdp* en la eficiencia de la invasión. Para ello, se comparó una cepa crecida en condiciones normales (PP3S) frente a la misma cepa previamente inoculada en medio “twitching” (PP3T).

El inóculo PP3S fue preparado como se explicó para el experimento anterior, al igual que los cultivos celulares, ambos un día antes de la infección. Por otro lado, para la obtención del segundo inóculo, la bacteria también fue inoculada varias veces por picadura en las placas de Petri (140 mm Ø) con medio BHIB suplementado con 1% NaCl y 0,2% agarosa (D-1 Low EEO; Pronadisa), e incubada a 25°C durante 72 horas. El día de la infección, se retiró el medio, se eliminaron las bacterias no adheridas y restos de agar mediante lavado con PBS, y se recogieron las bacterias adheridas a la placa con una solución fosfato 50 mM suplementada con urea 2M (pH 7,2).

El protocolo experimental fue exactamente el mismo descrito en el punto 3.2. Para los controles negativos se empleó PBS.

3.4. Inmunofluorescencia indirecta

Para esta técnica, los cultivos celulares y la posterior infección fueron llevados a cabo en placas de 24 sobre cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro. Después de 90 minutos de la inoculación e incubación a 22°C, las células y las bacterias fueron fijadas con PFA frío al 4% durante 20 minutos, a temperatura ambiente. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti-*Phdp* (hecho en conejo; cepa PP3) (Acosta *et al.*, 2002), y el anticuerpo secundario Alexa 488 anti-conejo (verde) o Alexa 594 (rojo) junto con Alexa Fluor® 488 Phalloidin (verde) (Invitrogen) para teñir las fibras de actina de las células

SAF-1. Todos los anticuerpos se diluyeron 1:1000 en BSA al 1% y los periodos de incubación fueron de 20 minutos, con lavados entre pasos. El montaje final se hizo con 2 µl de Prolong Gold que contiene DAPI (Invitrogen). Los cubreobjetos se colocaron de forma invertida sobre el portaobjetos. Se dejaron secar a oscuras durante varias horas y posteriormente se sellaron con laca y se guardaron a 4°C.

Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX43, con los objetivos Plan CN 40x/0,65 Ph2 y UPlan FLN 60x/1,25 y 100x/1,30 de aceite de inmersión. Para la captura digital de imágenes se usó una cámara Olympus XC30 y se trabajó con el programa Cell Sens Entry en la fusión de las imágenes.

3.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos fue ejecutado con el programa IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp.) mediante análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

Los ensayos de adherencia e invasión realizados se resumen en la [figura 15](#).

4. Estudio *in vitro* de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la modulación de la respuesta inmunitaria en dorada.

4.1. Cepas bacterianas

Para este experimento ([Figura 15](#)) se utilizó únicamente la cepa PP3 ([Tabla 6](#)), con y sin inducción de la motilidad. Por tanto, se prepararon dos inóculos; bacterias crecidas en BHIB con 1,5% NaCl, incubadas a 25°C en agitación durante 24 horas; y bacterias inoculadas en medio BHIB con 1% NaCl y 0,2% agarosa (para “twitching”), incubadas a 25°C en oscuridad durante 3 días.

4.2. Extracción de leucocitos de riñón anterior de dorada

Se utilizaron de 20 a 30 doradas (~250 g) a las que se les extrajo la sangre antes de recoger riñón anterior mediante punción en la vena caudal. El tejido renal fue mantenido en frío en medio L-15 suplementado con 2% de suero y antibióticos (1% de solución comercial de 100 U mL⁻¹ de penicilina + 100 mg mL⁻¹ de estreptomicina, y 5 µg mL⁻¹ de gentamicina).

La extracción de macrófagos fue realizada mediante el método descrito por Secombes (1990), con algunas modificaciones. Los riñones fueron triturados manualmente con micropistones de plástico estériles y filtrados a través de una membrana de Nylon de 100 µm con medio L-15 suplementado con suero y antibióticos. Después de centrifugar a 450 ×g durante 10 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en medio y sometidas a un gradiente de Ficoll (Lymphoprep; 1:1) (Figura 18). A continuación, se centrifugó a 600 ×g sin aceleración durante 30 minutos a 4°C y se retiró la interfase que contenía los macrófagos, con una pipeta Pasteur estéril, a un nuevo tubo de vidrio, donde fue diluida en 1 ml de medio L-15 sin suplemento y centrifugada (450 ×g 10 min 4°C) para lavar el Ficoll residual. Para limpiar más aún de eritrocitos, se resuspendieron las células en una solución de lisis (0,826% (p/v) NH₄Cl, 1mM EDTA, 10mM KHCO₃) en una proporción 1:3. Tras dejarla en reposo durante 10 minutos, se centrifugó a 685×g durante 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante, se realizó otro lavado mediante centrifugación y las células fueron resuspendidas nuevamente en 1 ml de medio L-15.

Posteriormente, se procedió al recuento de células viables mediante tinción vital de Tripan Blue (10 µl células + 40 µl tinción) en cámara de Neubauer. Finalmente, se ajustó la concentración a 10⁶ células mL⁻¹ y se prepararon placas de 6 y 96 pocillos –de fondo plano– con 10⁶ y 10⁵ macrófagos por pocillo, respectivamente, con medio L-15 sin suero y con antibióticos, para favorecer la fijación de las células a las placas de poliestireno. Tras 3 horas de incubación a 22°C, las células no adheridas fueron eliminadas mediante dos lavados con medio de cultivo. Los cultivos de macrófagos se dejaron incubando toda la noche a 22°C con medio L-15 suplementado con suero y antibióticos (Figura 19).

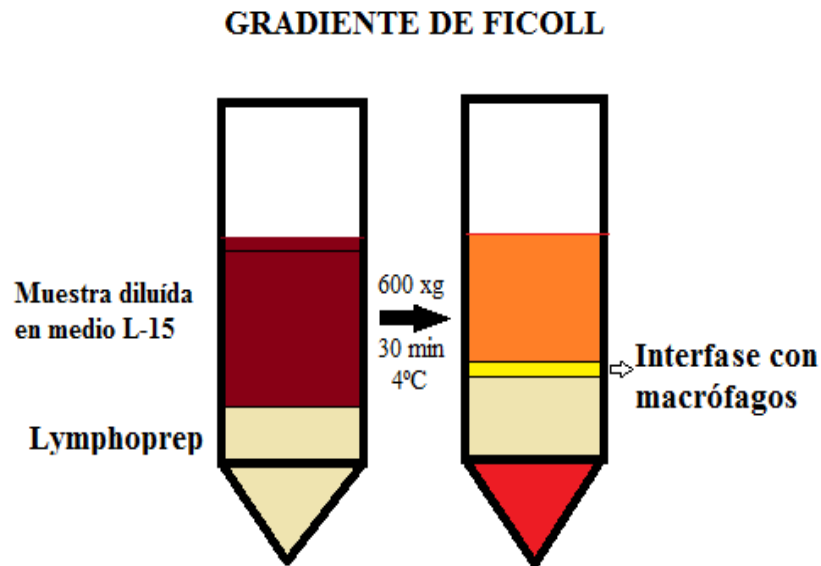


Figura 18.- Dibujo esquemático de un gradiente de Ficoll con Lymphoprep™ para el aislamiento de macrófagos.

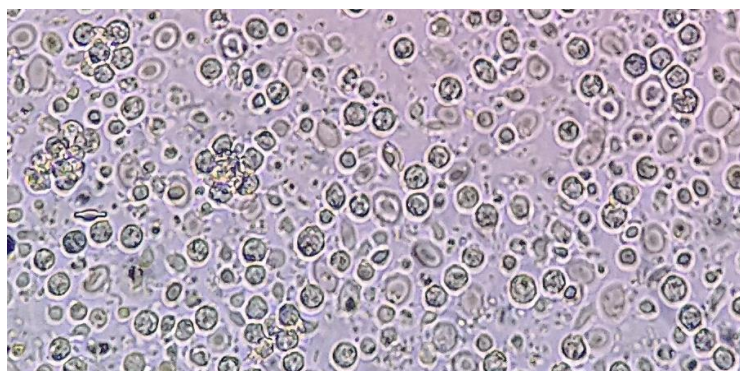


Figura 19.- Cultivo de macrófagos de riñón anterior de dorada.

4.3. Infección *in vitro*

Los macrófagos mantenidos en las placas de 6 pocillos fueron infectados con bacterias (MOI 5:1). La expresión de los genes IL-1 β , IL-1r2, Mx, IL-6, IL-10, TNF- α y Casp-3, involucrados en la respuesta inmunológica del hospedador, fue determinada a las 0, 2, 6, 12, 24, 48 y 72 horas post-infección mediante PCR cuantitativa (qPCR). Se utilizaron 3 pocillos para cada punto y cepa. Y como control negativo se emplearon cultivos inoculados con PBS.

4.4. PCR cuantitativa

El ARN de los macrófagos fue extraído con el kit ENZA[®] Total RNA Kit I (Omega) y cuantificado en un espectrofotómetro nanodrop 1000 (Thermo), 20 ng μl^{-1} de ARN molde fue retrotranscrito a ADN complementario (ADNc) (iScript cDNA synthesis kit de Biorad). Para la reacción se utilizó la química SYBR (BioRad) y para la cuantificación se utilizó un termociclador iQ5[™] (Biorad). Las secuencias de los cebadores utilizados se muestran en la [tabla 7](#).

El protocolo empleado para la síntesis de ADNc fue de 1 ciclo de 70°C durante 10 minutos en ausencia de la transcriptasa inversa, donde la mezcla de reacción estuvo constituida por 5 μl de tampón 5x, 12 μl de agua DEPC y 2 μl de ARN molde. Tras la adición de 1 μl de enzima (+5 μl de agua) a la mezcla de reacción, se prosiguió con 1 ciclo de 25°C durante 10 minutos, 42°C durante 50 minutos y 70°C durante 15 minutos.

Posteriormente, para el análisis a tiempo real, a 2 μl del producto anterior se le añadieron 10 μl del fluorocromo, 0,5 μl de cada cebador y agua milli-Q hasta completar un volumen final de reacción de 25 μl . Se programó 1 ciclo de 5 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 60°C (T^a de hibridación) durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos, 1 ciclo de 1 minuto a 95°C, 1 ciclo de 70 °C durante 1 minuto, y una curva de melting de 81 ciclos de 30 segundos (desde 55°C a 95°C). Las lecturas al final de la fase de hibridación de cada ciclo, permitió estimar los valores para el ciclo umbral (Ct), definido como el ciclo en el que es detectado un incremento estadísticamente significativo en la fluorescencia emitida sobre la señal de fondo.

Tabla 7.- Cebadores utilizados en el análisis por qPCR.

Gen		Secuencia del cebador
B-actina	Directo	5'-TCTGTCTGGATCGGAGGCT-3'
	Inverso	5'-AAGCATTGCGGTGGACG-3'
IL-1 β	Directo	5'-AGCGACATGGCACGATTT-3'
	Inverso	5'-GCACTCTCCTGGCACATATCC-3'
IL-1r2	Directo	5'-AAGGACTCCAGCTCCACTGA-3'
	Inverso	5'-ACGCCTTCTACATGGACCAC-3'
Mx	Directo	5'-GACAGGGAGCGGCATTGTTAC-3'
	Inverso	5'-TCGTCCAGCTCTTCCTCGTG-3'
IL-6	Directo	5'-GCTCTGCTGCGGTGTGCTCC-3'
	Inverso	5'-GTCTCCCACTCCTCACCTG-3'
IL-10	Directo	5'-TGGAGGGCTTTCCTGTCAGA-3'
	Inverso	5'-TGCTTCGTAGAAGTCTCGGATGT-3'
TNF- α	Directo	5'-TCGTTTCAGAGTCTCCTGCAG-3'
	Inverso	5'-CATGGACTCTGAGTAGCGCGA-3'
Casp-3	Directo	5'-CTGATCTGGATGGAGGCATT-3'
	Inverso	5'-AGTAGTAGCCTGGGGCTGTG-3'

Los resultados para cada muestra fueron expresados como la “cantidad” de expresión de los genes de interés relativa a la expresión de β -actina, que es un gen de mantenimiento usado como referencia, y al punto 0, usando el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (Livak y Schmittgen, 2001).

4.5. Estudio de la explosión respiratoria

La producción de radicales superóxido intracelulares por los fagocitos fue determinada por la reducción del reactivo nitroazul de tetrazolio (NBT) (Secombes, 1990; Boesen *et al.*, 2001) (Figura 20). Previamente, los cultivos de macrófagos de la placa de 96 pocillos fueron lavados con medio L-15 no suplementado y solución salina balanceada de Hanks (HBSS) para eliminar cualquier resto de antibiótico. Y seguidamente, se añadieron 100 μ l de NBT (Sigma) disueltos a una concentración de 1 mg mL^{-1} en HBSS. Se infectó con una MOI de 50:1 y se incubó a 22°C durante 45 minutos. Como control positivo se utilizaron cultivos inoculados con 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de acetato de forbolmiristato (PMA; Sigma). La especificidad de la reacción se midió con la adición de 300 UI de superóxido dismutasa (SOD; Sigma) a alguno de los pocillos con PMA.

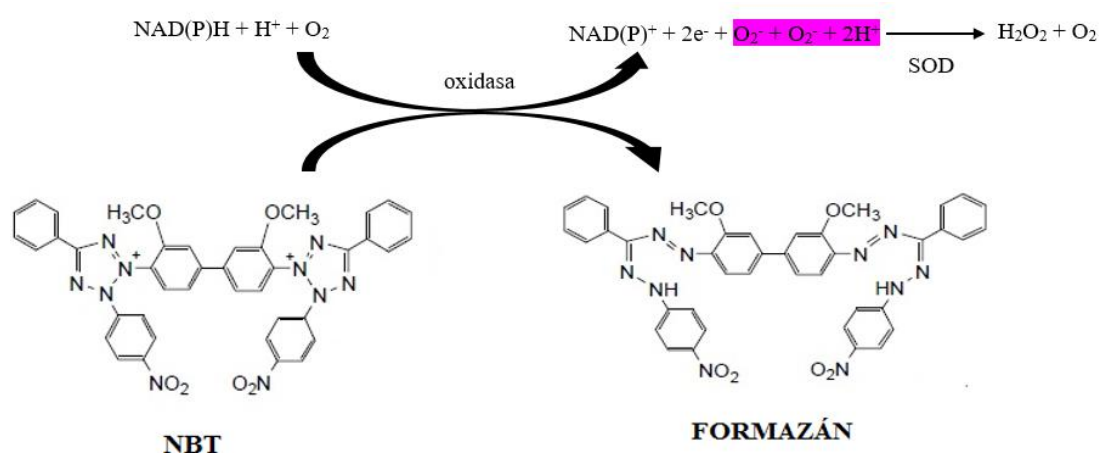


Figura 20.- Esquema de la reacción de reducción del NBT.

Finalizado el tiempo de infección, se retiró el sobrenadante y se añadió metanol al 70%. Se dejó evaporando el metanol en una campana de extracción hasta el día siguiente. El formazán del interior de los fagocitos se solubilizó añadiendo 120 µl de KOH 2M y 140 µl de superóxido dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma). Entonces, se midieron las absorbancias a 620 nm en un espectrofotómetro (Multiskan FC, Thermo). Los resultados fueron expresados como índice de estimulación, resultantes de dividir el valor de cada muestra entre su control.

4.6. Contenido en peroxidasa celular

El contenido total de peroxidasa (Figura 21) presente en los macrófagos se determinó por la metodología de Quade y Roth (1997). Los cultivos fueron inoculados con 100 µl de las suspensiones bacterianas preparadas para una MOI de 1:10 (bacteria: célula), e incubados a 22°C durante 30 minutos. Posteriormente, se procedió al lavado de los pocillos. Se añadió PBS como control negativo.

Después de retirar el sobrenadante y realizar un lavado, se añadieron 75 µl de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB, Sigma) al 0,02% durante 5 minutos para lisar las células. Seguido de 50 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina hidroclorehídrica 10 mM (TMB, Sigma) y 25 µl de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 5 mM, produciéndose una reacción de color, que es interrumpida después de 2 minutos con la adición de 50 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2M. Finalmente, 150 µl de la mezcla se pasaron a una placa nueva y se midió su absorbancia en un lector de placas (Multiskan FC, Thermo) a 450 nm. Los resultados se expresaron como índice de estimulación, dividiendo los valores de cada muestra por los de sus controles.

4.7. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron efectuados con el programa estadístico SPSS versión 22.0 (IBM Corp.). Se realizó análisis de la varianza (ANOVA) y prueba de Tukey, y las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas sólo cuando $p < 0,05$.

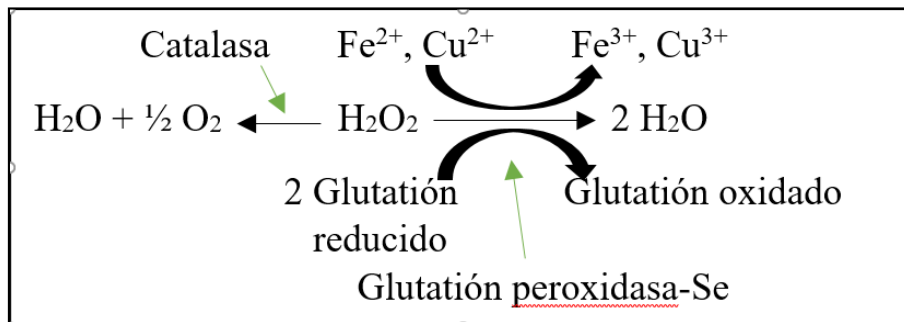


Figura 21.- Esquema de la reacción de reducción del peróxido de hidrógeno celular por acción de las enzimas peroxidasa y catalasa.

RESULTADOS



RESULTADOS

1. Determinación de la presencia de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

1.1. Hemaglutinación

Se observó aglutinación de eritrocitos humanos (Figura 22) y de lenguado en una única cepa de *Phdp* (DI-21). Además, la HA fue resistente a la manosa. La hemaglutinación de eritrocitos humanos fue más fuerte en comparación con la de eritrocitos de lenguado. No se detectó HA de glóbulos rojos de lubina.

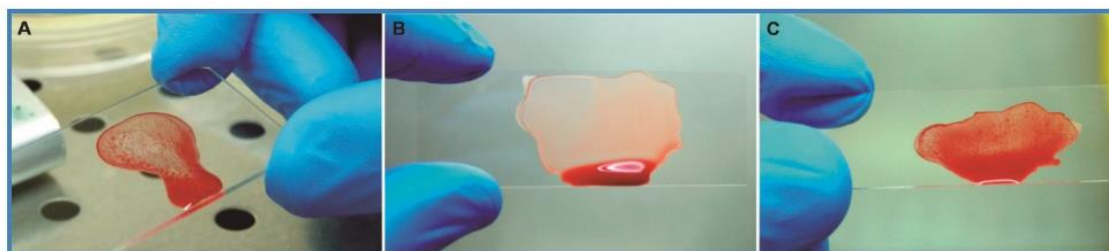


Figura 22.- Aglutinación de eritrocitos humanos. A: *Acinetobacter* (control positivo); B: cepa de *Phdp* que no producía HA; C: cepa DI-21, que produce hemaglutinación.

1.2. MET, MEB e inmunofluorescencia

El análisis por MET y MEB, dio como resultado la observación de fimbrias en todas las cepas estudiadas (Figura 23 A-F).

El antisuero utilizado en la técnica de inmunofluorescencia fue igual de eficiente con todas las cepas de *Phdp*, permitiendo la confirmación de la presencia de pili en todas ellas (Figura 23 G-H).

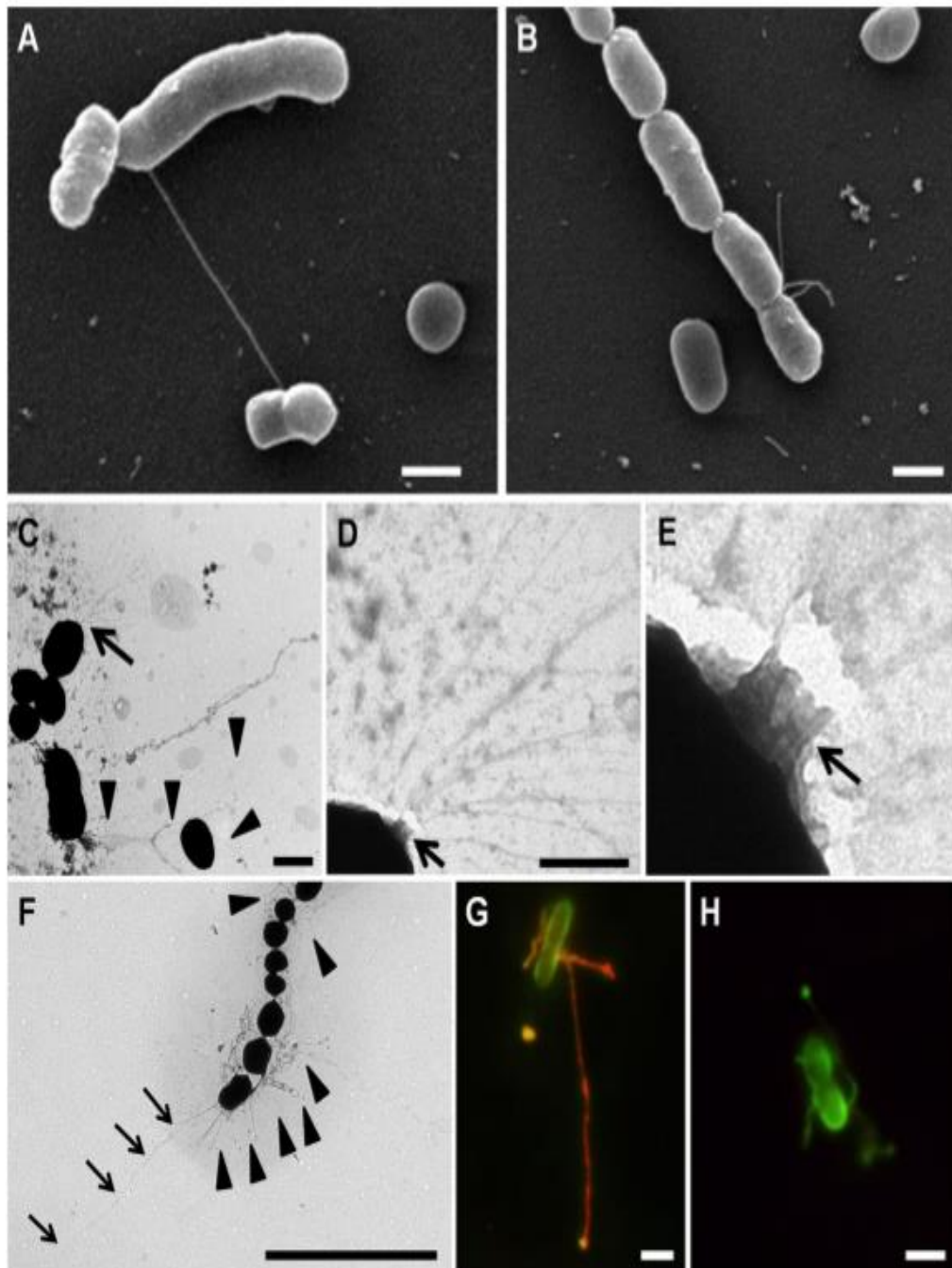


Figura 23.- Presencia de pili en cepas de *Phdp*. A-B: microfotografías de MEB de cepas 94/99 y DI-21, respectivamente; C-F: microfotografías de MET de cepas ATCC 17911 y DI-21, respectivamente (cabezas de flecha: pili en C y pili cortos en F; flecha: pilus largo polar en F); D-E: imagen aumentada del área señalada por la flecha en C; G-H: Imágenes de inmunofluorescencia de cepas 94/99 y C2, respectivamente. Aumentos: A-C: $\times 5000$; D: $\times 12000$; E: $\times 80000$; G-H: $\times 400$. Escala: A-B: 1 μm ; C: 2 μm ; D: 250 nm; F: 10 μm .

Esos pili son apéndices filamentosos de ~5-8 nm de diámetro, y con longitudes que pueden variar de 1 µm a 13 µm. Son similares en apariencia a las fimbrias tipo IV, que son expresadas por varios patógenos gram-negativos. Con frecuencia tuvieron una localización polar y su número por bacteria varió considerablemente; algunas mostraron 1-2, mientras que en otras el número fue de 30-40 fimbrias.

Las bacterias que crecieron en la interface entre el agar y la placa mostraron más fimbrias que las cultivadas en medio líquido. Además, aunque las preparaciones fueron fijadas antes de ser examinadas, pudieron verse filamentos despegados de las bacterias y dispersos por el fondo. Esto fue particularmente evidente tras la deshidratación para MET.

1.3. Motilidad bacteriana

Después de reducir la concentración de agarosa al 0,3%, se observó que todas las cepas eran capaces de propagarse por la interface entre el agar y la placa de manera similar al “twitching motility” descrito en otras bacterias gram-negativas (Figura 24).

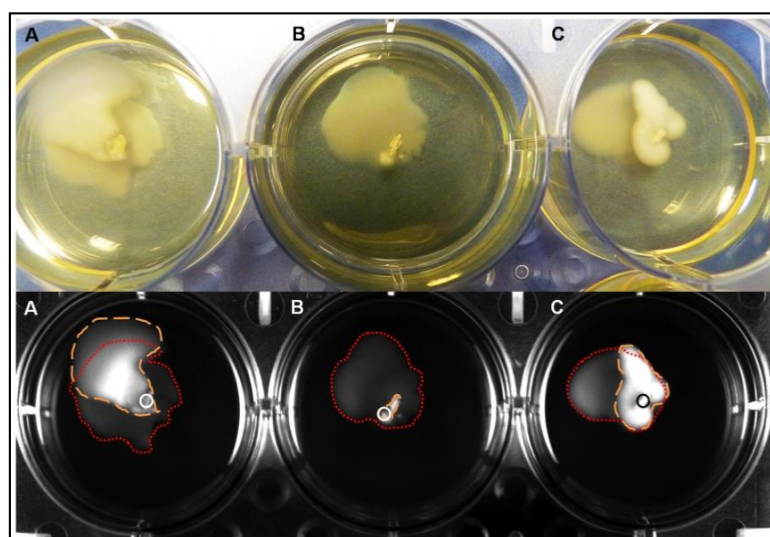


Figura 24.- Ensayos de motilidad de *Phdp* en medio BHIA con 0,3% glucosa, después de 48 h de incubación a 25°C. Cepas: 94/99 (A), C2 (B) y PP3 (C). Línea discontinua naranja: expansión de la bacteria en superficie del agar; línea de puntos roja: zonas de twitching.

La tinción con cristal violeta demostró que la bacteria se adhiere fuertemente a la superficie de plástico. Las cepas presentaron aparentemente mayor densidad de las zonas de twitching en medio con una concentración de agarosa del 0,3%, en comparación al 0,2%, pese a que el desplazamiento de la bacteria fue más extenso en el último caso (Figura 25). Además, las cepas parecen tener diferentes patrones de dispersión, mostrando dos tipos de borde, regular y rizoide (Figura 26).

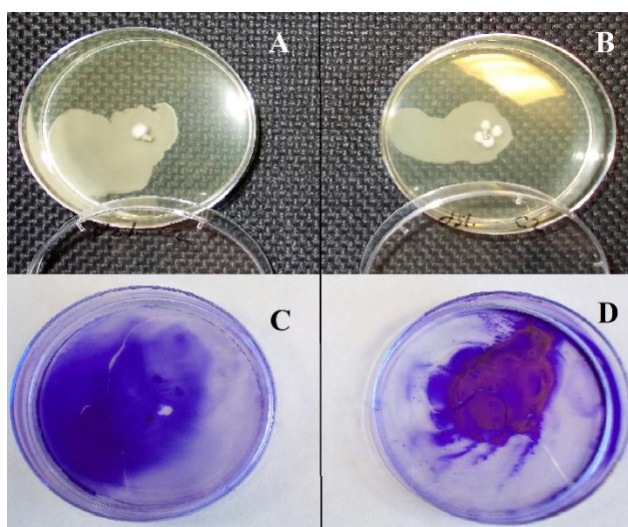


Figura 25.- Ensayos de motilidad de *Phdp* (cepa C2) en medio BHI con 0,2% (A) y 0,3% (B) de agarosa, y posterior tinción con CV (0,7%) (C: 0,2% agarosa; D: 0,3% agarosa).

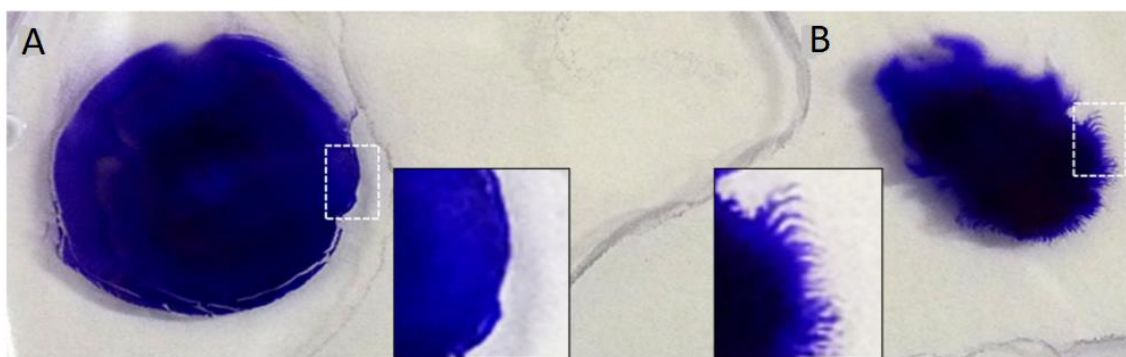


Figura 26.- Bacterias adheridas tras la motilidad de *Phdp*, teñidas con CV (0,7%). Adjunto: detalles del borde liso de cepa C2 (A) y rizoide de cepa 94/99 (B).

1.4. Formación de biocapas

La formación de biocapa *in vitro* en *Phdp* depende de la cepa y es inhibida por la adición de glucosa (Figuras 27 y 28). Ninguna de las cepas produjo biocapa en las placas de 96 pocillos. Sin embargo, algunas cepas formaron una biocapa consistente en las placas de 24 pocillos, fácilmente visualizada en la interface sólido-líquida tras la tinción con CV. La conformación de una biocapa abundante y estable sólo se logró pasados 4-6 días (Figura 27). La cantidad de biocapa formada por las bacterias crecidas en BHIB sin glucosa fue mayor que las crecidas en medio suplementado con el azúcar (Figura 28).

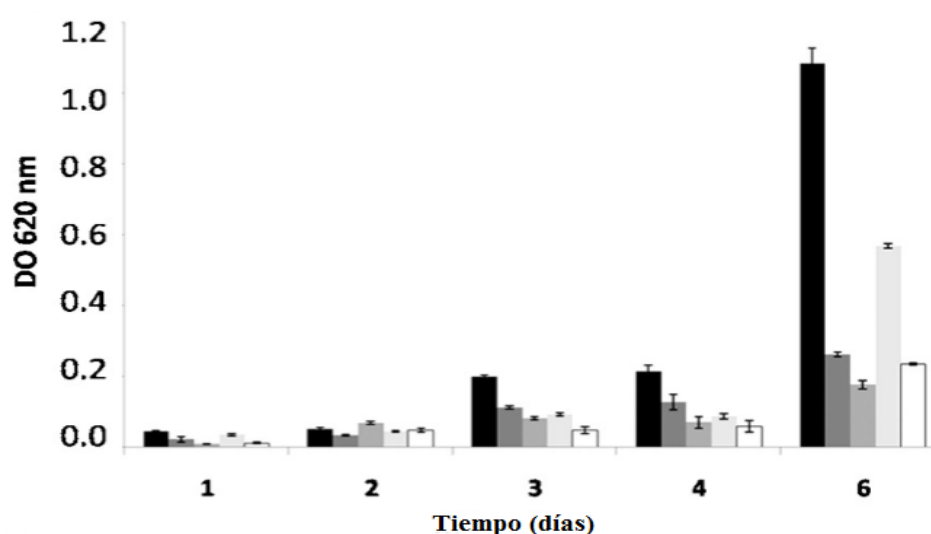


Figura 27.- Formación de biocapa de las distintas cepas de *Phdp* a lo largo del tiempo. Cada barra indica los valores medios con las desviaciones estándar. De negro a blanco, cepas: 94/99, C2, PP3, ATCC 17911 y DI-21.

