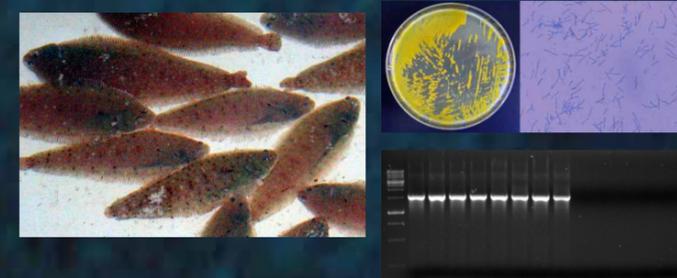




Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Genética

CARACTERIZACIÓN Y DESARROLLO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BACTERIAS ASOCIADAS A EPISODIOS DE MORTALIDAD EN PECES PLANOS

CARACTERIZACIÓN Y DESARROLLO DE MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BACTERIAS ASOCIADAS A EPISODIOS DE MORTALIDAD EN PECES PLANOS



TESIS DOCTORAL

Jose R. López Fernández



Jose R. López Fernández
Granada 2011

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Genética



Caracterización y desarrollo de métodos de diagnóstico molecular de bacterias asociadas a episodios de mortalidad en peces planos

Tesis doctoral

Jose R. López Fernández

Granada 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Jose R. López Fernández
D.L.: GR 2415-2011
ISBN: 978-84-694-2914-3

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Departamento de Genética

Caracterización y desarrollo de métodos de diagnóstico
molecular de bacterias asociadas a episodios de mortalidad
en peces planos

Memoria para optar al grado de
Doctor en Biología presentada
por **Jose R. López Fernández**

DIRECTORES:

Dr. Roberto De la Herrán Moreno
Profesor Titular Departamento de Genética
Universidad de Granada

Dr. José I. Navas Triano
Jefe del Departamento de Producción
IFAPA Centro *Agua del Pino*

Dr. Salvador Arijó Andrade
Profesor Contratado Doctor Departamento de Microbiología
Universidad de Málaga

Granada, Marzo de 2011

FINANCIACIÓN

La realización de esta tesis ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral del Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) de la Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, dentro del Programa de Formación de Personal para la Investigación y el Desarrollo Agroalimentario y Pesquero de Andalucía (Resolución de 2 de enero de 2004, BOJA nº 48 de 10 de marzo 2004), cofinanciado al 80% por el Fondo Social Europeo (FSE), dentro del Programa Operativo Integrado de Andalucía 2000-2006.

La financiación de la investigación corrió a cargo del propio IFAPA y de los grupos de investigación AGR-247 (Centro IFAPA *Agua del Pino*, Huelva) y BIO-200 (Departamento de Genética, Universidad de Granada), así como de los proyectos de investigación “Desarrollo de procedimientos para la prevención, diagnóstico y control de enfermedades bacterianas en el cultivo de la acedía (*Dicologlossa cuneata*)” (Proyecto RTA2005-00215-C03 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, INIA), cofinanciado al 70% por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y “Utilización de herramientas genéticas en la mejora del cultivo del lenguado (*Solea senegalensis*)” (Proyecto AGL2009-11872 del Ministerio de Ciencia e Innovación).



ugr

Universidad
de Granada



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA Y PESCA



Unión Europea

PUBLICACIONES

Parte de los resultados del presente trabajo están recogidos en las siguientes publicaciones:

- López JR, Balboa S, Núñez S, De la Roca E, De la Herrán R, Navas JI, Toranzo AE & Romalde JL. Characterization of *Vibrio tapetis* strains isolated from diseased cultured Wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau). *Research in Veterinary Science*. Aceptado
- López JR, Piñeiro-Vidal M, García-Lamas N, De la Herrán R, Navas JI, Hachero-Cruzado I & Santos Y. 2010. First isolation of *Tenacibaculum soleae* from diseased cultured wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau), and brill, *Scophthalmus rhombus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 33, 273-278
- López JR, Núñez S, Magariños B, Castro N, Navas JI, De la Herrán R & Toranzo AE. 2009. First isolation of *Tenacibaculum maritimum* from wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau). *Journal of Fish Diseases* 32, 603-610
- López JR, De la Roca E, Núñez S, De la Herrán R, Navas JI, Manchado M, Herrera M & Toranzo AE. 2009. Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased cultured wedge sole *Dicologlossa cuneata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 84, 209-217

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se ha presentado además la siguiente solicitud de patente:

- López JR, Sparagano OAE, Navas JI & De la Herrán R. Método de identificación de los patógenos de peces: *Photobacterium damsela*, *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum maritimum* y *Vibrio harveyi*. Solicitud P200930440. Institución solicitante: Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica.

AGRADECIMIENTOS

Tras tanto tiempo, este trabajo se acerca a su fin y es una alegría llegar a estas páginas, tanto por lo que significa el poder hacerlo, como porque me da la oportunidad de agradecer a toda la gente que me ha ayudado, de muy diversas maneras, a llegar a este momento. Cuando presenté el DEA hace unos años, fui bastante escueto en los agradecimientos y después me arrepentí, por lo que esta vez no cometeré el mismo error.

En primer lugar, me gustaría dar las gracias a José A. Guijarro Atienza, del Área de Microbiología de la Universidad de Oviedo, por ofrecerme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación, y ser uno de los mejores profesores y jefes que he conocido; a toda la gente del Laboratorio B, especialmente a Pablo y a Bea, por todas las discusiones y ayuda durante el tiempo que estuve con *Yersinia ruckeri*; a Carlos y a Fernando, del Servicio de Microscopia Electrónica de la Universidad de Oviedo, por su ayuda y los muchos momentos divertidos; y a Isabel Márquez Llano-Ponte, del SERIDA, por su manera de ser, los viajes a piscifactorías y todo lo que me enseñó trabajando con peces.

En 2004 llegó la beca del IFAPA para trabajar en el entonces CICEM *Agua del Pino*, en Huelva. En primer lugar quiero dar las gracias a José I. Navas Triano, sin el cual no hubiese habido beca ni proyectos, ni hubiese trabajado en algo tan interesante como la patología de peces planos, tanto en *Agua del Pino* como en otros centros de Andalucía. Gracias asimismo por las maratónicas correcciones a esta tesis. También dentro de *Agua del Pino*, mis más sinceras gracias a la “becaria” Victoria, imposible olvidar aquellas batallas de agua; a Jorge, Elena, Ana Rodiles, Inma y Paloma, por su ayuda desinteresada y ser tan buena gente; a Marce, Ismael y Eloy, por avisarme de los brotes que iban apareciendo y por poder contar con su ayuda siempre que la he necesitado; y a la gente de Administración, particularmente a Antonia, por su peculiar sentido del humor, por permitirme montar el laboratorio fotográfico, y por su ayuda en infinidad de pequeñas cosas.

No puedo olvidar tampoco a las muchas personas que me ayudaron e hicieron sentir como en casa durante las estancias llevadas a cabo en otros centros de investigación. Mi más profundo agradecimiento a todos ell@s:

Del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, a Miguel A. Moriñigo y Eduardo M. Manzanares, por acogerme en su laboratorio; muy especialmente, a Salvador Arijó Andrade, Salva, por descubrirme las teterías, y aceptar ser director de esta tesis; y, naturalmente, a Juanma, Rosa y Silvana, por las discusiones teológicas, por el *Mamma Mia*, y

por los muchos momentos divertidos en el laboratorio, tras esta cómo no iba querer hacer más estancias.

Del IFAPA Centro *El Toruño*, en Cádiz, en primer lugar a Manuel Manchado, por ofrecerme realizar una estancia que sería de lo más útil; a Bea, Mayi, Eugenia y Gaetano Catanese, por su ayuda y compañía en el día a día, fue un placer.

De la Universidad de Newcastle, en Reino Unido, de forma muy especial a Olivier A.E. Sparagano, por su interés en el desarrollo de este trabajo, por su ánimo colaborador siempre presente, y por disculpar mi inglés; a Brian Brown y Carlos de Luna, por su amabilidad en todo momento; y especialmente a Narut, por su ayuda con las RLB, los viajes por Escocia e Inglaterra y los desayunos ingleses, sin duda estos fueron de los mejores meses de esta tesis.

Del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela, a Alicia E. Toranzo, Jesús L. Romalde e Ysabel Santos, por permitirme realizar unas estancias sin las cuales esta tesis hubiese sido otra; a toda la gente que me ayudó, de la que aprendí tanto y con quien estoy en deuda: Sol, Ana, Sabela, Ale, Bea, Nuria, Susana, Maxi y Juan Barja.

En el Departamento de Genética de la Universidad de Granada, en fin, no hubo una estancia, sino una, luego otra, luego otra, ya no llevo la cuenta, y que siga. Quiero agradecer en primer lugar a Roberto de la Herrán, por su ayuda en múltiples aspectos desde que vine aquí por primera vez, por aguantar mis avalanchas de dudas al principio, mi tesis al final, y por ser tan buena gente, gracias mil; a Manuel Ruiz Rejón y a Carmelo Ruiz Rejón, por su interés en el desarrollo de esta tesis y meterme prisa; y muchas, muchas gracias a Chuchi, Belen, Mounim, Esther, Alejandra, Pedro, Inma, Paqui y Rafa, por su ayuda siempre que la he necesitado, por enseñarme tantas cosas y por el buen rollo que hay en el laboratorio.

Quiero dar también las gracias de una forma muy especial a quienes desde fuera del laboratorio han creado las condiciones para que esto siguiese adelante. A mis amigos de Gijón, Jose Alberto, Amador, Dani, Jose Luís, Fer, Jorge, Félix, Jon, Lago y Vila, por tantas cosas *legendarias*, olvidables y manifiestamente olvidables, pasadas juntos. Esto hay que celebrarlo con unas sidras! A los mejores compañeros de piso que he podido tener, Samir, Munir, Omar e Hicham, por todos los cuscús, botes de comino y partidas del *Panzer* compartidas. A mi familia, especialmente a Lore, a mis hermanos Edu y Lara, y naturalmente a Espi.

Y por ultimo, a mis padres, por su cariño, por nuestras peleas, por su apoyo, por todo, si los padres pueden estar orgullosos de sus hijos, también los hijos de sus padres. A la abuela de Barres, se que estarías feliz por esto, no te olvido nunca. Y especialmente, a Ana, por su pico, por Plaza de Armas, y por infinidad de cosas del día a día reflejo de su ayuda, cariño y apoyo constantes, ofrecidos incluso en las condiciones más difíciles que se pueden pasar, te quiero *mia*.

A mis padres

A la abuela de Barres

A Ana

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS UTILIZADOS

A	Adenina	ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)
ADH	Test arginina dihidrolasa		
ADN	Ácido desoxirribonucleico		
ADNr	ADN ribosómico	ERIC	Secuencias intergénicas repetitivas de enterobacterias (enterobacterial repetitive intergenic consensus)
AFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados (amplified fragment length polymorphism)	FAME	Ésteres metílicos de ácidos grasos (fatty acid methyl ester)
AN	Agar nutritivo	FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
APROMAR	Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España	fg	Femtogramo
ARN	Ácido ribonucleico	FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i> (fluorescent <i>in situ</i> hybridization)
ARNr	ARN ribosómico	FMM	Medio <i>Flexibacter maritimum</i> (<i>Flexibacter maritimus</i> medium)
ARNasaA	Ribonucleasa A	FPC	Fish Pathogen Collection, Japón
ATCC	American Type Culture Collection, EUA	g	Gramo
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato	G	Guanina
BCRC	Bioresources Collection and Research Center, Taiwan	h	Hora
BSA	Albúmina de suero bovino	H ₂ S (test)	Producción de ácido sulfhídrico
BUG	Medio de cultivo universal (universal growth media)	IAM	IAM Culture Collection, Japón
C	Citosina	IFAPA	Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica
°C	Grados centígrados	IFO	Institute for Fermentation, Osaka, Japón
CAIM	Collection of Aquatic Important Microorganisms, Mexico	IFREMER	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, Francia
CCUG	Culture Collection, University of Göteborg, Suecia	IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactósido
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo, España	ITS	Espaciador transcrito intergénico (internal transcribed spacer)
CFPB	Collection Francaise des Bacteries Phytopathogenes, Francia	JCM	Japan Collection of Microorganisms, Japón
CIP	Collection of Institut Pasteur, Francia	Kb	Kilobases
cm	Centímetro	Kg	Kilogramo
dATP	Adenina trifosfato	KACC	Korean Agricultural Culture Collection, Corea
dCTP	Citosina trifosfato	KCCM	Korean Culture Center of Microorganisms, Corea
DDE	Días después de la eclosión	KCTC	Korean Collection for Type Cultures, Corea
dGTP	Guanina trifosfato	KMM	Collection of Marine Microorganisms, Rusia
DL ₅₀	Dosis letal 50	l	Litro
DMSO	Dimetil sulfóxido	LB	Medio de cultivo Luria Bertani
DNA	Ácido desoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)	LD ₅₀	Dosis letal 50 (letal dosis 50)
dNTPs	Desoxi-nucleósidos-trifosfato	LDC	Test lisina decarboxilasa
DSM/	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Alemania	LMG	Laboratorium voor Microbiologie-Bacteriëverzameling, Universiteit Gent, Bélgica
DSMZ			
dTTP	Timina trifosfato		
dUTP	Uracilo trifosfato		
ECL	Electroquimioluminiscencia (electrochemiluminescence)		
EDAC	1-ethyl-3 (3-dimethylaminopropyl) carbodiimine		
EDTA	Ácido etilen diamino tetraacético (ethylenediaminetetraacetic acid)		

LPS	Lipopolisacárido	sp. nov	Species novum
M	Concentración molar (moles/litro)	SS	Solución salina
MAFF	Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japón	SSPE	Tampón salino de sodio-fosfato-EDTA (saline sodium phosphate EDTA)
MBIC	Marine Biotechnology Institute Culture Collection, Japón	t	Tonelada
mg	Miligramo	T	Timina
min	Minuto	Taq	Polimerasa de ADN de <i>Thermus aquaticus</i>
MilliQ	Agua ultrapura	TBE	Tris-borato-EDTA
ml	Militro	TBS	Tampón Tris-salino (Tris-buffered saline)
MLSA	Análisis de secuencias multilocus (multilocus sequence analysis)	TCBS	Medio tiosulfato-citrato-bilis-sacarosa
mM	Milimolar	TE	Tampón Tris-EDTA
MTCC	Microbial Type Culture Collection and Gene Bank, India	Tm	Temperatura de fusión (melting temperature)
NBT	Azul de tetrazolium (nitroblue tetrazolium)	Tris	2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol
NCIMB	National Collection of Industrial, food and Marine Bacteria, Reino Unido	TSA	Agar tripticasa-soja (tryptic soy agar)
NCMB	National Collection of Marine Bacteria, Reino Unido	TSA-SW	TSA hecho con agua de mar
NCPPB	National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Reino Unido	TSA-2	TSA suplementado con 2% de NaCl
ng	Nanogramo	TTBS	TBS + tween 20
nm	Nanometro	U	Unidad de enzima
nM	Nanomolar	µg	Microgramo
NO ₃ (test)	Test de reducción de nitratos en nitritos	µl	Microlitro
N ₂ (test)	Test de desnitrificación	µm	Micrómetro o micra
ODC	Test ornitina decarboxilasa	µM	Micromolar
OF	Test oxidativo-fermentativo	UFC	Unidades formadoras de colonia
ONPG	Test beta-galactosidasa (orto-nitrofenilgalactopiranosido)	UPGMA	Método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada (unweighted pair group method analysis)
PB	Tampón fosfato (phosphate buffer)	USD	Dólar estadounidense
pb	Pares de bases	UV	Ultravioleta
PBS	Tampón fosfato salino (phosphate buffered saline)	VP	Test Voges-Proskauer
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)	X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido
PDDC (ICMP)	International Collection of Microorganisms from Plants, Nueva Zelanda	ZOF	Medio OF para bacterias marinas (ZoBell-based oxidation fermentation)
pg	Picogramo	Símbolos utilizados en las tablas*	
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimorfo (random amplification of polymorphic DNA)	+	Positivo
REP	Elementos extragénicos palindrómicos repetitivos (repetitive extragenic palindromic)	-	Negativo
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (restriction fragment length polymorphism)	(+)	Positivo débil
RIMD	Research Institute for Microbial Diseases, Japón	α	Alfa hemólisis
RLB	Hibridación reversa en línea (reverse line blot)	β	Beta hemólisis
rpm	Revoluciones por minuto	a	Colonia amarilla en medio TCBS
s	Segundo	d	Discrepancias entre distintos autores
SDS	Dodecil sulfato sódico (sodium dodecyl sulfate)	F	Fermentativo
SOC	Medio de cultivo súper óptimo con represión catabólica (super optimal broth with catabolite repression)	ND	No hay datos disponibles / No determinado
		O	Oxidativo
		S	Sensible
		R	Resistente
		v	Colonia verde en medio TCBS
		V	Resultado variable
		V+	Resultado variable pero generalmente positivo
		V-	Resultado variable pero generalmente negativo

* Salvo que se indique otra cosa

RESUMEN / ABSTRACT

La acuicultura es una industria emergente que, habiendo experimentado un gran crecimiento en los últimos años, presenta retos para su desarrollo como la introducción de nuevas especies de cultivo y el control de una de las principales causas de pérdidas económicas, las enfermedades de origen bacteriano. Este trabajo se centra en el estudio de los episodios de mortalidad ocurridos en distintas fases del cultivo de tres especies de peces planos de alto valor comercial y potenciales candidatos para la diversificación de la acuicultura marina en España, la acedía (*Dicologlossa cuneata*), el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) y el rombo (*Scophthalmus rhombus*). Los objetivos perseguidos fueron la identificación de las especies bacterianas implicadas en las mortalidades, la evaluación de su grado de virulencia y el desarrollo de métodos basados en la PCR que permitan su rápida identificación. Los cultivos de acedía y lenguado senegalés presentaron un alto número de episodios de mortalidad, constituyendo las patologías un serio factor limitante para el cultivo. Por el contrario, en rombo los episodios con mortalidades significativas fueron escasos. Los aislados obtenidos a partir de estos brotes abarcan ocho géneros distintos, siendo *Vibrio* el dominante tanto en número como en diversidad. En total se detectaron cinco especies patógenas, cuatro de las cuales fueron identificadas como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* y *Vibrio harveyi*, mientras que la quinta constituye una nueva especie de *Pseudomonas*, para la que se propone el nombre de *Pseudomonas baetica* sp. nov. La detección de estas especies patógenas permite explicar la mayor parte de los brotes estudiados, excepto los ocurridos en larvas. El grado de virulencia observado fue mayor en las tres primeras especies mencionadas, mientras que las más prevalentes fueron *T. soleae* y *V. harveyi*, apareciendo en un mayor número de brotes y de especies hospedadoras. Por último, se ha desarrollado un método de diagnóstico de *T. soleae* mediante PCR con cebadores específicos, y un método que permite la identificación simultánea de *P. damsela*, *P. baetica*, *T. maritimum*, *T. soleae* y *V. harveyi* a partir de cultivos puros, mediante hibridación RLB con sondas de ADN específicas.

Aquaculture is an emerging industry which has undergone strong growth during recent years. However, issues such as the introduction of new culture species for diversification, and the control of bacterial fish diseases, which constitute one of the main causes of economic losses, still pose major challenges. This work focuses on mortality outbreaks during the different life stages in the culture of three economically valuable flatfish species, meant to diversify marine aquaculture in Spain: wedge sole (*Dicologlossa cuneata*), Senegalese sole

(*Solea senegalensis*) and brill (*Scophthalmus rhombus*). The main objectives of the present study were to determine which bacterial species were involved in the mortalities, to evaluate the virulence, and to develop quick molecular identification methods based on the PCR. Wedge sole and Senegalese sole cultures registered numerous mortality outbreaks, being the pathology the main limiting factor for its culture. Contrary, the brill cultures registered scarce outbreaks. The isolates obtained from these outbreaks belong to eight different genera, being *Vibrio* the dominant both in number and diversity. Only five of the detected species were proved to be pathogens. Four of them were identified as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae* and *Vibrio harveyi*, while the fifth, is a novel *Pseudomonas* species, for which the name *Pseudomonas baetica* sp. nov. is proposed. The presence of these pathogens allowed to explain the majority of the mortality outbreaks, except those that affected larvae. Virulence degree was higher in the first three pathogens, while *T. soleae* and *V. harveyi* were the most prevalent, appearing in a higher number of outbreaks and host species. Finally, we have developed a specific PCR protocol for *T. soleae* diagnosis and a reverse line blot hybridization (RLB) assay that allows simultaneous identification of pure cultures of *P. damsela*, *P. baetica*, *T. maritimum*, *T. soleae* and *V. harveyi*.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La acuicultura en España y en el mundo	3
▪ Historia y situación actual de la acuicultura	3
▪ La acuicultura en España	4
1.2. El cultivo de peces planos	5
1.3. Enfermedades infecciosas y parasitarias que afectan al cultivo de peces planos	8
▪ Enfermedades de etiología no bacteriana	12
▪ Enfermedades de etiología bacteriana	15
- <i>Tenacibaculum maritimum</i>	16
- <i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	18
- <i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	19
- <i>Listonella anguillarum</i>	19
- <i>Vibrio harveyi</i>	20
- <i>Vibrio tapetis</i>	21
- <i>Photobacterium damsela</i>	22
- <i>Edwardsiella tarda</i>	23
- <i>Streptococcus</i> spp.	23
- <i>Mycobacterium marinum</i>	24
▪ Enfermedades de etiología desconocida	24
1.4. Taxonomía bacteriana. Clasificación e identificación de bacterias patógenas de peces	25
▪ Métodos fenotípicos	26
- Métodos fenotípicos clásicos y sistemas miniaturizados	26
- Métodos serológicos	28
- Métodos quimiotaconómicos	28
- Análisis de proteínas totales	29
▪ Métodos genotípicos	29
- Determinación del porcentaje guanina citosina (G+C)	30
- Hibridación ADN-ADN	30
- Análisis comparativo de secuencias de ADN	31
- Métodos de tipificación genotípicos	33
- Identificación mediante PCR con cebadores específicos	34
- Métodos basados en la utilización de sondas de ADN	35
2. OBJETIVOS	37
3. MATERIAL Y MÉTODOS	41
3.1. Aislamiento de bacterias asociadas a episodios de mortalidad	43

▪ Muestras	43
▪ Aislamiento de bacterias asociadas a episodios de mortalidad	43
3.2. Establecimiento de fenones y evaluación de la virulencia	44
▪ Establecimiento de fenones	44
▪ Evaluación de la virulencia	44
3.3. Identificación y caracterización de los fenones	46
▪ Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	46
▪ Caracterización fenotípica	46
▪ Caracterización serológica	55
▪ Secuenciación de genes ribosómicos y “housekeeping”. Análisis filogenético	57
▪ Identificación mediante PCR con cebadores específicos	61
▪ Hibridación ADN-ADN	62
3.4. Desarrollo de métodos moleculares de identificación basados en la PCR	67
▪ Análisis de la región ITS1	67
▪ Desarrollo de un protocolo de identificación y detección de <i>Tenacibaculum soleae</i> mediante PCR	71
▪ Desarrollo de un protocolo de identificación de <i>Tenacibaculum soleae</i> , <i>Tenacibaculum maritimum</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Photobacterium damsela</i> y <i>Pseudomonas baetica</i> mediante hibridación RLB	74
4. RESULTADOS	81
4.1. Aislamiento de bacterias asociadas a episodios de mortalidad	83
4.2. Establecimiento de fenones y evaluación de la virulencia	89
▪ Establecimiento de fenones	89
▪ Evaluación de la virulencia	91
4.3. Identificación y caracterización de los fenones	94
▪ Caracterización fenotípica y genotípica de los fenones	94
▪ Género <i>Aliivibrio</i>	100
- Fenón G54 (<i>Aliivibrio</i> sp.)	101
▪ Género <i>Photobacterium</i>	103
- Fenón G185 (<i>Photobacterium</i> sp.)	103
- Fenón G197 (<i>Photobacterium</i> sp.)	105
- Fenón G321 (<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>)	107
▪ Género <i>Polaribacter</i>	112
- Fenón G500 (<i>Polaribacter</i> sp.)	112
▪ Género <i>Pseudoalteromonas</i>	114
- Fenón G1 (<i>Pseudoalteromonas</i> spp.)	115
▪ Género <i>Pseudomonas</i>	119
- Fenón G390 (<i>Pseudomonas baetica</i> sp. nov.)	119
▪ Género <i>Psychrobacter</i>	130
- Fenón G328 (<i>Psychrobacter</i> sp.)	130

▪ Género <i>Tenacibaculum</i>	133
- Fenón G47 (<i>Tenacibaculum soleae</i>)	133
- Fenón G443 (<i>Tenacibaculum maritimum</i>)	138
- Cepa a3 (<i>Tenacibaculum</i> sp.)	143
▪ Género <i>Vibrio</i>	144
- Fenón G7 (<i>Vibrio</i> sp.)	144
- Fenón G29 (<i>Vibrio</i> sp.)	148
- Fenón G35 (<i>Vibrio</i> sp.)	151
- Fenón G91 (<i>Vibrio harveyi</i>)	155
- Fenón G107 (<i>Vibrio</i> spp.)	161
- Fenón G148 (<i>Vibrio</i> sp.)	164
- Fenón G241 (<i>Vibrio</i> sp.)	167
- Fenón G255 (<i>Vibrio tapetis</i>)	171
- Fenón G256 (<i>Vibrio</i> sp.)	174
- Otras cepas del género <i>Vibrio</i>	178
4.4. Composición de la microbiota asociada a mortalidades	180
4.5. Desarrollo de métodos moleculares de identificación basados en la PCR	186
▪ Análisis de la región ITS1	186
- Amplificación de la región ITS1	187
- Análisis de las secuencias ITS1	187
- Análisis filogenético basado en las secuencias ITS1	191
▪ Desarrollo de un protocolo de identificación y detección de <i>Tenacibaculum soleae</i> mediante PCR	199
- Diseño de cebadores y optimización del protocolo de PCR	199
- Especificidad y sensibilidad	200
- Detección de <i>T. soleae</i> en tejidos de peces infectados naturalmente	202
▪ Desarrollo de un protocolo de identificación de <i>Tenacibaculum soleae</i> , <i>Tenacibaculum maritimum</i> , <i>Vibrio harveyi</i> , <i>Photobacterium damsela</i> y <i>Pseudomonas baetica</i> mediante hibridación RLB	203
- Diseño de sondas	203
- Especificidad y sensibilidad	204
- Aplicabilidad en tejidos de peces infectados de forma natural	205
5. DISCUSIÓN	209
▪ Contexto y objetivos	211
▪ Taxones bacterianos encontrados asociados a episodios de mortalidad	211
▪ Evaluación de la virulencia de los aislados	213
▪ Patógenos bacterianos asociados al cultivo de acedía	215
- Mortalidad en larvas	216
- Mortalidad en alevines y juveniles	218
- Mortalidad en adultos	220
▪ Patógenos bacterianos asociados al cultivo de lenguado senegalés	221
▪ Patógenos bacterianos asociados al cultivo de rombo	221
▪ Epizootiología de los patógenos encontrados	222
▪ Métodos de identificación utilizados	226
▪ Análisis de la región ITS1	229

▪ Desarrollo de métodos moleculares de identificación basados en la PCR	231
6. CONCLUSIONES	235
7. BIBLIOGRAFÍA	241
8. ANEXOS	283
Anexo I. Medios de cultivo, reactivos y tampones utilizados	
Anexo II. Datos de aislamiento	
Anexo III. Caracterización fenotípica preliminar	
Anexo IV. Perfiles de utilización de fuentes de carbono con el sistema BIOLOG	
Anexo V. Secuencias obtenidas en este trabajo	
Anexo VI. Porcentajes de identidad obtenidos utilizando el programa BLAST	
Anexo VII. Descripción de <i>Pseudomonas baetica</i> sp. nov.	

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA ACUICULTURA EN ESPAÑA Y EN EL MUNDO

▪ Historia y situación actual de la acuicultura

La acuicultura es el conjunto de actividades, técnicas y conocimientos de cultivo que tienen por objeto la producción de organismos acuáticos, animales o vegetales, de aguas dulces, salobres o saladas. Las referencias más antiguas a la acuicultura se remontan a la antigua China, donde ya en el -3.500 se realizaba “piscicultura de engorde” en estanques y donde, en el año -475, Fan-Li publicó el primer “tratado de piscicultura”, para el cultivo de carpa (Orvay 1993, Vallejo & González-Posada 2007). En distintas civilizaciones del mundo antiguo (Egipto, Grecia, Roma y en varias zonas de Asia) se encuentran también numerosas referencias. Aristóteles habla ya del cultivo de ostras en Grecia, y Plinio atribuye al general romano Lucinius Murena el invento de las piscinas en la que se cultivan peces, a las que se refiere Séneca como “nuestros estanques de peces, esos recintos diseñados para proteger la glotonería de las gentes del riesgo de enfrentarse a las tormentas” (Vallejo & González-Posada 2007). Durante la Edad Media en Europa, las instalaciones acuícolas, alimentadas por cauces fluviales, aparecen generalmente asociadas a conventos y abadías del interior, quizás debido a la necesidad de pescado fresco de los clérigos durante la Cuaresma.

A partir de mediados del siglo XVIII se publican en Europa distintos trabajos sobre fecundación artificial de huevos de salmónidos (el del austriaco Jacobi es el primero, en 1758), y hacia finales del siglo XIX se puede ya hablar de una piscicultura completa, al conseguirse la reproducción en cautividad de la trucha. Será sin embargo en Japón, a partir de los trabajos de Hudinaga en 1934, donde se sienten las bases técnicas de la producción a gran escala de la acuicultura moderna y donde se demuestre la posibilidad de cría de especies marinas. Con todo, no será hasta después de la Segunda Guerra Mundial cuando se pueda hablar con propiedad de la existencia de una acuicultura marina de producción, con mejoras en las técnicas de reproducción controlada y el engorde de larvas y alevines con piensos compuestos y equilibrados (Orvay 1993; Vallejo & González-Posada 2007).

Desde estos comienzos hasta nuestros días la acuicultura ha experimentado una expansión espectacular, pasando la producción mundial de 0,6 millones de toneladas en 1950 a más de 65 millones en 2007, mientras que el suministro per capita ha aumentado de los 0,7 kg en 1970 a los 7,8 kg en 2006 (FAO 2008, APROMAR 2009). Es el sector de producción de alimentos de origen animal que más rápidamente crece, a un ritmo mayor que la población, por lo que la FAO considera que tiene un importante papel que jugar en la erradicación del hambre y de la pobreza. Por otro lado, mientras que la producción de pesca de captura dejó de crecer a mediados de la década de 1980 debido a la sobreexplotación de las poblaciones, y es posible

que haya alcanzado su potencial máximo, el sector acuícola ha mantenido un ritmo de crecimiento medio anual desde 1970 de cerca del 9% en todo el mundo. En 2006, la acuicultura proporcionó el 47% del suministro mundial de pescado para alimentación (en 1970 representaba solo el 6%), y se espera que acabe superando a la pesca de captura. En lo que respecta a la composición en volumen, la producción acuícola mundial en 2006 estaba constituida principalmente por peces de agua dulce (54%), moluscos (27%) y crustáceos (9%), representando los peces marinos únicamente el 3% del volumen total. No obstante, estos últimos representaban el 8% en valor, frente al 37% de los peces de agua dulce. En cuanto a la producción por áreas geográficas, la acuicultura mundial está liderada por la región de Asia y el Pacífico, que aporta el 89% de la producción total, siendo China, por mucho, el principal productor (el 67% de la producción mundial), seguido de lejos por India, Vietnam, Indonesia, Tailandia, Bangladesh, Noruega, Chile, Japón y Filipinas (FAO 2008).

▪ **La acuicultura en España**

Como en otros países, la acuicultura en España inicia su desarrollo en la segunda mitad del siglo XIX, apareciendo la primera piscifactoría, dedicada a la producción de trucha común, en Aragón en 1866. A niveles comerciales no se llegará, sin embargo, hasta bien entrado el siglo XX. El cultivo del mejillón en batea se inicia en Galicia en los años 40, y la acuicultura continental, principalmente el cultivo de trucha, en los años 60. La acuicultura en los esteros de Cádiz, iniciada al entrar la industria salinera local en crisis, experimentará un gran desarrollo, al igual que los otros dos sectores, en los años 70. La acuicultura marina se consolidará definitivamente en los años 80 y 90, con una mayor industrialización e incorporando nuevas especies, como el rodaballo en el norte y la dorada y lubina en el sur, levante y Canarias (Vallejo & González-Posada 2007).

En la actualidad España es el segundo productor de acuicultura de Europa, solo por detrás de Noruega, habiendo pasado de una producción de 2.100 toneladas en 1950 a una de más de 281.200 toneladas en 2007, con un valor de 384.100 USD y representando el 25% de la producción pesquera. A nivel mundial, España ocupaba en 2007 la posición 17ª en cuanto a volumen, y el puesto 28º por valor, situándose por debajo de países con volúmenes de producción mucho menores (Reino Unido produjo unas 174.000 t con un valor de 927.000 USD, obteniendo países como Ecuador o Canadá resultados parecidos). Esto probablemente se debe a que aunque parte de la producción la constituyen peces de aleta de gran valor, una parte muy importante está constituida por moluscos de precio relativamente bajo. En 2007, de la producción total el 77,4% correspondió a moluscos (principalmente mejillón), el 11,9% a peces

marinos (principalmente dorada, lubina y rodaballo) y el 8,49% a peces continentales (principalmente trucha arcoíris).

La producción de peces marinos, aunque aún baja, está experimentando un gran crecimiento en los últimos años. Las principales especies cultivadas son el rodaballo, lenguado, abadejo y besugo en el norte y dorada, lubina, lenguado y corvina en la zona mediterránea y suratlántica. En la zona de levante también se da el engorde, sin resolver la reproducción, de anguila y atún rojo (Vallejo & González-Posada 2007, FAO 2008, APROMAR 2009). Por comunidades autónomas, en 2009 Galicia fue la principal productora de rodaballo (a nivel mundial), lenguado, besugo y abadejo; la producción de dorada y anguila estuvo liderada por la Comunidad Valenciana, la de lubina por Canarias y la de corvina y atún rojo por Murcia (APROMAR 2009).

1.2. EL CULTIVO DE PECES PLANOS

Los peces planos o pleuronectiformes son un orden de peces teleosteos, caracterizado por presentar un cuerpo muy comprimido lateralmente (aplanado) y asimétrico en los adultos. Las larvas nacen con simetría bilateral, pero durante la fase larvaria se produce la migración de un ojo a la otra cara del cráneo (metamorfosis), quedando en los adultos los ojos en el costado superior (según la familia puede ser el izquierdo o el derecho). En la mayor parte de las especies los adultos presentan aletas dorsales y anales amplias, alcanzando la primera el neurocráneo, y no suelen presentar vejiga natatoria. El orden incluye 15 familias, con unas 716 especies, la mayor parte de ellas marinas.

El interés en el desarrollo de técnicas de cultivo de peces planos en Europa data de finales del siglo XIX, cuando las técnicas utilizadas para la fertilización artificial de huevos de salmónidos se aplicaron con éxito a los peces marinos. En aquel momento el objetivo perseguido era obtener huevos y larvas con los que recuperar los caladeros, sin embargo los intentos de sacar adelante larvas después de que agotasen el vitelo fueron en su mayoría infructuosos. Una excepción fue el caso de Fabre-Domerque y Biérix (1905), que lograron criar larvas de lenguado común (*Solea solea*) con alimentación exógena, sin embargo, muy pocas de ellas llegaron a la metamorfosis. El principal obstáculo seguía siendo la no existencia de un alimento apropiado para esta fase, cuando Rollefsen (1939) descubrió que las larvas de solla (*Pleuronectes platessa*) podían alimentarse con larvas de *Artemia salina*. Sin embargo, no será hasta después de la Segunda Guerra Mundial cuando Shelbourne (1964), basándose en estos trabajos, desarrolle técnicas de cultivo para la solla y el lenguado común, quedando demostrada por primera vez la viabilidad del cultivo de especies marinas, incluyendo la fase larvaria.

A partir de los trabajos de Shelbourne se han dado importantes avances que han permitido el cultivo a nivel comercial de varias especies de peces planos. No obstante, hay distintas etapas en el cultivo que pueden presentar altas tasas de mortalidad, constituyendo auténticos “cuellos de botella” en la producción de ciertas especies.

Tras la eclosión del huevo, las larvas de peces planos poseen simetría bilateral, son de vida pelágica, y se alimentan únicamente del vitelo, ya que poseen un tracto digestivo indiferenciado y la boca aún está cerrada. El comienzo de la alimentación exógena, 1-5 días después de la eclosión (DDE), tras la apertura de la boca y el agotamiento de las reservas vitelinas, es una fase problemática en el cultivo de algunas especies de peces planos, pudiendo provocar altas mortalidades (Mangor-Jensen *et al.* 1998, Yúfera & Darias 2007). La alimentación de las larvas consiste básicamente en dos presas vivas, inicialmente rotíferos y posteriormente artemias, ambas nutricionalmente pobres.

El proceso de metamorfosis, durante el cual la larva sufre cambios fisiológicos y morfológicos como la migración del ojo o la transformación de la aleta caudal de heterocerca a homocerca, marca el final de la etapa larvaria, resultando en un alevín de vida bentónica y sin simetría bilateral, con todos los caracteres morfológicos propios del pez adulto. La edad de inicio y la duración de la metamorfosis varía según la especie. Como ejemplo, en la acedía (*Dicologlossa cuneata*) se inicia entre los 21-30 DDE, tardando en completarse entre 4 y 5 días (Herrera 2008). La metamorfosis suele estar asociada a periodos de baja eficiencia en la alimentación y a la aparición de altas tasas de mortalidad (Geffen *et al.* 2007, Herrera 2008).

Otra fase importante es la de destete, que supone la transición desde una alimentación con presas vivas a otra inerte (piensos), menos atractiva para la larva. La fase de destete generalmente conlleva altas tasas de mortalidad, pudiendo suponer un grave inconveniente. Una estrategia para evitar esto consiste en la co-alimentación, donde se suministra presa viva y alimento inerte antes de suministrar definitivamente solo este último. En la acedía este periodo dura unos 10 días, iniciándose entre el 30-40 DDE (Cañavate & Fernández-Díaz, 1999, Herrera 2008). Otro problema importante, que afecta a todas las fases del cultivo incluida la de engorde, es la aparición de patologías, que pueden llegar a constituir un serio factor limitante en el cultivo de ciertas especies como el lenguado (Padrós *et al.* 2003, Toranzo *et al.* 2003, Cañavate 2005).

A pesar de las dificultades señaladas, el cultivo de peces planos a nivel mundial ha aumentado en los últimos años, pasando de una producción de 33.445 t en 1998 a las 126.500 t en 2007, constituyendo además uno de los grupos de especies con mayor valor comercial. En 2007, su valor (5.555 USD/t) superó el de todos los demás grupos de especies de acuicultura a excepción de tres (peces demersales, túnidos y langostas) (FAO 2007). Fuera de Europa, las principales especies cultivadas son la platija japonesa o hirame (*Paralichthys olivaceus*), en

Japón y Corea, y la platija de verano (*Paralichthys dentatus*) y el halibut atlántico o fletán (*Hippoglossus hippoglossus*), una especie cuyos caladeros han sido sobreexplotados hasta el punto de ponerla en riesgo de extinción, en América del Norte. En Europa el cultivo está dominado por el rodaballo (*Scophthalmus maximus*) y el halibut atlántico, no obstante también se producen pequeñas cantidades de otras especies como la platija (*Platichthys flesus*), la solla (*Pleuronectes platessa*) o el lenguado (*Solea senegalensis*, *Solea solea*).

En este contexto de una acuicultura marina dominada por unas pocas especies (en España como se ha visto solo se cultivan integralmente a gran escala dorada, lubina y rodaballo), es preciso el desarrollo de sistemas de cultivo integrales de especies autóctonas de interés comercial que permitan la extensión y diversificación del sector. Con este fin, en el IFAPA Centro *Agua del Pino* (Huelva), dependiente de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, se instaló en 2002 una planta piloto para el acondicionamiento y cultivo de las tres especies de pleuronectiformes en las que se basa este trabajo: la acedía (*Dicologlossa cuneata*), el rombo (*Scophthalmus rhombus*) y el lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), todas ellas especies comerciales de alto valor típicas en el litoral andaluz (Herrera *et al.* 2003).

La acedía (Figura 1A) es un pleuronectiforme perteneciente a la familia *Soleidae*, de unos 30 cm de longitud, con una distribución que va desde el Golfo de Vizcaya hasta las costas de Sudáfrica, estando presente también en algunas zonas del Mar Mediterráneo (Miller & Loates 1999, Herrera 2008). En Europa los mayores caladeros están en la Bahía de Vizcaya, el estuario del Tajo y el Golfo de Cádiz. Su valor comercial es alto, pero las capturas sufrieron un importante descenso a finales del siglo XX (en Andalucía se redujeron un 92% entre 1997 y 2000, manteniéndose desde entonces en torno al 8-10% de las correspondientes a 1985), probablemente debido a la ruptura de un acuerdo de pesca que permitía faenar a los barcos españoles en aguas nacionales de Marruecos (Herrera 2008). En lo que respecta a su idoneidad para su introducción en la acuicultura marina a nivel comercial, los resultados obtenidos en el cultivo experimental en el IFAPA Centro *Agua del Pino* han sido en general buenos, aunque también se han dado aspectos negativos. La acedía parece adaptarse bien a cautividad, muestra una alta fecundidad y los resultados de otros parámetros de producción como supervivencia y tasa de crecimiento no difieren en gran medida de los observados en otros peces planos cultivados. Durante el cultivo larvario, las mayores mortalidades se dan entre los 0-5 y 20-25 DDE, coincidiendo con el comienzo de la alimentación exógena y con la realización de la metamorfosis, respectivamente. Por el contrario, la fase de destete no parece ser un “cuello de botella” para su cultivo. Larvas y alevines presentan canibalismo y necrofagia, quizás debido a la gran diferencia de tamaño que se da entre peces de la misma edad. El principal problema, sin embargo, lo constituye la alta incidencia de patologías, que provocan altas mortalidades y la pérdida de lotes enteros de peces (Herrera 2008, Herrera *et al.* 2008).

El rombo (Figura 1B), también llamado coruxo, parracho o remol, pertenece a la familia *Scophthalmidae*. Muy parecido al rodaballo, se diferencia de este por no presentar tubérculos óseos y por su menor tamaño (hasta 75 cm). Su distribución geográfica incluye toda la costa europea desde el Mar del Norte hasta el Mediterráneo (Miller & Loates 1999). Los estudios para su cultivo a gran escala comenzaron en los años 70, sin embargo los malos resultados obtenidos en comparación con el rodaballo hicieron que los esfuerzos se centrasen en esta última especie (Jones 1972). No obstante, es una especie atractiva para la diversificación de la acuicultura marina en la zona suratlántica europea pues está bien adaptada a climas cálidos, crece rápidamente, y posee un alto precio de mercado, siendo además sus capturas escasas (Hachero 2008). Por lo que respecta a su cultivo en cautividad, se han obtenido resultados satisfactorios en lo que a reproducción y engorde se refiere. Sin embargo, el cultivo larvario supone en estos momentos un importante cuello de botella, al producirse altas mortalidades a partir del momento en que las larvas agotan las reservas vitelinas (Hachero *et al.* 2005, Hachero 2008).

Por último, el lenguado senegalés (Figura 1C) pertenece, al igual que la acedía, a la familia *Soleidae*, pero alcanza una talla mayor (60 cm). Su distribución va desde el Golfo de Vizcaya hasta las costas de Senegal, estando también presente en algunas zonas del Mar Mediterráneo. Los trabajos para conseguir su producción a nivel comercial empezaron en España y Portugal en los años 80 (Rodríguez 1984, Dinis *et al.* 1999), siendo hoy día posible desarrollar su ciclo biológico completo. Sin embargo, no es posible afirmar que en estos momentos el lenguado senegalés sea una especie consolidada a nivel de producción industrial, fundamentalmente debido a la alta incidencia de patologías, en muchos casos oportunistas, que les afecta, sobre todo en las fases de preengorde y engorde (Imslund *et al.* 2003, Padrós *et al.* 2003, Toranzo *et al.* 2003, Cañavate 2005). Con todo, en los últimos años su producción ha aumentado significativamente, pasando de 75 a 316 toneladas entre 2004 y 2008. En 2009 se produjeron un total de 421 toneladas, la mayor parte en Galicia (400 t), con producciones menores en Canarias (20 t) y en Andalucía (1 t) (APROMAR 2009).

1.3. ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y PARASITARIAS QUE AFECTAN AL CULTIVO DE PECES PLANOS

Las enfermedades constituyen la principal fuente de pérdidas económicas en la acuicultura, superando de lejos las causadas por otros problemas como la mortalidad por cambios bruscos de la concentración de oxígeno, contaminación química, predación, robos, etc.

Por enfermedad se entiende una alteración del estado de salud de un organismo, producida por unas causas concretas (etiología), que se traduce en la aparición de síntomas característicos (anomalías en el comportamiento, fisiología o en la integridad corporal por

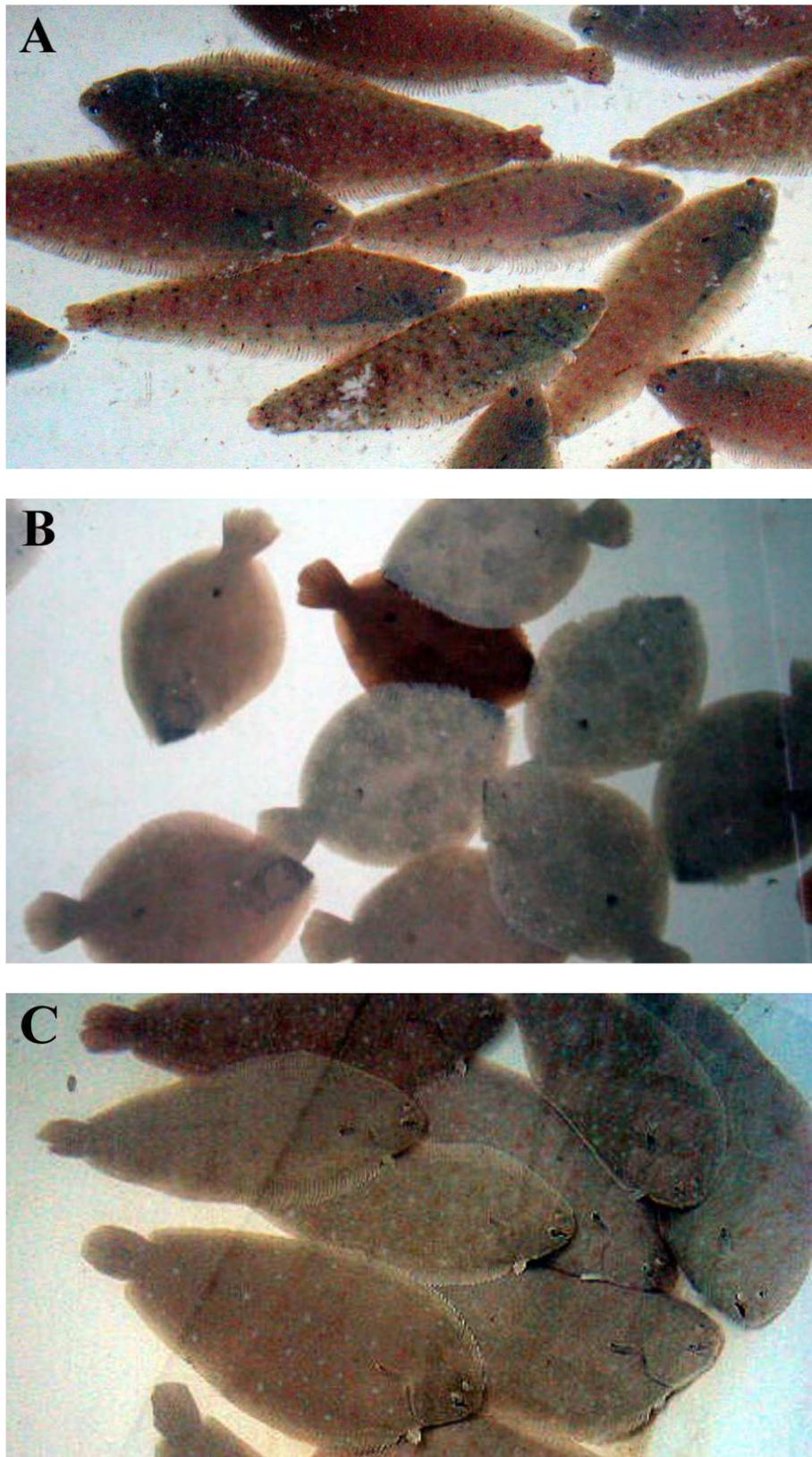


Figura 1. Especies de peces planos cultivadas experimentalmente en el IFAPA Centro *Agua del Pino* y utilizadas en este trabajo. A: acedia (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881); B: rombo o parracho (*Scophthalmus rhombus* Linnaeus, 1758); C: lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858).

ejemplo), y que supone un descenso del rendimiento o incluso la muerte del individuo.

Los agentes etiológicos de una enfermedad pueden ser medioambientales (enfermedades físico-químicas y alimentarias), genéticos (enfermedades genéticas y neoplásicas) y biológicos (enfermedades infecciosas y parasitarias), aunque, como en todos los grupos animales, en peces la aparición de una enfermedad puede deberse a más de un agente etiológico, con interacciones que pueden resultar muy complejas (Plumb 2002). De los distintos tipos de enfermedades, son las de tipo infeccioso o parasitario, causadas por bacterias, virus, hongos, protozoos, etc., las más importantes, siendo dentro de estas las de origen bacteriano las más problemáticas y las que mayores pérdidas provocan, tanto por la mortalidad de los animales como por los costes de los tratamientos (Meyer 1991, Wei 2002, Bondad-Reantaso *et al.* 2005).

La aparición de la enfermedad se refleja en dos aspectos: la tasa de mortalidad y/o la aparición de diversos síntomas en los peces afectados. El aumento de la mortalidad es en ocasiones la principal manifestación de la enfermedad; puede seguir un curso agudo, con altas mortalidades, o un curso crónico, en el que se da un número bajo de muertes pero de una forma persistente y continuada. Por otra parte, en una población donde se presenta una enfermedad solo una parte de los animales infectados presentarán síntomas (modelo de “iceberg”), pudiendo por tanto producirse muertes asintomáticas (Ortega y Muzquiz 2002). Los síntomas de una enfermedad pueden variar, dependiendo por ejemplo de la edad del pez afectado, y frecuentemente son inespecíficos, presentando enfermedades causadas por distintos patógenos una sintomatología similar. Por ejemplo, síntomas como la falta de apetito y la pérdida de peso, alteraciones nerviosas (pérdida de equilibrio, giros en espiral), alteraciones respiratorias, apatía, melanosis (oscurecimiento general), exoftalmia, palidez branquial (anemia), úlceras cutáneas (en septicemias bacterianas), hemorragias externas y/o en órganos internos, inflamación, necrosis o palidez (anemia) de órganos internos, enteritis catarral (intestino taponado por la presencia de mucus), ascitis (acumulación de líquido, por el desequilibrio osmótico resultante de la necrosis del riñón) y congestión (acumulación de sangre), son frecuentes en enfermedades septicémicas causadas tanto por bacterias como por virus.

El desarrollo de las enfermedades infecciosas depende de tres componentes: el hospedador, el agente patógeno y el medio ambiente, produciéndose generalmente la enfermedad cuando individuos susceptibles son expuestos a un agente patógeno bajo unas ciertas condiciones medioambientales (Sniezko 1974).

Entre los factores ambientales se incluyen las características físico-químicas del agua, como temperatura, pH, salinidad, concentración de oxígeno disuelto, concentración de productos nitrogenados de desecho como el amonio, presencia de partículas en suspensión o la presencia de toxinas o contaminantes (cloro, metales pesados). La temperatura es uno de los factores más importantes, dado que al ser poiquiloterms, la totalidad del metabolismo de los

peces es termodependiente, incluyendo los mecanismos de defensa (tanto los específicos como los inespecíficos). La temperatura influye también en la concentración de oxígeno del agua (menor a mayor temperatura), en la concentración de amonio (mayor a mayor temperatura), y también en el crecimiento y virulencia de los agentes patógenos. La presencia de contaminación orgánica o de partículas en suspensión también ha de tenerse en cuenta, pues pueden producir un aumento del número de patógenos oportunistas, irritación de las branquias, y facilitan la dispersión de los patógenos. Otros factores ambientales importantes son el hacinamiento (causa estrés y facilita la propagación de las enfermedades), la manipulación y transporte de los peces (pueden producirse heridas o la pérdida del recubrimiento de mucus), y el tipo y cantidad de alimentación recibida.

Los factores propios del hospedador son asimismo de importancia. No todas las especies de peces presentan el mismo grado de susceptibilidad frente a un mismo patógeno, pudiendo incluso ser este inocuo para unas y virulento para otras. El sexo, la edad, el tamaño, la presencia de neoplasias o cambios en los ciclos hormonales pueden también contribuir a aumentar la susceptibilidad del hospedador. Por otra parte, muchos de los factores ambientales descritos (altas densidades de población, baja concentración de oxígeno, lesiones por manipulación que comprometen el equilibrio osmótico del pez, etc.) pueden llevar a los peces a una situación de estrés, entendido este como el conjunto de reacciones con el que se hace frente a situaciones que pueden provocar la pérdida de la homeostasis y son por tanto potencialmente peligrosas. Esta situación supone un gasto de energía adicional para el mantenimiento de funciones básicas e incrementa, especialmente si se prolonga en el tiempo, la posibilidad de enfermedad al verse otras funciones, como la defensiva, disminuidas (Sniezko 1974, Barton 1997, McEwen 1998, Salas-Leiton *et al.* 2007).

Por último, el agente patógeno juega un papel determinante en el desarrollo de la enfermedad, pero su entrada y multiplicación en el hospedador (infección) no implica necesariamente la aparición de enfermedad, ya que su número y capacidad de virulencia pueden verse afectadas por las condiciones tanto del hospedador como del medio, favoreciendo o no su capacidad para producir enfermedad (Plumb 1999, Ortega & Múzquiz 2002). En función de esta capacidad, los agentes patógenos pueden clasificarse en primarios y secundarios. Los patógenos primarios pueden producir enfermedad por sí solos, mientras que los patógenos secundarios o oportunistas pueden sobrevivir en el hospedador sin producirle daños, causando enfermedad solo si antes actúa otro patógeno o se dan condiciones adversas que debiliten al hospedador. Factores importantes para el desarrollo de la enfermedad son el tipo de cepa, los factores de virulencia expresados, la capacidad de supervivencia en el medio, la vía de entrada, los mecanismos de transmisión y la dosis infectiva (Plumb 2002). La transmisión de la enfermedad puede ser vertical (se transmite al huevo a partir de los progenitores infectados) u horizontal (se transmite bien directamente, por contacto con peces infectados, bien indirectamente a partir del

medio o por medio de vectores), pudiendo presentar un patógeno ambas formas de transmisión. La transmisión horizontal puede verse favorecida por la presencia de portadores asintomáticos (peces infectados que no muestran síntomas de enfermedad pero que pueden constituir una fuente de infección, especialmente en condiciones de estrés), por hábitos de canibalismo, por la presencia de aves ictiófagas o de parásitos hematófagos, o por malas prácticas del piscicultor, como por ejemplo la no desinfección de los salabres. Por último, en función de su capacidad invasiva, el patógeno puede dar lugar a una enfermedad generalizada o septicémica, o a una enfermedad de tipo local. En el primer caso, a partir de un foco de entrada el patógeno invade el hospedador y coloniza otros tejidos diseminándose a través del sistema circulatorio, mientras que en el segundo caso invade los tejidos próximos al foco de entrada por continuidad, no a través de la sangre. No obstante, pueden darse muchas variantes intermedias: una infección local puede dar lugar por último a una septicemia, o una enfermedad septicémica puede presentarse de modo tan agudo que cause la muerte del pez antes de llegar a generalizarse.

La prevención y lucha contra enfermedades de tipo infeccioso debe realizarse, por tanto, en los tres niveles mencionados: 1) a nivel de las condiciones ambientales, mejorando la calidad del agua, de la alimentación, limitando el estrés al que se someten los peces, evitando densidades de cultivo altas, etc.; 2) a nivel de hospedador, mediante la vacunación, inmunoestimulación y aumento de la resistencia genética (selección); y 3) a nivel de patógeno, mediante la utilización de antibióticos efectivos, drogas, desinfectantes, etc.; siendo por tanto esencial el conocimiento de los distintos agentes patógenos que pueden afectar al cultivo. A continuación se hace un breve repaso de las principales enfermedades de origen biológico encontradas en distintas especies de peces planos.

▪ **Enfermedades de etiología no bacteriana**

Las principales enfermedades infecciosas y parasitarias causadas por agentes biológicos no bacterianos (virus, hongos, protozoos y metazoos) detectadas en distintas especies de peces planos se resumen en la Tabla 1.

Entre los virus, se han encontrado, asociados a patologías, miembros de las familias *Birnaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Nodaviridae*, *Iridoviridae* y *Herpesviridae*, entre otras. Entre las enfermedades más importantes, capaces de causar mortalidades significativas, están la necrosis pancreática infecciosa (IPN) y la septicemia hemorrágica viral (VHS), ambas de carácter septicémico-hemorrágico; la necrosis nerviosa viral (VNN) que provoca la vacuolización y necrosis del sistema nervioso central, y la hiperplasia epidérmica viral (VEH), que causa hiperplasia en la epidermis de piel y aletas, y en estados más avanzados, necrosis (Munday *et al.* 2002, Muroga 2001, Wolke *et al.* 2000, Feist 1998). Otra enfermedad importante es la

Tabla 1. Principales enfermedades infecciosas y parasitarias de origen no bacteriano detectadas en peces planos.

Enfermedad o agente etiológico	Hospedador	Referencia
VIRUS		
Necrosis pancreática infecciosa (IPN) (birnavirus)	Halibut, rodaballo	Castric <i>et al.</i> 1987, Mortensen <i>et al.</i> 1990, Novoa <i>et al.</i> 1993b, Wolke <i>et al.</i> 2000
Deformidad viral (birnavirus)	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000, Oh <i>et al.</i> 2005
Otros birnavirus (solevirus y otros)	Rodaballo, halibut, platija japonesa, lenguado senegalés, lenguado común	Novoa <i>et al.</i> 1993a, Rodríguez <i>et al.</i> 1997, Feist 1998, Wolke <i>et al.</i> 2000, Muroga 2001, Pérez-Prieto <i>et al.</i> 2001
Septicemia hemorrágica viral (VHS) (rhabdovirus)	Rodaballo, platija japonesa	Schlotfeldt <i>et al.</i> 1991, Feist 1998, Wolke <i>et al.</i> 2000, Takano <i>et al.</i> 2000, Isshiki <i>et al.</i> 2001, Kin <i>et al.</i> 2001,
<i>Rhabdovirus olivaceus</i> (virus del hirame o HIRRV) (rhabdovirus)	Platija japonesa	Kimura <i>et al.</i> 1986, Wolke <i>et al.</i> 2000, Muroga 2001, Oh <i>et al.</i> 2005
Encefalitis viral de peces (FEV) (nodavirus)	Rodaballo	Wolke <i>et al.</i> 2000
Encefalopatía y retinopatía viral (VER) o necrosis nerviosa viral (VNN) (nodavirus)	Platija japonesa, lenguado común, halibut, rodaballo	Boch <i>et al.</i> 1991, Grotmol <i>et al.</i> 1997, Wolke <i>et al.</i> 2000, Munday <i>et al.</i> 2002, Borghesan <i>et al.</i> 2003, Oh <i>et al.</i> 2005, Montes <i>et al.</i> 2010
Otros nodavirus	Halibut, lenguado senegalés	Wolke <i>et al.</i> 2000, Thiery <i>et al.</i> 2004
Linfocistis (iridovirus)	Rodaballo, platija japonesa, platija de invierno [†] , lenguado senegalés	Murchelano 1976, Wolke <i>et al.</i> 2000, Alonso <i>et al.</i> 2005,
Necrosis eritrocítica viral (VEN) (iridovirus)	Rodaballo	Lamas <i>et al.</i> 1996, Wolke <i>et al.</i> 2000
Iridovirus del pargo (Red sea bream iridovirus, RSIV)	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000
Oros iridovirus	Rodaballo	Bloch & Larsen 1993, Wolke <i>et al.</i> 2000, Kim <i>et al.</i> 2005
Paramyxovirus	Rodaballo	Toranzo <i>et al.</i> 1997, Wolke <i>et al.</i> 2000
Picornavirus	Rodaballo	Wolke <i>et al.</i> 2000
Aquareovirus del rodaballo (reovirus)	Rodaballo	Lupiani <i>et al.</i> 1989, Ledo <i>et al.</i> 1990, Wolke <i>et al.</i> 2000
Hiperplasia epidérmica viral (VEH) (herpesvirus)	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000, Muroga 2001, Oh <i>et al.</i> 2005
Necrosis epidérmica viral (VEdN) (herpesvirus)	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000, Miyazaki 2005
<i>Herpesvirus scophthalmi</i>	Rodaballo	Buchanan & Madeley 1978, Wolke <i>et al.</i> 2000
HONGOS		
<i>Exophiala salmonis</i> , <i>Exophiala</i> sp. (ascomiceto)	Platija de verano, rodaballo	Wolke <i>et al.</i> 2000, Gatica 2000
<i>Hormonconis resiniae</i> (deuteromiceto)	Halibut	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Ichthyophonus hoferi</i> (incertae sedis)	Rodaballo, limanda amarilla [†] , solla	McVicar 1986, Rand 1994, Feist 1998, Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Ichthyophonus</i> sp. (incertae sedis)	Rodaballo	Franco-Sierra <i>et al.</i> 2005
<i>Aphanomyces</i> sp. (oomiceto)	Lenguado de Florida [†] , lenguado de tres manchas [†]	Noga <i>et al.</i> 1991, Feist 1998
<i>Saprolegnia</i> sp. (oomiceto)	Lenguado de Florida, lenguado de tres manchas	Noga <i>et al.</i> 1991, Feist 1998
PROTOZOOS		
<i>Paramoeba</i> sp. (ameba) (amebiasis branquial)	Rodaballo	Dykova <i>et al.</i> 1998, Hemmingsen 2006
<i>Platyamoeba</i> sp. (ameba) (amebiasis branquial)	Rodaballo	Feist 1998, Leiro <i>et al.</i> 2008
<i>Amyloodinium</i> sp. (dinoflagelado)	Lenguado, lenguado senegalés	Wolke <i>et al.</i> 2000, Padrós <i>et al.</i> 2003
<i>Cryptobia</i> sp. (flagelado)	Lenguado senegalés	Padrós <i>et al.</i> 2003
<i>Cryptocaryon irritans</i> (ciliado)	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Cryptocaryon</i> sp. (ciliado)	Rodaballo, platija japonesa, lenguado senegalés	Wolke <i>et al.</i> 2000, Gatica 2000, Padrós <i>et al.</i> 2003
<i>Trichodina hippoglossi</i> (ciliado)	Halibut	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Trichodina</i> sp. (ciliado)	Halibut, rodaballo	Gatica 2000, Wolke <i>et al.</i> 2000, Hemmingsen 2006
<i>Uronema marinum</i> (ciliado)	Rodaballo, solla	Feist 1998
<i>Haemogregarina sachi</i> (cocidio)	Rodaballo	Wolke <i>et al.</i> 2000, Hemmingsen 2006
<i>Ictyobodo</i> sp.	Platija japonesa, rodaballo	Gatica 2000, Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Myxobolus aeglefini</i> (mixosporidio)	Solla	Roberts 1981
<i>Unicapsula muscularis</i> (mixosporidio)	Halitut del Pacífico [†]	Roberts 1981, Feist 1998
<i>Enteromyxum scophthalmi</i> (mixosporidio)	Rodaballo	Redondo <i>et al.</i> 2003
<i>Enterocytozoon</i> sp. (microsporidio)	Halibut	Wolke <i>et al.</i> 2000

[†] Platija de invierno, *Pseudopleuronectes americanus*; Limanda amarilla, *Limanda ferruginea*; Lenguado de florida, *Paralichthys lethostigma*; Lenguado de tres manchas, *Ancylosetta dilecta*; Solleta, *Citharus linguatula*; Halibut del Pacífico, *Hippoglossus stenolepis*

Tabla 1. Continuación.

Enfermedad o agente etiológico	Hospedador	Referencia
PROTOZOOS		
<i>Tetramicra brevifilum</i> (microsporidio)	Rodaballo	Feist 1998, Gatica 2000, Wolke <i>et al.</i> 2000, Hemmingsen 2006
<i>Glugea stephani</i> (microsporidio)	Solla	Roberts 1981, Feist 1998, Hemmingsen 2006
<i>Pleistophora hippoglossoides</i> (microsporidio)	Lenguado común	Feist 1998
METAZOOS		
<i>Lepeoptheirus hippoglossi</i> (copépodo)	Halibut	Wolke <i>et al.</i> 2000, Hemmingsen 2006
<i>Lepeoptheirus pectoralis</i> (copépodo)	Platija	Kabata 1979, Hemmingsen 2006
<i>Lepeoptheirus thompsoni</i> (copépodo)	Rodaballo, rombo	Kabata 1979, Hemmingsen 2006
<i>Lernaecerus</i> sp. (copépodo)	Rodaballo	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Acanthocephaloides propinquus</i> (acantocéfalo)	Acedía	Belghyti <i>et al.</i> 2005
<i>Hemibdella</i> sp. (hirudíneo)	Rodaballo, lenguado	Roberts 1981
<i>Platybdella soleae</i> (hirudíneo)	Lenguado	Barahona-Fernandes & Dinis 1992, Hemmingsen 2006
Hirudíneos no identificados	Acedía	Herrera <i>et al.</i> 2003
<i>Anisakis</i> sp. (nematodo)	Acedía, lenguado senegalés, platija	Marques <i>et al.</i> 2006
<i>Gyrodactylus</i> sp. (monogeneo)	Rodaballo	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Neoheterobothrium affine</i> (monogeneo)	Platija de verano	Feist 1998
<i>Entobdella</i> sp. (monogeneo)	Lenguado común	Feist 1998
<i>Neobenedenia girilla</i> (monogeneo)	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Bothriocephalus gragarius</i> (cestodo)	Rodaballo	Robert <i>et al.</i> 1988
<i>Bothriocephalus andresi</i> (cestodo)	Solleta [†]	Belghyti <i>et al.</i> 2005

linfocistis, causada por un iridovirus que provoca la hipertrofia de las células epidérmicas, formándose lesiones en forma de perlas en la piel. Aunque la enfermedad no suele causar mortalidad, los peces quedan desfigurados, perdiendo todo valor comercial (Roberts 1981, Feist 1998, Alonso *et al.* 2005). Otros virus, como el de la necrosis eritrocítica viral (VEN), pueden provocar altas mortalidades, cursando cuadros septicémicos, o bien provocar una fuerte anemia en los peces, volviéndolos más susceptibles a otros patógenos o a condiciones de bajos niveles de oxígeno (Feist 1998, Lamas *et al.* 2006). Por último, ciertos virus parecen ocasionar la aparición de tumores, habiéndose demostrado, por ejemplo, la implicación de un herpesvirus en el desarrollo de tumores en la platija japonesa (Anders & Yoshimizu 1994). En España se han detectado, asociados a enfermedad en cultivos de peces planos (lenguado senegalés y rodaballo), los virus de la linfocistis, de la septicemia hemorrágica viral y de la necrosis eritrocítica viral, así como birnavirus similares al de la IPN, paramyxovirus y aquaerovirus; no obstante las repercusiones patológicas no siempre son importantes (Ledo *et al.* 1990, Novoa *et al.* 1993a, Rodríguez *et al.* 1997, Toranzo *et al.* 1997, Toranzo *et al.* 2003, Padrós *et al.* 2003, Alonso *et al.* 2005, Lamas *et al.* 2006).

Entre las enfermedades fúngicas, la más importante es la ictiofoniasis, causada por *Ichthyophonus hoferi*, un hongo de clasificación incierta que provoca una granulomatosis generalizada, afectando a distintos órganos y tejidos. Aunque en España no se ha descrito ningún caso debido a esta especie, sí se han detectado otros miembros del género asociados a patologías en rodaballo (Franco-Sierra *et al.* 2005). Otras enfermedades detectadas en peces

planos son las debidas a miembros del género *Exophiala*, que también provocan granulomatosis generalizadas, e infecciones tegumentarias causadas por *Saprolegnia* sp. y *Aphanomyces* spp., que se manifiestan con la aparición de parches algodonosos y úlceras en la superficie del pez (micosis ulcerativas).

Por último, las enfermedades parasitarias descritas en peces planos están causadas por una amplia variedad de organismos eucariotas, incluyendo tanto protozoos como metazoos. Aunque en muchos casos las repercusiones patológicas debidas a la presencia de estos parásitos no están claras o no son importantes, en otros casos (por ejemplo, si se dan las condiciones para la rápida proliferación de parásitos de ciclo directo en cultivos masificados) pueden provocar altas mortalidades, aumentar la susceptibilidad de los peces a otras infecciones o causar lesiones que hacen que los peces sean comercialmente inviables (Roberts 1981, Feist 1998, Hemmingsen 2006).

Entre los ectoparásitos más importantes se incluyen protozoos pertenecientes a distintos grupos, como *Platyamoeba* sp. (ameba), *Amyloodinium* sp. (dinoflagelado), *Cryptocaryon irritans* (ciliado) y *Trichodina hippoglossi* (ciliado), mientras que dentro de los metazoos tienen importancia distintas especies de copépodos de los géneros *Lepeoptheirus* y *Lernaeocerus*, hirudíneos o sanguijuelas como *Hemibdella* sp. y platelmintos monogeneos como *Gyrodactylus* sp. La alimentación y multiplicación de estos parásitos puede causar obstrucción o disfunción branquial, lesiones importantes en piel y branquias (lo que favorece la aparición de infecciones secundarias), y en ciertos casos, como el de las sanguijuelas, anemia o la transmisión de otros parásitos (Roberts 1981, Feist 1998, Wolke *et al.* 2000, Hemmingsen 2006).

Entre los endoparásitos, los grupos más importantes de protozoos son los mixosporidios y microsporidios, parásitos intracelulares que provocan la hipertrofia de las células afectadas, apareciendo quistes cargados de esporas. Destacan el mixosporidio *Unicapsula muscularis* y el microsporidio *Tetramicra brevifilum*, que afectan al músculo, y el microsporidio *Glugea stephani*, que afecta al epitelio intestinal. Dentro de los metazoos, se han descrito infestaciones por nematodos como *Anisakis* sp. y por cestodos como *Bothriocephalus* spp (Roberts 1981, Robert *et al.* 1988, Feist 1998, Belghyti *et al.* 2005, Hemmingsen 2006).

▪ Enfermedades de etiología bacteriana

Como ya se mencionó anteriormente, las enfermedades más problemáticas para el desarrollo de la acuicultura marina son aquellas de origen bacteriano (Austin & Austin 1999), principalmente debido a su transmisión, directa, y a su capacidad para proliferar rápidamente, siendo las causadas por bacterias Gram negativas las más frecuentes e importantes. Una gran parte de las patologías descritas en peces planos han sido previamente detectadas en otras

especies, marinas (por ejemplo en dorada y lubina en el caso de nuestro país) o de agua dulce, lo que permite suponer que en el futuro el número de estas se ampliará, especialmente si los cultivos se realizan junto a esas otras especies sin adoptarse medidas preventivas adecuadas (Feist 1998, Padrós *et al.* 2003).

En la Tabla 2 se resumen los principales patógenos bacterianos descritos en distintas especies de pleuronectiformes. De las tres especies de peces planos en las que se basa este trabajo (acedía, rombo y lenguado senegalés), solamente en el caso del lenguado senegalés se dispone de publicaciones acerca de las patologías bacterianas que le afectan. En el caso de la acedía y el rombo no hay hasta el momento bibliografía disponible, por lo que a continuación se hace un resumen de los principales patógenos bacterianos detectados en otras especies de peces planos.

- *Tenacibaculum maritimum*

T. maritimum, antes denominado *Flexibacter maritimus* o *Cytophaga marina* (Wakabayashi *et al.* 1986, Holmes 1992, Suzuki *et al.* 2001), es una bacteria filamentosa Gram negativa de metabolismo oxidativo perteneciente al filo Bacteroidetes, familia *Flavobacteriaceae*. Es el agente causal de la tenacibaculosis o flexibacteriosis, una enfermedad ulcerativa que causa mortalidades masivas e importantes pérdidas económicas en cultivos de un gran número de especies marinas, con una distribución a nivel mundial (Toranzo *et al.* 2005, Avendaño-Herrera *et al.* 2006b).

La enfermedad fue descrita por primera vez en 1977 por Masumura y Wakabayashi en Japón, causando altas mortalidades en peces marinos cultivados. En peces planos ha sido descrita en lenguado común, lenguado senegalés, platija japonesa, rodaballo y platija europea (*Rhombosolea tapirina*) (McVicar & White 1979, Baxa *et al.* 1986, Devesa *et al.* 1989, Bernardet *et al.* 1990, Alsina & Blanch 1993, Soltani *et al.* 1996, Handlinger *et al.* 1997, Cepeda & Santos 2002). Los principales síntomas son lesiones en la superficie corporal (úlceras, necrosis), erosión de la boca, y aletas deshilachadas o putrefactas. En ocasiones pueden llegar a darse cuadros septicémicos. La enfermedad presenta una mayor prevalencia y severidad con temperaturas por encima de los 15°C, y cuando se dan situaciones de estrés.

El aislamiento de la bacteria a partir de los peces enfermos es a menudo problemático debido al lento crecimiento del patógeno, pudiendo ser ocultado y/o inhibido su crecimiento por otras especies bacterianas presentes en las lesiones. Dado que estas lesiones favorecen la entrada de otras bacterias, tanto saprofitas como patógenas, así como de protozoos, *T. maritimum* a menudo aparece en infecciones mixtas (McVicar & White 1979, Devesa *et al.* 1989, Kimura & Kusuda 1983, Handlinger *et al.* 1997). La identificación del patógeno puede realizarse a partir

Tabla 2. Principales enfermedades de origen bacteriano descritas en peces planos.

Enfermedad o agente etiológico	Hospedador	Referencia
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Lenguado común, lenguado senegalés, rodaballo, platija japonesa, platija europea	McVicar & White 1979, Baxa <i>et al.</i> 1986, Devesa <i>et al.</i> 1989, Bernardet <i>et al.</i> 1990, Alsina & Blanch 1993, Soltani <i>et al.</i> 1996, Handlinger <i>et al.</i> 1997, Cepeda & Santos 2002
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	Halibut	Hansen <i>et al.</i> 1992
<i>Tenacibaculum soleae</i>	Lenguado senegalés	Piñeiro-Vidal <i>et al.</i> 2008
<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>	Rodaballo	Mudarris <i>et al.</i> 1994
<i>Flexibacter sp.</i>	Halibut, platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	Rodaballo	Romalde 2005, Toranzo <i>et al.</i> 2005
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Halibut, rodaballo, platija japonesa, platija de verano	Toranzo & Barja 1992, Pedersen & Larsen 1996, Feist 1998, Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Aliivibrio fischeri*</i>	Rodaballo	Buller 2004
<i>Listonella anguillarum</i>	Rodaballo, solla, platija japonesa, platija de invierno, lenguado, halibut	Pedersen <i>et al.</i> 1999, Wolke <i>et al.</i> 2000, Buller 2004, Toranzo <i>et al.</i> 2005
<i>Listonella pelagia</i>	Rodaballo	Buller 2004
<i>Moritella viscosa</i>	Solla	Lunder <i>et al.</i> 2000
<i>Salinivibrio costicola</i>	Platija de verano	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Rodaballo, platija japonesa	Austin <i>et al.</i> 1993, Wolke <i>et al.</i> 2000, Buller 2004
<i>Vibrio campbellii</i>	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Vibrio campbellii</i> -like	Rodaballo de Nueva Zelanda [†] , rombo de Nueva Zelanda [†]	Diggles <i>et al.</i> 2000b
<i>Vibrio fluvialis</i>	Solla, platija japonesa	Pedersen <i>et al.</i> 1999
<i>Vibrio gazogenes</i>	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Vibrio harveyi</i>	Rodaballo, lenguado senegalés, platija japonesa, platija de verano	Soffientino <i>et al.</i> 1999, Wolke <i>et al.</i> 2000, Arijo <i>et al.</i> 2005a, Gauger <i>et al.</i> 2006, Rico <i>et al.</i> 2008, Sun <i>et al.</i> 2009
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	Platija japonesa, platija de verano	Ishimaru <i>et al.</i> 1996, Wolke <i>et al.</i> 2000, Gauger <i>et al.</i> 2006
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Platija de verano	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Vibrio splendidus</i>	Rodaballo, rodaballo de Nueva Zelanda, rombo de Nueva Zelanda, solla	Angulo <i>et al.</i> 1994, Pedersen <i>et al.</i> 1999, Diggles <i>et al.</i> 2000b, Thompson <i>et al.</i> 2005
<i>Vibrio tapetis*</i>	Halibut	Reid <i>et al.</i> 2003a
<i>Vibrio tubiashii</i>	Platija japonesa	Lee <i>et al.</i> 1991
<i>Vibrio sp.</i> (necrosis intestinal larval)	Halibut, platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	Rodaballo, platija japonesa, platija de verano	Lee <i>et al.</i> 1991, Fouz <i>et al.</i> 1992a, Wolke <i>et al.</i> 2000, Gauger <i>et al.</i> 2006
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Lenguado común, lenguado senegalés, platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000, Padrós <i>et al.</i> 2003, Toranzo <i>et al.</i> 2003, 2005
<i>Edwardsiella tarda</i>	Rodaballo, platija japonesa	Nakatsugawa 1983b, Plumb 1993, Austin & Austin 1999, Wolke <i>et al.</i> 2000, Mohanty & Sahoo 2007
<i>Serratia liquefaciens</i>	Rodaballo	Vigneulle & Laurencin 1995, Buller 2004
<i>Yersinia ruckeri</i>	Rodaballo, lenguado comun	Horne & Barnes 1999, Wheeler <i>et al.</i> 2009
<i>Streptococcus iniae</i>	Platija japonesa	Toranzo <i>et al.</i> 2005
<i>Streptococcus parauberis</i>	Rodaballo	Domenech <i>et al.</i> 1996, Toranzo <i>et al.</i> 2005
<i>Streptococcus sp.</i>	Platija japonesa	Wolke <i>et al.</i> 2000, Jong-Hun & Eunheui 2003
<i>Enterococcus sp.</i>	Rodaballo	Nieto <i>et al.</i> 1995
<i>Lactococcus garvieae</i>	Platija japonesa	Lee <i>et al.</i> 2001, Vendrell <i>et al.</i> 2006
<i>Mycobacterium marinum</i>	Halibut, rodaballo	Dos Santos <i>et al.</i> 2002, Toranzo <i>et al.</i> 2005
<i>Nocardia seriolae</i>	Platija japonesa	Kudo <i>et al.</i> 1988

* Patogenicidad dudosa. [†] Rodaballo de Nueva Zelanda, *Colistium nudipinnis*; Rombo de Nueva Zelanda, *Colistium guntheri*.

de características morfológicas y bioquímicas, o mediante distintos métodos moleculares basados en la técnica de la PCR (Toyama *et al.* 1996, Bader & Shotts 1998, Wilson *et al.* 2002, Wilson & Carson 2003, Warsen *et al.* 2004). Estudios serológicos han demostrado la existencia

en *T. maritimum* de al menos tres O-serogrupos, aparentemente relacionados con la especie hospedadora (Avendaño-Herrera *et al.* 2004a, Avendaño-Herrera *et al.* 2006b). En la actualidad se dispone de vacunas comerciales efectivas.

Dentro del género *Tenacibaculum*, otras especies como *Tenacibaculum ovolyticum* y *Tenacibaculum soleae* también han sido descritas como patógenos de peces planos. *T. ovolyticum* fue descrito en 1992 a partir de huevos de halibut atlántico, y es considerado un patógeno oportunista de huevos y larvas de esta especie (Hansen *et al.* 1992). *T. soleae* es una especie descrita recientemente, aislada en 2004 en Galicia a partir de ejemplares enfermos de lenguado senegalés. Ensayos de virulencia realizados con la cepa tipo han mostrado que esta es virulenta no solo para alevines de lenguado sino que también para los de rodaballo (Piñeiro-Vidal *et al.* 2008).

- *Pseudomonas anguilliseptica*

P. anguilliseptica es un bacilo Gram negativo de metabolismo oxidativo, perteneciente al filo Proteobacteria, familia *Pseudomonadaceae*. Originalmente descrito en 1972 causando mortalidades masivas en cultivos de anguila en Japón (Wakabayashi & Egusa 1972), desde entonces ha sido detectado en un gran número de especies marinas de cultivo, siendo por ejemplo el agente causal de la “enfermedad de invierno” de la dorada, afectando también a salmónidos. En el año 2000 se detectaron brotes causados por este patógeno en piscifactorías de rodaballos en España (Romalde 2005, Toranzo *et al.* 2005).

La enfermedad tiene lugar a bajas temperaturas (por debajo de los 16°C), generalmente en los meses de invierno, y es de curso septicémico, siendo los principales síntomas distensión abdominal y la aparición de petequias (puntitos rojos de naturaleza hemorrágica) en la piel y órganos internos, pudiendo darse también muertes asintomáticas.

La bacteria es bioquímicamente homogénea, pero se han descrito dos serotipos en función del antígeno O. Estos coinciden con los dos grupos genéticos establecidos con técnicas RAPD y están relacionados con la especie hospedadora, situándose por un lado los aislados de anguila y por otro los de rodaballo, dorada, besugo, etc. (Romalde 2005, Toranzo *et al.* 2005). La identificación del patógeno puede realizarse también por métodos moleculares, habiéndose descrito varios protocolos de PCR basados en el gen ARNr 16S (Blanco *et al.* 2002, Romalde *et al.* 2004). En el caso del rodaballo, se han ensayado distintas bacterinas que parecen ser efectivas (Romalde *et al.* 2005).

Otras especies del género, como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas plecoglossicida* o *Pseudomonas chlororaphis* han sido también descritas como

patógenos de peces, pero no han sido detectadas en peces planos (Nishimori *et al.* 2000, Romalde 2005).

– *Aeromonas salmonicida* subespecie *salmonicida*

A. salmonicida subsp. *salmonicida* es un bacilo Gram negativo fermentativo, perteneciente al filo Proteobacteria, familia *Aeromonadaceae*. Es el agente causal de la furunculosis, una enfermedad con amplia distribución geográfica que causa grandes pérdidas principalmente en cultivos de salmónidos. La enfermedad, no obstante, afecta también a peces no salmónidos, incluidos peces planos como el rodaballo, el halibut, la platija japonesa o la platija de verano, constituyendo de hecho un factor limitante para el cultivo de rodaballo en España (Toranzo & Barja 1992, Pedersen & Larsen 1996, Feist 1998, Wolke *et al.* 2000). La enfermedad, que puede aparecer de forma crónica o aguda, presenta un cuadro septicémico-hemorrágico, siendo no obstante frecuente la aparición de lesiones ulcerativas profundas.

El patógeno es bioquímica, antigénica y genéticamente homogéneo, no mostrando diferentes biotipos, serotipos o genotipos, lo que facilita su identificación, existiendo además un buen número de protocolos de PCR específicos, basados en distintos genes (Toranzo *et al.* 2005, Beaz-Hidalgo *et al.* 2008). Aunque existe una amplia gama de vacunas disponibles en el mercado, en salmónidos no son particularmente efectivas y en rodaballo la protección parece ser de muy corta duración (unos 3 meses) incluso cuando se aplica mediante inyección intraperitoneal (Wolke 2000, Toranzo *et al.* 2005).

– *Listonella anguillarum*

L. anguillarum (*Vibrio anguillarum*) es un bacilo Gram negativo fermentativo, perteneciente al filo proteobacteria, familia *Vibrionaceae*. Es el principal agente causal de la vibriosis “típica” o “clásica”, una enfermedad que causa graves pérdidas económicas en un elevado número de especies de peces, tanto marinas como de agua dulce, incluyendo pleuronectiformes como el rodaballo y la platija japonesa.

El patógeno, aislado por primera vez en 1893, es considerado el agente etiológico de la primera enfermedad bacteriana descrita en peces (1718), la peste roja de las anguilas (Roberts 1981, Wolke *et al.* 2000). Los peces afectados muestran los síntomas típicos de una septicemia hemorrágica, como exoftalmia, anorexia, melanosis, hemorragias y palidez branquial, pudiendo también aparecer úlceras en la piel. En rodaballo la enfermedad suele darse con temperaturas superiores a los 10-11°C, pero este umbral de temperatura varía según las especies.

Basándose en el antígeno O, se han descrito hasta 23 serotipos, aunque solo tres de ellos (O1, O2 y O3) han sido asociados con enfermedades en peces (Sørensen & Larsen 1986, Toranzo *et al.* 2005). La identificación del patógeno puede realizarse a partir de pruebas bioquímicas, métodos serológicos, sondas de ADN y mediante PCR con cebadores específicos. Se dispone de vacunas comerciales aplicables tanto por inmersión como por inyección, abarcando generalmente su formulación los serotipos O1 y O2 (Toranzo *et al.* 2005).

Otras especies como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* o *Vibrio splendidus* son también agentes causales de vibriosis en peces planos (Tabla 2).

– *Vibrio harveyi*

V. harveyi, que ahora incluye a *V. carchariae* y *V. trachuri* como sinónimos (Pedersen *et al.* 1998, Thompson *et al.* 2002), es un bacilo Gram negativo fermentativo perteneciente al filo Proteobacteria, familia *Vibrionaceae*. Ubicuo en el medio marino, es un miembro normal de la microbiota intestinal de muchos vertebrados e invertebrados marinos. Aunque muchas cepas son consideradas patógenos oportunistas, otras han mostrado ser altamente virulentas para la fauna acuática.

V. harveyi es considerado el principal agente causal de la vibriosis “luminosa” (la luminiscencia es frecuente en la especie), una enfermedad que afecta a una variedad de invertebrados marinos cultivados, especialmente langostinos, causando grandes pérdidas económicas, sobre todo en Asia y Sudamérica (Liu *et al.* 1996, Robertson *et al.* 1998, Diggles *et al.* 2000a, Oakey *et al.* 2003). No obstante, también ha sido detectado causando mortalidades significativas en distintas especies de peces cultivados, entre ellas el rodaballo, la platija japonesa, la platija de verano y el lenguado senegalés, constituyendo uno de los patógenos bacterianos más frecuentemente aislados (Soffientino *et al.* 1999, Wolke *et al.* 2000, Arijo *et al.* 2005a, 2005b, Austin & Zhang 2006, Gauger *et al.* 2006, Sun *et al.* 2009). Los síntomas observados en estos casos incluyen úlceras, hemorragias en aletas o boca, lesiones en el ojo y gastroenteritis (Zorrilla *et al.* 2003, Arijo *et al.* 2005a, Austin & Zhang 2006, Rico *et al.* 2008).

La bacteria, descrita en 1936 por Johnson y Shunk como “*Achromobacter harveyi*”, ha estado sometida a una continua revisión taxonómica hasta su inclusión en el género *Vibrio* por Baumann *et al.* (1980), y está estrechamente relacionada con *V. alginolyticus*, *V. campbellii* y *V. parahaemolyticus*. La identificación de *V. harveyi* es problemática debido a la alta heterogeneidad fenotípica -y genotípica- que muestra la especie, siendo extremadamente difícil de identificar solo a partir de test bacteriológicos convencionales (Oakey *et al.* 2003, Conejero & Hedreyda 2003, Vandenberghe *et al.* 2003, Thompson *et al.* 2007).

Entre los métodos moleculares utilizados para su identificación están la secuenciación del ADNr 16S, el análisis de secuencias multilocus (MLSA), los polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), la hibridación ADN-ADN, y protocolos de PCR con cebadores específicos basados en distintos genes, aunque en algún caso se han registrado casos de falsos positivos y falsos negativos (Conejero & Hedreyda 2003, Oakey *et al.* 2003, Gómez-Gil *et al.* 2004, Thompson *et al.* 2004, Pang *et al.* 2006, Thompson *et al.* 2007).

Por último, se ha desarrollado una variedad de vacunas contra *V. harveyi* utilizando células enteras, productos extracelulares y proteínas recombinantes, mostrado ser efectivas en rodaballo, lenguado senegalés y platija japonesa, entre otras especies (Arijo *et al.* 2005b, Sun *et al.* 2009, Cheng *et al.* 2010).

- *Vibrio tapetis*

V. tapetis es el agente causal de la enfermedad del anillo marrón, una enfermedad que afecta a cultivos de distintas especies de almeja en un gran número de países incluido España, provocando importantes pérdidas económicas. La enfermedad, que se caracteriza por la producción de un depósito orgánico de color marrón en la parte interna de la concha, fue descrita por vez primera en 1987 en Francia afectando a cultivos de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*), pero no sería hasta 1990 que se aislase al agente responsable (Paillard & Maes 1990, Borrego *et al.* 1996, Paillard 2004).

Aunque es principalmente conocido por ser el causante de la enfermedad del anillo marrón en bivalvos, *V. tapetis* también ha sido asociado a mortalidades en peces cultivados, concretamente de porredana (*Symphodus melops*) en Noruega (Jensen *et al.* 2003) y de halibut atlántico (*Hippoglossus hippoglossus*) en Escocia, Reino Unido (Reid *et al.* 2003a). No obstante, mientras que *V. tapetis* parece ser patógeno para la porredana, la relación entre esta bacteria y la mortalidad observada en el halibut no está clara.

Aunque inicialmente *V. tapetis* fue considerado un taxón homogéneo, cepas obtenidas a partir de distintos orígenes geográficos y hospedadores han mostrado cierta variabilidad intraespecífica, describiéndose tres serotipos distintos. Por otro lado, mediante distintas técnicas de tipado (REP-PCR, ERIC-PCR, RAPD) se han establecido tres grupos genéticos que guardan relación con el hospedador y que muestran una buena correlación con los serotipos descritos (Balboa *et al.* 2006, Read 2006, Rodríguez *et al.* 2006).

La identificación del patógeno puede hacerse a partir de pruebas bioquímicas convencionales, por métodos serológicos o mediante distintos protocolos de PCR con cebadores específicos (Paillard *et al.* 2006, Romalde *et al.* 2007).

- *Photobacterium damsela*

P. damsela es un cocobacilo Gram negativo fermentativo perteneciente al filo Proteobacteria, familia *Vibrionaceae*. Consta de dos subespecies, fácilmente distinguibles fenotípicamente y que causan enfermedades distintas, pero con secuencias idénticas para el gen ARNr 16S y una alta similitud en la hibridación ADN-ADN.

P. damsela subsp *damsela* (antes *Vibrio damsela*) causa una enfermedad septicémica (vibriosis) que afecta a un gran número de especies de peces de aguas frías y templadas, siendo los síntomas más típicos úlceras cutáneas y hemorragias, especialmente en boca, ojos y musculatura (Fouz *et al.* 2000). Aunque generalmente es descrito como un patógeno secundario, algunos aislados son capaces de provocar la enfermedad en peces sanos, e incluso septicemia en humanos (Fouz *et al.* 1992a, Shin *et al.* 1996). En peces planos ha sido descrito en platija japonesa y en cultivos de rodaballo en España (Fouz *et al.* 1992b, Wolke *et al.* 2000).

P. damsela subsp *piscicida* (antes *Pasteurella piscicida*), es el agente causal de la pasteurelosis o photobacteriosis, una enfermedad septicémica que causa mortalidades devastadoras en cultivos de muchas especies de peces marinos. Fue aislado por vez primera en 1963 en la Bahía de Chesapeake (EUA), provocando mortalidad en poblaciones naturales de peces marinos. Desde entonces, ha sido descrito en un gran número de especies en Europa, Asia y América del Norte, y constituye uno de los principales factores limitantes para el cultivo tanto del lenguado senegalés como del lenguado común (*Solea solea*) (Padrós *et al.* 2003, Toranzo *et al.* 2003, Toranzo *et al.* 2005). Los síntomas externos más comunes de la enfermedad son coloración oscura y una menor actividad natatoria, no presentando, por lo general, lesiones. Internamente, la enfermedad se caracteriza por la presencia de hemorragias y nódulos blancos (granulomas) en hígado, bazo y riñón (Zorrilla *et al.* 1999). La enfermedad se transmite tanto horizontal como verticalmente. Suele darse de forma más severa con temperaturas por encima de los 18-20°C (por debajo de esa temperatura puede permanecer en los peces por largos periodos de tiempo como una infección subclínica), dependiendo la susceptibilidad a la misma también de la especie de pez y del tamaño del individuo (en dorada, por ejemplo, los peces de más de 50 g son resistentes a la enfermedad) (Magariños *et al.* 2001, Toranzo *et al.* 2005).

P. damsela subsp *piscicida* es bioquímica y serológicamente homogéneo, por lo que puede identificarse fácilmente tanto por métodos bioquímicos (métodos convencionales, API 20E) como serológicos (aglutinación, ELISA), existiendo además un gran número de protocolos de PCR específicos para esta especie (Osorio *et al.* 1999, Kvitt *et al.* 2002, Rajan *et al.* 2003, González *et al.* 2004, Toranzo *et al.* 2005). Para la diferenciación de las dos subespecies de *P. damsela*, Osorio *et al.* (2000) propusieron una PCR múltiple con cebadores dirigidos a los genes ARNr 16S y *ureC*. La diferenciación de las dos subespecies se basa en la ausencia o presencia del gen de la ureasa.

En lo que respecta a la prevención de la enfermedad, existen vacunas comerciales frente a *P. damselae* subsp. *piscicida*, aunque su eficacia puede variar en función de factores como la especie y la edad del pez (Toranzo *et al.* 2005).

- *Edwardsiella tarda*

E. tarda (Ewing *et al.* 1965) es un bacilo Gram negativo fermentativo perteneciente al filo Proteobacteria, familia *Enterobacteriaceae*. Con una distribución mundial, puede causar enfermedad en peces tanto de agua dulce como marinos, así como en anfibios, reptiles, aves y mamíferos, incluido el hombre. En acuicultura marina fue descrito por primera vez en 1962 a partir de anguilas en Japón. Desde entonces, las infecciones causadas por este microorganismo han provocado importantes mortalidades en distintas especies marinas cultivadas, entre ellas la platija japonesa y, especialmente en los últimos años, en rodaballo (Nakatsugawa 1983b, Plumb 1993, Austin & Austin 1999, Mohanty & Sahoo 2007). La enfermedad es de curso septicémico, siendo los principales síntomas la decoloración de la piel, hemorragias externas (principalmente en la cabeza), tumefacción en torno a los ojos, ascitis y hemorragias en órganos internos, aunque en otros casos no hay signos aparentes de enfermedad.

La bacteria es bioquímicamente homogénea, pero se han descrito varios serotipos. El tratamiento y la prevención de la enfermedad es complicado debido a la resistencia a antibióticos que presentan muchas cepas, y a que aunque se han descrito muchas posibles vacunas, no se dispone de ninguna efectiva a nivel comercial. Por otro lado, el uso de inmunoestimulantes, ensayados a nivel experimental, parecen dar buenos resultados (Castro *et al.* 2006, Mohanty & Sahoo 2007).

- *Streptococcus spp.*

La “estreptococosis” es una enfermedad reemergente que afecta a muchas especies de peces tanto salvajes como cultivadas, de acuicultura marina y continental, a lo largo de todo el mundo. Está causada por distintas especies de cocos Gram positivos (principalmente estreptococos, lactococos y vagococos), siendo en pleuronectiformes las más importantes las del género *Streptococcus* (filo Firmicutes, familia *Streptococcaceae*), concretamente *Streptococcus iniae* en platija japonesa y *Streptococcus parauberis* en rodaballo. Estas dos especies causan la “estreptococosis de agua caliente”, causando mortalidades cuando la temperatura supera los 15°C. La enfermedad causa daños en el sistema nervioso central, caracterizándose por la presencia de exoftalmia supurativa y meningoencefalitis (Nakatsugawa 1983a, Doménech *et al.* 1996, Austin & Austin 1999, Toranzo *et al.* 2005).

En *S. iniae* se han descrito, en función de la composición de la cápsula, dos serotipos, mientras que *S. parauberis* parece ser serologicamente homogéneo (Bachrach *et al.* 2001, Toranzo *et al.* 2005). La identificación basada únicamente en pruebas bioquímicas puede ser complicada, no obstante se pueden utilizar también métodos serológicos y protocolos de PCR específicos, disponibles para ambas especies.

Se dispone de vacunas tanto contra *S. iniae* como para *S. paruberis*, aunque la eficacia de las mismas (grado de protección y duración de la misma) puede variar considerablemente dependiendo de la especie de pez y de la ruta de administración (Toranzo *et al.* 2005).

– *Mycobacterium marinum*

M. marinum es un bacilo Gram positivo perteneciente al filo Actinobacteria, familia *Mycobacteriaceae*. Se trata de un patógeno intracelular facultativo, principal responsable de la mycobacteriosis o tuberculosis de los peces, una enfermedad crónica que ha sido descrita en casi 200 especies, tanto de aguas dulces como marinas a nivel mundial, y que puede causar también enfermedad en humanos. En peces planos ha sido descrito en halibut salvajes y en rodaballo, constituyendo una amenaza para el cultivo de este último en Europa.

La enfermedad es progresiva, pudiendo permanecer asintomática durante largos periodos de tiempo, pero a menudo es fatal o provoca que los peces no sean comercializables. Se manifiesta principalmente por la aparición de granulomas blanquecinos en bazo, riñón e hígado, aunque pueden aparecer en otros órganos y tejidos. Otros síntomas observados son decoloración de la piel, pérdida de peso, exoftalmia, deformidades en la espina dorsal y úlceras (Dos Santos *et al.* 2002, Pasnik & Smith 2005, Toranzo *et al.* 2005).

La identificación del patógeno puede realizarse a partir de pruebas fenotípicas, secuenciación del gen ARNr 16S y mediante PCR con cebadores específicos (Toranzo *et al.* 2005). No existen tratamientos quimioterápicos efectivos, no obstante Pasnik y Smith (2005) han descrito una vacuna ADN que parece ser efectiva para la prevención de la enfermedad.

▪ **Enfermedades de etiología desconocida**

De las enfermedades de etiología desconocida, la que afecta a los cultivos larvarios es sin duda la más importante en el cultivo de peces planos, pudiendo causar mortalidades de hasta el 70-80% (Wolke *et al.* 2000). La enfermedad, cuyos únicos síntomas son la aparición de altas mortalidades en peces de entre 6 y 40 días, ha sido descrita en especies como el rodaballo, el halibut, la platija de verano o la platija japonesa, y aunque hay evidencias de que las bacterias juegan un papel en las mismas, su etiología parece ser multicausal y sigue sin estar clara

(Ishimaru *et al.* 1996, Ringo & Vadstein 1998, Alves *et al.* 1999, Wolke *et al.* 2000, Bergh *et al.* 2001, Gauger *et al.* 2006).

En lo que respecta al componente bacteriano de las mortalidades, la principal fuente de infección parece estar en la cadena alimentaria, especialmente en los cultivos de artemias, que favorecen la proliferación de bacterias, particularmente *V. alginolyticus* (Planas & Cunha 1999, Schreiber 2001, Villamil *et al.* 2003b, Verner-Jeffreys *et al.* 2004, Planas *et al.* 2006). Entre las especies bacterianas que se han encontrado asociadas a mortalidades en larvas figuran *Aeromonas caviae*, *Aeromonas hydrophila*, *L. anguillarum*, *L. pelagia*, *V. alginolyticus* y *V. splendidus* en rodaballo (Gatesoupe 1990, Munro *et al.* 1995, Ringo & Vadstein 1998, Gatesoupe *et al.* 1999, Villamil *et al.* 2003a, Thomson *et al.* 2005), *Aeromonas salmonicida*, *L. anguillarum*, *V. splendidus* y *T. ovoliticum* en halibut (Bergh *et al.* 2001, 1997), y *V. ichthyenteri* en platija japonesa (Ishimaru *et al.* 1996, Gauger *et al.* 2006).

1.4. TAXONOMÍA BACTERIANA. CLASIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS DE PECES

La taxonomía o sistemática, entendida como la ciencia de la clasificación, constituye hoy día una de las principales disciplinas en microbiología, abarcando subdisciplinas como la filogenia, clasificación, nomenclatura e identificación de los aislados bacterianos (Vandamme *et al.* 1996, Thompson *et al.* 2004). La clasificación consiste en la ordenación de los organismos en grupos taxonómicos basándose en su similitud, mientras que la identificación abarca los procesos que determinarán si un organismo desconocido pertenece a alguno de los grupos taxonómicos ya definidos.

Al igual que en otros ámbitos de las ciencias de la vida (plantas y animales), la especie es la unidad básica en taxonomía bacteriana. Sin embargo, el tradicional concepto biológico de especie (aquella población de organismos que puede entrecruzarse produciendo descendencia fértil y que está aislada reproductivamente de otras poblaciones por causas como por ejemplo el reconocimiento de pareja o la infertilidad) no es aplicable a los procariotas dado que estos se reproducen asexualmente (Roselló-Mora 1999, Madigan *et al.* 2004).

El concepto de especie en procariotas, y por tanto el esquema de clasificación, se ha ido modificando a medida que han ido evolucionando los métodos de obtención de información, pasándose de una taxonomía bacteriana tradicional, basada en los análisis fenotípicos (morfología, fisiología, etc.), a la actual taxonomía polifásica, basada en la utilización de métodos fenotípicos, genotípicos (hibridación genómica, secuenciación de genes, etc.) y filogenéticos (Colwell 1970, Vandamme *et al.* 1996).

En la actualidad, las fronteras de especie se demarcan básicamente en función del grado de similitud genómica obtenido mediante hibridación ADN-ADN, que debe ser de al menos el 70% para miembros de una misma especie. Sin embargo estos deben a su vez mostrar unas características fenotípicas coherentes, por lo que la especie procariota se podría definir como aquel conjunto de cepas, incluyendo la cepa tipo, que muestran un elevado grado de similitud global, fenotípica y genotípica, y que se diferencian considerablemente de otros grupos relacionados en estos dos aspectos (Wayne *et al.* 1987, Roselló-Mora 1999). Los principales métodos utilizados en la caracterización de bacterias, cuyos niveles de resolución taxonómica se muestran en la Figura 2, se describen a continuación.

▪ **Métodos fenotípicos**

Los métodos fenotípicos comprenden todos aquellos que no están dirigidos contra los ácidos nucleicos (ADN y ARN), derivando la información obtenida de las proteínas y sus funciones, de distintos marcadores quimiotaxonómicos (por ejemplo ácidos grasos), así como de un amplio rango de otras características expresadas (morfología, fisiología, serología, etc.). Es importante recordar que el fenotipo es la expresión observable del genotipo, y por tanto depende de las condiciones ambientales, reflejando únicamente una parte de la información genotípica.

– Métodos fenotípicos clásicos y sistemas miniaturizados

La caracterización fenotípica clásica en bacterias comprende el estudio de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas. Las características morfológicas abarcan tanto las propias de la célula (forma, presencia de flagelos, endosporas, tinción Gram, etc.) como las de las colonias (forma, color, tamaño, etc.). Las características fisiológicas y bioquímicas abarcan aspectos como el crecimiento con distintas temperaturas, concentraciones salinas, valores de pH o condiciones atmosféricas, presencia de distintas enzimas, utilización de distintos compuestos, resistencia a agentes quimioterápicos, etc.

Este tipo de pruebas son utilizadas en la mayor parte de los laboratorios de microbiología de forma rutinaria y constituyen una parte esencial en la descripción de cualquier taxón, desde especie o subespecie hasta género o familia, sin embargo presentan también una serie de inconvenientes. Además del cultivo del microorganismo, su realización requiere una considerable cantidad de tiempo y trabajo, y es necesaria una alta estandarización de los procedimientos a fin de que los resultados sean reproducibles, dentro y entre laboratorios, dado que los resultados pueden variar dependiendo de múltiples factores, por ejemplo, por la edad del cultivo o la temperatura de incubación.

Técnica	Familia	Género	Especie	Cepa
Caracterización fenotípica (clásica, API, Biolog..)	■	■	■	■
Análisis de ácidos grasos (FAME)	■	■	■	
Análisis de quinonas	■	■	■	
Análisis de la composición de la pared celular	■	■	■	
Técnicas serológicas (monoclonales y policlonales)				■
Patrones electroforéticos de proteínas celulares totales				■
% G+C		■	■	
Hibridación ADN-ADN		■	■	
Secuenciación ADN	■	■	■	■
Secuenciación ADNr	■	■	■	
Sondas de ADN	■	■	■	■
PCR		■	■	
RFLP				■
PFGE				■
Ribotipado				■
Técnicas de tipado basadas en la amplificación de ADN (AFLP, RAPD, Rep-PCR)				■

Figura 2. Resolución taxonómica de alguna de las técnicas utilizadas para la caracterización de bacterias (Vandamme *et al.* 1996).

La realización de muchas de estas pruebas ha venido facilitada por la aparición de sistemas miniaturizados como las galerías API o el sistema BIOLOG, que incluyen baterías de sustratos deshidratados, iniciándose la reacción (crecimiento, actividad enzimática, etc.) al añadirse un inóculo estandarizado. La identificación se realiza de acuerdo a las bases de datos proporcionadas por el fabricante. Los resultados obtenidos para un mismo test mediante un procedimiento clásico y un sistema miniaturizado pueden en ocasiones diferir, no obstante esto mismo es aplicable a menudo cuando se utilizan dos procedimientos clásicos diferentes (Vandamme *et al.* 1996).

La identificación de bacterias patógenas de peces, basada únicamente en criterios fenotípicos, resulta problemática por varias razones. Muchas de estas especies presentan o una alta variabilidad intraespecífica, o un alto grado de semejanza con especies relacionadas, o son inertes para muchos de los test utilizados de forma rutinaria, siendo difícil o imposible la identificación a nivel de especie. La utilización de claves dicotómicas, como las propuestas por

Alsina & Blanch (1994) y Noguerola & Blanch (2008) para la identificación de bacterias del género *Vibrio*, son de utilidad pero pueden dar resultados engañosos por estas mismas razones (Thompson *et al.* 2004). Asimismo, las discrepancias entre distintos autores para un test dado, relativo a una especie o incluso a una misma cepa no son infrecuentes. Por último, muchas de las especies patógenas de peces no aparecen incluidas en las bases de datos de los sistemas miniaturizados, por lo que estos no serían válidos como herramientas de diagnóstico, aunque sí de caracterización (Toranzo *et al.* 2005).

– Métodos serológicos

Los estudios serológicos en bacterias se basan en la variabilidad de los antígenos (sustancias capaces de provocar la formación de anticuerpos, generalmente proteínas o carbohidratos) presentes en distintos componentes de la célula (cápsula, pared celular, flagelos, moléculas intracelulares, etc.) así como de productos de secreción (enzimas, toxinas, etc.). Entre los antígenos bacterianos más utilizados están los antígenos K (capsular) y H (flagelar), ambos termolábiles, y el antígeno O (somático), termoresistente y que forma parte del lipopolisacárido (LPS) presente en la membrana externa de las bacterias Gram negativas.

De la variedad de métodos serológicos disponibles, uno de los más utilizados en la identificación y diagnóstico de bacterias patógenas de peces son los test de aglutinación. Estos se basan en que al poner en contacto una colonia bacteriana con un suero que contiene anticuerpos específicos frente a esa bacteria, se producirá una aglutinación visible a simple vista debido a la reacción antígeno-anticuerpo. Se trata de un método barato, rápido y específico, que muestra por lo general pocos problemas de reacciones cruzadas (Romalde *et al.* 1995). Existen kits comerciales (por ejemplo los de la marca Bionor) disponibles para varias especies patógenas de peces, como *A. salmonicida*, *L. anguillarum* y *P. damsela* subsp. *piscicida*, entre las descritas en peces planos.

El serotipado es importante también para el diseño de vacunas dado que, al menos en ciertas especies, la variación en el grado de virulencia entre cepas de una misma especie parece estar relacionada con el serotipo al que pertenecen. Por otra parte, esta relación parece estar asociada a los antígenos somáticos termoestables, más que a los antígenos termolábiles (Toranzo *et al.* 1987).

– Métodos quimiotaxonómicos

Los métodos quimiotaxonómicos abarcan aquellos que obtienen información a partir de los constituyentes químicos de la célula. El más utilizado en identificación bacteriana es el

análisis de ácidos grasos o FAME, consistente en la caracterización de los tipos y proporciones de los ácidos grasos presentes en los lípidos de la membrana citoplasmática y de la membrana externa de la pared celular (bacterias Gram negativas). Los ácidos grasos extraídos de hidrolizados celulares se modifican químicamente para formar sus correspondientes metil ésteres, identificándose estos derivados volátiles por cromatografía de gases. El método requiere una estandarización rígida, pero dado que la composición de los ácidos grasos en procariotas es tan variable (se han identificado más de 300 tipos, que se diferencian en la longitud de la cadenas, presencia o ausencia de grupos insaturados, grupos hidroxilos, etc.) el perfil de ácidos grasos de una bacteria particular puede ser útil para su identificación (Vandamme *et al.* 1996, Portal 2003, Madigan *et al.* 2004).

Otros métodos quimiotaxonómicos utilizados son el análisis de la composición de la pared celular y el análisis de las quinonas isoprenoides. Entre los componentes de la pared celular, la determinación del tipo de peptidoglicano es de utilidad en bacterias Gram positivas, habiendo tipos que son específicos de género o especie. En Gram negativas, sin embargo, el tipo de peptidoglicano es bastante uniforme y proporciona poca información (Vandamme *et al.* 1996, Portal 2003). Las quinonas isoprenoides aparecen en las membranas citoplasmáticas de la mayoría de los procariotas. Desempeñan importantes funciones en la célula, por ejemplo en el transporte de electrones, y presentan una importante variabilidad, por lo que se han utilizado para la caracterización de bacterias a distintos niveles taxonómicos (Vandamme *et al.* 1996).

– Análisis de proteínas totales

La comparación de los perfiles de proteínas totales obtenidos mediante electroforesis desnaturante en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) ha probado ser una herramienta útil en la identificación de bacterias, existiendo una correlación entre una alta similitud en los patrones de proteínas totales con los datos obtenidos mediante hibridación ADN-ADN (Costas 1992). El método es rápido y económico, no obstante solo proporciona información útil para la identificación a nivel de especie o de cepa (Vandamme *et al.* 1996).

▪ **Métodos genotípicos**

Los métodos genotípicos son aquellos dirigidos a la obtención de información derivada de los ácidos nucleicos, ADN y ARN. En la actualidad estos métodos dominan los estudios taxonómicos, debido tanto al progreso tecnológico como a que reflejan las relaciones naturales de los distintos taxones bacterianos.

– Determinación del porcentaje guanina citosina (G+C)

La determinación del contenido en guanina y citosina (G+C) del ADN genómico fue una de las primeras aproximaciones para la caracterización de genomas, siendo aún utilizado en la descripción de nuevos taxones. No obstante, su utilidad es limitada ya que no proporciona información sobre la filogenia, y aunque distintos porcentajes de G+C indican diferentes organismos, valores similares no indican que se esté necesariamente trabajando con organismos relacionados. La composición de G+C en procariotas varía considerablemente, desde el 24% al 76%. Por el contrario, la variación intraespecífica no suele ser mayor del 3%, y no más del 10% a nivel de género (Vandamme *et al.* 1996, Ludwig 2007).

– Hibridación ADN-ADN

Los ensayos de hibridación ADN-ADN constituyen una herramienta fundamental en taxonomía bacteriana ya que permiten realizar una estimación de la semejanza de secuencias que presentan dos genomas distintos, siendo por tanto útiles para la diferenciación de organismos estrechamente relacionados que pueden resultar indistinguibles mediante otros métodos, como el análisis fenotípico o la secuenciación del ADNr 16S.

La técnica se basa en las propiedades de desnaturalización y reasociación de los ácidos nucleicos, siendo el objetivo final la cuantificación de la reasociación de cadenas simples de ADN de origen heterólogo. Para ello, los ADNs de los dos microorganismos a ensayar son mezclados y desnaturalizados, quedando el ADN en cadena simple. A continuación se lleva a cabo la reasociación (hibridación) de dichas moléculas, en condiciones astringentes que solo permitan la renaturalización de secuencias complementarias. A mayor similitud de secuencias de los ADN de los dos microorganismos, mayor cantidad de híbridos heterólogos (heteroduplex) se formarán. Se han desarrollado una variedad de protocolos y formatos, que miden la cantidad de híbridos heterólogos, la cinética de la hibridación heteróloga, o la estabilidad de los híbridos heterólogos (Portal 2003, Ludwig 2007).

Los resultados se expresan en porcentaje de hibridación o en diferencias en grados centígrados de temperatura de fusión homólogo-híbrido (diferencia en el punto medio de desnaturalización térmica, ΔT_m). El primer concepto refleja la cantidad relativa de los heterodúplex respecto de los homodúplex, que se considera que representan una reasociación del 100%. El segundo concepto se refiere a la estabilidad térmica del ADN de doble cadena, siendo la temperatura media de fusión aquella a la que se desnaturaliza el 50% del ADN de doble cadena (Portal 2003).

Aunque no se ha establecido ningún acuerdo sobre el grado de hibridación entre dos DNAs necesario para asignar a dos organismos el mismo rango taxonómico, se recomiendan valores de hibridación del 70% o superiores, o una ΔT_m inferior a 5°C, para asignarlos a una misma especie, y se requieren valores de al menos el 20-30% para incluirlos en un mismo género (Wayne *et al.* 1987, Roselló-Mora 1999, Madigan *et al.* 2004).

Entre las desventajas que presentan estos ensayos es que son largos y tediosos, presentan un importante nivel de error experimental y los resultados no son acumulativos, no siendo posible la comparación de los resultados obtenidos en distintos ensayos ni la creación de bases de datos (Roselló-Mora 2006).

– Análisis comparativo de secuencias de ADN

La comparación de secuencias de ADN constituye una herramienta indispensable en taxonomía polifásica, aplicándose para la identificación y clasificación de bacterias al tiempo que aportan información sobre las relaciones filogenéticas de los microorganismos. Los ácidos nucleicos son macromoléculas que experimentan cambios en el transcurso del tiempo, por lo que pueden ser consideradas como relojes o cronómetros moleculares, medidores del cambio evolutivo. Para que una determinada molécula de ADN pueda ser considerada como marcador evolutivo debe cumplir varios requisitos, como estar universalmente distribuida, que sea funcionalmente homóloga en todos los organismos, que permita la realización de alineamientos (incluyendo zonas conservadas y zonas variables) y que cambie con una velocidad proporcional a la distancia filogenética que se va a determinar (Madigan *et al.* 2004).

Los cronómetros más ampliamente utilizados en la actualidad son los genes de los ARN ribosómicos (ADNr). En procariotas, el ribosoma consta de tres ARNr, de tamaños 5S, 16S y 23S (S indica unidades de masa “Svedberg”). La primera molécula ARNr en ser secuenciada en un número importante de bacterias fue el 5S (Wolters & Erdmann 1988), sin embargo hoy día la principal herramienta filogenética en bacterias, utilizada de forma universal, la constituye la secuenciación del gen que codifica el ARNr 16S (ADNr 16S). La utilización del ARNr 16S fue introducida a principios de la década de 1970 y su impacto ha sido tal que los dos tratados fundamentales de bacteriología, el *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* y *The Prokaryotes*, basan la estructuración del mundo procariota en las relaciones filogenéticas establecidas con esta macromolécula, al tiempo que su utilización, junto con su homólogo en eucariotas, el ARNr 18S, ha propiciado la distribución de todos los organismos celulares en tres dominios (*Bacteria* y *Archaea*, procariotas, y *Eukarya*, eucariotas).

El ARNr 16S está presente en todas las bacterias y está compuesto por dominios altamente conservados y otros variables, siendo de gran utilidad para la identificación a nivel de

género y las comparaciones entre bacterias alejadas filogenéticamente. Sin embargo, debido a su alta conservación a lo largo de la evolución, aunque el ADNr es útil para la identificación a nivel de especie, su resolución a este nivel es menor, pudiendo presentar especies relacionadas secuencias prácticamente idénticas, con porcentajes de similitud por encima del 99%. Aunque no es posible establecer unos valores numéricos de similitud de secuencias de ADNr 16S como frontera de una especie bacteriana, Stackebrandt & Ebers (2006) establecieron, tras comparar los resultados de hibridaciones ADN-ADN y el análisis de secuencias ADNr 16S, que cepas de una misma especie deben compartir al menos un 98,7% de similitud en la secuencia del ADNr 16S, en vez del valor del 97% propuesto previamente por Stackebrandt & Goebel (1994).

En bacterias, los genes de los ARNr 16S y 23S están separados por una región espaciadora que se transcribe junto con los genes ribosomales y que ha sido también ampliamente utilizada en estudios taxonómicos. Esta región, denominada espaciador interno transcrito (ITS1), está sometida a una menor presión evolutiva que los genes ribosómicos ya que es eliminada en el proceso de maduración del ARNr, por lo que presenta una tasa de evolución más rápida y un alto grado de variabilidad entre especies e incluso entre cepas de una misma especie. Por otra parte, muchas especies poseen varios operones ribosomales en sus genomas, por lo que incluso dentro de una cepa se pueden presentar distintos tipos de ITS1. La variabilidad de los ITS1 viene dada por diferencias tanto de tamaño como de secuencia, debidas principalmente a que estas regiones pueden incluir distintas combinaciones, en número y tipo, de genes que codifican ARN de transferencia (ARNt). Por otro lado, los ITS1 a menudo presentan una composición modular que alterna bloques de secuencias (variables o conservadas), que se cree se debe a procesos de recombinación homóloga (Osorio *et al.* 2005, Stewart & Cavanaugh 2007).

Otros marcadores moleculares de interés en microbiología son los genes que codifican proteínas esenciales para el funcionamiento general de las células, los llamados genes “housekeeping”. Entre estos están el *recA*, el *rpoB*, el *rpoD* y el *gyrB*, que codifican para la proteína multifuncional *recA*, las subunidades beta y sigma 70 de la ARN polimerasa, y la subunidad beta de la ADN girasa, respectivamente. Estos genes tienen tasas de cambio más bajas que otros genes codificantes para proteínas, pero mayores que las de los genes ARNr, por lo que muestran un grado de resolución mayor que el ADNr 16S y son más apropiados que este para la diferenciación de especies próximas. Por otra parte, los resultados obtenidos con estos marcadores suelen ser congruentes con los obtenidos mediante hibridación ADN-ADN (Mulet *et al.* 2010, Yamamoto *et al.* 1999), y dado que su análisis es fácil, rápido y altamente reproducible, constituyen una alternativa a la hibridación ADN-ADN a la hora de asignar aislados bacterianos a especies (Zeigler 2003).

Otra alternativa a la hibridación ADN-ADN la constituye el análisis de secuencias multilocus o MLSA, consistente en la utilización de las secuencias concatenadas de varios

genes “housekeeping” para la realización de los análisis filogenéticos. Los datos del MLSA pueden almacenarse en bases de datos, son comparables entre sí, fácilmente reproducibles y muestran una buena correlación con los resultados de la hibridación ADN-ADN, mostrando ser de utilidad para la identificación y estudio de la filogenia dentro de distintos géneros, como por ejemplo *Ensifer*, *Pseudomonas* y *Vibrio* (Stackebrand *et al.* 2002, Thompson *et al.* 2005, Gevers *et al.* 2005, Martens *et al.* 2008, Mulet *et al.* 2010). En principio, divergencias de más del 3% en la identidad de nucleótidos al utilizarse esta técnica implicaría que las cepas comparadas pertenecen a especies diferentes (Roselló-Mora 2009). No obstante, en el futuro será la secuenciación de genomas completos la que aportará una indicación exacta de las relaciones evolutivas de las distintas especies de microorganismos.

– Métodos de tipificación genotípicos

En las últimas décadas se ha desarrollado toda una variedad de métodos de tipado molecular basados en la generación y visualización de fragmentos de ADN, presentando una reproducibilidad y poder de discriminación mayor que el observado con los métodos fenotípicos.

Los fragmentos de ADN, generados mediante la utilización de enzimas de restricción o bien mediante amplificación por PCR, se separan por electroforesis, obteniéndose patrones de bandas que permiten la diferenciación de los microorganismos (Vandamme *et al.* 1996, Tang *et al.* 1997, Altinok & Kurt 2003, Ludwig 2007). Entre las técnicas que se basan en la utilización de enzimas de restricción están los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y el ribotipado, en el que los fragmentos generados se revelan mediante sondas de ARN ribosómico. Entre los basados en la PCR está la amplificación aleatoria del ADN (RAPD), con cebadores que hibridan aleatoriamente en el genoma, y la reacción en cadena de la polimerasa de elementos repetitivos (rep-PCR).

Aunque la mayor parte de estas técnicas se utilizan para el tipado de aislados pertenecientes a una misma especie, en ciertos casos han sido también utilizadas con éxito como sistemas de identificación. Entre estas, las más importantes son la rep-PCR ya mencionada y la técnica de polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

La rep-PCR se basa en la amplificación, mediante cebadores específicos, de las regiones comprendidas entre secuencias repetitivas altamente conservadas que se dan en un gran número de bacterias, aunque en número y localización variable, como son las secuencias ERIC, de 123 pb (ERIC-PCR), o las secuencias REP, que tienen un tamaño de 38 pb y una frecuencia mucho menor que las secuencias ERIC (REP-PCR). Es una técnica sencilla, barata y con alto poder de discriminación (Versalovic *et al.* 1991).

La técnica del AFLP se basa en la amplificación por PCR de fragmentos de ADN obtenidos por restricción enzimática del ADN genómico, dado que los fragmentos de restricción son ligados a adaptadores que proporcionan las dianas para los cebadores durante la PCR. Los cebadores tienen bases adicionales selectivas que reducen el número de dianas al que se unen correctamente, dando patrones de bandas menos complejos que otras técnicas como los RFLP o RAPD. Es una técnica más laboriosa y costosa que las demás, pero posee una mayor reproducibilidad y poder de discriminación, habiéndose descrito un buen número de especies de la familia *Vibrionaceae* basándose en estudios AFLP, con resultados que concuerdan con los de la hibridación ADN-ADN (Vandamme *et al.* 1996, Ludwig 2007, Beaz-Hidalgo 2008).

– Identificación mediante PCR con cebadores específicos

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR es una técnica desarrollada por Kary Mullis en 1983 (Mullis *et al.* 1986) que permite amplificar de manera selectiva fragmentos del ADN de un determinado organismo, siempre y cuando se conozcan las secuencias de nucleótidos que flanquean la región a amplificar (Portal 2003). Por su rapidez, especificidad y sensibilidad, la PCR se ha convertido en una técnica de gran aplicación en la identificación de microorganismos, resultando de gran utilidad en los casos en los que la caracterización fenotípica no es concluyente o cuando el aislamiento del microorganismo es difícil. Además, permiten la realización de un diagnóstico rápido del agente patógeno para poder iniciar el tratamiento específico lo antes posible.

La detección de bacterias patógenas mediante PCR se desarrolla en varias etapas. En primer lugar debe extraerse el ADN de la muestra (cultivos bacterianos, sangre o tejidos de peces infectados, muestras de agua, etc.). A continuación tiene lugar la amplificación en sí, que se desarrolla en tres fases. En la primera fase (desnaturalización), el ADN de la muestra es desnaturalizado, de forma que se encuentre en forma de cadena sencilla. Esto se consigue aplicando temperaturas de 90-95°C que producen la rotura de los puentes de hidrógeno intercatenarios, separándose las dos hebras de ADN. Este paso se mantiene unos minutos para conseguir la completa desnaturalización de toda la muestra. En la siguiente fase (hibridación o anillamiento) se baja la temperatura hasta un rango de 40-60°C, permitiendo que los cebadores o primers (oligonucleótidos sintéticos de unos 15-20 nucleótidos que son complementarios a las zonas que flanquean la región que se quiere amplificar) se apareen con las secuencias homólogas del ADN de la muestra. En la tercera fase (extensión) la enzima ADN polimerasa sintetiza la nueva cadena de ADN, incorporando nucleótidos en el extremo 3' del cebador, utilizando como molde la cadena de ADN previamente desnaturalizada. La ADN polimerasa más frecuentemente utilizada es la *Taq* polimerasa, una enzima aislada de la bacteria termófila

Thermus aquaticus, capaz de crecer a temperaturas de 79-85°C. La fase de extensión suele realizarse a 72°C, debido a que a esta temperatura la *Taq* polimerasa alcanza su mayor actividad. La elevada temperatura óptima de esta enzima permite la utilización de altas temperaturas para la unión de los cebadores y para la extensión, contribuyendo a una mayor especificidad de la reacción. Estas tres fases se repiten un número determinado de veces (25-40), consiguiéndose de esta manera un incremento exponencial del número de copias del fragmento de ADN delimitado por los cebadores (amplificación) (Tang *et al.* 1997, Portal 2003). Finalizada la amplificación, los amplicones se separan por tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa, y se visualizan con tinción de bromuro de etidio o similares y luz UV.

En acuicultura se han desarrollado protocolos específicos para el diagnóstico de un gran número de patógenos de peces, incluyendo especies problemáticas para el cultivo de peces planos como *A. salmonicida*, *L. anguillarum*, *M. marinum*, *P. anguilliseptica*, *P. damsela*, *S. iniae*, *T. maritimum* o *V. harveyi* (Buller 2004, Pang *et al.* 2006), utilizándose para ello una gran variedad de dianas (ADNr 16S, región ITS1, genes “housekeeping” como el *gyrB*, etc.). Aunque la mayor parte de los protocolos descritos se basan en la utilización de la PCR convencional y sirven para la detección de un único microorganismo, también se han desarrollado protocolos que permiten la detección simultánea de varios patógenos (PCR múltiple), así como protocolos mediante PCR en tiempo real (Del Cerro *et al.* 2002b, Romalde 2005). No obstante, dado que en la PCR la identificación se realiza en función del tamaño del ADN amplificado, incluso en una PCR múltiple el número de patógenos que puede detectarse simultáneamente es limitado (generalmente no mayor de seis) dada la dificultad de discriminar el tamaño de los amplicones mediante electroforesis convencional.

– Métodos basados en la utilización de sondas de ADN

Junto con los protocolos de PCR específicos de especie, los métodos basados en la utilización de sondas de ADN constituyen hoy día las principales herramientas para la identificación rápida de patógenos, utilizándose a distintos niveles taxonómicos. Entre las técnicas más utilizadas están la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), los microarrays o chips de ADN y la hibridación reversa en línea o hibridación “reverse line blot” (RLB).

La técnica FISH fue desarrollada en la década de 1980. Tras la fijación y permeabilización de las células bacterianas, estas son identificadas *in situ* en la muestra original, al hibridar intracelularmente las sondas marcadas con fluorocromos con las dianas (generalmente ADNr). Sondas con distintas especificidades se pueden marcar con distintos fluorocromos, permitiendo la identificación de varios patógenos en una misma muestra (Ludwig 2007).