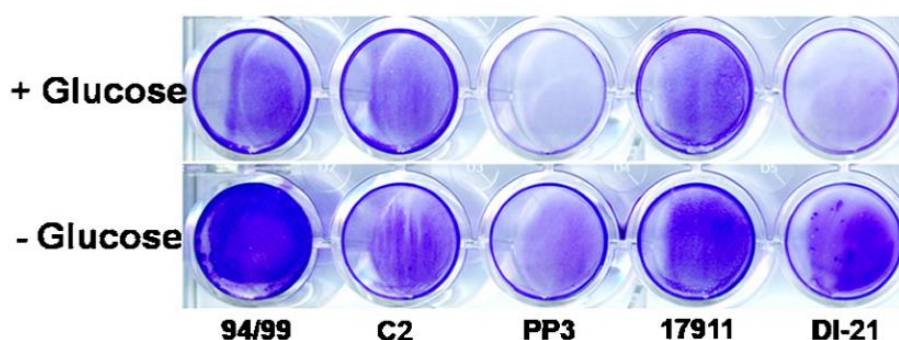


Figura 28.- Formación de biocapa de *Phdp* después de 6 días en presencia y ausencia de glucosa, teñido con CV.

La biocapa desarrollada sobre los portaobjetos con 4 μ -cámaras fue teñida con el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD BackLight y examinada por MLC (Figura 29). Las bacterias vivas con una membrana intacta se tiñen de verde (SYTO 9) y las bacterias con una membrana comprometida porque estén muertas o dañadas se tiñen de rojo (bromodesoxiuridina, o yoduro de propidio). El máximo espesor observado en las áreas de las biocapas fue de entre 40 y 50 μ m, que correspondió al producido por la cepa 94/99. En algunas cepas, la fracción de color rojo incrementó con el tiempo, lo que indica que la mayor parte de las bacterias de la biocapa eran no viables (Figura 29A-D). Usando el Ac policlonal anti-*Phdp*, el análisis por MLC reveló que la biocapa formada por *Phdp* no presenta las características típicas de la biocapa de la mayoría de las especies bacterianas, pues la morfología de las bacterias fue filamentosa, semejante a los micelios de los hongos (Figura 29E). Además, en todas las cepas, las bacterias de la biocapa aparecían sobretodo no encerradas en una matriz, como quedó reflejado tras la tinción con NucBlue y FilmTracer (Figura 29F). El control positivo para la producción de matriz extracelular –*P. aeruginosa*– fue fuertemente teñido con FilmTracer. Por último, las células filamentosas, mencionadas antes, presentes en la biocapa de *Phdp* fueron observadas también mediante MET, con los nucleoides teñidos con DAPI, mostrándose claramente multinucleados.

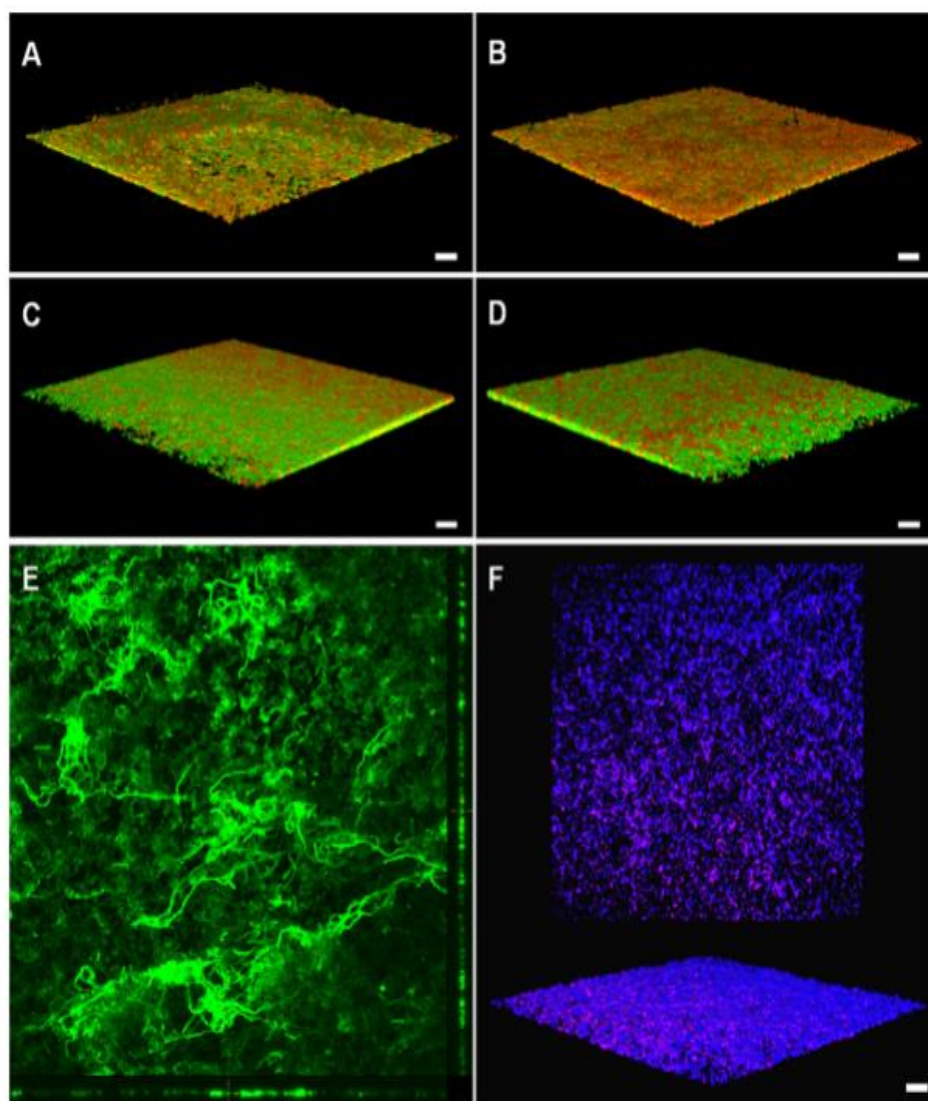


Figura 29.- Imágenes por MLC de biocapas –no fijadas– de 6 días (A-D y F). A-D: teñidas con LIVE/DEAD (verde: bacterias vivas; rojo: muertas). Cepas de *Phdp*: 94/99 (A), PP3 (B), ATCC 17911 (C) y DI-21 (D). F: teñidas con FilmTracerTM SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain (cepa 94/99) (puntos púrpuras: componentes proteináceos de una supuesta matriz extracelular; puntos azules: bacteria). E: Máxima intensidad de proyección de una biocapa de 4 días de la cepa 94/99, expuesto a Ac anti-*Phdp* y preparado como para estudios estándar de inmunofluorescencia. Aumentos: A-D y F: 200x; E: 400x. Escala: 20 μ m.

2. Establecimiento de las condiciones adecuadas para el desarrollo de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

2.1. Temperatura de incubación

Se observó desplazamiento en todas las cepas de *Phdp* estudiadas y a todas las temperaturas de incubación probadas, excepto en las cepas PP3 y DI-21 incubadas 48 horas a 18°C, y 94/99 incubada también a 18°C durante 48 horas y, además, cuando fue mantenida previamente en nevera durante una semana, tanto tras las 48 como las 72 horas de incubación. Por otra parte, las cepas mostraron entre ellas similar motilidad a 22 y 25°C, siendo superior a 25°C. A 20°C los resultados fueron irregulares. Además, la bacteria es capaz de resistir 3 días a 4°C y moverse posteriormente con normalidad a 22°C, incluso pudiendo alcanzar, la cepa PP3, desplazamientos máximos (Figura 30).

Hubieron diferencias estadísticamente significativas entre las horas de incubación para la cepa DI-21 mantenida 7 días a 4°C ($p<0.01$) y cepa ATCC 17911 incubada a 18°C ($p<0.04$) (Figura 30).

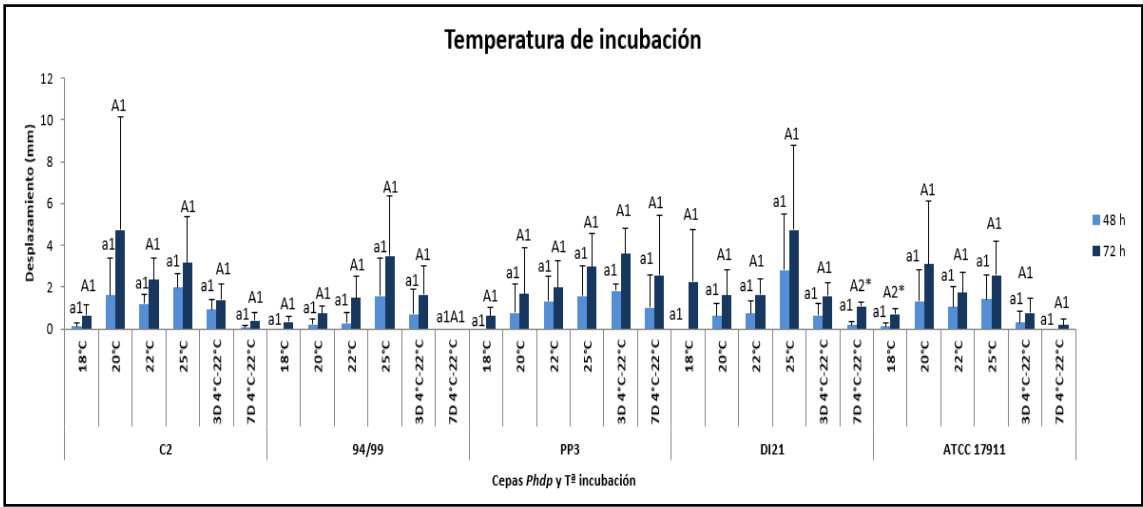


Figura 30.- Efecto de la temperatura en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*.
*Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo días de incubación).

2.2. pH

A las 48 horas, todas las cepas desarrollaron motilidad únicamente en los medios con pH 7, con diferencias estadísticamente significativas en las cepas C2 ($p < 0.005$) y DI-21 ($p < 0.05$). Tras 72 horas de incubación, se obtuvo el mismo resultado con las cepas C2, 94/99 y ATCC 17911, con significancia estadística en *Phdp* C2 ($p < 0.0001$). Sin embargo, las otras cepas (PP3 y DI21) también presentaron motilidad a diferentes pH, aunque con diferencias estadísticamente significativas entre pH 7 y los demás valores de pH en el caso de la PP3 ($p < 0.005$). La cepa DI21 parece tolerar los cambios de pH (Figura 31).

Comparando la dispersión bacteriana a las 48 y a las 72 horas, se encontraron diferencias significativas en la cepa C2 a pH 7 ($p < 0.03$) y en la cepa DI-21 con pH 6 ($p < 0.04$) (Figura 31).

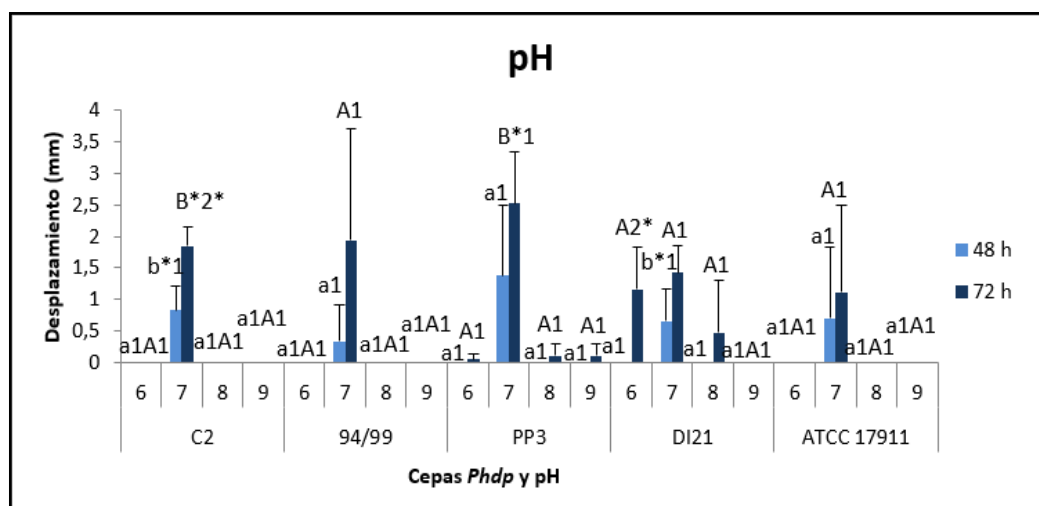


Figura 31.- Efecto del pH en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*.
*Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo días de incubación).

2.3. Concentración de nutrientes

Las bacterias mostraron motilidad con las distintas concentraciones de nutrientes probadas, sin diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p>0.05$) y horas de incubación ($p>0.05$) (Figura 32). La propagación en medios con diferente disponibilidad de nutrientes dependió de la cepa; sin embargo, parece ser más homogénea entre cepas con la concentración indicada en la formulación del medio de cultivo. Con este experimento no ha podido demostrarse que la escasez de nutrientes sea un estímulo y una posible causa para la dispersión de la bacteria.

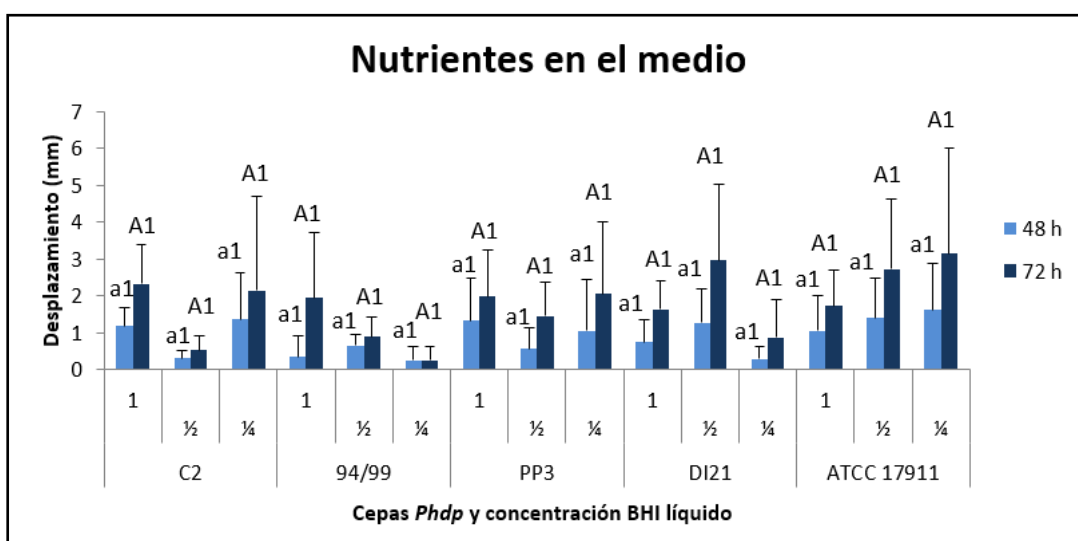


Figura 32.- Efecto de la disponibilidad de nutrientes en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo entre días de incubación).

2.4. Salinidad del medio

En este ensayo, se hallaron diferencias estadísticamente significativas en los siguientes casos: cepa C2, motilidad en medio suplementado con 1% NaCl frente a la de en los medios sin suplementación ($p<0.01$); cepa DI-21, entre 48 y 72 horas en medio con 1% NaCl ($p\leq 0.05$), y cepa ATCC 17911, entre horas de incubación en medio con

2,5% NaCl ($p < 0.01$). Como se esperaba, las bacterias no crecieron y, por tanto, no se desplazaron en medio de salinidad sin NaCl. Se puede apreciar una cierta tendencia a desplazarse más cuando las concentraciones de sal son del 0,5-1%, aunque existen resultados variables según la cepa (Figura 33).

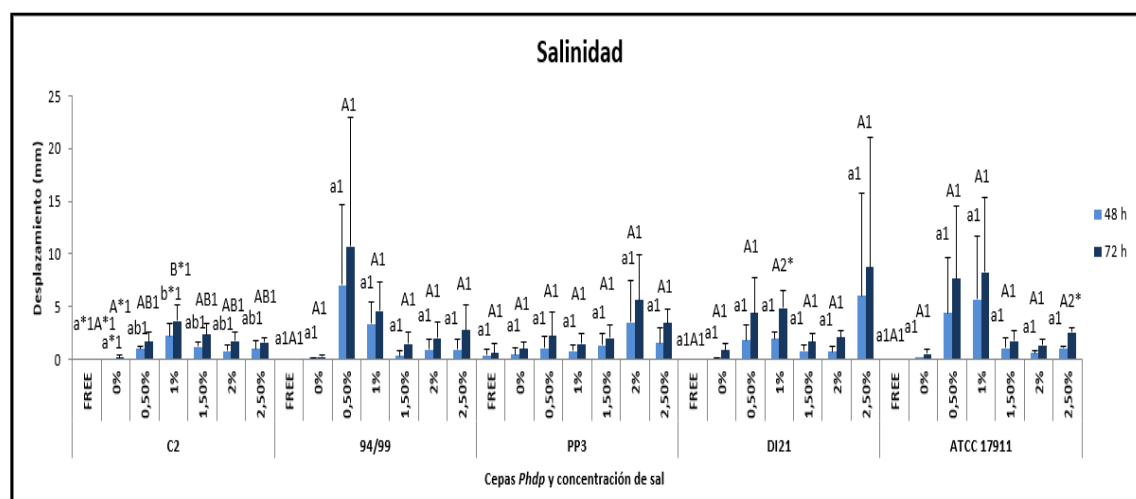


Figura 33.- Efecto de la salinidad del medio en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo entre días de incubación).

2.5. Concentración de agar

Un incremento significativo de la motilidad fue observado en las cepas 94/99 ($p < 0.02$), DI-21 ($p \leq 0.05$) y ATCC 17911 ($p \leq 0.05$) cuando la concentración de agarosa se reducía (0,2%; p/v). Las zonas de twitching también fueron más grandes con 0,2% de agarosa en las cepas PP3 y C2 ($p > 0.05$). No se detectaron diferencias significativas entre 48 y 72 horas de incubación ($p > 0.05$) (Figura 34).

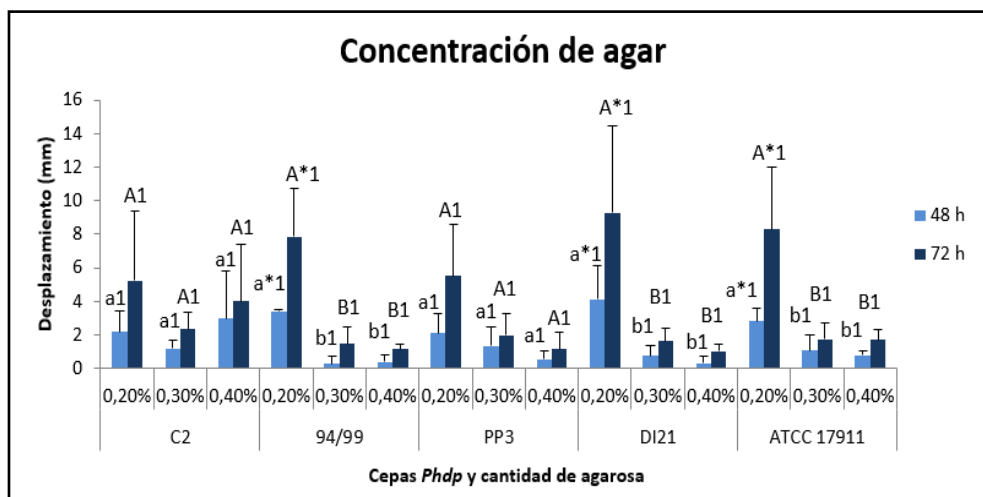


Figura 34.- Efecto de la concentración de agarosa del medio en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo entre días).

2.6. Textura del sustrato

La adherencia y motilidad de *Phdp* sobre superficies lisas y rugosas depende de la cepa. Así, en las cepas DI-21, ATCC 17911 y 94/99 se observó similar dispersión, mientras que en las cepas C2 y PP3 fue mayor en superficies rugosas que superficies lisas ($p > 0.05$). Las diferencias en el desplazamiento después de 48 y 72 horas de incubación tampoco fueron estadísticamente significativas (Figura 35).

2.7. Presencia de restos celulares en el medio

La motilidad de todas las cepas de *Phdp* no fue significativamente diferente en presencia o ausencia de células SAF-1 en el medio ($p > 0.05$), aunque se apreció un aumento de la misma en medio conteniendo restos celulares. Este incremento en la motilidad no fue directamente proporcional a las diluciones celulares empleadas. De hecho, para las cepas 94/99, C2 y ATCC 17911, los mejores datos de desplazamiento obtenidos parecen estar asociados a la presencia de restos celulares en baja cantidad (FD=1:8). Mientras que con la cepa PP3 ocurrió lo contrario, no observándose movilidad en medio con células a una dilución 1:8 (Figura 36).

Por otro lado, fueron obtenidas diferencias estadísticamente significativas entre 48 y 72 horas de incubación en los grupos “control” de cepas 94/99 y DI-21 ($p \leq 0.05$) y “Células FD 1:4” de cepa DI-21 ($p < 0.01$) (Figura 36).

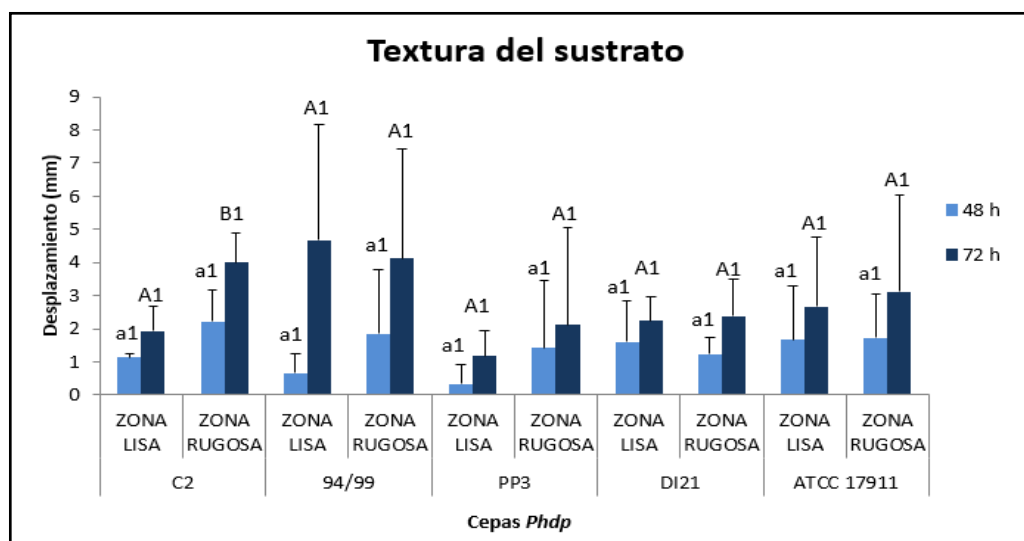


Figura 35.- Efecto de la textura de la placa en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo entre días de incubación).

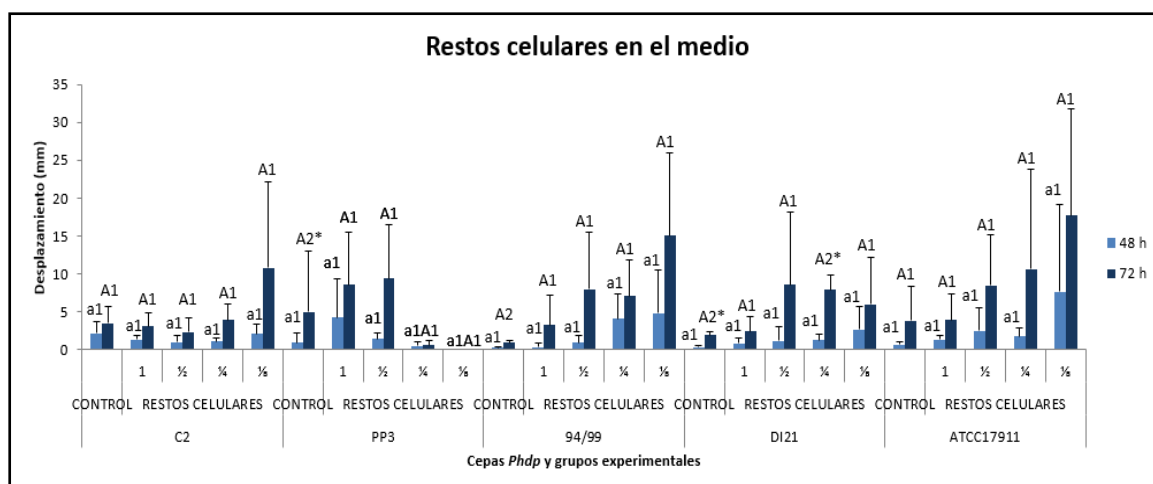


Figura 36.- Efecto de la presencia de restos celulares en el medio en la motilidad de distintas cepas de *Phdp*. *Indica que hay diferencias estadísticamente significativas (letras minúsculas: compara grupos a las 48 h; letras mayúsculas: compara grupos a las 72 h; números: compara en cada grupo entre días de incubación).

2.8. Medio “twitching”

Con los resultados obtenidos en esta experiencia formulamos un medio y establecimos unas condiciones de cultivo que favorecieran la motilidad de *Phdp*, con el objetivo de inducir la producción de fimbrias para futuros experimentos.

A este medio lo denominamos medio “twitching” y consiste en medio BHIB suplementado con 1% NaCl y 0,2% agarosa (pH 7 ± 0.2). Las bacterias son incubadas a 25°C durante 72 horas y en oscuridad. Los pasos previos de preparación del inóculo no varían, si bien es importante mantener los cultivos en reposo, sin agitación.

3. Estudio *in vitro* de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la capacidad de adherencia e invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en línea celular SAF-1.

3.1. Adherencia e invasión bacteriana

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los índices de adherencia e invasión de las distintas cepas de *Phdp* (Figura 37). En las cepas PP3 y ATCC 17911, se obtuvo mayor recuento de bacterias adheridas a las células SAF-1, mientras que el número de bacterias intracelulares fue más homogéneo entre cepas. La máxima eficiencia de la invasión fue exhibida por la cepa PP3 (0,07%) (Tabla 8).

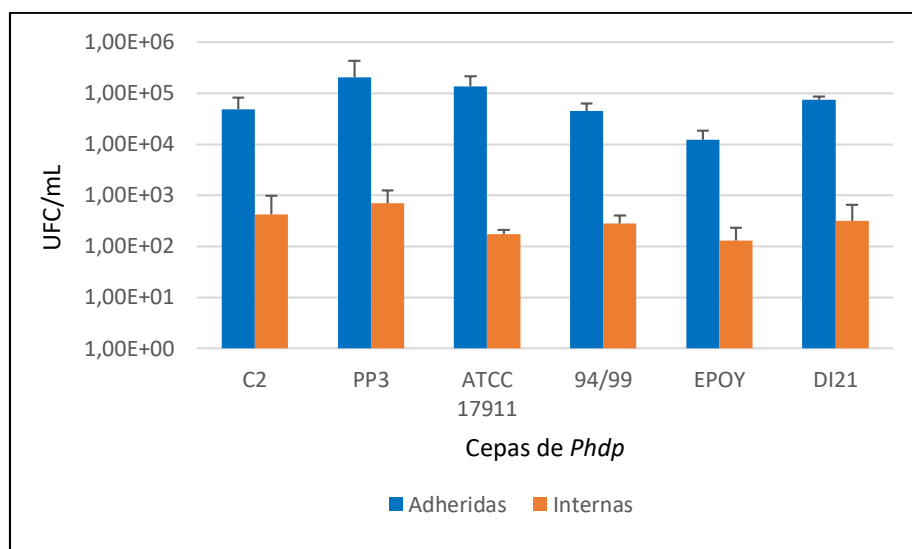


Figura 37.- Adherencia e invasión de distintas cepas de *Phdp* en línea celular SAF-1 tras una infección *in vitro*.

Cepa de <i>Phdp</i>	Tasa de adherencia (%)	Eficiencia de la invasión (%)
C2	5	0,042
94/99	5	0,028
DI-21	7	0,031
ATCC 17911	14	0,017
EPOY 8803-II	1	0,013
PP3/PP3S	21-23	0,071-0,043
PP3T	460	0,317

Tabla 8.- Tasa de adherencia y eficiencia de la invasión de las distintas cepas de *Phdp* estudiadas.

3.2. Adherencia e invasión de cepa piliada

La cepa PP3 inoculada en medio “twitching” y preparada después de tres días de incubación (PP3T) (Figura 38) para la infección de los cultivos celulares mostró mayores tasas de adherencia e invasión en células SAF-1, en comparación con la bacteria cultivada en medio líquido BHIB+1,5% NaCl en agitación durante 24 horas (PP3S). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (Figura 39).

En las infecciones *in vitro* con PP3T, la cepa PP3 de *Phdp* experimentó un incremento en la eficiencia de la invasión de células SAF-1, alcanzando el 0,32% de eficiencia (Tabla 8).



Figura 38.- Motilidad de *Phdp* (cepa PP3) en medio “twitching” después de 3 días de incubación a 25°C en oscuridad.

La técnica de inmunofluorescencia también reveló mayor cantidad de bacteria adherida en las preparaciones correspondientes a las infecciones con PP3T que con PP3S ($p < 0,05$), tras contar células SAF-1 (núcleos teñidos de azul) y bacterias (verdes o rojas) en distintos campos y hallar las proporciones. Los resultados expresados en porcentaje se representan en la figura 40. La figura 41 ilustra la infección en cultivo de células SAF-1 por la cepa PP3 en sus dos formas.

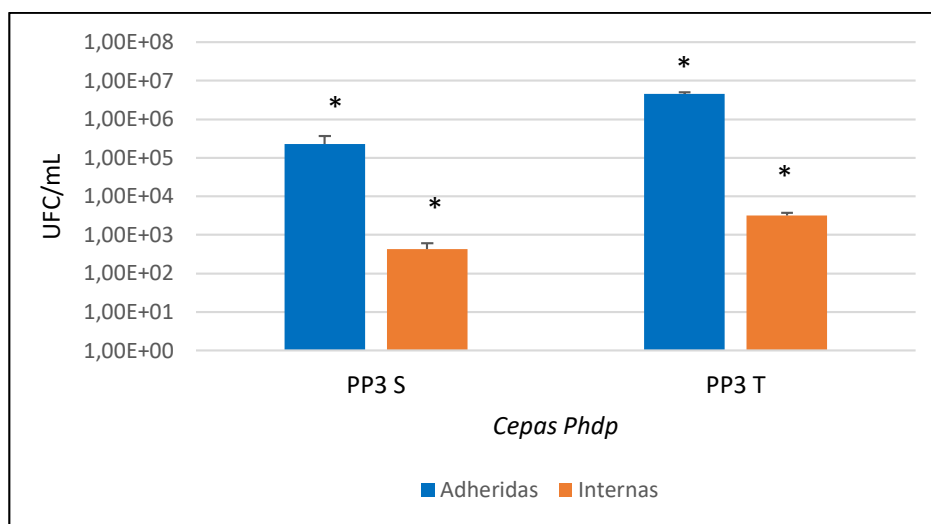


Figura 39.- Efecto de la motilidad y presencia de fimbrias en la adherencia e internalización de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1. PP3S: cepa PP3 cultivada en condiciones normales; PP3T: cepa PP3 inoculada previamente a la infección *in vitro* en medio “twitching”. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

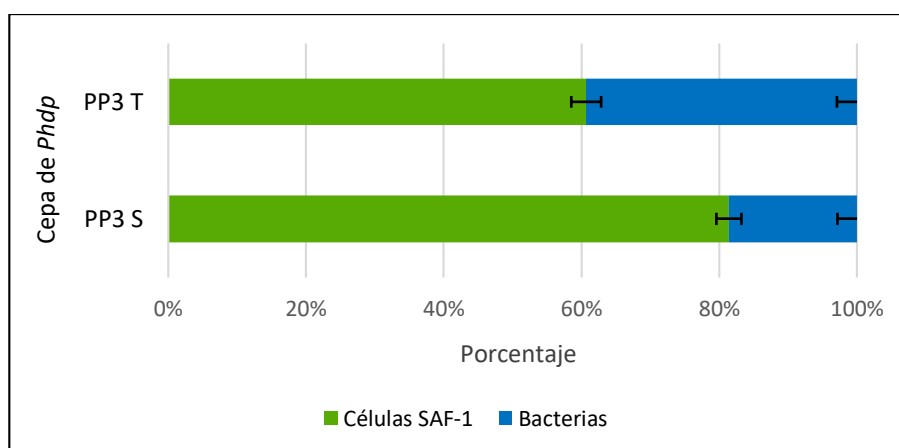


Figura 40.- Proporción de bacterias adheridas a células SAF-1 tras la infección *in vitro* con PP3S y PP3T, contadas en las preparaciones para inmunofluorescencia.