En los microarrays de ADN, las sondas específicas son fijadas a superficies sólidas, generalmente de vidrio. A continuación los productos de PCR o ADN genómico obtenidos a partir de la muestra de interés son marcados e hibridados con las sondas, detectándose las hibridaciones mediante fluorescencia. Además de para la identificación de microorganismos, los microarrays han sido utilizados ampliamente en estudios de expresión génica y en ecología. En acuicultura, se han desarrollado varios protocolos que permiten la detección simultánea de un número importante de patógenos, como *A. salmonicida*, *L. anguillarum*, *P. damsela* subsp. *damsela*, *T. maritimum*, *M. marinum*, *S. iniae* o *Yersinia ruckeri* (Warsen *et al.* 2004, González *et al.* 2004).

Otra técnica basada en el uso de sondas es la hibridación RLB, descrita originalmente por Kaufhold *et al.* (1994). En esta técnica, las sondas son unidas a membranas de nylon formando líneas paralelas (no puntos). Durante la hibridación, los productos de PCR marcados, obtenidos a partir de las muestras de interés, se colocan en líneas perpendiculares a las sondas, con lo que se pueden testar simultáneamente múltiples muestras con múltiples sondas (hasta 43, según el modelo de miniblottedter utilizado). Se trata de un método más sencillo de realizar, barato y flexible que los microarrays de ADN (Kong & Gilbert 2006), que ha sido utilizado con éxito para la detección de múltiples virus, bacterias y hongos (Zwart *et al.* 2003, Coiras *et al.* 2005, Zeng *et al.* 2007), aunque no hay protocolos disponibles para la identificación de patógenos de peces.

La principal ventaja de estas técnicas frente a la PCR con cebadores específicos radica en que permiten, especialmente en el caso de los microarrays y la hibridación RLB, la identificación simultánea de un número elevado de microorganismos, presentando como desventajas que son más laboriosas y costosas.

2. OBJETIVOS

Los objetivos perseguidos en la realización de este trabajo fueron los siguientes:

1. Caracterización e identificación de bacterias aisladas asociadas a episodios de mortalidad en cultivos de tres especies de peces planos de interés en acuicultura: acedía (*D. cuneata*), rombo (*S. rhombus*) y lenguado senegalés (*S. senegalensis*).
2. Evaluación de la virulencia de los aislados obtenidos, mediante la realización de ensayos por inmersión e inyección intraperitoneal con cepas representativas.
3. Desarrollo de métodos moleculares de identificación rápida basados en la técnica de la PCR y en la hibridación RLB, dirigidos contra los principales patógenos bacterianos encontrados. Evaluación de su eficacia con cultivos bacterianos puros y de su aplicabilidad para la detección directa de los patógenos en tejidos de peces.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ASOCIADAS A EPISODIOS DE MORTALIDAD

▪ Muestreos

Los muestreos se realizaron durante los años 2004-2007 y afectaron a cultivos de distintas edades (larvas, alevines, juveniles y adultos) de tres especies de peces planos: acedía (*D. cuneata*), rombo (*S. rhombus*) y lenguado senegalés (*S. senegalensis*), que presentaban episodios de mortalidad. En algún caso también fueron muestreados peces aparentemente sanos y cultivos de artemias o rotíferos.

Las muestras se obtuvieron a partir de 3 piscifactorías situadas a lo largo de la costa de Huelva. La piscifactoría A (IFAPA Centro *Agua del Pino*), de donde se obtuvieron la mayor parte de las muestras, está situada en Cartaya y se trata de una instalación experimental donde se cultivan moluscos, cefalópodos y peces, mantenidos en la mayor parte de los casos a una temperatura constante de 20°C. Las piscifactorías B y C, situadas en Isla Cristina y Punta Umbría respectivamente, son instalaciones comerciales dedicadas al cultivo exclusivo de peces, incluyendo especies como la lubina y la dorada.

▪ Aislamiento de bacterias asociadas a episodios de mortalidad

Las muestras se tomaron en el momento de las mortalidades, en la mayor parte de los casos a partir de peces aún vivos. Las larvas, muestreadas en grupos de 10-30 individuos según su edad, fueron sumergidas en povidona yodada (Betadine) durante 10-15 min y entonces lavadas, trituradas y homogeneizadas en agua de mar estéril. A partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas que fueron sembradas en medio FMM (Pazos *et al.* 1996). Las muestras de rotíferos y artemias fueron diluidas y sembradas en el mismo medio de cultivo.

El aislamiento bacteriano a partir de alevines, juveniles y adultos se realizó por siembra directa en FMM a partir de lesiones externas, hígado y riñón, tras lavar la superficie del pez con etanol 70%. Las placas se incubaron a una temperatura de 20°C, durante 1-7 días. Las resiembras se realizaron en FMM en el caso de las cepas de *T. maritimum* y en medio TSA (Difco) con agua de mar (TSA-SW) en los demás casos, hasta la obtención de cultivos puros. En los casos en que los peces presentaban lesiones externas se realizaron improntas con portaobjetos, que fueron teñidas con azul de metileno (Panreac) y observadas al microscopio.

Los aislados bacterianos obtenidos fueron conservados a -80°C en una solución de agua de mar estéril con glicerol al 20%.

3.2. ESTABLECIMIENTO DE FENONES Y EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA

▪ Establecimiento de fenones

Los aislados obtenidos se sometieron a una caracterización fenotípica preliminar con el fin de ser clasificados en fenones o grupos de aislados fenotípicamente similares. Los caracteres utilizados fueron: morfología celular, morfología de la colonia, carácter Gram, oxidasa, catalasa, movilidad, test de actividad metabólica oxidativa/fermentativa (OF), crecimiento en agar TCBS, requerimiento de agua de mar para el crecimiento, indol, arginina dihidrolasa, lisina y ornitina decarboxilasa, sensibilidad a los agentes quimioterápicos O129, novobiocina y ampicilina, así como las pruebas incluidas en el sistema miniaturizado API 20E (bioMérieux). La realización de estos test se explica en detalle en la parte 3.3 de este trabajo. Con los datos fenotípicos obtenidos se realizó un dendrograma, utilizando el programa MEGA v.3.0 y el algoritmo UPGMA.

▪ Evaluación de la virulencia de los aislados

La virulencia de los aislados se estimó mediante un ensayo por inyección intraperitoneal de una dosis fija de 10^6 UFC/pez, utilizando representantes de los principales fenones encontrados. Los fenones virulentos fueron sometidos a ensayos por inmersión con una dosis fija de 10^7 UFC/ml. Finalmente, el grado de virulencia, expresado como dosis letal 50 (DL_{50}), fue determinado únicamente en aquellos fenones que provocaron mortalidad por las dos rutas de infección utilizadas. En algún caso se realizaron además otros ensayos adicionales.

– Preparación de los inóculos

Las cepas utilizadas fueron crecidas en caldo FMM a 20°C, recolectadas por centrifugación a 13.200 rpm durante 2 min, lavadas en PBS estéril y finalmente resuspendidas en PBS (y posteriormente en agua de mar filtrada en el caso de los ensayos por inmersión) en la concentración adecuada.

La concentración bacteriana en los cultivos se estimó mediante lectura de la densidad óptica o absorbancia a 600 nm (Abs_{600}) con un espectrofotómetro NanoDrop 1000. Los valores de absorbancia se interpretaron de acuerdo a una curva patrón previamente obtenida, considerándose que un cultivo en fase exponencial con una Abs_{600} de 0,5 tiene una concentración bacteriana de aproximadamente 10^8 UFC/ml. Para determinar si la dosis real de

bacterias en el inóculo era la correcta se realizaron diluciones decimales seriadas de la suspensión original, sembrándose 0,1 ml de cada una de estas en placas de FMM.

– Ensayos por inyección intraperitoneal con una única dosis

Para cada cepa ensayada se utilizaron dos grupos de 10 peces (acedías): uno de alevines con un peso aproximado de 2 g y otro de juveniles con un peso de aproximadamente 15 g, todos ellos procedentes de la piscifactoría A y aparentemente sanos. Los peces fueron anestesiados con fenoxietanol (diluido 1:1000) e inoculados intraperitonealmente con una única dosis de 10^6 UFC/pez, en un volumen de 0,05-0,1 ml. Como control se utilizaron peces inoculados con PBS estéril. Los peces se mantuvieron sin alimentación en tanques de 18 l en circuito abierto a 20°C, con flujo continuo de agua de mar sometida a filtración y tratamiento con luz ultravioleta, y aireación constante. Las muertes se registraron diariamente durante un periodo de 18 días. Los animales muertos fueron retirados de los tanques y examinados con vistas a la recuperación del patógeno a partir de órganos internos.

– Ensayos por inmersión con una única dosis

Para cada cepa se utilizaron 1-2 grupos de 10 alevines de acedía de aproximadamente 4 g de peso. Los peces se mantuvieron en una suspensión bacteriana con 10^7 UFC/ml, en vasos de precipitados de 600 ml con aireación y a 20°C, durante 18 h de acuerdo al procedimiento descrito por Avendaño-Herrera *et al.* (2006a). Se incluyó también un grupo control. Tras la exposición los peces fueron trasladados a tanques de 18 l, manteniéndose durante 18 días en las mismas condiciones descritas para los ensayos por inyección intraperitoneal.

En el caso de ciertos aislados, se realizó también un ensayo con larvas de acedía de 20 días. Las condiciones fueron básicamente las mismas, pero en este caso los grupos estaban compuestos por 100 larvas, la dosis bacteriana fue menor (10^6 UFC/ml) y el ensayo tuvo una duración de 5 días.

– Cálculo de la dosis letal 50 (DL₅₀)

La DL₅₀ se define como la cantidad mínima de bacterias que, administradas por una ruta de infección adecuada a animales susceptibles, son necesarias para provocar la muerte de la mitad de estos, al término de un periodo de tiempo dado.

Para calcular la LD₅₀ los peces fueron mantenidos durante 18 h en suspensiones bacterianas de 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 UFC/ml. Para cada dosis se ensayaron simultáneamente dos

grupos de 10 alevines de acedía de 1 g. En cada ensayo se incluyó un grupo control. Tras la exposición los peces fueron trasladados a tanques de 18 l, manteniéndose durante 10 días en las condiciones ya descritas. Finalizado el ensayo, se calculó la media de mortalidad obtenida en cada dosis, utilizándose estos valores para el cálculo de la DL_{50} . En el caso de *P. damselae* subsp. *piscicida*, la DL_{50} fue calculada también mediante inyección intraperitoneal de distintas dosis de bacteria (10^1 - 10^4 UFC/pez) en alevines de 3 g. La determinación de la DL_{50} se realizó con el método de Reed & Muench (1938) como se detalla a continuación:

1. Cálculo de los porcentajes de mortalidad: en primer lugar, se anota el número de peces vivos y muertos observados en cada una de las dosis ensayadas. A continuación se hace el cálculo acumulativo de vivos y muertos en cada grupo, acumulando los vivos de dosis mayor a menor y los muertos en sentido inverso. A partir de estos datos se calcula el porcentaje de mortalidad de cada una de las dosis.
2. Cálculo del factor de proporcionalidad (P), mediante la siguiente formula: $P = (\text{porcentaje de mortalidad superior al } 50\%) - 50 / (\text{porcentaje de mortalidad superior al } 50\%) - (\text{porcentaje de mortalidad inferior al } 50\%)$.
3. Al logaritmo de la dosis que mostró el porcentaje de mortalidad por encima del 50% se le resta el valor del factor de proporcionalidad. El antilogaritmo del valor resultante es la DL_{50} .

3.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS FENONES

▪ Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para identificar las bacterias asociadas a los episodios de mortalidad estudiados se realizó una caracterización en mayor profundidad de aislados representativos de cada uno de los fenones establecidos, así como de algunas de las cepas no incluidas en los mismos. También se utilizaron cepas de referencia provenientes de distintas colecciones de cultivo. Todas las cepas se sembraron en TSA-SW, salvo las de *T. maritimum* que se crecieron en FMM, incubándose a 20°C.

▪ Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de los aislados se llevó a cabo utilizando simultáneamente métodos convencionales de cultivo en tubo y placa, siguiendo los protocolos descritos por Mc

Faddin (1980) y Smibert & Krieg (1981), así como los sistemas miniaturizados API 20E, API 20NE, API ZYM (bioMérieux), y el sistema de identificación microbiana BIOLOG (BIOLOG).

– Metodología clásica

Las pruebas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas utilizadas para la identificación de los aislados mediante métodos clásicos se indican a continuación. Los periodos de incubación fueron de 48 h, si no se indica otro periodo, a una temperatura de 20°C. La composición de los medios de cultivo y reactivos utilizados se detalla en el Anexo I.

- *Morfología y movilidad celular*: se determinaron mediante observación directa al microscopio de contraste de fases de una suspensión bacteriana en PBS, obtenida a partir de un cultivo fresco en placa.
- *Gram*: se determinó mediante el método propuesto por Buck (1982). Se disgrega con un asa una colonia de un cultivo joven en un portaobjetos y se añaden unas gotas de KOH al 3%. Las bacterias Gram negativas producen un aumento de la viscosidad de la solución, las Gram positivas no.
- *Oxidasa*: se realizó mediante el método de Kovacs (1956). Esta prueba se utiliza para determinar la presencia de la enzima citocromo-oxidasa, que cataliza la oxidación del citocromo C, utilizando oxígeno molecular (O₂) como aceptor de electrones. Sobre un papel de filtro impregnado con el reactivo de Kovacs (bioMérieux) se deposita una colonia de un cultivo joven. En presencia de oxígeno atmosférico, la enzima oxida la fenilenediamina del reactivo a un compuesto violeta, el indofenol, en unos 10-30 s. La aparición de este color en torno a la colonia al cabo de ese tiempo indica una prueba positiva. La enzima se da en organismos aerobios pero no en anaerobios estrictos.
- *Catalasa*: la presencia de esta enzima, que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno, se determinó resuspendiendo una colonia en unas gotas de peróxido de hidrógeno al 3%. La formación de burbujas indica la presencia de la enzima.
- *Oxidación-fermentación de la glucosa (OF)*: se realizó utilizando el medio basal OF de Hugh & Leifson (1953) pH 6,8 (Difco) suplementado con glucosa (1%), extracto de levadura (0,1%) y utilizando agua de mar estéril en vez de agua destilada. Para evitar la caramelización del azúcar el medio fue autoclavado a 110°C durante 10 min. Con

bacterias de la familia *Flavobacteriaceae* también se utilizó el medio ZOF, adaptado para bacterias marinas (Lemos *et al.* 1985). El microorganismo es inoculado en dos tubos con el medio, uno de los cuales es mantenido en aerobiosis, mientras el otro se mantiene en condiciones anaeróbicas mediante la adición de vaselina estéril (Panreac). Si el microorganismo cataboliza la glucosa por fermentación, producirá ácido a partir de la misma independientemente de la presencia de oxígeno, con lo que el color del medio virará a amarillo en los dos tubos. En ambos tubos se podrá ver asimismo crecimiento. Si tiene metabolismo oxidativo, únicamente virará y se verá crecimiento en el tubo mantenido en condiciones aerobias. Si la bacteria no utiliza la glucosa como fuente de carbono, ninguno de los tubos virará.

- *Decarboxilación de aminoácidos*: se utilizó el medio base Decarboxilasa de Moeller (Moeller 1955) (Difco), añadiéndole los aminoácidos L-arginina, L-lisina o L-ornitina a una concentración final del 1%, usando agua de mar estéril en vez de agua destilada, y ajustándose el pH a 6. Con esta prueba se pone de manifiesto la capacidad de un microorganismo para realizar la decarboxilación enzimática de un aminoácido produciendo aminas, con la consiguiente alcalinización del medio. La reacción ocurre en anaerobiosis, por lo que los tubos van sellados con vaselina. Tras la incubación, la presencia de turbidez y la alcalinización del medio (viraje a color púrpura o violeta) indican una reacción positiva. La reacción es negativa si no se producen cambios o el medio vira a amarillo (acidificación debida a la fermentación de la glucosa).
- *Utilización del citrato*: se realizó en el medio Citrato de Simmons (Simmons 1926), en tubos de agar inclinados. Con esta prueba se determina la capacidad de un microorganismo para utilizar el citrato sódico como única fuente de carbono. Su utilización provoca una alcalinización del medio, virando el medio a azul.
- *Producción de indol*: esta prueba permite detectar la enzima triptofanasa, que actúa sobre el aminoácido triptofano produciendo indol y alanina. El microorganismo se inocula en caldo de triptona, con un alto contenido en triptofano. Tras la incubación, la adicción del reactivo de Kovacs (Kovacs 1928) (Panreac) permite detectar el indol generado mediante la aparición de un anillo rojo en la parte superior del tubo. Si el anillo es de color amarillo la prueba es negativa.
- *Prueba del rojo metilo*: el metabolismo de la glucosa en bacterias puede seguir varios ciclos, uno de los cuales es la fermentación ácido mixta, en la que los productos finales son ácidos orgánicos (ácidos fórmico, acético, láctico, etc.). Estos provocan un fuerte descenso del pH inicial del medio que puede detectarse mediante el indicador rojo de

metilo. Para la realización de esta prueba, el microorganismo se inocula en el medio de Clark & Lubs (1915), incubándose como mínimo durante 48 h (un periodo de incubación menor puede dar lugar a falsos positivos). Se añaden unas gotas de rojo de metilo al medio. Si este vira a rojo, la prueba es positiva, si permanece amarillo es negativa.

- *Prueba de Voges-Proskauer*: otra vía de degradación de la glucosa es la fermentación butano-diolica, en la que se produce 2,3 butanediol (neutro) como principal producto terminal. La prueba se basa en la detección de la acetoína, un compuesto intermediario en esta ruta. El microorganismo se incuba en el medio de Clark & Lubs (1915), tras lo cual se añaden los reactivos VP de Barrit (VP1 y VP2, por este orden). El resultado se considera positivo si al cabo de 10-15 min aparece una coloración marrón-rojiza en la parte superior del tubo.
- *Gas de glucosa*: con esta prueba se determina la producción de ácido y gas en el metabolismo de la glucosa. Se inocula el microorganismo en caldo base rojo fenol con glucosa al 1% y una campana de Durham. La producción de ácido provoca el viraje del medio a amarillo. La aparición de burbujas en la campana indica la producción de gas.
- *Producción de ácido a partir de azúcares*: con esta prueba se determina si la bacteria es capaz de producir ácido al utilizar distintos azúcares. Se utilizó el medio OF descrito por Hugh & Leifson (1953) modificado, con una mayor concentración de agar y distribuido en placas. Los azúcares utilizados fueron manosa, manitol, sorbitol, arabinosa, sacarosa, celobiosa, lactosa y salicina, a una concentración final del 1% (0,5% en el caso de la salicina). Tras una incubación de 24 h, si el azúcar es utilizado, el medio se acidifica, virando a amarillo.
- *Reducción de nitratos*: sirve para determinar la capacidad de un microorganismo de reducir el nitrato (NO_3^-) en nitrito (NO_2^-). Este último puede a su vez ser reducido a nitrógeno libre (N_2) gaseoso (desnitrificación). Para la realización de la prueba, se inocula la bacteria en el caldo nitrato. Con aislados de la familia *Flavobacteriaceae*, este se hizo con agua de mar estéril. Tras una incubación de 24 h, se adicionan los reactivos A y B de Griess-Ilosvay, que reaccionan con el nitrito dando una coloración roja (prueba positiva). Si la prueba resulta negativa se añade al tubo polvo de zinc, que reduce el nitrato a nitrito. Si la bacteria no redujo el nitrato del medio, tras la adición del zinc aparecerá una coloración rojiza. Si no se desarrolla color, el nitrato fue reducido a nitrito y este a su vez en nitrógeno libre (detectable con una campana de Durham).

- *Hidrólisis de la gelatina*: con esta prueba se determina la capacidad de producir enzimas proteolíticas que licúan la gelatina (gelatinasas). Como medio basal se usó TSA-2 o FMM (familia *Flavobacteriaceae*), añadiéndosele gelatina al 0,4%. Tras la incubación se inunda la placa con el reactivo de Frazier (Frazier 1926), que provoca la precipitación de proteínas. La aparición de halos más claros en torno a las colonias indica que la gelatina ha sido hidrolizada.
- *Hidrólisis del almidón*: se utiliza para determinar la presencia de la enzima amilasa, necesaria para que la bacteria pueda utilizar el almidón. Los aislados fueron sembrados en TSA-2 o FMM (familia *Flavobacteriaceae*) suplementado con almidón al 0,4%. Tras la incubación, se inunda la placa con lugol, que tiñe de color violeta el almidón. La aparición de halos en torno a las colonias indica un resultado positivo.
- *Lipasa*: para detectar la presencia de enzimas lipasa. Se llevó a cabo utilizando TSA-2 o FMM (familia *Flavobacteriaceae*) suplementado con tween 80 al 1% y CaCl₂ al 0,01%. El tween 80 y el medio base se esterilizan por separado, mezclándose a continuación. Tras una incubación de al menos 48 h, la aparición de un halo opaco (cristales de oleato cálcico) en torno a las colonias indica un resultado positivo.
- *Hidrólisis de la esculina*: se utiliza para determinar la capacidad de un organismo de hidrolizar el glucósido esculina a esculetina y glucosa. Se utilizaron placas de AN o FMM con esculina al 0,1% y citrato férrico al 0,05%. La aparición de un halo negrozco en torno a la colonia, debido a que la combinación de la esculetina con los iones hierro lleva a la formación de un complejo de color marrón oscuro-negro, se considera un resultado positivo.
- *Hidrólisis de la caseína*: para detectar la enzima caseinasa, que cataliza la hidrólisis de la proteína caseína en aminoácidos. Se utilizó AN suplementado con caseína al 2%. Para preparar este medio se preparan dos soluciones de igual volumen concentradas al doble, una de leche descremada (4%) y la otra de AN-1, que se esterilizan separadamente, mezclándose a continuación. La aparición de halos claros en torno a las colonias tras la incubación se considera como resultado positivo.
- *Hidrólisis de la urea*: se utiliza para detectar la enzima ureasa, que cataliza la hidrólisis de la urea formando dos moléculas de amoníaco. Se utiliza el medio urea de Christensen, sin agar. Debido a que se degrada con el calor, la urea se esteriliza separadamente por filtración (Millipore 0,45μ), añadiéndose al medio de cultivo, ya autoclavado, una vez que este se ha enfriado (50°C). La incubación puede prolongarse entre 1-6 días. La

producción de amoníaco por los microorganismos ureasa positivos provoca una alcalinización del medio de cultivo, virando el indicador de pH adicionado al medio (rojo fenol) a rojo-violeta. Los microorganismos ureasa negativos no viran el color del medio, que permanece amarillo.

- *Producción de hemolisinas*: la presencia de enzimas hemolíticas se evaluó utilizando el medio agar Columbia con sangre de cordero al 5% (BBL). Alfa hemólisis: se observa una zona poco definida de destrucción parcial de los eritrocitos alrededor de la colonia, a menudo acompañada de una coloración verde a marrón del medio. Beta hemólisis: se observa un halo claro alrededor de las colonias, debido a la destrucción completa de los eritrocitos. En agar Columbia puede también aparecer una coloración verdosa en el medio.
- *Crecimiento en TCBS*: debido a su pH alcalino y a la inclusión de sales biliares, este medio se utiliza para el aislamiento selectivo del género *Vibrio*, principalmente. Las colonias pueden ser amarillas o verdes, en función de que el microorganismo utilice o no la sacarosa del medio.
- *Crecimiento a distintas temperaturas*: los microorganismos se sembraron en TSA-SW o FMM (familia *Flavobacteriaceae*), incubándose en un rango de temperaturas de entre 4 y 44°C durante 10 días.
- *Requerimiento de sodio y agua de mar para el crecimiento*: el requerimiento de sodio se determinó sembrando los aislados en medio basal con distintas concentraciones de NaCl (0, 3, 6, 8, 10, 12%). El requerimiento de agua de mar se determinó en caldo FMM con diferentes concentraciones de agua de mar (rango 10%-100%) y en TSA suplementado con NaCl al 1%. Los cultivos se incubaron a 20°C durante 10 días.
- *Prueba de la flexirrubina*: esta prueba permite detectar la presencia de pigmentos tipo Flexirrubina, presentes en la pared celular de algunos microorganismos de la familia *Flavobacteriaceae*. Se realizó de acuerdo al método propuesto por Bernardet *et al.* (2002). En un portaobjetos se hace un frotis con colonias de 3 días, inundándose a continuación con una solución de KOH al 20%. Dado que en este tipo de pigmentos el color depende del pH, si la colonia vira inmediatamente a un color rojizo-púrpura o marrón, la prueba es positiva. La colonia vuelve a su color original si se elimina el KOH y se añade una solución ácida. Si los pigmentos son de tipo carotenoides el color no varía con el pH.
- *Absorción de Rojo Congo*: se realizó de acuerdo al método propuesto por Bernardet *et al.* (2002). Las colonias crecidas en placa son cubiertas por una solución de Rojo Congo

(Sigma) al 0,01%. Tras dos minutos, las colonias son aclaradas con agua. Si desarrollan un color rojo, la prueba es positiva. En el caso de *Flavobacterium columnare*, el material teñido son los glicanos galactosamina, extracelulares (Johnson & Chilton 1966).

- *Detección de pigmentos fluorescentes:* se utilizó el medio de cultivo King B (Agar F) (Difco) (King *et al.* 1954). Este medio incorpora glicerol, que favorece la producción de pigmentos, y peptonas ricas en fósforo, que favorecen la producción de fluoresceína o pioverdina, un pigmento fluorescente amarillo-verdoso difusible en el medio de cultivo. Tras la incubación de las placas, la producción del pigmento se detecta con luz ultravioleta (254 nm).
- *Detección de piocianina:* la piocianina es un pigmento azul verdoso no fluorescente difusible en el medio de cultivo. Para su detección se siembran las cepas en el medio de cultivo King A (Agar P) (Difco). Este medio contiene también glicerol, pero a diferencia del King B, incorpora peptonas con bajo contenido en fósforo, minimizándose así la producción de fluoresceína, que podría enmascarar la de piocianina. Tras la incubación, la presencia del pigmento puede confirmarse añadiendo varias gotas de cloroformo en la placa. Dado que el pigmento es soluble en cloroformo, este tomará una tonalidad azul.
- *Luminiscencia:* se determinó de acuerdo al método propuesto por Buller (2004). Los aislados fueron sembrados en agar luminiscente y observados en completa oscuridad tras 18 y 24h de incubación a 20°C.

– Sistemas miniaturizados API 20E, API 20NE y API ZYM

Los sistemas miniaturizados API 20E, API 20NE y API ZYM consisten en galerías de 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados que se inoculan con suspensiones bacterianas, reconstituyéndose entonces los test (Tabla 3). Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se traducen en cambios de color espontáneos o revelados mediante la adición de reactivos, o en la aparición de turbidez en el medio.

El API 20E es un sistema de identificación para bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* y otros bacilos Gram negativos no exigentes. El API 20NE identifica bacilos Gram negativos no enterobacterias y no fastidiosos. Por último, el API ZYM es un método semicuantitativo de investigación de actividades enzimáticas. Cada sistema se utilizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante, excepto que los inóculos se hicieron con agua de mar y la temperatura de incubación fue de 20°C. Los inóculos se ajustaron a una densidad similar al

patrón 5 de la escala de McFarland ($1,5 \times 10^9$ células/ml), excepto en el caso del API 20NE, que se ajustaron al 0,5 ($1,5 \times 10^8$ células/ml). La lectura de los resultados se realizó a las 48 h.

Tabla 3. Test de los sistemas miniaturizados API 20E, API 20NE y API ZYM.

API 20E		API 20NE		API ZYM	
Test	Reacción/enzima	Test	Reacción/enzima	Test	Enzima
ONPG	β -galactosidasa	NO ₃	Reducción de nitratos	1	Control negativo
ADH	Arginina dihidrolasa	TRP	Producción de indol	2	Fosfatasa alcalina
LDC	Lisina decarboxilasa	GLU	Fermentación glucosa	3	Esterasa (C4)
ODC	Ornitina decarboxilasa	ADH	Arginina dihidrolasa	4	Esterasa lipasa (C8)
CIT	Utilización del citrato	URE	Ureasa	5	Lipasa (C14)
H ₂ S	Producción de H ₂ S	ESC	Hidrólisis esculina	6	Leucina arilamidasa
URE	Ureasa	GEL	Hidrólisis gelatina	7	Valina arilamidasa
TDA	Triptofano desaminasa	PNPG	β -galactosidasa	8	Cistina arilamidasa
IND	Producción de indol	GLU	Asimilación glucosa	9	Tripsina
VP	Producción de acetoina	ARA	Asimilación arabinosa	10	α -quimotripsina
GEL	Hidrólisis gelatina	MNE	Asimilación manosa	11	Fosfatasa acida
GLU	Fermentación/oxidación glucosa	MAN	Asimilación manitol	12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa
MAN	Fermentación/oxidación manitol	NAG	Asimilación N-acetil-glucosamina	13	α -galactosidasa
INO	Fermentación/oxidación inositol	MAL	Asimilación maltosa	14	β -galactosidasa
SOR	Fermentación/oxidación sorbitol	GNT	Asimilación gluconato potásico	15	β -glucuronidasa
RHA	Fermentación/oxidación rhamnosa	CAP	Asimilación ácido cáprico	16	α -glucosidasa
SAC	Fermentación/oxidación sacarosa	ADI	Asimilación ácido adípico	17	β -glucosidasa
MEL	Fermentación/oxidación melibiosa	MLT	Asimilación ácido málico	18	N-acetil- β -glucosaminidasa
AMY	Fermentación/oxidación amygdalina	CIT	Asimilación citrato trisódico	19	α -mannosidasa
ARA	Fermentación/oxidación arabinosa	PAC	Asimilación ácido fenilacético	20	α -fucosidasa
NO ₃	Reducción de nitratos				
N ₂	Desnitrificación				

– Sistema BIOLOG

Se trata de un sistema que permite la identificación de bacterias Gram negativas y Gram positivas, así como levaduras y mohos. La identificación se basa en el perfil de utilización de fuentes de carbono, utilizándose microplacas con 96 pocillos, 95 de los cuales contienen una fuente de carbono única y un indicador de actividad respiratoria, el cloruro de tetrazolium. Si la fuente de carbono de un pocillo es utilizada por el microorganismo, el cloruro de tetrazolium es reducido de forma irreversible a formazan, de color violeta. Las fuentes de carbono utilizadas se indican en la Tabla 4.

El protocolo utilizado en la mayor parte de los casos fue el indicado por el fabricante. Los microorganismos Gram negativos fueron crecidos en medio BUG suplementado con sangre de cordero (5%), incubados 24h a 30°C, y resuspendidos en el fluido de inoculación GN/GP, ajustándose la turbidez al 52%. La suspensión bacteriana fue entonces distribuida en placas

GN2, incubándose durante 24h a 30°C. Las placas se leyeron con el sistema BIOLOG MicroLog 3 MicroStation. Los resultados fueron interpretados con la base de datos y software MicroLog 3 v.4.20.05. El protocolo utilizado con cepas incapaces de crecer a 30°C o que necesitan agua de mar para su crecimiento (especies no incluidas en la base de datos BIOLOG. Ej. *V. tapetis*) fue similar, con algunas modificaciones: los aislados fueron crecidos en TSA-SW e incubados a 20°C. Como fluido de inoculación se utilizó agua de mar estéril, y las placas fueron incubadas durante 24-96 h a 20°C. Varias cepas de referencia de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium* y *Pseudomonas* fueron incluidas como controles positivos.

Tabla 4. Fuentes de carbono incluidas en las microplacas GN2 del sistema BIOLOG.

Polímeros	α -ciclodextrina, dextrina, glicógeno, tween 40, tween 80	Amidas	Ácido succinámico, glucuronamida, L-alaninamida
Azúcares y derivados	N-acetil-D-galactosamina, N-acetil-D-glucosamina, adonitol, L-arabinosa, D-arabitol, D-celobiosa, i-eritritol, D-fructosa, L-fucosa, D-galactosa, gentiobiosa, α -D-glucosa, m-inositol, α -D-lactosa, lactulosa, maltosa, D-manitol, D-manosa, D-melibiosa, β -metil-D-glucosido, D-psicosa, D-rafinosa, L-ramnosa, D-sorbitol, sacarosa, D-trehalosa, turanosa, xylitol	Aminoácidos, péptidos y relacionados	D-alanina, L-alanina, L-alanil-glicina, L-asparagina, ácido L-aspártico, ácido L-glutámico, ácido glicil-L-aspártico, ácido glicil-L-glutamico, L-histidina, hidroxil-L-prolina, L-leucina, L-ornitina, L-fenilalanina, L-prolina, ácido L-pirolglutámico, D-serina, L-serina, L-treonina, D,L-carnitina, ácido γ -aminobutírico, ácido urocánico
Metil-ésteres	Metil piruvato, mono-metil-succinato	Nucleósidos	Inosina, uridina, timidina
Ácidos carboxílicos	Ácido acético, ácido cis-acónico, ácido cítrico, ácido fórmico, lactona de ácido D-galactónico, ácido D-galacturónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucosaminico, ácido D-glucurónico, ácido α -hidroxibutírico, ácido β -hidroxibutírico, ácido γ -hidroxibutírico, ácido p-hidroxifenilacético, ácido itaconico, ácido α -ceto butírico, ácido α -ceto glutarico, ácido α -ceto valérico, ácido D,L-láctico, ácido malónico, ácido propiónico, ácido quínico, ácido D-sacarico, ácido sebácico, ácido succínico, ácido bromo-succínico	Aminas	Fenietilamina, putrescina
		Alcoholes	2-aminoetanol, 2,3-butanodiol, glicerol
		Azúcares-fosfato	D,L- α -glicerol fosfato, glucosa-1-fosfato, glucosa-6-fosfato

– Sensibilidad a antibióticos y quimioterápicos

La sensibilidad de los aislados a distintos agentes quimioterápicos se determinó utilizando la técnica de difusión en placa con discos impregnados (Bauer *et al.* 1966) en placas de agar Mueller-Hinton (Difco) suplementadas con NaCl (2%). En el caso de miembros de la familia *Flavobacteriaceae*, se utilizaron placas de FMM (Avendaño-Herrera *et al.* 2005). Las cepas se resuspendieron en PBS hasta alcanzar una turbidez similar al patrón 5 de la escala de McFarland, sembrándose entonces en las placas con un hisopo estéril. Después de 15 minutos a temperatura ambiente, se colocaron los discos comerciales (Oxoid) de los siguientes agentes antimicrobianos ($\mu\text{g}/\text{disco}$): ampicilina (10), compuesto vibriostático O129 (10, 150) y novobiocina (30). La lectura de las placas se realizó tras un periodo de incubación de 48h a

20°C. La aparición de halos de inhibición del crecimiento en torno a los discos indica sensibilidad de esa cepa al agente quimioterápico.

▪ **Caracterización serológica**

– Antisueros utilizados

Los antisueros utilizados fueron cedidos por las doctoras Alicia E. Toranzo e Ysabel Santos y el doctor Jesús L. Romalde de la Universidad de Santiago de Compostela. En todos los casos se trata de anticuerpos policlonales obtenidos con conejos de raza Nueva Zelanda siguiendo la metodología descrita por Sørensen & Larsen (1986). Se emplearon los siguientes antisueros:

- *Anti-ATCC 17911*. Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ATCC 17911, aislada de perca. Detecta todas las cepas conocidas de esta subespecie.
- *Anti-NCIMB 14368*. Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa *Tenacibaculum soleae* NCIMB 14368 (cepa tipo), aislada de lenguado.
- *Anti-PC503.1*. Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa *Tenacibaculum maritimum* PC503.1, aislada de lenguado. Presenta reactividad específica frente al serotipo O1 de esta especie.
- *Anti-PC424.1*. Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa *T. maritimum* PC424.1, aislada de rodaballo. Presenta reactividad específica frente al serotipo O2 de esta especie.
- *Anti-ACC13.1*. Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa *T. maritimum* ACC13.1, aislada de lenguado. Presenta reactividad específica frente al serotipo O3 de esta especie.
- *Anti-CECT 4600*. Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa *Vibrio tapetis* CECT 4600 (cepa tipo), aislada de almeja. Reacciona con la mayoría de las cepas de esta especie.

- *Anti-0202RD*. Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa *V. tapetis* 0202RD, aislada de almeja, y que parece representar un serotipo distinto dentro de esta especie (no reacciona con el antisuero Anti-CECT 4600).
- *Anti-6087*. Antisuero obtenido de animales inmunizados con la cepa *V. tapetis* 6087, aislada de halibut. Esta cepa parece representar un serotipo distinto dentro de esta especie, si bien algunos autores han reportado resultados positivos con el antisuero Anti-CECT 4600.

– Antígenos utilizados

Se utilizaron tanto células bacterianas enteras como antígenos O. En el primer caso, se resuspendieron colonias crecidas en placa en solución salina estéril (NaCl 0,9% pH 7,4), ajustándose a una turbidez similar al patrón nº 4 de la escala de McFarland (aproximadamente 10^9 células/ml). En el segundo caso, las suspensiones bacterianas en solución salina se calentaron a 100°C durante 1h, guardándose a 4°C hasta su utilización. De esta manera se eliminan antígenos termolábiles como el capsular (K) o el flagelar (H), quedando solo el antígeno somático (O), termoestable.

– Aglutinación en portaobjetos

Se realizó de acuerdo al método propuesto por Toranzo *et al.* (1987). En un portaobjetos se mezclan volúmenes iguales (20 µl) de suspensión antigénica (células enteras o antígenos O) y antisuero. Como control negativo se utilizó suero de conejo no inmune mezclado con la suspensión antigénica. Solo una aglutinación rápida y clara se consideró un resultado positivo. Una aglutinación débil al cabo de unos minutos se consideró negativo. Como control de autoaglutinación, se mezcló la suspensión antigénica con solución salina estéril.

– Ensayo “Dot-Blot”

Se realizó básicamente de acuerdo al método propuesto por Cipriano *et al.* (1985). Se utilizaron antígenos O y células enteras, estas últimas inactivadas con formol para evitar interferencias por la actividad fosfatasa propia de las bacterias. La inactivación se llevó a cabo resuspendiéndose las colonias en PBS con formaldehído al 0,7%, con una turbidez similar al patrón nº 4 de la escala de McFarland. Tras 1 h a 4°C, se lavaron dos veces en solución salina

estéril, resuspendiéndose finalmente en esta solución. El ensayo Dot-Blot se llevó a cabo como se describe a continuación:

1. En una membrana de ésteres de celulosa (Millipore) previamente humedecida en PBS y secada al aire, depositar 1 μ l de la suspensión antigénica y 1 μ l de PBS (control negativo).
2. Incubar la membrana en TBS con gelatina al 3% (solución bloqueante) durante 1h a 25 °C. Todas las soluciones con gelatina deben calentarse previamente a 37°C para disolverla.
3. Lavar la membrana dos veces con TTBS (TBS con tween 20 al 0,05%).
4. Incubar la membrana con una solución del antisuero de conejo correspondiente durante 1 h. El antisuero va diluido 1:1000 en TBS con gelatina al 1%. Como control negativo, también fue usado suero no inmune.
5. Retirar el antisuero y lavar la membrana dos veces con TTBS (15 min).
6. Incubar la membrana durante 1 h con suero comercial anti-inmunoglobulina G de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Biorad). El antisuero va diluido 1:3000 en TBS con gelatina al 1%.
7. Lavar la membrana dos veces con TTBS y una vez con TBS.
8. Para realizar el revelado, incubar la membrana en 100 ml de tampón carbonato con 700 μ l de NBT (0,03% en N,N dimetilformamida) y 1 ml de BCIP (0,015% en N,N dimetilformamida) hasta el desarrollo del color. El revelado se detiene con baños de agua destilada. Se consideran positivas las reacciones con una intensidad de color similar a las obtenidas con la cepa homóloga.

▪ **Secuenciación de genes ribosómicos y “housekeeping”. Análisis filogenético.**

– Extracción y cuantificación de ADN

La extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos puros se realizó por hervido. Se resuspendieron colonias en agua destilada hasta alcanzar una turbidez similar al patrón nº 5 de la escala de McFarland, calentándose entonces la suspensión a 99°C durante 10 min. Tras centrifugar a 13.200 rpm durante 1 min, se recogió el sobrenadante, guardándose a -20°C hasta su uso.

La cantidad de ADN se cuantificó por espectrofotometría midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm.

– Cebadores utilizados

La amplificación parcial del gen ARNr 16S se llevó a cabo utilizando dos parejas de cebadores, los Aerospp1 y Vibriospp4, descritos por Labella *et al.* (2006), y los cebadores 20F y 1500R, descritos por Weisburg *et al.* (1991). Los primeros amplifican un fragmento de 833 pb, y se diseñaron en principio para amplificar a partir de especies de los géneros *Aeromonas* y *Vibrio*. Los segundos amplifican la práctica totalidad del gen, y son universales.

Para la amplificación parcial del gen ARNr 23S se utilizaron los cebadores universales 16/23S-F y 16/23S-R, descritos por Lee *et al.* (2002), que amplifican las primeras 400 pb del gen, aproximadamente. El gen *gyrB* fue amplificado utilizando los cebadores degenerados UP1 y UP2r, propuestos por Yamamoto & Harayama (1995). Estos cebadores son en principio universales y dan un amplicón de tamaño variable según la especie que se trate. El gen *rpoD* se amplificó con los cebadores 70F y 70R, también degenerados y descritos por Yamamoto & Harayama (1998). Las secuencias de los cebadores utilizados para cada uno de los casos se recogen en la Tabla 5.

Tabla 5. Cebadores utilizados para la amplificación de los genes ARNr 16S, ARNr 23S, *gyrB* y *rpoD*.

Cebador	Secuencia 5'-3'	Gen diana	Referencia
Aerospp1	GGCTCACCAAGGCGACGATCCCTA	16S ARNr	Labella <i>et al.</i>
Vibriospp4	GGACTTAACCCAACATTTTCAACACGAG		2006
20F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	16S ARNr	Weisburg <i>et al.</i>
1500R	GGTTACCTTGTTACGACTT		1991
16/23S-F	TTGTACACACCGCCCGTC	23S ARNr	Lee <i>et al.</i> 2002
16/23S-R	CCTTTCCTCACGGTACTG		
UP1	GAAGTCATCATGACCGTCTGCAYGCNNGGNAARTTYGA	<i>gyrB</i>	Yamamoto &
UP2r	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCRTCNGRCNGTCAT		Harayama 1995
70F	ACGACTGACCCGGTACGCATGTAYATGMNGARATGGNACNGT	<i>rpoD</i>	Yamamoto &
70R	ATAGAAATAACCAGACGTAAGTTNGCYTCNACCATYTCYTTYTT		Harayama 1998

– Amplificación por PCR

La reacción de amplificación se llevó a cabo en una mezcla con 200 nM de cada primer, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), tampón de PCR con MgCl₂ 2 mM (Biotools), 1,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Biotools), 1 µl de ADN diana, y agua MilliQ estéril hasta un volumen de reacción de 50 µl.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos de: 94°C durante 1 min, 54°C (60°C en el caso de los cebadores aerospp1 y vibriospp4) durante 45 s y 72°C durante 45 s; finalmente, una extensión final a 72°C durante 5 min. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf).

– Visualización del producto amplificado

Una muestra de 15 µl del producto de PCR con tampón de carga (Sigma) fue sometida a electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% con Sybr Green (Invitrogen) a 80 voltios. Como tampón se utilizó TBE 0,5x. El ADN se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta. Como marcador de peso molecular se utilizó el 100 bp ladder (Amersham Biosciences).

– Purificación del producto amplificado

El producto de PCR fue purificado con el kit comercial GenElute PCR Clean-up (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit se basa en el uso de columnas con matrices de sílice, a las que los ácidos nucleicos se unen en presencia de altas concentraciones salinas, mientras que proteínas y otros contaminantes son eliminados durante los pasos de lavado. El ADN es liberado de la matriz mediante una solución eluyente o agua ultra pura. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Añadir a la columna 500 µl de la solución “Column Prep Solution” y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
2. Añadir al producto de PCR 5 volúmenes de “Binding Solution” y pasar la mezcla a la columna.
3. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min.
4. Añadir a la columna 500 µl de “Wash Solution” y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Pasar la columna a un tubo nuevo.
5. Añadir a la columna 40 µl de agua MilliQ estéril y dejar incubar 1 min.
6. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 min. Guardar el eluido.

– Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se llevó a cabo de acuerdo al método enzimático de Sanger *et al.* (1977), utilizando el kit comercial BigDye Terminador v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), basado en el uso de terminadores fluorescentes. Se siguieron las recomendaciones del fabricante, con ligeras modificaciones.

A la mezcla de reacción del kit (3 µl), que incluye los dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y Taq ADN polimerasa FS, se le añadió el cebador correspondiente (el directo o el reverso utilizado en la amplificación) a una concentración de 3,2 pmol, DMSO a una

concentración final de 5%, aproximadamente 500 ng de ADN, buffer (1x), y agua MilliQ hasta un volumen final de 20 μ l.

Las condiciones de la reacción de secuenciación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C; y 25 ciclos de: 96°C durante 10 s, 50°C durante 5 s y 60°C durante 4 min; por último las muestras se mantuvieron a 4°C.

– Precipitación del ADN

Tras la reacción de secuenciación el ADN fue precipitado para eliminar restos de reactivos y dideoxinucleótidos marcados que podrían interferir en la lectura de la secuencia. Para ello se realizaron los siguientes pasos:

1. Añadir a cada tubo:

- ◆ Acetato de sodio 3M pH 4,6: 3 μ l
- ◆ Etanol 95%: 62,5 μ l
- ◆ Agua MilliQ estéril: 14,5 μ l.

2. Mezclar por vortex e incubar durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad.
3. Centrifugar a 14.000 rpm durante 20 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
4. Añadir 250 μ l de etanol 70%.
5. Centrifugar a 14.000 rpm durante 15 min a 4°C. Eliminar el sobrenadante con una pipeta y dejar secar. Se puede guardar a – 20°C hasta su uso.

– Carga en el secuenciador

El pellet con el ADN precipitado se resuspendió en una solución desnaturalizante de formamida (20 μ l) y fue cargado en un secuenciador automático de electroforesis multicapilar ABI Prism 3130 (Applied Biosystems), capaz de separar fragmentos de ADN que se diferencian en una sola base. La lectura de la secuencia se realiza según la longitud de onda que van emitiendo, tras ser excitados por un láser, los distintos fluorocromos presentes en la cadena de ADN, asociándose cada longitud de onda a una determinada base nitrogenada.

– Análisis de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos

El análisis de las secuencias se llevó a cabo utilizando distintos programas informáticos. Para la visualización del cromatograma, corrección de errores de secuenciación y ensamblaje de las secuencias que requirieron la secuenciación por ambos extremos *forward* y *reverse* se utilizaron los programas Chromas Lite v2.01 (Technelysium) y SeqMan II (DNASTAR).

La búsqueda de secuencias relacionadas publicadas en la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank se llevó a cabo con los programas de red BLAST (Altschul *et al.* 1990, 1997) y FASTA (Pearson & Lipman 1988). Los porcentajes de similitud entre secuencias se calcularon con el programa MatGAT 1.8 (Campanella *et al.* 2003).

Para la realización de análisis filogenéticos, las secuencias obtenidas fueron alineadas con secuencias de especies relacionadas y no relacionadas con los programas Clustal X y Clustal W (Higgins & Sharp 1988, Thompson *et al.* 1994, Larkin *et al.* 2007). Los árboles filogenéticos se realizaron de acuerdo al método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987), con el programa informático MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004). Las matrices de distancias utilizadas como base de dicho análisis fueron calculadas siguiendo el modelo de Kimura 2-parámetros (Kimura 1980). Como *test* filogenético se utilizó el método de remuestreo con reemplazamiento (*bootstrap*) (Felsenstein 1985), con 1.000 replicas.

▪ **Identificación mediante PCR con cebadores específicos**

La identificación de los aislados se confirmó, cuando fue posible, mediante amplificación por PCR con cebadores específicos de especie disponibles en la bibliografía. Los cebadores utilizados y sus características se resumen en la Tabla 6. La extracción de ADN a partir de cultivos puros se realizó por hervido o mediante el kit Insta-Gene Matrix (Bio-Rad). La reacción de amplificación se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado anterior o con el kit Ready-To-Go PCR Beads (Amersham), ajustándose la cantidad de ADN molde a aproximadamente 100 ng. La temperatura de anillamiento utilizada fue en cada caso la descrita en la bibliografía para cada uno de los cebadores empleados.

En cada ensayo se incluyeron como controles positivos cepas de referencia de las especies ensayadas. Como control negativo se utilizó agua MilliQ estéril y en algún caso también cepas de referencia relacionadas.

La visualización de los productos de PCR se llevó a cabo por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron el 100 bp Ladder (Biotools), 1 Kb Ladder (Biotools) y 50-2000 pb Ladder (Sigma).

Tabla 6. Cebadores específicos de especie utilizados.

Especie diana	Cebador	Secuencia 5'-3'	Región diana	T ¹	pb ²	Referencia
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	MAR1	AATGGCATCGTTTTAAA	Gen ARNr 16S	45	1088	Toyama <i>et al.</i> 1996 Bader & Shotts 1998; Cepeda <i>et al.</i> 2003 Osorio <i>et al.</i> 2000
	MAR2	CGCTCTCTGTTGCCAGA				
	Mar1	TGTAGCTTGCTACAGATGA	Gen ARNr 16S	54	400	
	Mar2	AAATACCTACTCGTAGGTACG				
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damselae</i>	Ure3	CTTGAATATCCATCTCATCTGC	Gen <i>ureC</i>	60	448	Osorio <i>et al.</i> 2000
	Ure5	TCCGGAATAGGTAAGCGGG				
<i>Photobacterium damsela</i> (ambas subespecies)	CPSF	AGGGGATCCGATTATTACTG	Gen polisacárido capsular	55	410	Rajan <i>et al.</i> 2003
	CSPR	TCCATTGAGAAGATTGTAT				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16SPSEfluF	TGCATTCAAAACTGACTG	Gen ARNr 16S	60 ³	850	Scarpellini <i>et al.</i> 2004
	16SPSER	AATCACACCGTGGTAACCG				
<i>Vibrio harveyi</i>	ToxRF1	GAAGCAGCACTCACCGAT	Gen <i>toxR</i>	55	382	Pang <i>et al.</i> 2006
	ToxRR1	GGTGAAGACTCATCAGCA				
<i>Vibrio splendidus</i>	VSPN-F	GATTAGTTAAAGCCAGAGC	ITS1	55	240, 294	Lee <i>et al.</i> 2002
	VSPN-R	CCTGATAAAGTGTGGCCG				
<i>Vibrio tapetis</i>	Vtf	CGAGCGGAAACGAGAAGTAG	Gen ARNr 16S	63	416	Paillard <i>et al.</i> 2006
	Vtr	GGATGCACGCTATTAACGTACA				
	Jvt-1	TACGTTAATAGCGTGCATCC	Gen ARNr 16S	64	816	Romalde <i>et al.</i> 2007
	Jvt-2	TCACCATCGCTGGTTGGCTG				
<i>Aliivibrio fischeri</i>	LuxA-F	GTTCTTAGTTGGATTATTGG	Gen <i>luxA</i>	40	428	Lee & Ruby 1995
	LuxA-R	TCAGTTCATTAGCTTCAAATCC				

¹T: temperatura de anillamiento (°C); ²pb: tamaño del producto de PCR en pares de bases; ³Scarpellini *et al.* 2004 no indica ninguna temperatura de anillamiento.; basándose en la Tm de los cebadores, se utilizaron temperaturas de 55 y 60°C.

▪ Hibridación ADN-ADN

La hibridación ADN-ADN determina el grado de similitud de secuencias entre genomas completos, siendo por tanto útil para diferenciar organismos estrechamente relacionados. La técnica consta de varias etapas: extracción y marcaje del ADN de la cepa de interés; hibridación del ADN marcado con un exceso de ADN no marcado de la cepa homóloga y de cepas heterólogas; separación y detección del ADN de cadena simple y ADN de cadena doble resultantes de la hibridación; y por último, determinación del porcentaje de hibridación, comparando con el control (ADN homólogo), al que se le asigna el 100%. La comparación de los resultados obtenidos con la mezcla de ADNs heterólogos y la mezcla del ADN homólogo nos da una idea de la similitud de las secuencias.

El protocolo de hibridación seguido aquí se corresponde al descrito por Ziemke *et al.* (1998) con ligeras modificaciones, combinándose el método de la hidroxapatita para la separación de cadenas simples y dobles (Brenner *et al.* 1969; Paetkau & Langman 1975; Lind & Ursing 1986), con la detección no radiactiva del ADN.

– Extracción de ADN

Se utilizó el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante para bacterias Gram negativas. Los pasos son los siguientes:

1. Resuspender varias colonias bacterianas en 1 ml de PBS.
2. Centrifugar a 7.500 rpm 10 min. Decantar el sobrenadante.
3. Resuspender el pellet en 180 μ l de "Buffer ATL" (Tissue Lysis Buffer).
4. Añadir 20 μ l de la solución de Proteinasa K. Mezclar por vortex e incubar en agitación (600 rpm) a 56°C durante 2-4 h.
5. Añadir 4 μ l de RNasa A (100 mg/ml). Mezclar por vortex e incubar a temperatura ambiente durante 2 min. Dar un vortex 15 seg.
6. Añadir 200 μ l de "Buffer AL" (Lysis Buffer) y 200 μ l de etanol 96-100% frío. Mezclar por vortex.
7. Pasar la muestra a una columna DNeasy Mini spin.
8. Centrifugar a 8.000 rpm 1 min a 4°C. Descartar el tubo colector.
9. Pasar la columna a un nuevo tubo colector y añadir 500 μ l de "Buffer AW1" (Wash Buffer 1).
10. Centrifugar a 8.000 rpm 1 min a 4°C. Descartar el tubo colector.
11. Pasar la columna a un nuevo tubo colector y añadir 500 μ l de "Buffer AW2" (Wash Buffer 2).
12. Centrifugar a 14.000 rpm 3 min a 4°C. Descartar el tubo colector.
13. Pasar la columna a un nuevo tubo. Añadir 50 μ l de agua MilliQ e incubar al menos 1 min a temperatura ambiente.
14. Centrifugar a 8.000 rpm 1 min a 4°C. Recoger el eluido.

La concentración de ADN se determinó midiendo la absorbancia de la muestra a 260 nm con un espectrofotómetro. El cociente de absorbancias a 260 nm y 280 nm (Abs_{260}/Abs_{280}) se utilizó para valorar la pureza del ADN extraído. Un valor inferior a 1,8 o mayor o igual a 2 indica la presencia de impurezas. El ADN utilizado debe estar entre esos dos valores.

– Marcaje del ADN

El ADN se marcó doblemente con Digoxigenina-11-dUTP y Biotina-16-dUTP (Roche) utilizando el kit comercial Nick-Translation (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El marcaje de ADN mediante nick-translation (Rigby *et al.* 1977) se basa en la utilización de dos enzimas, la DNasa I y la ADN polimerasa I. La primera crea muescas en la cadena de ADN que son utilizadas por la segunda como punto de partida de síntesis. La actividad exonucleasa de la ADN polimerasa I remueve los nucleótidos en la dirección de síntesis, de forma que la antigua cadena de ADN es reemplazada por una nueva que incorpora los nucleótidos marcados. Estos van marcados con biotina, una vitamina que muestra una alta

afinidad por proteínas como la estreptavidina, o con digoxigenina, un esteroide que es considerado un hapteno. El protocolo detallado se indica a continuación:

1. Preparar una mezcla de los nucleótidos dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dUTP-Digoxigenina y dUTP-Biotina en una proporción 3:3:3:2:0,75:0,25.
2. Para cada ADN que se quiera marcar, añadir en un tubo:
 - ◆ Mezcla de nucleótidos: 5 μ l
 - ◆ Mezcla de enzimas DNasa I y ADN polimerasa I: 1 μ l
 - ◆ Buffer 10x: 1 μ l
 - ◆ ADN a marcar: 1 μ g
 - ◆ Agua MilliQ estéril: hasta un volumen final de 10 μ l.
3. Incubar los tubos durante 1 h 30 min a 15°C.
4. Precipitar el ADN marcado. Añadir a cada tubo:
 - ◆ Acetato de sodio 3M pH 5,2: 40 μ l
 - ◆ Etanol absoluto (frío): 890 μ l
 - ◆ Agua MilliQ estéril: 390 μ l
5. Incubar a – 20°C toda la noche.
6. Centrifugar a 13.000 rpm 10 min a 4°C. Decantar el sobrenadante y dejar secar.
7. Resuspender el pellet en 100 μ l de agua MilliQ estéril. Guardar a – 20°C hasta su uso.

Para evaluar la eficiencia del marcaje, se utilizó 1 μ l de la suspensión final, siguiendo el protocolo de revelado que se cita más adelante.

– Hibridación ADN-ADN

Los ensayos de hibridación se llevaron a cabo usando una modificación del método usado por Lind & Ursing (1986). En cada ensayo se enfrentó el ADN marcado de la cepa problema con el ADN no marcado de la cepa homóloga y de cepas heterólogas.

1. En cada tubo de hibridación añadir:
 - ◆ ADN marcado: 70-120 ng (según calidad del marcaje)
 - ◆ ADN no marcado (competidor): 11 μ g
 - ◆ Agua MilliQ estéril: hasta un volumen final de 72 μ l

2. Incubar la mezcla de hibridación en hielo durante 5 min.
3. Incubar a 99°C durante 15 min (desnaturalización).
4. Incubar en hielo durante 3 min.
5. Añadir a cada tubo 28 µl de tampón PB 1 M pH 6,8.
6. Añadir a cada tubo 100 µl de aceite mineral e incubar a la temperatura de hibridación seleccionada (65°C) durante 16 h.

– Separación de las cadenas simples y cadenas dobles

La separación de las cadenas simples y dobles resultantes de la hibridación se realizó usando una modificación del método de centrifugación con hidroxiapatita descrito por Brenner *et al.* (1969). La hidroxiapatita es un mineral que muestra una alta afinidad por las cadenas dobles de ADN, pero no por las simples. Las eluciones se llevaron a cabo por duplicado para cada tubo de hibridación.

- *Equilibrado de la hidroxiapatita*

1. Resuspender la hidroxiapatita en agua MilliQ (0,1 g/ml) con cuidado (usar pipeta). Repartir en alícuotas de 1 ml.
2. Centrifugar a 10000 rpm durante 30 s a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
3. Añadir a cada tubo 1 ml de tampón PB 0,14 M con SDS 0,2%. Resuspender con cuidado.
4. Centrifugar a 10000 rpm durante 30 s a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
5. Lavar otras dos veces en tampón PB 0,14 M con SDS 0,2%. En el último lavado repartir la suspensión en alícuotas de 200 µl. Tras eliminar el sobrenadante cada tubo contendrá unos 20 mg de hidroxiapatita, equilibrada en tampón fosfato 0,14 M.

- *Obtención de las cadenas simples*

La obtención de las cadenas simples se llevó a cabo como se indica a continuación:

1. Recuperar la mezcla de hibridación y añadir un volumen similar de agua MilliQ.
2. Añadir 50 µl de la mezcla de hibridación diluida a un tubo con hidroxiapatita equilibrada en tampón fosfato 0,14 M. Resuspender con cuidado (usar pipeta).
3. Incubar a la temperatura de hibridación (65°C) durante 15 min.
4. Centrifugar a 10000 rpm durante 30 s a 4 °C. Recuperar el sobrenadante, donde se encuentran las cadenas simples.

5. Lavar otras dos veces con tampón PB 0,14 M con SDS 0,2%, hasta recuperar un volumen final de 1 ml. Entre cada lavado incubar a la temperatura de hibridación durante 5-7 min.

- *Obtención de las cadenas dobles*

Para la obtención de las cadenas dobles se usaron los tubos utilizados para la obtención de las cadenas simples:

1. Añadir a cada tubo 200 µl de tampón PB 0,4 M. Resuspender por vortex.
2. Centrifugar a 10000 rpm durante 30 seg a 4°C. Recuperar el sobrenadante, donde se encuentran las cadenas dobles.
3. Lavar de nuevo con tampón PB 0,4 M, hasta recuperar un volumen final de 400 µl.

– Recta patrón y revelado

Paralelamente a la hibridación, se prepararon diluciones en base 2, en tampón PB 0,14 M, del ADN marcado. Estas diluciones se revelaron junto con los datos de la hibridación, utilizándose para la realización de una recta patrón. El revelado se realiza como sigue:

1. Incubar a 99 °C durante 15 min los tubos con cadenas dobles y recta patrón.
2. Incubar en hielo durante 5 min los tubos de cadenas dobles, cadenas simples y recta patrón.
3. Añadir a todos los tubos albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma) hasta una concentración final de 0,1%.
4. Pasar 200 µl de cada tubo a pocillos de una placa StreptaWell (Roche). Los pocillos de la placa están recubiertos de estreptavidina.
5. Incubar la placa a temperatura ambiente durante 1-2 h en agitación (300 rpm).
6. Lavar los pocillos 3 veces con 200 µl de PBS pH 7,16.
7. Añadir a cada pocillo 200 µl de una solución de PBS con albúmina al 0,1% y anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) en dilución 1:5000.
8. Incubar a temperatura ambiente 1 h en agitación (300 rpm)
9. Lavar los pocillos dos veces con PBS y una vez con Coating buffer pH 9,8.
10. Añadir a cada pocillo 250 µl de Coating buffer con *p*-nitrofenilfosfato (pNPP) (Sigma) 1 mg/ml. El pNPP es un sustrato de la fosfatasa alcalina que al ser utilizado genera *o*-nitrofenol, de color amarillo.
11. Incubar la placa a 37°C sin agitación y en oscuridad 30 min-4 h.

12. Medir el desarrollo de color en un lector de placas a 405 nm.

– Tratamiento de los datos de hibridación

Las reasociaciones homólogas y heterólogas se procesaron de manera simultánea. El grado de reasociación (ratio de unión) se expresó como el porcentaje de ADN marcado liberado con tampón fosfato 0,4 M (cadenas dobles) comparado con el total de ADN marcado liberado. El grado de reasociación relativo del ADN heterólogo se expresó como el porcentaje de unión homóloga, considerada el 100%.

3.4. DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN BASADOS EN LA PCR

▪ **Análisis de la región ITS1**

– Cepas bacterianas utilizadas

Para el análisis de la región ITS1 se seleccionaron cepas representativas de cada uno de los fenones patógenos encontrados. Con fines comparativos se incluyeron también algunas cepas de fenones no patógenos y las cepas de referencia *T. ovolyticum* LMG 13025 y *P. anguilliseptica* CECT 899.

– Extracción de ADN y amplificación por PCR

La extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos puros se realizó por hervido. Se utilizaron los cebadores universales 16/23S-F y 16/23S-R, descritos por Lee *et al.* (2002), que amplifican el extremo 3' del gen ARNr 16S, el espaciador intergénico (ITS1) completo y el extremo 5' del gen ARNr 23S.

La reacción de PCR se llevó a cabo en una mezcla con 200 nM de cada primer, 200 µM de cada dNTP (Invitrogen), tampón de PCR con MgCl₂ 2 mM (Biotools), 1,25 U de ADN polimerasa (Biotools), 1 µl de ADN diana, y agua destilada hasta un volumen de reacción de 50 µl. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C; 35 ciclos de: 94°C durante 1 min, 54°C durante 45 s y 72°C durante 45 s; finalmente, una extensión final a 72°C durante 5 min.

– Visualización y purificación del producto de PCR

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. La purificación del producto de PCR se realizó con el kit comercial GenElute PCR Clean-up (Sigma), excepto cuando se observaron bandas de ADN de distintos tamaños en el gel de agarosa. En este caso las bandas seleccionadas fueron cortadas y purificadas individualmente con el kit GFX PCR DNA & Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Este kit se basa en la utilización de un “buffer de captura” que contiene agentes caotrópicos que desnaturalizan las proteínas, disuelven la agarosa, y favorecen la unión del ADN a una matriz de fibra de vidrio. Las proteínas y sales contaminantes son eliminadas en los pasos de lavado. El protocolo utilizado es el siguiente:

1. Cortar la porción de gel de agarosa que contiene la banda de ADN de interés. Por cada 1 mg de peso añadirle 1 μ l de “Capture Buffer”. Vortex.
2. Incubar a 60°C durante 5-15 min, hasta que el gel se funda.
3. Pasar la muestra a una columna con tubo colector e incubar durante 1 min a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Eliminar el eluido.
5. Añadir a la columna 500 μ l de “Wash Buffer” y centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Pasar la columna a un nuevo tubo.
6. Añadir 20 μ l de agua MilliQ estéril a la columna e incubar durante 1 min a temperatura ambiente.
7. Centrifugar a 13.000 rpm durante 2 min. Guardar el eluido.

– Clonación

Parte de los productos de PCR fueron clonados con el kit pGEM-T Easy Vector System II (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit se basa en la utilización del plásmido pGEM-T Easy Vector. Este cuenta con timinas terminales añadidas en el extremo 3' que evitan su recircularización a la vez que favorecen la unión de los productos de PCR generados por ADN polimerasas que añaden un nucleótido adenina en el extremo 3'.

El vector contiene múltiples sitios de corte para varias enzimas de restricción, un gen que codifica una β -lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina y el gen *LacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa. Este último gen está interrumpido por la zona de unión del inserto y puede por tanto ser inactivado por este, permitiendo la selección de transformantes por color en presencia de los substratos adecuados (Sambrook & Russell 2001).

- *Ligación*

La unión del producto de PCR purificado al plásmido pGEM-T se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. En un tubo mezclar:
 - ◆ Tampón de ligación 2x: 5 μ l
 - ◆ Vector pGEM-T: 1 μ l (50 ng)
 - ◆ ADN ligasa T4: 1 μ l (3 U)
 - ◆ Producto de PCR: 3 μ l
 - ◆ Agua MilliQ: hasta un volumen final de 10 μ l.
2. Homogeneizar con cuidado con una pipeta e incubar durante 1 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C.

- *Transformación de células competentes*

Se utilizaron las células competentes *Escherichia coli* IM109. Una vez descongeladas y homogeneizadas, se transformaron como sigue:

1. Mezclar 50 μ l de la suspensión de células competentes con 5 μ l de la reacción de ligación e incubar en hielo durante 20 min.
2. Incubar en un baño a 42°C sin agitación durante 45 s. Este choque térmico permite la entrada del plásmido dentro de la célula.
3. Inmediatamente después incubar en hielo durante 2 min.
4. Añadir a cada tubo 950 μ l de medio SOC e incubar en agitación a 37°C durante 1 h 30 min.
5. Sembrar 100 μ l del cultivo en placas de medio LB suplementadas con ampicilina (50 μ g/ml), IPTG (0,5 mM) y X-Gal (80 μ g/ml). Incubar a 37°C durante toda la noche, después guardar a 4°C.

El IPTG es un inductor de la enzima β -galactosidasa. El X-Gal es un sustrato (incolore) de la misma enzima, que al ser metabolizado genera una coloración azul. Tras la incubación, en las placas aparecerán colonias azules y blancas. Por norma general, las colonias azules presentarán el plásmido sin inserto, mientras que las colonias blancas presentan el plásmido con el producto de PCR insertado, inactivando este el gen de la β -galactosidasa e impidiendo el desarrollo de color. El crecimiento de bacterias no transformadas es prevenido por la ampicilina presente en el medio.

- *Purificación del ADN plasmídico*

Las colonias seleccionadas fueron crecidas en medio LB con ampicilina (10 ml) durante toda la noche a 37°C, en agitación. La purificación de los plásmidos se realizó con el kit comercial “Perfectprep Plasmid Mini” (Eppendorf), basado en el método de lisis alcalina. Este método explota las diferencias en las propiedades de desnaturalización y renaturalización entre el ADN plasmídico y el ADN cromosómico. La alcalinización de una suspensión bacteriana, con una solución de NaOH y SDS provoca la lisis celular y la desnaturalización del ADN y proteínas. A continuación, la neutralización del medio mediante una solución con alta concentración de sal (acetato potásico) provoca la precipitación de las proteínas, del SDS y del ADN cromosómico, pero no del ADN plasmídico, que se renaturaliza correctamente y queda soluble en el sobrenadante. Los pasos son los siguientes:

1. Pasar 2 ml del cultivo bacteriano a un tubo, centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min y eliminar el sobrenadante. Repetir hasta procesar el volumen total del cultivo.
2. Añadir 100 µl de “Solución 1” y resuspender el pellet por vortex.
3. Añadir 100 µl de “Solución 2” (lisis), mezclar por inversión.
4. Añadir 100 µl de “Solución 3” (neutralización), mezclar por inversión.
5. Centrifugar a 13.000 rpm durante 5 min.
6. Recoger el sobrenadante (en el pellet queda el ADN genómico) y pasarlo a una columna con tubo colector.
7. Añadir a la columna 450 µl de “DNA Binding Matrix”. Mezclar con pipeta.
8. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Eliminar el filtrado.
9. Añadir 400 µl de “Purification Solution Concentrate”.
10. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Eliminar el filtrado. Repetir.
11. Pasar la columna a un nuevo tubo y añadir 50-70 µl de agua MilliQ estéril.
12. Centrifugar a 13.000 rpm durante 1 min. Guardar el eluido a 4°C o a -20°C.

- *Análisis de los insertos*

Para confirmar la presencia de insertos en los plásmidos, estos fueron cortados con la enzima de restricción EcoRI. Esta tiene dos sitios de corte en el vector que flanquean la zona de unión del inserto.

1. En un tubo mezclar:
 - ◆ ADN plasmídico: 12 µl
 - ◆ EcoRI (10 u/µl) (Roche): 2 µl

- ◆ SuRE/Cut buffer H (Roche) : 2 µl
- ◆ Agua MilliQ estéril: 4 µl

2. Incubar la mezcla a 37°C durante 1 h.
3. Analizar los fragmentos de restricción mediante electroforesis en gel de agarosa.

– Secuenciación

La reacción de secuenciación, la precipitación del ADN y la lectura de las secuencias se realizó según el procedimiento descrito en el apartado 3.3 de esta memoria. Los cebadores utilizados en la reacción de secuenciación fueron el M13 Forward en el caso de las secuencias clonadas y el 16/23S-F para las no clonadas.

– Análisis de las secuencias

La corrección de las secuencias y la construcción de árboles filogenéticos se llevaron a cabo con los programas mencionados anteriormente. La delimitación de la región ITS1 se realizó por comparación con las secuencias disponibles para *Flavobacterium johnsoniae* UW101 (número de acceso CP000685), *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 (CP000094) y *Vibrio parahaemolyticus* IFO 12711 (AB041851). El análisis de los genes tRNAs presentes en las secuencias se realizó con el programa de red tRNAscan-SE 1.21 (Lowe & Eddy 1997).

▪ **Desarrollo de un protocolo de identificación y detección de *Tenacibaculum soleae* mediante PCR**

– Selección de cebadores

Para el diseño de cebadores específicos para *T. soleae* se utilizaron secuencias del gen ARNr 16S y de la región ITS1 obtenidas en este trabajo, así como otras obtenidas de la base de datos GenBank, pertenecientes a *T. soleae* y otras especies de la familia *Flavobacteriaceae*. Las secuencias fueron alineadas con el programa de red Clustal W, seleccionándose dos regiones con variabilidad interespecífica en las que, con el programa de red Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), se diseñaron los cebadores. Con el programa BLAST se compararon las secuencias de los cebadores con las publicadas en la base de datos GenBank, para descartar la posibilidad de que secuencias similares pudieran encontrarse en otras especies bacterianas. Los cebadores fueron sintetizados por Thermo Scientific, y guardados a -20°C a una concentración de 100 µM.

– Extracción de ADN de las muestras

La extracción de ADN a partir de cultivos bacterianos puros se realizó por hervido. La extracción y purificación de ADN a partir de tejidos de peces se realizó como se describe a continuación:

1. Homogeneizar 100 mg de tejido en 100 µl de buffer TE (Sigma).
2. Añadir 800 µl de buffer TE, 45 µl de SDS 20% (concentración final 1%) y 4,5 µl de Proteinasa K 20 mg/ml (Sigma) (concentración final 100 µg/ml).
3. Incubar a 56°C 3 h o toda la noche en agitación.
4. Añadir 2 µl de ARNasa A 10 mg/ml (Sigma) (concentración final 20 µg/ml).
5. Incubar a 37°C 1 h en agitación.
6. Pasar 500 µl de la mezcla a un tubo Phase lock gel (Eppendorf) previamente centrifugado a 12.000 rpm 30 s.
7. Añadir 500 µl de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (Sigma) guardada en frío (4°C). Mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
8. Centrifugar a 12.000 rpm 15 min, a 4°C. En la fase superior acuosa quedará el ADN. En la fase inferior, bajo el gel, quedará el fenol, el cloroformo y el alcohol isoamílico.
9. Añadir 500 µl de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) guardada en frío (4°C).
10. Centrifugar a 12.000 rpm 5 min, a 4°C. En la fase superior acuosa quedará el ADN.
11. Pasar la fase superior a otro tubo. Mantener en hielo.
12. Añadir un volumen de isopropanol (Panreac) guardado en frío (-20°C).
13. Incubar 1 h o toda la noche a -20°C. El ADN precipitá.
14. Centrifugar a 12.000 rpm 10 min, a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
15. Añadir 50 µl de etanol 70% guardado en frío (-20°C).
16. Centrifugar a 12.000 rpm 5 min, a 4°C. Eliminar el sobrenadante con una pipeta y dejar secar.
17. Resuspender el pellet en 50 µl de agua destilada estéril. Guardar a -20°C hasta su uso.

La concentración y pureza del ADN extraído se cuantificaron como ya se ha descrito con anterioridad en esta memoria.

– Protocolo de identificación de *T. soleae* por PCR

La PCR se llevó a cabo con el kit comercial RedTaq Ready Mix (Sigma), con una mezcla de reacción con 200 nM de cada primer, 3 U de Taq ADN polimerasa, 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM. La cantidad de ADN molde y agua destilada fue variable, hasta un

volumen final de 50 μ l. Para los ensayos de optimización del protocolo se utilizó ADN extraído de la cepa *T. soleae* a47 (1 y 100 ng/tubo de reacción) y un termociclador con gradiente de temperatura Mastercycler gradient (Eppendorf). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94 °C 5 min; 35-45 ciclos de desnaturalización (94 °C 1 min), anillamiento (se ensayó el rango 40-60 °C 45 s), y extensión (72 °C 1-2 min); finalmente un paso de extensión a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en geles de agarosa horizontal al 1% en tampón TBE 0,5x con Sybr Green (Invitrogen), visualizándose con un transiluminador ultravioleta. Para determinar el tamaño del fragmento obtenido se utilizó el marcador de peso molecular 1 Kb Ladder (Biotools).

– Especificidad y sensibilidad

La especificidad y sensibilidad del método fueron evaluadas una vez optimizado. La especificidad fue determinada utilizando 9 cepas de *T. soleae*, aisladas de 3 hospedadores distintos e incluyendo la cepa tipo. Además se utilizaron otras 81 cepas pertenecientes a otras especies tanto próximas como alejadas taxonómicamente (Tabla 7). Para la reacción de PCR se utilizaron 100 ng de ADN de cada cepa ensayada. Como control negativo se utilizó agua destilada.

La sensibilidad del método fue evaluada utilizando diluciones decimales seriadas de ADN de *T. soleae* a47 en un rango de 100 ng-100 fg/tubo de reacción, así como cantidades de ADN entre 0,5 y 3 μ g. Para evaluar la sensibilidad del protocolo en presencia de ADN de tejidos de peces o de otras bacterias, se utilizaron las mismas diluciones decimales mezcladas con 1 μ g de ADN extraído de hígado de acedía sana o de una mezcla de varias bacterias marinas (*T. maritimum*, *V. harveyi*, *P. damsela*, *P. baetica* y *Psychrobacter* sp). Todos los ensayos se hicieron al menos por duplicado.

– Aplicabilidad en tejidos

El ensayo de detección en tejidos de peces infectados de forma natural se realizó una vez optimizado el método. Se utilizaron muestras congeladas de úlceras externas, hígado o riñón de cuatro peces (dos acedías, un lenguado y un rombo) en los que el patógeno había sido previamente detectado mediante cultivo en placa. Además se utilizaron muestras de úlceras de seis acedías sospechosas de sufrir tenacibaculosis por *T. soleae*, por la historia clínica del tanque, la presencia de bacterias filamentosas en las improntas de lesiones externas o el crecimiento de colonias inviábiles, morfológicamente similares a las de *T. soleae*. El ADN fue extraído como ya se ha indicado, utilizándose una cantidad de 1 μ g en cada reacción de PCR.

▪ **Desarrollo de un protocolo de identificación de *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum maritimum*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* y *Pseudomonas baetica* mediante hibridación RLB**

La RLB es un método que permite la hibridación de 43 muestras con hasta 43 sondas de ADN distintas, en un único ensayo. El protocolo utilizado aquí se basa en el descrito por Zwart *et al.* (2003). Consta de tres etapas: la extracción del ADN de las muestras, la amplificación de fragmentos de interés mediante PCR con cebadores universales o específicos marcados con biotina, y la hibridación propiamente dicha, que permite detectar y diferenciar los amplicones producidos. Para la realización de la hibridación, las sondas son unidas covalentemente a una membrana en líneas paralelas, usando un miniblottter. Una vez unidas, la membrana es rotada 90° y los productos de PCR son cargados en el miniblottter, quedando perpendiculares a las sondas. La hibridación se visualiza usando conjugado estreptavidina-peroxidasa, que se une a la biotina de las muestras, seguido de detección por quimioluminiscencia.

– Diseño de sondas

Las sondas fueron diseñadas a partir de las secuencias de *T. soleae*, *T. maritimum*, *V. harveyi*, *P. damsela* y *P. baetica* obtenidas en este trabajo con los cebadores descritos por Lee *et al.* (2002), que abarcan la totalidad del ITS1 y el extremo 5' del gen ribosómico 23S, junto con otras obtenidas de la base de datos GenBank, pertenecientes a las especies diana o a especies relacionadas. Las secuencias se alinearon con el programa de red Clustal W, examinándose en busca de áreas de similitud intraespecífica y variabilidad interespecífica. Las sondas fueron diseñadas para compartir una temperatura de fusión (T_m) similar, entre 58 y 62 °C, de acuerdo a la norma de Wallace (Wallace *et al.* 1979). La posibilidad de que secuencias similares pudiesen encontrarse en otras especies bacterianas fue descartada utilizando el programa de red BLAST. Todas las sondas fueron sintetizadas por Sigma, con un grupo amino (NH_2) terminal en el extremo 5' y sin más purificación que el desalado. Se guardaron a -20°C a una concentración de 100 μM (100 pmol/ μl).

– Protocolo de hibridación RLB

• *Extracción de ADN de las muestras*

La extracción y cuantificación de ADN, a partir de cultivos bacterianos puros y de tejidos, se realizó como se ha descrito en el apartado anterior.

Tabla 7. Cepas de referencia y aislados utilizados en los ensayos de especificidad.

Especie	Cepas	Origen	País
<i>Tenacibaculum soleae</i>	NCIMB 14368 ^T	Lenguado senegalés (<i>S. senegalensis</i>)	España
	a11	Rombo (<i>S. rhombus</i>)	España
	a47, a50, a216, a462, a467	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
	a410, a469	Lenguado senegalés (<i>S. senegalensis</i>)	España
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	LMG 13025	Halibut (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>) (en huevos)	Noruega
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	CECT 4276	Pargo de cabeza negra (<i>Acanthopagrus schlegeli</i>)	Japón
	Lg326	Lenguado senegalés (<i>S. senegalensis</i>)	España
	a274, a388, a442, a443, a444, a461, a523	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Tenacibaculum</i> sp.	a3	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Polaribacter</i> sp.	a502	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Flavobacterium marinotypicum</i>	CECT 578 ^T		
<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	CECT 5015	Hierva	UK
	UW 101 ^T (ATCC 17061 ^T)	Suelo	UK
<i>Flavobacterium psychrophilum</i>	NCIMB 1947 ^T	Salmón coho (<i>Oncorhynchus kisutch</i>)	EUA
	OSU THCO2-90	Salmón coho (<i>O.s. kisutch</i>)	EUA
<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. <i>salmonicida</i>	CECT 894 ^T	Salmón común (<i>Salmo salar</i>)	
<i>Aliivibrio fischeri</i>	CECT 524 ^T		
<i>Vibrio harveyi</i>	CECT 525 ^T	Anfípodo (<i>Talorchestia</i> sp.)	EUA
	CECT 5156	Lubina (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	
	Lg 123, a10	Lenguado senegalés (<i>S. senegalensis</i>)	España
	a9, a20, a26, a82, a87, a91, a102, a106, a417, a421, a459	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Vibrio alginolyticus</i>	CECT 521 ^T	Chicharro (<i>Trachurus trachurus</i>)	Japón
	CECT 436	Comida	
	a134	Rombo (<i>S. rhombus</i>)	España
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	a241	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
	CECT 511 ^T	Paciente humano con intoxicación alimentaria	Japón
<i>Vibrio campbellii</i>	CECT 523 ^T	Agua de mar	EUA (Hawaii)
<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 526 ^T	Lodo de ciénaga	EUA
<i>Vibrio tubiashii</i>	CECT 4196 ^T	Almeja americana (<i>Mercenaria mercenaria</i>)	EUA
<i>Vibrio tapetis</i>	CECT 4600 ^T	Almeja japonesa (<i>Tapes philippinarum</i>)	Francia
	a255	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Vibrio splendidus</i>	CECT 528 ^T	Pez marino	
<i>Vibrio</i> spp.	a7, a29, a35, a54, a107, a256	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
	a6	Lenguado senegalés (<i>S. senegalensis</i>)	España
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	CECT 5895	Lubina (<i>D. labrax</i>)	
	Lg 122, a316, a319, a321, a335, a340, a356, a364	Lenguado senegalés (<i>S. senegalensis</i>)	España
	CECT 626 ^T		
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damselae</i>		Castañeta (<i>Chromis punctipinnis</i>)	EUA
<i>Photobacterium leiognathi</i>	CECT 4191 ^T	Pez teleosteo (<i>Leiognathus equula</i>)	Tailandia
<i>Photobacterium angustum</i>	CECT 5690 ^T	Agua de mar	
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	CECT 4192 ^T		
<i>Photobacterium</i> spp.	a185, a197	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Pseudoalteromonas</i> spp.	a220, a250	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Psychrobacter</i> sp.	a328	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CECT 378 ^T	Tanque de agua	UK
<i>Pseudomonas putida</i>	CECT 385	Suelo	
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	CECT 899 ^T	Anguila japonesa (<i>Anguilla japonica</i>)	Japón
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853		
<i>Pseudomonas</i> spp.	a390, a391, a393, a398, a399, a600	Acedía (<i>D. cuneata</i>)	España
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922		

- *Amplificación del ADN de las muestras por PCR*

La región ITS1 y parte del gen ARNr 23S fueron amplificadas con los cebadores 16/23S F y 16/23S R descritos por Lee *et al.* (2002). El primer reverso va marcado con biotina en el extremo 5'. La PCR se llevó a cabo con el kit comercial RedTaq Ready Mix (Sigma) de

acuerdo a las instrucciones del fabricante, con una mezcla de reacción con 200 nM de cada primer, 3 U de Taq ADN polimerasa, 200 μ M de cada dNTP y $MgCl_2$ 1,5 mM. La cantidad de ADN molde y agua destilada fue variable, hasta un volumen final de 50 μ l.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos; 45 ciclos de desnaturalización (94°C 1 minuto), anillamiento (54°C 45 s), y extensión (72°C 45 s); por último, un paso de extensión a 72°C durante 5 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

- *Unión de las sondas a la membrana*

Se utilizó una membrana de nylon Biodyne C (Pall). Esta dispone de una alta densidad de grupos carboxilo en la superficie, estando cargada negativamente en un amplio rango de pH.

1. Diluir las sondas en $NaHCO_3$ 0,5M pH 8,4 hasta alcanzar la concentración deseada (10-6.400 pmol en un volumen final de 150 μ l).
2. Cortar la membrana con unas medidas de 15x15 cm, sin quitar el papel protector (manipular con pinzas). Marcar la cara opuesta a la que se van unir las sondas.
3. Incubar la membrana a temperatura ambiente en 10 ml de EDAC (Sigma) al 16% en agua destilada (esta solución debe estar recién hecha). El EDAC activa los grupos carboxilo presentes en la superficie de la membrana, permitiendo la unión covalente de las sondas.
4. Lavar la membrana dos veces con agua destilada para eliminar el EDAC.
5. Colocar la membrana en un miniblotter ECL Multiprobe XL (Amersham) (manipular con pinzas).
6. Eliminar por aspiración el agua residual presente en los canales del miniblotter.
7. Rellenar los canales del miniblotter con los 150 μ l de las sondas diluidas. El primer y último canal se rellenan con tinta china diluida 1:100 en buffer SSPE 2x (Sigma). Los canales no ocupados por sondas se rellenan con buffer $NaHCO_3$ 0,5M pH 8,4.
8. Incubar a temperatura ambiente 2 min. Las sondas se unen covalentemente a la membrana.
9. Eliminar por aspiración las sondas, en el mismo orden en que se colocaron.
10. Retirar la membrana del miniblotter e incubarla en NaOH 100 mM por no más de 5 min. El NaOH hidroliza los grupos carboxilos aún activos, inactivando de nuevo la membrana.
11. Lavar la membrana en SSPE 2x con SDS 0,1% durante 5 min a 60°C. La membrana queda lista para su uso.

12. Para almacenar la membrana en este momento, lavar con EDTA 20 mM pH8 durante 15 min a temperatura ambiente, en agitación, y a continuación guardar en la misma solución a 4°C.

- *Hibridación y revelado*

1. Mezclar 40 µl del producto de PCR con 110 µl de buffer SSPE 2x con SDS 0,1%. Desnaturalizar incubando la mezcla a 99°C durante 10 min. Inmediatamente después incubar en hielo durante 10 min.
2. Incubar la membrana en SSPE 2x con SDS 0,1% durante 5 min a temperatura ambiente, en agitación.
3. Colocar la membrana en el miniblottter de manera que los canales del mismo queden perpendiculares a las sondas previamente unidas.
4. Eliminar por aspiración el buffer residual presente en los canales.
5. Rellenar los canales con el producto de PCR diluido evitando la formación de burbujas.
6. Incubar la membrana a 42°C durante 1 hora. Sellar los canales del miniblottter para evitar la evaporación de las muestras. Los productos de PCR marcados con biotina se unirán por complementariedad a las sondas correspondientes.
7. Eliminar por aspiración las muestras presentes en los canales y retirar la membrana del miniblottter.
8. Lavar la membrana con 10 ml de SSPE 2x con SDS 0,5% en agitación, durante 10 min a 65°C, dos veces. Se ensayaron temperaturas de lavado en el rango de 42-65°C.
9. Incubar la membrana con 10 ml de SSPE 2x con SDS 0,5% conteniendo 1,25 u de conjugado estreptavidina-peroxidasa (Roche) (dilución 1:4000) durante 30 min a 42°C, en agitación. La estreptavidina del conjugado se une a la biotina del primer reverso.
10. Lavar la membrana con 10 ml de SSPE 2x con SDS 0,5% a 42°C en agitación durante 10 min, dos veces.
11. Lavar la membrana con SSPE 2x a temperatura ambiente en agitación, durante 5 min, dos veces.
12. Incubar la membrana con 10 ml de los reactivos de detección ECL (Amersham) durante 1 min. Para ello se mezcla, inmediatamente antes de ser utilizados, un volumen similar (5 ml) de los reactivos de detección 1 y 2. El reactivo 1 consiste en H₂O₂, sustrato de la enzima peroxidasa; el reactivo 2 contiene luminol. La reducción del reactivo 1 por parte de la peroxidasa del conjugado provoca la oxidación del luminol, que entra así en un estado excitado en el cual emite luz azul.
13. Colocar la membrana en el cassette de exposición (BioMax Cassette, Kodak), entre dos hojas de acetato, evitando la formación de burbujas. En oscuridad (luz roja) poner

encima una película de autorradiografía sensible a luz azul Hyperfilm ECL (Amersham).
Incubar 15 min-1 h.

14. Revelado: sumergir el film ECL en líquido revelador (GBX developer, Kodak) durante 2 min; lavar con agua y sumergir en líquido fijador (GBX fixer, Kodak) durante 3 min; lavar con agua y dejar secar.
15. Leer los resultados en una plantilla.

- *Reutilización de la membrana*

La membrana puede ser reutilizada al menos 10 veces. Para eliminar los productos de PCR unidos a la membrana, esta es incubada en SDS 1% a 90°C durante 30 min en agitación, dos veces. A continuación se incuba en EDTA 20 mM durante 15 min. Por último se guarda sumergida en EDTA 20 mM a 4°C hasta el siguiente uso.

– Especificidad y límite de detección

La especificidad y sensibilidad del método fueron determinadas una vez optimizada la temperatura de lavado tras la hibridación. La especificidad del método se evaluó utilizando 49 cepas de referencia y/o aislados obtenidos a partir de distintos hospedadores, pertenecientes a las especies diana *T. soleae* (9 cepas), *T. maritimum* (9 cepas), *V. harveyi* (15 cepas), *P. damsela* (10 cepas) y *P. baetica* (6 cepas), así como 41 cepas pertenecientes a otras especies, en su mayor parte relacionadas ecológica o taxonómicamente con las especies diana (Tabla 7). La amplificación por PCR se realizó con 100 ng de ADN de cada cepa, extraído a partir de cultivos puros. Como control negativo se utilizó agua destilada.

El límite de detección del método se determinó utilizando en la PCR diluciones decimales seriadas del ADN extraído a partir de las cepas *T. soleae* a47, *T. maritimum* a443, *V. harveyi* a91, *P. damsela* subsp. *piscicida* a321 y *Pseudomonas baetica* a390, en un rango de 100 ng-100 fg/tubo de reacción. Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

– Aplicabilidad en tejidos

El ensayo de detección en tejidos se realizó sobre muestras congeladas de hígado, riñón o lesiones externas, obtenidas a partir peces (acedía, lenguado o rombo) enfermos de forma natural en los cuales se había confirmado previamente la presencia, por cultivo o por PCR con cebadores específicos, de *T. soleae* (7 muestras), *T. maritimum* (4 muestras), *V. harveyi* (10 muestras), *P. damsela* subsp. *piscicida* (5 muestras) o *P. baetica* (2 muestras). En alguna de las

muestras se detectaron varios patógenos simultáneamente. Se utilizaron también muestras de 3 acedías sospechosas (por la historia clínica del tanque y la presencia de bacterias filamentosas en improntas de úlceras) de sufrir tenacibaculosis por *T. soleae*. Las muestras correspondientes a *T. soleae*, *T. maritimum* y *V. harveyi* consistieron mayoritariamente en úlceras externas, mientras que en el caso de *P. damsela* y *P. baetica* se trató siempre de órganos internos. El ADN fue extraído como ya se ha indicado, utilizándose una cantidad de 1 µg en la reacción de PCR.

4. RESULTADOS

4.1. AISLAMIENTO DE BACTERIAS ASOCIADAS A EPISODIOS DE MORTALIDAD

Durante el periodo 2004-2007 se realizaron 50 tomas de muestras que abarcaron tanto peces concretos que mostraban síntomas de enfermedad, sin que hubiese una mortalidad significativa en el tanque, como episodios de alta o baja mortalidad, en los que el número de peces muestreados fue mayor. Estas tomas de muestras se agruparon, en función de la especie y edad del pez muestreado, así como del tanque afectado y fecha en que tuvieron lugar, en 28 muestreos cuyas características se resumen en las tablas 8, 9 y 10.

Se muestrearon más de 250 peces, de los cuales el 64,5% correspondieron a acedía, el 21,3% a lenguado senegalés y el 14,2% a rombo (Tabla 11).

Tanto la acedía como el lenguado presentaron numerosos episodios de mortalidad, sin embargo, en el caso del lenguado, debido a la existencia de numerosos trabajos previos sobre patología en esta especie, solo se muestrearon unos pocos casos representativos. Por el contrario, en el caso del rombo el bajo número de peces muestreados se debió a que el número de episodios de mortalidad en peces *destetados* (alevines, juveniles o adultos) fue muy bajo o nulo (el 79% de los peces muestreados fueron larvas, frente al 11,5% en acedía y el 35% en lenguado).

Los síntomas observados en los peces enfermos incluyeron tanto cuadros ulcerativos (úlceras, necrosis externas) como septicémicos (órganos internos con necrosis, hemorragias, decoloración, inflamación, granulomas, etc.) (Figuras 3, 4 y 5), no obstante en otros casos no se observó ningún síntoma de enfermedad:

- a) Las larvas de acedía, lenguado y rombo muestreadas presentaban alta mortalidad pero no mostraban síntomas aparentes de enfermedad. En casi todos estos casos, las larvas se encontraban realizando la metamorfosis en el momento de las mortalidades.
- b) En alevines los síntomas más frecuentes fueron úlceras en las aletas caudal, dorsal o anal. Otros síntomas observados fueron úlceras cutáneas, zonas de descamación o zonas de inflamación, en la piel o en la zona visceral.
- c) En juveniles de acedía y lenguado los síntomas predominantes fueron también úlceras en la aleta caudal, aleta anal, en la piel o en la zona visceral-opercular, pudiendo ir acompañados de alteraciones en el hígado (palidez, necrosis, hemorragias). Solo en un caso los peces afectados no presentaron, en general, ningún tipo de lesión externa, pero sí internas (hígado hemorrágico).

Tabla 8. Muestréos realizados en cultivos de acedía. La salinidad del agua fue de 32 ± 4 ‰.

E	R	F	S	M	Nº aislados	Nº TM	Nº P	P	TQ	T	Notas
Larva	A1-LA10	Febrero 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	5	2	20	A	LA-10	20	Larvas (30 días) en metamorfosis Larvas (8-15 días) sanas
	A1S-1	Febrero 2005	Peces sanos	Ninguna	4	2	60	A	LA-10	20	
Alevín	A2-BI10	Octubre 2004	Úlceras en piel y aleta caudal, hígado pálido (anemia) en algún caso	Baja	3	1	5	A	BI-10	20	
	A2-SE1	Marzo-mayo 2005	Úlceras en aleta caudal, piel con zonas de descamación; en algún caso sin síntomas externos, con apatía o pérdida de equilibrio (natación errática, en espiral)	Alta/baja según muestra	19	7	20	A	SE-1	19-21	
	A2-SE1 (2)	Agosto 2006	Zona visceral inflamada, en algún caso aleta caudal erosionada	Alta	4	1	10	A	SE-1	19	
	A2-SE31	Abril-agosto 2004	Aleta caudal ulcerada	Baja	9	3	29	A	SE-31	19-22	
Juvenil	A3-BI10	Marzo-mayo 2005	Úlceras en piel, zona opercular, aleta caudal o en aleta anal; en algún caso hígado necrosado, distensión abdominal, apatía, o sin ningún síntoma externo	Alta	23	4	32	A	BI-10	12-19	
	A3-BI9	Diciembre 2004	Úlceras en piel o aleta caudal, en algún caso hígado pálido (anemia) o necrosado	Alta	5	1	4	A	BI-9	16	
	A3-LA9	Octubre 2004	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	Puntual	6	1	2	A	LA-9	20	
	A3-MA	Abril-mayo 2006	Úlceras en zona opercular, aleta caudal o en aleta dorsal, hígado pálido (anemia) o hemorrágico; en algún caso sin síntomas externos	Alta	35	2	14	B	MA	22	
	A3-SE1	Marzo 2006	Aleta caudal ulcerada	Puntual	5	1	1	A	SE-1	19	
	A3-SE1 (2)	Enero 2007	Aleta caudal inflamada, zona visceral inflamada	Baja	1	1	4	A	SE-1	19	
	A3-SE85	Septiembre-noviembre 2004	Úlceras en aleta caudal, aleta dorsal o en zona opercular, zonas de descamación; en algún caso hígado pálido (anemia) o necrosado	Alta	24	2	22	A	SE-85	10-21	Alguno de los peces muestreados eran alevines
Adulto	A4-BI6	Enero-marzo 2006	Sin síntomas externos, hígado frecuentemente alterado (necrosado, inflamado o hemorrágico); en algún caso pequeñas lesiones en aleta caudal	Baja	27	5	9	A	BI-6	10-15	
	A4-SE	Diciembre 2007	Úlceras en aleta caudal y rostro, pérdida de equilibrio, alteración del comportamiento	Puntual	1	1	1	A	SE	20	

Leyenda (Tablas 8, 9 y 10): E, edad o fase de cultivo (se clasificaron como “Larva” los individuos antes de la metamorfosis, “Alevín” los individuos posteriores a la metamorfosis con un peso de 0,2-5 g, como “Juvenil” los individuos con un peso de 5-35 g y como “Adulto” individuos con más de 35 g); R, referencia del muestreo; F, fecha de muestreo; SP, especie muestreada; S, síntomas observados en los peces muestreados; M, mortalidad en el momento de la toma de la muestra (se clasifico como “Puntual” cuando afectaba a unos pocos individuos concretos, “Baja” cuando se observaba una mortalidad baja pero continuada en el tiempo y “Alta” cuando se produce un repunte en la mortalidad del tanque que causa un 5% o más de bajas en una semana); Nº TM, número de tomas de muestra realizadas en cada brote o muestreo; Nº P, número de peces muestreados; P, piscifactoría; TQ, tanque de origen de las muestras; T, temperatura del agua en el momento del muestreo en °C.

Tabla 9. Muestréos realizados en cultivos de lenguado senegalés.

E	R	F	S	M	Nº aislados	Nº TM	Nº P	P	TQ	T	Notas
Larva	L1-LA5	Mayo-junio 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	8	2	20	A	LA-5	20	Larvas de 30 días
Alevín	L2-BI5	Febrero 2005	Úlceras en aleta caudal, dorsal o anal	Baja	3	1	6	A	BI-5	16	
Juvenil	L3-AR	Mayo 2006	Úlceras y descamación en abultamientos en zonas ventral y dorsal	Puntual	1	1	1	A	AR	19	
	L3-SE	Junio 2004	Úlcera en aleta caudal y piel	Puntual	2	1	1	A	SE	19	
	L3-UM	Octubre 2005	Sin síntomas externos, hígado hemorrágico	Alta	4	1	7	C	UM	22	
Adulto	L4-BI5	Mayo-junio 2005	Coloración oscura, distensión abdominal; hígado hemorrágico, bazo inflamado o con granulomas blanquecinos, ascitis, congestión de la zona visceral; a veces sin ningún síntoma externo	Alta	23	4	11	A	BI-5	19-21	
	L4-EXT	Julio 2004	Aleta caudal ulcerada, úlceras cutáneas, hígado en algún caso ligeramente hemorrágico	Alta	2	1	6	A	EXT	21	Dinoflagelado (<i>Amyloodinium</i>) en branquias
	L4-SE	Marzo 2006	Hemorragias en zona ventral, boca y aletas dorsal y anal, hígado hemorrágico en algún caso	Alta	1	1	5	A	SE	19	

Tabla 10. Muestréos realizados en cultivos de rombo.

E	R	F	S	M	Nº aislados	Nº TM	Nº P	P	TQ	T	Notas
Larva	R1-LA2	Febrero 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	3	1	10	A	LA-2	20	Larvas (20 días) en metamorfosis
	R1-LA6	Febrero 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	4	1	10	A	LA-6	20	Larvas (19 días) en metamorfosis
	R1-LA7	Febrero 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	1	1	10	A	LA-7	20	Larvas (17 días) en metamorfosis
	R1S-1	Febrero 2005	Peces sanos	Ninguna	2	1	10	A	LA-1	20	Larvas (31 días) sanas en metamorfosis
	R1S-2	Febrero 2005	Peces sanos	Ninguna	2	1	10	A	LA-3	20	Larvas (19 días) sanas en metamorfosis
Alevín	R2-LA	Mayo 2005	Aleta dorsal ulcerada	Baja	3	1	3	A	LA	20	
Adulto	R4-BI	Enero 2006	Úlcera cutánea dorsal, falta de apetito	Puntual	1	1	1	A	BI	10	
	R4-BI (2)	Agosto 2007	Hemorragias en aletas y zona ventral; hígado hemorrágico, zona visceral congestionada	Alta	Ninguno	1	4	A	BI	20	

Tabla 11. Distribución de los peces muestreados y de los aislados obtenidos por especie y fase de cultivo.

	Acedía				Lenguado				Rombo			
	Larva	Alevín	Juvenil	Adulto	Larva	Alevín	Juvenil	Adulto	Larva	Alevín	Juvenil	Adulto
Nº peces muestreados	20	65	78	10	20	6	9	22	30	3	-	5
Nº de aislados	5	36	98	28	8	3	7	26	8	3	-	1

- d) En peces adultos también se dieron cuadros ulcerativos en las tres especies estudiadas, pero en una proporción mucho menor a la observada en alevines y juveniles. El cuadro más frecuente fue el de peces sin ningún tipo de lesión externa (o de poca importancia) pero con alteraciones en los órganos internos (hígado inflamado, necrosado o hemorrágico, bazo inflamado o con granulomas blanquecinos), aunque también hubo peces que no mostraron ningún tipo de síntoma, ni interno ni externo. En otros casos, los principales síntomas fueron hemorragias en la zona ventral, boca y aletas.

La tasa de mortalidad observada varió entre los distintos muestreos realizados:

- a) En larvas de acedía, lenguado y rombo se registraron mortalidades muy altas, pudiendo llegar a alcanzar a la casi totalidad del tanque en unos pocos días.
- b) En el caso de alevines y juveniles de acedía y lenguado, se observó un mismo patrón de mortalidad, consistente en una mortalidad “por goteo”, baja pero continuada, interrumpida cada cierto tiempo (1 semana-1 mes) por picos en los que se podían alcanzar mortalidades del 5-30% en 1-3 semanas (en algunos casos de hasta el 10-30% en un solo día). La mortalidad acumulada en estos casos podía alcanzar el 80-90% al cabo de 3-6 meses. La utilización de antibióticos (oxitetraciclina) en estos casos lograba detener la mortalidad, pero no de forma duradera, volviéndose a producir mortalidades (primero bajas y luego altas) al interrumpirse el tratamiento. En alevines y juveniles de rombo no se dio ningún episodio de importancia.
- c) Respecto a la mortalidad en adultos, el único episodio importante en acedías adultas produjo una mortalidad del 9% en dos meses, mientras que los registrados en lenguados adultos se saldaron con mortalidades del 50-90% en un periodo de 1-2 semanas. En rombos adultos solo se dio un episodio de importancia, con una mortalidad de alrededor del 7% en una semana; no obstante ninguna bacteria creció a partir de las muestras de este brote.

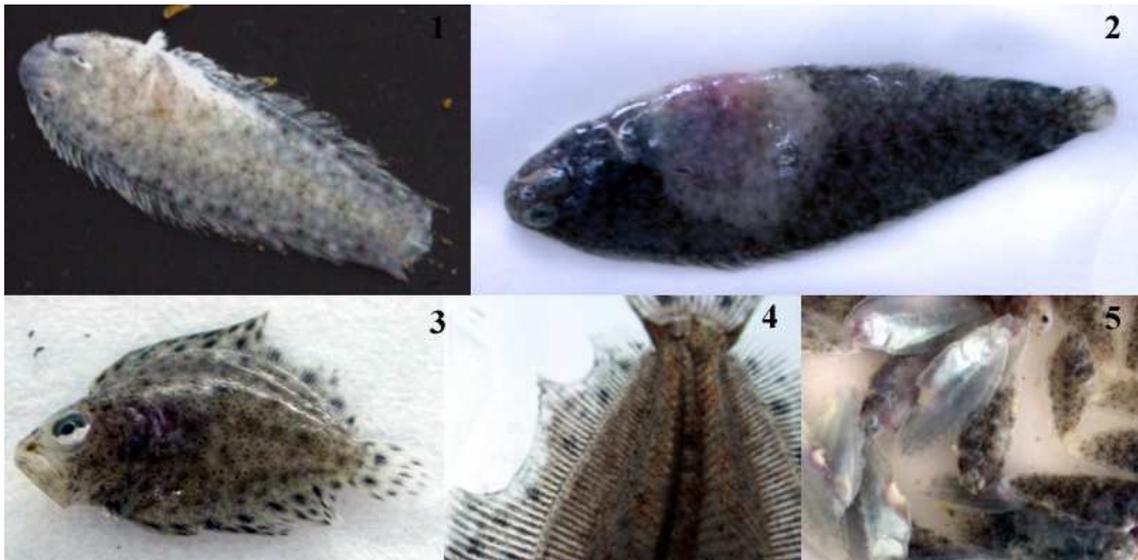


Figura 3. Sintomatología observada en alevines de acedía (1-2), rombo (3-4) y lenguado (5): 1, aleta caudal ulcerada; 2, zona visceral-dorsal inflamada; 3 y 4, úlceras en la aleta dorsal; 5, úlceras en las aletas dorsal o anal.

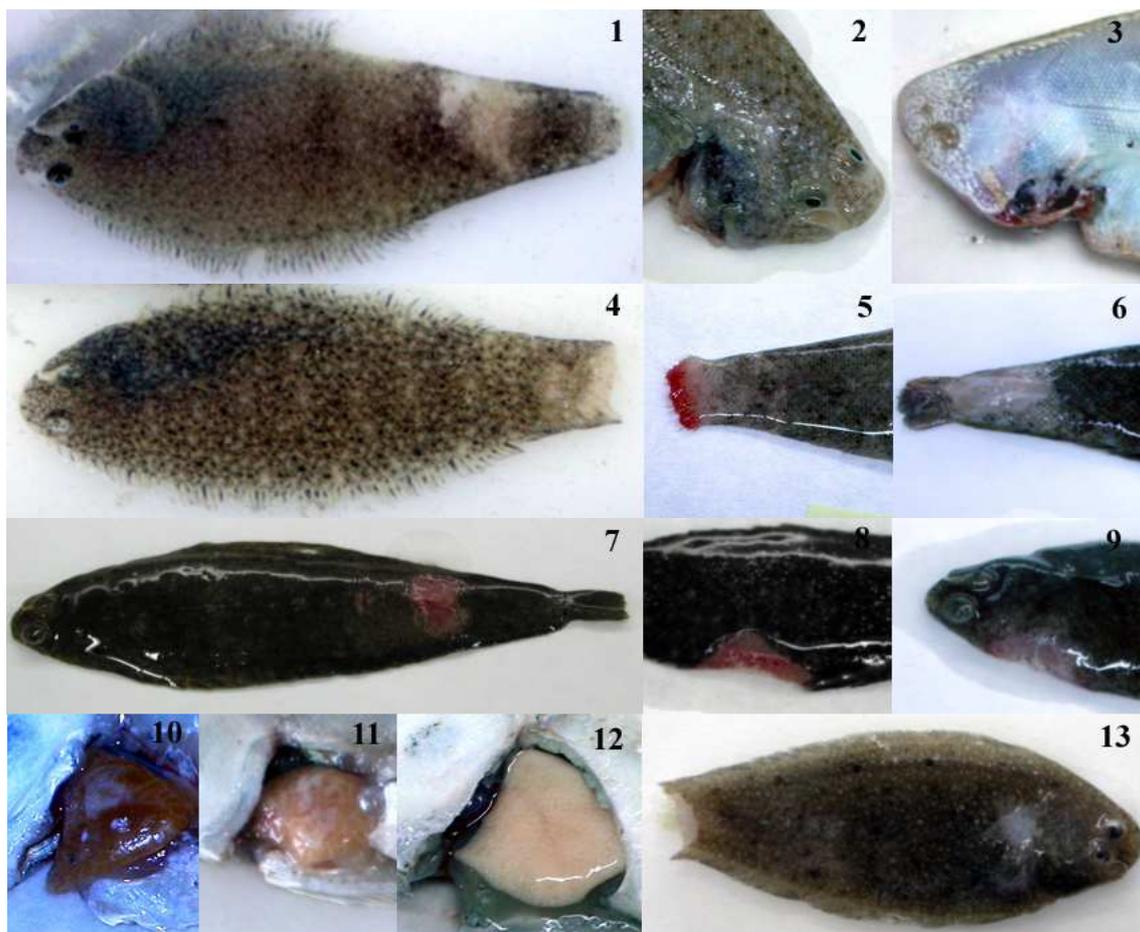


Figura 4. Sintomatología observada en juveniles de acedía (1-12) y lenguado (13): 1, zonas de descamación; 2 y 3, úlcera en la zona opercular; 4 y 5, aleta caudal ulcerada; 6 y 7, úlceras cutáneas; 8, úlcera en aleta anal; 9, úlcera en aleta dorsal; 10 y 11, hígado necrosado; 12, hígado decolorado (anemia); 13, aleta caudal ulcerada y úlcera cutánea.

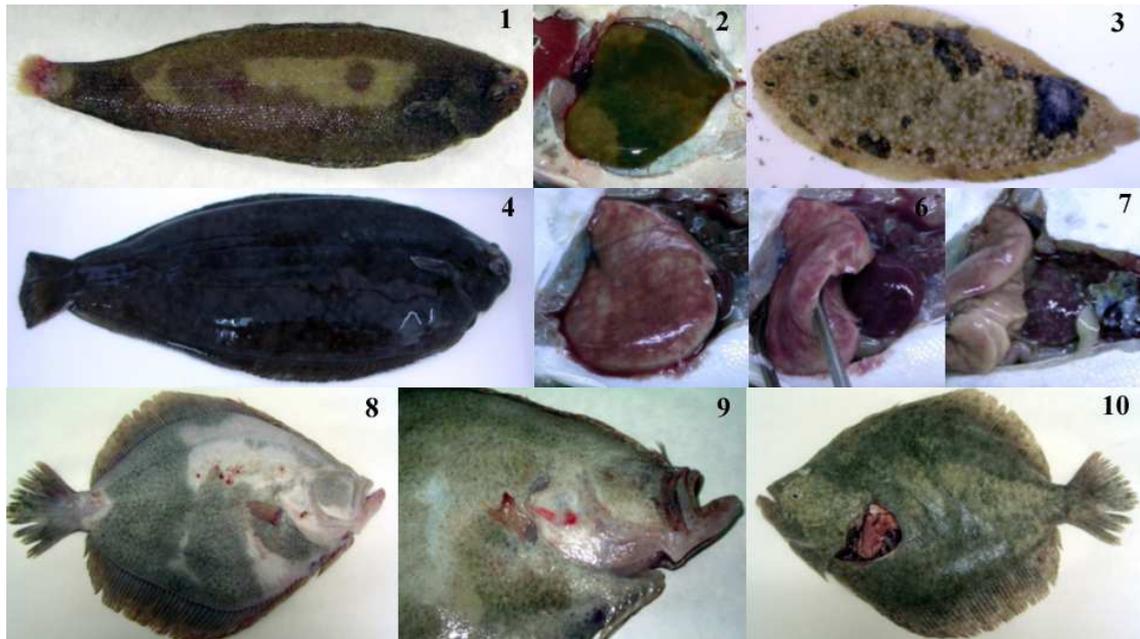


Figura 5. Sintomatología observada en adultos de acedía (1-2), lenguado (3-7) y rombo (8-10): 1, aleta caudal ulcerada; 2, hígado con necrosis; 3, úlcera cutánea; 4, distensión abdominal (ascitis), coloración general oscura (melanosis); 5, hígado hemorrágico; 6, bazo inflamado; 7, bazo con granulomas; 8 y 9, hemorragias en aletas y piel; 10, hígado hemorrágico y zona visceral congestionada (acumulación de sangre).

En total se obtuvieron 223 aislados a partir de peces enfermos, de los cuales el 74,9% corresponden a acedía, el 19,7% a lenguado y el 5,4% a rombo. En la Tabla 11 se muestra su distribución en función de la especie y fase de cultivo a partir de la cual fueron recuperados. Por edades, el 9,4% de los aislados provienen de larvas, el 18,8% de alevines, el 47% de juveniles y el 24,7% de peces adultos. De las cepas procedentes de peces *destetados*, el 58,8% se aislaron a partir de lesiones externas, el 41,2% restante a partir de órganos internos. Por otro lado, con el fin de dilucidar si la mortalidad en larvas se debía a un problema infeccioso o al proceso de metamorfosis, se muestrearon larvas sanas de la misma edad a las afectadas, con el fin de encontrar diferencias en la microbiota bacteriana en cada caso, así como los cultivos de artemias que servían de alimento a las larvas. A partir de estas muestras se obtuvieron otros 10 aislados.

La mayor parte de las cepas incluidas en este trabajo se aislaron a partir de cultivos mixtos, seleccionándose en cada caso las colonias más numerosas o representativas. En un número considerable de casos, no se obtuvo ningún aislado a partir de las muestras de peces enfermos, lo que podría deberse a que la enfermedad fuese de etiología no bacteriana, a la incapacidad de las bacterias para crecer en el medio de cultivo utilizado, a una temperatura de incubación inadecuada o a un tratamiento con antibióticos simultáneo a la toma de muestras. En otros casos, la impronta de las lesiones externas reveló la presencia de numerosas bacterias filamentosas que luego no quedaban reflejadas en el medio de cultivo, bien debido a su incapacidad para crecer en el mismo, bien porque eran inhibidas o ocultas por otras bacterias

presentes en la muestra. Los datos de aislamiento para cada una de las cepas obtenidas se recogen en el Anexo II.

4.2. ESTABLECIMIENTO DE FENONES Y EVALUACIÓN DE LA VIRULENCIA

▪ Establecimiento de fenones

Los aislados obtenidos fueron sometidos a una caracterización fenotípica preliminar cuyos resultados se recogen en el Anexo III. Basándose en los perfiles fenotípicos obtenidos, todos los aislados, excepto cinco, fueron agrupados en 19 fenones (G1, G7, G29, G35, G47, G54, G91, G107, G148, G185, G197, G241, G255, G256, G321, G328, G390, G443 y G500) (Tabla 12), que fueron designados en función de un aislado tipo. Esta agrupación de los aislados fue corroborada al realizarse con los mismos datos fenotípicos un dendrograma mediante el método UPGMA, mostrando esta una distribución de los aislados básicamente similar a la agrupación en fenones (Figura 6).

La distribución de los aislados en función del fenón al que pertenecen y de la muestra a partir de la cual fueron recuperados se indica en la Tabla 13.

Tabla 12. Distribución de los aislados obtenidos en los 19 grupos fenotípicos o fenones establecidos. Los aislados a3, a42, a152, a153 y a246 no fueron incluidos en ningún fenón. En negrita se indican los aislados tipo.

Fenón	Número de aislados	Aislados
G1	18	a1 , a4, a5, a48, a49, a57, a72, a75, a80, a108, a202, a206, a220, a230, a248, a250, a266, a269
G7	12	a7 , a90, a157, a163, a165, a167, a170, a194, a214, a234, a273, a303
G29	5	a13, a14, a28, a29 , a51
G35	20	a6, a27, a31, a32, a33, a35 , a36, a52, a85, a86, a92, a97, a98, a100, a101, a238, a287, a309, a311, a439
G47	8	a11, a47 , a50, a216, a410, a462, a467, a469
G54	3	a54 , a173, a227
G91	40	a8, a9, a10, a17, a18, a19, a20, a26, a30, a76, a82, a87, a91 , a102, a106, a417, a418, a419, a420, a421, a422, a423, a426, a427, a428, a429, a430, a431, a432, a433, a434, a450, a451, a452, a455, a456, a457, a458, a459, a460
G107	22	a16, a58, a105, a107 , a117, a118, a119, a126, a133, a150, a166, a168, a174, a176, a177, a207, a281, a295, a394, a415, a440, a441
G148	11	a134, a142, a143, a148 , a149, a154, a155, a156, a164, a172, a175
G185	3	a180, a184, a185
G197	3	a197 , a199, a308
G241	20	a81, a218, a221, a233, a237, a239, a241 , a242, a243, a245, a252, a257, a258, a259, a260, a262, a271, a312, a313, a314
G255	9	a190, a196, a200, a201, a203, a204, a208, a213, a255
G256	8	a12, a15, a212, a254, a256 , a286, a292, a297
G321	25	a316, a318, a319, a320, a321 , a329, a330, a331, a332, a333, a334, a335, a336, a337, a338, a339, a340, a341, a342, a343, a344, a354, a356, a357, a364
G328	2	a328 , a381
G390	7	a390 , a391, a392, a393, a398, a399, a600
G443	8	a274, a388, a442, a443 , a444, a445, a461, a523
G500	4	a500 , a501, a502, a503

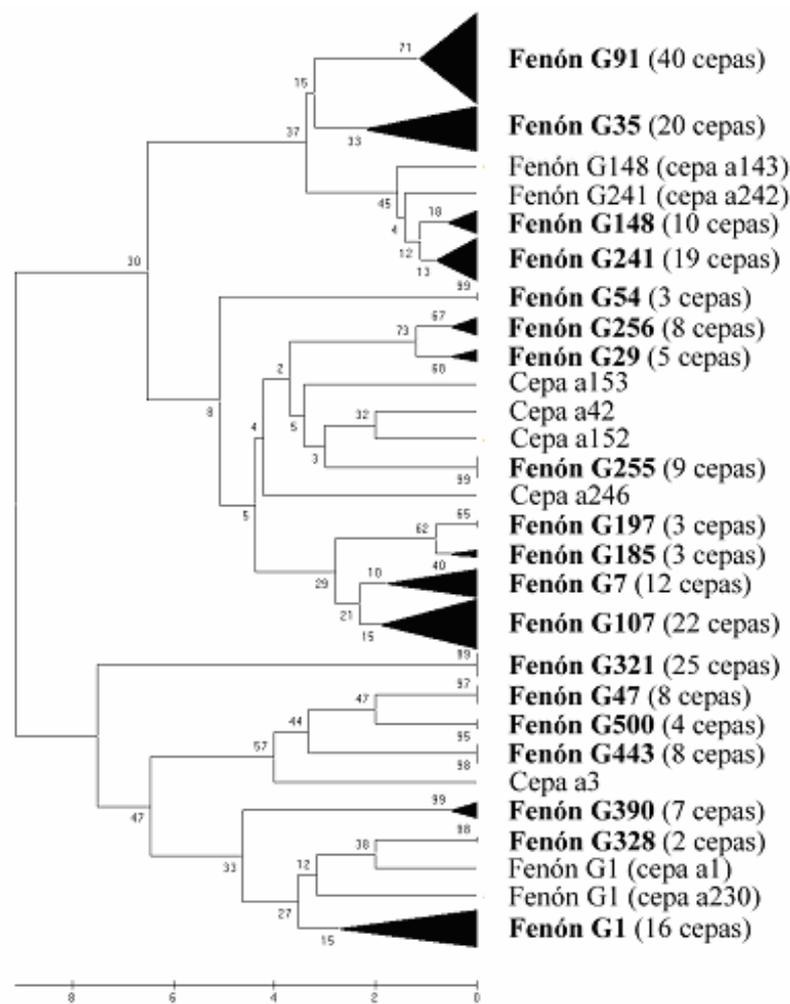


Figura 6. Dendrograma realizado mediante el método UPGMA, utilizando los perfiles de la caracterización fenotípica previa de los aislados, mostrando las relaciones entre los distintos fenones y cepas no adscritas a fenones.

Tabla 13. Distribución de las cepas recuperadas a partir de peces enfermos, en función del fenón al que pertenecen y de la muestra a partir de la cual fueron aisladas.

Fenón	Acedía				Lenguado				Rombo			
	Larva	Alevín	Juvenil	Adulto	Larva	Alevín	Juvenil	Adulto	Larva	Alevín	Juvenil	Adulto
G1	-	9	7	-	-	-	-	-	-	2	-	-
G7	1	3	1	3	-	-	-	1	2	-	-	-
G29	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G35	-	-	16	1	-	-	1	2	-	-	-	-
G47	-	1	3	1	-	-	1	1	-	-	-	1
G54	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
G91	-	4	32	2	-	-	1	1	-	-	-	-
G107	1	-	7	6	-	1	-	-	2	-	-	-
G148	1	-	-	-	-	2	-	-	4	-	-	-
G185	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-
G197	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G241	-	10	1	-	8	-	-	-	-	1	-	-
G255	-	1	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G256	-	2	4	2	-	-	-	-	-	-	-	-
G321	-	-	-	-	-	-	4	21	-	-	-	-
G328	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G390	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-
G443	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G500	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

▪ Evaluación de la virulencia

Para evaluar la virulencia de los aislados se seleccionaron cepas representativas de cada uno de los fenones descritos (Tabla 14). En los ensayos realizados con alevines (2 g) y juveniles (15 g) de acedía mediante inyección intraperitoneal de una única dosis de 10^6 UFC/pez, solo las cepas de cinco fenones, los G47, G91, G321, G390 y G443, produjeron mortalidades significativas, del 80-100% (Tabla 15). Estas se produjeron antes de transcurridos los 6 días de iniciado el experimento, salvo en el caso de la cepa a443, que se produjeron más tarde. Por otro lado, no se observaron diferencias importantes en las tasas de mortalidad entre alevines y juveniles a pesar de utilizar la misma dosis bacteriana en ambos casos. La mortalidad causada por cepas de otros fenones fue nula o inferior al 40%.

Las cepas tipo de los 5 fenones virulentos se utilizaron para la realización de un ensayo por inmersión con una dosis única de 10^7 UFC/ml, con alevines de acedía de aproximadamente 4 g. El resultado del ensayo se muestra en la Tabla 16. Las cepas a47, a321 y a443 provocaron la muerte del 100% de los peces al cabo de 10 días de iniciarse el ensayo. La cepa a443 fue la más virulenta, provocando la muerte de todos los peces dentro de los 3 primeros días tras la exposición al patógeno. La cepa a321 registro un resultado similar a los 6 días y la a47 a los 10 días. Las cepas a91 y a390 no produjeron mortalidades significativas en ninguno de los dos ensayos realizados.

Tabla 14. Cepas utilizadas en los ensayos de virulencia.

Fenón	Cepa	Aislamiento		
		Especie	Edad	Muestra
G1	a220	Acedía	Alevín	Aleta caudal (úlceras)
	a250	Acedía	Alevín	Aleta caudal (úlceras)
G7	a7	Acedía	Alevín	Aleta caudal (úlceras)
G29	a29	Acedía	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)
G35	a6	Lenguado	Adulto	Aleta caudal (úlceras)
	a35	Acedía	Juvenil	Hígado
G47	a47	Acedía	Juvenil	Hígado
	a216	Acedía	Adulto	Piel (descamación)
G54	a54	Acedía	Adulto	Hígado
G91	a82	Acedía	Juvenil	Hígado
	a91	Acedía	Juvenil	Hígado
	a417	Acedía	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)
G107	a107	Acedía	Juvenil	Hígado
G185	a185	Acedía	Adulto	Hígado
G197	a197	Acedía	Juvenil	Aleta anal (úlceras)
G148	a134	Rombo	Larva	Larva entera
	a148	Artemia		
G241	a241	Acedía	Alevín	Piel (descamación)
	a243	Acedía	Alevín	Piel (descamación)
G255	a255	Acedía	Alevín	Aleta caudal (úlceras)
G256	a256	Acedía	Alevín	Hígado
G321	a321	Lenguado	Adulto	Hígado
G328	a328	Acedía	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)
G390	a390	Acedía	Adulto	Hígado
G443	a443	Acedía	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)
G500	a500	Acedía	Alevín	Hígado
Otros	a3	Acedía	Alevín	Aleta caudal (úlceras)

Tabla 15. Porcentajes de mortalidad en alevines y juveniles de acedía en el ensayo por inyección intraperitoneal con una dosis bacteriana de 10^6 UFC/pez. Se utilizaron cepas representativas de cada uno de los fenones descritos. La mortalidad se registró diariamente durante los 18 días siguientes a la infección.

Fenón	Cepa	Porcentajes de mortalidad acumulada (%)							
		Alevines (2 g)				Juveniles (15 g)			
		Día 3	Día 6	Día 10	Día 18	Día 3	Día 6	Día 10	Día 18
G1	a220	-	-	10	10	-	-	-	-
	a250	-	-	-	-	-	-	-	-
G7	a7	-	-	-	-	-	-	-	-
G29	a29	-	-	-	-	-	-	-	-
G35	a6	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND
	a35	-	-	-	-	-	-	-	-
G47	a47	50	100	100	100	60	100	100	100
	a216	100	100	100	100	ND	ND	ND	ND
G54	a54	10	10	10	10	-	-	-	-
G91	a82	80	80	80	80	ND	ND	ND	ND
	a91	90	100	100	100	90	90	90	90
	a417	40	40	40	40	ND	ND	ND	ND
G107	a107	-	-	-	-	-	-	-	-
G185	a185	20	30	30	30	-	-	-	-
G197	a197	-	-	-	-	-	-	-	-
G148	a134	-	-	-	-	-	-	-	-
	a148	-	-	-	-	-	-	-	-
G241	a241	-	-	-	-	-	-	-	-
	a243	-	-	-	-	-	-	-	-
G255	a255	-	-	-	-	-	-	-	-
G256	a256	-	-	-	-	-	-	-	-
G321	a321	50	100	100	100	90	90	100	100
G328	a328	-	-	-	-	-	-	-	-
G390	a390	100	100	100	100	90	90	90	90
G443	a443	-	-	30	80	-	30	80	90*
G500	a500	-	-	-	-	-	-	-	-
Otros	a3	-	-	-	-	ND	ND	ND	ND

* En el ensayo realizado con juveniles de acedía y la cepa a443, la dosis bacteriana real fue de 10^7 UFC/pez.

Tabla 16. Porcentajes de mortalidad en alevines de acedía en el ensayo por inmersión con una dosis bacteriana de 10^7 UFC/ml. Se utilizaron cepas que mostraron ser virulentas por inyección intraperitoneal. La mortalidad se registró diariamente durante los 18 días siguientes a la infección.

Fenón	Cepa	Porcentajes de mortalidad acumulada (%)							
		Ensayo 1				Ensayo 2			
		Día 3	Día 6	Día 10	Día 18	Día 3	Día 6	Día 10	Día 18
G47	a47	-	-	100	100	ND	ND	ND	ND
G91	a91	-	-	-	-	-	-	-	-
G321	a321	-	100	100	100	ND	ND	ND	ND
G390	a390	-	-	10	10	-	-	10	10
G443	a443	100	100	100	100	ND	ND	ND	ND

Para el cálculo de la dosis letal 50 (DL_{50}) se realizaron ensayos por inmersión con dosis de bacteria de 10^4 - 10^7 UFC/ml, con alevines de acedía de 1 g, cuyos resultados se muestran en la Figura 7. Para cada dosis utilizada se realizaron dos ensayos simultáneamente, calculándose la dosis letal a partir del valor medio de los dos ensayos. La cepa a443 fue de nuevo la más virulenta, con una DL_{50} de $2,2 \times 10^5$ UFC/ml, seguida de la a321, con una DL_{50} de $3,4 \times 10^5$ UFC/ml, y de la a47, que con una DL_{50} de $7,8 \times 10^5$ UFC/ml, fue la menos virulenta. En el caso de la cepa a321 la DL_{50} se determinó también mediante inyección intraperitoneal, utilizando alevines de acedía de aproximadamente 3g con un rango de dosis de 10^1 - 10^4 UFC/pez. La DL_{50} obtenida en este caso fue de $1,5 \times 10^3$ UFC/pez.