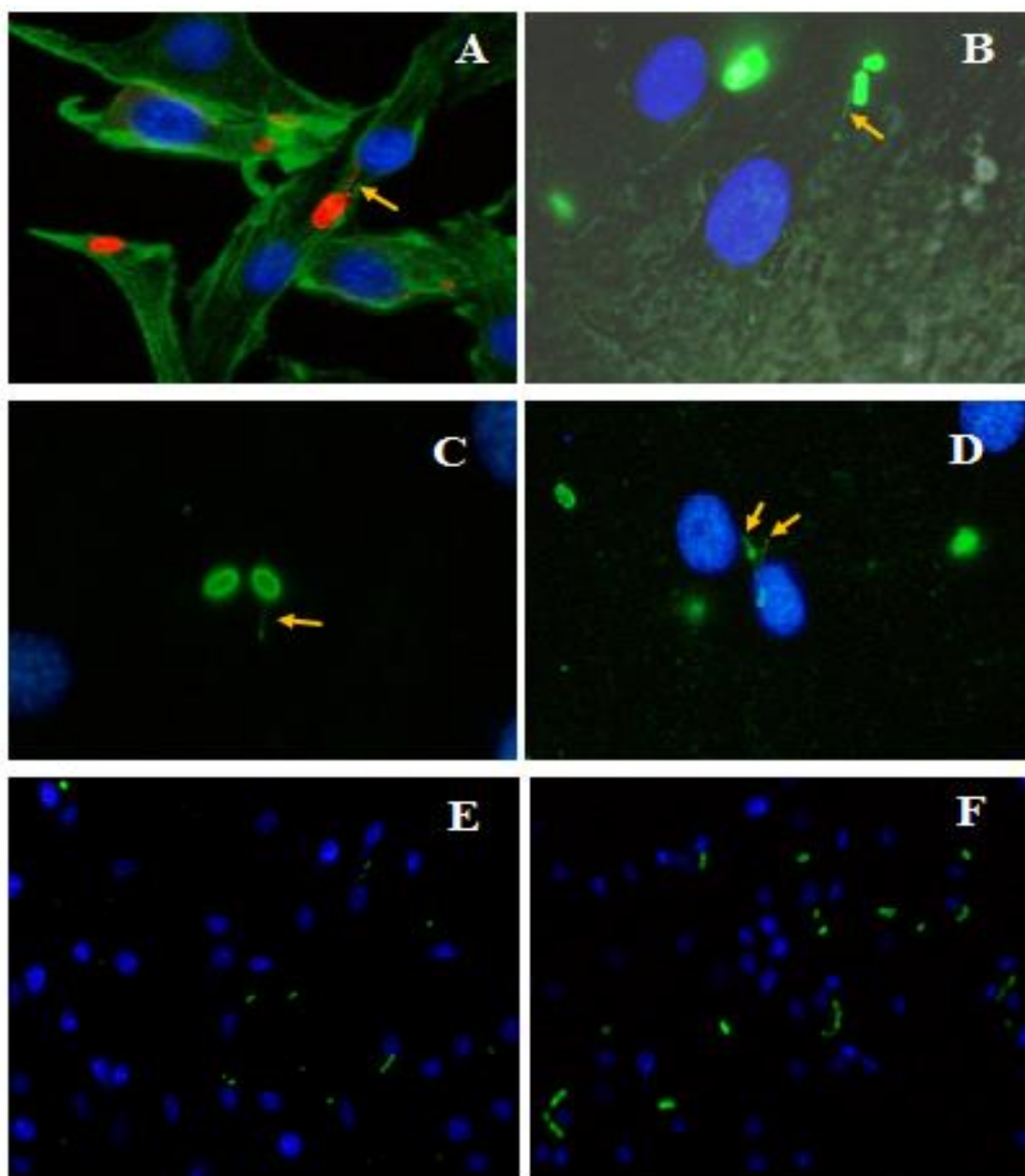


Figura 41.- Imágenes de inmunofluorescencia de cultivos de células SAF-1 infectados con *Phdp* (cepa PP3) durante 90 minutos. A: bacterias teñidas con el Ac 2º Alexa 594 (rojo), núcleos de células SAF-1 teñidos con DAPI (azul) y fibras de actina del soma de la célula con Alexa Fluor® 488 Phalloidin (verde). B-F: bacterias teñidas con el Ac 2º Alexa 488 anti-conejo (verde) y núcleos celulares con DAPI (azul). B: Imagen montada sobre otra de los cuerpos celulares obtenida por contraste de fase. Las flechas amarillas señalan pili (en A aparece fragmentado). E-F: Proporción aproximada de bacterias adheridas a las células tras la infección con PP3S (E) y con PP3T (F).

4. Estudio *in vitro* de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la modulación de la respuesta inmunitaria en dorada.

4.1. Expresión génica de citoquinas y proteínas Mx y Casp-3.

En este apartado se analizó la cinética de inducción de los genes estudiados en macrófagos de riñón anterior de dorada, como respuesta a una infección *in vitro* con *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, con y sin fimbrias en su superficie (PP3T y PP3S, respectivamente).

En 72 horas desde la infección no se obtuvo expresión de la proteína Mx en PP3S. Con PP3T se observó expresión entre las 48 y 72 horas post-infección (pi), aunque parece que es inducida a partir de las 24 horas pi. El pico máximo se alcanzó a las 48 horas pi (Figura 42).

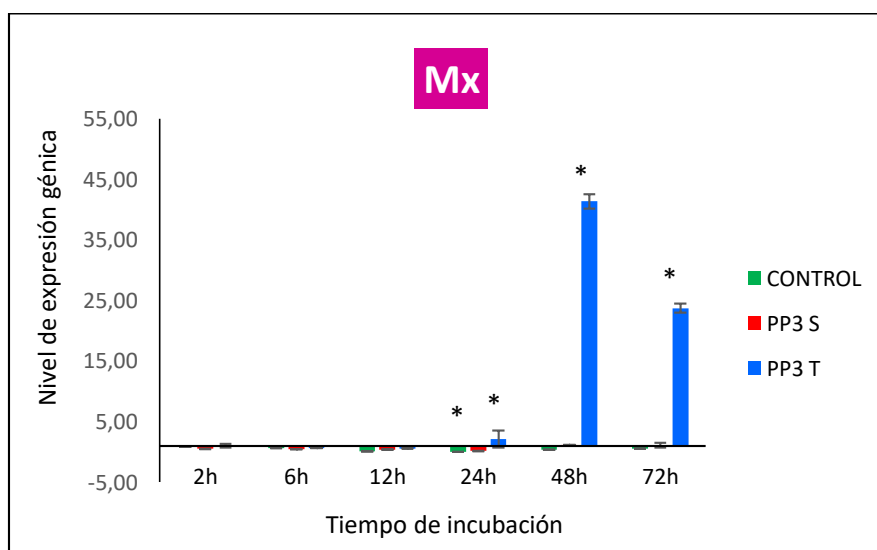


Figura 42.- Expresión génica de Mx en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Se observó expresión de interleuquina-1 β en todos los tiempos examinados en PP3S y PP3T, aunque presentaron diferente perfil (Figura 43). Así, PP3T mantuvo los niveles de expresión constantes a lo largo del tiempo, exceptuando al comienzo de la infección (2h) y a las 24 h pi, donde ocurrió un descenso en los mismos. Mientras que la expresión en el caso de PP3S aumentó alcanzando el máximo a las 72 h pi. Aunque las diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0,03$) (salvo a las 48h pi), es difícil establecer qué cepa induce mayor respuesta, debido al diferente patrón de expresión mostrado por ambas, advirtiendo por otra parte, que con PP3T los niveles sólo fueron superiores durante las 6 y 12 h pi. Sin embargo, sólo obtuvimos expresión de su receptor IL-1r2 a las 72 h pi (Figura 44).

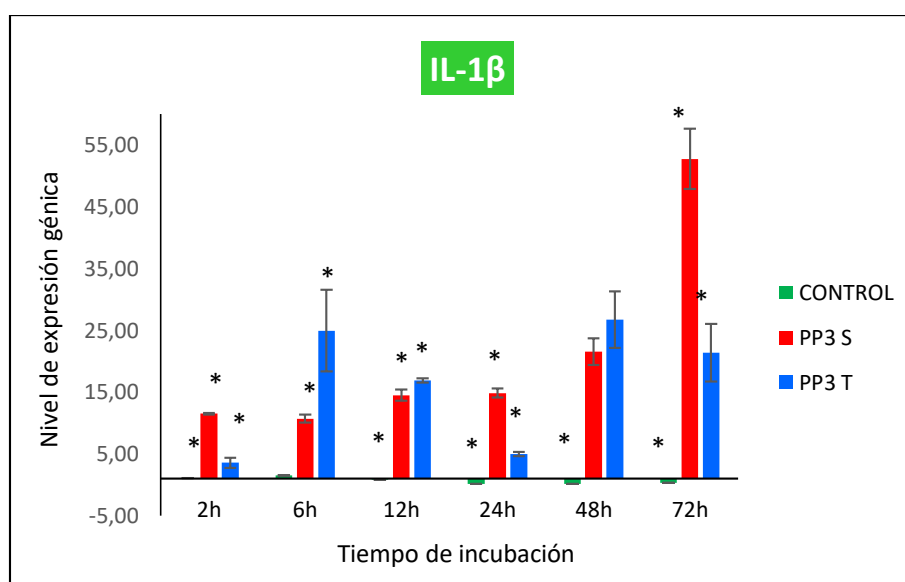


Figura 43.- Expresión génica de IL-1 β en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

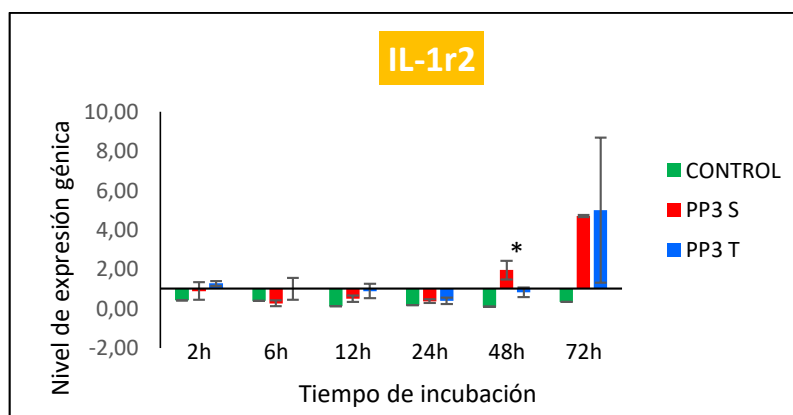


Figura 44.- Expresión génica de IL-1r2 en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La cinética de expresión de IL-6 fue muy similar a la de IL-1 β , aunque de menor magnitud y con algunas diferencias (Figura 45). Con PP3S la producción de ARNm aumentó progresivamente desde las 6h pi hasta las 48-72 h pi, con un índice inicial a las 2h pi moderado pero muy superior al de las 6h pi. Este pico inicial se repitió también tras la infección con PP3T y, además, se apreció un nivel máximo de expresión a las 72h pi.

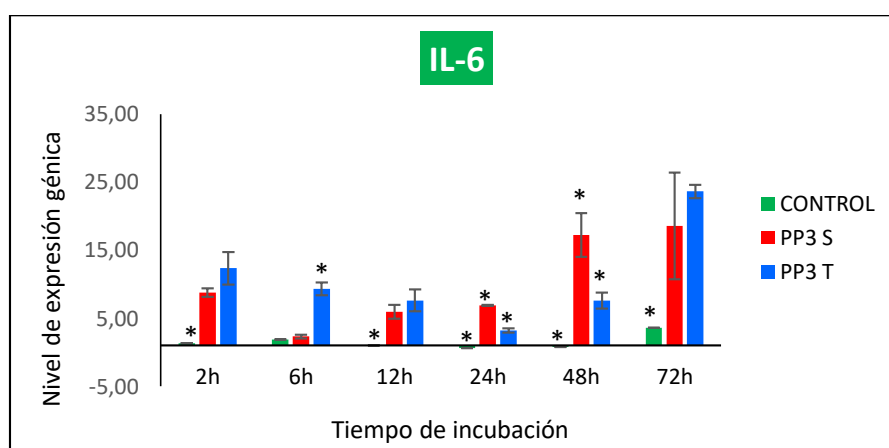


Figura 45.- Expresión génica de IL-6 en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Respecto a la expresión de IL-10, sucedió frente a PP3T a las 2 h pi (pico), y en respuesta a PP3S entre las 24 h (pico) y 48 h pi fundamentalmente, con una ligera inducción a las 2 h pi. Antes y después, los niveles disminuyeron considerablemente o no se expresaron. Las respuestas observadas a las 72 horas para ambas cepas no fueron debidas a la infección. Las diferencias tuvieron significancia estadística a las 2h pi ($p \approx 0$) para PP3T, y a las 24 ($p < 0,25$) y 48 h pi ($p \approx 0$) para PP3S (Figura 46).

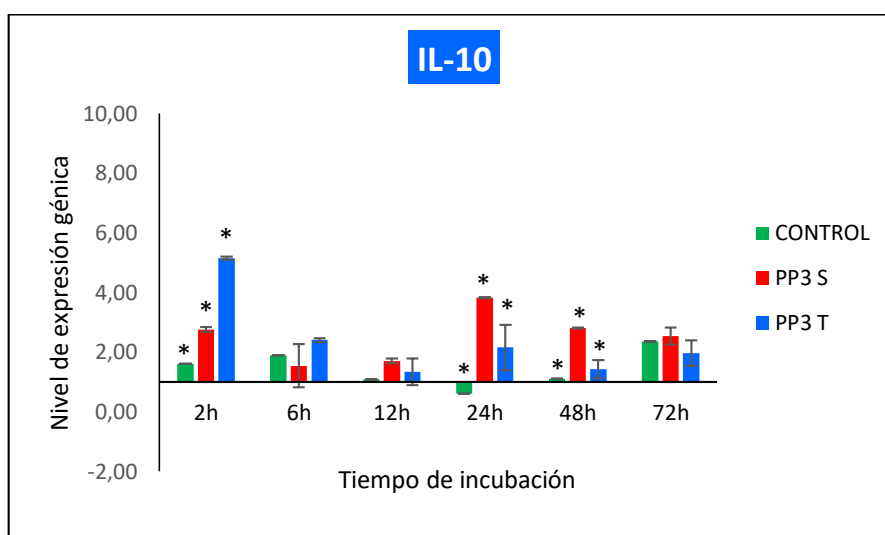


Figura 46.- Expresión génica de IL-10 en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Existió expresión del gen TNF- α a las 2 h pi, igual para PP3S y PP3T. A las 6h pi los niveles de ARNm disminuyeron (PP3T) o se perdieron (PP3S), para volver a incrementarse desde las 12 h pi hasta las 48 h pi, donde se obtuvo el máximo nivel de expresión para ambas bacterias. A las 72 h pi dejó de expresarse el gen en los macrófagos infectados con PP3T como respuesta a la infección experimental. PP3S indujo una notable mayor expresión de TNF- α , mostrando diferencias estadísticamente significativas a las 24 y 48 h pi ($p \approx 0$) (Figura 47).

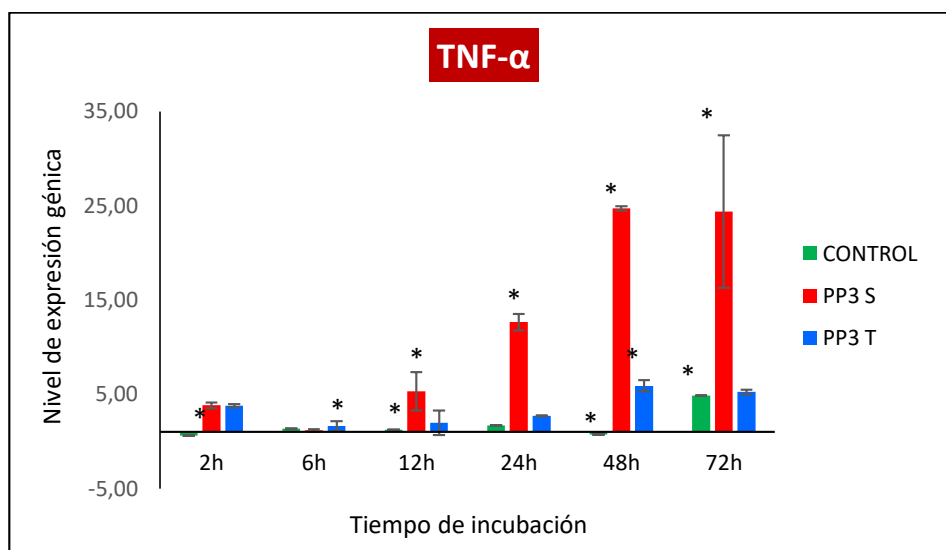


Figura 47.- Expresión génica de TNF- α en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, se observó antes la expresión de la proteína caspasa-3 en los cultivos infectados con PP3S (24 h pi) que con PP3T (48 h pi). Sin embargo, los niveles conseguidos con PP3T fueron mayores ($p \approx 0$), tanto a las 48 h pi como a las 72 h pi. En ambos casos, el pico máximo de expresión se alcanzó a las 48 h pi, disminuyendo a continuación (Figura 48). La síntesis de casp-3 por los macrófagos infectados con *Phdp* siguió el mismo patrón presentado por la proteína Mx, con la diferencia de que la expresión del gen que aquí nos ocupa también fue inducida por PP3S.

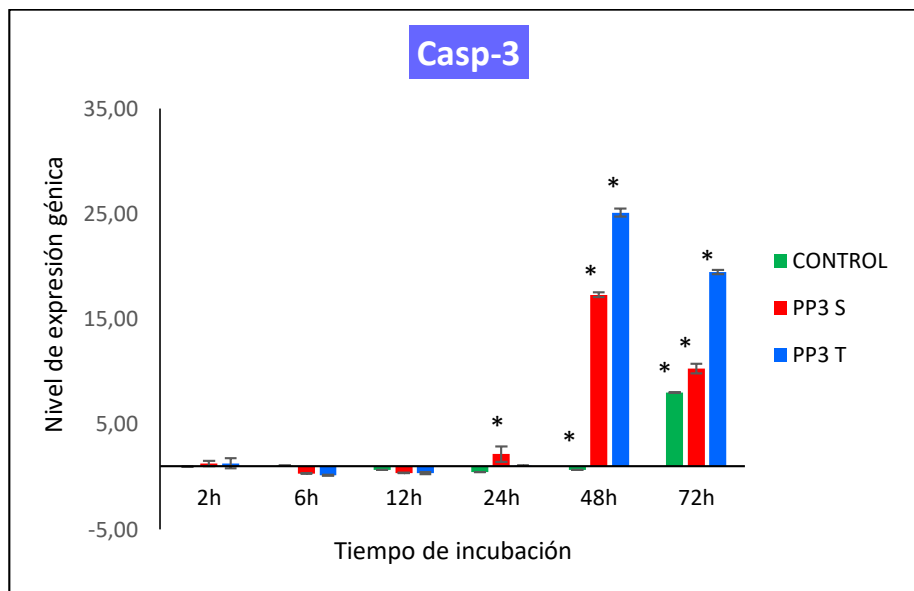


Figura 48.- Expresión génica de Casp-3 en macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con la cepa PP3 de *Phdp* en presencia (PP3T) y ausencia (PP3S) de fimbrias en su superficie. Valores expresados como la media $\pm$ SE de la expresión del gen (ARNm) relativa a las 0h determinada por qPCR. *Indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2. Explosión respiratoria y contenido en peroxidasa

La infección de los cultivos de macrófagos con *Phdp* logró inhibir la explosión respiratoria (Figura 49A), sin embargo, no alteró el contenido en peroxidasa (Figura 49B). La producción de radicales superóxido (ROS) fue menor con PP3T, con diferencias estadísticamente no significativas con respecto a PP3S. Por otra parte, los resultados obtenidos en los ensayos para la determinación del contenido en peroxidasa celular fueron inciertos y no dan respuesta a esta cuestión.

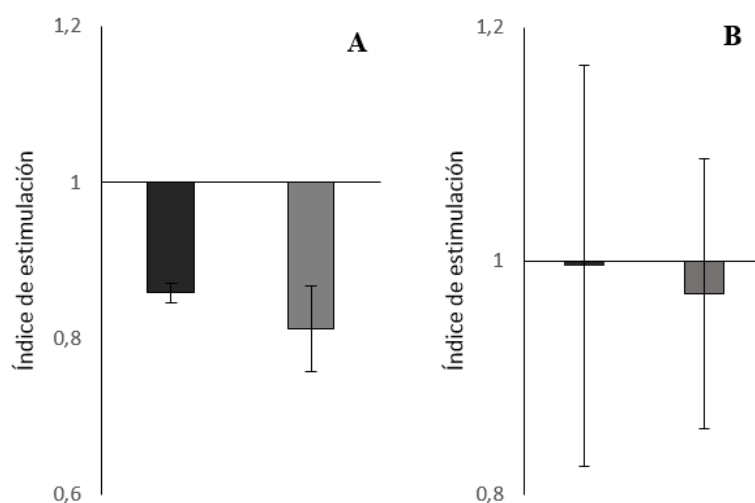


Figura 49.- Explosión respiratoria (A) y contenido en peroxidasa (B) de los cultivos de macrófagos de riñón anterior de dorada infectados con *Phdp* con (PP3T; barra gris) y sin fimbrias (PP3S; barra negra). Los resultados están expresados como índice de estimulación, obtenidos de dividir cada valor de la muestra entre la media de su control.

DISCUSIÓN



DISCUSIÓN

1. Determinación de la presencia de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad y a la formación de biocapas en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Con las técnicas utilizadas en este estudio se ha demostrado que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, un patógeno de peces intracelular facultativo, expresa estructuras en su superficie similares a los pili (o fimbrias), que recuerdan en varios aspectos a los apéndices de otras bacterias. No tenemos conocimiento de que estas estructuras hayan sido descritas en *Phdp* con anterioridad. Este microorganismo está caracterizado como inmóvil, debido a la ausencia de flagelo y, en consecuencia, su incapacidad de moverse. Sin embargo, las cepas utilizadas se desplazaron sobre las superficies de plástico, en la interface con el medio sólido, con un movimiento conocido como “movilidad twitching”. La presencia de pili en *Phdp*, puede ejercer un papel importante en la motilidad, adherencia a superficies inertes y vivas, y, además, en la formación de biocapas. Los artículos concernientes a la viabilidad de esta bacteria en el medio acuático son escasos y su mecanismo de transmisión aún no ha sido dilucidado (Magariños *et al.*, 1994a). En agua salada puede sobrevivir solamente 3 días (Janssen y Surgalla, 1968), aunque existen evidencias de que bacterias viables son capaces de permanecer durante más tiempo en este medio (Magariños *et al.*, 1993).

La formación de biocapas en medio acuático podría contribuir al establecimiento y supervivencia del patógeno, jugando un papel importante en la transmisión de estos patógenos. Además, una hipótesis alternativa sobre la prevalencia de biocapas en medio acuático es que funcionan de nicho protector contra la depredación, permitiendo mayores densidades de células que en estado libre (Matz *et al.*, 2008). La capacidad de que las bacterias que constituyen una biocapa alcancen grandes densidades ha sido atribuida a varios factores, incluyendo alta resistencia a estímulos estresantes exógenos o la acumulación de nutrientes en las superficies (Johnson *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 2012). En este trabajo hemos demostrado que *Phdp* forma biocapas en superficies sumergidas, y no en la interface aire-líquido en placas de microtitulación. Esta producción de biocapa fue considerablemente dependiente del tiempo de incubación, medio de cultivo, así como de la cepa utilizada. Las cepas de *Phdp* estudiadas no formaron biocapas en placas de 96 pocillos con fondo en U, al contrario que en el

estudio de Khouadja *et al.* (2014); estos autores observaron biocapas en placas de 96 después de 24 horas. Aunque hubo algunas diferencias en las condiciones del ensayo, recomendamos el empleo de placas de fondo plano para la obtención y cuantificación de biocapas en *Phdp*.

Muchas bacterias patógenas producen biocapas como una estrategia valiosa para persistir en el medio. Una biocapa es una comunidad bacteriana estructurada, envuelta en una matriz polimérica producida por las propias bacterias y adherente a superficies vivas e inertes (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

La tinción de la matriz extracelular con FilmTracer es capaz de marcar la mayor parte de las proteínas de la biocapa, como son proteínas fibrilares, lipoproteínas, fosfoproteínas y glicoproteínas. En nuestro estudio, las bacterias de la biocapa no se encontraban completamente embebidas en la matriz extracelular protéica. Esto podría conducir a una fácil separación o desprendimiento de la biocapa, debido a que la escasa matriz proteica producida no es suficiente para provocar una fuerte adherencia al sustrato. Por otra parte, el componente mayoritario de la matriz de la biocapa en *Phdp* podrían ser azúcares o lípidos. El examen microscópico de las biocapas mediante MEB y MLC reveló que *Phdp* formaba largas cadenas de bacterias que presentaban elongación celular durante la producción de biocapa *in vitro*. La unión de bacterias en cadena podría facilitar e incrementar el flujo de nutrientes hacia el interior de la biocapa y permitir un incremento de la cohesión estructural durante situaciones de estrés (Vejborg y Klem, 2009). Otras especies bacterianas también forman cadenas durante la formación de biocapas, como por ejemplo *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* y *Legionella pneumophila* (Rieu *et al.*, 2008; Labbate *et al.*, 2004). La elongación y formación de cadenas podría ser una estrategia frente a la escasez de nutrientes también en *Phdp*. Esta adaptación difiere de la adoptada (y mejor entendida) por bacterias de vida libre en medios acuáticos, que consiste en la disminución del tamaño de la bacteria (Vivas *et al.*, 2004; Arias *et al.*, 2012). Además, el análisis de imagen mediante DAPI, sugiere que la elongación y formación de cadenas observadas en *Phdp* son debidas no a defectos en la replicación del ADN o la segregación cromosómica, sino a una incompleta formación del septo.

En conclusión, basándonos en nuestros resultados, el análisis estandarizado de los apéndices de superficie de *Phdp*, la producción de biocapas, la motilidad y su impacto sobre la supervivencia del patógeno y la patobiología son ahora más factibles y ayudarán a abrir nuevas áreas de investigación en varios campos de la ecología y patogénesis de este patógeno.

2. Establecimiento de las condiciones adecuadas para el desarrollo de estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Muchos autores han llegado a la conclusión de que los cambios de temperatura alteran la expresión de fimbrias (Van der Woude *et al.*, 1990b; Amano *et al.*, 1994; Walker *et al.*, 1999). Durante nuestros experimentos en relación con la temperatura de incubación, se obtuvo una mayor motilidad de *Phdp* entre 22 y 25°C. A bajas temperaturas, especialmente a 18°C, la bacteria no siempre fue capaz de crecer y desplazarse. Un estudio de adhesión a superficies de una bacteria marina (no identificada) resultó en que el número de bacterias adheridas era proporcional a la densidad de bacterias suspendidas a 12-14°C; por el contrario, a 25°C sólo unas pocas bacterias se fijaron a la superficie, a pesar de la alta densidad del cultivo (Fletcher y Floodgate, 1973).

Sin embargo, nosotros no hemos cuantificado la cantidad de bacterias, sino desplazamiento sobre superficies sólidas. Como se mencionó en la introducción de este trabajo, la temperatura y el medio afectan a la fimbriación, aunque parecen hacerlo de manera independiente, ésto fue observado durante un estudio de fimbrias tipo 1 en *E. coli* K-12 (Gally *et al.*, 1993). A bajas temperaturas se ralentiza e incluso se interrumpe la producción de fimbrias porque afecta a los promotores y los genes *fim*. Para *E. coli*, la temperatura óptima se encuentra entre 37 y 41°C, pero estas temperaturas son extremadamente altas para *Phdp*, incluso 28°C.

La expresión de los genes *fim* es ligeramente inferior en medios ácidos y alcalinos que a pH neutro, donde es máxima. Medios ácidos también perturban el “encendido” de los promotores de los genes *fim* influyendo en su transcripción (Schwan

et al., 2002). Ésto podría explicar los resultados obtenidos en nuestro experimento. *Phdp* desarrolló motilidad en medio con pH 7, mientras que a otros valores de pH sucedió sólo y ocasionalmente en dos cepas, después de 72 horas de incubación, con considerable menor desplazamiento que a pH neutro.

Con respecto a la capacidad de adherencia bacteriana, no se hallaron diferencias a pH 7,4 y 8,6 en un bacilo gram-negativo móvil no identificado (Fletcher y Floodgate, 1973) y fue máxima a pH 8,2-8,5 en un estudio con *Vibrio spp.* (Balebona *et al.*, 1995). El efecto represor en la transcripción de estos genes a bajo pH aumenta en *E. coli* uropatógena cuando la osmolaridad es de moderada a alta (Schwan *et al.*, 2002). Al ser *Phdp* un patógeno de peces marinos, puede tolerar altas concentraciones de cloruro sódico, por lo que cabría esperar que el resultado fuera diferente.

La síntesis de fimbrias depende de la tasa de crecimiento específica, que es independiente del nutriente limitante del crecimiento utilizado (Van der Woude *et al.* 1990a). Por otra parte, en nuestro estudio, la cantidad de nutrientes en el medio de cultivo fue reducida, pudiéndose advertir posteriormente una ligera merma en la motilidad de las cepas 94/99 y DI-21 con bajas concentraciones de nutrientes. Sin embargo, con todos los datos obtenidos, pensamos que puede afirmarse que la limitación de nutrientes no parece influir significativamente en el desplazamiento de *Phdp*. En el estudio de Fletcher y Floodgate (1973), la concentración de peptona tampoco afectó el número de bacterias adheridas, incluso si las cantidades empleadas eran superiores a las encontradas de forma natural en el agua de mar. Gally *et al.* (1993) observaron que la formación de pili era más lenta en medios enriquecidos determinados que en medios con limitación de nutrientes, y que podía variar y ser controlada por los niveles de aminoácidos alifáticos (alanina, isoleucina, leucina, valina).

La ausencia de motilidad en medios sin NaCl podría explicarse por la necesidad de *Phdp* de medios salinos para crecer, y en consecuencia, para moverse. Este resultado contrasta con los de otros, dónde un incremento de la osmolaridad redujo la expresión de fimbrias (Schwan *et al.*, 2002). Sin embargo, la adherencia de *Vibrio spp.*, otra bacteria marina, a portaobjetos de vidrio recubiertos de mucus de dorada fue mayor cuando la bacteria fue incubada en agua de mar (3,5% NaCl) que en solución salina (0,85%) y PBS (Balebona *et al.*, 1995).

Se ha descrito que la producción de pili es mayor en medios líquidos que sólidos (1,5% agar) (Amano *et al.*, 1994) y por eso, la motilidad bacteriana es mayor en superficies más suaves y húmedas (0,3% agar) que en superficies relativamente firmes y secas (1,5% agar) (Shi y Zusman, 1993). En cambio, Liu *et al.* (2001) observó mayor dispersión en medios con 1,2-1,6% de agar después de examinar la motilidad twitching con distintas concentraciones de agar, desde el 0,8% al 2%.

Se consiguió un desplazamiento ligeramente mayor sobre superficies rugosas; es sabido que este tipo de superficies favorece la formación de biocapas (Teughels *et al.*, 2006). La adherencia bacteriana se ve afectada por las propiedades fisicoquímicas tanto de la superficie como de la pared celular de las bacterias, incluyendo sus características estructurales (Smets *et al.*, 1999; Camesano y Logan, 2000; Bakker *et al.*, 2004), en este caso, pili. También, Anselme *et al.* (2004) relacionaron rugosidad con cantidad de bacteria adherida a placas de vidrio recubiertas de poliuretano preconditionado en agua de mar. Whitehead *et al.* (2005) y Campoccia *et al.* (2006) estudiaron este fenómeno mediante el uso de hoyos de diámetro y profundidad específicas, mientras que en nuestro ensayo, las marcas en las placas eran irregulares y los resultados se expresaron como desplazamiento y no como número de bacterias. En el primer estudio (Whitehead *et al.*, 2005), hubo un aumento del número de bacterias adherentes en las superficies rugosas, especialmente en el fondo de las grietas (Characklis, 1981), aunque la cantidad más baja se obtuvo en el hoyo más grande; pero en el segundo, no se detectaron diferencias significativas (Campoccia *et al.*, 2006). Además, algunos autores han sugerido que la respuesta bacteriana a la rugosidad a escala nanométrica está mediada por estructuras como las fimbrias (Bakker *et al.*, 2004; Anselme *et al.*, 2004).

La adición de metales al medio (Ca, Co, Cu, Fe, etc.) (Cruz *et al.*, 2012) o la exposición de la bacteria a las células del tejido con las que interactúa y presenta tropismo (Thankavel *et al.*, 1999) como en nuestro trabajo, son algunos de los métodos empleados para estudiar y promover la adherencia bacteriana y el twitching. Sin embargo, la motilidad de *Phdp* en este ensayo dependió de la cepa. Así, la propagación de la cepa PP3 se vio favorecida en medios con la mayor concentración de células SAF-1; concentraciones menores de células fueron suficientes e incluso mejores para las cepas 94/99, DI-21 y ATCC 17911, mientras que para la cepa C2, la ausencia o presencia de células en el medio fue indiferente.

Con el empleo del medio “twitching” y las condiciones de cultivo establecidas podemos incrementar significativamente la expresión de pili en *Phdp*. Ahora podemos continuar con el estudio de estas estructuras y su relación con la capacidad del patógeno de adherirse a e invadir células no fagocíticas. Además de su posible participación en el desarrollo de inmunidad frente a *Phdp* y posible aplicación en formulaciones vacunales o como diana terapéutica.

3. Estudio *in vitro* de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la capacidad de adherencia e invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en línea celular SAF-1.

El objetivo de este estudio fue analizar la interacción de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con células SAF-1 y determinar si la presencia de fimbrias en la superficie bacteriana, habiendo estimulado previamente su síntesis, incrementa la capacidad de adherencia e invasión de la bacteria, influyendo de este modo en las fases iniciales de la infección.

Se han utilizado distintas líneas celulares de peces para el estudio de *Phdp*, entendiendo que la invasión de células no fagocíticas podría significar una estrategia del patógeno para eludir la respuesta inmunológica del hospedador (Magariños *et al.*, 1996b), así como un importante factor de virulencia (Acosta *et al.*, 2009), favoreciendo la propagación de la infección. Y aunque *Phdp* es capaz de penetrar en células de carpa (EPC), salmón (CHSE-214), trucha arco iris (RTM), lubina estriada (SBL), pez gato (CCO), carpita cabezona (FHM) y dorada (SAF-1) (Magariños *et al.*, 1996b; López-Dóriga *et al.*, 2000; Elkamel y Thune, 2003; Acosta *et al.*, 2009), y sobrevivir intracelularmente hasta 7 días en fibroblastos de dorada (SAF-1) (Acosta *et al.*, 2009), los índices de replicación intracelular descritos son bajos (Elkamel *et al.*, 2003a; Acosta *et al.*, 2009).

Se ha afirmado que el proceso de internalización de *Phdp* es dependiente del tiempo. Aunque se ha podido detectar bacteria intracelular después de 30 minutos tras la infección en células SAF-1, se alcanzaron mayores porcentajes a los 90 minutos post-infección (pi) (Acosta *et al.*, 2009), pudiendo aumentar durante las primeras 3 h pi y en

menor medida hasta las 6 h pi también en otras líneas celulares (López-Dóriga *et al.*, 2000; Elkamel y Thune, 2003), en los días siguientes los recuentos de UFCs disminuyeron. De ahí, que en nuestro experimento los cultivos infectados fueran incubados durante 90 minutos a 25°C, de acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente por otros autores en un ensayo semejante; las tasas de internalización fueron mayores a 25°C que a 20°C (Vega Alonso, tesis 2015).

La capacidad de adherencia e invasión de *Phdp* en líneas celulares es considerada débil o moderada (al contrario que en células intestinales de peces) (Magariños *et al.*, 1996b), y depende de la línea celular y de la cepa (Magariños *et al.*, 1996b; Elkamel y Thune, 2003; Acosta *et al.*, 2009). Sin embargo, existe controversia en cuanto a la influencia del inóculo en los niveles de invasión del patógeno. Algunos autores observaron mayor eficiencia cuanto mayor fue la dosis infectiva (Acosta *et al.*, 2009); por el contrario, otros lograron mejores tasas de invasión a baja multiplicidad de infección (López-Dóriga *et al.*, 2002), llegando a la saturación a MOI altas ($1,6 \times 10^4$), lo que sugiere por otra parte que la internalización de la bacteria puede estar mediada por receptores específicos con número limitado.

En nuestro ensayo, la eficiencia de la invasión de las cepas de *Phdp* estudiadas fue inferior al 0,1%, similar al resultado obtenido por Acosta *et al.* (2009), considerando que la MOI utilizada por nosotros fue ligeramente inferior y a excepción de la cepa 94/99, que exhibió una mayor tasa de invasión en el estudio de 2009. Los índices de adherencia medios manifestaron mayor dispersión entre cepas. desde un 1% para la cepa EPOY 8803-II hasta el 21-23% para la cepa PP3, no obstante, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Además, las cepas DI-21, ATCC 17911 y EPOY 8803-II demostraron ser más adherentes a las células SAF-1 que a las líneas celulares EPC, CHSE-214, RTM y SBL (excepto EPOY 8803-II en CHSE-214) (Magariños *et al.*, 1996b). Las tasas de adherencia mostradas por las distintas cepas, fueran virulentas (PP3, C2, DI-21), moderadamente virulentas (ATCC 17911) o no virulentas (94/99, EPOY 8803-II), no estuvieron correlacionadas con su poder patógeno. Asimismo, las cepas con mayores índices de adherencia no manifestaron en todos los casos mayores tasas de internalización, lo que indica que la adherencia e invasión de *Phdp* podrían ser dos procesos independientes, como sostienen algunos autores (Magariños *et al.*, 1996b).

Pese al uso de modelos *in vitro* e *in vivo*, los mecanismos involucrados en la adherencia, invasión y supervivencia de *Phdp* son aún poco conocidos; si bien, la internalización de la bacteria parece requerir la participación activa de los microfilamentos de actina y depender del metabolismo de la célula hospedadora (Magariños *et al.*, 1996b; López-Dóriga *et al.*, 2000; Acosta *et al.*, 2009).

La síntesis de fimbrias favoreció la adherencia de *Phdp* a las células y en menor medida la eficiencia de la invasión, y estas diferencias fueron estadísticamente significativas, sugiriendo que la producción de fimbrias podría ejercer un papel importante en la adherencia, colonización e internalización de este patógeno en células no fagocíticas del hospedador, en su caso, la dorada. La adherencia podría suceder de modo inespecífico, como ocurre en superficies inertes (Sun *et al.*, 2000; Skerker y Berg, 2001) o, por el contrario, estar relacionado probablemente con la presencia de receptores específicos en las células, como ha sido descrito para otras bacterias (Lee *et al.*, 1994; Kallstrom *et al.*, 1997; Hazes *et al.*, 2000; Kirchner *et al.*, 2005; Weyand *et al.*, 2006). Otros factores de virulencia como la presencia de cápsula no produjeron diferencias en la invasión de células no fagocíticas (López-Dóriga *et al.*, 2000); aunque ha sido demostrado con anterioridad su papel en la reducción significativa de los índices de fagocitosis por parte de los macrófagos de dorada, sin efecto en la actividad bactericida de las células (Arijo *et al.*, 1998). Quedaría pendiente confirmar la influencia de estas estructuras similares a pili en la virulencia de *Phdp in vivo*.

4. Estudio *in vitro* de la influencia de las estructuras bacterianas asociadas a la motilidad en la modulación de la respuesta inmunitaria en dorada.

Se analizó la expresión de citoquinas en macrófagos de dorada inducida por una infección *in vitro* por *Phdp*, y la influencia de las fimbrias en esa inducción, mediante la estimación de la cantidad de ARNm, por qPCR. La cinética de expresión de IL-1 β y IL-6 fue muy similar y con altos niveles, aunque de mayor intensidad para IL-1 β , manteniéndose en todos los tiempos de incubación desde las 2h pi. Sin embargo, fue diferente entre cepas y los niveles de expresión dependieron del tiempo post-infección.

Se ha sugerido que la IL-6 está regulada por la IL-1 β (El Aamri *et al.*, 2015). IL-1 β tiene dos receptores, IL-1r1 que media sus efectos y IL-1r2 que inhibe su actividad. IL-1r2 ha sido clonada en dorada y su expresión ha sido estudiada por diferentes autores (López-Castejón *et al.*, 2007). En nuestro trabajo, ciertamente la síntesis de IL-1r2 no fue estimulada hasta las 48-72 horas, si bien no se observó inhibición de la IL-1 β . Los niveles de transcripción del gen TNF- α debidos a la infección por PP3S fueron considerables y aumentaron a lo largo del tiempo hasta las 48-72 h pi, similar a la cinética mostrada por las interleuquinas mencionadas anteriormente, con algunas diferencias; mientras que PP3T indujo la síntesis de TNF- α , pero no de manera importante. En bacterias gram positivas (*S. pneumoniae*), se ha descrito un aumento de TNF- α y IL-6 en infecciones con cepas que presentan fimbrias sintetizadas por la vía de las sortasas, en comparación con cepas no piliadas (Barocchi *et al.*, 2006). La expresión de IL-10 inducida por PP3T tuvo un pico a las 2h pi, coincidente con una mayor internalización de la bacteria durante este periodo (90 min) en células SAF-1, en comparación con PP3S (experimento punto 3). Posteriormente los niveles disminuyeron, aunque se detectó un ligero incremento a las 24 h pi, después de un pico de IL-1 β a las 12h pi seguido de una drástica disminución a las 24 h pi, volviendo a incrementarse notablemente su expresión en los sucesivos tiempos de incubación. Sin embargo, contra PP3S, el máximo nivel de expresión se obtuvo a las 24 h pi, regresando a los niveles iniciales a las 48 h pi. Los genes Mx y *casp-3* tuvieron una respuesta importante a partir de las 48 h pi, comenzando a expresarse desde 24 h pi. También, resulta curioso que la bacteria PP3S intracelular no fuera capaz o suficiente para inducir la síntesis de Mx. Los resultados revelaron una respuesta predominantemente pro-inflamatoria (IL-1 β , IL-6, TNF- α), con inducción de la apoptosis de los macrófagos de dorada después de 24-48 horas de la infección *in vitro* con *Phdp*. La respuesta inflamatoria frente a la infección por *Phdp* piliada parece estar mediada principalmente por las interleuquinas 1 y 6, y muy discretamente por TNF- α . En otras infecciones, como es el caso de leucocitos de lubina infectados por *Streptococcus iniae*, se ha observado una primera fase pro-inflamatoria seguida de un incremento de la expresión de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10 y Mx) que coincide con la restitución de los niveles basales de IL-1 β , IL-6 y TNF- α (El Aamri *et al.*, 2015).

Phdp puede sobrevivir intracelularmente y replicarse en macrófagos de lubina, (Elkamel *et al.*, 2003b), aunque anteriormente algunos autores afirmaron que macrófagos de lubina, dorada y trucha arcoiris eran capaces de matar al patógeno (Skarmeta *et al.*, 1995). Además, la bacteria resulta citotóxica para fagocitos de peces (Noya *et al.*, 1995b), al igual que en otras líneas celulares (Magariños *et al.*, 1996b; Yoshida *et al.*, 1997), pudiendo inducir la apoptosis de macrófagos y neutrófilos de lubina (Elkamel, PhD Thesis 2002; do Vale *et al.*, 2003) y lenguado (en infecciones naturales) (do Vale *et al.*, 2005). La proteína AIP56, responsable de la destrucción de los fagocitos, es secretada abundantemente por cepas virulentas de *Phdp* (do Vale *et al.*, 2005) posiblemente mediante el SSTII o una vía tipo IV (sistema utilizado en la formación de pili tipo IV) (Hueck, 1998). Se ha descrito también que *Phdp* es capaz de inducir la síntesis de las proteínas pro-apoptóticas casp-3 y casp-9 (do Vale *et al.*, 2005), ahora ratificado por nosotros (expresión de *casp-3*). En nuestro estudio, hubo una mayor estimulación de la expresión de *casp-3* por bacterias piliadas. La apoptosis de las células fagocíticas del hospedador afecta la fagocitosis y ataque contra el patógeno y libera las bacterias (do Vale *et al.*, 2003), permitiendo la propagación de la infección. Igualmente se vería afectada la producción de citoquinas por esos leucocitos, con el consecuente perjuicio de la respuesta inmunológica del pez (do Vale *et al.*, 2005). Con este mismo objetivo de sobrevivir en el interior de los fagocitos, algunas bacterias, como *S. iniae* o *Vibrio anguillarum*, son capaces de inhibir la expresión de los genes de las caspasas (Reis *et al.*, 2007; El Aamri *et al.*, 2015).

En línea celular SAF-1 (Vega Alonso, Tesis Doctoral 2015), los perfiles de expresión de algunas citoquinas difieren de los señalados en la infección de macrófagos por *Phdp*. Así, por ejemplo, IL-1 β presentó una cinética discontinua, con una expresión inicial mínima a las 4 h pi y un pico máximo a las 24 h pi, mientras que nosotros obtuvimos expresión desde las 2 h pi y se mantuvo ascendente hasta las 72 h pi. IL-1 β , IL-1r2 y TNF- α mostraron un mismo perfil de expresión. Esto fue similar a los resultados de nuestro estudio para IL-1 β y TNF- α , pero no para IL-1r2, cuya inducción difirió con la del resto, si bien, nosotros tampoco observamos inhibición en la expresión del gen IL-1 β . Por el contrario, aunque más tardía, la cinética de expresión de Mx en los macrófagos frente a la infección por PP3T fue la misma que en fibroblastos de dorada

infectados por *Phdp* cultivada en condiciones normales. Se comentó en el primer párrafo que PP3S no indujo la síntesis de Mx en leucocitos.

Cómo afecta el uso de probióticos o vacunas al sistema inmunitario del pez es una cuestión interesante, pues supone una alternativa al uso de antibióticos para el control de enfermedades como la que nos ocupa.

Se ha examinado la respuesta de leucocitos HK de lubina incubados con la cepa probiótica *Vagococcus fluvialis* L-21, obteniendo altos niveles de expresión de citoquinas pro-inflamatorias desde tan sólo 1h pi, los perfiles de IL-10 y *casp-3* son similares a los mostrados frente a la infección por *S. iniae* (El Aamri *et al.*, 2015) y por *Phdp* (en este estudio), respectivamente, y Mx se expresó a las 12 y 48 h pi (Román *et al.*, 2013). Una temprana sobreexpresión (1 día pi) de los genes IL-1 β , IL-1r2, TNF- α y COX-2 fue estimulada tras la inmunización de doradas con una vacuna (cepa 94/99) inactivada por calor, mientras que la síntesis de IL-1r2, inducida por la administración de una vacuna inactivada con formol, inhibió la expresión de IL-1 β (Grasso *et al.*, 2015). La mayor expresión de Mx tuvo lugar únicamente a los 3 días pi con la vacuna inactivada con luz ultravioleta (Grasso *et al.*, 2015), parecido a otras vacunaciones con bacterina de *Vibrio anguillarum* y LPS y ADN de *Vibrio alginolyticus* (Acosta *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2011). También ha sido descrita la influencia de la dieta en el sistema inmunológico del pez para varias especies (Montero *et al.*, 2010), pudiendo ser un factor importante involucrado en el potencial defensivo del hospedador frente a infecciones.

Finalmente, se analizó la explosión respiratoria y el contenido en peroxidasa de los cultivos de macrófagos de dorada infectados con la cepa PP3 con y sin fimbrias, con el objetivo de determinar si las fimbrias ejercen algún efecto a este nivel en la respuesta de las células frente a la infección. *Phdp* es extremadamente sensible a los radicales oxidativos (ROS) generados durante la explosión respiratoria de los macrófagos (Barnes *et al.*, 1999), como son el ión superóxido y el peróxido de hidrógeno. Pero presenta actividad SOD y catalasa, dependientes de hierro (y de atmósfera aerobia) (Barnes *et al.*, 1999; Díaz-Rosales *et al.*, 2003, 2005), lo que constituye un factor de virulencia en muchas bacterias. Es más, se ha demostrado que si *Phdp* logra sobrevivir a la exposición al H₂O₂ presentará mayor resistencia en subsiguientes exposiciones (Díaz-Rosales *et al.*, 2003), esto es especialmente interesante en cepas no virulentas; pues se

ha detectado mayores niveles de actividad catalasa en cepas virulentas, registrándose índices de supervivencia bacteriana en fagocitos de lenguado del 62% frente al 19% alcanzado por cepas no virulentas (Díaz-Rosales *et al.*, 2005). En nuestro trabajo, se apreció inhibición de la producción de ROS, al igual que con otras especies como *Streptococcus iniae* en leucocitos de lubina (El Aamri *et al.*, 2015) o *Vibrio anguillarum* en leucocitos de lubina (Sepulcre *et al.*, 2007) y de trucha arcoíris (Boesen *et al.*, 2001). No se observó efecto protector adicional o modulación de la explosión respiratoria en la cepa piliada. Sin embargo, se ha visto que cepas capsuladas de *Phdp* pueden resistir mejor el efecto bactericida de las moléculas reactivas de nitrógeno (óxido nítrico y peroxinitritos) producidas también durante la respuesta inmunitaria inespecífica en macrófagos (Acosta, tesis 2002). Por otra parte, la muerte bacteriana no se reduce por la adición de SOD al sistema, sugiriendo que están involucrados otros mecanismos; sin embargo, sí se consigue con la adición de catalasa o ambas enzimas (Barnes *et al.*, 1999). La administración oral de probióticos (cepas *Pdp11* y *Pdp13* de *Shewanella sp.*) y ciertas microalgas (*Porphyridium cruentum*) en combinación o no con bacterinas contra *Phdp* han logrado incrementar la actividad oxidativa de los macrófagos de lenguado, confiriendo protección frente a infecciones experimentales por *Phdp* (Díaz-Rosales *et al.*, 2008, 2009). Otra cepa probiótica, *Vagococcus fluvialis* L-21, también consiguió aumentar la explosión respiratoria, el contenido en peroxidasa y la actividad fagocítica de leucocitos de dorada y lubina (Román *et al.*, 2012).

Resumiendo, la presencia de fimbrias en *Phdp* indujo la producción de Mx e incrementó significativamente la expresión de caspasa-3 a partir de las 24 y 48 h pi, respectivamente, siendo en ambos casos máxima a las 48h pi. Por el contrario, no influyó en la respuesta inflamatoria temprana del macrófago mediada por interleuquinas, aunque se observó una notable disminución de TNF- α . Tampoco parece modular los procesos oxidativos que tienen lugar en los macrófagos. Se necesitarían estudios *in vivo* para comparar, confirmar y esclarecer estos procesos en dorada.

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



CONCLUSIONES

PRIMERA.-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es capaz de expresar estructuras similares a fimbrias en su superficie.

SEGUNDA.-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* puede formar biocapas estables después de 4-6 días.

TERCERA.-La cepa virulenta DI-21 es capaz de aglutinar (MRHA) eritrocitos humanos y de lenguado, pero no de lubina. Las otras 4 cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* estudiadas (C2, PP3, 94/99 y ATCC 17911) no presentan actividad hemaglutinante.

CUARTA.-La síntesis de fimbrias permite que *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se adhiera fuertemente a material plástico y permita su desplazamiento sobre superficies sólidas mediante un tipo de movimiento denominado twitching.

QUINTA.-La motilidad twitching y por ende la expresión de fimbrias en *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* se ven favorecidas a 22-25°C en un medio compuesto de 3,7% BHIB, 1% NaCl y 0,2% agarosa, con un pH final de 7. La dispersión de la bacteria es considerable después de 3 días. Dicha motilidad se ve también favorecida en superficies rugosas o mediante la adición de células SAF-1 al medio, pero el comportamiento en estos casos es cepa dependiente.

SEXTA.-La mayoría de las cepas de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* muestran una alta adherencia a células SAF-1, en comparación con otras líneas celulares.

SÉPTIMA.-La presencia de fimbrias mejora significativamente la adherencia y la eficiencia de la invasión de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en células SAF-1, indicando que estas estructuras podrían influir en las fases iniciales de la infección.

OCTAVA.-La respuesta inmunitaria temprana de los macrófagos de dorada frente a la infección por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es predominantemente pro-inflamatoria. Sin embargo, la cepa piliada estudiada reduce los niveles de expresión de TNF- α .

NOVENA.-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* es capaz de inducir apoptosis de los macrófagos. La cepa piliada utilizada intensifica esta respuesta.

DÉCIMA.-La cepa piliada estudiada de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* induce la expresión de proteína Mx.

UNDÉCIMA.-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* inhibe la explosión respiratoria de macrófagos de dorada. Las fimbrias no están involucradas en los mecanismos de supervivencia bacteriana frente a estos procesos oxidativos.

CONCLUSIONS

FIRST.-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* may express pili -like structures on the surface.

SECOND.-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* can forms a stable biofilm after 4-6 days.

THIRD.-The virulent strain DI-21 is capable of agglutinating human and sole erythrocytes (MRHA), but not sea bass red blood cells. The other 4 strains do not display haemagglutinating activity.

FORTH.-Piliated bacterium is able to strongly adhere to plastic and move on solid surfaces by twitching motility.

FIFTH.-Twitching motility and hence, fimbriae expression in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* are greater at 22-25°C in a medium composed of 3,7% (w/v) BHIB, 1% (w/v) NaCl and 0,2% (w/v) agarose, with a final pH of 7. Bacteria spreading over the surface is considerable after 3 days. This motility is also favoured on rough surfaces or after the addition of SAF-1 cells to the medium, but the behaviour in both cases depends on the strain.

SIXTH.-Most of the *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains show high adhesion to SAF-1 cells.

SEVENTH.-Fimbriae significantly increase the adhesion to and the efficiency of the invasion of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in SAF-1 cells, indicating that they might be involved in the initial stages of infection.

EIGHTH.-The early immune response in seabream macrophages against infection by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is predominantly pro-inflammatory. However, the piliated strain studied reduces the levels of expression of TNF- α gene.

NINTH.-*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* may induce apoptosis of macrophages. The piliated bacterium used intensifies this response.

TENTH.-Piliated bacterium induces the Mx protein expression.

ELEVENTH.-Fimbriae are not involved in the inhibition of the respiratory burst achieved by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

BIBLIOGRAFÍA



- Acosta F, Real F, Caballero MJ, Siero C, Fernández A, Rodríguez LA (2002). Evaluation of immunohistochemical and microbiological methods for the diagnosis of brown trout infected with *Hafnia alvei*. *J Aquat Anim Health* 14: 77-83.
- Acosta F (2002). Respuesta immune inespecífica de la dorada (*Sparus aurata*) frente a *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Ph.D. tesis, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, España. 229pp.
- Acosta F, Lockhart K, Gahlawat SK, Real F, Ellis AE (2004). Mx expression in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr in response to *Listonella anguillarum* bacterin, lipopolysaccharide and chromosomal DNA. *Fish Shellfish Immunol* 17: 255–263.
- Acosta F, Ellis AE, Vivas J, Padilla D, Acosta B, Déniz S, Bravo J, Real F (2006). Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and sea bass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish Shellfish Immunol* 20: 709-717.
- Acosta F, Vivas J, Padilla D, Vega J, Bravo J, Grasso V, Real F (2009). Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *J Fish Dis* 32: 535-541.
- Alm RA, Mattick JS (1995). Identification of a gene, pilV, required for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*, whose product possesses a pre-pilin-like leader sequence. *Mol Microbiol* 16: 485–496.
- Amagliani G, Omiccioli E, Andreoni F *et al.* (2009). “Development of a multiplex PCR assay for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* identification in fish samples,”. *J Fish Dis* 32(8): 645–653.

- Amano A, Sharma A, Sojar HT, Kuramitsu HK, Genco RJ (1994) Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 62: 4682-4685.
- Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301: 105–107.
- Anderson KL, Billington J, Pettigrew D et al. (2004). An atomic resolution model for assembly, architecture, and function of the Dr adhesins. *Mol Cell* 15: 647–657.
- Andreoni F, Boiani R, Serafini G et al. (2013). “Isolation of a novel gene from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and analysis of the recombinant antigen as promising vaccine candidate,”. *Vacc* 31(5): 820–826.
- Andreoni F, Maganani M (2014). Photobacteriosis: prevention and diagnosis. *J Immunol Res*, 7pp.
- Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazson M, Liley M, Ploux L (2010) The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometer scale. *Acta Biomater* 6: 3824-3846.
- APROMAR. 2016. La acuicultura en España 2016. 88 pp.
- Arias CR, Lafrentz S, Cai W, Olivares-Fuster O (2012). Adaptive response to starvation in the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: cell viability and ultrastructural changes. *BMC Microbiol* 12: 266.
- Arijo S, Borrego JJ, Zorrilla I, Balebona MC, Moriñigo MA (1998). Comparison of the immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) to capsulated and uncapsulated strains of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol* 8: 63-72.

- Arijo S, Rico R, Chabrillon M, Diaz-Rosales P, Martínez-Manzanares E *et al.* (2005). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis* 28: 33–38.
- Aroeti B, Friedman G, Zlotkin-Rivkin E, Donnenberg M (2012). Retraction of enteropathogenic *E. coli* type IV pili promotes efficient host cell colonization, effector translocation and tight junction disruption. *Gut Microbes* 3: 267–271.
- Assalkhou R, et al. (2007). The outer membrane secretin PilQ from *Neisseria meningitidis* binds DNA. *Microbiol* 153: 1593–1603.
- Austin B, Austin DA (1993). Bacterial Fish Pathogens. En: Disease in Farmed and Wild Fish, Second Edition, Ellis Horwood, London.
- Averhoff B (2004). DNA transport and natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 36: 25–33.
- Baerwald MR, Petersen JL, Hedrick RP, Schisler GJ, May B (2011). A major effect quantitative trait locus for whirling disease resistance identified in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Heredity* 106(6): 920-926.
- Bakker DP, Busscher HJ, van Zanten J, de Vries J, Klijnstra JW, van der Mei HC (2004) Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after conditioning film formation in the marine environment. *Microbiol* 150: 1779-1784.
- Bakopoulos V, Adams A, Richards RH (1995). Some biochemical properties and antibiotic sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy. *J Fish Dis* 18: 1-7.

- Bakopoulos V, Peric Z, Rodger H, Adams A, Richards R (1997). First report of fish pasteurellosis from Malta. *J Aquat Anim Health* 9: 26-33.
- Bakopoulos V, Hanif A, Poulos K, Galeotti M, Adams A, Dimitriadis GJ (2004). The effect of in vivo growth on the cellular and extracellular components of the marine bacterial pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis* 27(1): 1-13.
- Balbuena *et al.*, FAO. 2011. Manual básico de sanidad piscícola. 51 pp.
- Balebona MC, Moriñigo MA, Sedaño J, Martínez Manzanares E, Vidaurreta A, Borrego JJ, Toranzo AE (1992). Isolation of *Pasteurella piscicida* from sea bass in southwestern Spain. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 12(1): 168-170.
- Balebona MC, Moriñigo MA, Faris A, Krovacek K, Mansson I, Bordas MA, Borrego JJ (1995) Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. *Aquac* 132: 113-120.
- Baptista T, Romalde JL, Toranzo AE (1996). First occurrence of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Bull Eur.Assoc. Fish Pathol* 16: 92-95.
- Barnes AC, Balebona MC, Horne MT, Ellis AE (1999). Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. *Microbiol* 145(2): 483-494.
- Barnes AC, dos Santos NMS, Ellis AE (2005). "Update on bacterial vaccines: *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*". *Dev Biol* 121: 75-84.
- Baudin Laurencin F, Pepin JF, Raymond JC (1991). First observation of an epizootic of pasteurellosis in farmed and wild fish of the French Mediterranean coasts. En: Abstracts of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists. p.17.

- Barocchi MA, Ries J, Zogaj X, Hemsley C, Albiger B et al. (2006) A pneumococcal pilus influences virulence and host inflammatory responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 2857–2862.
- Barreto Argilagos G, Campal Espinosa A, Abreu Guirado O, Velázquez Pérez B (2001). El bloqueo de la adhesión fimbrial como opción terapéutica. *Rev Prod Anim* 13(1): 71-82.
- Bejar J, Borrego JJ, Alvarez MC (1997). A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac* 150: 143-153.
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM (2008). *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322: 249–289.
- Bernstein HD (1998). Membrane protein biogenesis: the exception explains the rules. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14587–14589.
- Bian Z, Normark S (1997). Nucleator function of CsgB for the assembly of adhesive surface organelles in *Escherichia coli*. *EMBO J* 16: 5827-5836.
- Bieber D, Ramer SW, Wu CY, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, Schoolnik GK (1998). Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280: 2114–2118.
- Boesen JT, Larsen MH, Larsen JL, Ellis AE (2001). *In vitro* interactions between rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) macrophages and *Vibrio anguillarum* serogroup 02a. *Fish Shellfish Immunol* 11: 415-431.
- Bonet R, Magariños B, Romalde JL, Simón-Pujol MD, Toranzo AE, Congregado F (1994). Capsular polysaccharide expressed by *Pasteurella piscicida* grown *in vitro*. *FEMS Microbiol Lett* 124: 285–290.

- Bonner PJ, Shimkets LJ (2006). Phospholipid directed motility of surface-motile bacteria. *Mol Microbiol* 61: 1101–1109.
- Boyd JM, Dacanay A, Knickle LC, Touhami A, Brown LL, Jericho MH, Johnson SC, Reith M (2008). Contribution of Type IV Pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Infect Immun* 76: 1445-1455.
- Bradley DE (1972a). Evidence for the retraction of *Pseudomonas aeruginosa* RNA phage pili. *Biochem Biophys Res Commun* 47: 142–149.
- Bradley DE (1972b). Shortening of *Pseudomonas aeruginosa* pili after RNA phage adsorption. *J Gen Microbiol* 72: 303–319.
- Bradley DE (1980). A function of *Pseudomonas aeruginosa* PAO polar pili: twitching motility. *Can J Microbiol* 26: 146–154.
- Bravo J, Acosta F, Padilla D, Grasso V, Real F (2011). Mx expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in response to poly I: C, bacterial LPS and chromosomal DNA: preliminary study. *Fish Shellfish Immunol* 31: 170-172.
- Brinton CC Jr (1965). The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans N Y Acad Sci.* 27: 1003–1054.
- Browne-Silva J, Nishiguchi MK (2008). Gene sequences of the pil operon reveal relationships between symbiotic strains of *Vibrio fischeri*. *Int J System Evol Microbiol* 58: 1292-1299.
- Bullock GL (1978). Pasteurellosis of Fishes. Fish Disease Leaflet #54. U.S. Department of the Interior, Fish and Wildlife Service, Washington, D.C.
- Burriesci M, Bhaya D (2008). Tracking phototactic responses and modeling motility of *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *J Photochem Photobiol B* 91: 77–86.