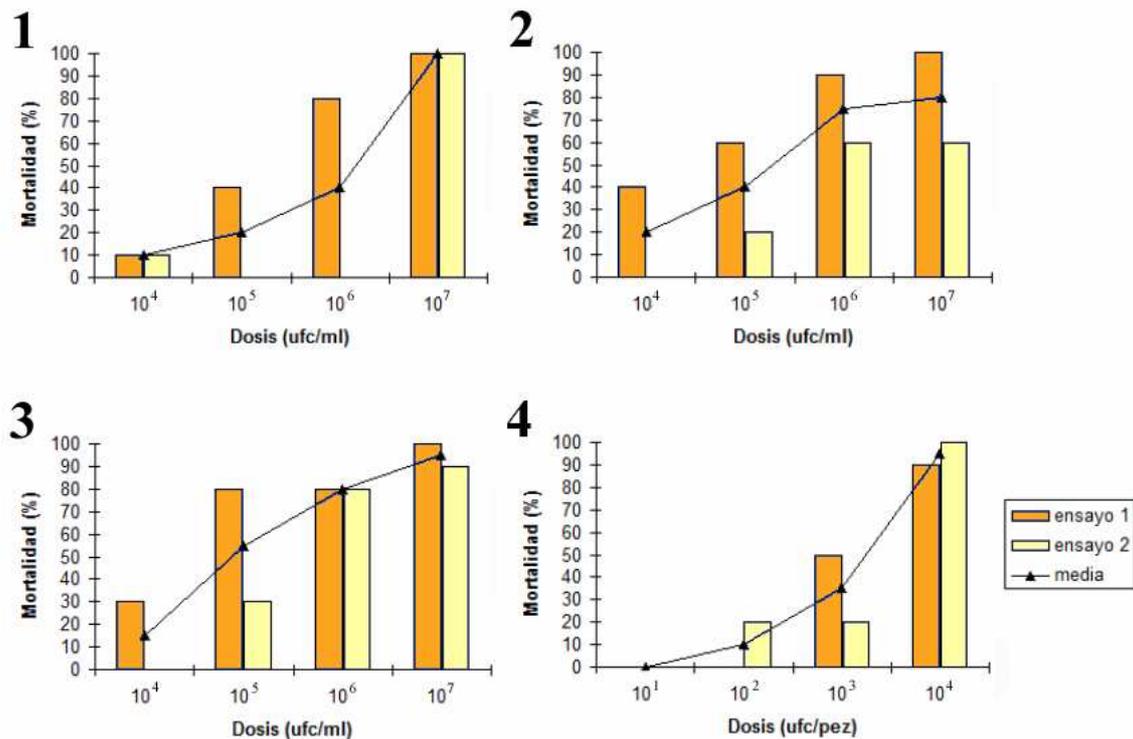


Figura 7. Porcentajes de mortalidad acumulada en los ensayos realizados para el cálculo de la dosis letal 50, a los 10 días del inicio del experimento. Se utilizaron las cepas que mostraron ser virulentas por inyección intraperitoneal e inmersión. Gráfica 1: ensayo por inmersión con la cepa a47; gráfica 2: ensayo por inmersión con la cepa a443; gráfica 3: ensayo por inmersión con la cepa a321; gráfica 4: ensayo por inyección intraperitoneal con la cepa a321. Para cada una de las dosis se realizaron simultáneamente dos ensayos, usándose la media de ambos para el cálculo de la dosis letal.

En el curso de la realización de estos ensayos, solamente los peces infectados con la cepa a443 reprodujeron con cierta frecuencia los síntomas típicos de la enfermedad, úlceras externas en este caso. En todos los demás casos los peces no mostraron ningún síntoma de enfermedad, a excepción de un pez infectado con la cepa a47 que también acabó por presentar úlceras en la aleta caudal. La recuperación de los patógenos a partir de los peces muertos varió según la cepa utilizada. En el caso de las cepas a390, a321 y a91, el patógeno fue recuperado de la práctica totalidad de los peces y en buen número, aunque casi siempre en cultivos mixtos. En el caso de las cepas a47 y a443, ambas bacterias filamentosas, sin embargo, el patógeno no siempre fue recuperado de los peces muertos y cuando se recuperó fue en bajo número, en cultivos mixtos. En ninguno de los ensayos realizados con alevines y juveniles se registraron muertes entre los peces controles.

Por otra parte, con el fin de determinar si los principales fenones detectados en larvas (G7, G107, G148 y G241) podían resultar patógenos para estas, se realizó un ensayo por inmersión con grupos de larvas de acedia de 20 días (n=100) con una dosis de 10⁶ UFC/ml, con representantes de estos 4 fenones. Como controles positivos, se incluyeron también las cepas

tipo de los fenones patógenos G91 y G321. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8. El grupo de peces control mostró a los 5 días una mortalidad del 61%, obteniendo las cepas de los fenones G91, G7 y G107 resultados básicamente similares (65%, 59% y 60% respectivamente). Únicamente el fenón G321 mostró ser claramente virulento (100% mortalidad), mientras que los fenones G148 y G241 mostraron resultados extraños, al mostrar porcentajes de mortalidad muy inferiores a los del grupo control (43% y 35% respectivamente).

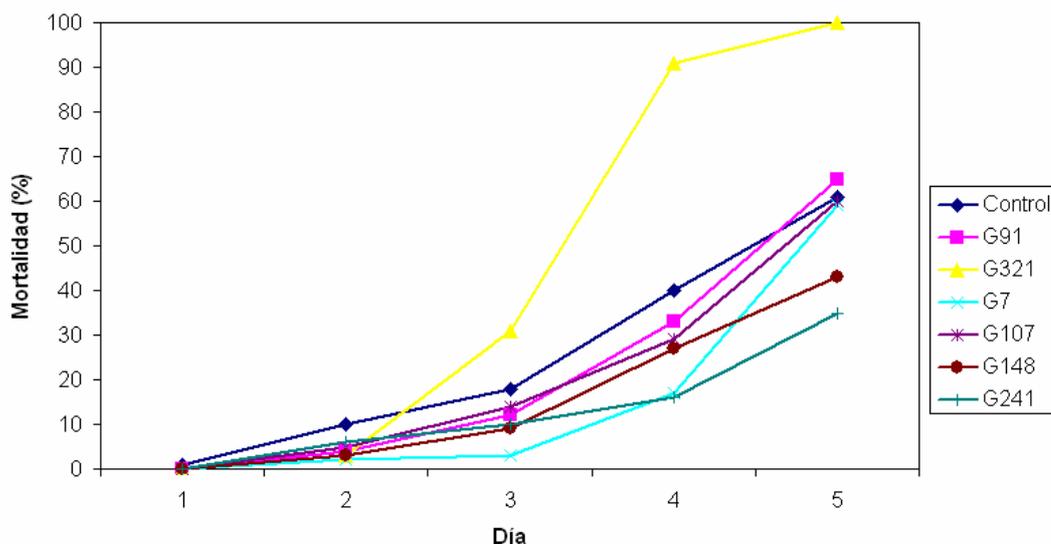


Figura 8. Porcentajes de mortalidad acumulada en el ensayo por inmersión realizado con larvas de acedia de 20 días, utilizando representantes de los fenones G91 (a91), G321 (a321), G7 (a7), G107 (a107), G148 (a134) y G241 (a243). En el grupo control no se adicionó ninguna bacteria a las larvas.

4.3. IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS FENONES

▪ Caracterización fenotípica y genotípica de los fenones

Con el fin de identificar los principales tipos de bacterias presentes en los episodios de mortalidad estudiados, se seleccionaron 109 de los 223 aislados obtenidos (Tabla 17), incluyéndose representantes de cada uno de los fenones así como las cepas no incluidas en estos. Estos aislados fueron sometidos a una caracterización fenotípica más extensa y a una caracterización genotípica basada principalmente en la secuenciación del gen ARNr 16S. Los resultados obtenidos en ambos casos fueron congruentes con la clasificación en fenones establecida inicialmente, y permitieron tanto una mejor diferenciación de los mismos, como su identificación a nivel de género o especie, mostrando que en algún caso incluían más de una especie.

Tabla 17. Cepas bacterianas utilizadas para la caracterización fenotípica y genotípica de los fenones.

Fenón	Número de aislados	Aislados
G1	11	a1, a5, a108, a202, a206, a220, a230, a248, a250, a266, a269
G7	4	a7, a90, a170, a234
G29	4	a14, a28, a29, a51
G35	8	a6, a33, a35, a85, a92, a100, a101, a311
G47	8	a11, a47, a50, a216, a410, a462, a467, a469
G54	2	a54, a227
G91	17	a8, a9, a10, a20, a26, a30, a82, a87, a91, a102, a106, a417, a421, a426, a428, a456, a459
G107	5	a58, a105, a107, a207, a394
G148	5	a134, a142, a143, a148, a149
G185	2	a180, a185
G197	3	a197, a199, a308
G241	7	a221, a233, a239, a241, a245, a260, a314
G255	4	a200, a201, a204, a255
G256	5	a212, a254, a256, a286, a297
G321	3	a316, a319, a321
G328	2	a328, a381
G390	6	a390, a391, a393, a398, a399, a600
G443	6	a274, a388, a443, a444, a461, a523
G500	2	a500, a502

Las principales características fenotípicas diferenciales de los fenones se resumen en la Tabla 18. Basándose en estos resultados se desarrolló una clave para su diferenciación de acuerdo a criterios fenotípicos (Figura 9). En todos los casos se trató de bacterias Gram negativas oxidasa positivas, por lo que la primera división de los aislados se hizo basándose en los resultados del test oxidación-fermentación de la glucosa (OF).

Entre los microorganismos de metabolismo oxidativo (6 fenones) la diferenciación se realizó inicialmente en función de la morfología de la célula, la movilidad, el requerimiento de agua de mar para el crecimiento y el crecimiento con distintas concentraciones de NaCl.

La diferenciación de los microorganismos de metabolismo fermentativo (13 fenones) se realizó inicialmente de acuerdo a los resultados de los test arginina dihidrolasa (ADH), lisina decarboxilasa (LDC) y ornitina decarboxilasa (ODC), siguiendo el procedimiento descrito por Alsina & Blanch (1994). Los grupos formados a raíz de este esquema se diferenciaron con test como el del indol, fermentación de azúcares, hidrólisis de la gelatina o el crecimiento a distintas temperaturas o concentraciones de NaCl.

El análisis filogenético basado en secuencias parciales del ADNr 16S mostró una clasificación básicamente similar a la obtenida mediante criterios fenotípicos, aunque en algún caso fue menos discriminante.

Con una única excepción, dentro de cada fenón las cepas mostraron porcentajes de similitud iguales o superiores al 98,7% propuesto por Stackebrandt & Ebers (2006) como valor mínimo dentro de una especie, por lo que pueden considerarse, si no miembros de una misma especie, sí pertenecientes a especies estrechamente relacionadas. El único fenón en el que la similitud entre sus cepas fue inferior a ese valor fue el G1, un resultado acorde con la alta heterogeneidad fenotípica que se observa en este grupo.

Tabla 18. Principales características fenotípicas diferenciales entre los 19 fenones establecidos. En todos los casos se trata de bacterias Gram negativas, oxidasa y catalasa positivas. Todos los aislados fueron negativos para los test de producción de H₂S, de producción de gas a partir de glucosa y de producción de ácido a partir de inositol y rhamnosa. A excepción de algunos aislados del fenón G1, todos fueron sensibles a novobiocina. No se incluyen otros test realizados únicamente a ciertos grupos.

Test	Fenón																		
	G1	G7	G29	G35	G47	G54	G91	G107	G148	G185	G197	G241	G255	G256	G321	G328	G390	G443	G500
Morfología celular	B [#]	V	B	B	F	V	B	V	B	V	V	B	B	B	B	B	V	F [#]	F
OF	O	F	F	F	O	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	O	O	O	O
Móvil	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
ADH	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-
LDC	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-
TCBS	-	v	a	a, v	-	v	a, v	a	a	v	v	a	v	a	-	-	-	-	-
ONPG	V-	+	+	V-	-	-	V	V	+	-	-	V	+	+	-	-	-	-	-
Citrato	V	-	-	-	-	-	V	-	V+	-	-	V	-	-	-	+	+	-	-
Indol	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
VP	V	-	-	-	+	-	-	-	V	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
Rojo metilo	-	+	+	+	ND	+	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	ND	ND	ND	ND
NO ₃	V+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
N ₂	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+
Amilasa	V	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Esculinasa	ND	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	ND	ND	-	-	-
Caseinasa	ND	ND	-	+	+	ND	+	ND	+	ND	ND	+	ND	-	ND	ND	+	ND	ND
Ureasa	-	-	-	+	-	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	-, α, β	β	-	-	ND	α	α	β	α	-	α	-, β	-	α	-	α	α, β	ND	ND
<i>Ácido de:</i>																			
Glucosa	V	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Manitol	V	+	-	V-	-	+	+	+	+	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	V	+	+	V	-	-	V	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
Melobiosa	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Arabinosa	V	-	V	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	V-	V+	-	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
Manosa	-	+	+	+	ND	+	+	+	+	+	+	V	+	+	+	+	+	ND	ND
Salicina	-	-	-	V+	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ND	ND
<i>Crecimiento a:</i>																			
4°C	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+
30°C	+	ND	+	+	ND	ND	+	ND	+	ND	+	+	-	+	+	+	+	ND	+
35°C	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
40°C	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+
44°C	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	ND	-	-	-
<i>Crecimiento en:</i>																			
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
6% NaCl	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-
8% NaCl	+	-	-	(+)	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-
10% NaCl	ND	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
12% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Requerimiento agua mar	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Sensibilidad a:</i>																			
O120 (10 µg)	R	V	S	R	R	S	R	VS	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S
O129 (150 µg)	R	VS	S	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S
Ampicilina	V	VS	S	R	VS	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S
Color colonia	B	G, B	G	G	AB	AP	MC	G, B	B	B	B	B	B	G	G	B	B	AP	AB
Swarming	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Pigmentos difusibles	-	-	+	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Número cepas	11	4	4	8	8	2	17	5	5	2	3	7	4	5	3	2	6	6	2

[#]Leyenda: +, el porcentaje de cepas positivas iguala o supera el 90%; V, porcentaje de positivos del 26-74%; V+, porcentaje de positivos del 75-89%; V-, porcentaje de positivos del 11-25%; -, porcentaje de positivos del 0-10%; (+), positivo débil; ND, no determinado. Morfología celular: B, bacilo; F, filamentosa; V, bacilo con forma de coma o irregular. Color de las colonias: AB, amarillo brillante; AP, amarillo pálido; B, blancuzca; G, gris; MC, marrón claro.

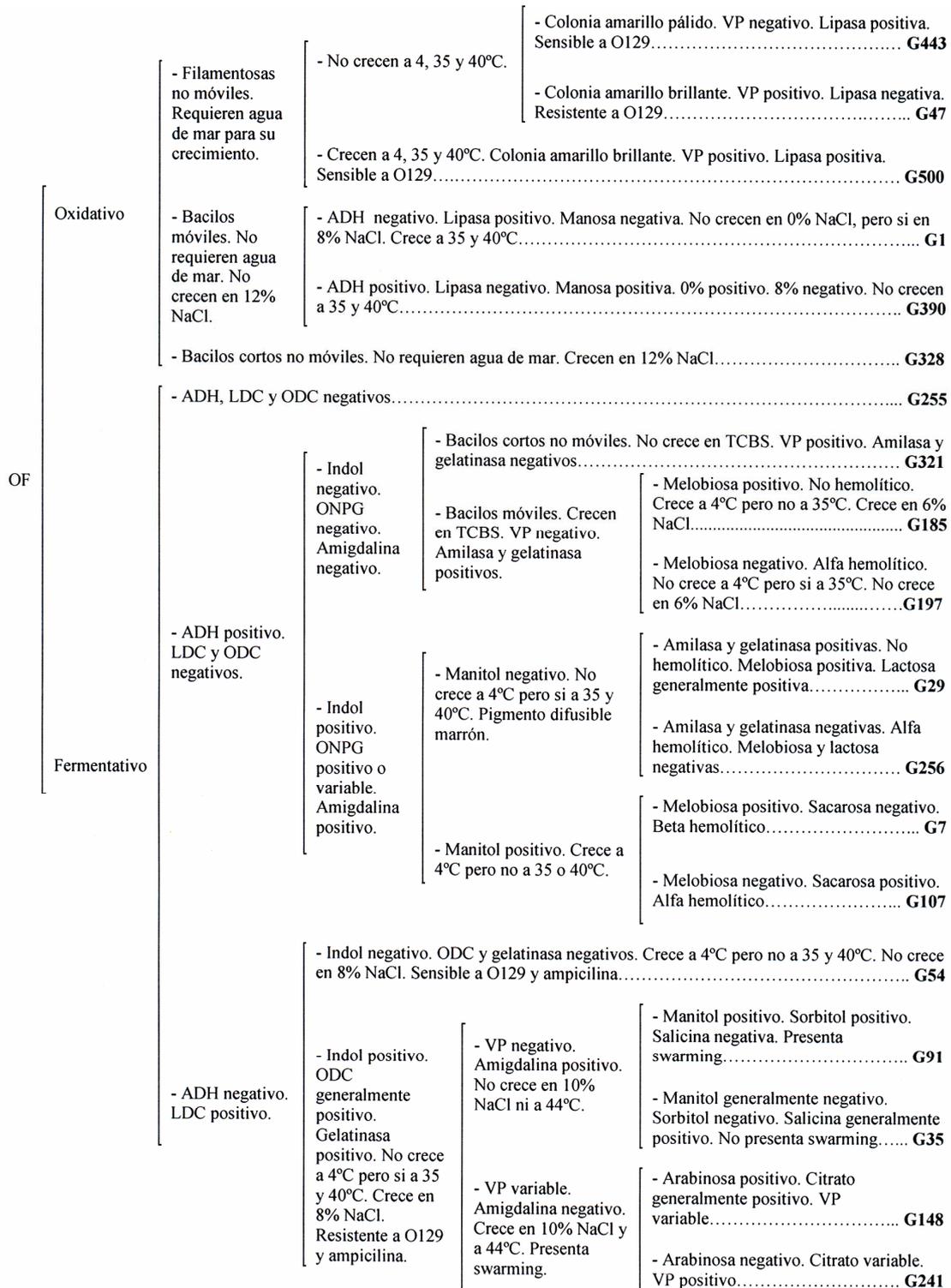


Figura 9. Clave para la diferenciación de los diecinueve fenones establecidos, basada en las características fenotípicas determinadas durante la realización de este trabajo. En todos los casos se trata de bacterias Gram negativas oxidasa positivas, por lo que la primera diferenciación se realizó en función del test de oxidación-fermentación de la glucosa (OF). La diferenciación inicial de los microorganismos de metabolismo oxidativo se realizó en función de la morfología de la célula, su movilidad y el requerimiento de agua de mar para su crecimiento. Los microorganismos de metabolismo fermentativo se diferenciaron inicialmente en función de los resultados de los tests ADH, LDC y ODC. Las cepas no pertenecientes a ningún fenón no se incluyen.

En la Tabla 19 se muestran los porcentajes de similitud observados entre secuencias parciales del ADNr 16S de cepas representativas de los distintos fenones. En la mayor parte de los casos los valores se encuentran muy por debajo de los valores propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006) e incluso por debajo del 97% (el valor más bajo se dio entre las cepas a47 y a390, con un 72,9% de similitud). En dos casos, sin embargo, se dieron valores por encima del 98,7%: entre las cepas de los fenones G29 y G256 (99,7%) y entre las cepas de los fenones G91, G35, G148 y G241 (98,5-100%), manteniéndose en estos casos los fenones principalmente en base a criterios fenotípicos.

Por otro lado, el árbol filogenético obtenido a partir de las distancias genéticas de las secuencias ADNr 16S obtenidas en este trabajo (Anexo V) reflejó claramente estos resultados, agrupando los fenones G29 y G256 por un lado, y los fenones G91, G35 y G241 por otro, mientras que los demás fenones formaron clados únicos, claramente diferenciados entre sí (Figura 10). Por otra parte, la distribución de los aislados en función de estas secuencias es muy similar a la obtenida en el dendrograma resultante de la caracterización fenotípica previa de los aislados (Figura 6).

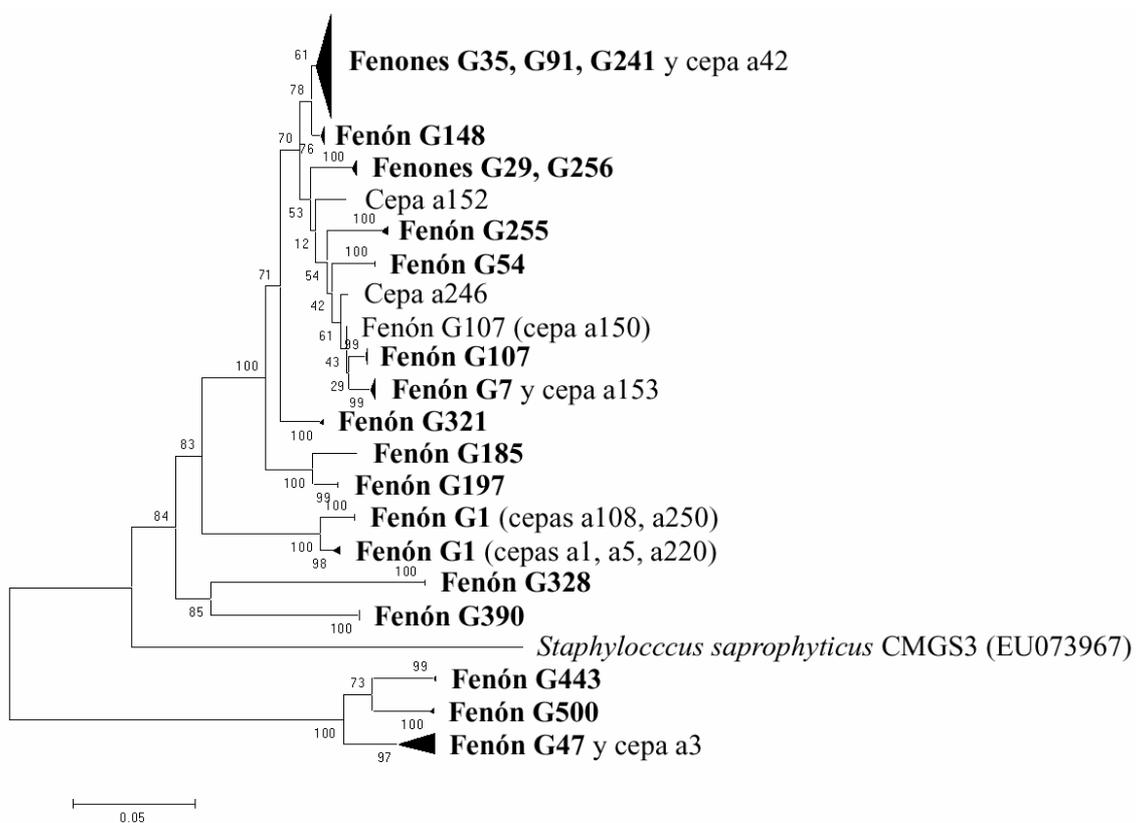


Figura 10. Árbol filogenético obtenido a partir de las distancias genéticas de 109 secuencias del gen ARNr 16S obtenidas a partir de las cepas de los distintos fenones. El árbol se realizó con el método de Neighbour-joining, con un valor de *bootstrap* de 1000 replicas. La secuencia EU03967 se utilizó con el fin de incluir el ADNr 16S de una cepa Gram positiva. La longitud de las ramas horizontales es proporcional a la divergencia evolutiva.

Tabla 19. Porcentajes de similitud entre secuencias parciales (600 pb) del ADNr 16S de cepas de los distintos fenones, calculados con el programa MatGat.

	a388	a47	a500	a220	a250	a390	a381	a255	a321	a185	a197	a29	a256	a7	a107	a54	a91	a35	a148	a241
Fenón G443	a388																			
Fenón G47	a47	95,8																		
Fenón G500	a500	96,3	94,4																	
Fenón G1	a220	76,4	76,4	77,0																
Fenón G1	a250	76,0	76,2	76,5	97,5															
Fenón G390	a390	73,4	72,9	75,2	86,9	86,5														
Fenón G328	a381	75,4	76,1	75,9	84,9	85,4	87,4													
Fenón G255	a255	75,7	75,1	75,9	87,7	88,5	87,0	85,5												
Fenón G321	a321	75,6	75,6	76,6	88,9	89,7	86,2	85,2	95,2											
Fenón G185	a185	75,4	75,1	76,4	89,0	89,2	86,9	84,9	93,9	94,2										
Fenón G197	a197	75,1	74,8	76,1	88,2	89,4	84,9	84,9	94,4	94,7	97,0									
Fenón G29	a29	75,6	75,1	75,4	88,0	87,7	85,7	85,2	97,2	94,9	92,9	94,0								
Fenón G256	a256	75,2	75,1	75,4	87,9	88,4	85,9	85,2	97,7	94,9	92,9	94,0	99,7							
Fenón G7	a7	75,6	74,6	75,9	88,4	88,5	86,7	84,6	96,8	93,7	94,9	93,9	96,3	96,3						
Fenón G107	a107	75,1	74,9	75,7	88,9	89,0	86,5	84,6	97,7	94,4	94,2	93,0	96,3	96,3	98,0					
Fenón G54	a54	74,8	74,6	76,0	88,7	88,9	86,1	84,1	96,7	94,5	94,0	93,4	96,5	96,4	97,2	97,3				
Fenón G91	a91	75,6	74,8	75,6	89,5	89,4	87,0	85,2	97,2	96,3	94,2	94,4	97,0	97,0	96,0	96,3	95,7			
Fenón G35	a35	75,7	74,9	75,7	89,7	89,5	87,2	85,4	97,3	96,5	94,0	94,2	97,2	97,2	96,2	96,5	95,7	99,8		
Fenón G148	a148	74,6	74,4	75,1	89,0	88,9	86,7	85,4	97,0	95,3	95,2	94,4	96,7	96,7	96,5	96,0	96,8	98,7	98,5	
Fenón G241	a241	75,6	74,8	75,6	89,5	89,4	87,0	85,2	97,2	96,3	94,2	94,4	97,0	97,0	96,0	96,3	95,7	100,0	99,8	98,7

La caracterización fenotípica y genotípica de los fenones, y particularmente la secuenciación del ADNr 16S, permitió determinar la posición taxonómica de estos al menos a nivel de género (Figura 11). Los seis fenones de metabolismo oxidativo abarcan 5 géneros distintos, pertenecientes a las familias *Flavobacteriaceae* (géneros *Tenacibaculum* y *Polaribacter*), *Pseudoalteromonadaceae* (género *Pseudoalteromonas*), *Pseudomonadaceae* (género *Pseudomonas*) y *Moraxellaceae* (género *Psychrobacter*), mientras que los 13 fenones de metabolismo fermentativo se reparten en 3 géneros pertenecientes a la familia *Vibrionaceae* (*Aliivibrio*, *Photobacterium* y *Vibrio*).

La identificación de los fenones incluidos en cada uno de estos géneros se detalla a continuación.

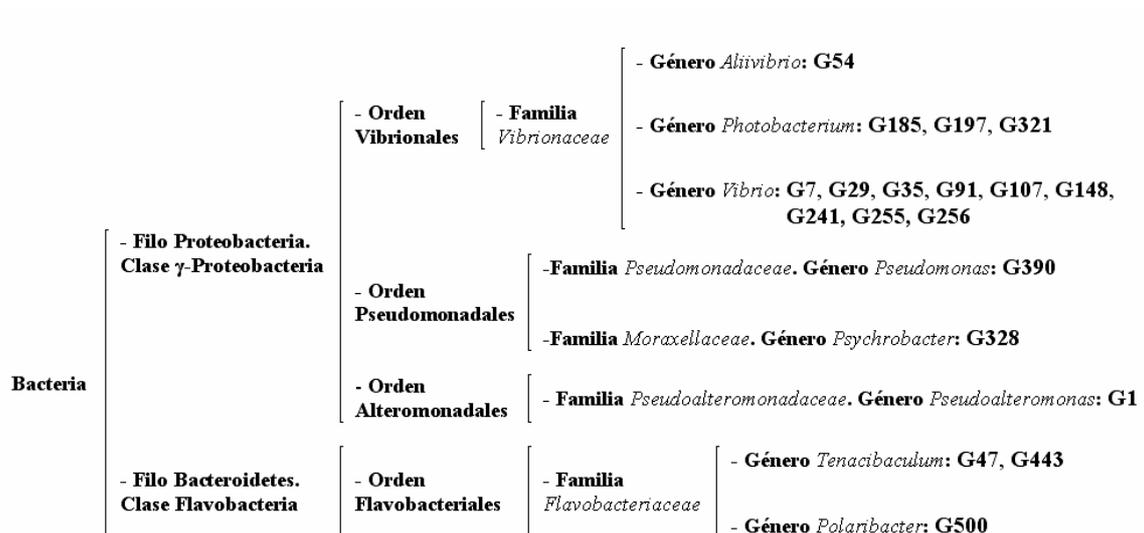


Figura 11. Posición taxonómica de los distintos fenones a nivel de género.

▪ Género *Aliivibrio*

Este género abarca únicamente las cepas de un fenón, el G54. Se trata de bacilos curvos, Gram negativos, oxidasa positivos, móviles, anaerobios facultativos, negativos para los test ADH, VP, indol y gelatinasa, incapaces de crecer en 10% NaCl, y sensibles a la novobiocina y al agente vibrioestático O129. Estas características fenotípicas, junto con los resultados de la secuenciación del gen ARNr 16S, permiten su inclusión dentro del género *Aliivibrio* (Urbanczyk *et al.* 2007).

- Fenón G54 (*Aliivibrio* sp.)

La caracterización fenotípica y genotípica de los aislados no permitió una identificación clara a nivel de especie, por lo que fueron clasificados únicamente a nivel de género como *Aliivibrio* sp.

Las colonias son de color amarillo pálido, y no presentan *swarming*, pigmentos difusibles ni adherencia al agar. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 20. Las cepas mostraron perfiles fenotípicos idénticos, tanto con los test convencionales como con el API 20E. La única discrepancia entre los test convencionales y los del API 20E se dio con el test de la ureasa, positivo con los primeros y negativo con los segundos.

Las especies más cercanas, de acuerdo la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST, se muestran en el anexo VI-7. Únicamente *Aliivibrio finisterrensis*, con un 98,9% de similitud, mostró valores superiores a los propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006) para ser considerados miembros de una misma especie, registrando otras especies próximas como *Aliivibrio fischeri*, *Aliivibrio wodanis* y *Aliivibrio logei* valores inferiores al 98%. El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias reflejó estos resultados, agrupando claramente las cepas del fenón G54 con *A. finisterrensis* (Figura 12).

No obstante estos resultados, la pertenencia de los aislados a *A. finisterrensis* no está clara, ya que esta especie se diferencia de las cepas del fenón G54 en una serie de test (Tabla 21), incluidos el ADH, ONPG, hidrólisis de almidón, producción de ácido a partir de salicina, o

Tabla 20. Características fenotípicas de los aislados del fenón G54.

Test	Cepas		Test	Cepas	
	a54	a227		a54	a227
OF	F	F	Ácido de:		
ADH	-	-	Melobiosa	-	-
LDC	+	+	Amigdalina	-	-
ODC	-	-	Arabinosa	-	-
TCBS	v	v	Lactosa	-	-
ONPG	-	-	Manosa	+	+
Citrato	-	-	Salicina	-	-
H ₂ S	-	-	Crecimiento a:		
Indol	-	-	4°C	+	+
VP	-	-	35°C	-	-
Gas glucosa	-	-	40°C	-	-
NO ₃	+	+	44°C	-	-
Amilasa	+	+	Crecimiento en:		
Lipasa	+	+	0% NaCl	-	-
Gelatinasa	-	-	3% NaCl	+	+
Esculinasa	+	+	6% NaCl	+	+
Ureasa	+*	+*	8% NaCl	-	-
Hemólisis	α	α	10% NaCl	-	-
Catalasa	+	+	12% NaCl	-	-
Ácido de:			Requerimiento agua de mar	-	-
Glucosa	+	+	Luminiscencia	-	-
Manitol	+	+	O129 (10 µg)	S	S
Inositol	-	-	O129 (150 µg)	S	S
Sorbitol	-	-	Novobiocina	S	S
Rhamnosa	-	-	Ampicilina	S	S
Sacarosa	-	-			

* El sistema API 20E mostró el resultado opuesto.

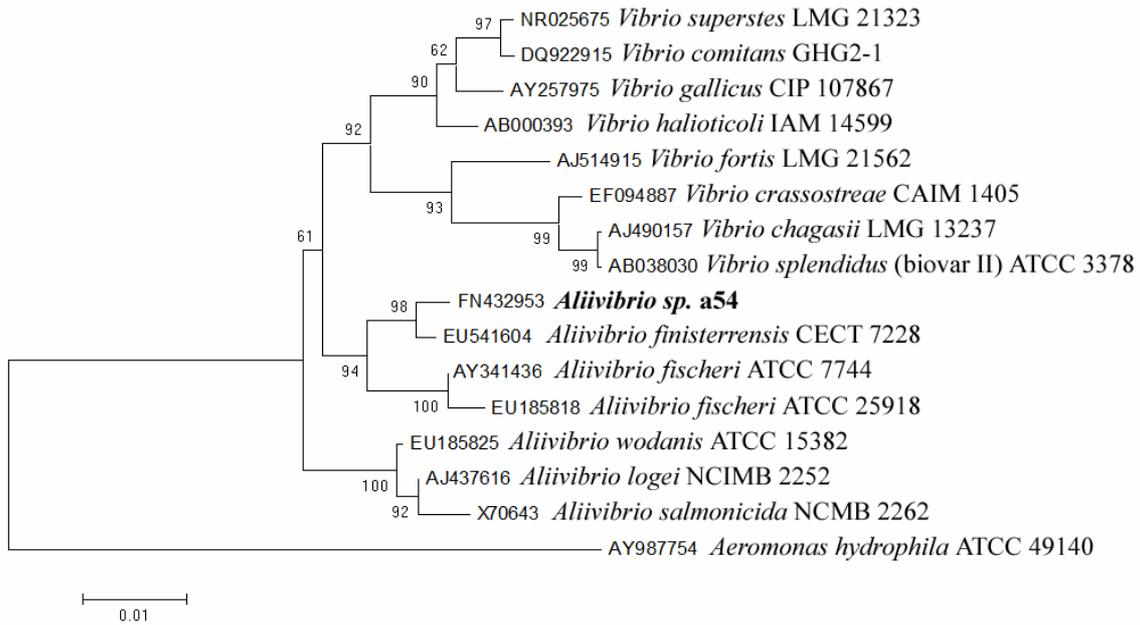


Figura 12. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas del gen ARNr 16S de la cepa a54 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas. Los números de acceso de las secuencias en la base de datos DDBJ/EMBL/GenBank se indican antes de los nombres de las especies. La longitud de las ramas horizontales es proporcional a la divergencia evolutiva.

Tabla 21. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G54 y las especies más próximas según la secuenciación del ADNr 16S. Datos extraídos de Alsina & Blanch (1994), Buller (2004) y Beaz-Hidalgo (2008). En gris se indican las características discrepantes de las distintas especies con las cepas del fenón G54.

Test	Especie				
	Fenón G54	<i>Aliivibrio finisterrensis</i>	<i>Aliivibrio fischeri</i>	<i>Aliivibrio wodanis</i>	<i>Aliivibrio logei</i>
Pigmentación colonia	Amarillo pálido	ND	Amarillo-naranja	Azul-negro	Amarillo-naranja
ADH	-	+	-	-	-
LDC	+	+	+	-	+
ODC	-	-	-	-	V+
ONPG	-	+	V-	-	V
Indol	-	-	d	V+	-
Amilasa	+	-	-	+	-
Gelatinasa	-	-	V-	+	V-
Esculinasa	+	+	-	-	V
Ureasa	+	V+	+	V-	V
β-hemólisis	-	ND	-	+	-
6% NaCl	+	V	+	V	-
Ácido de:					
Manitol	+	V-	V-	V	V+
Amigdalina	-	+	ND	ND	ND
Salicina	-	+	V	-	V
Ampicilina	S	R	V	S	V

la sensibilidad a la ampicilina. Tras *A. finisterrensis* la especie más próxima es *A. fischeri*, con un 97,7% de similitud en el ADNr 16S. Junto con esta baja similitud en el ADNr 16S y algunas diferencias fenotípicas (Tabla 21), la utilización de los cebadores específicos de *A. fischeri* LuxA-F y LuxA-R, descritos por Lee & Ruby (1995), permitió descartar esta especie. Ninguna

de las cepas del fenón presentó el fragmento específico de 428 pb, que por el contrario sí apareció con la cepa de referencia *A. fischeri* CECT 524, utilizada como control positivo (datos no mostrados). Ensayos adicionales deberán realizarse para determinar si las cepas del fenón G54 pertenecen a la especie *A. finisterrensis* o si representan una especie nueva dentro del género *Aliivibrio*.

▪ **Género *Photobacterium***

Este género abarca 3 fenones, el G185, el G197 y el G321, este último patógeno. Los dos primeros fenones consisten en bacilos curvos móviles, mientras que el último está formado por bacilos cortos no móviles. En todos los casos son bacterias Gram negativas, oxidasa positivas, anaerobias facultativas, que requieren sodio para su crecimiento. A excepción de que los miembros de este género se describen como cocobacilos o bacilos rectos, estas características, junto con los resultados de la secuenciación del ADNr 16S, permiten situarlos dentro del género *Photobacterium* (Holt *et al.* 1994).

– Fenón G185 (*Photobacterium* sp.)

Los aislados de este fenón solo pudieron identificarse a nivel de género como *Photobacterium* sp., siendo posible que se trate de una nueva especie dentro del mismo.

Las colonias son de color blanquecino, y no presentan *swarming*, pigmentos difusibles ni adherencia al agar. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 22. Las dos cepas caracterizadas mostraron perfiles idénticos, con excepción de la producción de ácido a partir de manitol.

Las especies más cercanas, de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST, se muestran en el anexo VI-12. Los valores de similitud más altos se dieron con *P. iliopiscarium*, con un 97,7%, seguida de *P. kishitanii* y *P. aquimaris* con un 97,6%, y *P. phosphoreum*, con un 97,4%. Otras especies de los géneros *Photobacterium* y *Vibrio* mostraron valores inferiores al 97%. Estos valores están, sin embargo, muy por debajo del propuesto por Stackebrandt & Ebers (2006) para ser considerados miembros de una misma especie.

El árbol filogenético realizado con estas secuencias muestra a la cepa a185 claramente dentro del género *Photobacterium*, pero no se agrupa con ninguna de las especies actualmente descritas (Figura 13). Por otra parte, estas especies muestran características fenotípicas que los diferencian claramente de los aislados del fenón G185 (Tabla 23), por lo que como se ha indicado estos podrían constituir una nueva especie dentro de género *Photobacterium*.

Tabla 22. Características fenotípicas de los aislados del fenón G185.

Test	Cepa		Test	Cepas	
	a180	a185		a180	a185
OF	F	F	Ácido de:		
ADH	+	+	Melobiosa	+	+
LDC	-	-	Amigdalina	-	-
ODC	-	-	Arabinosa	-	-
TCBS	v	v	Lactosa	-	-
ONPG	-	-	Manosa	+	+
Citrato	-	-	Salicina	-	-
H ₂ S	-	-	Crecimiento a:		
Indol	-	-	4°C	+	+
VP	-	-	35°C	-	-
Gas glucosa	-	-	40°C	-	-
NO ₃	+	+	44°C	-	-
Amilasa	+	+	Crecimiento en:		
Lipasa	+	+	0% NaCl	-	-
Gelatinasa	+	+	3% NaCl	+	+
Esculinasa	-	-	6% NaCl	+	+
Ureasa	-	-	8% NaCl	-	-
Hemólisis	-	-	10% NaCl	-	-
Catalasa	+	+	12% NaCl	-	-
Ácido de:			Requerimiento agua de mar	-	-
Glucosa	+	+	Luminiscencia		
Manitol	+	-	O129 (10 µg)	S	S
Inositol	-	-	O129 (150 µg)	S	S
Sorbitol	-	-	Novobiocina	S	S
Rhamnosa	-	-	Ampicilina	S	S
Sacarosa	-	-			

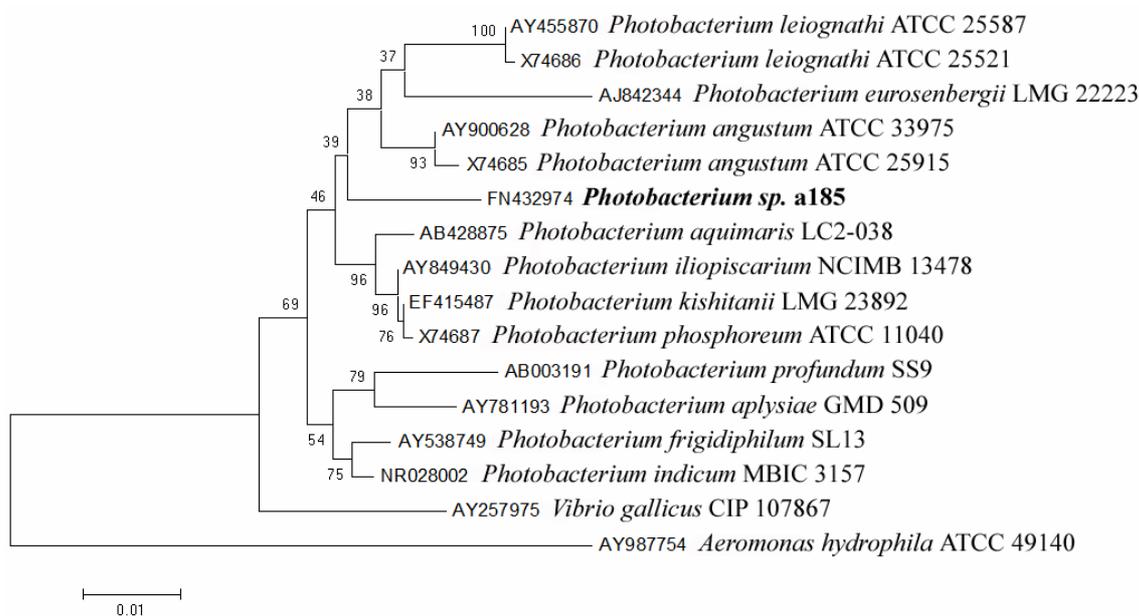
**Figura 13.** Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa a185 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 23. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G185 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S: 1, fenón G185; 2, *Photobacterium iliopiscarium*; 3, *Photobacterium kishitanii*; 4, *Photobacterium phoshoreum*; 5, *Photobacterium aquimaris*; 6, *Photobacterium indicum*; 7, *Photobacterium frigidihilum*; 8, *Photobacterium angustum*. Datos extraídos de Johnson & Weisrock (1969), Holt *et al.* (1994), Xie & Yokota (2004), Buller (2004), Seo *et al.* (2005), Ast *et al.* (2007) y Yoshizawa *et al.* (2009).

Test	Especie							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Oxidasa	+	+	-(+)	-	-	-	+	d
LDC	-	+	+	V	ND	ND	ND	-
VP	-	+	ND	+	ND	ND	ND	+
Indol	-	-	-	-	ND	+	+	-
ONPG	-	ND	-	+	ND	ND	ND	+
Gas glucosa	-	+	ND	+	ND	ND	ND	ND
H ₂ S	-	-	-	ND	ND	+	ND	ND
Gelatinasa	+	-	-	-	ND	-	ND	V+
Amilasa	+	ND	ND	-	ND	-	ND	-
Catalasa	+	ND	+	+	ND	-	+	d
Ácido de Melobiosa	+	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND
Crecimiento en:								
3% NaCl	+	-	ND	+	ND	ND	+	+
6% NaCl	+	-	ND	V	ND	ND	-	+
Crecimiento a:								
4°C	+	+	ND	+	ND	+	-	V+
35°C	-	-	ND	-	ND	-	-	+

- Fenón G197 (*Photobacterium* sp.)

Al igual que en el caso anterior, la caracterización fenotípica y genotípica permitió situar las cepas de este fenón dentro del género *Photobacterium* pero no su identificación a nivel específico, representando probablemente una especie nueva.

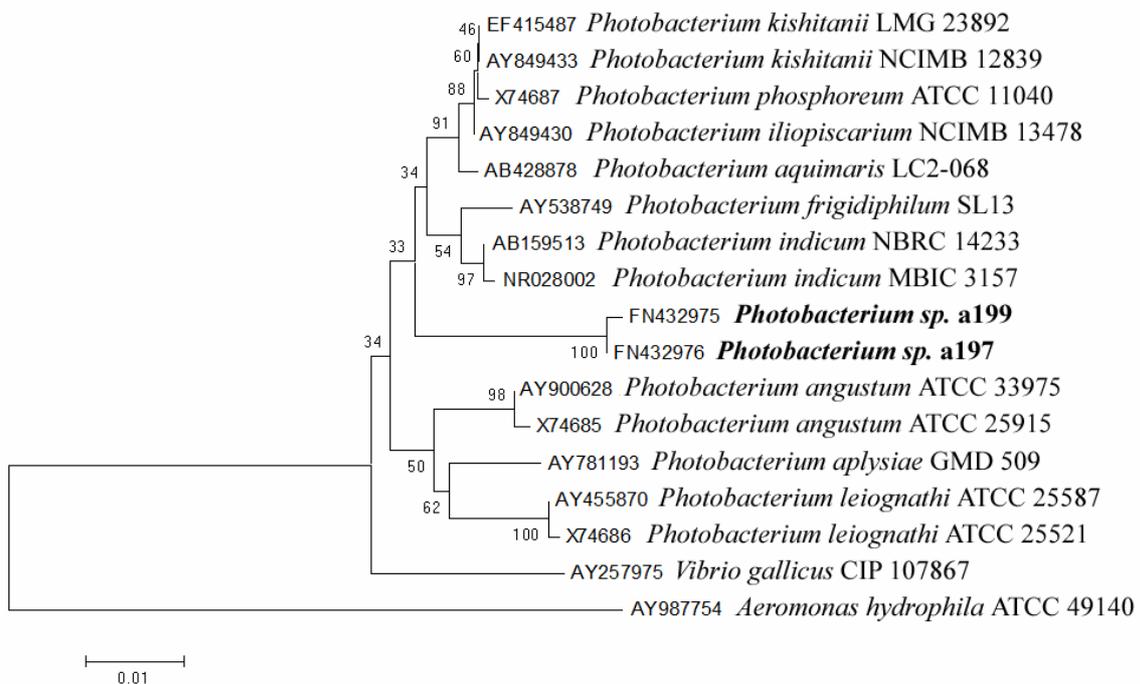
Las colonias son de color blanquecino, y no presentan *swarming*, pigmentos difusibles ni adherencia al agar. Todas las cepas caracterizadas mostraron perfiles fenotípicos idénticos (Tabla 24). El sistema BIOLOG se utilizó únicamente con la cepa a197, que fue erróneamente identificada como *Vibrio splendidus*, sin que ninguna especie del género *Photobacterium* fuese incluida como especie probable por el sistema.

Las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST se muestran en el anexo VI-13. Los porcentajes de similitud más altos se dieron con *Photobacterium kishitanii* (97,4%) y *Photobacterium iliopiscarium* (97,2%), mostrando otras especies relacionadas valores inferiores al 97%. La similitud con las cepas del fenón G185 fue de solo el 96,6-96,9%. En todos los casos se trata de valores muy por debajo de los propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006) para miembros de una misma especie. El árbol filogenético realizado con estas secuencias sitúa las cepas del fenón dentro del género *Photobacterium*, pero las separa claramente de las especies descritas actualmente en este género (Figura 14).

Por otro lado, la secuencia del gen ARNr 23S de la cepa a197 se diferencia claramente de la de otras cepas de *Photobacterium*, como *Photobacterium* sp. a185 (95,3% similitud), *P. profundum* SS9 (90,8%), *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539 y *P. damsela* subsp.

Tabla 24. Características fenotípicas de los aislados del fenón G197.

Test	Cepas			Test	Cepas		
	a197	a199	a308		a197	a199	a308
OF	F	F	F	Ácido de:			
ADH	+	+	+	Melobiosa	-	-	-
LDC	-	-	-	Amigdalina	-	-	-
ODC	-	-	-	Arabinosa	-	-	-
TCBS	v	v	v	Lactosa	-	-	-
ONPG	-	-	-	Manosa	+	+	+
Citrato	-	-	-	Salicina	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	Crecimiento a:			
Indol	-	-	-	4°C	-	-	-
VP	-	-	-	30°C	+	+	+
Rojo metilo	+	+	+	35°C	+	+	+
Gas glucosa	-	-	-	40°C	-	-	-
NO ₃	+	+	+	44°C	-	-	-
Amilasa	+	+	+	Crecimiento en:			
Lipasa	+	+	+	0% NaCl	-	-	-
Gelatinasa	+	+	+	3% NaCl	+	+	+
Esculinasa	-	-	-	6% NaCl	-	-	-
Ureasa	-	-	-	8% NaCl	-	-	-
Hemólisis	α	α	α	10% NaCl	-	-	-
Catalasa	+	+	+	12% NaCl	-	-	-
Ácido de:				Requerimiento agua de mar	-	-	-
Glucosa	+	+	+	Luminiscencia			
Manitol	+	+	+	O129 (10 μ g)	S	S	S
Inositol	-	-	-	O129 (150 μ g)	S	S	S
Sorbitol	-	-	-	Novobiocina	S	S	S
Rhamnosa	-	-	-	Ampicilina	S	S	S
Sacarosa	-	-	-				

**Figura 14.** Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas a197 y a199 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

piscicida ATCC 29690 (90,5%). Para otras especies no hay secuencias disponibles en las bases de datos.

Como en el caso del fenón G185, las cepas del fenón G197 muestran características fenotípicas que los diferencian claramente de las especies más próximas de acuerdo a la secuenciación del gen ARNr 16S (Tabla 25), por lo que como se ha indicado podrían constituir una nueva especie dentro del género *Photobacterium*.

Tabla 25. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G197 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Buller (2004), Seo *et al.* (2005), Ast *et al.* (2007) y Yoshizawa *et al.* (2009).

Test	Especie					
	Fenón G197	<i>Photobacterium kishitanii</i>	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	<i>Photobacterium aquimaris</i>	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	<i>Photobacterium frigidophilum</i>
Oxidasa	+	-(+)	+	-	-	+
LDC	-	+	+	ND	V	ND
VP	-	ND	+	ND	+	ND
Indol	-	-	-	ND	-	+
ONPG	-	-	ND	ND	+	ND
Gas glucosa	-	ND	+	ND	V+	ND
Gelatinasa	+	-	-	ND	-	ND
Ácido de Manitol	+	-	-	ND	V	ND
Crecimiento en:						
3% NaCl	+	ND	-	ND	+	+
6% NaCl	-	ND	-	ND	+	-
Crecimiento a:						
4°C	-	ND	+	ND	+	-
30°C	+	ND	-	ND	V	-
35°C	+	ND	-	ND	-	-

- Fenón G321 (*Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*)

La caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de este fenón permitió su identificación como *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Las colonias son pequeñas, de color grisáceo y crecimiento lento (Figura 15). Con frecuencia se adhieren al agar, pero no presentan *swarming* ni pigmentos difusibles. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 26. Las cepas mostraron perfiles similares tanto en las pruebas convencionales como con el sistema miniaturizado API 20E (Figura 16). Estos fueron coincidentes con los publicados para *P. damsela* subsp. *piscicida* por Thyssen *et al.* (1998) y Buller (2004), aunque se encontraron diferencias menores en los resultados obtenidos con las galerías API 20NE y API ZYM (Tabla 26).

El sistema BIOLOG se utilizó únicamente con la cepa a321, usándose como control la cepa *P. damsela damsela* CECT 626. Mientras que esta cepa de referencia fue correctamente identificada, para la cepa a321 el sistema no pudo dar una identificación aceptable ni a nivel de

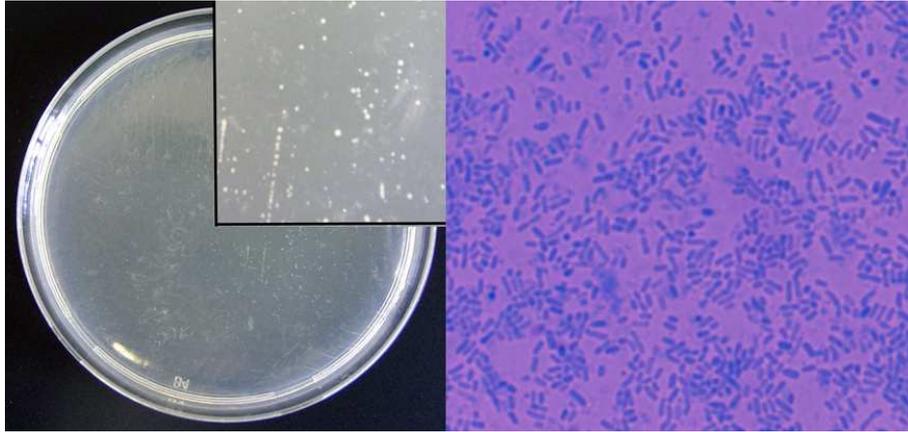


Figura 15. Morfología de la colonia y de las células de la cepa a321. La morfología celular se observó al microscopio óptico (1000x) con tinción azul de metileno.



Figura 16. Resultados de los sistemas miniaturizados API 20E, API 20NE y API ZYM con el aislado a321.

especie ni de género. Entre las especies probables, el sistema citó a *Vibrio tubiashii* y *Aeromonas salmonicida*, y en tercer lugar a *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* (la subespecie *piscicida* no está incluida en la base de datos de BIOLOG). Los perfiles obtenidos en el BIOLOG para las dos cepas ensayadas (Anexo IV) fueron marcadamente distintos, un resultado no muy extraño dado que las dos subespecies de *P. damsela* muestran características fenotípicas muy diferentes.

El análisis filogenético basado en el ADNr 16S situó las cepas del fenón dentro de la especie *P. damsela* pero, como era de esperar, no permitió la diferenciación entre las dos subespecies. Las especies más cercanas de acuerdo al programa BLAST se muestran en el anexo VI-17. Las secuencias obtenidas muestran una similitud del 99,4-99,5% con *Photobacterium damsela* (ambas subespecies), del 96,6-97% con *Photobacterium leiognathi*, e inferior al 97% con otras especies relacionadas, siendo por tanto *P. damsela* la única especie con valores dentro de los límites propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006). El árbol

Tabla 26. Características fenotípicas de los aislados del fenón G321 y de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.

Test	Cepas			<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Test API 20NE	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	
	a316	a319	a321			Cepas a321	
OF	F	F	F	F	NO ₃	-	-
ADH	+	+	+	+	Indol	-	-
LDC	-	-	-	-	Fermentación glucosa	+	+
ODC	-	-	-	-	ADH	+	+
TCBS	-	-	-	-	Ureasa	-	-
ONPG	-	-	-	-	Hidrólisis esculina	-	-
Citrato	-	-	-	-	Hidrólisis gelatina	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	β-galactosidasa	-	-
Indol	-	-	-	-	Asimilación de:		
VP	+	+	+	+	Glucosa	+	+
Rojo metilo	+	+	+	(+)	Arabinosa	+	-
NO ₃	-	-	-	-	Manosa	+	+
N ₂	+	+	+	ND	Manitol	+	-
Amilasa	-	-	-	V	N-acetil-glucosamina	+	+
Lipasa	+	+	+	+	Maltosa	-	-
Gelatinasa	-	-	-	-	Gluconato potásico	+	-
Ureasa	-	-	-	-	Ácido cáprico	+	-
Hemólisis	-	-	-	-	Ácido adípico	-	+
Catalasa	+	+	+	+	Ácido málico	+	-
Ácido de:					Citrato trisódico	+	-
Glucosa	+	+	+	+	Ácido fenilacético	-	-
Manitol	-	-	-	-			
Inositol	-	-	-	-	Test API ZYM		
Sorbitol	-	-	-	-	2 Fosfatasa alcalina	(+)	+
Rhamnosa	-	-	-	-	3 Esterasa (C4)	(+)	+
Sacarosa	-	-	-	-	4 Esterasa lipasa (C8)	(+)	+
Melobiosa	-	-	-	-	5 Lipasa (C14)	(+)	-
Amigdalina	-	-	-	-	6 Leucina arilamidasa	+	+
Arabinosa	-	-	-	-	7 Valina arilamidasa	-	-
Lactosa	-	-	-	ND	8 Cistina arilamidasa	-	-
Manosa	+	+	+	+	9 Tripsina	-	-
Salicina	-	-	-	ND	10 α-quimotripsina	-	-
Crecimiento a:					11 Fosfatasa acida	+	+
4°C	-	-	-	-	12 Naftol-AS-BI- fosfosfohidrolasa	-	+
30°C	+	+	+	+	13 α-galactosidasa	-	-
35°C	+	+	+	+	14 β-galactosidasa	-	-
40°C	-	-	-	-	15 β-glucuronidasa	-	-
44°C	-	-	-	-	16 α-glucosidasa	-	-
Crecimiento en:					17 β-glucosidasa	-	-
0% NaCl	-	-	-	-	18 N-acetil-β- glucosaminidasa	+	+
3% NaCl	+	+	+	+	19 α-mannosidasa	-	-
6% NaCl	-	-	-	-	20 α-fucosidasa	-	-
8% NaCl	-	-	-	-			
10% NaCl	-	-	-	-			
12% NaCl	-	-	-	-			
Requerimiento agua de mar	-	-	-	-			
Luminiscencia	-	-	-	-			
O129 (10 µg)	S	S	S	V S			
O129 (150 µg)	S	S	S	V S			
Novobiocina	S	S	S	V S			
Ampicilina	S	S	S	S			

filogenético construido con estas secuencias agrupó claramente las cepas del fenón G321 con las de *P. damsela* (Figura 17), situándolas más próximas a la subespecie *piscicida*, aunque con valores de *bootstrap* no significativos.

Las secuencias del gen ARNr 23S obtenidas a partir de los aislados a316, a319 y a321 no fueron de gran utilidad, dado que hay pocas secuencias publicadas para especies del género *Photobacterium*. Las tres cepas mostraron secuencias similares, con una alta similitud con la de

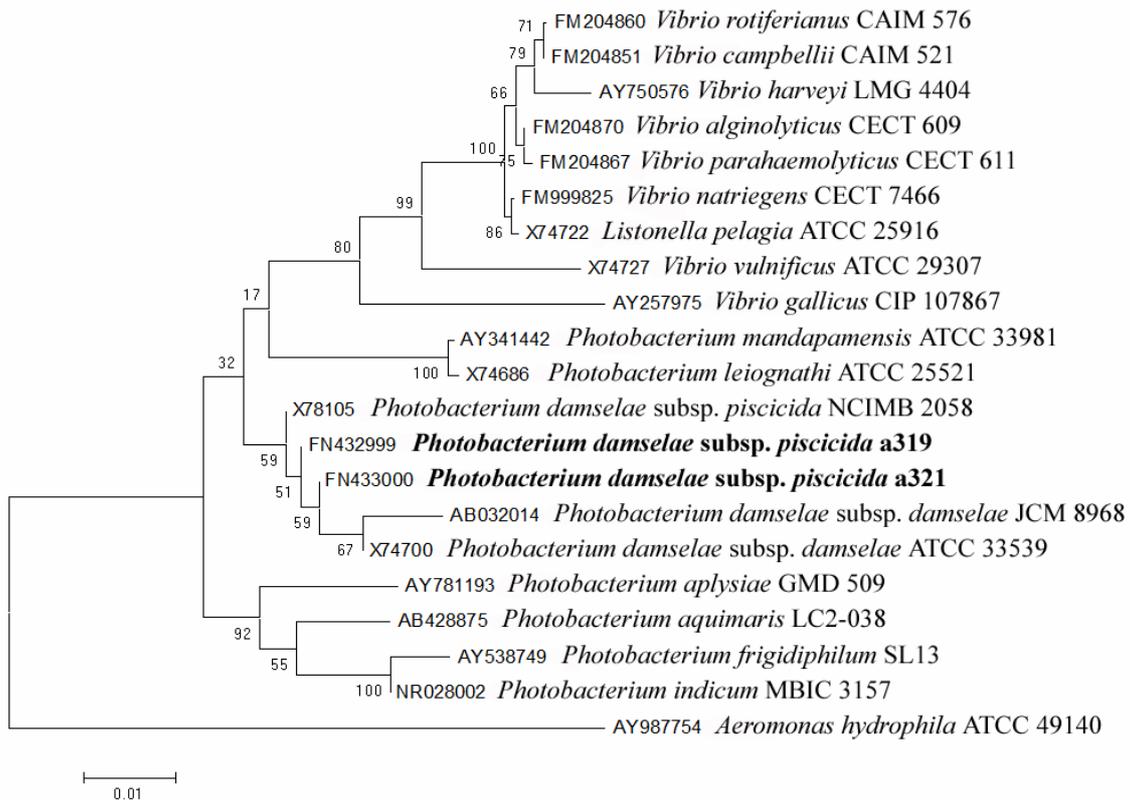


Figura 17. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G321 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

P. damsela damsela ATCC 33539 (98,0-98,9%) y *P. damsela piscicida* ATCC 29690 (98,0-98,9%). Las diferencias fueron mayores con otras cepas de *Photobacterium*, como *Photobacterium profundum* SS9 (89,9-90,8% similitud), *Photobacterium* sp. a185 (85,9-87,0%) y *Photobacterium* sp. a197 (88,9-90,2%).

La identificación de los aislados como *P. damsela* subespecie *piscicida* se confirmó mediante PCR con los cebadores específicos Ure3-Ure5 (Osorio *et al.* 2000) y CPSF-CSPR (Rajan *et al.* 2003). Los primeros, dirigidos contra el gen de la ureasa, ausente en la subespecie *piscicida*, detectan únicamente la subespecie *damsela*, mientras que los segundos detectan ambas subespecies. Los aislados del fenón G321 no produjeron el amplificado esperado con los cebadores Ure3-Ure5, pero sí con los CPSF-CSPR (Figura 18). No obstante, estos últimos fallaron a la hora de detectar la cepa de referencia *P. damsela* subespecie *damsela* CECT 626, utilizada como control positivo, por lo que quizás no sean validos para detectar todas las cepas de la subespecie *damsela*. Por otro lado, la diferenciación entre los aislados del fenón G321 y la subespecie *P. damsela* subespecie *damsela* puede hacerse a partir de varios test fenotípicos, que se resumen en la Tabla 27.

Por último, los ensayos de aglutinación en portaobjetos realizados con el antisuero anti-ATCC 17911 y antígenos O, mostraron que estos aislados pertenecen al único serotipo descrito hasta el momento en *P. damsela* subsp. *piscicida* (Magariños *et al.* 1992, Romalde 2002).

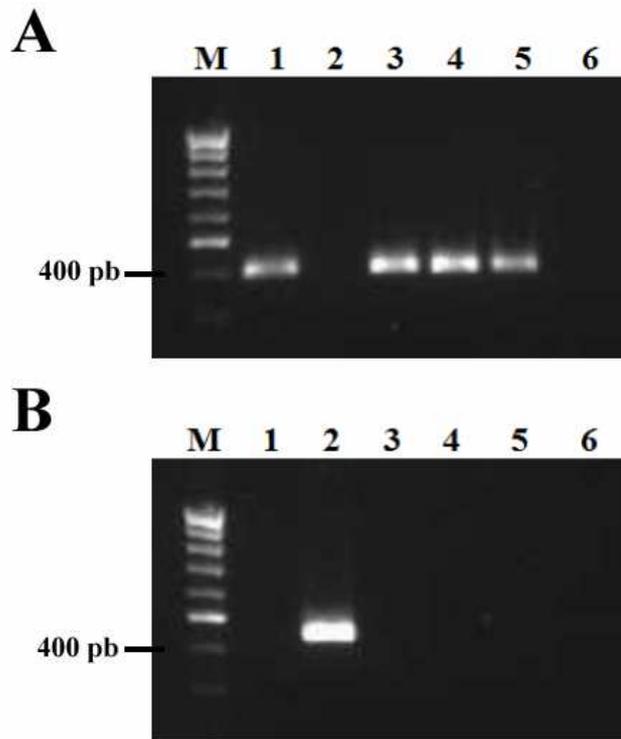


Figura 18. Amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos para *Photobacterium damsela* CPSF y CSPR, descritos por Rajan *et al.* (2003) (A) y los Ure3 y Ure5, descritos por Osorio *et al.* (2000) (B), con cepas del fenón G321. M, marcador de peso molecular 100 pb; línea 1, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* CECT 5895; línea 2, *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* CECT 626^T; líneas 3-5, cepas a316, a319 y a321, respectivamente; línea 6, control negativo; los productos de amplificación esperados son de 410 pb en A y de 448 pb en B.