- Burrows LL (2005). Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* 57: 878–888.
- Burton B, Dubnau D (2010). Membrane-associated DNA transport machines. Cold Spring Harb. *Perspect Biol* 2: a000406.
- Camesano TA, Logan BE (2000). Probing bacterial electrosteric interactions using atomic force microscopy. *Environm Sci Technol* 34: 3354-3362.
- Campal Espinosa AC, Junco Barranco JA, Arteaga Moré NO, Castro Santana MD, Casas Suárez S, León Barreras L, Barreto Arguilagos G, Pardo Cardoso G (2008). Procedimiento general para purificar a pequeña escala las fimbrias expresadas por cepas porcinas de *Escherichia coli* enterotoxigénicas. *Rev Colomb Biotecnol* X(1): 122-131.
- Campoccia D, Montanaro L, Agheli H, Sutherland DS, Pirini V, Donati ME, Arciola CR (2006). Study of *Staphylococcus aureus* adhesion on a novel nanostructured surface by chemiluminometry. *Int J Artif Organs* 29: 622-629.
- Campos M, Francetic O, Nilges M (2011). Modeling pilus structures from sparse data. *J Struct Biol* 173: 436–444.
- Candan A, Kucuker MA, Karatas S. (1996). Pasteurellosis in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 16: 150-153.
- Capitani G, Eidam O, Glockshuber R, Grutter MG (2006). Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microb Infect* 8(8): 2284-2290.
- Cegelski L *et al.* (2009). Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat Chem Biol* 5: 913–919.

- Chabrillón M (2003). Estudio de la interacción de patógenos piscícolas y potenciales bacterias probióticas con las superficies mucosas de dorada (*Sparus aurata* L.). PhD thesis, Universidad de Málaga, España.
- Chabrillón M, Rico RM, Arijo S, Díaz-Rosales P, Balebona MC, Moriñigo MA (2005a). Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J Fish Dis* 28: 531-7.
- Chabrillón M, Rico RM, Balebona MC, Moriñigo MA (2005b). Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis* 28: 229-37.
- Chapman MR, Robinson LS, Pinkner JS, Roth R *et al.* (2002). Role of *Escherichia coli* Curli Operons in Directing Amyloid Fiber Formation. *Science* 295(5556): 851-855.
- Characklis WG (1981). Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnol Bioeng* 23: 1923-1960.
- Chen I, Dubnau D (2003). DNA transport during transformation. *Front Biosci* 8: s544–s556.
- Chen SL, Hung CS, Pinkner JS *et al.* (2009). Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *P Natl Acad Sci USA* 106: 22439–22444.
- Ceschia G, Quaglio F, Giorgetti G, Bertoja G, Bovo G (1991). Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian

coasts. En: Abstracts of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists. p.26.

Chan R, Acres SD, Costerton JW (1982). Use of specific antibody to demonstrate glycocalyx, K99 pili, and the spatial relationships of K99- enterotoxigenic *Escherichia coli* in the ileum of colostrum-fed calves. *Infect Immun* 37, 1170–1180.

Chiang P, Burrows LL (2003). Biofilm formation by hyperpiliated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 185: 2374–2378.

Collyn F *et al.* (2002). *Yersinia pseudotuberculosis* harbors a type IV pilus gene cluster that contributes to pathogenicity. *Infect Immun* 70: 6196– 6205.

Comolli JC, Hauser AR, Waite L, Whitchurch CB, Mattick JS, Engel JN (1999). *Pseudomonas aeruginosa* gene products PilT and PilU are required for cytotoxicity in vitro and virulence in a mouse model of acute pneumonia. *Infect Immun* 67: 3625–3630.

Coureur M, *et al.* (2009). Meningococcal type IV pili recruit the polarity complex to cross the brain endothelium. *Science* 325: 83–87.

Craig L *et al.* (2003). Type IV pilin structure and assembly: X-ray and EM analyses of *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus and *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin. *Mol Cell* 11: 1139–1150.

Craig L, Pique ME, Tainer JA (2004). Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 2: 363–378.

Craig L *et al.* (2006). Type IV pilus structure by cryo-electron microscopy and crystallography: implications for pilus assembly and functions. *Mol Cell* 23: 651–662.

- Craig L, Li J (2008). Type IV pili: paradoxes in form and function. *Curr Opin Struct Biol* 18: 267–277.
- Cruz LF, Cobine PA, De La Fuente L (2012). Calcium increases *Xylella fastidiosa* surface attachment, biofilm formation and twitching motility. *Appl Environ Microbiol* 78 (5): 1321-1331.
- Daly JG (1999). Other Bacterial Pathogen. En: "Fish Disease and Disorders", Vol. 3. Woo PTK y Bruno DW eds., CAB International, New York. 577-598.
- Danne C, Dramsi S (2012). Pili of gram-positive bacteria: roles in host colonization. *Res Microbiol*. 163: 645-658.
- Darzens A, Russell MA (1997). Molecular genetic analysis of type-4 pilus biogenesis and twitching motility using *Pseudomonas aeruginosa* as a model system — a review. *Gene* 192: 109–115.
- Davis CP, Avots-Avotins AE, Fader RC (1981). Evidence for a bladder cell glycolipid receptor for *Escherichia coli* and the effect of neuraminic acid and colominic acid on adherence. *Infect Immun* 34, 944–948.
- del Castillo CS, Jang HB, Hikima J-I *et al.* (2013) “Comparative analysis and distribution of pP9014, a novel drug resistance IncP-1 plasmid from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*,”. *Int J Antimicrob Agents* 42(1): 10–18.
- Díaz-Rosales P, Chabrillón M, Moriñigo MA, Balebona MC (2003). Survival against exogenous hydrogen peroxide of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* under different culture conditions. *J Fish Dis* 26: 305–308.

- Díaz-Rosales P, Chabrillón M, Arijo S, Martínez-Manzanares E, Moriñigo MA, Balebona MC (2006). Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis* 29: 355-364.
- Díaz-Rosales P, Chabrillón M, Abdala RT, Figueroa FL, Balebona MC, Moriñigo MA (2008). Effect of dietary administration of *Porphyridium cruentum* on the respiratory burst activity of sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) phagocytes. *J Fish Dis* 31: 489-495.
- Díaz-Rosales P, Arijo S, Chabrillón M, Alarcón FJ, Tapia-Paniagua ST, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA (2009). Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquac* 293: 16-21.
- Díaz-Rosales P (2016). Papel de las actividades superóxido dismutasa y catalasa en la virulencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Estrategias para la estimulación del estallido respiratorio en fagocitos de lenguados cultivados. Ph.D. tesis, Universidad de Málaga.
- Dietrich M, et al. (2011). Activation of NF-kappaB by *Neisseria gonorrhoeae* is associated with microcolony formation and type IV pilus retraction. *Cell. Microbiol* 13: 1168–1182.
- Do Vale A, Ellis AE, Silva MT (2001). Electron microscopic evidence that expression of capsular polysaccharide by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is dependent on iron availability and growth phase. *Dis Aquat Org* 44: 237–240.
- Do Vale A, Marques F, Silva MT (2003). Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Shellfish Immunol* 15: 129- 144.

- Do Vale A, Silva MT, dos Santos NMS, Nascimento DS, Reis-Rodrigues P, Costa-Ramos C, Ellis AE, Azevedo JE (2005). AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. *Mol Microbiol* 58: 1025-1038.
- Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmunds PN (1955). Non-flagellar filamentous appendages (“fimbriae”) and hemagglutinating activity in bacterium coli. *J Pathol Bacteriol* 70: 335–348.
- Egusa S (1980). Disease problems in Japanese yellowtail, *Seriola quinqueradiata* culture: a review. En: Diseases of Commercially Important Marine Fish and Shellfish, Stewart JE ed., Conseil International pour l' Exploration de la Mer, Copenhagen. pp.10-18.
- Egusa S (1992). Bacterial pseudotuberculosis in *Seriola quinqueradiata*. En: "Infectious diseases of fish", Kothekar VS ed., AA Balkema publishers, Brookfield, USA. pp.219-230.
- El Aamri F, Real F, Acosta F, Acosta B, Valdivia J, Ramos-Vivas J, Padilla J (2012). *In Vitro* Study of Adherence, Invasion, and Persistence of *Streptococcus iniae* in Fibroblastic-Like Fish Cell Line SAF-1. *J Aquatic Ani Health* 24(3): 165-170.
- El Aamri F, Real F, Acosta F, Bravo J, Román L, Déniz S, Padilla D (2015). Differential innate immune response of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) against *Streptococcus iniae*. *Fish Shellfish Immunol* 46(2): 436-441.
- Elkamel AA (2002). Pathogenic mechanisms of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* in hybrid striped bass. Ph.D. tesis, Louisiana State University, EEUU. p.181.

Elkamel AA, Thune RL (2003). Invasion and replication of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish cell lines. *J Aquat Anim Health* 15: iss2.

Elkamel AA, Hawke JP, Henk WG, Thune RL (2003). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is capable of replicating in hybrid striped bass macrophages. *J Aquat Anim Health* 15: iss.2.

Essex-Lopresti AE, Boddey JA, Thomas R, Smith MP *et al.* (2005). A Type IV pilin, PilA, contributes to adherence of *Burkholderia pseudomallei* and virulence *in vivo*. *Infect Immun* 73(2): 1260-1264.

FAO. 2016. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma. 224 pp.

FAO. Páginas web: <http://www.fao.org/aquaculture/es/>;

<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-aquaculture-production/query/en>;

<http://www.fao.org/fishery/statistics/global-capture-production/query/es>.

Finlay BB, Falkow S (1988). A comparison of microbial invasion strategies of *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species. En: "Bacteria-Host Cell Interaction", Alan R. Liss ed. M A. Horowitz, New York. pp.227-243.

Fletcher M, Floodgate GD (1973). An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J Gen Microbiol* 74: 325-334.

Fouz B, Toranzo AE, Millan M, Amaro C (2000). Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *J App Microbiol* 88: 531-535.

- Frans I, Busschaert P, Dierckens K, Michiels CW, Willems KA, Lievens B, Bossier P, Rediers H (2013). Are type IV pili involved in *Vibrio anguillarum* virulence towards sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) larvae? *Agric Sci* 4(6a): 30-38.
- Fronzes R *et al.* (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *Embo J.* 27: 2271–2280.
- Galán JE (1994). Interactions of bacteria with non-phagocytic cells. *Curr Opin Immun* 6: 590-595.
- Gally DL, Bogan JA, Eisenstein BI, Blomfield IC (1993). Environmental regulation of the *fim* switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: Effects of temperature and media. *J Bacteriol* 175: 6186-6193.
- Gauthier G, LaFay B, Ruimy R, Breitmayer V, Nicolas JL, 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. *Int J System Bacteriol* 45(1): 139-144.
- Gibiansky ML *et al.* (2010). Bacteria use type IV pili to walk upright and detach from surfaces. *Sci* 330:197.
- Gil H, Benach JL, Thanassi DG (2004). Presence of pili on the surface of *Francisella tularensis*. *Infect Immun* 72: 3042– 3047.
- Giltner CL, Nguyen Y, Burrows LL (2012). Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev* 76: 740–772.
- Girardeau JP, Dubourguier HC, Gouet P (1982a). Inhibition of K99 synthesis by L – alanine in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 128: 463-470.

Girardeau JP, Dubourguier H C, Gouet P (1982b). Effect of the glucose and amino acids on expression of K99 antigen in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 128: 2243-2249.

Giron JA, Ho ASY, Schoolnik GK (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Sci* 254: 710–713.

Glick R *et al.* (2010). Increase in rhamnolipid synthesis under ironlimiting conditions influences surface motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 192: 2973–2980.

Gobierno de Canarias. Páginas web:

http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/pesca/temas/cultivos_marinos/;

<http://www.gobiernodecanarias.org/cmsgobcan/export/sites/agricultura/pesca/galerias/doc/estadisticas/Totales.pdf> ;

<http://www.gobiernodecanarias.org/cmsgobcan/export/sites/agricultura/pesca/galerias/doc/estadisticas/TotalesGranCanaria.pdf>.

Grasso V, Padilla D, Bravo J, Román L, Rosario I, Acosta B, Vega B, El Aamri F, Escuela O, Ramos-Vivas J, Acosta F (2015). Immunization of sea bream (*Sparus aurata*) juveniles against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* by short bath: Effect of some pro-inflammatory molecules and the Mx gene expression. *Fish Shellfish Immunol* 46: 292-296.

Guerina NG, Kessler TW, GuerinaVJ, Neutra MR, Clegg HW, Langermann S, Scannapieco FA, Goldmann DA (1983). The role of pili and capsule in the pathogenesis of neonatal infection with *Escherichia coli* K1. *J Infect Dis* 148, 395–405.

Hadi N, Yang Q, Barnett TC, Tabei SMB, Kirov SM, Shaw JG (2012). Bundle-Forming Pilus Locus of *Aeromonas veronii* vb. *sobria*. *Infect Immun* 80: 1351-1360.

- Hall-Stoodly L, Costerton JW, Stoodley P (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol* 2: 95-108.
- Hamaguchi M, Kusuda R (1989). “Field testing of *Pasteurella piscicida* formalin killed bacterin against pseudotuberculosis in cultured yellowtail, *Seriola quinqueradiata*,” *Bull Mar Sci Fish* 11: 11–16.
- Han X, Kennan RM, Parker D, Davies JK, Rood JI (2007). Type IV fimbrial biogenesis is required for protease secretion and natural transformation in *Dichelobacter nodosus*. *J Bacteriol* 189: 5022–5033.
- Han X *et al.* (2008). Twitching motility is essential for virulence in *Dichelobacter nodosus*. *J Bacteriol* 190: 3323–3335.
- Hansen JK, Forest KT (2006). Type IV pilin structures: insights on shared architecture, fiber assembly, receptor binding and type II secretion. *J Mol Microbiol Biotechnol* 11: 192–207.
- Hastein T, Gudding R, Evensen (2005). “Bacterial vaccines for fish: an update of the current situation worldwide,”. *Dev Biol* 121: 55–74.
- Hawke JP, Plakas SM, Minton RV, McPhearson RM, Snider TG, Guarino AM (1987). Fish pasteurellosis of cultured striped bass (*Morone saxatilis*) in coastal Alabama. *Aquac* 65: 193-204.
- Hawke JP (1996). Importance of a siderophore in the pathogenesis and virulence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*). Ph.D. Dissertation, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana.
- Hawke JP, Thune RL, Cooper RK, Judice E, Kelly-Smith M (2003). Molecular and phenotypic characterization of strains of *Photobacterium damsela* subsp.

- piscicida* from hybrid striped bass cultured in Louisiana, USA. *J Aquat Anim Health* 15: 189-201.
- Hawke JP (2012). <http://afs-fhs.org/perch/resources/14069221931.2.14photobacteriosis2014.pdf>
- Hazes B, Sastry PA, Hayakawa K, Read RJ, Irvin RT (2000). Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilin suggests a main-chain-dominated mode of receptor binding. *J Mol Biol* 299: 1005–1017.
- Heiniger RW, Winther-Larsen HC, Pickles RJ, Koomey M, Wolfgang MC (2010). Infection of human mucosal tissue by *Pseudomonas aeruginosa* requires sequential and mutually dependent virulence factors and a novel pilus-associated adhesin. *Cell Microbiol* 12: 1158–1173.
- Helaine S et al. (2005). PilX, a pilus-associated protein essential for bacterial aggregation, is a key to pilus-facilitated attachment of *Neisseria meningitidis* to human cells. *Mol Microbiol* 55: 65–77.
- Helaine S, Dyer DH, Nassif X, Pelicic V, Forest KT (2007). 3D structure/ function analysis of PilX reveals how minor pilins can modulate the virulence properties of type IV pili. *Proc Natl Aca Sci. USA* 104: 15888–15893.
- Henrichsen J (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36(4): 478–503.
- Henrichsen J (1975). The occurrence of twitching motility among Gram-negative bacteria. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 83: 171-178.
- Henrichsen J (1983). Twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 37: 81-93.
- Ho L-P, Han-You Lin J, Liu H-C, Chen H-E, Chen TY, Yang HL (2011). “Identification of antigens for the development of a subunit vaccine against

- Photobacterium damsela* ssp. *Piscicida*. *Fish Shellfish Immunol* 30(1): 412–419.
- Ho LP, Chang CJ, Liu HC, Yang HL, Lin JHY (2014). “Evaluating the protective efficacy of antigen combinations against *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida* infections in cobia, *Rachycentron canadum* L,”. *J Fish Dis* 37(1): 51–62.
- Houston RD, Haley CS, Hamilton A *et al.* (2010). “The susceptibility of Atlantic salmon fry to fresh water in factious pancreatic necrosis is largely explained by a major QTL,”. *Heredity* 105(3): 318–327.
- Houwink A, van Iterson W (1950). Electron microscopical observations on bacterial cytology. II. A study of flagellation. *Biochim Biophys Acta* 5:10.
- Howie HL, Glogauer M, So M (2005). The *N. gonorrhoeae* type IV pilus stimulates mechanosensitive pathways and cytoprotection through a pilT-dependent mechanism. *PLoS Biol* 3: e100.
- Hueck CJ (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379–433.
- Humphries RM *et al.* (2010). N-acetyllactosamine-induced retraction of bundle-forming pili regulates virulence-associated gene expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 76: 1111–1126.
- Hung CS, Bouckaert J, Hung D *et al.* (2002). Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* 44: 903–915.
- Hyland RM *et al.* (2008). The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. *Cell Microbiol* 10: 177–187.

- Inglis V, Roberts RJ, Bromage NR (1993). *Bacterial Diseases of Fish*, Blackwell Scientific Publications, Oxford. 312 pp.
- Jacques M, Bélanger M, Roy G, Foiry B (1991). Adherence of *Actinobacillus pleuropneumoniae* to porcine tracheal epithelial cells and frozen lung sections. *Vet Microbiol* 27, 133–143.
- Jacques M, Kobisch M, Bélanger M, Dugal F (1993). Virulence of capsulated and noncapsulated isolates of *Pasteurella multocida* and their adherence to porcine respiratory tract cells and mucus. *Infect Immun* 61, 4785–4792.
- Janssen WA, Surgalla MJ (1968). Morphology, physiology, and serology of a *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). *J Bacteriol* 96: 1606-1610.
- Jiang SM, Park SE, Yadav P, Paoletti LC, Wessels MR (2012). Regulation and function of pilus island 1 in group B streptococcus. *J Bacteriol* 194, 2479–2490.
- Johnson LR (2008). Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J Theor Biol* 251: 24-34.
- Jones CH, *et al.* (1993). FimC is a periplasmic PapD-like chaperone that directs assembly of type 1 pili in bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8397–8401.
- Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholoes AV, Abraham SN, Hultgren SJ (1995). FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *P Natl Acad Sci USA* 92: 2081–2085.
- Jones MW, Cox DI (1999). Clinical disease in seafarmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with a member of the family Pasteurellaceae, a case report. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 19(2): 75-78.

- Josenhans C, Suerbaum S (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol* 291: 605-614.
- Jude BA, Taylor RK (2011). The physical basis of type 4 pilus-mediated microcolony formation by *Vibrio cholerae* O1. *J Struct Biol* 175:1–9.
- Juíz-Río S, Osorio CR, LemosML (2005). “Heme uptake genes in human and fish isolates of *Photobacterium damsela*: existence of hutA pseudogenes,”. *Arch Microbiol* 183(5): 347–358.
- Juis-Río SM (2006). Caracterización molecular de los sistemas de transporte de hierro en *Photobacterium damsela*, análisis de la variabilidad genética y presencia de elementos móviles. Ph.D. tesis, Santiago de Compostela.
- Jung TS, Thompson KD, Adams A (2001). Determination of the attachment of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* to fish cells using an enzyme linked immunosorbent assay. *Fish Pathol* 36(4): 201-206.
- Jung TS, Thompson KD, Volpatti D, Galeotti M, Adams A (2007). Variation in the molecular weight of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* antigens when cultured under different conditions *in vitro*. *J Vet Sci* 8: 255 pp.
- Jung TS, Thompson KD, Volpatti D, Galeotti M, Adams A (2008). *In vivo* morphological and antigenic characteristics of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Vet Sci* 9: 169 pp.
- Kaiser D (1979). Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 5952-5956.
- Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB (1997). Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol* 25: 639–647.

- Kang YW, Liu HL, Genin S, Schell M.A, Denny TP (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol* 46: 427-437.
- Kang HJ *et al.* (2007). Stabilizing isopeptide bonds revealed in gram-positive bacterial pilus structure. *Science* 318: 1625–1628.
- Kang HJ *et al.* (2009). The *Corynebacterium diphtheriae* shaft pilin SpaA is built of tandem Ig-like modules with stabilizing isopeptide and disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106: 16967–16971.
- Kawakami H, Shinohara N, Fukuda Y, Yamashita H, Kihara H, Sakai M (1997). The efficacy of lipopolisaccharide mixed chlorophorm-killed cell (LPS-CKC) bacterin of *Pasteurella piscicida* on yelowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Aquac.* 154: 95-105.
- Kawakami H, Suzukawa K, Yamashita H, Kohno Y, Kono T, Sakai M (1999). Mass mortality of wild largescale blackfish *girella punctata* caused by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish Pathol* 4(2): 87-88.
- Kawanishi M, Kojima A, Ishihara K, Esaki H, Kijima M, Takahashi T, Suzuki S, Tamura Y (2005). Drug resistance and pulsed-field gel electrophoresis patterns of *Lactococcus garvieae* isolates from cultured *Seriola* (yellowtail, amberjack and kingfish) in Japan. *Lett Appl Microbiol* 40: 322-328.
- Khouadja S, Lamari F, Bakhrouf A, Gaddour K (2014). Virulence properties, biofilm formation and random amplified polymorphic DNA analysis of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates from cultured sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Microb Pathog* 69-70: 13-19.

- Kim EH, Aoki T (1993). "Drug resistance and broad geographical distribution of identical R plasmids of *Pasteurella piscicida* isolated from cultured yellowtail in Japan,". *Microbiol Immunol* 37(2): 103–109.
- Kim EH, Aoki T (1994). The trasposon-like structure of IS2Tetracycline, and Kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid from the fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol Immunol* 38(1): 31-38.
- Kim EH, Aoki T (1996a). Sulfonamide resistance gene in a transferable R plasmid of *Pasteurella piscicida*. *Microbiol Immunol* 40(5): 397-399.
- Kim EH, Aoki T (1996b). Sequence analysis of the Florfenicol resistance gene encoded in the transferable R plasmid of a fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Microbiol Immunol* 40(9): 665-669.
- Kim MJ, Hirono I, Kurokawa K *et al.* (2008). "Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolates collected in Japan and the United States,". *Antimicrob Agents Chemother* 52(2): 606–611.
- Kimura M, Kitao T (1971). On the etiological agent of "bacterial tuberculosis" of *Seriola*. *Fish Pathol* 6: 8-14.
- Kirchner M, Heuer D, Meyer TF (2005). CD46-independent binding of neisserial type IV pili and the major pilus adhesin, PilC, to human epithelial cells. *Infect Immun* 73: 3072–3082.
- Klausen M, Aaes-Jorgensen A, Molin S, Tolker-Nielsen T (2003a). Involvement of bacterial migration in the development of complex multicellular structures in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Mol Microbiol* 50: 61–68.

- Klausen M *et al.* (2003b). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* 48: 1511– 1524.
- Kline KA *et al.* Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe*. 5: 580– 592.
- Kline KA, Dodson KW, Caparon MG, Hultgren SJ (2010). A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends Microbiol.* 18(5): 224-232.
- Koike Y, Kuwahara A, Fujiwara H (1975). Characterization of *Pasteurella piscicida* isolated from white perch and cultivated yellowtail. *Jpn J Microbiol* 19: 241-247.
- Krukonis ES, DiRita VJ (2003). From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol* 6: 186-190.
- Kubota SS, Kimura M, Egusa S (1970). Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail. I. Symptomatology and histopathology. *Fish Pathol* 4: 111-118.
- Kubota S, Kimura M, Egusa S (1972). Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail-III. Findings on nodules and bacterial colonies in tissues. *Gyob Kenk* 6: 69-72.
- Kuehn MJ, Heuser J, Normark S, Hultgren SJ (1992). P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* 356: 252-255.
- Kusuda R, Yamaoka M (1972). Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. I. On the morphological and biochemical properties. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 38: 1325-1332.

- Kusuda R, Kawai K, Matsui M (1978). Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. II. On the serological properties. *Fish Pathol* 13:79–83.
- Kusuda R, Salati F (1993). “Major bacterial diseases affecting mariculture in Japan,”. *Annu Rev Fish Dis* 3(C): 69–85.
- Kvitt H, Ucko M, Colorni A, Batargias C, Zlotkin A, Knibb W (2002). *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*: detection by direct amplification of 16S rRNA gene sequences and genotypic variation as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Dis Aquat Org* 48: 187–195.
- Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleberg S (2004). Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol* 186: 692–698.
- Lang E *et al.* (2009). Identification of neisserial DNA binding components. *Microbiol* 155: 852–862.
- Langermann S *et al.* (1997). Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* 276: 607–611.
- Langermann S, Mollby R, Burlein JE *et al.* (2000). Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherhichia coli*. *J Infect Dis* 181: 774–778.
- Lauer P *et al.* (2005). Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus. *Science* 309:105.
- Lautrop H (1961). Bacterium anitratum transferred to the genus *Cytophaga*. *Int Bull Bacteriol Nomencl* 11: 107–8.

- Lee KK *et al.* (1994). The binding of *Pseudomonas aeruginosa* pili to glycosphingolipids is a tip-associated event involving the C-terminal region of the structural pilin subunit. *Mol Microbiol* 11: 705–713.
- Leung KY, Lim TM, Lam TJ, Sin YM (1996). Morphological changes in carp epithelial cells infected with *Aeromonas hydrophila*. *J Fish Dis* 19: 167–174.
- Li J *et al.* (2008). *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pilus structure analyzed by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Structure* 16: 137–148.
- Liu P-C, Cheng C-F, Chang C-H, Lin S-L, Wang W-S, Hung S-W, Chen M-H, Lin C-C, Tu C-Y, Lin Y-H (2011). Highly virulent *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from Taiwan paradise fish, *Macropodus opercularis* (L.) in Taiwan. *Afr J Microbiol Res* 5: 2107–2113.
- Lipuma JL, Gilsdorf JR (1987). Role of capsule in adherence of *Haemophilus influenzae* type b to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* 55, 2308–2310.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. *Methods* 25: 402–408.
- Lo AWH, Moonens K, Remaut H (2013). Chemical attenuation of pili function and assembly in gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* 16: 85–92.
- Lobo C, Moreno-Ventas X, Tapia-Paniagua S, Rodríguez C, Moriñigo MA, de La Banda IG (2014). Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish Physiol Biochem* 40(1): 295–309.
- Lobo C (2015). Efectos de la administración del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en alimento vivo en el cultivo larvario y destete del

- lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Ph.D. tesis, Universidad de Cantabria, España.
- Lopez C, Rajan PR, Lin JH-Y, Yang H-L (2002). Disease outbreak in sea farmed cobia, *Rachycentron canadum* associated with *Vibrio* spp., *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *monogenean*, and *myxosporean* parasites. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 23: 206-211.
- López-Castejón G, Sepulcre MP, Roca FJ, Castellana B, Planas JV, Meseguer J, Mulero V (2007). The type II interleukin-1 receptor (IL-1RII) of the bony fish gilthead seabream *Sparus aurata* is strongly induced after infection and tightly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels. *Mol Immunol* 44: 2772-80.
- Lopez-Doríga MV, Barnes AC, Dos Santos NM, Ellis AE (2000). Invasión of fish epithelial cells by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: evidence for receptor specificity, and effect of capsule and serum. *Microbiol* 146(1): 21-30.
- Lovley DR *et al.* (2011). Geobacter: the microbe electric's physiology, ecology, and practical applications. *Adv Microb Physiol* 59: 1–100.
- Magariños B, Romalde J, Byin I, Fouz B, Toranzo AE (1992a). Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Appl Environ Microbiol* 58: 3316-3322.
- Magariños B, Santos Y, Romalde JL, Rivas C, Barja JL, Toranzo AE (1992b). Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *J Gen Microbiol* 138: 2491-2498.
- Magariño B., Romalde JL, Skarmeta AM, Silava A, Toranzo AE (1993). Viable but nonculturable *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment microcosms.

“Diseases of Fish and Shellfish” Sixth International Conference, EAAP, Brest, France.

Magariños B, Toranzo AE, Romalde JL (1994a). Different susceptibility of gilthead seabream and turbot to *Pasteurella piscicida* infection by the water route. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 15(3): 88-90.

Magariños B, Romalde JL, Lemos ML, Barja JL, Toranzo AE (1994b). Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. *Appl Environ Microbiol* 60: 2990-2998.

Magariños B, Noya M, Romalde JL, Pérez G, Toranzo E. (1994c). Influence of fish size and vaccine formulation on the protection of gilthead seabream against *Pasteurella piscicida*. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 14: 120-122.

Magariños B (1995). *Pasteurella piscicida*: aspectos taxonómicos, serológicos y de patogenicidad. Ph.D. Thesis. University of Santiago de Compostela, Spain.

Magariños B, Bonet R, Romalde JL, Martínez MJ, Congregado F, Toranzo AE (1996a). Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. *Microb pathog* 21: 289-297.

Magariños B, Romalde JL, Noya M, Barja JL, Toranzo AE (1996b). Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. *FEMS Microbiol Lett* 138: 29-34.

Magariños B, Toranzo AE, Romalde JL (1996c). Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*. *Annu Rev Fish Dis* 6: 41-64.

Magariños B, Osorio CR, Toranzo AE, Romalde JL (1997). Applicability of ribotyping for intraspecific classification and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *System Appl Microbiol* 20: 634-639.

- Magariños B, Toranzo AE, Barja JL, Romalde JL (2000). Existence of two geographically-linked clonal lineages in the bacterial fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* evidenced by random amplified polymorphic DNA analysis. *Epidemiol Infect* 125(1): 213-219.
- Magariños B, Romalde JL, López Romalde S, Moriñigo MA, Toranzo AE (2003). Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 23(4): 183-190.
- Maier B, Potter L, So M, Seifert HS, Sheetz MP (2002). Single pilus motor forces exceed 100 pN. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 16012– 16017.
- Malvankar NS, Lovley DR (2012). Microbial nanowires: a new paradigm for biological electron transfer and bioelectronics. *ChemSusChem* 5: 1039–1046.
- Mannheim W (1984). Pasteurellaceae Pohl 1981a. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1., NR Krieg and JG Holt ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD. pp. 550-552.
- Manning PA, Meyer TF (1997). Type-4 pili: biogenesis, adhesins, protein export and DNA import. Proceeding of a workshop. *Gene* 192: 1-198.
- Maresso AW, Schneewind O (2008). Sortase as a target of anti-infective therapy. *Pharmacol Rev* 60: 128–141.
- Marraffini LA *et al.* (2006). Sortases and the art of anchoring proteins to the envelopes of gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 70: 192–221.
- Marrs CF, Schoolnik G, Koomey JM, Hardy J, Rothbard J, Falkow S (1985). Cloning and sequencing of a *Moraxella bovis* pilin gene. *J Bacteriol* 163: 132–139.

- Marshall SH, Gomez FA, Ramirez R, Nilo L, Henriquez V (2012). Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth stress conditions: a putative in vivo survival /persistence strategy in marine environments. *Res Microbiol* 163: 557-566.
- Martínez-Manzanares E, Tapia-Paniagua ST, Díaz-Rosales P, Chabrillón M, Moriñigo MA (2007). Susceptibility of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup, and gilthead seabream, *Sparus aurata* L., to several antibacterial agents. *J Fish Dis* 31: 73-76.
- Masada CL, LaPatra SE, Morton AW, Strom MS (2002). An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Dis Aquat Organ* 51: 13-25.
- Massault C, Franch R, Haley C, de Koning DJ, Bovenhuis H, Pellizzari C, Patarnello T, Bargelloni L (2011). Quantitative trait loci for resistance to fish pasteurellosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Anim Gene* 42: 191-203.
- Mattick JS, Whitchurch CB, Alm RA (1996). The molecular genetics of type-4 fimbriae in *Pseudomonas aeruginosa*—a review. *Gene* 179: 147–155
- Mattick JS (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu Rev Microbiol* 56: 289–314.
- Matz C, Webb JS, Schupp PJ, Phang SY, Penesyan A, Egan S, Steinberg P, Kjelleberg S (2008). Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PloS ONE* 3: e2744.
- Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu CY, Schoolnik GK (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310: 1824– 1827.

- Melville S, Craig L (2013). Type IV pili in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 77(3), 323-341.
- Merz AJ, Enns CA, So M (1999). Type IV pili of pathogenic neisseriae elicit cortical plaque formation in epithelial cells. *Mol Microbiol* 32: 1316–1332.
- Merz AJ, So M (2000). Interactions of pathogenic neisseriae with epithelial cell membranes. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16: 423-457.
- Merz AJ, So M, Sheetz MP (2000). Pilus retraction powers bacterial twitching motility. *Nature* 407: 98–102.
- Miller RM *et al.* (2008). *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility mediated chemotaxis towards phospholipids and fatty acids: specificity and metabolic requirements. *J Bacteriol* 190: 4038–4049.
- Misic AM, Satyshur KA, Forest KT (2010). *P. aeruginosa* PilT structures with and without nucleotide reveal a dynamic type IV pilus retraction motor. *J Mol Biol* 400: 1011–1021.
- Moen T, Baranski M, Sonesson AK, Kjøglum S (2009). “Confirmation and fine-mapping of a major QTL for resistance to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait,”. *BMC Gen* 10: 368.
- Montero D, Mathlouthi F, Tort L, Alonso JM, Torrecillas S, Fernández-Vaquero A, Negrin D, Izquierdo MS (2010). Replacement of dietary fish oil by vegetable oils affects humoral immunity and expression of pro-inflammatory cytokines genes in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Fish Shellfish Immunol* 29 (6): 1073-1081.
- Morand PC *et al.* (2004). Type IV pilus retraction in pathogenic *Neisseria* is regulated by the PilC proteins. *EMBO J* 23: 2009–2017.

- Morii H, Hayashi N, Uramoto K (2003). "Cloning and nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol resistance gene on conjugative R plasmids from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*,". *Dis Aquat Organ* 53(2): 107–113.
- Morii H, Bharadwaj MS, Eto N (2004). "Cloning and nucleotide sequence analysis of the ampicillin resistance gene on a conjugative R plasmid from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*,". *J Aquat Anim Health* 16(4): 197–207.
- Morii H, Ishikawa Y (2012). "Cloning and nucleotide sequence analysis of the chloramphenicol and erythromycin resistance genes on a transferable R plasmids from the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*,". *Bull Fac Fish* 93: 41–50.
- Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J, Hultgren SJ (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282: 1494–1497.
- Naka H, Hirono I, Aoki T (2007). Cloning and characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* phospholipase: an enzyme that shows haemolytic activity. *J Fish Dis* 30: 681-690.
- Nelson JS, Kawahara E, Kawai K, Kusuda R (1981). Macrophage infiltration in pseudotuberculosis of yellowtail, *Seriola quinqueradiata*. *Bull Mar Sci Fish Kochi Univ* 1: 17-22.
- Nicolas JL, Gauthier G, Orsini L, Corre S (1994). Use of 16S rRNA sequences for taxonomy and detection of pathogenic bacteria (abstract). 6th International Colloquium of Pathology in Marine Aquaculture (PAMAQ 6), Montpellier, France. BIOCIM, Montpellier, p.54.

- Nishiyama M, Horst R, Eidam O *et al.* (2005). Structural basis of chaperone–subunit complex recognition by the type 1 pilus assembly platform FimD. *EMBO J* 24: 2075-2086.
- Nitza S, Shwartsburd B, Vaiman R, Heller ED (2001). Some characteristics of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated in Israel during outbreaks of pasteurellosis in hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*). *Bull Eur Ass Fish Pathol* 21: 77-80.
- Noya M, Magariños B, Lamas J (1993). Histología asociada a *Pasteurella piscicida* y sus productos extracelulares en dorada, *Sparus aurata*. Actas IV Congreso Nac. Acuicult Illa de Arousa. pp.599-604.
- Noya M, Magariños B, Lamas J (1995a). Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study. *Aquac* 131: 11-21.
- Noya M, Magariños B, Toranzo AE, Lamas J (1995b). Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream (*Sparus aurata*). A light- and electron-microscopic study. *Dis Aquat Organ* 21: 177-186.
- Nuccio SP, Baumler AJ (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71: 551–575.
- Nudleman E, Kaiser D (2004). Pulling together with type IV pili. *J Mol Microbiol Biotechnol* 7: 52-62.
- Nunn D (1999). Bacterial type II protein export and pilus biogenesis: More than just homologies? *Trends Cell Biol* 9: 402-408.
- OIE. 2017. <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/oie-listed-diseases-2017/>

- Olsen DR, Uitto J (1989). Differential expression of Type IV procollagen and laminin genes by fetal vs adult skin fibroblasts in culture: Determination of subunit mRNA steady-state levels. *J Inv Dermatol* 93(1): 127-131.
- Osorio CR, Collins MD, Toranzo AB, Barj J.L, Romalde JL (1999). 16S rRNA gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Appl Environ Microbiol* 65: 2942-2946.
- 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.
- O'Toole GA, Kolter R (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295–304.
- Ottow JCG (1975) Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol.* 29: 79-108.
- Padilla D, Acosta F, Bravo J, Grasso V, Real F, Vivas, J (2008). Invasion and intracellular survival of *Hafnia alvei* in human epithelial cells. *J Appl Microbiol* 105: 1614–1622.
- Padrós F, Furones MD (2002). Patología bacteriana en piscicultura. *Actualidad SEM* 34: 13-21.
- Paranjpye RN, Johnson AB, Baxter AE, Strom MS (2007). Role of type IV pilins in persistence of *Vibrio vulnificus* in *Crassostrea virginica* oysters. *Appl Environ Microbiol* 73: 5041–5044.
- Parge HE *et al.* (1995). Structure of the fibre-forming protein pilin at 2.6 Å resolution. *Nature* 378: 32–38.

- Parkinson JS (1993). Signal transduction schemes of bacteria. *Cell* 73: 857-871.
- Patti JM, Allen BL, McGavin MJ, Hook M (1994). MSCRAMM -Mediated Adherence of Microorganisms to Host Tissues. *Annu Rev Microbiol* 48: 585-617.
- Pellic V (2008). Type IV pili: *e pluribus unum*? *Mol Microbiol* 68: 827– 837.
- Pettigrew D, Anderson KL, Billington J *et al.* (2004). High resolution studies of the Afa/Dr adhesin DraE and its interaction with chloramphenicol. *J Biol Chem* 279: 46851–46857.
- Piątek R, Zalewska B, Bury K, Kur J (2005). The chaperone-usheer pathway of bacterial adhesin biogenesis — from molecular mechanism to strategies of anti-bacterial prevention and modern vaccine design. *Acta Biochim Pol* 52(3): 639-646.
- Planet PJ, Kachlany SC, Fine DH, DeSalle R, Figurski DH (2003). The wide spread colonization island of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* *Nat Genet* 34: 193–198.
- Plumb JA, Hanson LA (2007). Chapter 15, Striped Bass Bacterial Diseases. En: Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes, 3rd edition, Wiley-Blackwell publishing, Ames, Iowa. pp.429-433.
- Plumb JA, Hanson LA (2010). Principles of Health Maintenance. En: Health Maintenance and Principal Microbial Diseases of Cultured Fishes, 3rd edition, Wiley-Blackwell, Oxford, UK.
- Proft T, Baker EN (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria – structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci.* 66: 613–635.

- Pujol C, Eugène E, Marceau M, Nassif X (1999). The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4017-4022.
- Quade MJ, Roth JA (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet Immunol Immunopathol* 58: 239-248.
- Ramboarina S *et al.* (2005). Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 280: 40252–40260.
- Real F, Oros J, Acosta F, Acosta B, Santana P, Déniz S (1997). Pasteurellosis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria Island, Spain. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 17: 153-157.
- Reguera G *et al.* (2005). Extracellular electron transfer via microbial nanowires. *Nature* 435: 1098–1101.
- Reis MIR, Nascimento DS, do Vale A, Silva MT, Dos Santos NMS (2007). Molecular cloning and characterisation of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L) caspase-3 gene. *Mol Immunol* 44: 774-783.
- Remuzgo-Martínez S, Lázaro-Díez M, Padilla D, Vega B, El Aamri F, Icardo JM, Acosta F, Ramos-Vivas J (2014). New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: pili, motility and adherence to solid surfaces. *Vet Microbiol* 174: 247-254.
- Rieu A, Briandet R, Habimana O, Garmyn D, Guzzo J, Piveteau P (2008). *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl Environ Microbiol* 74: 4491-4497.

- Roberts M, Jacobs RF, Haas JE, Smith AL (1984). Adherence of *Haemophilus influenzae* to monkey respiratory tissue in organ cultures. *J Gen Microbiol* 130, 1437–1447.
- Robohm RA (1983). *Pasteurella piscicida*, En: Antigenes of fish pathogens: Development and Production for Vaccines and Serodiagnostics, Anderson DP, Dorson M, Dubourget P ed., Collection Foundation Marcel Merieux, Lyon. pp.161-175.
- Romalde JL, Magariños B, Fouz B, Byín I, Núñez S, Toranzo AE (1995a). Evaluation of BIONOR mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Dis Aquat Org* 21: 25-34.
- Romalde JL, Bretón A, Magariños B, Toranzo AE (1995b). Use of Bionor Aquarapid-Pp kit for the diagnosis of *Pasteurella. piscicida* infections. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 15(2): 64-66.
- Romalde JL, Magariños B, Turnbull KD, Baya AN, Barja JM, Toranzo AE (1995c). Fatty acid profiles of *Pasteurella piscicida*: comparison with other fish pathogenic gram-negative bacteria. *Arch Microbiol* 163: 211-216.
- Romalde JL, Magariños B (1997). Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. *Dev Biol Stand* 90: 167-177.
- Romalde JL, Magariños B, Lores F, Osorio CR, Toranzo AE (1999). “Assessment of a magnetic bead-EIA based kit for rapid diagnosis of fish pasteurellosis,”. *J Microbiol Meth* 38(1-2): 147–154.
- Romalde JL (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol* 5: 3-9.
- Román L, Real F, Sorroza L, Padilla D, Acosta B, Grasso V, Bravo J, Acosta F (2012). The in Vitro Effect of Probiotic *Vagococcus Fluvialis* on the Innate

- Immune Parameters of *Sparus Aurata* and *Dicentrarchus Labrax*. *Fish Shellfish Immunol* 33(5): 1071-1075.
- Román L, Real F, Padilla D, El Aamri F, Déniz S, Grasso V, Acosta F (2013). Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with the probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish Shellfish Immunol* 35(4): 1329-1332.
- Rosini R, Rinaudo CD, Soriani M, Lauer P et al. (2006). Identification of novel genomic islands coding for antigenic pilus-like structures in *Streptococcus agalactiae*. *Mol Microbiol* 61: 126-142.
- Runnels PL, Moon HW (1984). Capsule reduces adherence of enterotoxigenic *Escherichia coli* to isolated intestinal epithelial cells of pigs. *Infect Immun* 45, 737–740.
- Russell BH, Vasan R, Keen DR, Xu Y (2007). *Bacillus anthracis* internalization by human fibroblasts and epithelial cells. *Cell Microbiol* 9: 1262–1274.
- Sakai M, Atsuta S, Kobayashi M, Kawakami H, Yoshida T (1993): The cell surface hydrophobicity and hemagglutinating properties of the bacterial fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 13, 168-170.
- Salit IE, Gotschlich EC (1977). Hemagglutination by purified Type I *Escherichia coli* pili. *J Exp Med* 146: 1169-1181.
- Sandkvist M (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* 69: 3523–3535.
- Satyshur KA, Worzalla GA, Meyer LS, Heiniger EK, Aukema KG, Misic AM, Forest KT (2007). Crystal structures of the pilus retraction motor PilT suggest large domain movements and subunit cooperation drive motility. *Structure* 15: 363–376.

- Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LAH, Davies DG, Gilbert P (2004). Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol* 186(21): 7312-7326.
- Saville RM, Dieckmann N, Spormann AM (2010). Spatiotemporal activity of the *mshA* gene system in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 308: 76–83.
- Scheuerpflug I, Rudel T, Ryll R, Pandit J, Meyer TF (1999). Roles of PilC and PilE proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* 67: 834–843.
- Schroeder TH, Zaidi T, Pier GB (2001). Lack of adherence of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to asialo-GM(1) on epithelial cells. *Infect Immun* 69: 719–729.
- Schwan WR, Lee JL, Lenard FA, Matthews BT, Beck MT (2002). Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 20: 559-566.
- Scott JR, Zahner D (2006). Pili with strong attachments: Gram-positive bacteria do it differently. *Mol Microbiol*. 62: 320–330.
- Secombes CJ (1990). Isolation of salmonid macrophages and analysis of their killing activity. En: *Techniques in fish immunology*, Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS, van Muiswinkel WB ed., FairHaven, NJ: SOS Publications. pp.137-154.
- Semmler AB, Whitchurch CB, Mattick JS (1999). A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol* 145: 2863–73.

- Sepulcre MP, Sarropoulou E, Kotoulas G, Meseguer J, Mulero V (2007). *Vibrio anguillarum* evades the immune response of the bony fish sea bass (*Dichentrarchus labrax* L.) through the inhibition of leukocyte respiratory burst and down-regulation of apoptotic caspases. *Mol Immunol* 44: 3751-3757.
- Shi W, Zusman DR (1993). The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 3378-3382.
- Sierra EM, Espinosa de Los Monteros A, Real F, Herráez P, Rodríguez P, Fernández A (2005). Histología y patología de los peces Parte II: Infecciones víricas, bacterianas y micóticas. *Rev Can Cienc Vet* n.2: 46-57.
- Simidu U, Egusa S (1972). A re-examination of the fish pathogenic bacterium that had been reported as a *Pasteurella* species. *Bull Jap Soc Sci Fish* 38: 803-812.
- Skarmeta AM, Byin I, Santos Y, Toranzo E. (1995). In vitro killing of *Pasteurella piscicida* by fish macrophages. *Dis Aquat Organ* 23: 51-57.
- Skerker JM, Berg HC (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 6901–6904.
- Skerman VBD, McGowan V, Sneath PHA (1989). Approved lists of bacterial names, amended edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C. p.72.
- Smets BF, Grasso D, Engwall MA, Machinist BJ (1999). Surface physicochemical properties of *Pseudomonas fluorescens* and impact on adhesion and transport through porous media. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 14: 121-139.

- Smith SK, Sutton DC, Fuerst JA, Reichelt JL (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. *Int J Syst Bacteriol* 41: 529–534.
- Snieszko SF, Bullock GL, Hollis E, Boone JG (1964). *Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J Bacteriol* 88: 1814-1815.
- Snieszko SF (1973). Recent advances in scientific knowledge and developments pertaining to diseases of fishes. En: *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*, C.A. Brandly y C.E. Cornelius, eds., Academic Press, New York, 291-314.
- Stabb EV, Ruby EG (2003). Contribution of *pilA* to competitive colonization of the squid *Euprymna scolopes* by *Vibrio fischeri*. *Appl Environ Microbiol* 69: 820–826.
- St Geme JW III, Falkow S (1991). Loss of capsule expression by *Haemophilus influenzae* type b results in enhanced adherence to and invasion of human cells. *Infect Immun* 59, 1325–1333.
- St Geme JW III, Cutter D (1996). Influence of pili, fibrils, and capsule on in vitro adherence by *Haemophilus influenzae* type b. *Mol Microbiol* 21, 21–31.
- Strom MS, Lory S (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* 47: 565-596.
- Strom MS, Nunn DN, Lory S (1993). A single bifunctional enzyme, PilD, catalyzes cleavage and N-methylation of proteins belonging to the type IV pilin family. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 2404–2408.

- Speilberg LA, Myhr E, Valheim M (1991). A *Pasteurella piscicida*-like organisms as the causative agent of periorbital cellulitis and dermal ulceration in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in Norway. Abstracts of the Fifth International Conference of the European Association of Fish Pathologists. p.99.
- Sun H, Zusman DR, Shi WY (2000). Type IV pilus of *Myxococcus* is a motility apparatus controlled by the frz chemosensory system. *Curr Biol* 10: 1143-1146.
- Tafalla C, Aranguren R, Secombes CJ, Figueras A, Novoa B (2004). Cloning and analysis of expression of a gilthead sea bream (*Sparus aurata*) Mx cDNA. *Fish Shellfish Immunol* 16: 11-24.
- Tan B, Low KW, Won WSF, Leung KY (1998). Internalization of *Aeromonas hydrophila* by fish epithelial cells can be inhibited with a tyrosine kinase inhibitor. *Microbiol* 144: 299-307.
- Tapia-Paniagua ST, Vidal S, Lobo C, Prieto-Álamo MJ, Jurado J, Cordero H, Cerezuela R, García de la Banda I, Esteban MA, Balebona MC, Moriñigo MA (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. *Fish Shellfish Immunol* 41(2): 209-221.
- Tapia Paniagua ST (2015). Uso del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en el cultivo de *Solea senegalensis*: implicaciones sobre la microbiota intestinal. Ph.D. tesis, Universidad de Málaga, España.
- Taylor RK, Miller VL, Furlong DB, Melakanos JJ (1987.) Use of phoA gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2833–2837.
- Telford JL *et al.* (2006). Pili in Gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* 4: 509–519.

- Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M (2006). Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants* 17: 68-81.
- Thanassi DG, Bliska JB, Christie PJ (2012). Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 36: 1046–1082.
- Thankavel K, Shah AH, Cohen MS, Ikeda T, Lorenz RG, Curtiss III R, Abraham SN (1999). Molecular basis for the enterocyte tropism exhibited by *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae. *J Biol Chem* 274: 5797-5809.
- Thune RL, Stanley LA, Cooper RK (1993). Pathogenesis of gram negative bacterial infections in warmwater fish. *Annu Rev Fish Dis* 3: 37-68.
- Thyssen A, Goris J, Pedersen K, Swings J, Larsen JL, Ollevier F (1999). Phenotypic and genotypic characterization of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Proceedings of the 9th International Conference on Diseases of Fish and Shellfish, EAAP, Rhodes, O-153.
- Thyssen A, Van Eygen S, Hauben L, Goris J, Swings J, Ollevier F (2000). Application of AFLP for taxonomic and epidemiological studies of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1013-1019.
- Ton-That H, Schneewind O (2003). Assembly of pili on the surface of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* 50: 1429–1438.
- Ton-That H *et al.* (2004). Sortases and pilin elements involved in pilus assembly of *Corynebacterium diphtheriae*. *Mol Microbiol* 53: 251–261.
- Toranzo AE, Barja JL, Hetrick FM (1982). Antiviral activity of antibiotic-producing marine bacteria. *Can J Microbiol* 28(2): 231-238.

- Toranzo, A.E, Barreiro, S, Casal, JF, Figueras, A, Magariños, B, Barja, J (1991). Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): First report in Spain. *Aquac* 99: 1-15.
- Toranzo AE, Magariños B, Romalde JR (2005). A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquac* 246: 37-61.
- Truper HG, De'Clari L (1997). Taxonomic note: necessary correction of epithets formed as substantives (nouns) “in apposition”. *Int J Syst Bacteriol* 47: 908–909.
- Tsui IS, Yip CM, Hackett J, Morris C (2003). The type IVB pili of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* bind to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Infect Immun* 71: 6049–6050.
- Tukel C, Raffatellu M, Humphries AD, Wilson RP *et al.* (2005). CsgA is a pathogen-associated molecular pattern of *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* that is recognized by Toll-like receptor 2. *Mol. Microbiol* 58: 289–304.
- Tung MC, Tsai SS, Ho LF, Huang ST, Chen SC (1985). An acute septicemic infection of *Pasteurella* organisms in pond-cultured Formosa Snakehead fish [*Chana maculata* Lacepede] in Taiwan. *Fish Pathol* 20: 143-148.
- Ueki N, Kayano Y, Muroga K (1990). *Pasteurella piscicida* in juvenile red grouper. *Fish Pathol* 25: 43-44.
- Van der Woude MW, Arts PA, Bakker D, Van Verseveld HW, De Graaf FK (1990a). Growth rate dependent synthesis of K99 fimbrial subunits is regulated at the level of transcription. *J. Gen. Microbiol* 136: 897-903.

- Van der Woude MW, Braster M, Van Verseveld HW, De Graaf FK (1990b). Control of temperature dependent synthesis of K99 fimbriae. *FEMS Microbiol. Lett.* 56: 183-188.
- Vega Alonso J (2015). Interacción de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* con células SAF-1. Ph.D. tesis, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, España. 184pp.
- Vejborg RM, Klemm P (2009). Cellular chain formation in *Escherichia coli* biofilms. *Microbiol* 155: 1407-1417.
- Vengadesan K, Narayana SVL (2011). Structural biology of Gram-positive bacterial adhesins. *Prot Sci* 20: 759-772.
- Verdonck F, Cox E, Goddeeris BM (2004). F4 fimbriae expressed by porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*, an example of an eccentric fimbrial system? *J Mol Microbiol Biotechnol* 7: 155-169.
- Villar MT, Hirschberg RL, Schaefer MR (2001). Role of the *Eikenella corrodens* pilA locus in pilus function and phase variation. *J Bacteriol* 183: 55–62.
- Virji M, Kayhty H, Ferguson DJP, Alexandrescu C, Moxon ER (1991). Interactions of *Haemophilus influenzae* with cultured human endothelial cells. *Microb Pathog* 10, 231–245.
- Vivas J, Carracedo B, Riano J, Razquin BE, Lopez-Fierro P, Acosta F, Naharro G, Villena AJ (2004). Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. *Appl Environ Microbiol* 70: 2702-2708.
- Vivas J, Padilla D, Real F, Bravo J, Grasso V, Acosta F (2008). Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Vet Microbiol* 129: 150-155.

- Walker SL, Sojka M, Dibb-Fuller M, Woodward MJ (1999). Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype *Enteritidis*. *J Med Microbiol* 48: 253-261.
- Wall D, Kaiser D (1999). Type IV pili and cell motility. *Mol Microbiol* 32: 1-10.
- Wang XH, Oon H., Ho GWP, Wong WSF, Lim TM, Leung KY (1998). Internalization and cytotoxicity are important virulence mechanisms in vibrio-fish epithelial cell interactions. *Microbiol* 144: 2987-3002.
- Wedemeyer G.A, Meyer FP, Smith L (1976). Environmental stress and fish diseases. En: Diseases of Fish, Fifth book, S.F. Snieszko y H.R. Axelrod, eds., Jersey City, New Jersey, T.F.H. Publications Inc. Ltd., 192 pp.
- Weyand NJ *et al.* (2006). Monoclonal antibody detection of CD46 clustering beneath *Neisseria gonorrhoeae* microcolonies. *Infect Immun* 74: 2428–2435.
- Whitehead KA, Colligon J, Verran J (2005). Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids Surf B Biointerfaces* 41: 129-138.
- Winther-Larsen HC *et al.* (2001). *Neisseria gonorrhoeae* PilV, a type IV pilus-associated protein essential to human epithelial cell adherence. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15276–15281.
- Wolfgang M, Lauer P, Park HS, Brossay L, Hebert J, Koomey M (1998a). PilT mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in piliated *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 29: 321–30.
- Wolfgang M, Park HS, Hayes SF, van Putten JP, Koomey M (1998b). Suppression of an absolute defect in type IV pilus biogenesis by loss-of-function

- mutations in pilT, a twitching motility gene in *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14973–78.
- Wolke RE (1975). Pathology of bacterial and fungal diseases affecting fish. En: The Pathology of Fishes, Ribelin and Migaki ed., The University of Wisconsin Press, Madison WI. pp.33-116.
- Xing CF, Hu H-H, Huang HB *et al.* (2013). “Diet supplementation of *Pediococcus pentosaceus* in cobia (*Rachycentron canadum*) enhances growth rate, respiratory burst and resistance against photobacteriosis”. *Fish Shellfish Immunol* 35(4): 1122–1128.
- Yanagawa R *et al.* (1968). Electron microscopy of fine structure of *Corynebacterium renale* with special reference to pili. *Jpn J Vet Res.* 16: 31–37.
- Yasunaga N, Hatai K, Tsukahara J (1983). *Pasteurella piscicida* from an epizootic of cultured sea bream. *Fish Pathol* 18: 107-110.
- Yasunaga N, Yasumoto S, Hirakawa E, Tsukahara J (1984). On a masive mortality of oval file fish [*Navodan modestus*] caused by *Pasteurella piscicida*. *Fish Pathol* 19: 51-55.
- Yoshida T, Inglis V, Misawa N, Kruger R, Sakai M (1997). *In vitro* adhesion of *Pasteurella piscicida* to cultured fish cells. *J Fish Dis* 20: 77-80.
- Yoshida T, Furuya N, Ishikura M, Isobe T, Haino-Fukushima K, Ogawa T, Komano T (1998). Purification and characterization of thin pili of IncI1 plasmids ColIb-P9 and R64: formation of PilV-specific cell aggregates by type IV pili. *J Bacteriol* 180: 2842–2848.

- Zahavi EE, Lieberman JA, Donnenberg MS *et al.* (2011). Bundle forming pilus retraction enhances enteropathogenic *Escherichia coli* infectivity. *Mol Biol Cell* 22: 2436–2447.
- Zavialov AV, Berglund J, Pudney AF, Fooks LJ, Ibrahim TM, MacIntyre S, Knight SD (2003). Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell* 113: 587–596.
- Zhang XL, Tsui ISM, Yip CMC, Fung AWY, Wong DKH, Dai XY, Yang YH, Hackett J, Morris C (2000). *Salmonella enterica* serovar *Typhi* uses type IVB pili to enter human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 68: 3067–3073.
- Zierler MK, Galán JE (1995). Paradigms in bacterial entry into host cells. En: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 2nd edition, JA Roth, CA Bolin, KA Brogden, FC Minion y MJ Wannemuehler ed., American Society for Microbiology, Washington, DC. pp. 21–31.
- Zorrilla I, Balebona MC, Moriñigo MA, Sarasquete C, Borrego JJ (1999) Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J Fish Dis* 22: 167–172.

ANEXO: ARTÍCULOS





ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic

Short communication

New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: Pili, motility and adherence to solid surfaces



Sara Remuzgo-Martínez^a, María Lázaro-Díez^a, Daniel Padilla^b, Belinda Vega^b,
Fátima El Aamri^b, José Manuel Icardo^c, Félix Acosta^b, José Ramos-Vivas^{a,*}

^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla IDIVAL, Santander, Cantabria, Spain

^bInstituto Universitario de Sanidad Animal, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Arucas, Spain

^cDepartamento de Anatomía y Biología Celular, Universidad de Cantabria, Santander, Cantabria, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2014

Received in revised form 1 August 2014

Accepted 3 August 2014

Keywords:

Photobacterium damsela subsp. *piscicida*

Pili

Motility

Biofilm

ABSTRACT

We describe for the first time the presence of pilus-like structures on the surface of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*). The hint to this discovery was the ability of one strain to hemagglutinate human erythrocytes. Further analysis of several *Phdp* strains ultrastructure by electron microscopy revealed the presence of long, thin fibers, similar to pili of other Gram-negative bacteria. These appendages were also observed and photographed by scanning, transmission electron microscopy and immunofluorescence. Although this fish pathogen has been described as non-motile, all strains tested exhibit twitching motility, a flagella-independent type IV-dependent form of bacterial translocation over surfaces. As far as we are aware, the movement of *Phdp* bacteria on semi-solid or solid surfaces has not been described previously. Moreover, we speculate that *Phdp* twitching motility may be involved in biofilm formation. Microscopic examination of *Phdp* biofilms by microscopy revealed that *Phdp* biofilm architecture display extensive cellular chaining and also bacterial mortality during biofilm formation *in vitro*. Based on our results, standardized analyses of *Phdp* surface appendages, biofilms, motility and their impact on *Phdp* survival, ecology and pathobiology are now feasible.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (*Phdp*, previously *Pasteurella piscicida*) is one of the most important halophilic bacterial pathogens, and the causative agent of fish pasteurellosis, a serious disease affecting several economically important marine fish species. This disease was first observed in natural populations of white perch (*Morone americanus*) and striped bass (*Morone saxatilis*) in

1963 in Chesapeake Bay (Snieszko et al., 1964). Until recently, Europe was considered to be free of fish pasteurellosis, but from 1990 to the present, several outbreaks occurred in cultured fish populations in different European countries. Based on an exhaustive characterization, a complete description of the pathogen was obtained (Gauthier et al., 1995; Thyssen et al., 1998). *Phdp* is a Gram-negative, nonmotile, pleomorphic bacterium. The virulence of *Phdp* is reported to correlate with the presence of a polysaccharide capsular layer (Acosta et al., 2006) and a plasmid-encoded virulence factors (do Vale et al., 2005). The presence of bacterial pili (or fimbriae) and their relation to agglutination of red blood cells were demonstrated early by Duguid and coworkers in 1955

* Corresponding author. Tel.: +34 942315515x73172; fax: +34 942315517.

E-mail address: jvivas@idival.org (J. Ramos-Vivas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.005>

0378-1135/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

(Duguid et al., 1955), but in *Phdp*, not any strain described in the literature was able to hemagglutinate sheep, rat, rabbit, yellowtail, horse, trout or chicken erythrocytes (Yoshida et al., 1997).

Moreover, epifluorescence, light, transmission, scanning and confocal microscopy studies performed until now did not reveal pili on different *Phdp* strains. In contrast with several studies, the results reported in this paper revealed the presence of long appendages (similar in appearance to type 4 bacterial pili) in several *Phdp* strains, and that new features of this pathogen (motility and attachment to solid surfaces) could be mediated by these structures.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria

The *Phdp* strains used in this study are listed in Table 1. All strains were subjected to taxonomic analysis by standard morphological, physiological and biochemical plate and tube tests, and molecular techniques (PCR) (Osorio et al., 2000). Bacteria were grown routinely from laboratory stocks on brain heart infusion broth or agar (BHIB/BHIA) supplemented with 1.5% NaCl at 25 °C.

2.2. Hemagglutination (HA)

We studied the hemagglutinating activity of the *Phdp* strains with human group A erythrocytes, and the mannose sensitivity of these agglutinations. Human erythrocytes were obtained from healthy volunteers after an informed consent. Fish erythrocytes were obtained from Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.), the main target of *P. damsela* subsp. *piscicida* in the Canary Islands, and Senegalese sole (*Solea senegalensis*) cultured in Santander, Spain. HA tests were performed on microscope slides using 10% suspensions of erythrocytes. Bacteria were cultured at 25 °C for 48 h in BHIA. Several colonies were resuspended in PBS and 25 µl of bacteria were mixed with 25 µl of erythrocytes with or without 1% D-mannose (Sigma). Agglutination of erythrocytes was examined visually after a short period (up to 1 min) of rocking at room temperature (RT). Hemagglutination was considered resistant to mannose (MRHA) when it occurred despite the presence of mannose.

2.3. Transmission electron microscopy (TEM)

Phdp strains were examined by TEM to confirm the presence of pili. Bacteria were applied to formvar-coated grids and air dried. The cells were then negatively stained

with 1% phosphotungstic acid in distilled water for 20 s, and examined with a JEOL (JEM-1011) transmission electron microscope operating at 80 kV, and equipped with an ORIUS SC 1000 CCD camera (GATAN).