Tabla 27. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G321 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Thyssen *et al.* (1998) y Buller (2004).

Test	Especie			
	Fenón G321	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	<i>Photobacterium</i> <i>leiognathi</i>
Oxidasa	+	+	+	-
Movilidad	-	-	+	V
TCBS	-	-	+	-
ONPG	-	-	-	+
NO ₃	-	-	+	V
Ureasa	-	-	+	-
B-hemólisis	-	-	+	-
Crecimiento en 6% NaCl	-	-	V+	V

▪ **Género *Polaribacter***

Este género abarca únicamente las cepas del fenón G500. Se trata de bacterias filamentosas Gram negativas, oxidasa positivas, no móviles, con metabolismo oxidativo, que no presentan pigmentos tipo flexirrubina y requieren agua de mar para el crecimiento. Estas características permiten su inclusión en el género *Polaribacter* (Gosink *et al.* 1998) pero también en otros de *Flavobacteriaceae*, siendo la secuenciación del gen ARNr 16S el factor determinante para su inclusión en este género.

– Fenón G500 (*Polaribacter* sp.)

La caracterización de los aislados de este fenón permitió identificarlos como *Polaribacter* sp., pero no asignarlos a ninguna de las especies actualmente descritas dentro de este género, constituyendo probablemente una especie nueva.

Las colonias son de color amarillo brillante, no producen pigmentos difusibles y no se adhieren al agar, resultando similares a las del fenón G47. Las características fenotípicas de los aislados se muestran en la Tabla 28. Fenotípicamente, los aislados podrían incluirse dentro del género *Tenacibaculum*, y muestran algunas discrepancias con la descripción original del

Tabla 28. Características fenotípicas de los aislados del fenón G500.

Test	Cepas		Test	Cepas		Test API ZYM	Cepas		
	a500	a502		a500	a502		a500	a502	
OF	O	O	Ácido de:			2	Fosfatasa alcalina	+	+
ADH	-	-	Amigdalina	-	-	3	Esterasa (C4)	+	+
LDC	-	-	Arabinosa	-	-	4	Esterasa lipasa (C8)	+	+
ODC	-	-	Crecimiento a:			5	Lipasa (C14)	(+)	+
TCBS	-	-	4°C	+	+	6	Leucina arilamidasa	+	+
ONPG	-	-	15°C	+	+	7	Valina arilamidasa	+	+
Citrato	-	-	25°C	+	+	8	Cistina arilamidasa	+	+
H ₂ S	-	-	35°C	+	+	9	Tripsina	+	+
Indol	-	-	40°C	+	+	10	α-quimotripsina	+	+
VP	+	+	44°C	-	-	11	Fosfatasa acida	+	+
NO ₃	-	-	Crecimiento			12	Naftol-AS-BI-	(+)	(+)
N ₂	+	+	en:				fosfofohidrolasa		
Amilasa	-	-	0% NaCl	-	-	13	α-galactosidasa	-	-
Lipasa	+	+	3% NaCl	-	-	14	β-galactosidasa	-	-
Gelatinasa	+	+	6% NaCl	-	-	15	β-glucuronidasa	-	-
Esculinasa	-	-	8% NaCl	-	-	16	α-glucosidasa	-	-
Ureasa	-	-	10% NaCl	-	-	17	β-glucosidasa	-	(+)
Catalasa	+	+	12% NaCl	-	-	18	N-acetil-β-glucosaminidasa	-	-
Ácido de:			TSA-1% NaCl	-	-	19	α-mannosidasa	-	-
Glucosa	-	-	Requerimiento	+	+	20	α-fucosidasa	-	-
Manitol	-	-	agua de mar						
Inositol	-	-	Flexirrubina	-	-				
Sorbitol	-	-	Rojo congo	+	+				
Rhamnosa	-	-	O129 (10 µg)	S	S				
Sacarosa	-	-	O129 (150 µg)	S	S				
Melobiosa	-	-	Novobiocina	S	S				
			Ampicilina	S	S				

género *Polaribacter* hecha por Gosink *et al.* (1998). Entre estas destaca el color de las colonias (ninguna de las especies descritas tiene colonias amarillas), el crecimiento en medios de cultivo con solo NaCl, la producción de ácido a partir de carbohidratos o la producción de amilasa. No obstante, en ambos casos los pigmentos no son de tipo flexirrubina, y al menos una especie del género (*P. dokdonensis*) solo produce ácido a partir de unos pocos carbohidratos. Los perfiles fenotípicos obtenidos para las dos cepas caracterizadas fueron similares.

Las especies más cercanas, de acuerdo a la secuenciación del gen ARNr 16S y el programa BLAST, se muestran en el anexo VI-23. La especie más próxima es *Polaribacter dokdonensis*, con una similitud del 97,1-97,2%, seguida por otras especies de los géneros *Polaribacter* y *Tenacibaculum*, con similitudes menores o iguales al 95%. En todos los casos se trata de valores muy por debajo del propuesto por Stackebrandt & Ebers (2006) para ser considerados miembros de una misma especie. El árbol filogenético obtenido con estas secuencias (Figura 19) situó los aislados dentro del género *Polaribacter*, pero claramente diferenciados de las especies actualmente descritas dentro de este género.

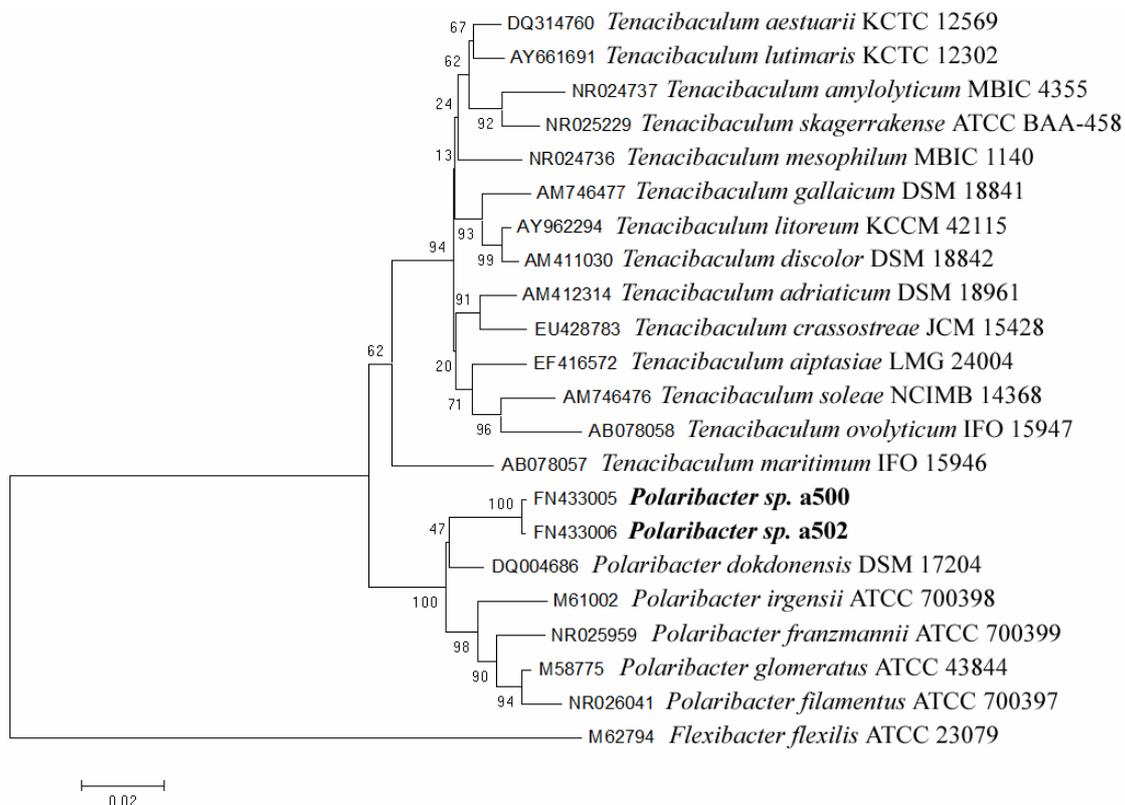


Figura 19. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G500 y especies relacionadas. La secuencia de *Flexibacter flexilis* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

La diferenciación entre el fenón G500 y especies relacionadas de acuerdo al ADNr 16S puede hacerse fácilmente mediante distintas pruebas fenotípicas, que se resumen en la Tabla 29. Las principales diferencias se dieron en los test de producción de ácido a partir de glucosa, crecimiento a 35 y 40°C y en la pigmentación de las colonias.

En resumen, los resultados de la caracterización fenotípica y del análisis de la secuencia del gen ARNr 16S no permitieron asignar las cepas del fenón a ninguna de las especies actualmente descritas dentro del género *Polaribacter*, apuntando a que constituyen una especie nueva dentro de este género.

Tabla 29. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G500 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Bernardet *et al.* (1990), Gosink *et al.* (1998), Buller (2004), Avendaño-Herrera *et al.* (2004a, 2006b) y Yoon *et al.* (2006).

Test	Especie						
	Fenón G500	<i>Polaribacter dokdonensis</i>	<i>Polaribacter irgensii</i>	<i>Polaribacter franzmanii</i>	<i>Polaribacter filamentus</i>	<i>Polaribacter glomeratus</i>	<i>Tenacibaculum maritimum</i>
Pigmentación colonia	Amarillo brillante	Naranja	Naranja	Naranja	Salmón	Naranja	Amarillo pálido
Morfología celular	Filamentosa	Bacilo recto o curvo	Filamentosa	Bacilo irregular	Filamentosa	Bacilos curvos	Filamentosa
Oxidasa	+	+	(+)	+	-	+	+
Esculinasa	-	-	-	+	-	-	-
Gelatinasa	+	-	-	+	(+)	+	V
Amilasa	-	+	(+)	(+)	(+)	+	-
ONPG	-	-	-	+	-	-	-
Crecimiento con solo NaCl	-	+	ND	ND	ND	ND	-
Crecimiento a:							
25°C	+	+	-	-	-	-	+
35°C	+	-	-	-	-	-	-
40°C	+	-	-	-	-	-	-
Ácido de:							
Glucosa	-	-	+	+	+	+	-
Rhamnosa	-	-	ND	ND	+	+	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	+	-
Arabinosa	-	-	-	+	+	-	-

▪ Género *Pseudoalteromonas*

Este género abarca las cepas de un único fenón, el G1. Se trata de bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos, móviles, con metabolismo oxidativo, que requieren Na⁺ para su crecimiento, capaces de crecer a 20°C, arginina dihidrolasa negativos y gelatinasa positivos. Estas características permiten, junto con los resultados de la secuenciación del gen ARNr 16S, su inclusión en el género *Pseudoalteromonas*.

La única discrepancia fenotípica de importancia es que las cepas del fenón G1 no requieren agua de mar para el crecimiento. Este requerimiento es una de las características definitorias del género (Gauthier *et al.* 1995), sin embargo muchas especies de

Pseudoalteromonas descritas presentan un comportamiento similar a las del fenón G1, requiriendo Na⁺ para el crecimiento pero no agua de mar.

– Fenón G1 (*Pseudoalteromonas* spp.)

La caracterización de los aislados de este fenón permitió situarlos dentro del género *Pseudoalteromonas*, pero no su identificación a nivel de especie.

Las colonias son de color blanquecino, no agarolíticas, y no presentan *swarming*, adherencia al agar o pigmentos difusibles (solo la cepa a250 presenta un pigmento marrón difusible). La caracterización fenotípica de los aislados mostró una importante heterogeneidad (Tabla 30), con resultados variables para 17 de los 45 test realizados, por lo que es probable que el fenón incluya cepas de distintas especies. El sistema BIOLOG se utilizó únicamente con las cepas a220 y a250, que mostraron perfiles diferentes, no pudiendo el sistema identificar ninguna de ellas a nivel de especie ni de género.

El análisis basado en las secuencias del ADNr 16S de cinco de los aislados (a1, a5, a108, a220 y a250) situó claramente estas cepas dentro del género *Pseudoalteromonas*. Por otro lado, aunque estas secuencias mostraron entre sí porcentajes de similitud del 97,7-100%, se dividieron en dos grupos claramente diferenciados: por un lado las cepas a1, a5 y a220 (porcentajes de similitud entre sí del 99,6-100%), y por otro las cepas a108 y a250 (100% de similitud). No obstante las cepas de cada grupo no tienen perfiles fenotípicos totalmente homogéneos, ni diferenciables de las cepas del otro grupo.

Las especies más cercanas a las cepas a220 y a250 de acuerdo al programa BLAST se muestran en los anexos VI-1 y VI-2. Los porcentajes de similitud entre aquellas y la cepa a220, calculados con el programa MatGat, entraron dentro del límite de variabilidad intraespecífica propuesto por Stackebrandt & Ebbers (2006) con las especies *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Pseudoalteromonas issachenkonii*, *Pseudoalteromonas haloplanktis*, *Pseudoalteromonas agarivorans*, *Pseudoalteromonas paragorgicola*, *Pseudoalteromonas atlantica*, *Pseudoalteromonas carrageenovora*, *Pseudoalteromonas nigrifaciens*, *Pseudoalteromonas citrea*, *Pseudoalteromonas aliena*, *Pseudoalteromonas undina* y *Moritella marina*, que mostraron valores de similitud del 98,7-100%. La cepa a250 mostró valores superiores al 98,7% únicamente con *Pseudoalteromonas mariniglutinosa* (99,2% similitud). Las demás especies mostraron porcentajes inferiores a ese valor.

El árbol filogenético construido con estas secuencias refleja claramente estos resultados (Figura 20). Los aislados del fenón G1 no aparecen agrupados entre sí sino repartidos en dos clados principales, y no se agrupan claramente con ninguna de las especies actualmente descritas. Las cepas a1 y a220 parecen estar relacionadas con *P. issachenkonii* y *P. haloplanktis*,

Tabla 30. Características fenotípicas de los aislados del fenón G1.

Test	Cepas										
	a1	a5	a108	a202	a206	a220	a230	a248	a250	a266	a269
Movilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OF	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCBS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Citrato	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-
Rojo metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
N ₂	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amilasa	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	α	-	α	α	α	α	α	β	β	α	α
Catalasa	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Ácido de:											
Glucosa	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Manitol	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Melobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a:											
4°C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en:											
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Requerimiento											
agua de mar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O129 (10 µg)	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
O129 (150 µg)	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R
Novobiocina	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R

mientras que las cepas a108 y a250 se sitúan próximas a *P. mariniglutinosa* y *P. byunsanensis*.

Las características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G1 y las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del gen ARNr 16S se resumen en la Tabla 31. Las principales diferencias se dieron en los test de reducción de nitratos, crecimiento a 40°C y en la pigmentación de las colonias.

En resumen, los aislados del fenón G1 no son homogéneos ni fenotípica ni genotípicamente, y probablemente pertenecen a especies diferentes. Todos ellos pertenecen al género *Pseudoalteromonas* pero muestran características que los diferencian de las especies

actualmente descritas, no siendo posible por el momento asignarlas con seguridad a ninguna especie conocida.

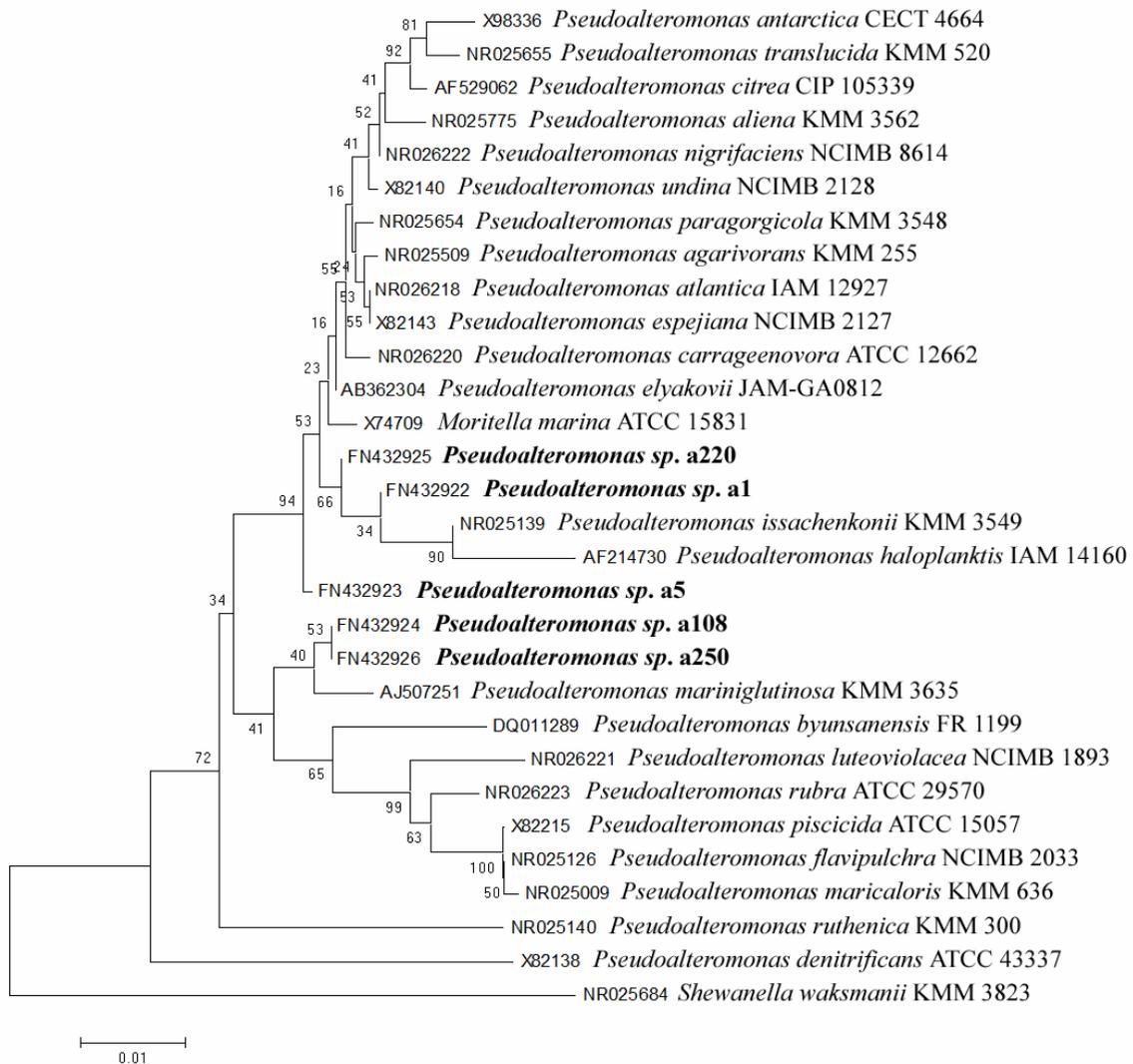


Figura 20. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G1 y especies relacionadas. La secuencia de *Shewanella waksmanii* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de bootstrap con 1000 replicas.

Tabla 31. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G1 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Bein (1954), Chan *et al.* (1978), Gauthier (1982, 1977, 1976), Baumann *et al.* (1984), Simidu *et al.* (1990), Akagawa-Matsushita *et al.* (1992), Bozal *et al.* (1997), Urakawa *et al.* (1998), Sawabe *et al.* (2000), Romanenko *et al.* (2003a, b), Ivanova *et al.* (2004, 2002a, b, c, d), Buller (2004) y Park *et al.* (2005).

Especie	OF	ADH	H ₂ S	NO ₃	Lipasa	Ureasa	Ácido de manosa	Crecimiento a:				Crecimiento con NaCl				Agarasa	Pigmentación colonia
								25°C	30°C	35°C	40°C	6%	8%	10%	12%		
Fenón G1	O	-	-	V+	V+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-*
<i>Moritella marina</i>	F	-	-	+	ND	ND	-	d	d	-	-	-	-	-	-	ND	-
<i>P. agarivorans</i>	O	-	ND	-	+	-	-	+	+	+	-	ND	ND	ND	-	+	-
<i>P. aliena</i>	O	+	ND	ND	+	ND	ND	+	+	-	-	+	-	-	-	ND	Marrón-negro (difusible)
<i>P. antarctica</i>	O	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	ND	-
<i>P. atlantica</i>	O	V+	+	-	+	-	ND	+	+	+	-	ND	ND	ND	-	+	d
<i>P. byunsanensis</i>	O	-	-	-	ND	ND	ND	+	+	+	+	-	-	-	-	ND	Violeta
<i>P. carrageenovora</i>	O	+	+	-	+	+	ND	+	+	+	-	ND	ND	ND	-	-	Marrón-negro (difusible)
<i>P. citrea</i>	O	-	-	-	+	-	+	+	+	V	V	+	+	+	-	ND	Amarillo-limón
<i>P. elyakovii</i>	O	ND	ND	-	+	ND	ND	+	+	+	-	ND	ND	ND	-	ND	-
<i>P. espejiana</i>	O	-	ND	-	+	ND	ND	ND	ND	V	-	ND	ND	ND	-	ND	-
<i>P. flavipulchra</i>	O	d	-	-	ND	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	ND	Naranja
<i>P. haloplanktis</i>	O	-	ND	-	+	V	ND	-	-	-	-	ND	ND	ND	-	ND	d
<i>P. issachenkonii</i>	O	-	ND	ND	+	ND	ND	+	+	+	-	+	+	+	+	ND	-
<i>P. luteoviolacea</i>	O	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	ND	Violeta
<i>P. maricaloris</i>	O	d	ND	-	ND	ND	ND	+	+	+	-	+	+	+	-	ND	Amarillo
<i>P. mariniglutinosa</i>	O	-	ND	ND	ND	-	ND	+	+	+	-	+	+	-	-	ND	-
<i>P. nigrifaciens</i>	O	-	ND	-	+	ND	ND	+	d	-	-	ND	ND	ND	-	ND	Marrón-negro
<i>P. paragorgicola</i>	O	-	ND	ND	+	ND	ND	+	+	-	-	+	+	-	-	ND	Naranja
<i>P. piscicida</i>	O	-	ND	d	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	-	ND	Amarillo-naranja (difusible)
<i>P. rubra</i>	O	-	-	-	+	ND	+	+	+	+	-	ND	ND	ND	ND	ND	Rojo
<i>P. ruthenica</i>	O	+	ND	ND	+	ND	ND	+	+	+	-	+	+	-	-	ND	Naranja
<i>P. translucida</i>	O	-	ND	ND	+	ND	ND	+	+	-	-	+	-	-	-	ND	-
<i>P. undina</i>	O	ND	ND	-	+	ND	-	+	+	d	-	ND	ND	ND	-	ND	-

* Solo la cepa a250 muestra un pigmento marrón difusible por el medio.

▪ **Género *Pseudomonas***

Este género estuvo representado por un único fenón, el G390, patógeno en los ensayos de virulencia. Se trata de bacilos Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos, móviles y de metabolismo oxidativo, características que junto con la secuenciación del gen ARNr 16S permitieron su inclusión en el género *Pseudomonas* (Holt *et al.* 1994). La única discrepancia importante con las especies de este género se da en lo relativo a la morfología celular. Las cepas del fenón G390 son bacilos largos, de 3-20 µm de longitud y de morfología irregular (Figura 21), mientras que lo frecuente en el género *Pseudomonas* son bacilos de 1,5-5 µm.

– Fenón G390 (*Pseudomonas baetica* sp. nov.)

La caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de este fenón mostró que constituyen una especie nueva dentro del género *Pseudomonas*, para la que se propone el nombre de *Pseudomonas baetica* sp. nov.

Las colonias son de color blanquecino, y no presentan *swarming*, pigmentos difusibles o adherencia al agar (Figura 21). Las características fenotípicas se muestran en las tablas 32 y 33. Las cepas mostraron perfiles fenotípicos prácticamente idénticos, tanto para las pruebas convencionales como con los sistemas miniaturizados API 20E, API 20NE y API ZYM (Figura 22), así como con el sistema BIOLOG. La única discrepancia entre los test convencionales y los sistemas miniaturizados se refirió a la prueba de la ADH, que fue positiva en los test convencionales y con el API 20E, pero negativa en varios casos con el API 20NE. En el API ZYM los aislados mostraron algunas diferencias, principalmente para los test fosfatasa alcalina, esterasa C4 y leucina arilamidasa. El sistema BIOLOG se usó con todas las cepas seleccionadas, obteniéndose perfiles prácticamente idénticos (Anexo IV). La única diferencia importante se dio con el test de utilización de mono-metil succinato, que mostró resultados variables entre distintas cepas. La base de datos BIOLOG identificó todos los aislados como *Pseudomonas fluorescens*, biotipo G.

El análisis filogenético basado en el ADNr 16S situó las cepas del fenón dentro del género *Pseudomonas*, concretamente dentro del grupo de especies próximas a *P. fluorescens*. Se obtuvieron secuencias parciales del gen ARNr 16S para las cepas a390, a391, a393, a398 y a399, que mostraron unos valores de similitud entre sí del 99,9-100%. Las especies más cercanas de acuerdo al programa BLAST se muestran en la Tabla 34 junto con los valores de similitud obtenidos con el programa MatGat, y en el anexo VI-19. Los valores de similitud más altos se dieron con *Pseudomonas reinekei* DSM 18361^T, *Pseudomonas moorei* DSM 12647^T, *Pseudomonas umsongensis* KACC 10847^T, *Pseudomonas jessenii* CIP 105274^T, *Pseudomonas*

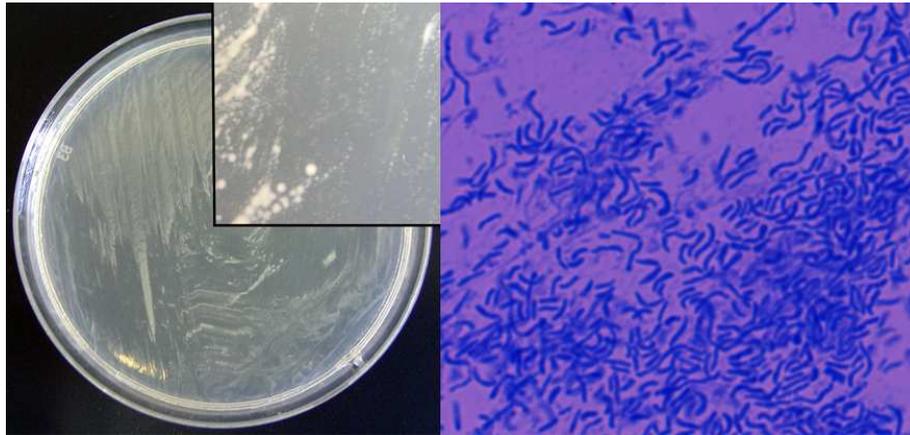


Figura 21. Morfología de la colonia y de las células de la cepa a390. La morfología celular se observó al microscopio óptico (1000x) con tinción azul de metileno.



Figura 22. Resultados de los sistemas miniaturizados API 20E, API 20NE y API ZYM con el aislado a390.

fluorescens LMG 14577 y *Pseudomonas mohnii* DSM 18327^T (99,4-99,3% similitud). Otras cepas pertenecientes a *P. fluorescens*, *Pseudomonas moraviensis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas vancouverensis* y *Pseudomonas migulae* mostraron valores de similitud inferiores pero por encima del valor de variabilidad intraespecífica propuesto por Stackebrandt & Ebers (2006). El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias muestra las cepas del fenón G390 formando un clado aparte, con *P. jessenii* y *P. moorei* como especies más próximas (Figura 23).

Los análisis filogenéticos basados en los genes “housekeeping” *gyrB* y *rpoD* fueron más discriminantes. El gen *gyrB* situó las cepas del fenón G390 dentro del grupo de especies próximas a *P. fluorescens*, pero las separó claramente de estas. Se obtuvieron secuencias parciales de este gen para las cepas a390 y a391, que mostraron unos valores de similitud entre sí del 100% y una distancia genética de 0,000. Las especies más próximas, de acuerdo al programa BLAST, se muestran en la Tabla 35 y en el anexo VI-20. Los valores de similitud más altos se dieron con *P. fluorescens* ATCC 17467 (94,5%), *P. koreensis* DSM 16610^T (93,4%) y

Tabla 32. Características fenotípicas de los aislados del fenón G390.

Test	Cepas						Test	Cepas					
	a390	a391	a393	a398	a399	a600		a390	a391	a393	a398	a399	a600
OF	O	O	O	O	O	O	Ácido de:						
ADH	+	+	+	+	+	+	Melobiosa	-	-	+	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	Amigdalina	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	Arabinosa	-	-	-	-	-	-
TCBS	-	-	-	-	-	-	Lactosa	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	Manosa	+	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	+	+	+	+	Salicina	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	Crecimiento a:						
Indol	-	-	-	-	-	-	4°C	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	30°C	+	+	+	+	+	+
Gas	-	-	-	-	-	-	35°C	-	-	-	-	-	-
glucosa	-	-	-	-	-	-	40°C	-	-	-	-	-	-
NO ₃	-	-	-	-	-	-	44°C	-	-	-	-	-	-
N ₂	+	+	+	+	+	+	Crecimiento						
Amilasa	-	-	-	-	-	-	en:						
Lipasa	-	-	-	-	-	-	0% NaCl	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	3% NaCl	+	+	+	+	+	+
Esculinasa	-	-	-	-	-	-	6% NaCl	+	+	+	+	+	+
Caseinasa	+	+	+	+	+	+	8% NaCl	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	10% NaCl	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	α	α	α	α	β	α	12% NaCl	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	Requerimiento						
Ácido de:							agua de mar						
Glucosa	+	+	+	+	+	+	Fluoresceína	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-	Piocianina	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	O129 (10 µg)	R	R	R	R	R	R
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	O129 (150 µg)	R	R	R	R	R	R
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	Novobiocina	S	S	S	S	S	S
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	Ampicilina	R	R	R	R	R	R

Tabla 33. Resultados de los sistemas miniaturizados API 20NE y API ZYM con aislados del fenón G390.

Test API 20NE	Cepas					Test API ZYM	Cepas				
	a390	a391	a393	a398	a399		a390	a391	a393	a398	a399
NO ₃	-	-	-	-	-	2 Fosfatasa alcalina	+	-	(+)	(+)	+
Indol	-	-	-	-	-	3 Esterasa (C4)	+	+	(+)	+	-
Fermentación	-	-	-	-	-	4 Esterasa lipasa (C8)	+	(+)	+	(+)	+
glucosa	-	-	-	-	-	5 Lipasa (C14)	-	-	-	-	-
ADH	+	-	-	-	+	6 Leucina arilamidasa	+	+	+	+	-
Ureasa	-	-	-	-	-	7 Valina arilamidasa	-	-	-	-	-
Hidrólisis	-	-	-	-	-	8 Cistina arilamidasa	-	-	-	-	-
esculina	-	-	-	-	-	9 Tripsina	-	-	-	-	-
Hidrólisis	+	+	+	+	+	10 α -quimotripsina	-	-	-	-	-
gelatina	+	+	+	+	+	11 Fosfatasa acida	+	+	+	+	+
β -galactosidasa	-	-	-	-	-	12 Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	-	-	-	-	-
β -galactosidasa	-	-	-	-	-	13 α -galactosidasa	-	-	-	-	-
Asimilación de:	-	-	-	-	-	14 β -galactosidasa	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	15 β -glucuronidasa	-	-	-	-	-
Arabinosa	+	+	(+)	(+)	+	16 α -glucosidasa	-	-	-	-	-
Manosa	+	+	+	+	+	17 β -glucosidasa	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	18 N-acetil- β -glucosaminidasa	-	-	-	-	-
N-acetil-	+	+	+	+	+	19 α -mannosidasa	-	-	-	-	-
glucosamina	+	+	+	+	+	20 α -fucosidasa	-	(+)	-	-	-
Maltosa	-	-	-	-	-						
Gluconato	+	+	+	+	+						
potásico	+	+	+	+	+						
Ácido cáprico	+	+	+	+	+						
Ácido adípico	-	-	-	-	-						
Ácido málico	+	+	+	+	+						
Citrato trisódico	+	+	+	+	+						
Ácido	-	-	-	-	-						
fenilacético	-	-	-	-	-						

Tabla 34. Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia del ADNr 16S de la cepa a390 (1496 pb) con especies próximas, calculados utilizando los programas BLAST y MatGat, respectivamente.

Especie	Cepa	% identidad	% similitud
<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361 ^T	99	99,4
<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647 ^T	98	99,4
<i>Pseudomonas jessenii</i>	CIP 105274 ^T	99	99,3
<i>Pseudomonas umsongensis</i>	KACC 10847 ^T	99	99,4
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LMG 14577	99	99,3
<i>Pseudomonas mohnii</i>	DSM 18327 ^T	98	99,3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 17573	99	99,2
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	DSM 16007 ^T	99	99,2
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 17522	99	99,2
<i>Pseudomonas koreensis</i>	KACC 10848 ^T	99	99,2
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	ATCC 700688 ^T	99	99,1
<i>Pseudomonas migulae</i>	CIP 105470 ^T	98	98,7
<i>Pseudomonas graminis</i>	DSM 11363 ^T	98	98,3
<i>Pseudomonas monteilii</i>	CIP 104883 ^T	98	98,3
<i>Pseudomonas brenneri</i>	CIP 106646 ^T	98	98,1
<i>Pseudomonas mosselii</i>	CIP 105259 ^T	98	98,2
<i>Pseudomonas proteolytica</i>	DSM 15321 ^T	98	98,0
<i>Pseudomonas asplenii</i>	ATCC 23835 ^T	98	98,0
<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	MAFF 301177 ^T	98	98,0
<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	IAM 1568 ^T	97	97,8
<i>Pseudomonas mandelii</i>	CIP 105273 ^T	98	98,0
<i>Pseudomonas agarici</i>	LMG 2112 ^T	98	98,2
<i>Pseudomonas gessardii</i>	CIP 105469 ^T	97	97,8
<i>Pseudomonas libanensis</i>	CIP 105460 ^T	97	97,8
<i>Pseudomonas chlororaphis subsp. aurantiaca</i>	NCIB 10068	97	97,8
<i>Pseudomonas lurida</i>	DSM 15835 ^T	97	97,6

Pseudomonas azotoformans IAM 1603 (93,1%). Las demás especies, incluidas aquellas más próximas de acuerdo a las secuenciación del ADNr 16S, mostraron valores inferiores al 93%.

Por otro lado, la distancia genética, con secuencias *gyrB*, de las cepas de fenón G390 con las especies más próximas se sitúa claramente por encima del valor de 0,041 establecido por Yamamoto *et al.* (1999) como límite entre cepas de una misma especie (Tabla 36). La especie más próxima fue *P. fluorescens* (cepa ATCC 17467), con una distancia genética de solo 0,047-0,049. Las demás especies mostraron valores iguales o mayores a 0,060. El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias muestra las cepas del fenón G390 formando un clado claramente diferenciado de las demás especies, con un valor de *bootstrap* de 100 (Figura 24).

El análisis del gen *rpoD* mostró resultados parecidos. Las especies más próximas de acuerdo al programa BLAST se muestran en la Tabla 37 y en el anexo VI-21. La cepa más estrechamente relacionada, con un 94,8% de similitud, fue *P. fluorescens* ATCC 17573 (Figura 25). Cepas pertenecientes a otras especies mostraron en todos los casos valores inferiores al 93%.

Los porcentajes de similitud obtenidos con las secuencias concatenadas del ADNr 16S y de los genes *gyrB* y *rpoD* (99,7% entre los aislados a390 y a391) mostraron como cepas más próximas a *P. fluorescens* ATCC 17573 (96,5-96,6%) y a las cepas tipo de *P. moraviensis* y *P. koreensis* (95,7-96,0% en ambos casos), mostrando cepas pertenecientes a otras especies valores por debajo del 96,0%. Estos valores se sitúan, por tanto, por debajo del límite interespecífico

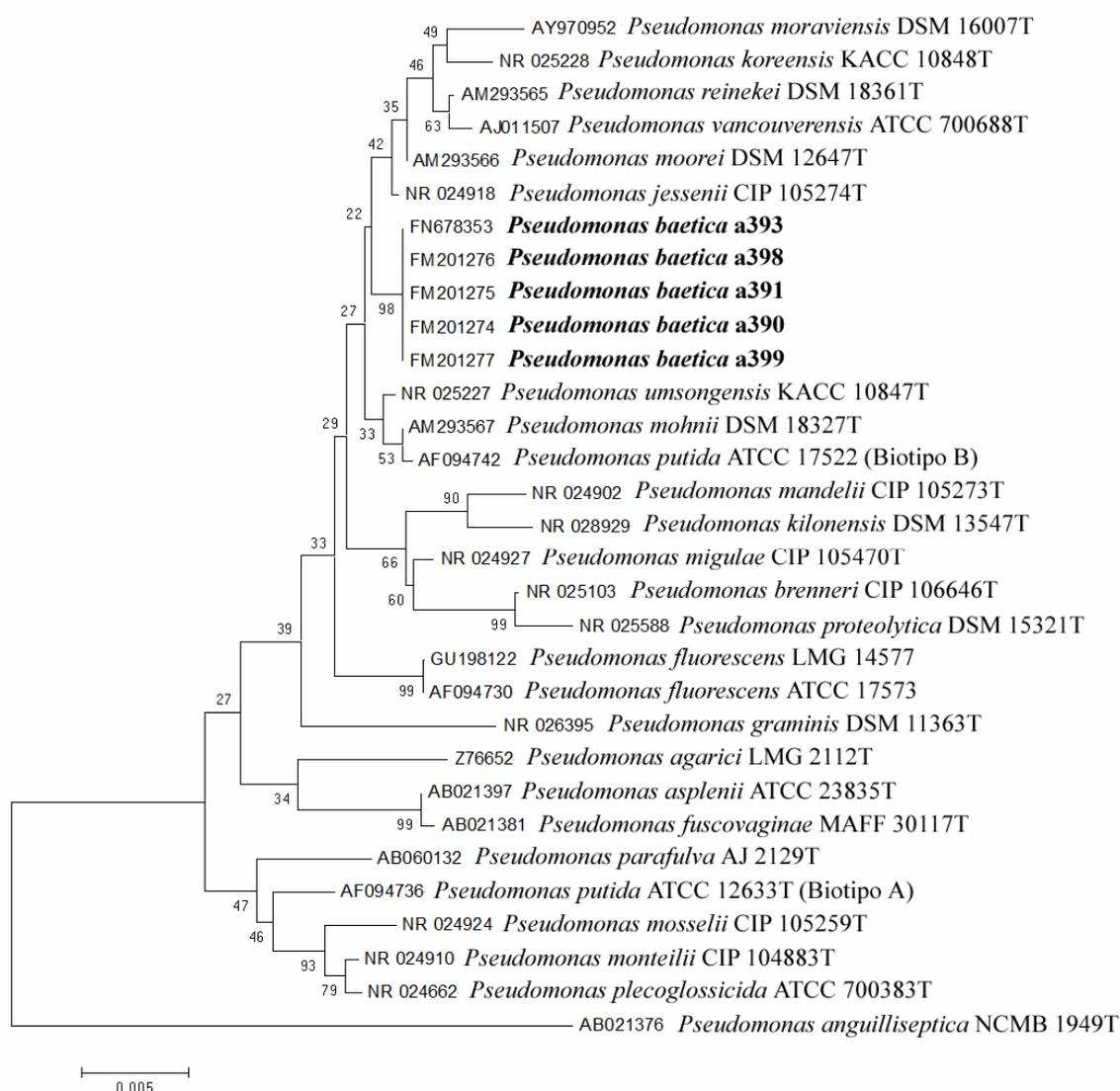


Figura 23. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G390 y especies relacionadas. La secuencia de *Pseudomonas anguilliseptica* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

(97%) observado por Mulet *et al.* (2010) con 107 especies del género *Pseudomonas*, utilizando estos mismos genes. El análisis filogenético realizado con estas secuencias separó claramente los aislados del fenón G390 de las especies del género *Pseudomonas* actualmente descritas (Figura 26). Por otra parte, la cepa más próxima, *P. fluorescens* ATCC 17573, pertenece al biotipo G de esta especie, guardando estos resultados cierta relación con los obtenidos con la caracterización fenotípica.

Los ensayos de hibridación ADN-ADN confirmaron los resultados previamente obtenidos. Los porcentajes de reasociación entre la cepa a390 y las cepas tipo de algunas de las especies más próximas, incluida *P. fluorescens*, se situaron entre el 39-60%, valores por debajo

Tabla 35. Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia del gen *gyrB* de la cepa a390 (724 pb) con especies próximas, calculados utilizando los programas BLAST y MatGat, respectivamente.

Especie	Cepa	% identidad	% similitud
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo B)	ATCC 17467	94	94,5
<i>Pseudomonas koreensis</i>	DSM 16610 ^T	93	93,4
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603	92	93,1
<i>Pseudomonas kilonensis</i>	520-20 ^T	92	92,8
<i>Pseudomonas marginalis</i>	NCPPB 667 ^T	92	92,8
<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	CFBP 11261 ^T	92	92,5
<i>Pseudomonas umsongensis</i>	DSM 16611 ^T	92	92,8
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo C)	ATCC 17561	92	92,9
<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361 ^T	92	92,4
<i>Pseudomonas synxantha</i>	IFO 3913	92	92,5
<i>Pseudomonas putida</i> (biotipo B)	ATCC 17522	92	92,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo G)	ATCC 17573	92	92,5
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	CFBP 5447 ^T	92	92,4
<i>Pseudomonas jessenii</i>	DSM 17150 ^T	92	92,1
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	CFBP 11706 ^T	92	92,0
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	DSM 16007 ^T	92	92,4
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	DSM 17555 ^T	91	92,2
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo A)	ATCC 49036	91	92,1
<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647 ^T	91	91,5
<i>Pseudomonas corrugata</i>	NCPPB 3056	91	91,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525 ^T	91	91,8
<i>Pseudomonas migulae</i>	CCUG 43165 ^T	91	91,4
<i>Pseudomonas mohnii</i>	DSM 18327 ^T	91	91,1
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	IAM 12406	91	91,7
<i>Pseudomonas frederikbergensis</i>	DSM 13022 ^T	91	91,3
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	NCIMB 11881	91	90,8
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	NCPPB 2412	90	90,8
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	IFO 3904 ^T	90	90,6
<i>Pseudomonas fragi</i>	ATCC 27362	90	90,7
<i>Pseudomonas agarici</i>	NCPPB 2472	89	89,1
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	IAM 1653	88	88,6
<i>Pseudomonas syringae</i>	PDDCC 4303	88	87,9

Tabla 36. Distancia genética entre las secuencias del gen *gyrB* entre las cepas a390 y a391 y especies relacionadas, calculada de acuerdo al modelo Kimura 2-parametros (Kimura 1980) con el programa MEGA3.

Especie	Cepa	a390	a391
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo B)	ATCC 17467	0,047	0,049
<i>Pseudomonas koreensis</i>	DSM 16610 ^T	0,060	0,060
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603	0,063	0,064
<i>Pseudomonas kilonensis</i>	520-20 ^T	0,066	0,067
<i>Pseudomonas marginalis</i>	NCPPB 667 ^T	0,066	0,069
<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	CFBP 11261 ^T	0,069	0,070
<i>Pseudomonas umsongensis</i>	DSM 16611 ^T	0,066	0,067
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo C)	ATCC 17561	0,064	0,066
<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361 ^T	0,071	0,072
<i>Pseudomonas synxantha</i>	IFO 3913	0,069	0,071
<i>Pseudomonas putida</i> (biotipo B)	ATCC 17522	0,067	0,069
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo G)	ATCC 17573	0,069	0,070
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	CFBP 5447 ^T	0,070	0,072
<i>Pseudomonas jessenii</i>	DSM 17150 ^T	0,074	0,075
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	CFBP 11706 ^T	0,075	0,077
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	DSM 17555 ^T	0,074	0,075
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo A)	ATCC 49036	0,074	0,075
<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647 ^T	0,080	0,081
<i>Pseudomonas corrugata</i>	NCPPB 3056	0,079	0,080
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525 ^T	0,077	0,078
<i>Pseudomonas mohnii</i>	DSM 18327 ^T	0,085	0,086
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	NCIMB 11881	0,088	0,090
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	IFO 3904 ^T	0,091	0,093
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	FPC 976	0,148	0,152
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	BCRC 17517 ^T	0,148	0,152
<i>Pseudomonas putida</i> (biotipo A)	ATCC 12633 ^T	0,151	0,153

Tabla 37. Porcentajes de identidad y similitud de la secuencia del gen *rpoD* de la cepa a390 (815 pb) con especies próximas, calculados utilizando los programas BLAST y MatGat, respectivamente.

Especie	Cepa	% identidad	% similitud
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 17573	95	94,8
<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 17522	90	90,0
<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	DSM 13022 ^T	90	89,3
<i>Pseudomonas jessenii</i>	CIP 10574 ^T	90	90,7
<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361	90	89,9
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	DSM 16007 ^T	92	92,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 17467	90	90,1
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	NCIMB 9030	88	88,0
<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	CFBP 11261 ^T	88	87,9
<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647 ^T	90	89,4
<i>Pseudomonas kilonensis</i>	520-20 ^T	89	88,4
<i>Pseudomonas agarici</i>	NCPPB 2289	87	87,2
<i>Pseudomonas koreensis</i>	LMG 21318 ^T	91	91,4
<i>Pseudomonas mediterranea</i>	CFBP 5447 ^T	88	88,2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525 ^T	87	86,4
<i>Pseudomonas marginalis</i>	NCPPB 3183	87	87,2
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	NCPPB 2194	87	86,7
<i>Pseudomonas corrugata</i>	NCPPB 3316	87	86,7
<i>Pseudomonas synxantha</i>	IFO 3913	87	86,5
<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603	87	86,4
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	IAM 12406	87	86,3
<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	CFBP 11706 ^T	88	87,6
<i>Pseudomonas migulae</i>	CCUG 43165 ^T	90	90,6
<i>Pseudomonas marginata</i>	HRI 17	86	86,1
<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	ATCC 700688 ^T	89	89,7
<i>Pseudomonas lini</i>	CIP 107460 ^T	89	89,6
<i>Pseudomonas asplenii</i>	NCPPB 959	86	84,6
<i>Pseudomonas mohnii</i>	CCUG 53115 ^T	89	89,3
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	IAM 1653	85	84,3
<i>Pseudomonas umsongensis</i>	LMG 21317 ^T	89	89,1

del valor mínimo del 70% requerido para cepas de una misma especie (Wayne *et al.* 1987). Por el contrario, los porcentajes de reasociación entre la cepa a390 y los aislados a391, a393, a398 y a399 oscilaron entre el 74 y el 96%, probando que todos estos aislados pertenecen a una única especie (Tabla 38). *P. fluorescens* pudo, por otra parte, ser descartada también mediante la utilización de los cebadores específicos propuestos por Scarpellini *et al.* (2004), capaces de detectar todos los biotipos descritos en esta especie. Ninguno de los aislados del fenón G390 produjo el fragmento de amplificación esperado (datos no mostrados).

La diferenciación fenotípica entre el fenón G390 y las especies más cercanas puede realizarse a partir de una amplia serie de test, que se resumen en las tablas 39 y 40. Entre los más discriminantes destacan la hidrólisis de gelatina, la producción de ácido a partir de glucosa, el crecimiento a 35°C, el crecimiento con 6% de cloruro sódico, la presencia de fluoresceína, y la utilización como fuente de carbono de N-acetil-D-glucosamida, ácido fórmico, ácido D-galacturónico, ácido D-glucosamínico, hidroxil-L-prolina, inosina y uridina.

En resumen, la caracterización fenotípica y genotípica (ADNr 16S, *gyrB*, *rpoD*, MLSA, hibridación ADN-ADN) de las cepas del fenón G390 muestra que estas constituyen una nueva especie de *Pseudomonas*, filogenéticamente situada dentro del grupo de especies relacionadas con *P. fluorescens*, y para la que se propone el nombre de *Pseudomonas baetica* sp. nov. La descripción de esta nueva especie se recoge en el Anexo VII.

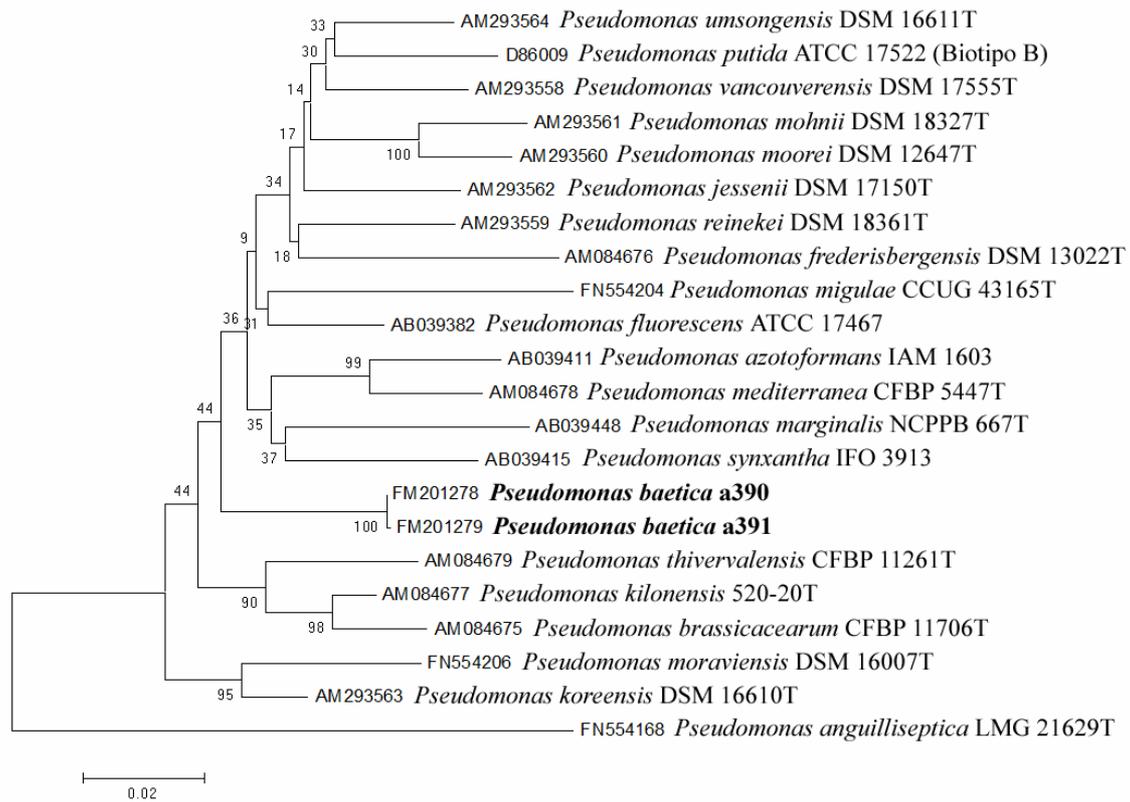


Figura 24. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen *gyrB* de las cepas del fenón G390 y especies relacionadas. La secuencia de *Pseudomonas anguilliseptica* fue incluida como *outgroup*.

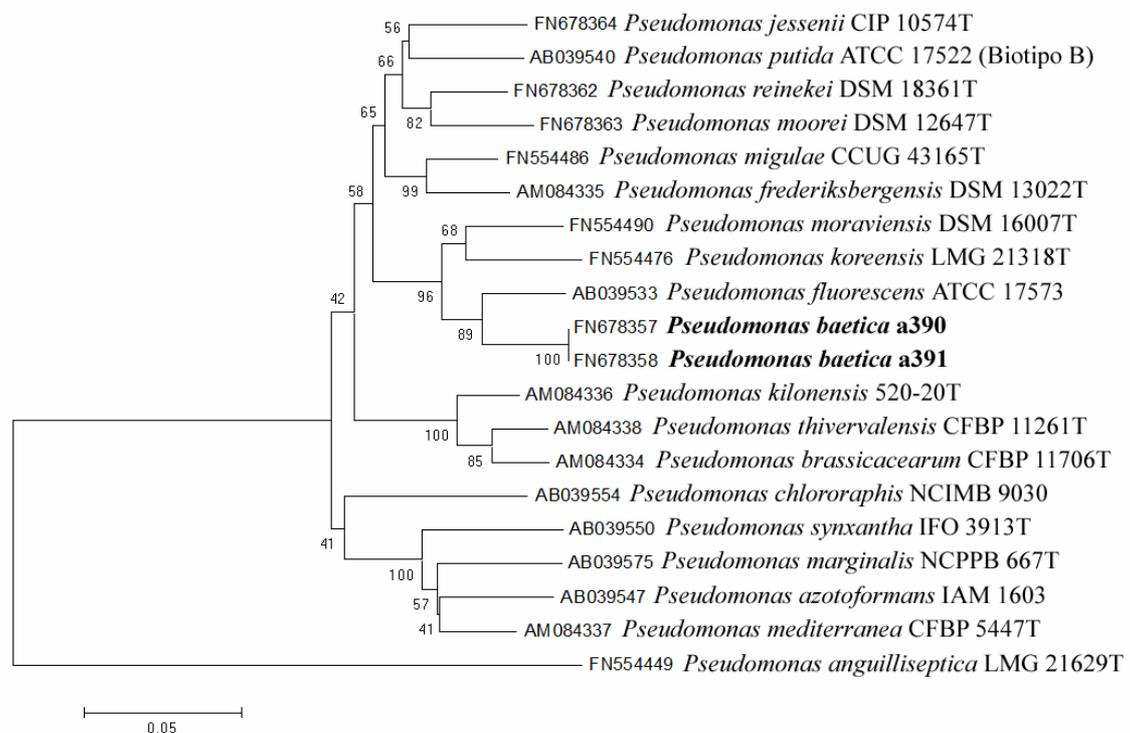


Figura 25. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen *rpoD* de las cepas del fenón G390 y especies relacionadas. La secuencia de *Pseudomonas anguilliseptica* fue incluida como *outgroup*.

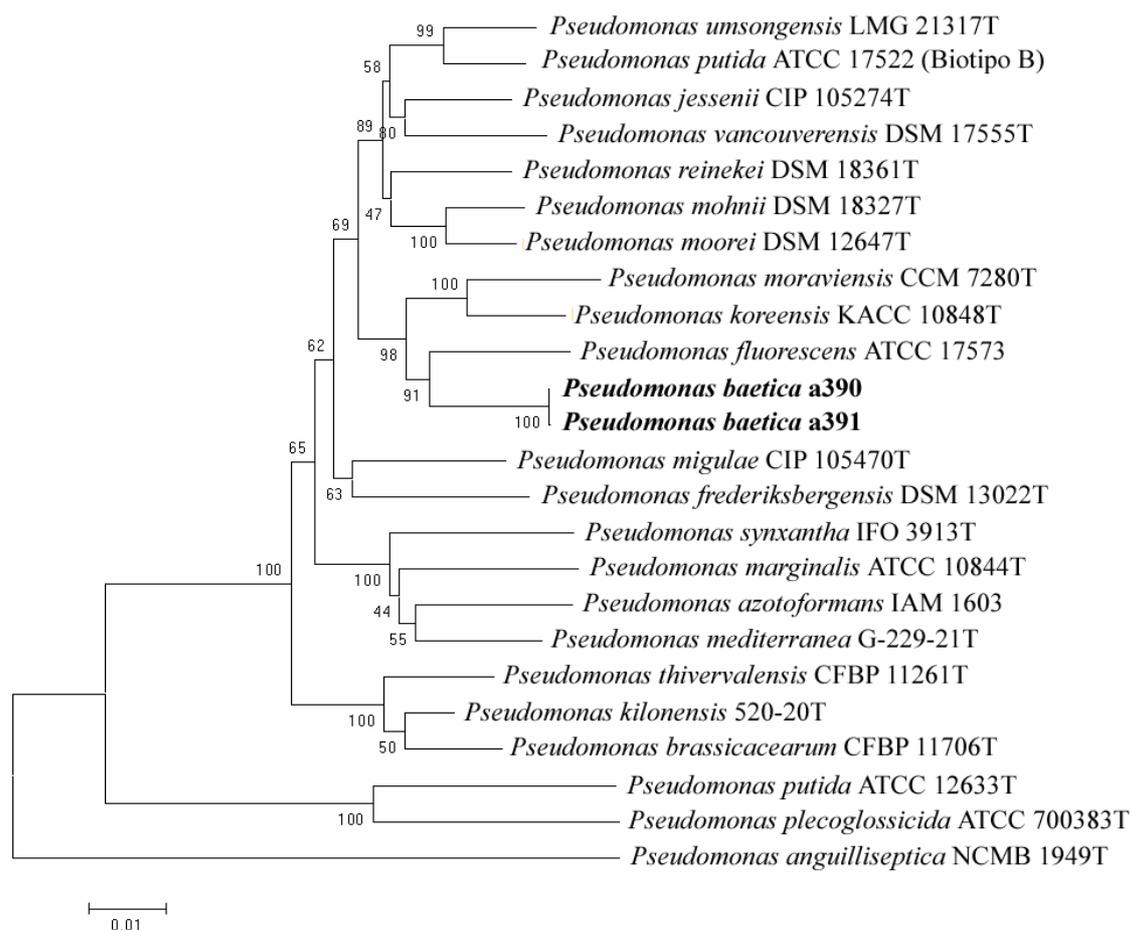


Figura 26. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias concatenadas del ADNr 16S y de los genes “housekeeping” *gyrB* y *rpoD*, de las cepas del fenón G390 y especies relacionadas. La secuencia de *Pseudomonas anguilliseptica* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 38. Resultados de la hibridación ADN-ADN de la cepa a390 con otras cepas del fenón G390 y especies próximas de acuerdo a la secuenciación de los genes ARNr 16S, *gyrB* y *rpoD*.

Especie	Cepa	Hibridación AND-ADN (%)
<i>Pseudomonas baetica</i>	a390	100
	a391	96
	a393	84
	a398	74
	a399	91
<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647 ^T	60,2
<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361 ^T	60,3
<i>Pseudomonas jessenii</i>	DSM 17150 ^T	57,9
<i>Pseudomonas moraviensis</i>	DSM 16007 ^T	49,9
<i>Pseudomonas migulae</i>	DSM 17966 ^T	50,9
<i>Pseudomonas koreensis</i>	DSM 16610 ^T	46,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525 ^T	39,4

Tabla 39. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G390 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Holt *et al.* (1994), Cámara *et al.* (2007), Verhille *et al.* (1999a, b), Mohn *et al.* (1999), Kwon *et al.* (2003), Buller (2004) y Tvrzová *et al.* (2006).

Test	Especie											
	G390	<i>P. moorei</i>	<i>P. umsongensis</i>	<i>P. mohnii</i>	<i>P. reinekei</i>	<i>P. putida</i>	<i>P. jessenii</i>	<i>P. vancouverensis</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. koreensis</i>	<i>P. moraviensis</i>	<i>P. migulae</i>
Morfología celular	Bacilo irregular (3-20 µm)	ND	Bacilo (1,5 µm)	ND	ND	Bacilo	Bacilo	Bacilo (1-3 µm)	Bacilo	Bacilo (1-2 µm)	Bacilo (2-5 µm)	ND
ADH	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
NO ₃	-	-	+	-	-	-	+	+	V	-	-	V
Lipasa	-	-	-	-	-	ND	-	-	ND	+	+	-
Gelatinasa	+	-	-	-	-	-	-	ND	+	V+	+	-
Caseína	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	-	-	ND
Ácido de:												
Glucosa	+	-	-	-	-	+	+	ND	+	-	ND	ND
Arabinosa	-	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	ND	ND	ND
Crecimiento a 35°C	-	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	V+	ND	+	+
Crecimiento con 6% NaCl	+	-	ND	-	-	-	-	-	ND	ND	ND	-
Fluoresceína	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Tabla 40. Diferencias en la utilización de distintos sustratos como fuentes de carbono entre los aislados del fenón G390 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Verhille *et al.* (1999b), Kwon *et al.* (2003), Tvrzová *et al.* (2006) y Cámara *et al.* (2007), excepto para *P. putida*, extraídos de la base de datos BIOLOG, y para *P. fluorescens*, obtenidos en este trabajo.

Test	Especie											
	G390	<i>P. moorei</i>	<i>P. umsongensis</i>	<i>P. mohnii</i>	<i>P. reinekei</i>	<i>P. putida</i> (biotipo B)	<i>P. jessenii</i>	<i>P. vancouverensis</i>	<i>P. fluorescens</i> CECT 378 ^T	<i>P. koreensis</i>	<i>P. moraviensis</i>	<i>P. migulae</i>
Tween 40	+	-	+	-	-	V	+	-	+	+	+	ND
Tween 80	+	-	+	-	-	V+	+	(+)	+	+	+	ND
N-acetil-D-glucosamina	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	ND	+
L-arabinosa	+	+	+	+	+	V+	+	-	+	+	+	+
D-arabitol	+	-	V	-	+	V	-	-	+	+	+	+
D-fructosa	+	-	+	-	-	V	+	(+)	+	+	+	+
D-galactosa	+	+	+	+	+	V+	+	-	+	+	+	+
D-manitol	+	+	V	+	-	V+	+	+	+	+	+	+
D-manosa	+	-	+	(+)	-	V+	+	-	+	+	+	+
D-psicosa	-	-	V	-	-	V	ND	ND	-	-	+	ND
D-trehalosa	-	-	-	-	-	-	ND	ND	+	-	+	+
Ácido acético	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	ND
Ácido fórmico	-	-	+	(+)	+	+	+	-	-	-	+	ND

Tabla 40. Continuación.

Test	Especie											
	G390	<i>P. moorei</i>	<i>P. umsongensis</i>	<i>P. mohnii</i>	<i>P. reinekei</i>	<i>P. putida</i> (biotipo B)	<i>P. jessenii</i>	<i>P. vancouverensis</i>	<i>P. fluorescens</i> CECT 378 ^T	<i>P. koreensis</i>	<i>P. moraviensis</i>	<i>P. migulae</i>
Lactona de ácido D-galactónico	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	ND
Ácido D- galacturónico	-	+	+	+	+	V	-	-	+	V	-	ND
Ácido D- glucosaminico	-	+	+	(+)	(+)	V	-	+	+	+	+	ND
Ácido D- glucurónico	-	+	V	+	-	V	-	-	+	V	-	ND
Ácido α - hidroxibutírico	-	-	+	-	(+)	V+	-	-	+	+	+	ND
Ácido p-hidroxi fenilacético	-	-	-	-	-	V	+	-	-	-	-	ND
Ácido α -ceto butírico	-	-	+	-	-	V	ND	ND	+	V	ND	ND
Ácido α -ceto glutarico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	ND
Ácido α -ceto valerico	-	-	+	-	-	V	(+)	ND	-	+	+	ND
Ácido malónico	+	-	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	ND
Ácido propiónico	+	-	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	ND
Ácido quínico	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	ND
Ácido D-sacarico	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	ND
Ácido succinámico	-	-	-	-	-	V+	V	+	+	-	+	ND
Glucuronamida	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	ND	ND
L-alaninamida	V-	-	+	-	(+)	V	+	(+)	-	+	+	ND
D-alanina	+	(+)	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-alanil-glicina	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	ND
Ácido glicil-L- glutámico	-	-	+	-	-	V	ND	ND	+	+	ND	ND
L-histidina	V+	+	+	-	-	V+	V	-	+	+	+	-
Hidroxi-L- prolina	-	+	V	+	-	V	+	+	-	+	+	ND
L-leucina	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	ND
L-oritina	-	-	+	-	-	V	+	+	+	+	-	ND
Ácido L-piroglutámico	+	+	+	-	+	+	+	-	+	V	+	ND
L-treonina	V+	-	+	-	-	V+	+	-	+	+	+	ND
Ácido γ - aminobutírico	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	ND
Inosina	+	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+	+	ND
Uridina	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	ND
Fenietilamina	-	-	+	(+)	+	V	+	(+)	-	-	-	ND
Putrescina	V+	(+)	+	(+)	-	V+	+	+	+	+	ND	+
2-aminoetanol	V+	(+)	+	-	(+)	V+	+	-	+	+	+	ND
D,L- α -glicerol fosfato	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	ND

▪ **Género *Psychrobacter***

Este género abarca un único fenón, el G328. Se trata de bacilos cortos (cocobacilos) Gram negativos, oxidasa y catalasa positivos, no móviles y de metabolismo oxidativo. Estas características fenotípicas, junto con los resultados de la secuenciación del ADNr 16S, permiten incluirlos dentro del género *Psychrobacter* (Holt *et al.* 1994).