2.4. Immunofluorescence

For bacterial microscopic examinations, bacteria were stained using a polyclonal antibody against *Phdp* strain 94/99 as we described previously (Acosta et al., 2009). Bacteria were fixed with 3.2% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 for 15 min at RT. Secondary antibodies Alexa Fluor 594 and 488 goat anti-rabbit were purchased from Invitrogen. Primary and secondary antibodies were diluted 1:1000 in bovine serum albumin (BSA, Sigma) (1% in PBS). Coverslips were washed extensively with PBS and incubated for 20 min with the polyclonal rabbit anti-*Phdp*. After washing, the coverslips were mounted on glass slides with Fluoroshield mounting medium containing DAPI (Sigma Aldrich). Preparations were examined by epifluorescence microscopy using a Zeiss Axiovert 200 microscope. Digital images were acquired using a Zeiss AxioCam HRC digital camera, and merged using Photoshop CS3 (Adobe) software.

2.5. Motility assays

Phdp strains were grown in BHIB for 48 h at 37 °C with shaking, and a 1:1000 dilution was prepared in PBS to an OD₆₂₀ of 0.05. Motility assays were performed as previously described with some modifications (Vivas et al., 2008). Briefly, BHI motility plates (Petri plates and 6-well plates, Corning) were prepared with 1.5% NaCl and 0.2–0.4% agarose (Pronadisa), dried overnight at RT, inoculated with bacteria using sterile toothpicks and incubated for 48 h at 25 °C. The sizes of the swarming and twitching zones were observed macroscopically. For twitching motility, cells were stab inoculated in the motility plates and after incubation, the polystyrene surface was examined by removing the agar, washing unattached cells with tap water, and staining the attached cells with crystal violet (0.7%, w/v, solution).

2.6. Biofilm formation

Quantitative estimation of biofilm formation was performed as previously described with some modifications (Vivas et al., 2008). *Phdp* strains were grown on BHIA for 48 h at 25 °C, and a suspension from two to three colonies was prepared in PBS to an OD₆₂₀ of 0.05. Twenty microlitres of the *Phdp* suspension was placed in each well

Table 1
Bacterial strains used in this study.

Strain	Isolation source	Country of isolation	Source/reference
94/99	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	Spain	Real et al. (1997)
C2	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	Spain	Real et al. (1997)
PP3	Japanese yellowtail (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Japan	Provided by Dr. Andrew Barnes
ATCC 17911	White perch (<i>Roccus americanus</i>)	USA	Snieszko et al. (1964)
DI-21	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	Spain	Toranzo et al. (1991)

of a U-bottomed 96-well plate containing 130 μ l culture medium and incubated for 48 h at 37 °C. After the medium had been discarded by inverting the plate and tapping on absorbent paper, wells were rinsed three times with distilled water (each with 200 μ l per well) and the remaining adherent bacteria were stained for 12 min with 170 μ l crystal violet (CV; 0.7%, w/v, solution) per well. Excess stain was removed by washing three times with distilled water (each with 200 μ l per well). CV was extracted with 150 μ l of 33% acetic acid and the plates were incubated at RT in an orbital shaker for 1 min at 400

r.p.m. to release the dye into solution. A sample of 100 μ l was then transferred to another 96-well flat-bottomed plate and the amount of dye (proportional to the density of adherent cells) was quantified at OD₆₂₀ using a microplate reader. For each experiment, correction for background staining was made by subtracting the value for CV bound to uninoculated control wells. The biofilm assay was performed three times, with eight wells per strain in each assay. Biofilm formation was also qualitatively analyzed up to 6 days by CV staining in 24-well plates, scaling volumes up accordingly. For assay of the effect of glucose, biofilms

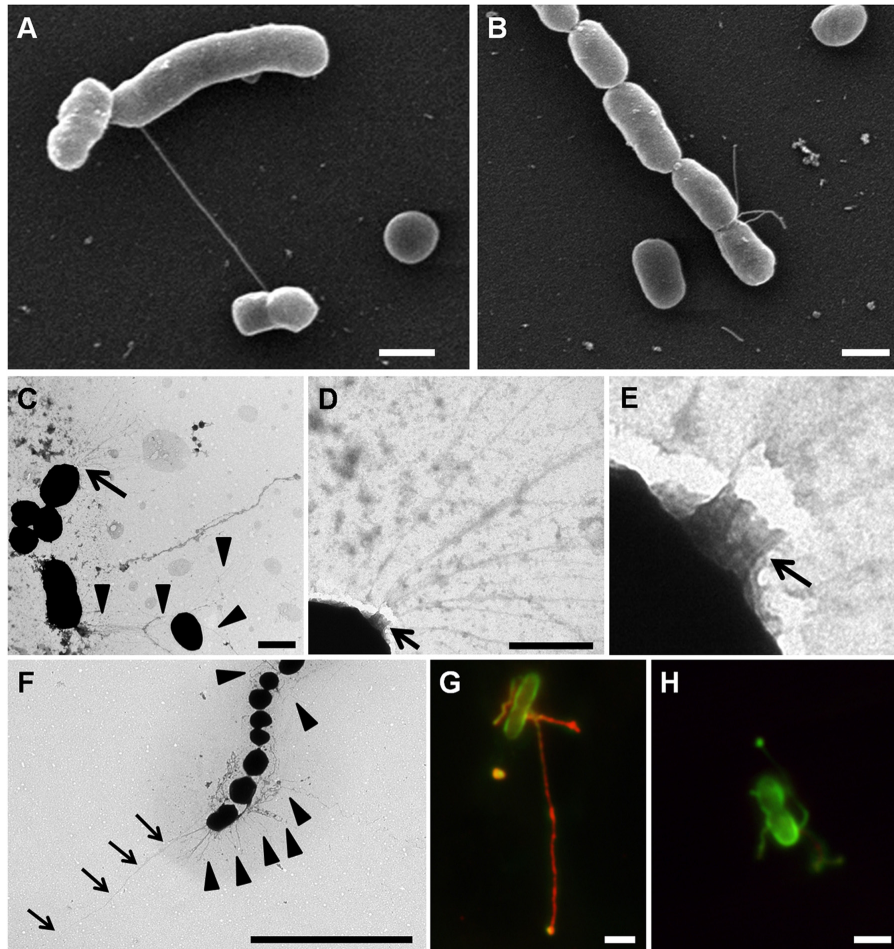


Fig. 1. Presence of pili in *Pdhp* strains. (A and B) SEM microphotographs obtained from cells attached to a glass slide of strains 94/99 and DI-21 respectively. (C–F) TEM microphotographs obtained from cells attached at the interface of the agar medium with the Petri dish of strains ATCC and DI-21 respectively; (D and E) magnifications from the area indicated by the arrow in C. Arrowheads in C indicate pili. Arrows in F indicate a long polar pilus and arrowheads indicate short pili. (G and H) Immunofluorescence images obtained from cultures grown in BHI broth of strains 94/99 and C2 respectively. Original magnifications: A–C: $\times 5000$; D: $\times 12,000$; E: $\times 80,000$; G and H: $\times 400$. Scale bars: A and B: 1 μ m; C: 2 μ m; D: 250 nm; F: 10 μ m.

were grown for 6 days on BHIB supplemented with 1.5% glucose.

2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

Cells were also photographed using SEM after growth in 24-well plates using coverslips as a substratum. Bacteria were fixed in ice-cold 3% glutaraldehyde for 20 min at 4 °C. Samples were then dehydrated in a graded ethanol series, dried by the critical point method, coated with gold in a Fine coat ion sputter JFC-1100 (JEOL) and observed with an Inspect S microscope (FEI Company) working at 15 or 20 kV.

2.8. Confocal laser scanning microscopy (CLSM)

Bacteria were grown up to 6 days in 24-well plates with submerged coverslips, or into 4-well μ -chamber uncoated slides (Ibidi, Martinsried) without shaking at 25 °C. Unfixed planktonic cells were removed by rinsing with saline (0.85% NaCl) for LIVE/DEAD staining, or with distilled water for matrix staining using the FilmTracer (Invitrogen). Samples for CLSM were prepared as for standard immunofluorescence studies without fixation. Bacterial viability within biofilms was determined by using the BacLight LIVE/DEAD bacterial viability kit (Molecular Probes Inc.). For matrix visualization, unfixed biofilms in 4-well chamber slides were stained with 200 μ l of

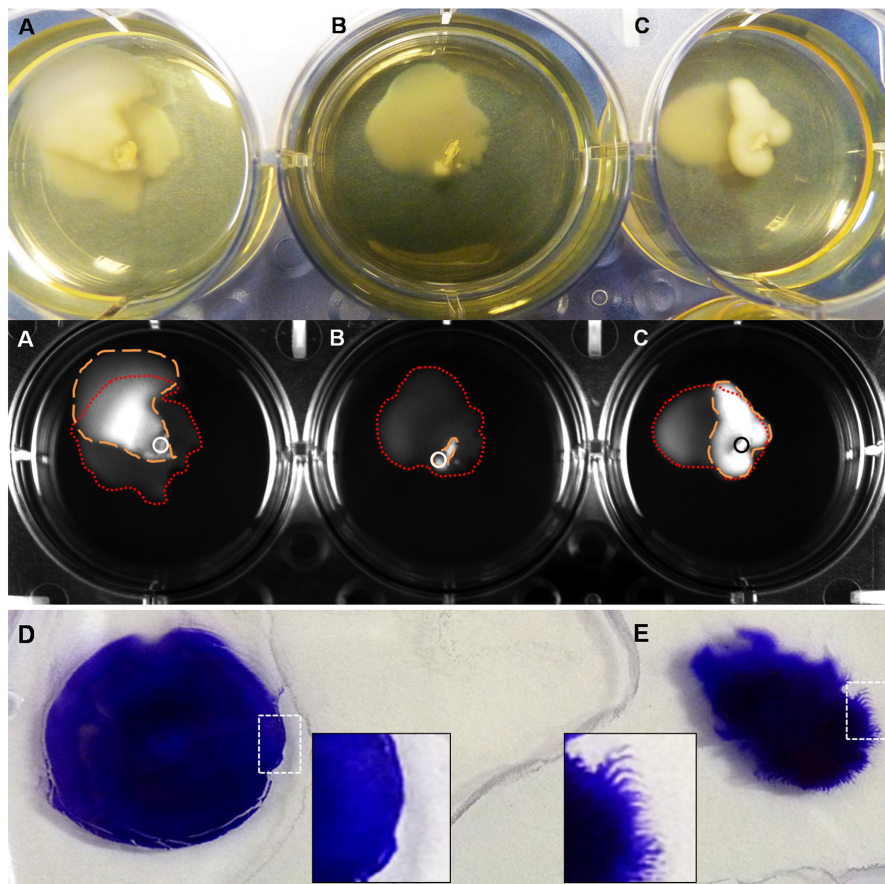


Fig. 2. Motility assays of *Phdp* strains. (A–C) Bacteria were inoculated with a toothpick into the bottom of BHIA medium in Petri plates (0.3% agarose). Plates were incubated at 25 °C for 48 h (strains: A, 94/99; B, C2; and C, PP3). Grayscale images in the central panel show the colony spreading over the surface (orange, discontinuous line), and the twitching motility (red, dotted line). (D and E) Unattached cells were removed by rinsing the plates thoroughly with water, and attached cells were subsequently stained by incubation with 0.7% CV for 12 min. *Insets:* Details of the smooth border (D, strain C2) and rhizoid border (E, strain 94/99). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix (Invitrogen) per well, incubated in the dark for 30 min at RT, and rinsed with distilled water. As a positive control for biofilm matrix formation, we used a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate, which produces a dense and compact biofilm with abundant extracellular matrix. For bacterial DNA staining, unfixed biofilms were stained with one drop of NucBlue (Molecular Probes) applied for 30 min to each well. A series of optical sections were obtained with a Nikon A1R confocal scanning laser microscope. For LIVE/DEAD a 488/561 nm excitation, 500–550/570–620 nm emission filters were used respectively. For FilmTracer a 405 nm excitation, 662–737 nm emission filter was used. For NucBlue, a 375–390-nm excitation, 420–490-nm emission filter was used.

Images were captured at random with a $\times 20$ Plan Apo 0.75 NA objective. Reconstructions of confocal sections were assembled using the NIS-Elements 3.2 software. Z-stacks of confocal images were rendered into 3D mode using ImageJ software.

3. Results

3.1. Hemagglutination, SEM, TEM and immunofluorescence

Hemagglutination of human and sole red blood cells was observed only in one strain (DI-21) and the HA was mannose-resistant. The hemagglutination of human erythrocytes was strong compared with sole erythrocytes (not shown). No hemagglutination of sea bass erythrocytes was observed. Therefore, after this result, piliation of all strains was analyzed by SEM and TEM. Examples of the bacterial appendages in *Phdp* photographed by the different techniques used are shown in Fig. 1. All the *Phdp* strains appeared piliated. For immunofluorescence experiments, we took advantage of our polyclonal antibody against *Phdp*. This antiserum reacted very efficiently and equally well with all *Phdp* strains used and we confirmed the presence of pilus appendages in all strains. These pili are filamentous appendages with ~ 5 –8 nm diameter, and lengths varying from 1 μm up to 13 μm , and were similar in appearance to type 4 pili, which are expressed by a number of Gram-negative pathogens. These pilus-like structures often had a polar location and the number of pili per cell varied considerably; some cells had as few as 1–2, others had 30–40. We found that organisms grown at the interface of the agar medium with the Petri dish clearly showed more pili than those grown on liquid media. Furthermore, although some preparations were fixed before examination, some pili apparently became detached since filaments were seen scattered over the background. This is particularly evident after dehydration for SEM analysis.

3.2. Motility

The twitching motility assay was used to study a surface-based motility that requires functional pili. After decreasing the agarose concentration of the twitching motility plates to 0.3%, we noticed that all strains were able to propagate at the interface between the agar and the

plate in a manner similar to the typical twitching behavior described for several Gram-negative bacteria. Examples are shown in Fig. 2A–C. Moreover, CV staining demonstrates that bacteria are strongly adhered to the plastic surface. The *Phdp* strains seem to have different patterns of spread over the plastic surface showing two types of colony borders, smooth and rhizoid. Examples are shown in Fig. 2D and E.

3.3. Biofilm formation

In vitro biofilm formation in *Phdp* is strain dependent and is inhibited by the addition of glucose. None of the strains tested formed biofilms in the 96-well plates. Interestingly, however, some strains formed a consistent biofilm, easily visualized in the 24-well plates at the solid–liquid interface after CV staining. The formation of a robust and stable biofilm was achieved only after 4–6 days (Fig. 3). The amount of biofilm formed by the *Phdp* strains grown in BHIB without glucose was higher than that of cells grown in BHIB supplemented with glucose (Fig. 3B). Following biofilm formation on 4-well μ -chamber uncoated slides, biofilms were stained with LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit, and examined by CLSM. The viability kit consists of two dyes; green-fluorescent SYTO 9 which stains live bacteria, and red-fluorescent propidium iodide which only penetrates nonviable bacterial cells with damaged/perturbed cell membranes. The maximum biofilm thickness observed in the biofilm areas examined by

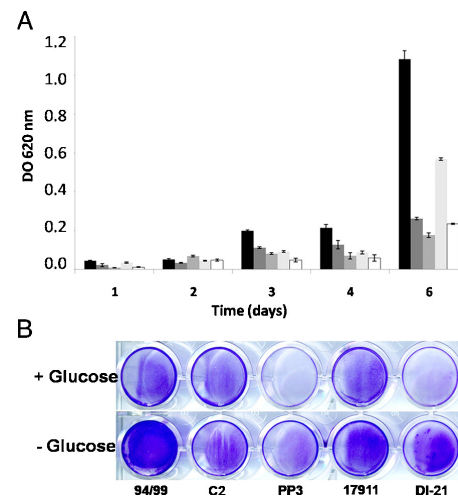


Fig. 3. (A) Biofilm formation by *Phdp* strains in 24-well polystyrene plates following different times of incubation. Biofilm formation on polystyrene surface was assessed by crystal violet staining in static conditions. Each bar indicates the mean values with standard deviations. From black to white, strains 94/99, C2, PP3, ATCC 17911, and DI-21. The biofilm assay was performed three times, with duplicates in each assay. (B) Examples of biofilm formation by the five *Phdp* strains in 24-well plates before CV solubilization, after 6 days of growth in the presence or the absence of glucose.

the confocal microscope was between 40 μm and 50 μm , and was made by the strain 94/99. In some strains, the fraction of red color (non-viable) increased with time indicating that most cells inside the biofilm were non-viable (Fig. 4A–D). Using the anti-*Phdp* antibody, CLSM analysis on glass slides shown that *Phdp* biofilms did not have the typical biofilm features shown by most bacteria, because the morphology of the cells was filamentous, resembled the mycelia of fungi (Fig. 4E). Furthermore, in all strains, the cells within the *biofilms* are mostly not encased in a matrix as revealed by the NucBlue and FilmTracer staining (Fig. 4F). The positive control for matrix production (*P. aeruginosa*) was strongly stained with the FilmTracer (not shown). Moreover, the filamentous cells in *Phdp* biofilms were visualized by SEM, stained for their nucleoids using DAPI and found to be clearly multinucleate (Fig. S1).

Supplementary Fig. S1 related to this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.08.005>.

4. Discussion

We have shown that *Phdp*, a facultative intracellular fish pathogen, expresses pilus-like surface structures which resemble in several aspects the surface appendages of other bacteria. To the best of our knowledge, such appendages have not previously been described in this species. Although, historically *Phdp* is described as non-motile, which is related to the lack of flagella and therefore its inability to swim, the strains used in this study migrated in the medium-plastic interface of solid media, referred to as twitching motility. Pili in *Phdp* may play a role in twitching motility, in adhesion to an inert or living surface, and thus in biofilm formation. Reports concerning the viability of *Phdp* in the aquatic environment are scarce and its mode of transmission has not yet been elucidated (Magarinos et al., 1994).

Biofilm formation by pathogens in aquatic environments may contribute to the establishment and long-term survival of bacteria and may play a role in the

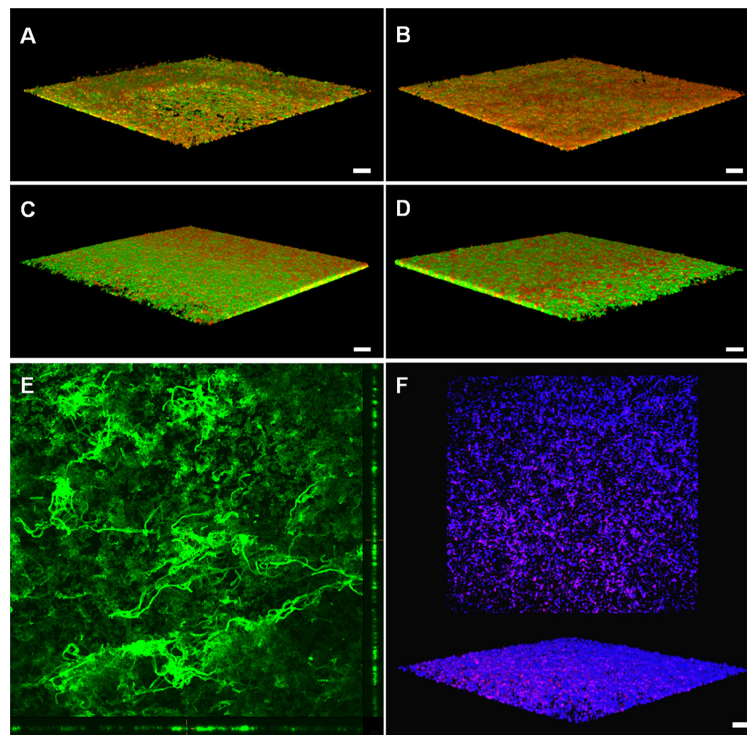


Fig. 4. CLSM images of unfixed (A–D and F) 6 days old biofilms formed by *Phdp* strains 94/99 (A), PP3 (B), ATCC 17911 (C), DI-21 (D) and stained with LIVE/DEAD. Live bacteria are stained green and dead bacteria are stained red. (E) Maximum intensity projection of a fixed 4 days old biofilm formed on a glass slide (strain 94/99). Bacteria were stained with the anti-*Phdp* antibody and prepared as for standard immunofluorescence studies. (F) CLSM images of an unfixed 6 days old biofilm formed by *Phdp* strain 94/99 and stained with the FilmTracer™ SYPRO® Ruby Biofilm Matrix Stain. The purple spots on the image represent the proteinaceous components of a putative extracellular matrix, and bacteria are shown in blue. Original magnifications: A–D and F: $\times 200$; E: $\times 400$. Scale bars: 20 μm . (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

transmission of those pathogens. Moreover, an alternative hypothesis for the prevalence of biofilms is aquatic environments is that they serve as a protective niche against predation, allowing for higher densities of cells than in planktonic states (Matz et al., 2008). The ability of biofilm bacteria to achieve high densities has been ascribed to various factors, including greater resistance to exogenous stresses or the accumulation of nutrients at surfaces (Johnson, 2008; Marshall et al., 2012). We report here that *Phdp* forms biofilms on submerged surfaces and not at the air-liquid interface on microtiter plates. Biofilm production was found to be strongly dependent on incubation time, culture medium, as well as the strain used. The *Phdp* strains used in this study did not form biofilms on U-bottom 96-well plates. This finding is not in agreement with Khouadja's findings (Khouadja et al., 2014). These authors reported biofilm formation in *P. damsela* subsp. *damsela* in 96-well plates after only 24 h. Although some differences in the assay conditions were used, we recommend the use of flat bottom plates to observe and quantify biofilms in *Phdp*. In this point, many pathogenic bacteria produce biofilms as an important strategy for persisting in the environment. A biofilm is a structured community of bacterial cells enveloped in a self-produced polymeric matrix and adherent to an inert or living surface (Hall-Stoodley et al., 2004). The fluorescent stain used in this study was FilmTracer™ SYPRO Ruby biofilm matrix stain. This stain is able to mark most of the proteins in the biofilm such as fibrillar protein, lipoproteins, phosphoproteins, and glycoproteins. In our study, biofilm bacteria were not completely embedded in an extracellular proteinaceous matrix. This could lead to easy detachment, because it is likely that the small amount of proteinaceous matrix produced by those bacteria was not in sufficient quantity to allow strongly attachment to the substratum. Alternatively, the major component in the biofilm matrix in *Phdp* could be other compounds such as sugars or lipids. Microscopic examination of biofilms by SEM and CLSM revealed that *Phdp* display extensive cellular chaining and cell elongation during biofilm formation *in vitro*. Cellular chaining may facilitate an increased flow of nutrients through the interior of the biofilm and could also afford an increased structural coherence during stress conditions (Vejborg and Klemm, 2009). Other microbial species have been found to form cellular chains during biofilm formation, including *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa*, and *Legionella pneumophila* (Rieu et al., 2008; Labbate et al., 2004). *Phdp* could adapt to starvation by elongation and cellular chain formation. This adaptation, differs from a better-understood starvation response (*i.e.* cell size decreases) for planktonic bacteria in aquatic environments (Arias et al., 2012; Vivas et al., 2004). In addition, our image analyses using DAPI suggest that cellular chain elongation is due not to defects in DNA replication or chromosome segregation, but to an incomplete septum formation.

In conclusion, based on our results, standardized analyses of *Phdp* surface appendages, biofilms, motility and their impact on *Phdp* survival, ecology and pathobiology are now more feasible, and will help to open up new

research areas in several fields of the ecology and the pathogenesis of this important fish pathogen.

Acknowledgments

J.R.V. holds a Miguel Servet contract for Young Researchers from the Instituto de Salud Carlos III, Spain. Dr. Acosta is supported by the Fundación Ramón Areces (grant CIVP16A1810). The authors thank Dr Fidel Madrazo (Servicios Tecnológicos, IDIVAL) for help with CLSM and Dr. Alain Ocampo for providing the *Pseudomonas* strain. We also would like to thank Dr. Daniel Montero Vítore (Aquaculture Research Group) and Parque Científico Tecnológico Marino of the ULPGC (Canary Islands), for providing the specimens of sea bass, and Carmen Lobo and Inés García de la Banda (Instituto Oceanográfico Español, Santander) for providing the specimens of sole.

References

- Acosta, F., Ellis, A.E., Vivas, J., Padilla, D., Acosta, B., Deniz, S., Bravo, J., Real, F., 2006. Complement consumption by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in seabream, red porgy and seabass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. *Fish Shellfish Immunol.* 20, 709–717.
- Acosta, F., Vivas, J., Padilla, D., Vega, J., Bravo, J., Grasso, V., Real, F., 2009. Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *J. Fish Dis.* 32, 535–541.
- Arias, C.R., Lafrentz, S., Cai, W., Olivares-Fuster, O., 2012. Adaptive response to starvation in the fish pathogen *Flavobacterium columnare*: cell viability and ultrastructural changes. *BMC Microbiol.* 12, 266.
- do Vale, A., Silva, M.T., dos Santos, N.M., 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. *Mol. Microbiol.* 58, 1025–1038.
- Duguid, J.P., Smith, I.W., Dempster, G., Edmunds, P.N., 1955. Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol.* 70, 335–348.
- 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. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 139–144.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108.
- Johnson, L.R., 2008. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J. Theor. Biol.* 251, 24–34.
- Khouadja, S., Lamari, F., Bakhruf, 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*). *Microb. Pathog.* 69–70, 13–19.
- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice, S.A., Givskov, M., Kjelleberg, S., 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* 186, 692–698.
- Magarinos, B., Romalde, J.L., Barja, J.L., Toranzo, A.E., 1994. Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 180–186.
- Marshall, S.H., Gomez, F.A., Ramirez, R., Nilo, L., Henriquez, V., 2012. Biofilm generation by *Piscirickettsia salmonis* under growth stress conditions: a putative *in vivo* survival/persistence strategy in marine environments. *Res. Microbiol.* 163, 557–566.
- Matz, C., Webb, J.S., Schupp, P.J., Phang, S.Y., Penesyan, A., Egan, S., Steinberg, P., Kjelleberg, S., 2008. Marine biofilm bacteria evade eukaryotic predation by targeted chemical defense. *PLoS ONE* 3, e2744.
- 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*. *Dis. Aquat. Organ.* 40, 177–183.
- Real, F., Oros, J., Acosta, F., Acosta, B., Santana, P., Deniz, S., 1997. Pasteurellosis in gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria, Spain. *Bull. Eur. Assoc. Fish Pathol.* 17, 153–157.
- Rieu, A., Briandet, R., Habimana, O., Garmyn, D., Guzzo, J., Piveteau, P., 2008. *Listeria monocytogenes* EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 4491–4497.
- Snieszko, S.F., Bullock, G.L., Hollis, E., Boone, J.G., 1964. *Pasteurella* Sp. from an epizootic of white perch (*Roccus Americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas. *J. Bacteriol.* 88, 1814–1815.
- Thyssen, A., Grisez, L., van Houdt, R., Ollevier, F., 1998. Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48, 1145–1151.
- Toranzo, A.E., Barreiro, S., Casal, J.F., Figueras, A., Magariños, B., Barja, J.L., 1991. Pasteurellosis in cultured gilt-head sea bream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99, 1–15.
- Vejborg, R.M., Klemm, P., 2009. Cellular chain formation in *Escherichia coli* biofilms. *Microbiology* 155, 1407–1417.
- Vivas, J., Carracedo, B., Riano, J., Razquin, B.E., Lopez-Fierro, P., Acosta, F., Naharro, G., Villena, A.J., 2004. Behavior of an *Aeromonas hydrophila* aroA live vaccine in water microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2702–2708.
- Vivas, J., Padilla, D., Real, F., Bravo, J., Grasso, V., Acosta, F., 2008. Influence of environmental conditions on biofilm formation by *Hafnia alvei* strains. *Vet. Microbiol.* 129, 150–155.
- Yoshida, T., Inglis, V., Misawa, N., Kruger, R., Sakai, M., 1997. In vitro adhesion of *Pasteurella piscicida* to cultured fish cells. *J. Fish Dis.* 20, 77–80.

Effect of Different Culture Conditions on the (Twitching) Displacement of *Photobacterium Damselae subsp. Piscicida*

Abstract

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (Phdp), etiological agent of photobacteriosis, is a non-motile bacterium. Notwithstanding, it is able to move on solid surfaces. The presence of pili-like structures on the bacterial surface has been recently described and being associated with twitching displacement by our team. The objective of this study was to modify some conditions (temperature, pH, concentration of nutrients, salinity, solidification of the medium, surface roughness and presence of target cells of Phdp) to determine which ones promote motility on solid surfaces.

Lower temperatures ($\leq 18^{\circ}\text{C}$), alkaline and acidic environments and lacking salinity ($<0.5\%$) media had a negative effect on cell motility, while nutrient limitation did not affect the bacterial response. The best twitching motility was observed when Phdp was inoculated in medium with 0.2% agar and pH 7.0. Also, interesting results were obtained on rough surfaces or by the addition of cellular debris of SAF-1 cell line to the medium.

According to the results, the "new" composition of the "twitching displacement" medium could be as follows: 3.7% (w/v) brain-heart infusion broth (BHIB) supplemented with about 1.0% (w/v) NaCl and 0.2% (w/v) agar, with a final pH of 7.0, and maybe, scrape petri dishes and add debris of SAF-1 cells 1:2-factor dilution to medium. If bacterial strains are incubated at 22-25°C for three days, a good response should be achieved in terms of fimbriae production.

Keywords: *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*; Twitching; Bacterial displacement; Culture media

Research Article

Volume 4 Issue 4 - 2017

Vega Belinda¹, Ramos-Vivas José², Bravo Jimena¹, Acosta Begoña³, Lázaro-Díez María² and Acosta Félix^{1*}

¹Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Spain

²Servicio de Microbiología, Instituto de Investigación Marqués de Valdecilla IDIVAL, Spain

³Instituto Universitario de Sanidad Animal, Spain

*Corresponding author: Félix Acosta Arbelo, Grupo de Investigación en Acuicultura (GIA), Instituto Ecoaqua, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, PCTM, Spain, Email: elix.acosta@ulpgc.es

Received: April 12, 2017 | Published: April 28, 2017

Abbreviations: Phdp: *Photobacterium Damsela* subsp. *Piscicida*; ATCC: American Type Culture Collection; spp.: Species; Subsp.: Subspecies; PBS: Phosphate Buffered Saline Solution; BHIB: Brain-Heart Infusion Broth; BHIA: Brain-Heart Infusion Agar; SAF-1: Cell Line from Sparus Aurata Fin; NaCl: Sodium Chloride; CV: Crystal Violet; PCR: Polymerase Chain Reaction; RT: Room Temperature; OD600: Optical Density at 600nm; p: p-value; w/v: Weight/volume; ml: Milliliter; nm: Nanometre; h: Hour; °C: Degree Celsius; %: Percent

Introduction

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* (Phdp), which belongs to the family *Vibrionaceae*, is a pleomorphic Gram-negative bacterium, with bipolar staining, non-motile and halophilic [1,2]. It grows at 15-30°C, but the disease caused by this organism usually occurs when water temperatures are over 20°C.

The etiological agent of fish photobacteriosis or pasteurellosis [3] is an important pathogen affecting different fish species in Europe, Japan, USA and Mediterranean countries [4,5]. It first appeared in USA in 1963 affecting wild white perch (*Morone americanus*) and striped bass (*Morone saxatilis*) [6]. Afterwards, it caused serious economic losses in aquaculture in Japan [7] and

from the early 1990s began to spread across Europe, becoming a major problem in the global marine aquaculture.

Different studies reveal that Phdp has virulence factors involved in its pathogenesis: presence of a polysaccharide capsular layer [8,9] plasmid-encoded virulence factors [10], iron uptake mechanisms [11], proteins with apoptotic activity [12], other enzyme activities [13,14], and resistance to blood serum of several fish species [15].

"Twitching motility", term introduced is a kind of motion mediated by a proteinaceous and filamentous structure called Type-IV fimbriae or pili [16,17]. It is located on the surface of many Gram-negative and Gram-positive bacteria, at one or both poles [18-20]. And also, it is involved in surface adhesion and colonization [21-23], tropism determination [24], biofilm formation [23], genetic material uptake [21] and virulence of bacteria [25-27]. Fimbriae expression is controlled by transcriptional and post-transcriptional [28] and is influenced by several factors: bacterial growth rate [29], culture medium composition [30,31], temperature [32], pH and osmolarity [33]. So, it is a complex and unstable process and its levels are heterogeneous, frequently becoming lost [34].

Recently, the presence of surface appendages similar to pili on Phdp (Figure 1) and the ability of this pathogen to move on solid surfaces have been described by our team [35]. Thus, we aim to go into detail about this subject, starting by studying and determining what factors and environmental conditions affect twitching displacement of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Identifying these parameters should contribute to a better understanding of the correlation between the adherence capabilities and the pathogenicity of this bacterium.

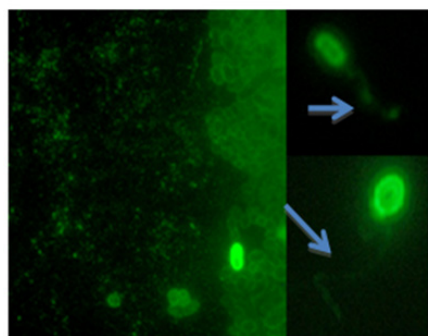


Figure 1: Immunofluorescence image of Phdp after motility assay. The bacteria was labeled with polyclonal antibody against Phdp and finally marked with Alexa 488 antirabbit. The photo was taken in an Epi-fluorescence microscope Olympus BX43.

→ pili-like structure.

Material and Methods

Ethical approval is not required by a specific committee since animals has not been used in the present study for research purposes.

Bacterial strains

The five *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains used in this study are listed in Table 1. These bacteria were verified by biochemical and PCR tests and preserved in brain-heart infusion broth (BHIB-1.5) with 1.5%NaCl and 25% glycerol at -80°C until use.

Table 1: Bacterial strains used in this study.

Phdp C2	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	Spain, 1997	[55]
Phdp 94/99	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	Spain, 1999	[55]
PhdpDI21	Gilthead seabream (<i>Sparus aurata</i>)	Spain, 1991	[56]
PhdpPP3	Yellowtail (<i>Seriola quinqueradiata</i>)	Japan	
Phdp ATCC 17911	White perch (<i>Roccus americanus</i>)	USA, 1964	[6]

Prior to experiment

The strains were routinely cultured in brain-heart infusion agar (BHIA-1.5) supplemented with 1.5% NaCl and incubated at 22°C for 24 hours. For experiments, 1-5 colonies of each strain were passed to 10ml of brain-heart infusion broth (BHIB-1.5) supplemented with 1.5% NaCl and incubated at room temperature (RT), in darkness for 24h. When the medium was turbid (OD600≈0.45), it was diluted 1:100 with sterile phosphate buffered saline (PBS) solution, becoming the inoculum of the experiments.

“Twitching displacement” medium

The composition of the medium used to the experiments was brain-heart infusion broth supplemented with 1.5% NaCl and 0.3% agarose D-1 Low EEO (CONDA, Pronadisa). It was sterilized at 120°C for 20 minutes, prepared and poured into Petri dishes the day before the experiment and kept in darkness at RT until use.

Displacement assays

After preparing everything, we proceeded to the inoculation of the media. To do this, sterile flat toothpicks were immersed into the bacterial suspensions for about 5 seconds and inoculated in three points into the agar to touch the plate underneath the agar, being removed after 1-2 seconds. Afterwards, it was incubated for 48 and 72 hours in darkness.

The length of bacterial shifts from inoculation point was measured after 2 and 3 days of incubation in every experiment to determine what environmental conditions favor “twitching motility”. These conditions are detailed below.

Temperature of incubation

The temperatures of incubation studied were 18, 20, 22 (reference temperature) and 25°C. And furthermore, some agar plates were kept at 4°C for 3 and 7 days and later, inoculated and incubated at 22°C for other 2 and 3 days.

pH

The culture medium was prepared in the same conditions described above and the pH was adjusted with phosphate buffer to a final pH of 6, 7, 8 and 9.

Concentration of nutrients

The quantity of brain-heart infusion broth was reduced by half and a quarter to evaluate the bacterial response when the availability of nutrients decreases.

Salinity of the medium

For this assay, the medium was supplemented with 0, 0.5, 1, 1.5, 2 and 2.5% of sodium chloride (NaCl). Also, we inoculated in “salinity medium” with 0% NaCl (0.3% agarose, 0.1% yeast extract, 0.4% peptone; w/v).

Agar concentration of the medium

0.3% agar added to the medium was compared to 0.2 and 0.4% to check whether the degree of solidification of the medium facilitates or curbs bacterial motility.

Scraping Petri dishes

The objective of this test was to observe whether rough surfaces benefit the biofilm formation and cell attachment, as well as compare the motility on rough and smooth surfaces. It was carried out under sterile conditions before serving the "motility" medium by using sterile scissors to draw a "W" on the plate in every direction.

Cell debris in the medium

Debris of SAF-1 cells was added in the medium in order to generate tropism, previously knowing that Phdp is able to adhere to, invade and survive within these cells [36]. This cell line consists of fibroblastic cells from fin of gilthead seabream (*Sparus aurata*) [37]. Cells from culture bottles were diluted with PBS to 0.409 optical density at 600 nm. Next, it was diluted by a factor of 1:2, 1:4 and 1:8. 10 ml of each dilution were mixed with 200 ml of medium.

Crystal violet staining

After three days of incubation, agar was carefully removed from petri dishes to show the bacterial growth and shift on the plate beneath the agar. Loose cells and agar remains were washed with distilled water and then, the attached bacteria were stained with crystal violet (CV) solution (0.7% w/v). Twelve minutes later, it was washed and air dried. Finally, we could observe the bacteria fixed to the plate.

Statistical analysis

Analyses were produced on IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corp.), using general linear models: multivariate (posthoc tests: Tukey, Duncan and Hochberg) to compare the "different groups" of each assay for both data collection days (days 2 and 3 of incubation) separately and univariate to analyse the differences on motility between "days 2 and 3 of incubation" for each group. Models indicate significance when $p \leq 0.05$.

Results

Temperature of incubation

Strains C2 and ATCC 17911 developed displacement at all temperatures tested, with no significant difference ($p > 0.05$). The same for strains PP3 and DI21 when Phdp was incubated for 3 days, but on the second day of incubation, we could see no growth and no motility at 18°C ($p > 0.05$). Nevertheless, strain 94/99 had not motion at 18°C (day 2) nor when it was previously kept cold for a week (days 2 and 3) ($p > 0.05$) (Figure 2). There were no significant differences between days of incubation either ($p > 0.05$), except for groups "7 days at 4°C" (strain DI21) ($p < 0.01$) and "18°C" (strain ATCC 17911) ($p < 0.04$) (Figure 2).

pH

After 2 days of incubation, all the strains only swelled and moved at pH 7, with significant difference in the case of C2 ($p < 0.005$) and DI21 strains ($p < 0.05$). After 3 days, history repeated itself for strains C2, 94/99 and ATCC 17911, with significant difference for the first one ($p < 0.0001$); while the other strains had displacement at different pH, although with significant difference between pH 7

and other pH values (strain PP3) ($p < 0.005$) (Figure 3). Comparing days of incubation, there were significant differences for groups "pH 7" (strain C2) ($p < 0.03$) and "pH 6" (strain DI21) ($p < 0.04$) (Figure 3).

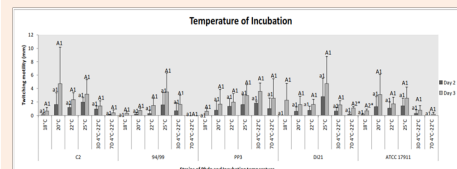


Figure 2: Effect of temperature of incubation on twitching motility of the Phdp strains tested: C2, 94/99, PP3, DI21 and ATCC 17911.

Small letters: Compare "groups" after 48 h of incubation

Capital letters: Compare "groups" after 72 h of incubation

Numbers: Compare "days of incubation" of each group

*Indicates that there are statistically significant differences

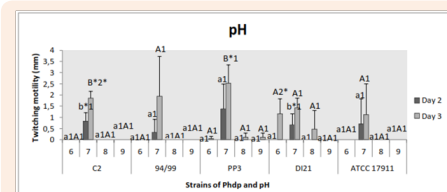


Figure 3: Effect of pH on twitching motility of the Phdp strains tested: C2, 94/99, PP3, DI21 and ATCC 17911.

Small letters: Compare "groups" after 48 h of incubation.

Capital letters: Compare "groups" after 72 h of incubation.

Numbers: Compare "days of incubation" of each group.

*Indicates that there are statistically significant differences.

Concentration of nutrients

Bacteria showed displacement at all concentrations of nutrients tested, with no statistically significant differences between groups ($p > 0.05$) and between days of incubation ($p > 0.05$). These results were obtained in all cases (Figure 4).

Salinity of the medium

Regarding strain C2, we found significant difference on displacement between bacteria inoculated in medium supplemented with 1% NaCl and media containing no added NaCl ($p < 0.01$). Between groups "NaCl free-salinity medium", wherein bacteria had no growth or motility, and "twitching motility medium with 0% NaCl", between every group and between days of

Nutrients

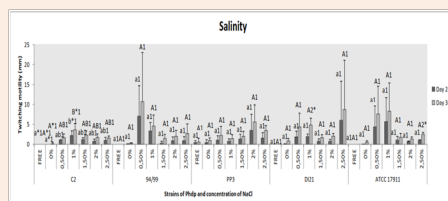
Tachyplex mortality (nms)

Day 2 (black bars), Day 3 (grey bars)

Strains of Phlo and concentration of BHB

Strain	Concentration	Day 2 (nms)	Day 3 (nms)	Significance
C2	1	~2.5	~2.8	A1
	1/2	~1.2	~1.5	a1
	1/4	~2.2	~2.8	A1
94/99	1	~1.2	~2.2	A1
	1/2	~1.2	~1.5	a1
	1/4	~1.2	~1.5	a1
PP3	1	~1.8	~2.2	A1
	1/2	~1.2	~1.8	a1
	1/4	~1.2	~1.8	a1
A121	1	~1.2	~2.2	A1
	1/2	~1.2	~1.8	a1
	1/4	~1.2	~1.8	a1
ATCC 17911	1	~1.8	~2.2	A1
	1/2	~1.2	~1.8	a1
	1/4	~1.2	~1.8	a1

*Indicates that there are statistically significant differences.



*Indicates that there are statistically significant differences

Concentration of agar

Turbidity (OD_{600 nm})

Day 2
Day 3

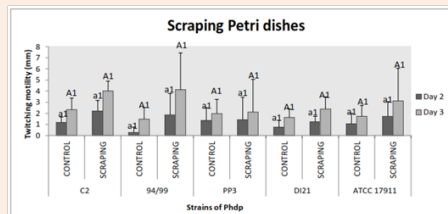
C2 94/99 PP3 DI02 ATCC 17911

0.20% 0.30% 0.40%

Strains of Pdp and concentration of agar

*Indicates that there are statistically significant differences.

Scrape the petri dishes or not was not statistically different ($p>0.05$). However, displacement was slightly higher for all strains in the first case. We could always notice that the bacterial shifts were larger on the third day of incubation as in all assays, except when there was no motility; at this time, with no significant difference ($p>0.05$) (Figure 7).



*Indicates that there are statistically significant differences

There were no significant differences between the groups “control” and “presence of cells in the medium” ($p>0.05$) and between the different dilutions of cells ($p>0.05$), for any strain. In the case of strains 94/99, DI21 and ATCC 17911, displacement best values seemed to be associated with presence of cell but in a lesser proportion, whereas for strain PP3 it was the opposite,

displacement was not observed at 1:8 factor- dilutions. Strain C2 had groups with similar results ($p>0.05$) (Figure 8). Significant differences between days of incubation in groups “control” (94/99 and DI21) ($p<0.05$) and “1:4 factor-dilution” (DI21) ($p<0.01$) were obtained (Figure 8).

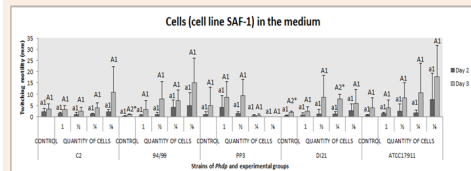


Figure 8: Effect of presence of cell debris in the medium on twitching motility of the Phdp strains tested: C2, 94/99, PP3, DI21 and ATCC 17911.

Small letters: Compare “groups” after 48 h of incubation

Capital letters: Compare “groups” after 72 h of incubation

Numbers: Compare “days of incubation” of each group

*Indicates that there are statistically significant differences

Discussion

For various reasons, many authors have reached the conclusion that low and high temperatures alter fimbriae expression [29,38,39]; bearing in mind, of course, that the meaning of low or high will depend on the bacteria (and its genetics). In our work, the best performance was obtained between 22 and 25°C. At lower temperatures, especially at 18°C, bacteria did not always grow and develop displacement. Studied the adhesion of a marine bacterium to surfaces and the number of attached bacteria was proportional to the density of suspended bacteria at 12°C to 14°C [40], on the other hand, at 25°C, only a few bacteria were attached to the surface, despite a high culture density. Nevertheless, we did not measure the number of bacteria, but the displacement on the solid surface. As stated in the introduction of this article, temperature and media affect fimbriae expression; this was observed while studying type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K-12 and these effects appear to be independent [41]: low temperatures slow down even shut down the fimbriae synthesis because that affects the promoters switching and fim genes; for *E. coli*, the optimal temperature seems to be between 37 and 41°C, however, these temperatures are too high for *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and 28°C, which is the lowest temperature tested, is still high.

Expression of fim genes is slightly lower in alkaline and acidic environments than at neutral pH, where it is maximal. Acidic environments also affect the transcription of fim promoters [33]. So, this could explain the results obtained in this experiment. Twitching displacement happened at pH 7.0. At other pH values, it was only and occasionally observed in two strains, after three days of incubation and considerably fewer compared to that developed at neutral pH. But about the adhesion ability, the

results achieved with an unidentified motile Gram-negative rod was no difference at pH 7.4 and 8.6 [40] and with *Vibrio spp.* were a maximal adhesion at pH 8.2-8.5 [42]. The repressing effect on transcription of these genes at low pH is increased when osmolarity is moderate to high in Uropathogenic *Escherichia coli* [33]; but *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is a marine fish bacterium and can tolerate high NaCl concentrations, so it could be expected that its performance would be different.

Fimbriae expression depends on specific growth rate, which is independent of the growth-limiting nutrient used [29]. On the other hand, in this study, the quantity of nutrient in the medium was reduced, observing perhaps a slight and not significant decrease in twitching displacement of strains 94/99 and DI21 at low concentration of nutrients. Nevertheless, with all the data, we think we can say that nutrient limitation does not seem to significantly affect phenotypically. In the study of Fletcher and Floodgate [41], the peptone concentration did not affect the number of attached bacteria either, even if the levels used were greater than the natural organic nutrient concentrations in seawater. On the other hand, Gally et al. [41] observed that fimbria synthesis was slower in defined rich medium than minimal medium and can vary and be control by levels of aliphatic amino acids (alanine, isoleucine, leucine, valine).

No twitching displacement in NaCl-free culture media can be explained by the necessity of NaCl for Phdp to grow and accordingly, to move. This result contrasts with others, where an increased osmolarity reduces fimbriae expression [33]; however, the adhesion of *Vibrio spp.*, other marine bacteria, to mucus-coated glass slides is higher when the bacterial cells are incubated in seawater (3.5% NaCl) than in saline solution and PBS [42].

Fimbriae production by bacteria is greater in broth than agar (1.5%) cultures [38] and therefore, displacement is better on rather soft and wet surfaces (0.3% agar) than on relatively firm and dry surfaces (1.5% agar) [43]. We agree with this statement. Nevertheless, Liu et al. [44] observed a better twitching displacement in 1.2-1.6% agar plates after testing agar concentrations ranging from 0.8 to 2.0%.

Slightly greater displacement was got on rough surface, it is known that such surfaces favour the biofilm formation [45]; after all, bacterial adhesion is affected by physic-chemical properties of both the surface and the bacteria cell wall, including its structural features [46-48], in this case, fimbriae. Also, Anselme [49] showed a relationship between roughness and adherent bacteria number on polyurethane-coated glass plates preconditioned in seawater. Whitehead et al. [50] & Campoccia et al. [51] studied this subject by testing different pits with specific diameter and depth, whereas in our assay, the marks were irregular on the plates and the results expressed as displacement and not bacteria number; in the first study, there was an increase of adherent bacteria number on rough surfaces, especially on the bottom of crevices [52], although the lowest number was obtained on the larger pit, but in the second one, no differences were observed. In addition, some authors have proposed that bacterial response to nanometer scale roughness is mediated by structures such as fimbriae [48,49].

Adding metals to the medium (Ca, Co, Cu, Fe and so on) [53], exposing bacteria to tissue cells it interacts with and feels tropism

towards [54] as our work, are some methods employed in order to study and promote cell adhesion and twitching displacement. That is it, Phdp strain PP3 showed a slightly better displacement in culture media with a lot of cells; strains 94/99, DI21 and ATCC 17911 too, but a lower amount of added cells was enough and better; however, for the strain C2, media with or without cell debris did not make difference.

In conclusion, according to the results, the “new” composition of the “twitching displacement” medium could be as follows: 3.7% (w/v) BHIB supplemented with about 1.0% (w/v) NaCl and 0.2% (w/v) agar; with a final pH of 7.0, and maybe, scrape petri dishes and add debris of SAF-1 cells 1:2-factor dilution to medium. If bacterial strains are incubated at 22-25°C for three days, a good response should be achieved in terms of fimbriae production. Now, we must continue with the study of these pili-like structures recently discovered in *Photobacterium damsela subsp. piscicida* and their relationship to the ability of the bacteria to adhere and invade non-phagocytic cells, and their possible involvement in the development of immunity against *Photobacterium damsela subsp. piscicida* and the possible application of the same in vaccine formulations or as a therapeutic target. With this medium we can increase significantly the expression of such pili-like structures to work.

Acknowledgement

Dr. Acosta thanks to Fundación Ramón Areces for support this work by the Grant XVII Concurso Nacional para la adjudicación de Ayudas a la Investigación en Ciencias de la Vida y de la Materia (CIVP16A1810). Belinda Vega thanks to University of Las Palmas de Gran Canaria for support with PhD grant.

References

- Janssen WA, Surgalla MJ (1968) Morphology, physiology and serology of a *Pasteurella species* pathogenic for white perch (*Roccus americanus*). J Bacteriol 96(5): 1606-1610.
- Magariños B, Romalde JL, Bandín I, Fouz B, Toranzo AE (1992) Phenotypic, antigenic and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. Appl Environ Microbiol 58(10): 3316-3322.
- Gauthier G, Lafay B, Ruimy R, Breittmayer V (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. Int J Syst Bacteriol 45(1): 139-144.
- Romalde JL, Magariños B (1997) Immunization with bacterial antigens: pasteurellosis. Dev Biol Stand 90: 167-177.
- Romalde JL (2002) *Photobacterium damsela subsp. piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. Int Microbiol 5(1): 3-9.
- Snieszko SF, Bullock GL, Hollis E, Boone JG (1964) *Pasteurella sp.* from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidalwater areas. J Bacteriol 88: 1814-1815.
- Kusuda R, Yamaoka M (1972) Etiological studies on bacterial pseudotuberculosis in cultured yellowtail with *Pasteurella piscicida* as the causative agent. I. On the morphological and biochemical properties. B Jpn Soc Sci Fish 38(12): 1325-1332.
- Magariños B, Bonet R, Romalde JL, Martínez MJ (1996) Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish. Microb Pathog 21(4): 289-297.
- Magariños B, Romalde JL, Noya M, Barja JL (1996) Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*. FEMS Microbiol Lett 138(1): 29-34.
- Do Vale A, Silva MT, dos Santos NMS, Nascimento DS, Reis Rodrigues P (2005) AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela subsp. piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils. Mol Microbiol 58(4): 1025-1038.
- Magariños B, Romalde JL, Lemos ML, Barja JL (1994) Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish. Appl Environ Microbiol 60(8): 2990-2998.
- Do Vale A, Marques F, Silva MT (2003) Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. Fish Shellfish Immunol 15(2): 129-144.
- Díaz-Rosales P, Chabrilón M, Arijo S, Martínez-Manzanares E (2006) Superoxide dismutase and catalase activities in *Photobacterium damsela subsp. piscicida*. J Fish Dis 29(6): 355-364.
- Naka H, Hirono I, Aoki T (2007) Cloning and characterization of *Photobacterium damsela subsp. piscicida* phospholipase: an enzyme that shows haemolytic activity. J Fish Dis 30(11): 681-690.
- Acosta F, Ellis AE, Vivas J, Padilla D (2006) Complement consumption by *Photobacterium damsela subsp. piscicida* in seabream, red porgy and sea bass normal and immune serum. Effect of the capsule on the bactericidal effect. Fish Shellfish Immunol 20(5): 709-717.
- Ottow JCG (1975) Ecology, physiology and genetics of fimbriae and pili. Annu Rev Microbiol 29: 79-108.
- Strom MS, Lory S (1993) Structure-function and biogenesis of the type IV pili. Annu Rev Microbiol 47: 565-596.
- Henrichsen J (1975) The occurrence of twitching motility among Gram-negative bacteria. Acta Pathol Microbiol Scand B 83(3): 171-178.
- Henrichsen J (1983) Twitching motility. Annu Rev Microbiol 37: 81-93.
- Kaiser D (1979) Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. P Natl Acad Sci USA 76(11): 5952-5956.
- Manning PA, Meyer TF (1997) Type-4 pili: biogenesis, adhesins, protein export and DNA import. Proceeding of a workshop. Gene 192(1): 1-198.
- Boyd JM, Dacanay A, Knickle LC, Touhami A (2008) Contribution of Type IV Pili to the virulence of *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*). Infect Immun 76(4): 1445-1455.
- Hadi N, Yang Q, Barnett TC (2012) Tabei SMB. Bundle-Forming Pilus Locus of *Aeromonas veronii* vb. *sobria*. Infect Immun 80(4): 1351-60.
- Parkinson JS (1993) Signal transduction schemes of bacteria. Cell 73(5): 857-871.
- Masada CL, LaPatra SE, Morton AW, Strom MS (2002) An *Aeromonas salmonicida* type IV pilin is required for virulence in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ 51(1): 13-25.

26. Josenhans C, Suerbaum S (2002) The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J of Med Microbiol* 291(8): 605-614.
27. Krukons ES, DiRita VJ (2003) From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Curr Opin Microbiol* 6(2): 186-190.
28. Verdonck F, Cox E, Goddeeris BM (2004) F4 fimbriae expressed by porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*, an example of an eccentric fimbrial system? *J Mol Microbiol Biotech* 7(4): 155-169.
29. Van der Woude MW, Arts PA, Bakker D, Van Verseveld HW (1990) Growth rate dependent synthesis of K99 fimbrial subunits is regulated at the level of transcription. *J Gen Microbiol* 136: 897-903.
30. Girardeau JP, Dubourguier HC, Gouet P (1982) Inhibition of K99 synthesis by L-alanine in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 128(3): 463-470.
31. Girardeau JP, Dubourguier HC, Gouet P (1982) Effect of the glucose and amino acids on expression of K99 antigen in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 128(10): 2243-2249.
32. Van der Woude MW, Braster M, Van Verseveld HW, de Graaf FK (1990) Control of temperature-dependent synthesis of K99 fimbriae. *FEMS Microbiol Lett* 56(1-2): 183-188.
33. Schwan WR, Lee JL, Lenard FA, Matthews BT (2002) Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70(3): 1391-1402.
34. Campal Espinosa AC, Junco Barranco JA, Arteaga Moré NO, Castro Santana, et al. (2008) A general procedure for small-scale purification of fimbriae expressed by porcine enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Rev Colomb Biotec* 10: 122-131.
35. Remuzgo-Martínez S, Lázaro-Díez M, Padilla D, Vega B, El Aamri F, et al. (2014) New aspects in the biology of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: pili, motility and adherence to solid surfaces. *Vet Microbiol* 174(1-2): 247-254.
36. Acosta F, Vivas J, Padilla D, Vega J, Bravo J, et al. (2009) Invasion and survival of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L. *J Fish Dis* 32(6): 535-541.
37. Bejar J, Borrego JJ, Alvarez MC (1997) A continuous cell line from the cultured marine fish gilt-head seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture* 150: 143-53.
38. Amano A, Sharma A, Sojar HT, Kuramitsu HK (1994) Effects of temperature stress on expression of fimbriae and superoxide dismutase by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 62(10): 4682-4685.
39. Walker SL, Sojka M, Dibb-Fuller M, Woodward MJ (1999) Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype Enteritidis. *J Med Microbiol* 48(3): 253-261.
40. Fletcher M, Floodgate GD (1973) An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *J Gen Microbiol* 74: 325-34.
41. Gally DL, Bogan JA, Eisenstein BI, Blomfield IC (1993) Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: Effects of temperature and media. *J Bacteriol* 175(19): 6186-6193.
42. Balebona MC, Moriño MA, Faris A, Krovacek K (1995) Influence of salinity and pH on the adhesion of pathogenic *Vibrio* strains to *Sparus aurata* skin mucus. *Aquaculture* 132: 113-120.
43. W Zusman DR (1993) The two motility systems of *Myxococcus xanthus* show different selective advantages on various surfaces. *Proceedings of National Acad Sci USA* 90(8): 3378-3382.
44. Liu H, Kang Y, Genin S, Schell MA, Denny TP (2001) Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiol* 147(pt 12): 3215-3229.
45. Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implan Res* 17(Suppl 2): 68-81.
46. Smets BF, Grasso D, Engwall MA, Machinist BJ (1999) Surface physicochemical properties of *Pseudomonas fluorescens* and impact on adhesion and transport through porous media. *Colloids Surfaces B* 14: 121-39.
47. Camesano TA, Logan BE (2000) Probing bacterial electrostatic interactions using atomic force microscopy. *Environ Sci Technol* 34(16): 3354-3362.
48. Bakker DP, Busscher HJ, Van Zanten J, de Vries J (2004) Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after conditioning film formation in the marine environment. *Microbiol* 150(pt 6): 1779-1784.
49. Anselme K, Davidson P, Popa AM, Giazson M, Liley M, et al. (2010) The interaction of cells and bacteria with surfaces structured at the nanometer scale. *Acta Biomater* 6(10): 3824-3846.
50. Whitehead KA, Colligon J, Verran J (2005) Retention of microbial cells in substratum surface features of micrometer and sub-micrometer dimensions. *Colloids Surfaces B* 41(2-3): 129-138.
51. Campoccia D, Montanaro L, Agheli H, Sutherland DS, Pirini V, et al. (2006) Study of *Staphylococcus aureus* adhesion on a novel nanostructured surface by chemiluminometry. *Intern J Art Org* 29(6): 622-629.
52. Characklis WG (1981) Fouling biofilm development: a process analysis. *Biotechnol and Bioeng* 23(9): 1923-1960.
53. Cruz LF, Cobine PA, De La Fuente L (2012) Calcium increases *Xylella fastidiosa* surface attachment, biofilm formation and twitching motility. *Appl Environ Microbiol* 78(5): 1321-1331.
54. Thankavel K, Shah AH, Cohen MS, Ikeda T, Lorenz RG, et al. (1999) Molecular basis for the enterocyte tropism exhibited by *Salmonella typhimurium* type 1 fimbriae. *J Biol Chem* 274(9): 5797-5809.
55. Real F, Oros J, Acosta F, Acosta B (1997) Pasteurellosis of gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Gran Canaria Island, Spain. *Bull Europ Ass Fish Pathol* 17(5): 153-157.
56. Toranzo AE, Barreiro S, Casal JF, Figueras A (1991) Pasteurellosis in culture gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain. *Aquaculture* 99(1): 1-15.

AGRADECIMIENTOS



Espero poder expresar en estas líneas mi sincero agradecimiento a tantas personas, por todos los momentos vividos durante mi andadura en esta etapa. Sin duda, ardua labor convertir en palabras los sentimientos y recuerdos que hicieron de este proyecto una auténtica experiencia, no sólo de aprendizaje profesional; también, y especialmente, humana. Resulta enriquecedor emprender así un nuevo camino: con añoranza por lo que se cierra, pero segura de haber crecido con el mejor equipo.

Quiero agradecer:

Al Dr. D. Félix Acosta Arbelo, mi director de tesis. Muchísimas gracias por contar conmigo todos estos años, por tu ayuda constante y tu deferencia, y por lo mucho que he aprendido a tu lado. Gracias en lo profesional y lo personal. Por tu cercanía y tantos detalles que te caracterizan y te hacen querido. Mi agradecimiento infinito.

Al Dr. D. José Ramos Vivas, mi director de tesis. Gracias por tu generosidad en esta fase tan importante para mí. Afortunada de tenerte como director.

A toda la familia del SABE/PCT/IU ECOAQUA, profesores, compañeros, técnicos...ha sido un inmenso placer haber coincidido con cada uno de ustedes, me llevo muy gratos recuerdos, ¡gracias!. Y gracias por acogerme y acompañarme hasta el final de este proyecto.

Al Dr. D. Daniel Montero Vítores, por dar prioridad a nuestros experimentos y facilitar los peces para los mismos. Gracias.

Y gracias al IUSA, porque ahí fue donde comenzó todo y donde mucho viví y compartí.

A Mercedes, por no desesperar con mis preguntas; soy un desastre con el papeleo, pero siempre buscas solución a todo.

Al Dr. D. Fernando Real Valcárcel, siempre le estaré agradecida por haberme tenido en cuenta en la solicitud de beca para formar parte del grupo como técnico.

Aunque muchas personas son las que guardo en mi memoria, quisiera nombrar y agradecer a quienes han sido mis compañeras de laboratorio, Judit, Lorena, Fátima, Valentina, Lita, Elena, por hacer del lugar de trabajo algo más y por otras muchas cosas... Freddy y Aridani, saben que por supuesto están incluidos.

A Jimena, hago extensivo lo anterior, y te doy las gracias por tus explicaciones y propuestas y por estar disponible y ayudarme cuando lo necesito.

Dani, gracias por tu forma de ser y por tantas veces que me ayudaste. Gracias Begoña por tu trato, por todo. Inma sigue así de alegre y dicharachera, por favor.

A Claudio, porque aprendí mucho durante tu estancia y agradezco enormemente la ayuda y los ánimos que siempre me brindas.

A profesores, compañeros, técnicos y personal de limpieza de la Facultad de Veterinaria, porque siempre me han tratado con cariño.

A Manola, Esther, Carmen, Guaci, Andrea y Chano, por facilitarme la tarea en el día a día del laboratorio. Echaré de menos tus conversaciones, Chano, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar.

Chano, Rayco, Fernando, Andrea y Jimena, mil gracias por la colaboración en los muestreos. A Carolina, por tu generosidad durante el periodo en el que trabajamos juntas.

Quiero dar las gracias al Laboratorio de fitoplancton y algas tóxicas del Instituto para el Medio Ambiente Marino Costero de Mesina, por la ayuda en las enseñanzas de técnicas de microscopía electrónica.

Igualmente, quisiera agradecer al Dr. D. Antonio Ruíz Reyes, además de los equipos prestados, su implicación, atención y ayuda. Gracias por el tiempo que me dedicó.

Y al Dr. D. Emilio Soler Onís, por su colaboración y trabajo.

Alex, Sara, Dácil, Rita...y mi querida familia del ajedrez, gracias por los ánimos. Basilio, muchas gracias por estar siempre cuando se te necesita.

A Julia y Mari, mis todas para una y una para todas, por la fuerza transmitida y por ser incondicionales.

A toda mi familia, por estar siempre ahí.

A mis padres y hermana, mis imprescindibles, por dónde empezar...Muchísimas gracias por haberme apoyado siempre en todo lo que hago y por confiar en mí. Porque esta tesis es fruto del esfuerzo de todos.

Soy consciente de que en estas líneas faltan muchos nombres, mas tengan por seguro que no me olvido de nadie y que siempre estarán muy presentes.

MUCHAS GRACIAS A TODOS DE CORAZÓN.