- Fenón G328 (*Psychrobacter* sp.)

La caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de este fenón permitió su identificación a nivel de género como *Psychrobacter* sp., no siendo posible realizar una identificación clara a nivel de especie.

Las colonias son de color blanquecino, y no presentan *swarming*, pigmentos difusibles, o adherencia al agar. Las características fenotípicas de los aislados se muestran en la Tabla 41. Las dos cepas caracterizadas mostraron perfiles idénticos. El sistema BIOLOG se utilizó únicamente con la cepa a328; no proporcionó una identificación aceptable, pero señaló como especie probable a *Psychrobacter immobilis*.

Las especies más próximas, de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST, se muestran en el anexo VI-18. *Psychrobacter nivimaris*, *Psychrobacter muriicola*, *Psychrobacter proteolyticus*, *Psychrobacter aquimaris*, *Psychrobacter namhaensis*,

Tabla 41. Características fenotípicas de los aislados del fenón G328.

Test	Cepas		Test	Cepas	
	a328	a381		a328	a381
OF	O	O	Ácido de:		
ADH	-	-	Melobiosa	-	-
LDC	-	-	Amigdalina	-	-
ODC	-	-	Arabinosa	-	-
TCBS	-	-	Lactosa	+	+
ONPG	-	-	Manosa	+	+
Citrato	+	+	Salicina	-	-
H ₂ S	-	-	Crecimiento a:		
Indol	-	-	4°C	+	+
VP	+	+	30°C	+	+
NO ₃	-	-	35°C	+	+
N ₂	+	+	40°C	+	+
Amilasa	+	+	Crecimiento en:		
Lipasa	+	+	0% NaCl	+	+
Gelatinasa	+	+	3% NaCl	+	+
Ureasa	-	-	6% NaCl	+	+
Hemólisis	α	α	8% NaCl	+	+
Catalasa	+	+	10% NaCl	+	+
Ácido de:			12% NaCl	+	+
Glucosa	+	+	Requerimiento agua de mar	-	-
Manitol	-	-	O129 (10 µg)	R	R
Inositol	-	-	O129 (150 µg)	R	R
Sorbitol	-	-	Novobiocina	S	S
Rhamnosa	-	-	Ampicilina	S	S
Sacarosa	-	-			

Psychrobacter aquaticus y *Psychrobacter cryohalolentis* mostraron porcentajes de similitud del 98,7-99,9%, superiores por tanto a los propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006) para cepas de una misma especie. Por el contrario, el porcentaje de similitud con *P. immobilis* fue de solo el 97,6%. El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias puso de manifiesto una mayor relación filogenética de estos aislados con *P. nivimaris* y *P. muriicola* (Figura 28).

Las características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G328 y las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del gen ARNr 16S se resumen en la Tabla 42. *P. muriicola* se diferencia del fenón G328 por su capacidad para crecer en anaerobiosis, mostrando además discrepancias en los test de reducción de nitratos, hidrólisis de almidón y urea, en la producción de ácido a partir de glucosa y manosa, y en su capacidad de crecimiento a 40°C o con 12% de NaCl. *P. nivimaris* muestra discrepancias en test como la hidrólisis de

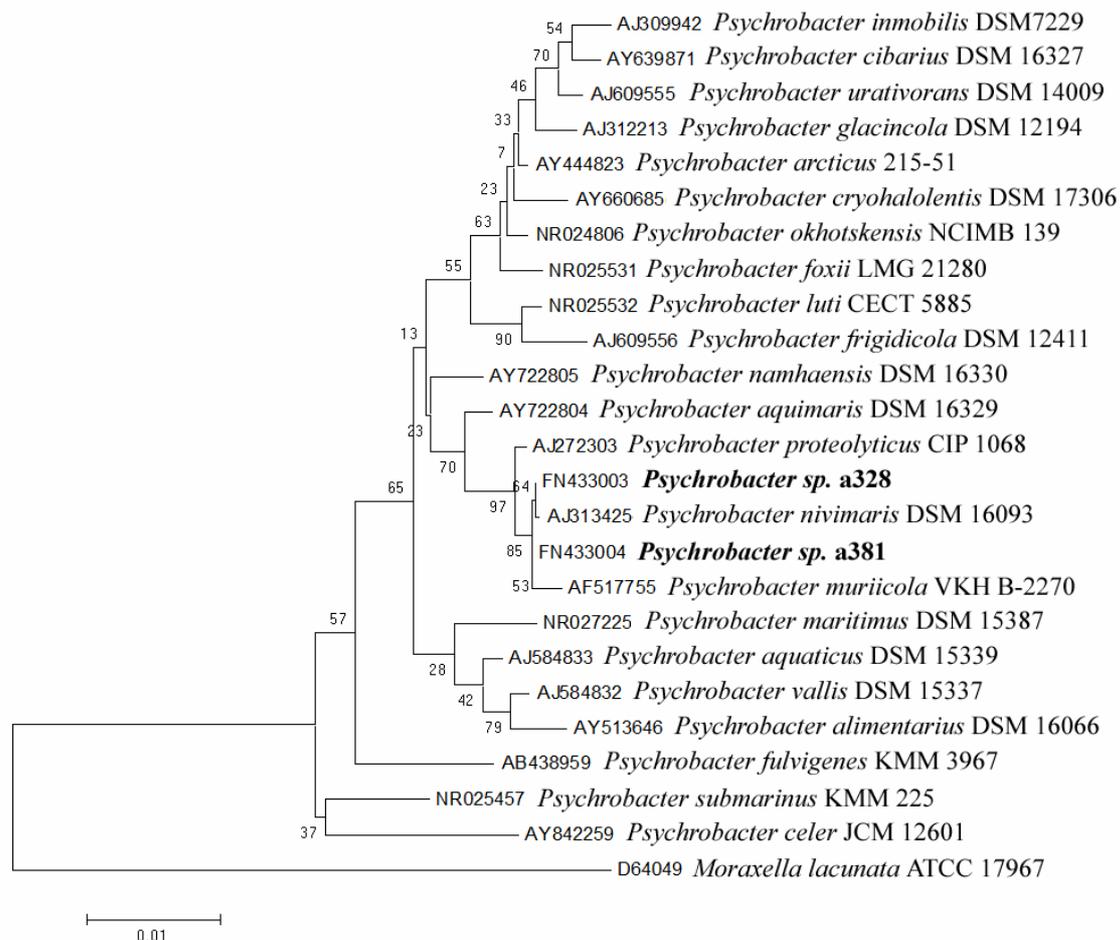


Figura 28. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G328 y especies relacionadas. La secuencia de *Moraxella lacunata* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 42. Características fenotípicas diferenciales entre el fenón G328 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Juni & Heym (1986), Bowman *et al.* (1996), Denner *et al.* (2001), Yumoto *et al.* (2003), Bozal *et al.* (2003), Vela *et al.* (2003), Romanenko *et al.* (2004, 2002), Heuchert *et al.* (2004), Yoon *et al.* (2005a, b), Shivaji *et al.* (2005), Jung *et al.* (2005), Bakermans *et al.* (2006) y Shcherbakova *et al.* (2009).

	Indol	VP	NO ₃	Amilasa	Gelatinasa	Ureasa	Ácido de:					Crecimiento a/en:				
							Glucosa	Rhamnosa	Melobiosa	Arabinosa	Lactosa	4°C	35°C	40°C	0% NaCl	12% NaCl
Fenón G328	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
<i>Psychrobacter nivimaris</i>	ND	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	
<i>Psychrobacter muriicola</i>	-	ND	+	-	ND	+	-	-	-	ND	+	+	-	+	-	
<i>Psychrobacter proteolyticus</i>	-	ND	-	-	+	+	+	+	+	ND	+	-	-	ND	+	
<i>Psychrobacter aquimaris</i>	-	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
<i>Psychrobacter namhaensis</i>	-	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	+	+	+	-	+	+	
<i>Psychrobacter aquaticus</i>	-	-	+	-	-	+	-	ND	ND	-	-	+	-	-	+	
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	ND	ND	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	+	-	-	+	
<i>Psychrobacter vallis</i>	-	-	+	-	-	-	+	ND	ND	-	-	+	-	-	+	
<i>Psychrobacter okhotskensis</i>	+	-	+	ND	-	-	-	ND	-	-	-	+	+	-	+	
<i>Psychrobacter alimentarius</i>	-	-	ND	-	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	-	+	
<i>Psychrobacter urativorans</i>	-	-	V	-	-	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	-	-	+	
<i>Psychrobacter fozii</i>	ND	ND	-	-	ND	+	-	-	ND	-	-	+	-	-	V	
<i>Psychrobacter arcticus</i>	ND	ND	V	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	+	-	-	-	
<i>Psychrobacter luti</i>	ND	ND	+	-	ND	-	-	-	ND	-	-	+	-	-	+	
<i>Psychrobacter glacincola</i>	ND	ND	V	-	-	V	-	-	ND	-	-	+	-	-	+	
<i>Psychrobacter cibarius</i>	ND	ND	+	-	-	ND	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
<i>Psychrobacter immobilis</i>	-	ND	V	-	-	+	+	+	ND	+	V	-	V	-	+	
<i>Psychrobacter submarinus</i>	ND	-	ND	ND	ND	ND	-	-	ND	+	-	+	+	-	+	
<i>Psychrobacter pulmonis</i>	-	+	+	ND	-	-	-	-	-	-	ND	ND	+	ND	ND	
<i>Psychrobacter maritimus</i>	ND	ND	+	ND	ND	ND	-	-	ND	-	-	+	+	-	+	

almidón y gelatina o la capacidad de crecer a 40°C. Por otra parte, el perfil obtenido para la cepa a328 con el sistema BIOLOG fue muy distinto al publicado para la cepa tipo de *P. nivimaris*, mostrando discrepancias con hasta 26 test. Otras especies próximas muestran asimismo una serie de características fenotípicas que las diferencia claramente de las cepas del fenón, entre ellas, la hidrólisis de almidón o gelatina, la producción de ácido a partir de glucosa, y la capacidad de crecimiento a 35 y 40°C.

Ensayos adicionales deberán realizarse para determinar la inclusión de las cepas del fenón G328 en alguna de las especies mencionadas o en una especie nueva dentro del género *Psychrobacter*.

▪ **Género *Tenacibaculum***

Este género incluye las cepas de dos fenones, el G47 y el G443, ambos patógenos, así como la cepa a3, no incluida en ningún fenón. En todos los casos se trata de bacterias filamentosas Gram negativas, oxidasa positivas no móviles (movilidad deslizante), de metabolismo oxidativo, no productoras de pigmentos tipo flexirrubina y capaces de crecer bien en medios de cultivo con agua de mar, aunque no todas las cepas tienen este requerimiento. Estas características fenotípicas, junto con los resultados de la secuenciación del ADNr 16S, permitieron la inclusión de estas cepas dentro del género *Tenacibaculum* (Suzuki *et al.* 2001).

– Fenón G47 (*Tenacibaculum soleae*)

La caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de este fenón permitió su identificación como *Tenacibaculum soleae*.

Las colonias, formadas por bacterias filamentosas de 5-15 µm de longitud, son de color amarillo brillante y no presentan *swarming*, pigmentos difusibles ni adherencia al agar (Figura 29). Las características fenotípicas de los aislados se muestran en la Tabla 43. Las cepas mostraron perfiles fenotípicos prácticamente idénticos tanto con los test convencionales como con el API 20E (Figura 30) pero mostraron algunas discrepancias con el API ZYM, obteniéndose perfiles ligeramente distintos. Los resultados obtenidos fueron similares a los descritos para *T. soleae* por Piñeiro-Vidal *et al.* (2008c), excepto en lo que se refiere a los perfiles obtenidos con el API ZYM, en los que se observaron algunas diferencias.

Las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST se muestran en el anexo VI-6. Las cepas del fenón mostraron unos valores de similitud del 98,7-99,5% con la cepa tipo de *T. soleae*, dentro por tanto de los valores propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006), pero inferiores al 97% con otras especies próximas,

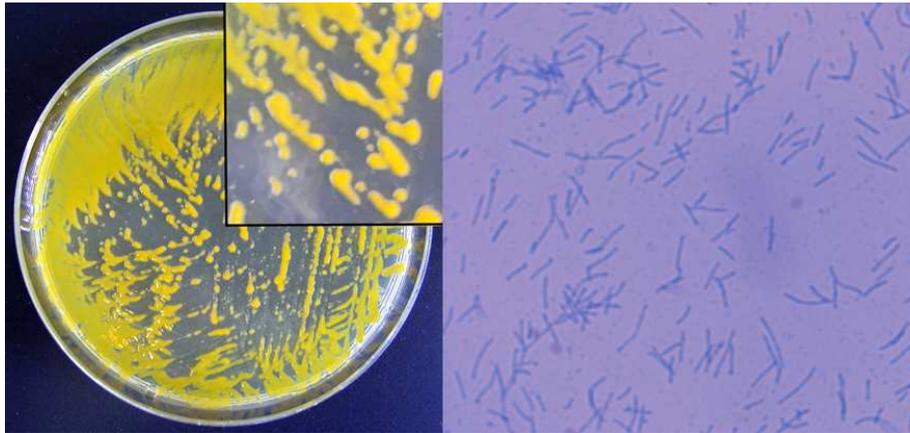


Figura 29. Morfología de la colonia y de las células de la cepa a47. La morfología celular se observó al microscopio óptico (1000x) con tinción azul de metileno.



Figura 30. Resultados de los sistemas miniaturizados API 20E y API ZYM con el aislado a47.

pertenecientes a los géneros *Tenacibaculum* y *Polaribacter*. El árbol construido a partir de estas secuencias agrupó claramente las cepas del fenón G47 con la cepa tipo de *T. soleae* y mostró a *T. ovoliticum* como la especie más próxima filogenéticamente (Figura 31).

Las características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G47 y las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del gen ARNr 16S se resumen en la Tabla 44. Las principales diferencias se dieron en los test de hidrólisis de almidón y tween 80, requerimiento de agua de mar para el crecimiento, crecimiento a 35°C y en la pigmentación de las colonias.

Por último, la caracterización serológica utilizando el antisero anti-NCIMB 14368, dirigido contra la cepa tipo de *T. soleae*, reveló la existencia de variabilidad antigénica entre las cepas estudiadas. Todos los aislados reaccionaron positivamente cuando se utilizaron suspensiones de células bacterianas enteras, tanto en los ensayos de aglutinación en portaobjetos como en los ensayos Dot-Blot. Sin embargo, solo las cepas a47, a467 y a469 mostraron resultados positivos cuando se utilizaron los antígenos O, mostrando pertenecer al mismo serotipo que la cepa tipo de *T. soleae* (Figura 32). Los demás aislados mostraron resultados negativos, por lo que podrían pertenecer a otros serotipos dentro de esta especie.

Tabla 43. Características fenotípicas de los aislados del fenón G47 y de la cepa tipo de *Tenacibaculum soleae*.

Test	Cepas								<i>T. soleae</i> NCIMB 14368 ^T
	a11	a47	a50	a216	a410	a462	a467	a469	
OF	O	O	O	O	O	O	O	O	O
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TCBS	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lipasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculinasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Caseinasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+
Ácido de:									
Glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a:									
4°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en:									
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TSA-1% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Requerimiento agua de mar	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Flexirrubina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rojo congo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
O129 (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	ND
O129 (150 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Novobiocina	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Test API ZYM									
2 Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 Esterasa (C4)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	+
4 Esterasa lipasa (C8)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5 Lipasa (C14)	-	-	-	-	-	-	-	-	+
6 Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7 Valina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8 Cistina arilamidasa	+	+	-	+	+	+	+	+	+
9 Tripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 α-quimotripsina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 Fosfatasa acida	+	+	+	-	+	+	+	+	-
12 Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	(+)	(+)	-	(+)	+	+	+	-
13 α-galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 β-galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 β-glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16 α-glucosidasa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
17 β-glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18 N-acetil-β-glucosaminidasa	-	+	+	+	+	+	-	-	-
19 α-mannosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 α-fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-

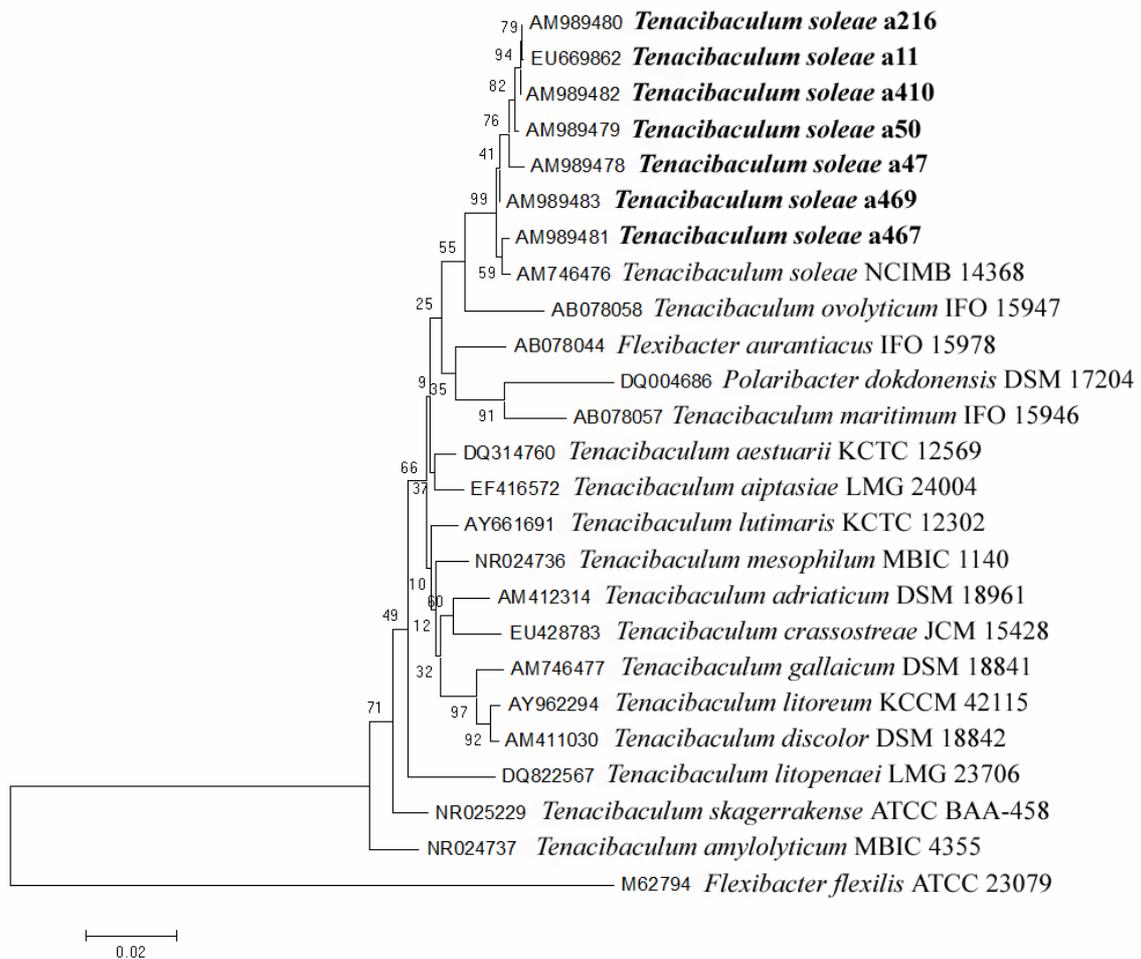


Figura 31. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G47 y especies relacionadas. La secuencia de *Flexibacter flexilis* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

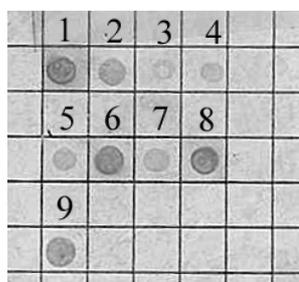


Figura 32. Ensayo Dot-Blot utilizando antisuero dirigido contra la cepa tipo de *Tenacibaculum soleae* y antígenos "O". Punto 1: *Tenacibaculum soleae* NCIMB 14368^T; puntos 2-9, cepas a462, a50, a410, a11, a467, a216, a469 y a47, respectivamente.

Tabla 44. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G47 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Wakabayashi *et al.* (1986), Bernardet *et al.* (1990), Hansen *et al.* (1992), Suzuki *et al.* (2001), Frente *et al.* (2004), Buller (2004), Yoon *et al.* (2006, 2005c), Jung *et al.* (2006), Choi *et al.* (2006), Avendaño-Herrera *et al.* (2006b, 2004a), Sheu *et al.* (2007), Wang *et al.* (2008), Piñeiro-Vidal *et al.* (2008b, c), Heindl *et al.* (2008) y Lee *et al.* (2009).

Especie	Hidrólisis de:				NO ₃	Crecimiento con solo NaCl	Requerimiento agua de mar	Crecimiento a:		Sensibilidad a:		Pigmentación colonia
	Almidón	Tween 80	Esculina	Caseína				4°C	35°C	O129 (150 µg)	Novobiocina	
Fenón G47	-	-	-	+	+	-	+	-	-	R	S	Amarillo brillante
<i>Tenacibaculum soleae</i>	-	-	-	+	+	-	+	-	-	R	S	Amarillo brillante
<i>Tenacibaculum adriaticum</i>	ND	ND	+	ND	ND	+	-	-	-	ND	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	-	-	ND	+	+	-	+	-	+	ND	ND	Amarillo brillante
<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	ND	ND	ND	ND	ND	+	-	ND	+	ND	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum discolor</i>	-	-	ND	+	+	-	+	-	+	ND	ND	Amarillo brillante (verde)
<i>Tenacibaculum litoreum</i>	+	+	-	ND	+	+	-	-	+	ND	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	-	+	ND	ND	+	-	+	+	-	ND	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum crassostreae</i>	+	+	ND	+	ND	-	+	-	+	ND	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum aestuarii</i>	-	+	-	+	-	+	-	-	+	ND	R	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	-	ND	ND	ND	-	+	-	-	+	ND	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	-	-	-	+	V	+	-	-	+	ND	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum skagerrakense</i>	+	-	ND	+	+	-	+	-	+	ND	ND	Amarillo brillante
<i>Tenacibaculum amyolyticum</i>	+	ND	ND	ND	+	+	-	-	+	ND	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum litopenaei</i>	ND	-	-	ND	-	+	-	-	+	ND	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	-	+	ND	+	V	-	+	-	-	S	ND	Amarillo pálido
<i>Flexibacter aurantiacus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Naranja
<i>Polaribacter dokdoniensis</i>	ND	+	-	-	-	+	-	+	-	ND	S	Naranja

* Las cepas a11, a50, a410, a467 y a469 requieren un 55-100% de agua de mar; la cepa a462 requiere el 30-100%.

- Fenón G443 (*Tenacibaculum maritimum*)

La caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de este fenón permitió su identificación como *Tenacibaculum maritimum*.

Las colonias, formadas por bacterias filamentosas de 5-20 μm de longitud, son de color amarillo pálido, planas, con bordes irregulares y crecimiento lento (Figura 33). Con frecuencia se adhieren al agar, pero no producen pigmentos difusibles ni presentan *swarming*.

Las características fenotípicas de los aislados se muestran en la Tabla 45. Las cepas presentan perfiles fenotípicos homogéneos para los test convencionales y con el API 20E (Figura 34), encontrándose únicamente diferencias menores en los resultados de las galerías API ZYM. Las características fenotípicas de los aislados coinciden con las descritas para *T. maritimum* por Bernardet *et al.* (1990), Ostland *et al.* (1999), Suzuki *et al.* (2001), Avendaño-Herrera *et al.* (2004a), Buller (2004) y Avendaño-Herrera *et al.* (2006b), observándose únicamente diferencias sin importancia en el API ZYM.

Las especies más cercanas, de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST, se muestran en el anexo VI-22. Las secuencias obtenidas mostraron un porcentaje de

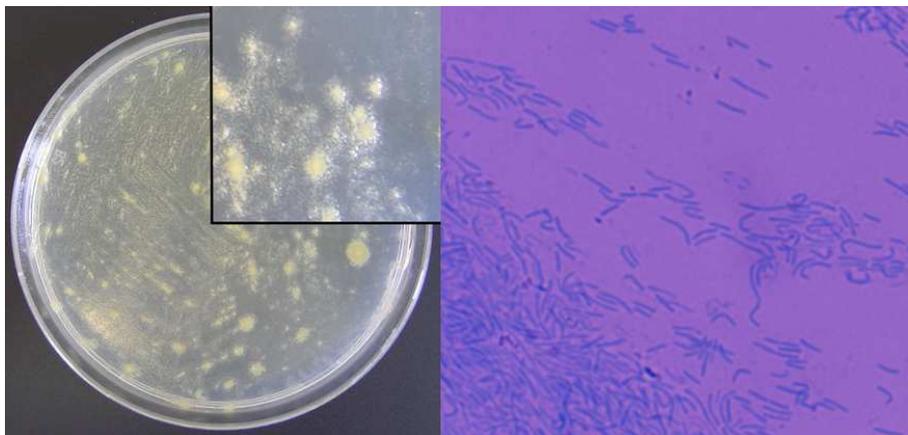


Figura 33. Morfología de la colonia y de las células de la cepa a443. La morfología celular se observó al microscopio óptico (1000x) con tinción azul de metileno.



Figura 34. Resultados de los sistemas miniaturizados API 20E y API ZYM con el aislado a443.

Tabla 45. Características fenotípicas de los aislados del fenón G443 y de *Tenacibaculum maritimum*.

Test	Cepas						<i>T. maritimum</i>
	a274	a388	a443	a444	a461	a523	
OF	O	O	O	O	O	O	O
ADH	-	-	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	-	-
TCBS	-	-	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	V
Indol	-	-	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃	-	-	-	-	-	-	V
N ₂	+	+	+	+	+	+	ND
Amilasa	-	-	-	-	-	-	-
Lipasa	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	V
Esculinasa	-	-	-	-	-	-	-
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Ácido de:							
Glucosa	-	-	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-
Melobiosa	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a:							
4°C	-	-	-	-	-	-	-
15°C	+	+	+	+	+	+	+
25°C	+	+	+	+	+	+	+
35°C	-	-	-	-	-	-	-
40°C	-	-	-	-	-	-	-
44°C	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en:							
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
6% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
8% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
12% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
TSA-1% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
Requerimiento agua de mar	+	+	+	+	+	+	+
Flexirrubina	-	-	-	-	-	-	-
Rojo congo	+	+	+	+	+	+	+
O129 (10 µg)	S	S	S	S	S	S	ND
O129 (150 µg)	S	S	S	S	S	S	S
Novobiocina	S	S	S	S	S	S	ND
Ampicilina	S	S	S	S	S	S	ND
Test API ZYM							
2 Fosfatasa alcalina	+	+	+	+	+	+	+
3 Esterasa (C4)	+	+	+	+	+	+	+
4 Esterasa lipasa (C8)	+	+	+	+	+	+	+
5 Lipasa (C14)	+	+	+	+	+	+	+
6 Leucina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+
7 Valina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+
8 Cistina arilamidasa	+	+	+	+	+	+	+
9 Tripsina	+	+	+	+	+	+	+
10 α-quimotripsina	+	+	+	+	+	+	+
11 Fosfatasa acida	+	+	+	+	+	+	+
12 Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	+	+	+	+	+	+	+
13 α-galactosidasa	-	-	-	-	-	-	-
14 β-galactosidasa	(+)	-	-	-	-	-	-
15 β-glucuronidasa	-	-	-	-	-	-	-
16 α-glucosidasa	-	-	-	-	-	(+)	-
17 β-glucosidasa	-	-	-	-	-	-	-
18 N-acetil-β-glucosaminidasa	-	-	-	-	-	-	-
19 α-mannosidasa	-	-	-	-	-	-	-
20 α-fucosidasa	-	-	-	-	-	-	-

similitud del 99,6% con la cepa tipo de *T. maritimum*, pero inferior al 97% con otras especies relacionadas, siendo por tanto *T. maritimum* la única con valores dentro de los propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006). El árbol filogenético construido con estas secuencias agrupó las cepas del fenón G443 con la cepa tipo de *T. maritimum*, diferenciándolas claramente de otras especies del género *Tenacibaculum* y mostrando a *Polaribacter dokdonensis* como la especie más próxima filogenéticamente (Figura 35).

La identificación de los aislados como *T. maritimum* se confirmó mediante PCR con los cebadores específicos Mar1-Mar2 y MAR1-MAR2, descritos por Bader & Shorts (1998) y Toyama *et al.* (1996), respectivamente. Todas las cepas mostraron los fragmentos de ADN esperados, similares a los de las cepas de referencia (Figura 36). Por otro lado, la diferenciación entre los aislados del fenón G443 y las especies más cercanas puede hacerse a partir de varios test fenotípicos, que se resumen en la Tabla 46.

Por último, la caracterización serológica utilizando antígenos O y los antisueros anti-PC503.1, anti-PC424.1 y anti-ACC13.1, dirigidos contra cepas pertenecientes a los distintos

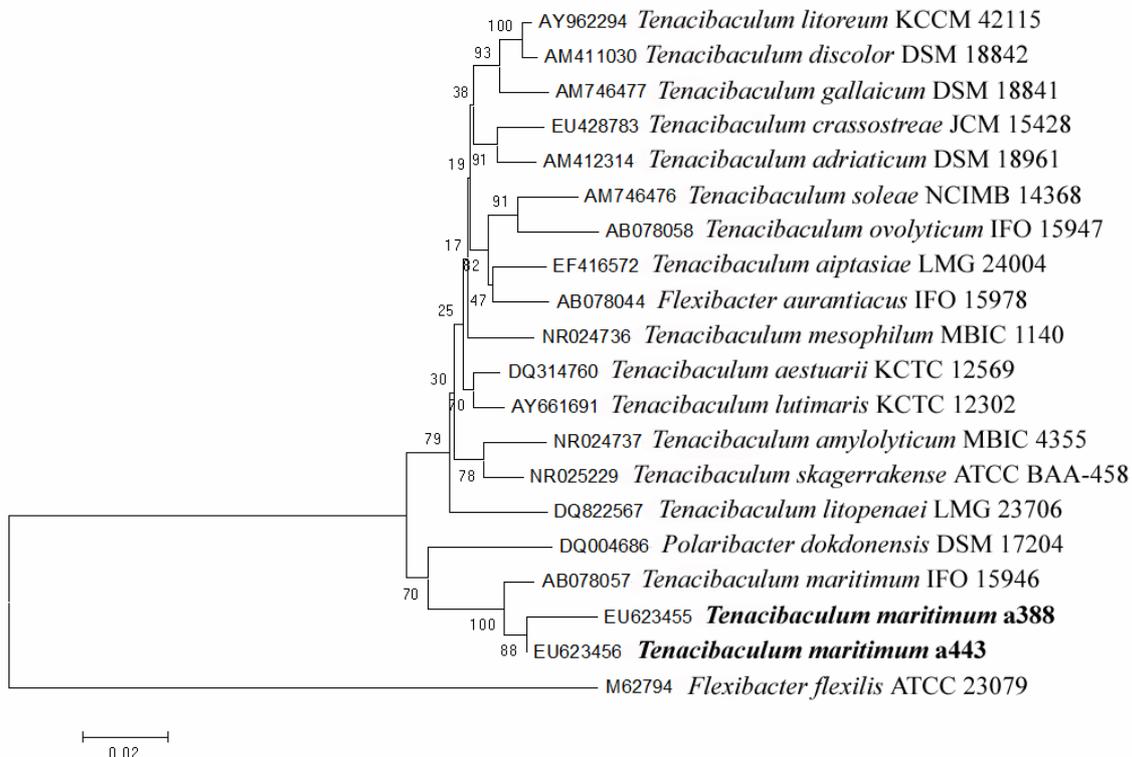


Figura 35. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G443 y especies relacionadas. La secuencia de *Flexibacter flexilis* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

serotipos descritos en esta especie, revelaron heterogeneidad antigénica entre las cepas aisladas. Los aislados a274 y a388 pertenecen al serotipo O1, mientras que los demás pertenecen al serotipo O3. El serotipo O2 no se vio representado por ningún aislado (Figura 37).

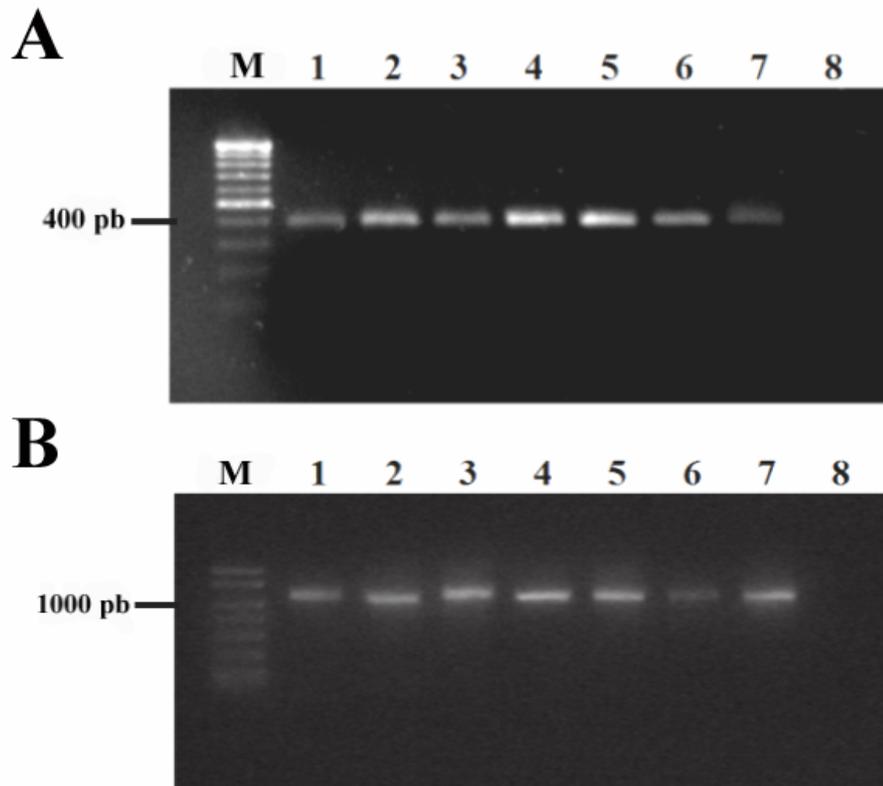


Figura 36. Amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos para *T. maritimum* Mar1-Mar2, descritos por Bader & Shorts (1998) (A) y los MAR1-MAR2, descritos por Toyama *et al.* (1996) (B), con cepas del fenón G443. A: M, marcador de peso molecular 100 pb; líneas 1-6, cepas a274, a388, a443, a444, a461 y a523, respectivamente; línea 7, *T. maritimum* CECT 4276; línea 8, control negativo; el producto de amplificación esperado es de 400 pb; B: MW, marcador de peso molecular 50-2000 pb; línea 1, *T. maritimum* PC503.1; línea 2, *T. maritimum* PC424.1; líneas 3-7, cepas a274, a388, a443, a461 y a523, respectivamente; línea 8, control negativo; el producto de amplificación esperado en este caso es de 1088 pb.

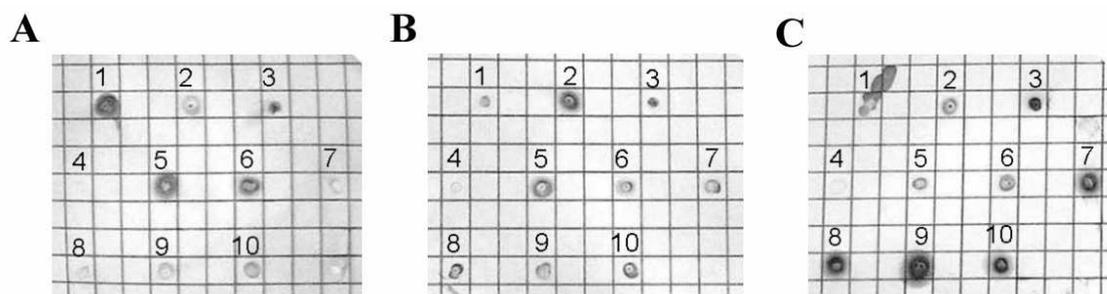


Figura 37. Ensayo Dot-Blot utilizando antisuero dirigido contra cepas de *Tenacibaculum maritimum* pertenecientes a distintos serotipos: A, contra la cepa PC503.1 (serotipo O1); B, contra la cepa PC424.1 (serotipo O2); C, contra la cepa ACC13.1 (serotipo O3). Punto 1: cepa PC503.1; punto 2, cepa PC424.1; punto 3, cepa ACC13.1; punto 4, control negativo; puntos 5-10, cepas a274, a388, a443, a444, a461 y a523, respectivamente.

Tabla 46. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G443 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Wakabayashi *et al.* (1986), Bernardet *et al.* (1990), Hansen *et al.* (1992), Suzuki *et al.* (2001), Buller (2004), Frente *et al.* (2004), Yoon *et al.* (2006, 2005c), Jung *et al.* (2006), Choi *et al.* (2006), Avendaño-Herrera *et al.* (2006b, 2004a), Sheu *et al.* (2007), Wang *et al.* (2008), Piñeiro-Vidal *et al.* (2008b, c), Heindl *et al.* (2008) y Lee *et al.* (2009).

Especie	Hidrólisis de:			Crecimiento con solo NaCl	Requerimiento agua de mar	Crecimiento a:		O129 (150 µg)	Pigmentación colonia
	Almidón	Tween 80	Esculina			4°C	35°C		
Fenón G443	-	+	-	-	+	-	-	S	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum maritimum</i>	-	+	-	-	+(30-100%)	-	-	S	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum soleae</i>	-	-	-	-	+(55-100%)	-	-	R	Amarillo brillante
<i>Tenacibaculum adriaticum</i>	ND	ND	+	+	-	-	-	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	-	-	ND	-	+(30-100%)	-	+	ND	Amarillo brillante
<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	ND	ND	ND	+	-	ND	+	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum discolor</i>	-	-	ND	-	+(30-100%)	-	+	ND	Amarillo brillante (verde)
<i>Tenacibaculum litoreum</i>	+	+	-	+	-	-	+	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	-	+	ND	-	+(70-100%)	+	-	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum crassostreae</i>	+	+	ND	-	+	-	+	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum aestuarii</i>	-	+	-	+	-	-	+	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	-	ND	ND	+	-	-	+	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	-	-	-	+	-	-	+	ND	Amarillo pálido
<i>Tenacibaculum skagerrakense</i>	+	-	ND	-	+(25-150%)	-	+	ND	Amarillo brillante
<i>Tenacibaculum amyolyticum</i>	+	ND	ND	+	-	-	+	ND	Amarillo
<i>Tenacibaculum litopenaei</i>	ND	-	-	+	-	-	+	ND	Amarillo
<i>Flexibacter aurantiacus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Naranja
<i>Polaribacter dokdoniensis</i>	ND	+	-	+	-	+	-	ND	Naranja

- Cepa a3 (*Tenacibaculum* sp.)

La caracterización de esta cepa no permitió identificarla a nivel de especie, pareciendo no pertenecer a ninguna de las especies actualmente descritas en el género *Tenacibaculum*.

Las colonias son de un característico color amarillo-verdoso y no presentan *swarming*, adherencia al agar o pigmentos difusibles. Sus características fenotípicas se resumen en la Tabla 47. A diferencia de los fenones G47 y G443, no requiere agua de mar para crecer.

De acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S, las especies más próximas son *T. discolor* (98,0% similitud), *T. gallaicum* (97,6%) y *T. litoreum* (97,5%), no alcanzando ninguna el valor de similitud mínimo propuesto por Stackebrandt & Ebers (2006) para ser considerados miembros de la misma especie. Otras especies relacionadas, pertenecientes a los géneros *Tenacibaculum* y *Polaribacter*, muestran valores de similitud inferiores al 97%. El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias refleja estos resultados (Figura 38). De los fenones establecidos en este trabajo, el G47 fue el más próximo, con un 95,9% de similitud en la secuencia del gen ARNr 16S.

Por otro lado, la caracterización fenotípica mostró discrepancias entre la cepa a3 y las especies más próximas. Las características diferenciales con *T. discolor* y *T. gallaicum* incluyen los test lipasa, crecimiento a 4 y 40°C, y el requerimiento de agua de mar. *T. litoreum* puede diferenciarse a partir de los test lipasa y crecimiento a 4°C, además de por la morfología de la colonia, amarillo pálido en este caso.

Tabla 47. Características fenotípicas de la cepa a3.

Test	Cepa a3	Test	Cepa a3
OF	O	Ácido de:	
ADH	-	Melobiosa	-
LDC	-	Amigdalina	-
ODC	-	Arabinosa	-
TCBS	-	Lactosa	-
ONPG	-	Crecimiento a:	
Citrato	-	4°C	+
H ₂ S	-	15°C	+
Indol	-	25°C	+
VP	-	35°C	+
Rojo metilo	-	40°C	+
NO ₃	+	Crecimiento en:	
Amilasa	-	0% NaCl	-
Lipasa	+	3% NaCl	-
Gelatinasa	+	6% NaCl	-
Esculinasa	-	8% NaCl	-
Ureasa	-	10% NaCl	-
Hemólisis	-	12% NaCl	-
Catalasa	-	TSA-1% NaCl	+
Ácido de:		Requerimiento agua de mar	-
Glucosa	-	Flexirrubina	-
Manitol	-	Rojo congo	+
Inositol	-	O129 (10 µg)	S
Sorbitol	-	O129 (150 µg)	S
Rhamnosa	-	Novobiocina	S
Sacarosa	-	Ampicilina	R

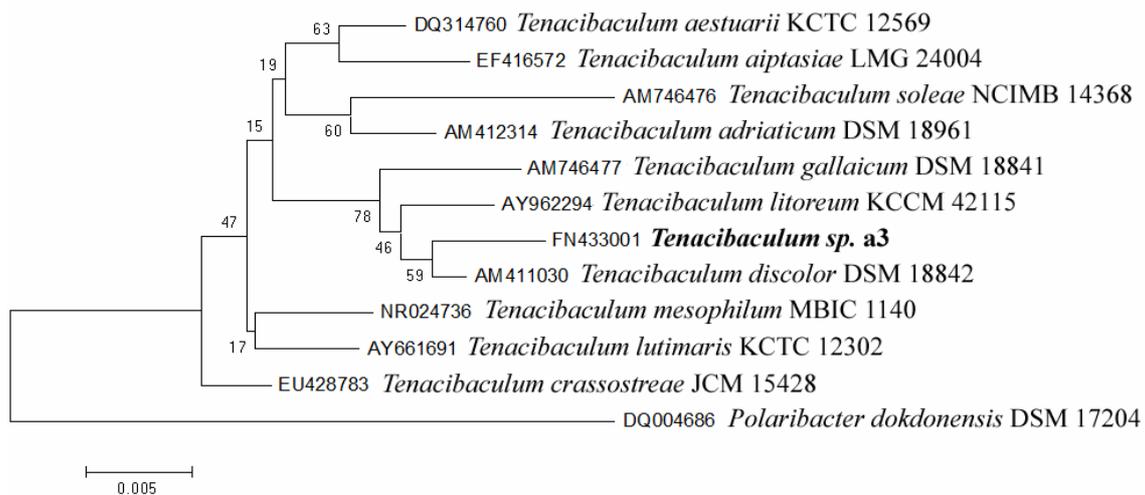


Figura 38. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa a3 y especies relacionadas. La secuencia de *Polaribacter dokdonensis* fue incluida como *outgroup*. Los valores de *bootstrap* de 1000 replicas aparecen en el nudo correspondiente.

▪ Género *Vibrio*

Este género es el que cuenta con una mayor representación. Abarca nueve fenones (G7, G29, G35, G91, G107, G148, G241, G255 y G256, de los que solo el G91 es patógeno) y cuatro cepas que no fueron incluidas en fenones. En todos los casos se trata de bacilos Gram negativos oxidasa positivos, móviles, anaerobios facultativos, que reducen nitratos a nitritos, fermentan hidratos de carbono y requieren sodio para su crecimiento. Estas características, junto con los resultados de la secuenciación del gen ARNr 16S, permitieron su inclusión dentro del género *Vibrio* (Holt *et al.* 1994). Los fenones G7 y G107 están formados por bacilos curvos, mientras que los demás fenones son bacilos cortos o cocobacilos. La sensibilidad al agente quimioterápico O129, uno de los caracteres clásicamente definitorios del género, varió de unos fenones a otros, al igual que en las especies de *Vibrio* descritas.

– Fenón G7 (*Vibrio* sp.)

La caracterización de las cepas del fenón muestra que se trata de bacterias del grupo de *Vibrio splendidus*, probablemente *Vibrio crassostreae* o *Vibrio gigantis*.

Las colonias son de color grisáceo o blancuzco, y no presentan *swarming*, adherencia al agar ni producción de pigmentos difusibles. Las características fenotípicas se resumen en la Tabla 48. Las cepas mostraron perfiles fenotípicos básicamente similares, observándose diferencias únicamente en la sensibilidad a los agentes quimioterápicos O129 y ampicilina, y en

Tabla 48. Características fenotípicas de los aislados del fenón G7.

Test	Cepas				Test	Cepas			
	a7	a90	a170	a234		a7	a90	a170	a234
OF	F	F	F	F	Ácido de:				
ADH	+	+	+	+	Sacarosa	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	Melobiosa	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-	Amigdalina	+	+	+	+
TCBS	v	v	v	v	Arabinosa	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	Lactosa	+	-	-	-
Citrato	-*	-	-	-	Manosa	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	Salicina	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	Crecimiento a:				
VP	-	-	-	-	4°C	+	+	+	+
Rojo metilo	+	+	+	+	35°C	-	-	-	-
Gas glucosa	-	-	-	-	40°C	-	-	-	-
NO ₃	+	+	+	+	44°C	-	-	-	-
Amilasa	+	+	+	+	Crecimiento en:				
Lipasa	+	+	+	+	0% NaCl	-	-	-	-
Gelatinasa	+	+	+	+	3% NaCl	+	+	+	+
Esculinasa	+	+	+	+	6% NaCl	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	8% NaCl	-	-	-	-
Hemólisis	β	β	β	β	10% NaCl	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	12% NaCl	-	-	-	-
Ácido de:					Requerimiento agua de mar	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	O129 (10 µg)	R	S	R	S
Manitol	+	+	+	+	O129 (150 µg)	R	S	S	S
Inositol	-	-	-	-	Novobiocina	S	S	S	S
Sorbitol	-	-	-	-	Ampicilina	S	R	S	S
Rhamnosa	-	-	-	-					

* El sistema API 20E mostró el resultado opuesto.

la producción de ácido a partir de lactosa. Los resultados obtenidos con las cepas del fenón G7 coinciden con los publicados para *V. crassostreae* y *V. gigantis* por Faury *et al.* (2004), Le Roux *et al.* (2005) y Noguerola & Blanch (2008) mostrando diferencias únicamente en la coloración de las colonias en el medio TCBS (ácido a partir de sacarosa), amarillas en las dos especies, y en los resultados del test ONPG. De acuerdo a las claves propuestas por Noguerola & Blanch (2008), la totalidad de las cepas deberían incluirse en *V. gigantis*, sin embargo los test propuestos por Le Roux *et al.* (2005) para distinguir estas dos especies muestran que sus perfiles fenotípicos son prácticamente idénticos.

El sistema BIOLOG se utilizó únicamente con la cepa a7, que fue identificada como *V. splendidus*. La utilización de los cebadores específicos de *V. splendidus* VSPN-F y VSPN-R, descritos por Lee *et al.* (2002), contradujo, sin embargo, este resultado, al no mostrar ninguna de las cepas del fenón las dos bandas de amplificación esperadas para esta especie (datos no mostrados).

Las especies más próximas de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST se muestran en el anexo VI-3. *V. pomeroyi*, *V. splendidus*, *V. chagasii* y *V. gallaecicus* mostraron valores de similitud superiores a los propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006), sin embargo, los valores más altos se obtuvieron con *V. gigantis* (99,3%) y *V. crassostreae* (99,7%).

El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias agrupó claramente la cepa a7 con *V. crassostreae*, mostrándola más cercana a esta especie que a *V. gigantis* (Figura 39).

Las características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G7 y las especies más cercanas de acuerdo al gen ARNr 16S se resumen en la Tabla 49.

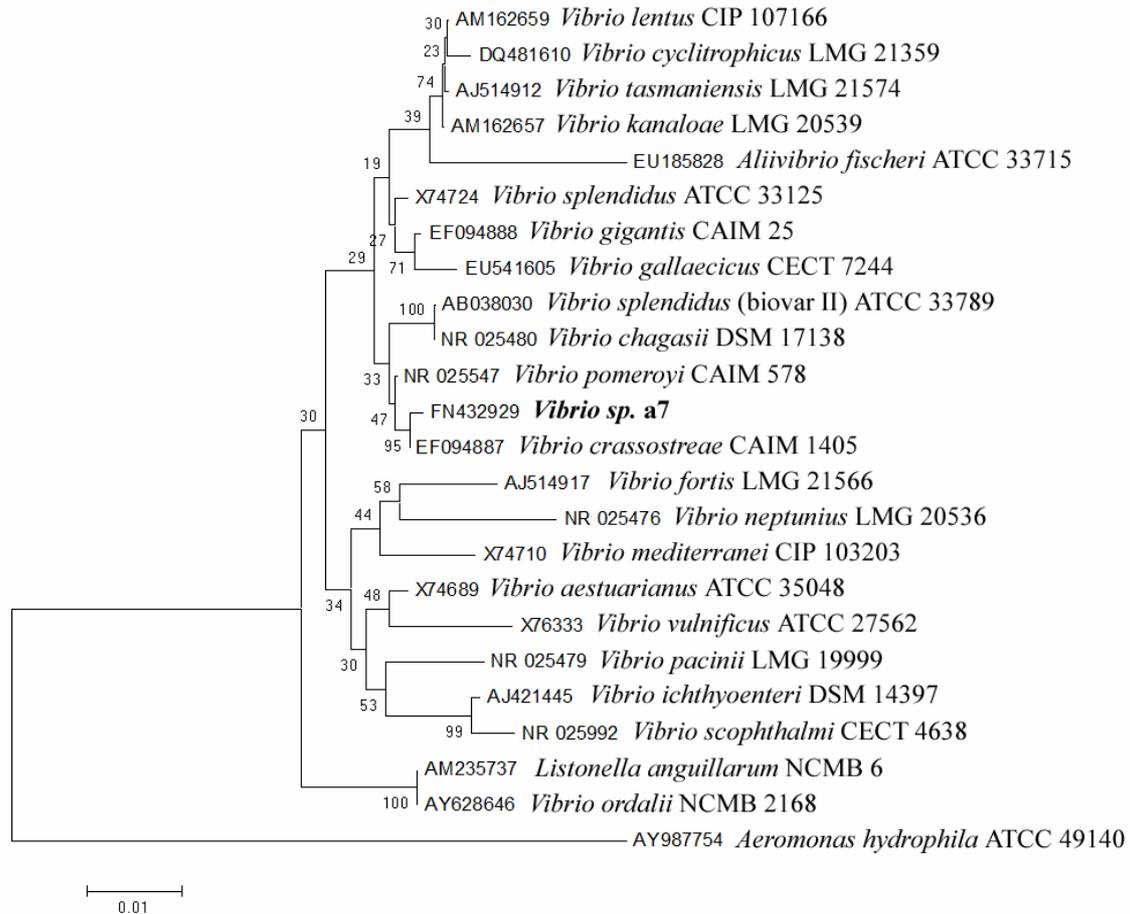


Figura 39. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa a7 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 49. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G7 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Buller (2004), Faury *et al.* (2004), Le Roux *et al.* (2005) y Nogueroles & Blanch (2008).

	ADH	ONPG	Citrato	Indol	VP	NO ₃	Ácido de:					Gelatinasa	Crecimiento en/a:		
							Manitol	Sorbitol	Rhamnosa	Sacarosa	Melobiosa		Arabinosa	6% NaCl	8% NaCl
Fenón G7	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>Vibrio crassostreae</i>	+	-	ND	+	ND	+	+	-	-	+	+	+	d	-	V-
<i>Vibrio gigantis</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	- (?)	+	+	d	-	-
<i>Vibrio pomeroiyi</i>	+	+	-	+	V	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Vibrio splendidus</i>	V	V	V	V	-	+	+	-	-	V	-	+	V	V	V
<i>Vibrio chagasii</i>	V	-	+	+	ND	+	+	ND	-	-	-	ND	+	+	-
<i>Vibrio gallaecicus</i>	-	ND	-	+	-	+	+	ND	+	V	ND	+	-	-	ND
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	+	-	ND	-	ND	-	+	-	ND	+	V	+	+	+	+
<i>Vibrio kanaloae</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
<i>Vibrio lentus</i>	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	-	-	ND	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Vibrio aestuarianus</i>	+	+	+	+	-	+	+	V	V	+	-	+	+	V	+
<i>Vibrio mediterranei</i>	V	V	-	+	-	+	+	+	V	+	V+	-	+	V	V+
<i>Listonella anguillarum</i>	+	+	+	V+	+	+	+	V+	-	+	-	V+	+	V	+
<i>Vibrio ordalii</i>	-	-	V	-	-	V-	V-	-	-	+	-	V	V+	-	V
<i>Vibrio ichthyenteri</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Vibrio pacinii</i>	+	-	+	-	V+	+	-	-	-	+	-	V	+	d	+

- Fenón G29 (*Vibrio* sp.)

La caracterización de los aislados de este fenón no permitió asignarlos a ninguna de las especies de *Vibrio* actualmente descritas, siendo posible que constituyan una especie nueva dentro de este género.

Las colonias son de color grisáceo y producen un pigmento marrón-violáceo que difunde por el medio al cabo de unos días de crecimiento, pero no presentan *swarming* ni se adhieren al agar. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 50. Las cepas presentan perfiles similares, observándose diferencias únicamente en los test de producción de ácido a partir de arabinosa y lactosa. De acuerdo a las claves propuestas por Noguerola & Blanch (2008), todas las cepas son identificadas como *Vibrio nereis*, sin embargo esta especie muestra discrepancias con los aislados de este fenón en los test catalasa, ONPG, hidrólisis de esculina y tween 80, utilización de citrato, producción de hemolisinas, y de ácido a partir de melobiosa. El sistema BIOLOG identificó la única cepa testada (a29) como *Listonella pelagia*, sin embargo, también esta especie puede diferenciarse de las cepas del fenón G29 a partir de distintas pruebas fenotípicas (Tabla 51).

Las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST se muestran en el anexo VI-4. Un total de 15 especies de los géneros *Vibrio*, *Listonella* y *Allomonas* (entre ellas *V. nereis* y *L. pelagia*) mostraron valores de similitud del 97%, pero

Tabla 50. Características fenotípicas de los aislados del fenón G29.

Test	Cepas				Test	Cepas			
	a14	a28	a29	a51		a14	a28	a29	a51
OF	F	F	F	F	Ácido de:				
ADH	+	+	+	+	Sacarosa	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	Melobiosa	+	+	+	+
ODC	-	-	-	-	Amigdalina	+	+	+	+
TCBS	a	a	a	a	Arabinosa	+	-	+	-
ONPG	+	+	+	+	Lactosa	+	-	+	+
Citrato	-	-	-	-	Manosa	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	Salicina	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	Crecimiento a:				
VP	-	-	-	-	4°C	-	-	-	-
Rojo metilo	+	+	+	+	30°C	+	+	+	+
Gas glucosa	-	-	-	-	35°C	+	+	+	+
NO ₃	+	+	+	+	40°C	+	+	+	+
Amilasa	+	+	+	+	44°C	-	-	-	-
Lipasa	+	+	+	+	Crecimiento en:				
Gelatinasa	+	+	+	+	0% NaCl	-	-	-	-
Esculinasa	+	+	+	+	3% NaCl	+	+	+	+
Caseinasa	-	-	-	-	6% NaCl	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	8% NaCl	-	-	-	-
Hemólisis	-	-	-	-	10% NaCl	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	12% NaCl	-	-	-	-
Ácido de:					Requerimiento agua de mar	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	+	Luminiscencia	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	O129 (10 µg)	S	S	S	S
Inositol	-	-	-	-	O129 (150 µg)	S	S	S	S
Sorbitol	-	-	-	-	Novobiocina	S	S	S	S
Rhamnosa	-	-	-	-	Ampicilina	S	S	S	S

ninguna mostró valores iguales o superiores a los propuestos por Stackebrandt & Ebers (2006) para ser considerados miembros de una misma especie, por lo que estos aislados podrían constituir una especie nueva dentro del género *Vibrio*. El árbol filogenético construido con estas secuencias agrupó las cepas del fenón G29 entre sí pero las separó claramente de las demás especies (Figura 40).

Por otro lado la secuencia parcial del gen ARNr 23S obtenida del aislado a29 mostró valores de similitud muy bajos con cepas de algunas de las especies más próximas, como *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 (90,9%), *V. campbellii* CECT 523 (90,3%), *V. harveyi* ATCC BAA-1116 (90,0%), *L. pelagia* CECT 4202 (89,0%) y *V. agarivorans* CECT 5085 (87,7%), lo que permite descartarlas. Para otras especies relacionadas no hay secuencias publicadas.

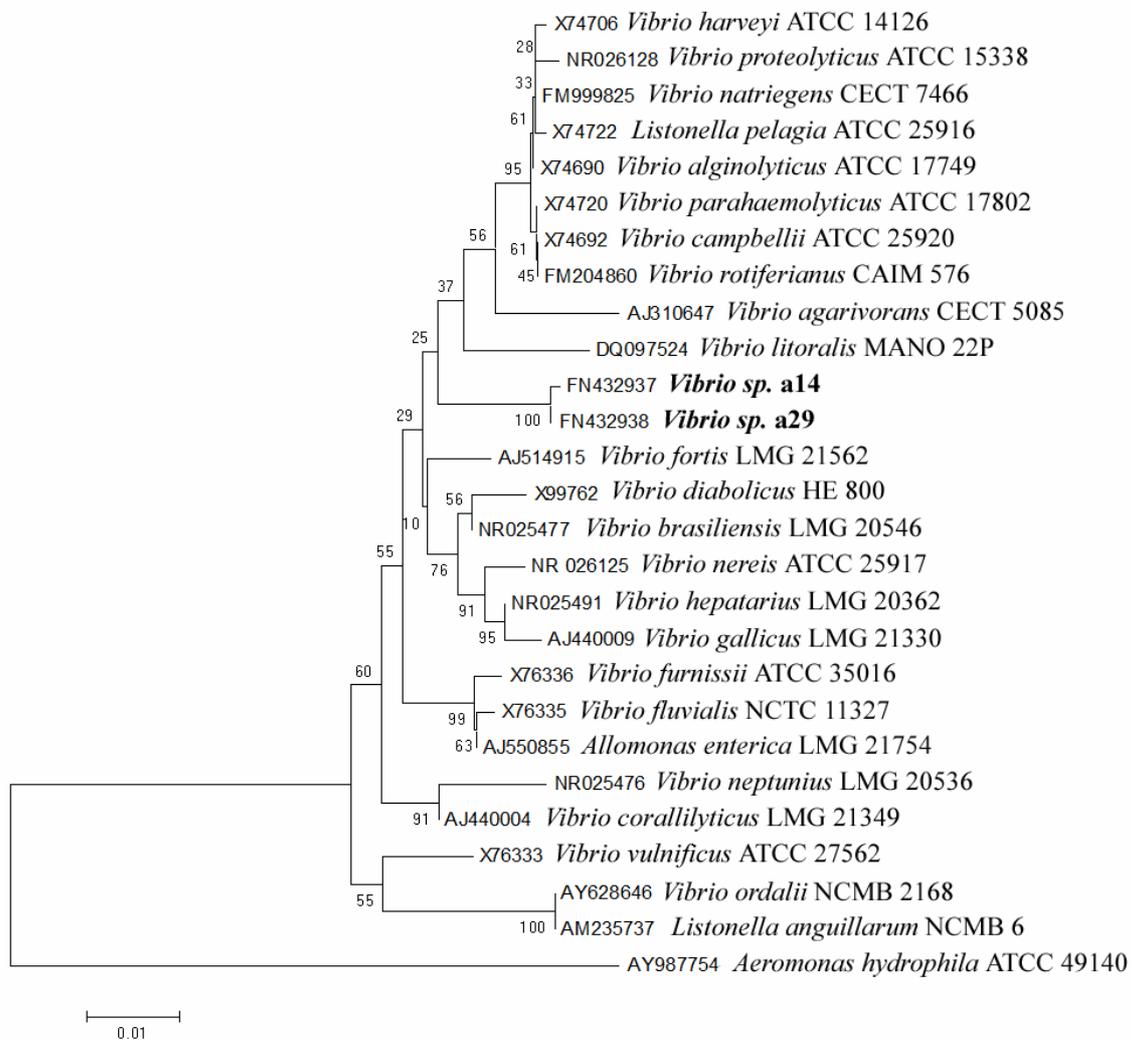


Figura 40. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de cepas del fenón G29 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 51. Características fenotípicas diferenciales entre el fenón G29 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de West *et al.* (1983), Raguenees *et al.* (1997), Ben-Haim *et al.* (2003), Gomez-Gil *et al.* (2003), Buller (2004) y Noguerola & Blanch (2008).

	ADH	LDC	ODC	ONPG	VP	Indol	Citrato	Esculina	β-hemolisis	Ácido de:			Crecimiento a/en:				O129 (10 µg)
										Manitol	Sacarosa	Melobiosa	4°C	40°C	0% NaCl	8% NaCl	
Fenón G29	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	S
<i>Vibrio fortis</i>	-	-	-	+	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	+	+	-	-	+	R
<i>Vibrio agarivorans</i>	-	-	-	+	ND	-	-	d	-	+	-	+	-	-	-	-	S
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	+	-	-	V+	V+	-	+	+	-	-	-	+	d	d	R
<i>Vibrio hepatarius</i>	ND	-	-	-	ND	+	ND	ND	ND	+	-	-	+	-	+	+	ND
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	+	V+	-	V+	+	V+	V-	+	+	V+	-	d	+	-	+	R
<i>Vibrio natriegens</i>	-	-	-	V	-	-	+	+	-	+	+	V	d	V	-	d	R
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	+	+	d	-	+	-	ND	ND	d	+	+	-	+	-	-	S
<i>Vibrio campbellii</i>	-	V	-	-	-	+	V	V	-	V	-	-	-	-	-	V	V
<i>Vibrio furnissii</i>	+	-	-	V	V-	-	+	-	V	+	+	-	-	V	V	+	R
<i>Vibrio fluvialis</i>	+	-	-	+	-	V+	+	V	V	+	+	-	-	V	V	V+	R
<i>Vibrio diabolicus</i>	-	+	+	-	d	+	d	-	ND	+	+	-	-	+	-	ND	S
<i>Vibrio gallicus</i>	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	+	-	-	-	-	-	ND	ND
<i>Vibrio littoralis</i>	-	ND	ND	-	ND	-	+	-	ND	+	-	ND	+	+	-	+	S
<i>Listonella pelagia</i>	-	-	-	+	-	V	V	V	ND	+	V	-	V	-	-	V	V
<i>Allomonas enterica</i>	V+	-	V+	ND	-	+	+	ND	+	+	+	ND	-	-	-	-	ND
<i>Vibrio harveyi</i>	-	+	+	V	-	+	V	V	V	+	V	-	-	V	-	V+	V
<i>Vibrio nereis</i>	+	-	-	-	-	V+	+	-	+	-	+	-	V-	V	-	d	V
<i>Vibrio proteolyticus</i>	+	+	-	-	V+	+	+	-	+	+	V	-	-	+	-	+	R
<i>Vibrio ordalii</i>	-	-	-	-	-	-	V	V	+	V-	+	-	V	-	-	-	S
<i>Listonella anguillarum</i>	+	-	-	+	+	V+	+	V-	ND	+	+	-	V	-	V	-	V
<i>Vibrio corallilyticus</i>	V	ND	+	+	-	+	V+	ND	ND	V+	+	-	ND	ND	-	-	S

- Fenón G35 (*Vibrio* sp.)

La caracterización de las cepas de este fenón las situó dentro del grupo de especies próximas a *V. harveyi*, pero no permitió una identificación a nivel de especie.

Las colonias son de color grisáceo y no presentan *swarming*, pigmentos difusibles ni adherencia al agar. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 52. Las cepas no son fenotípicamente homogéneas, por lo que se establecieron dos tipos de perfiles dentro del fenón. El tipo T6 incluye las cepas a6 y a85, es positivo para las pruebas ONPG, producción de ácido a partir de manitol y sacarosa, y es negativo para la producción de ácido a partir de salicina. El tipo T35 incluye las demás cepas y presenta resultados opuestos para los test mencionados.

De acuerdo a las claves propuestas por Nogueroles & Blanch (2008), las cepas pertenecientes al tipo T35 fueron identificadas como *V. rotiferianus*, mientras que las del tipo T6 lo fueron como *V. harveyi* o *V. corallilyticus*. Las principales discrepancias entre las cepas del tipo T35 y *V. rotiferianus* fueron la producción de ácido a partir de sacarosa, melibiosa y arabinosa, la sensibilidad al quimioterápico O129, y la incapacidad (según Nogueroles & Blanch 2008) de esta especie para crecer a 20°C. Por lo que respecta a las cepas del tipo T6, las principales diferencias con *V. corallilyticus* se dieron con los test ureasa, producción de ácido a partir de manitol, sacarosa, amigdalina e inositol, y la sensibilidad al agente vibriostático O129.

La especie con el perfil fenotípico más próximo, tanto para las cepas del tipo T6 como del T35, fue *V. harveyi*. Sin embargo, cuando se utilizaron los cebadores específicos para esta especie diseñados por Pang *et al.* (2006), ninguna de las cepas del fenón produjo el fragmento de amplificación esperado (datos no mostrados).

El sistema BIOLOG se utilizó únicamente con las cepas a6 y a35, no obteniéndose una identificación aceptable para ninguna de ellas. Los perfiles de estas dos cepas fueron distintos de los publicados para *V. corallilyticus* y *V. rotiferianus* por Ben-Haim *et al.* (2003) y Gómez-Gil *et al.* (2003) y totalmente distintos entre sí, lo que parece indicar que se trata de dos especies diferentes.

El análisis filogenético basado en el gen ARNr 16S situó las cepas dentro del grupo de especies próximas a *V. harveyi*, pero no reflejó heterogeneidad dentro del fenón, probablemente debido a la poca longitud de las secuencias (700 pb aproximadamente). Las especies más cercanas de acuerdo al programa BLAST se muestran en el anexo VI-5. Los mayores valores de similitud, superiores a los propuestos por Stackebrand & Ebers (2006), se dieron con *V. natriegens*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus*, *L. pelagia*, *V. campbellii*, *V. harveyi* y *V. proteolyticus* (99,5-100% similitud), mostrando otras especies próximas valores por debajo del 98,7%.

Tabla 52. Características fenotípicas de los aislados del fenón G35.

Test	Cepas							
	a6	a33	a35	a85	a92	a100	a101	a311
OF	F	F	F	F	F	F	F	F
ADH	-	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+*	+	+	+	+*	+*	+*	+*
TCBS	a	v	v	a	v	v	v	a
ONPG	+	-	-	+	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-
Indol	+*	+*	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-
Rojo metilo	+	+	+	+	+	+	+	+
Gas glucosa	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃	+	+	+	+	+	+	+	+
Amilasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculinasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseinasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*
Hemólisis	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+
Ácido de:								
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	-	+	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	-	-	+	-	-	-	+
Melobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Manosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicina	-	+	+	-	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a:								
4°C	-	-	-	-	-	-	-	-
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+
44°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en:								
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
12% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
Requerimiento agua de mar	-	-	-	-	-	-	-	-
Luminiscencia	-	-	-	-	-	-	-	-
O129 (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R
O129 (150 µg)	S	S	S	S	S	S	S	S
Novobiocina	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R

* El sistema API 20E mostró el resultado opuesto.

El árbol filogenético construido con estas secuencias mostró las cepas del fenón relacionadas con este grupo de especies, pero no las agrupó con ninguna especie en concreto, al menos con valores de *bootstrap* significativos (Figura 41). Por otra parte todas estas especies cercanas muestran características fenotípicas que permiten distinguirlas del fenón G35 (Tabla 53). Una caracterización en mayor profundidad será necesaria para determinar la posición taxonómica de estos aislados.

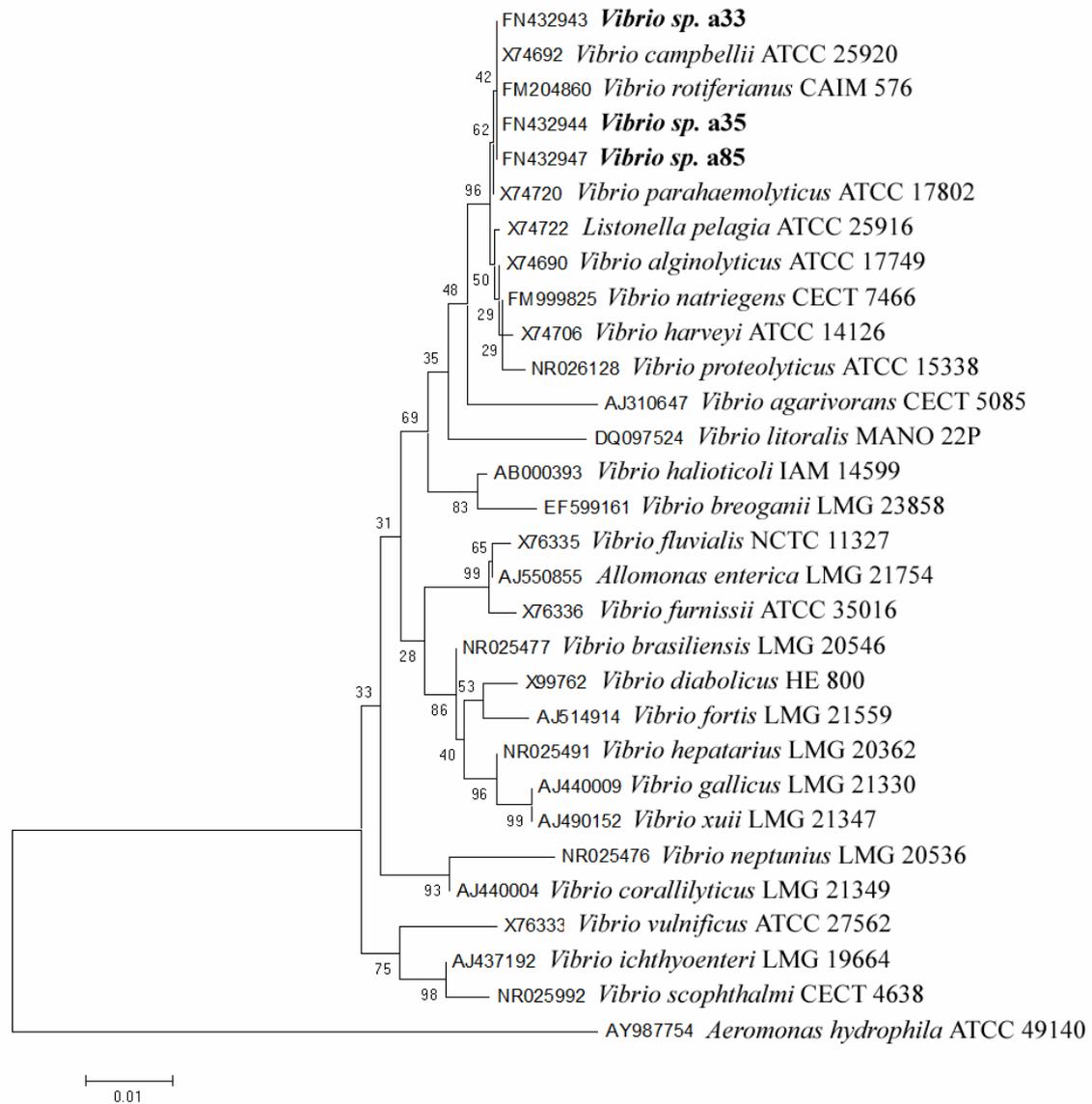


Figura 41. Árbol filogenético basado en secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G35 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 53. Características fenotípicas diferenciales entre los dos tipos de perfiles del fenón G35 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Ragueneis *et al.* (1997), Ben-Haim *et al.* (2003), Gomez-Gil *et al.* (2003), Buller (2004) y Noguerola & Blanch (2008).

	ADH	LDC	ODC	ONPG	VP	Indol	Citrato	Esculina	Ureasa	Ácido de:				Sw	Crecimiento a/en:		O129 (10 µg)
										Sacarosa	Melobiosa	Arabinosa	Salicina		40°C	10% NaCl	
Fenón G35-T6	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	R	
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	+	+	d	-	+	-	ND	V+	+	+	+	ND	-	+	S	
<i>Vibrio natriegens</i>	-	-	-	V	-	-	+	+	V	+	V	+	+	-	V	R	
<i>Vibrio campbellii</i>	-	V	-	-	-	+	V	V	-	-	-	-	V	-	-	V	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	+	-	-	V+	V+	-	V	-	-	V+	d	V	+	R	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	+	V+	-	V+	+	V+	V-	V-	V+	-	-	V	V+	+	R	
<i>Listonella pelagia</i>	-	-	-	+	-	V	V	V	V	V	-	-	-	-	-	V	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	+	+	-	-	V+	+	+	-	V	V	-	-	-	+	+	R	
<i>Vibrio harveyi</i>	-	+	+	V	-	+	V	V	V	V	-	-	V+	V-	V	V	
<i>Vibrio diabolicus</i>	-	+	+	d	d	+	d	-	-	+	-	-	-	+	+	ND	
<i>Vibrio agarivorans</i>	-	-	-	+	ND	-	-	d	-	-	+	-	-	ND	-	S	
<i>Vibrio haliotocoli</i>	-	-	-	+	-	+	-	V	V	-	-	-	V	-	-	V	
<i>Vibrio fortis</i>	-	-	-	+	ND	+	ND	ND	-	ND	+	ND	ND	ND	-	R	
<i>Vibrio hepatarius</i>	ND	-	-	-	ND	+	ND	ND	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	
<i>Vibrio corallilyticus</i>	V	ND	+	+	-	+	V+	ND	-	+	-	ND	ND	ND	-	S	

	ADH	LDC	ODC	VP	Indol	Citrato	Esculina	Ureasa	Ácido de:					Sw	Crecimiento a/en:		O129 (10 µg)
									Manitol	Sacarosa	Melobiosa	Arabinosa	Salicina		40°C	10% NaCl	
Fenón G35-T35	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	R	
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	+	+	-	+	-	ND	V+	d	+	+	+	ND	-	+	S	
<i>Vibrio natriegens</i>	-	-	-	-	-	+	+	V	+	+	V	+	+	-	V	R	
<i>Vibrio campbellii</i>	-	V	-	-	+	V	V	-	V	-	-	-	V	-	-	V	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	+	-	V+	V+	-	V	+	-	-	V+	d	V	+	R	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	+	V+	V+	+	V+	V-	V-	+	V+	-	-	V	V+	+	R	
<i>Listonella pelagia</i>	-	-	-	-	V	V	V	V	+	V	-	-	-	-	-	V	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	+	+	-	V+	+	+	-	V	+	V	-	-	-	+	+	R	
<i>Vibrio harveyi</i>	-	+	+	-	+	V	V	V	+	V	-	-	V+	V-	V	V	
<i>Vibrio diabolicus</i>	-	+	+	d	+	d	-	-	+	+	-	-	-	+	+	ND	
<i>Vibrio agarivorans</i>	-	-	-	ND	-	-	d	-	+	-	+	-	-	ND	-	S	
<i>Vibrio haliotocoli</i>	-	-	-	-	+	-	V	V	+	-	-	-	V	-	-	V	
<i>Vibrio fortis</i>	-	-	-	ND	+	ND	ND	-	+	ND	+	ND	ND	ND	-	R	
<i>Vibrio hepatarius</i>	ND	-	-	ND	+	ND	ND	-	+	-	-	-	ND	ND	-	ND	
<i>Vibrio corallilyticus</i>	V	ND	+	ND	+	V+	ND	-	V+	+	-	ND	ND	ND	-	S	

- Fenón G91 (*Vibrio harveyi*)

La caracterización fenotípica y genotípica de los aislados de este fenón permitió su identificación como *Vibrio harveyi*.

Las colonias son de color marrón claro-crema (Figura 42), no producen pigmentos difusibles ni se adhieren al agar, pero presentan *swarming*. Al cabo de unos días de crecimiento presentan un aspecto “arrugado”. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 54. Los perfiles obtenidos a partir de test convencionales y del sistema miniaturizado API 20E (Figura 43) fueron muy similares entre las distintas cepas, pero una serie de test, principalmente ONPG, citrato, ureasa y producción de ácido a partir de sacarosa y arabinosa, mostraron resultados variables. Por otra parte, las galerías API 20E dieron numerosos falsos negativos para los test ODC, citrato, indol y ureasa.

De acuerdo a las claves propuestas por Noguerola & Blanch (2008), la totalidad de las cepas fueron identificadas como *V. harveyi*, a excepción de la a87, identificada como *V. alginolyticus*. Los perfiles fenotípicos de los aislados concuerdan con los descritos para *V. harveyi*, *V. carchariae* y *V. trachuri* por Alsina & Blanch (1994), Zorrilla *et al.* (2003), Buller (2004), Noguerola & Blanch (2008) y Rico *et al.* (2008). Aunque todas las cepas comparten algunas características infrecuentes en *V. harveyi* como la producción de ácido a partir de sorbitol o la presencia de *swarming*, estas se dan en las descripciones de algunas cepas y fenotipos de la especie.

El sistema BIOLOG se utilizó con todas las cepas excepto la a456, obteniéndose una variedad de perfiles (Anexo IV). En la mayor parte de los casos, el sistema no pudo dar identificaciones aceptables, al menos a nivel de especie. El aislado a106 fue identificado como *V. carchariae* (*V. harveyi*), mientras que los a30, a102 y a417 fueron identificados como *V.*

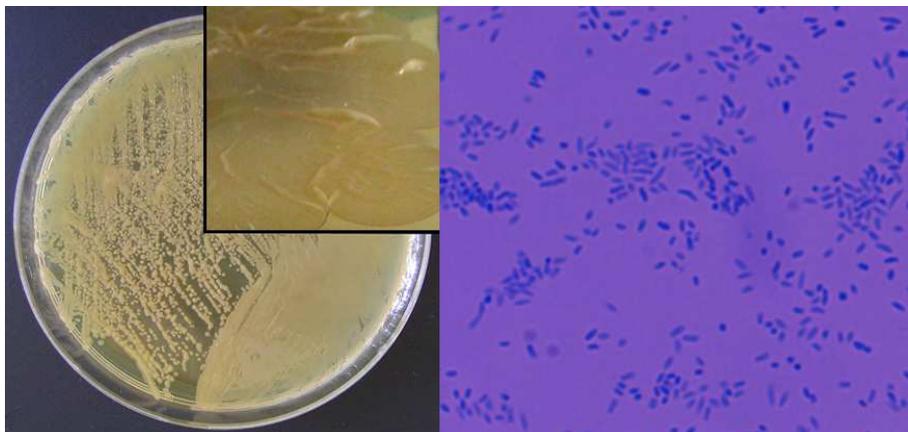


Figura 42. Morfología de la colonia y de las células de la cepa a91. La morfología celular se observó al microscopio óptico (1000x) con tinción azul de metileno.



Figura 43. Resultados de los sistemas miniaturizados API 20E, API 20NE y API ZYM con el aislado a91. Los perfiles obtenidos con la galería API 20NE para las cepas a82, a91 y a417 fueron idénticos y similares a los descritos para *V. harveyi*, *V. alginolyticus* y *V. diabolicus* por Buller (2004), excepto para el test esculina en el caso de *V. alginolyticus* y para los test esculina y asimilación de manitol y ácido cáprico en el caso de *V. diabolicus*. El perfil API ZYM de la cepa a91 fue similar al descrito para *V. harveyi* por Buller (2004), salvo para los test lipasa C14 y tripsina.

alginolyticus. Las demás cepas no fueron asignadas a ninguna especie, considerándolas el programa posibles *V. alginolyticus*, o con menor probabilidad *V. carchariae*. Las cepas de referencia *V. harveyi* CECT 525 y CECT 5156, *V. alginolyticus* CECT 436 y CECT 521, y *V. parahaemolyticus* CECT 511 fueron incluidas como controles positivos. Todas ellas fueron correctamente identificadas, con la excepción de *V. harveyi* CECT 5156, que fue identificada como *V. alginolyticus*.

Las especies más cercanas, de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST, se muestran en el anexo VI-8. Se registraron valores de similitud superiores a los propuestos por Stackebrand & Ebers (2006) con las especies *V. campbellii*, *V. rotiferianus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* y *L. pelagia*, pero los valores más altos se obtuvieron con cepas de *V. harveyi* (99,5-99,9%). El árbol filogenético construido a partir de los resultados obtenidos con la cepa a91 muestra a esta formando parte del clado de *V. harveyi* (Figura 44). Las secuencias de los demás aislados, obtenidas con los cebadores descritos por Labella *et al.* (2006), son más cortas y no fueron incluidas en el árbol filogenético.

El análisis filogenético basado en el gen ARNr 23S confirmó los resultados del ADNr 16S pero mostró una mayor capacidad de discriminación que este. Las especies más próximas (anexo VI-9) fueron *V. harveyi* y *V. campbellii* (99% identidad), seguidos de lejos por *V. alginolyticus*, *A. fischeri*, *V. mediterranei*, *V. parahaemolyticus* y *L. pelagia* (90-93% identidad). Para *V. rotiferianus* no hay secuencias publicadas. El árbol filogenético derivado de estas secuencias agrupó las cepas del fenón G91 con las de *V. harveyi* y *V. campbellii*, pero las separó claramente de otras especies relacionadas (Figura 45).

La identificación de los aislados como *V. harveyi* se confirmó mediante PCR con los cebadores específicos toxRF1-toxRR1, dirigidos contra el gen *toxR* (Pang *et al.* 2006). Como

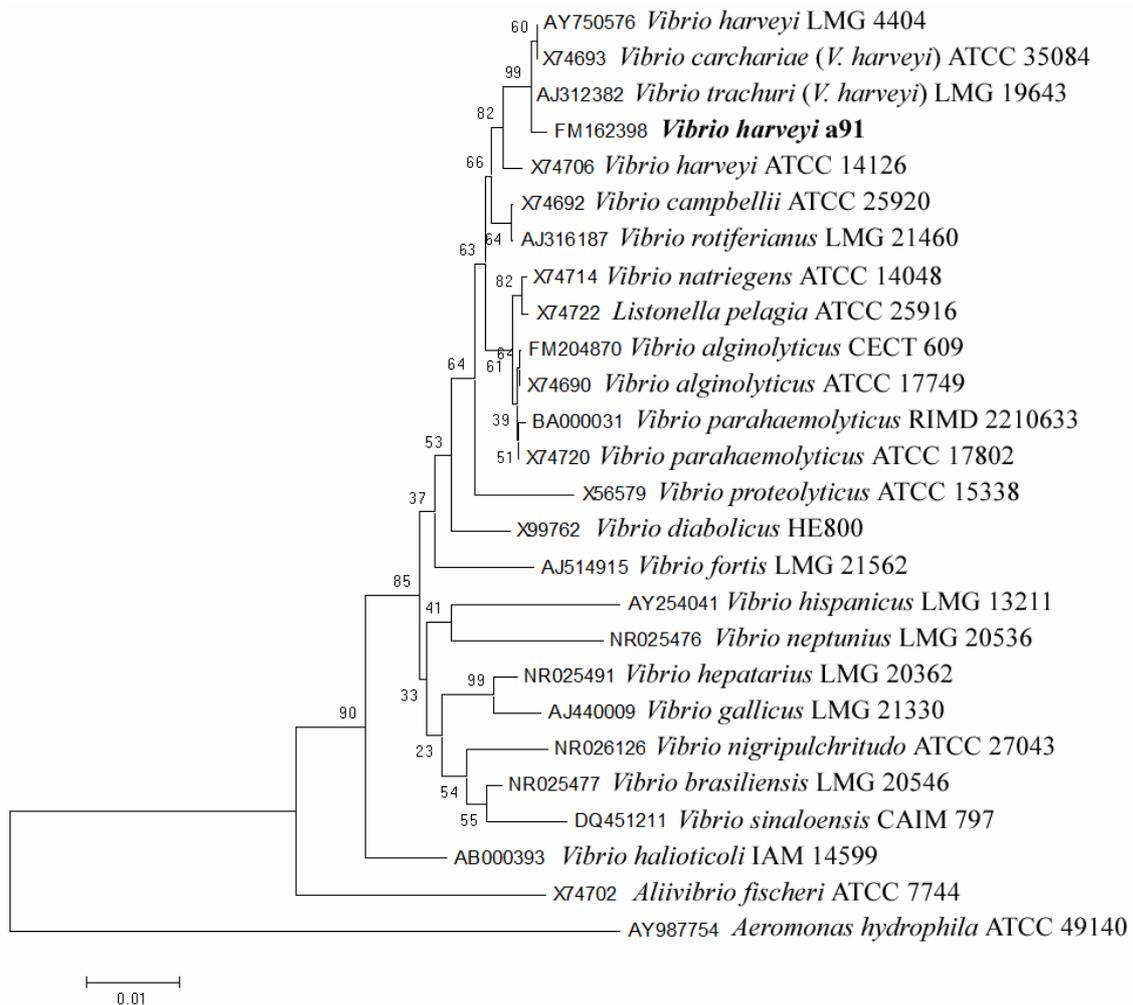


Figura 44. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa a91 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

controles positivos y negativos se incluyeron cepas de referencia de *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Todas las cepas del fenón G91 produjeron el producto de amplificación esperado, similar al de las cepas de referencia de *V. harveyi* (Figura 46). Ninguno de los controles negativos produjo amplificado alguno. Por otro lado, la diferenciación entre los aislados del fenón G91 y las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación de los genes ribosómicos puede hacerse a partir de varios test fenotípicos, que se resumen en la Tabla 55.

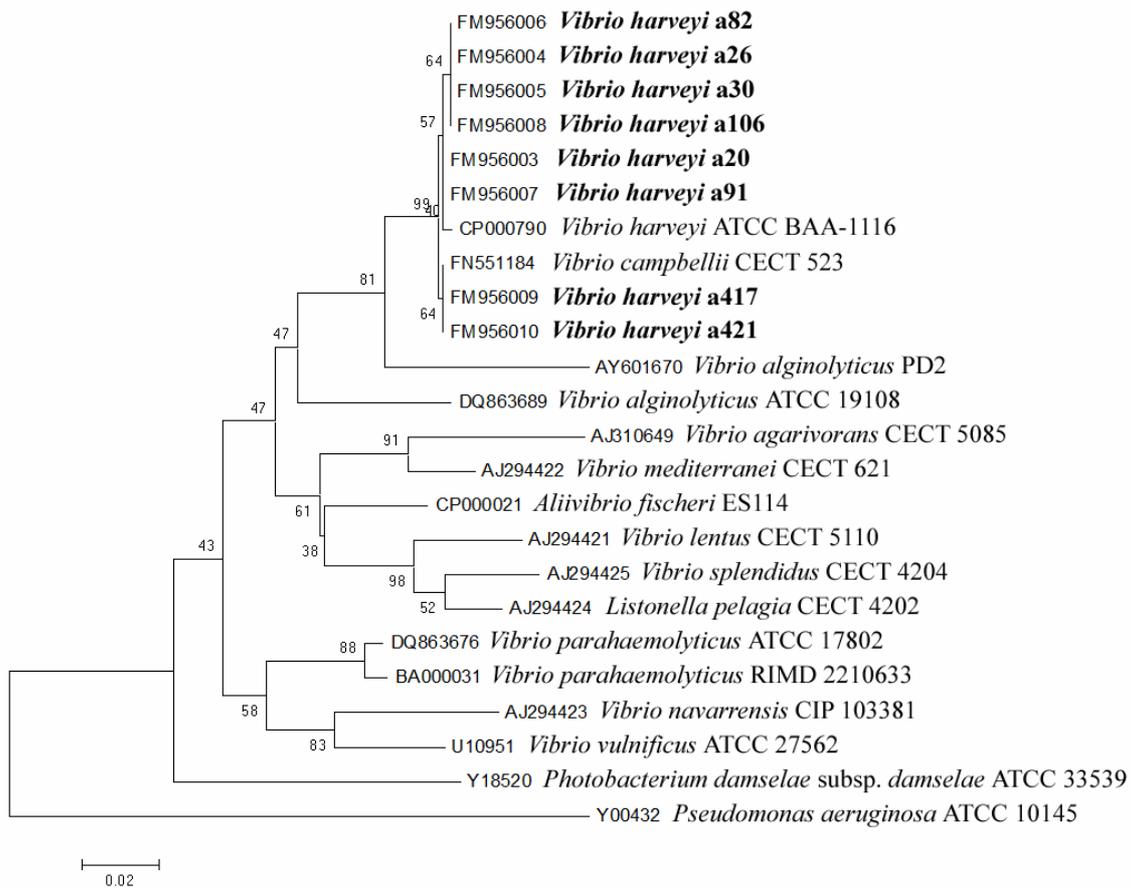


Figura 45. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 23S de cepas del fenón G91 y especies relacionadas. La secuencia de *Pseudomonas aeruginosa* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

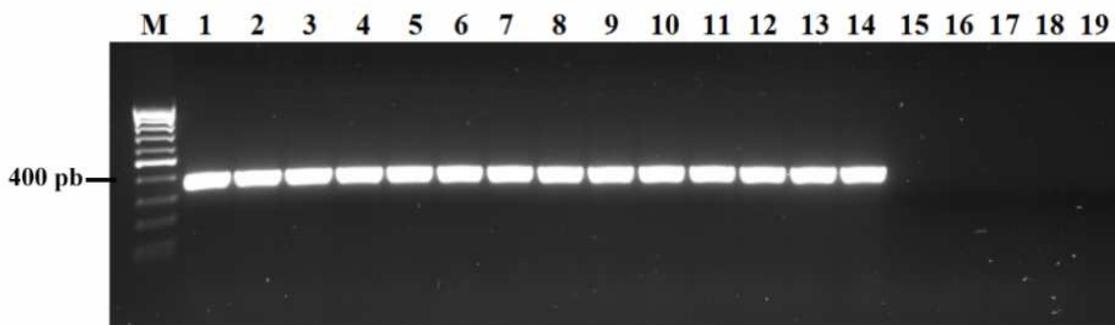


Figura 46. Amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos para *V. harveyi* toxRF1 y toxRR1, descritos por Pang *et al.* (2006), y cepas del fenón G91. M, marcador de peso molecular 100 pb; líneas 1 y 2, cepas de *V. harveyi* CECT 525^T y CECT 5156 respectivamente, utilizadas como controles positivos; líneas 3-14, cepas a9, a20, a26, a30, a82, a87, a91, a102, a106, a417, a421 y a456, respectivamente; líneas 15-18, *V. alginolyticus* CECT 521^T y CECT 436, *V. campbellii* CECT 523^T y *V. parahaemolyticus* CECT 511^T respectivamente, utilizados como controles negativos; línea 19, control negativo; el producto de amplificación esperado es de 382 pb.

Tabla 54. Continuación.

Test	Cepas																	<i>Vibrio harveyi</i>
	a8	a9	a10	a20	a26	a30	a82	a87	a91	a102	a106	a417	a421	a426	a428	a456	a459	
Crecimiento en:																		
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3-8% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Requerimiento agua de mar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Luminiscencia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O129 (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
O129 (150 µg)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Novobiocina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Tabla 55. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G91 y las especies más próximas según la secuenciación de los genes ARNr 16S y 23S. Datos extraídos de Raguene *et al.* (1997), Gomez-Gil *et al.* (2003), Zorrilla *et al.* (2003), Buller (2004), Noguerola & Blanch (2008) y Rico *et al.* (2008).

Test	Fenón G91	<i>Vibrio harveyi</i>	<i>Vibrio campbellii</i>	<i>Vibrio rotiferianus</i>	<i>Vibrio alginolyticus</i>	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Vibrio natriegens</i>	<i>Vibrio diabolicus</i>	<i>Listonella pelagica</i>
LDC	+	+	V	+	+	+	-	+	-
ODC	V+	V+	-	+	V+	+	-	+	-
Indol	+	+	+	+	+	+	-	+	V
VP	-	-	-	-	V+	-	-	d	-
Rojo metilo	+	+	V	ND	+	+	-	ND	ND
Esculinasa	+	V	V	ND	V-	-	+	-	V
B-hemolisis	-	V	-	ND	+	+	-	ND	ND
Ácido de:									
Sorbitol	+	V	-	-	-	-	V-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	+	ND	-
Melobiosa	-	-	-	+	-	-	V	-	-
Salicina	-	V	V	ND	V	d	+	-	-
Crecimiento en:									
8% NaCl	+	+	V	-	+	d	d	ND	V
10% NaCl	-	-	-	-	+	-	-	ND	-
Crecimiento a:									
20°C	+	+	+	-	+	+	+	+	+
40°C	+	V	-	+	+	+	d	+	-
44°C	-	ND	-	-	ND	-	ND	+	-
O129 (150 µg)	R	V	S	S	VS	S	S	S	V
Ampicilina	R	V	R	VR	R	R	S	ND	V

- Fenón G107 (*Vibrio* spp.)

La caracterización de los aislados de este fenón los situó dentro del grupo de especies próximas a *Vibrio splendidus*, pero no permitió su identificación a nivel de especie.

Las colonias son de color grisáceo o blanuzco, y no presentan *swarming* ni adherencia al agar. Dos de las cepas (a207 y a394) producen sin embargo un pigmento marrón que difunde por el medio. En la Tabla 56 se resumen las características fenotípicas de los aislados. Las cepas mostraron perfiles idénticos, registrándose resultados variables únicamente con el test ONPG. Las claves propuestas por Noguerola & Blanch (2008) identifican los aislados ONPG positivos (a58 y a207) como *V. pomeroyi* o *Vibrio splendidus*, mientras que los ONPG negativos (a105, a107 y a394) son identificados como *V. kanaloae*.

El sistema BIOLOG se utilizó únicamente con la cepa a107. El sistema no pudo proporcionar una identificación aceptable, aunque dio como especies probables a *Listonella pelagia* y a *V. splendidus*. Este resultado probablemente se explica por el hecho de que especies próximas a *V. splendidus* como *V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. cyclitrophicus*, *V. tasmaniensis* o *V. pomeroyi* no se incluyen en la base de datos de BIOLOG.

Las especies más cercanas a la cepa tipo del fenón, de acuerdo la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST, se muestran en el anexo VI-10. Los mayores porcentajes de similitud se registraron con *V. lentus*, *V. kanaloae* y *V. tasmaniensis* (99,8-99,9%), no obstante

Tabla 56. Características fenotípicas de los aislados del fenón G107.

Test	Cepas					Test	Cepas				
	a58	a105	a107	a207	a394		a58	a105	a107	a207	a394
OF	F	F	F	F	F	Acido de:					
ADH	+	+	+	+	+	Sacarosa	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	Melobiosa	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	Amigdalina	+	+	+	+	+
TCBS	a	a	a	a	a	Arabinosa	-	-	-	-	-
ONPG	+	-	-	+	-	Lactosa	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	Manosa	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	Salicina	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	+	Crecimiento a:					
VP	-	-	-	-	-	4°C	+	+	+	+	+
Rojo metilo	+	+	+	+	+	35°C	-	-	-	-	-
Gas glucosa	-	-	-	-	-	40°C	-	-	-	-	-
NO ₃	+	+	+	+	+	44°C	-	-	-	-	-
Amilasa	+	+	+	+	+	Crecimiento en:					
Lipasa	+	+	+	+	+	0% NaCl	-	-	-	-	-
Gelatinasa	+	+	+	+	+	3% NaCl	+	+	+	+	+
Esculinasa	+	+	+	+	+	6% NaCl	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	8% NaCl	-	-	-	-	-
Hemólisis	α	α	α	α	α	10% NaCl	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	12% NaCl	-	-	-	-	-
Ácido de:						Requerimiento					
Glucosa	+	+	+	+	+	agua de mar	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	Luminiscencia					
Inositol	-	-	-	-	-	O129 (10 µg)	S	S	S	S	R
Sorbitol	-	-	-	-	-	O129 (150 µg)	S	S	S	S	S
Rhamnosa	-	-	-	-	-	Novobiocina	S	S	S	S	S
						Ampicilina	S	S	S	S	S

* El sistema API 20E mostró el resultado opuesto

otras especies como *V. cyclitrophicus*, *V. gallaecicus*, *V. gigantis* y *V. pomeroyi* obtuvieron también valores superiores a los propuestos por Stackebrand & Ebers (2006). *V. splendidus* mostró valores de solo el 98,4-98,5%. El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias agrupó la cepa a107 con *Vibrio lentus*, *Vibrio kanaloae*, *Vibrio cyclitrophicus* y *Vibrio tasmaniensis*, separándolas claramente de las demás (Figura 47).

Las características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón y las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S se resumen en la Tabla 57. Los resultados obtenidos en el ensayo de PCR con los cebadores VSPN-F y VSPN-R, específicos para *V. splendidus* (Lee *et al.* 2002), variaron según la cepa (datos no mostrados). Únicamente

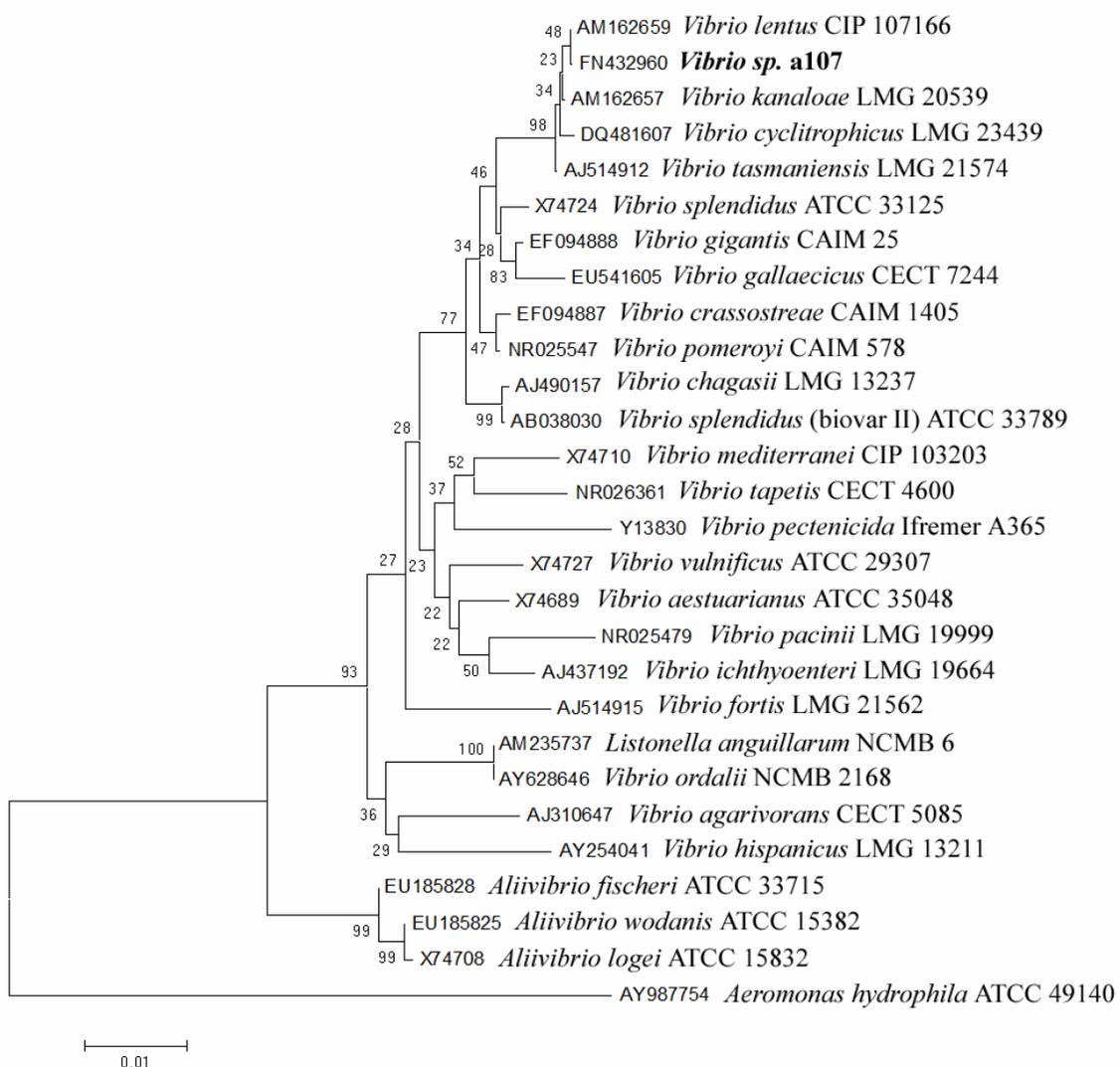


Figura 47. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa a107 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 57. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G107 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Faury *et al.* (2004), Buller (2004), Le Roux *et al.* (2005) y Nogueroles & Blanch (2008).

	ADH	LDC	Citrato	Indol	VP	NO ₃	Ácido de:					Gelatinasa	Crecimiento en/a:			
							Manitol	Sorbitol	Rhamnosa	Sacarosa	Melobiosa		Arabinosa	6% NaCl	8% NaCl	35°C
Fenón G107	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Vibrio lentus</i>	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-
<i>Vibrio kanaloae</i>	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	+	-	ND	-	ND	-	+	-	ND	+	V	+	+	+	+	+
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	-	-	ND	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
<i>Vibrio gigantis</i>	+	-	-	+	-	+	+	-	-	- (?)	+	+	d	-	-	-
<i>Vibrio gallaecicus</i>	-	-	-	+	-	+	+	ND	+	V	ND	ND	+	-	-	ND
<i>Vibrio crassostreae</i>	+	-	ND	+	ND	+	+	-	-	+	+	+	d	-	-	V-
<i>Vibrio splendidus</i>	V	-	V	V	-	+	+	-	-	V	-	+	V	V	V	V
<i>Vibrio pomeroyi</i>	+	-	-	+	V	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Vibrio chagasii</i>	V	-	+	+	ND	+	+	ND	-	-	-	ND	+	+	+	-
<i>Vibrio tapetis</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Aliivibrio fischeri</i>	-	+	V	-	-	+	V-	-	-	V	-	-	+	-	-	V
<i>Vibrio aestuarianus</i>	+	V	+	+	-	+	+	V	V	+	-	+	+	V	+	+
<i>Aliivibrio wodanis</i>	-	-	ND	V+	-	ND	V	-	-	+	-	+	V	-	-	-
<i>Aliivibrio logei</i>	-	+	-	-	-	+	V+	-	-	V-	-	-	-	-	-	-
<i>Listonella anguillarum</i>	+	-	+	V+	+	+	+	V+	-	+	-	V+	+	V	-	+
<i>Vibrio ordalii</i>	-	-	V	-	-	V-	V-	-	-	+	-	V	V+	-	-	V
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	+	+	V	-	+	V	-	V-	V-	-	+	V+	-	-	+
<i>Vibrio mediterranei</i>	V	V	-	+	-	+	+	+	V	+	V+	-	+	V	V+	+
<i>Vibrio pectenicida</i>	-	-	V	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	V-

el aislado a207 parece dar las dos bandas específicas de esta especie. Las cepas restantes presentan una única banda, pero de diferentes tamaños, siendo, por ejemplo, la de la cepa a107 distinta a la de los aislados a58 y a394. La cepa a207 podría por tanto tratarse de *V. splendidus*, mientras que basándose en la secuenciación del ADNr 16S y en la caracterización fenotípica la cepa a107 probablemente se trata de *V. lentus* o *V. kanaloae*, resultados no muy alejados de los propuestos mediante las claves de Noguera & Blanch (2008). Los demás aislados podrían corresponder a estas u otras especies relacionadas.

En resumen, los aislados del fenón G107 podrían pertenecer a distintas especies dentro del grupo de *V. splendidus*, siendo necesaria la realización de un mayor número de pruebas para obtener su identificación a nivel de especie.

– Fenón G148 (*Vibrio* sp.)

La caracterización de las cepas de este fenón indica que se trata de bacterias del grupo de especies próximas a *V. harveyi*, fenotípicamente similares a *Vibrio alginolyticus*.

Las colonias son de color blanquecino, cremosas. No producen pigmentos difusibles ni se adhieren al agar pero todas ellas presentan *swarming*, extendiéndose por las placas de cultivo con rapidez. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 58. Las cepas

Tabla 58. Características fenotípicas de los aislados del fenón G148.

Test	Cepas					Test	Cepas				
	a134	a142	a143	a148	a149		a134	a142	a143	a148	a149
OF	F	F	F	F	F	Acido de:					
ADH	-	-	-	-	-	Melobiosa	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	Amigdalina	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+	Arabinosa	+	+	+	+	+
TCBS	a	a	a	a	a	Lactosa	-	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	-	Manosa	+	+	+	+	+
Citrato	+	+	-	+	+	Salicina	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	Celobiosa	+	+	+	+	+
Indol	+	+	+	+	+	Crecimiento a:					
VP	+	+	-	-	+	4°C	-	-	-	-	-
Rojo metilo	+	+	+	+	+	30°C	+	+	+	+	+
Gas glucosa	-	-	-	-	-	35°C	+	+	+	+	+
NO ₃	+	+	+	+	+	40°C	+	+	+	+	+
Amilasa	+	+	+	+	+	44°C	+	+	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	+	Crecimiento en:					
Gelatinasa	+	+	+	+	+	0% NaCl	-	-	-	-	-
Esculinasa	+	+	+	+	+	3% NaCl	+	+	+	+	+
Caseinasa	+	+	+	+	+	6% NaCl	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	8% NaCl	+	+	+	+	+
Hemólisis	α	α	α	α	α	10% NaCl	+	+	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	12% NaCl	-	-	-	-	-
Ácido de:						Requerimiento					
Glucosa	+	+	+	+	+	agua de mar	-	-	-	-	-
Manitol	+	+	+	+	+	Luminiscencia	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	O129 (10 µg)	R	R	R	R	R
Sorbitol	-	-	-	-	-	O129 (150 µg)	R	R	S	R	R
Rhamnosa	-	-	-	-	-	Novobiocina	S	S	S	S	S
Sacarosa	+	+	+	+	+	Ampicilina	R	R	R	R	R

* El sistema API 20E mostró el resultado opuesto.

mostraron perfiles fenotípicos muy similares, observándose diferencias únicamente en los test de utilización de citrato, Voges-Proskauer y en la sensibilidad al agente vibriostático O129.

De acuerdo a las claves propuestas por Noguerola & Blanch (2008), las cepas a134, a142 y a149 fueron identificadas como *V. alginolyticus*, mientras que las cepas a143 y a148 lo fueron como *V. parahaemolyticus* o *V. harveyi*. Esta última especie pudo ser descartada tras la utilización de los cebadores específicos descritos por Pang *et al.* (2006), ya que ninguno de los aislados produjo el fragmento de amplificación esperado (datos no mostrados). El sistema BIOLOG se utilizó únicamente con la cepa a148, que fue identificada como *V. alginolyticus*.

Las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST se muestran en el anexo VI-11. Los valores de similitud más altos, superiores a los propuestos por Stackebrand & Ebers (2006), se obtuvieron con cepas de las especies *V. natriegens*, *V. diabolicus*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus*, *L. pelagia* y *V. campbellii* (98,7-99,1% similitud). Sin embargo, el árbol filogenético construido a partir de estas secuencias agrupó las cepas del fenón G148 en un clado claramente diferenciado de estas especies más próximas (Figura 48).

Las características diferenciales entre las cepas del fenón G148 y las especies más estrechamente relacionadas se resumen en la Tabla 59. Basándose en criterios fenotípicos, la

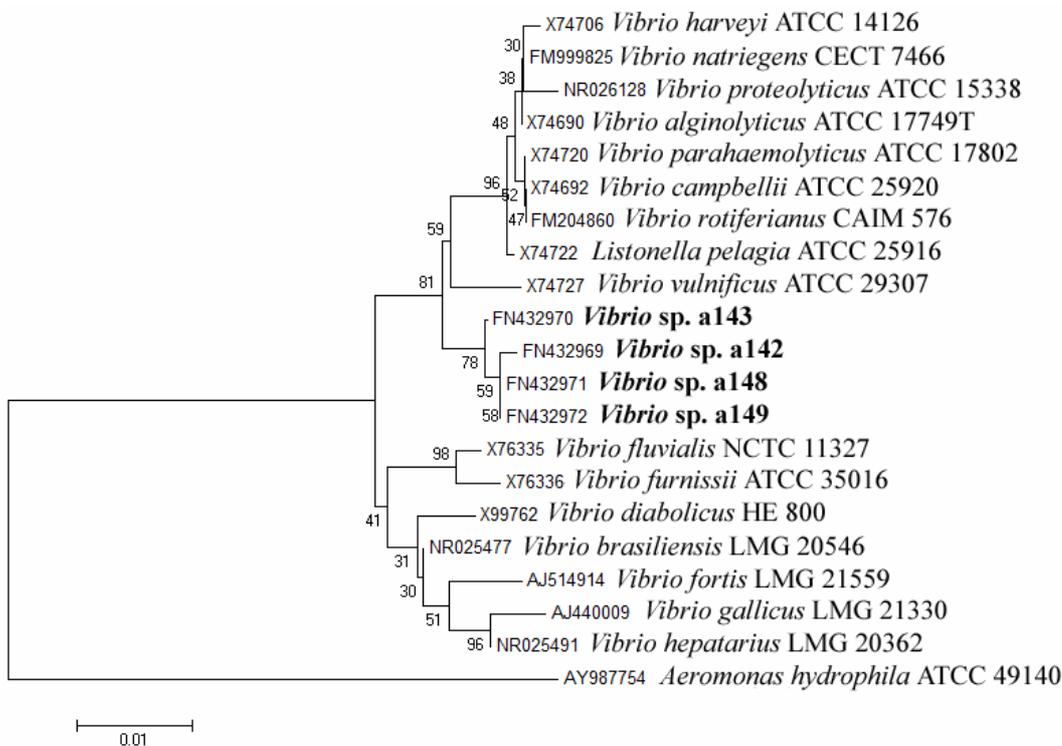


Figura 48. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G148 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 59. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G148 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Ragueneis *et al.* (1997), Gomez-Gil *et al.* (2003), Buller (2004) y Noguerola & Blanch (2008).

	ADH	LDC	ODC	Citrato	Indol	Gelatinasa	Esculinasa	Ácido de:					Sw	Crecimiento a/en:		O129 (10 µg)
								Amigdalina	Sacarosa	Melobiosa	Arabinosa	Salicina		44°C	10% NaCl	
Fenón G148	-	+	+	V+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	R	
<i>Vibrio natriegens</i>	-	-	-	+	-	+	+	ND	+	V	+	-	ND	-	R	
<i>Vibrio diabolicus</i>	-	+	+	d	+	+	-	+	+	-	-	+	+	ND	S	
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	+	V+	V+	+	+	V-	V	V+	-	-	V	V+	ND	R	
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	+	V+	V+	+	-	ND	-	-	V+	d	V	-	R	
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	+	+	-	+	+	ND	ND	+	+	+	ND	-	-	S	
<i>Listonella pelagia</i>	-	-	-	V	V	V	V	ND	V	-	-	-	-	-	V	
<i>Vibrio campbellii</i>	-	V	-	V	+	+	V	ND	-	-	-	V	-	-	V	
<i>Vibrio harveyi</i>	-	+	+	V	+	+	V	+	V	-	-	V+	V-	ND	V	
<i>Vibrio fortis</i>	-	-	-	ND	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	-	R	
<i>Vibrio proteolyticus</i>	+	+	-	+	+	V	-	ND	V	-	-	-	+	ND	R	
<i>Vibrio hepatarius</i>	ND	-	-	ND	+	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-	ND	
<i>Vibrio fluvialis</i>	+	-	-	+	V+	+	V	ND	+	-	+	V+	-	ND	R	
<i>Vibrio gallicus</i>	-	-	-	-	ND	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	-	ND	
<i>Vibrio furnissii</i>	+	-	-	+	V-	+	-	ND	+	-	+	-	-	ND	R	
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	+	V	V+	V	+	-	ND	V-	-	-	V	-	ND	VS	
<i>Vibrio brasiliensis</i>	+	-	-	+	+	+	ND	ND	+	-	-	ND	ND	-	S	
<i>Vibrio littoralis</i>	-	ND	ND	+	-	-	-	ND	-	ND	+	ND	ND	ND	S	
<i>Vibrio neptunius</i>	+	-	-	+	+	+	ND	ND	+	-	-	ND	-	-	S	
<i>Vibrio corallilyticus</i>	V	ND	+	V+	+	+	ND	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	S	
<i>Vibrio haliotocoli</i>	-	-	-	-	+	-	V	ND	-	-	-	V	-	-	V	

especie más próxima es *V. alginolyticus*, que se diferencia únicamente en la hidrólisis de esculina, generalmente negativa en esta especie, y en la producción de ácido a partir de arabinosa. Otras especies relacionadas presentan un mayor número de discrepancias, mostrando en muchos casos perfiles fenotípicos claramente distinguibles de los del fenón G148.

Una caracterización más exhaustiva será necesaria para determinar si estas cepas pueden o no asignarse a *V. alginolyticus*.

- Fenón G241 (*Vibrio* sp.)

Al igual que en el caso de las cepas del fenón anterior, se trata de bacterias del grupo de *V. harveyi*, probablemente *V. alginolyticus*.

Las colonias son similares a las del fenón G148. De color blanquecino, cremosas, no producen pigmentos difusibles ni presentan adherencia al agar, pero sí *swarming*. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 60. Las cepas no son totalmente homogéneas, presentando diferencias en los test ODC, utilización de citrato, producción de ácido a partir de manosa, y en la producción de hemolisinas. A su vez, se dieron algunas discrepancias entre los test convencionales y los del API 20E, principalmente en la prueba del indol, falsamente negativa en la mayor parte de los casos con el sistema API.

De acuerdo a las claves fenotípicas propuestas por Nogueroles & Blanch (2008), todas las cepas fueron identificadas como *V. alginolyticus*. Las únicas discrepancias con esta especie se dan con el test de hidrólisis de la esculina, generalmente negativo en *V. alginolyticus*, y en la sensibilidad al agente vibriostático O129 (150 µg), generalmente positiva. El sistema BIOLOG, utilizado únicamente con la cepa a241, dio un resultado similar, identificando esta cepa como *V. alginolyticus*.

Las especies más cercanas, de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST, se muestran en el anexo VI-14. Las secuencias obtenidas muestran valores de similitud superiores a los propuestos por Stackebrand & Ebers (2006) con las especies *V. natriegens* (99,9%), *V. alginolyticus* (99,6%), *L. pelagia* (99,6%), *V. parahaemolyticus* (99,5%), *V. rotiferianus* (99,4%), *V. campbellii* (99,3%), *V. harveyi* (99,2%) y *V. proteolyticus* (99,2%). Otras especies relacionadas muestran valores por debajo del 98,7%. El árbol filogenético construido con estas secuencias agrupó las cepas del fenón G241 con las especies mencionadas, pero no fue de utilidad a la hora de revelar cual o cuales son las más cercanas (Figura 49).

Las características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G241 y las especies más próximas se resumen en la Tabla 61. Como se ha indicado, la especie más probable es *V. alginolyticus*, que apenas muestra discrepancias fenotípicas con el fenón G241. Las demás especies próximas presentan por el contrario perfiles fenotípicos fácilmente

distinguibles, incluido *V. natriegens*, la especie más cercana de acuerdo a la secuencia del gen ARNr 16S. Por otro lado, la utilización de los cebadores específicos de *V. harveyi* descritos por Pang *et al.* (2006) mostró el resultado esperado, no produciendo los aislados del fenón G241 ningún amplificado (datos no mostrados).

Tabla 60. Características fenotípicas de los aislados del fenón G241.

Test	Cepas						
	a221	a233	a239	a241	a245	a260	a314
OF	F	F	F	F	F	F	F
ADH	-	-	-	-	-	-	-
LDC	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+*	+	+	+	-	-	+
TCBS	a	a	a	a	a	a	a
ONPG	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+*	-	-	+*	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Indol	+	+*	+*	+*	+*	+*	+*
VP	+	+	+	+	+	+	+
Rojo metilo	+	+	+	+	+	+	+
Gas glucosa	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃	+	+	+	+	+	+	+
Amilasa	+	+	+	+	+	+	+
Lipasa	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinasa	+	+	+	+	+	+	+
Esculinasa	+	+	+	+	+	+	+
Caseinasa	+	+	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-	-
Hemólisis	β	β	β	β	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+
Ácido de:							
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
Rhamnosa	-	-	-	-	-	-	-
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+
Melobiosa	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-	-
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	-	-	-	-	-
Manosa	-	-	-	-	+	+	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento a:							
4°C	-	-	-	-	-	-	-
30°C	+	+	+	+	+	+	+
35°C	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+
44°C	+	+	+	+	+	+	+
Crecimiento en:							
0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
8% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
10% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
12% NaCl	-	-	-	-	-	-	-
Requerimiento agua de mar	-	-	-	-	-	-	-
Luminiscencia	-	-	-	-	-	-	-
O129 (10 µg)	R	R	R	R	R	R	R
O129 (150 µg)	R	R	R	R	R	R	R
Novobiocina	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R

* El sistema API 20E mostró el resultado opuesto.

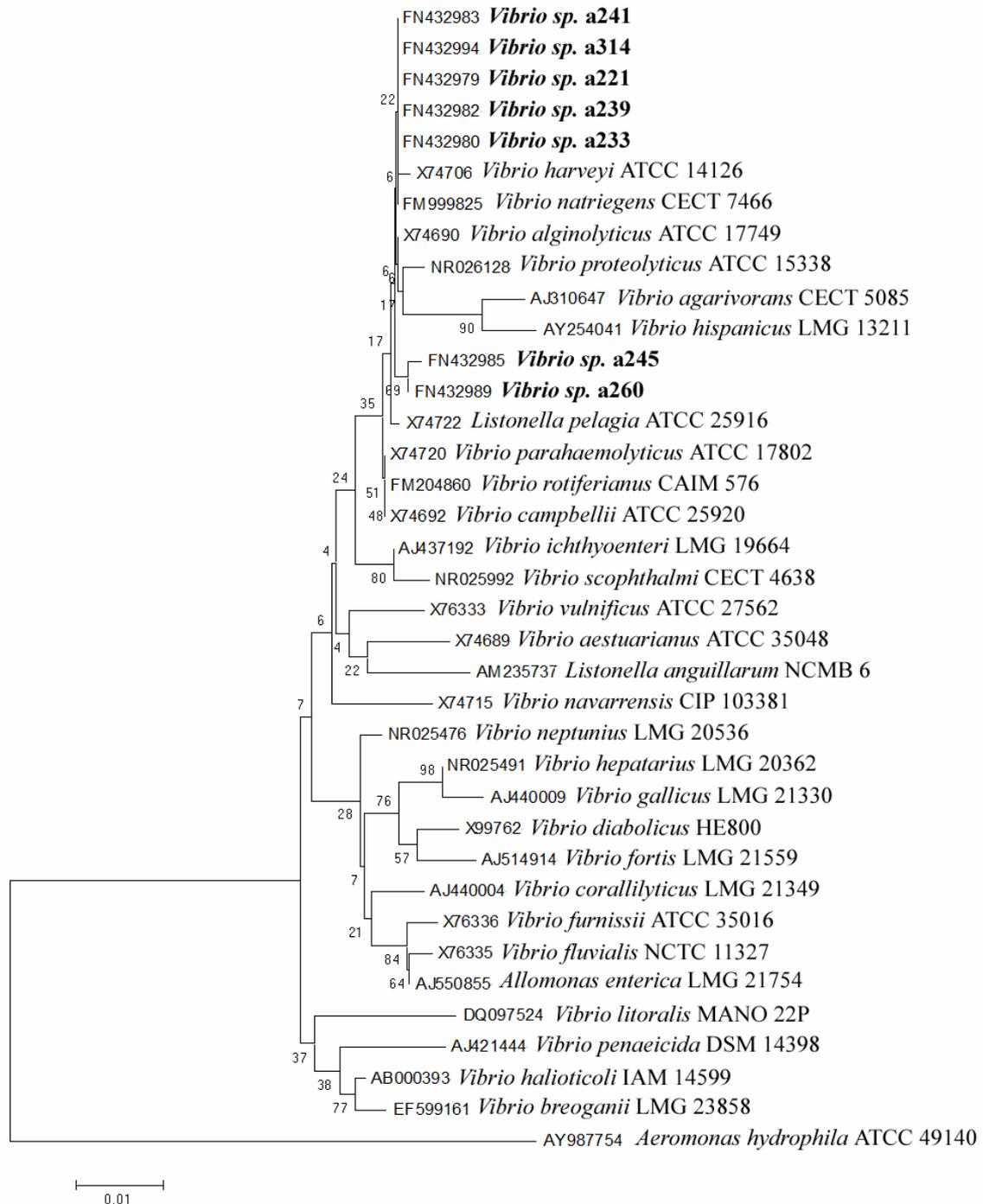


Figura 49. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G241 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 61. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G241 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Raguenes *et al.* (1997), Gómez-Gil *et al.* (2003), Buller (2004) y Noguerola & Blanch (2008).

	ADH	LDC	ODC	VP	Indol	Gelatinasa	Esculinasa	Ácido de:					Sw	Crecimiento a/en:		O129 (10 µg)
								Amigdalina	Sacarosa	Melobiosa	Arabinosa	Salicina		44°C	10% NaCl	
Fenón G241	-	+	V+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	R
<i>Vibrio natriegens</i>	-	-	-	-	-	+	+	ND	+	V	+	+	-	ND	-	R
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	+	V+	V+	+	+	V-	V	V+	-	-	V	V+	ND	+	R
<i>Listonella pelagia</i>	-	-	-	-	V	V	V	ND	V	-	-	-	-	-	-	V
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	+	-	V+	+	-	ND	-	-	V+	d	V	-	-	R
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	+	+	-	+	+	ND	ND	+	+	+	ND	-	-	-	S
<i>Vibrio campbellii</i>	-	V	-	-	+	+	V	ND	-	-	-	V	-	-	-	V
<i>Vibrio harveyi</i>	-	+	+	-	+	+	V	+	V	-	-	V+	V-	ND	V-	V
<i>Vibrio proteolyticus</i>	+	+	-	V+	+	V	-	ND	V	-	-	-	+	ND	+	R
<i>Vibrio diabolicus</i>	-	+	+	d	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	ND	S
<i>Vibrio hepatarius</i>	ND	-	-	ND	+	ND	ND	ND	-	-	-	ND	ND	-	-	ND
<i>Vibrio agarivorans</i>	-	-	-	ND	-	+	d	ND	-	+	-	-	ND	-	-	S
<i>Vibrio fortis</i>	-	-	-	ND	+	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	-	-	R
<i>Vibrio litoralis</i>	-	ND	ND	ND	-	-	-	ND	-	ND	+	ND	ND	ND	+	S
<i>Allomonas enterica</i>	V+	-	V+	-	+	+	ND	ND	+	ND	+	-	ND	-	-	ND
<i>Vibrio furnissii</i>	+	-	-	-	V-	+	-	ND	+	-	+	-	-	ND	V	R
<i>Vibrio fluvialis</i>	+	-	-	-	V+	+	V	ND	+	-	+	V+	-	ND	V+	R
<i>Vibrio vulnificus</i>	-	+	V	-	V	+	-	ND	V-	-	-	V	-	ND	-	VS
<i>Vibrio gallicus</i>	-	-	-	ND	ND	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	-	ND	ND
<i>Vibrio haliotocoli</i>	-	-	-	-	+	-	V	ND	-	-	-	V	-	-	-	V
<i>Vibrio corallilyticus</i>	V	ND	+	ND	+	+	ND	ND	+	-	ND	ND	ND	ND	-	S

- Fenón G255 (*Vibrio tapetis*)

La caracterización de los aislados de este fenón permitió su identificación como *Vibrio tapetis*.

Las colonias son de color blanquecino, y no presentan *swarming*, pigmentos difusibles ni adherencia al agar. Las características fenotípicas de los aislados se resumen en la Tabla 62.

Las cepas, fenotípicamente homogéneas, fueron identificadas mediante las claves propuestas por Noguerola & Blanch (2008) como *V. tapetis*. Los perfiles fenotípicos concuerdan con los descritos para esta especie por Castro *et al.* (1992), Borrego *et al.* (1996),

Tabla 62. Características fenotípicas de los aislados del fenón G255 comparadas con las de *Vibrio tapetis*.

Test	Cepas				<i>Vibrio tapetis</i>	Test API ZYM	Cepas		<i>Vibrio tapetis</i>	
	a200	a201	a204	a255			a200	a255		
OF	F	F	F	F	F	2	Fosfatasa alcalina	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-	3	Esterasa (C4)	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	4	Esterasa lipasa (C8)	+	+	+
ODC	-	-	-	-	-	5	Lipasa (C14)	+	+	-
TCBS	v	v	v	v	v	6	Leucina arilamidasa	+	+	+
ONPG	+	+	+	+	+	7	Valina arilamidasa	+	+	+
Citrato	-	-	-	-	-	8	Cistina arilamidasa	+	+	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	9	Tripsina	-	-	-
Indol	+	+	+	+	+	10	α -quimotripsina	-	-	-
VP	-	-	-	-	-	11	Fosfatasa acida	(+)	(+)	+
Rojo metilo	+	+	+	+	ND	12	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	-	(+)	-
Gas glucosa	-	-	-	-	V	13	α -galactosidasa	-	-	-
NO ₃	+	+	+	+	+	14	β -galactosidasa	-	-	-
Amilasa	+	+	+	+	+	15	β -glucuronidasa	-	-	-
Lipasa	+	+	+	+	+	16	α -glucosidasa	-	-	-
Gelatinasa	+	+	+	+	+	17	β -glucosidasa	-	-	-
Esculinasa	-	-	-	-	-	18	N-acetil- β -glucosaminidasa	-	-	+
Ureasa	-	-	-	-	-	19	α -mannosidasa	-	-	-
Hemólisis	-	-	-	-	ND	20	α -fucosidasa	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+					
Ácido de:										
Glucosa	+	+	+	+	+					
Manitol	-	-	-	-	-					
Inositol	-	-	-	-	-					
Sorbitol	-	-	-	-	-					
Rhamnosa	-	-	-	-	-					
Sacarosa	-	-	-	-	-					
Melobiosa	-	-	-	-	-					
Amigdalina	-	-	-	-	-					
Arabinosa	-	-	-	-	-					
Lactosa	-	-	-	-	-					
Manosa	+	+	+	+	d					
Salicina	-	-	-	-	ND					
Crecimiento a:										
4°C	+	+	+	+	+					
30-44°C	-	-	-	-	-					
Crecimiento en:										
0% NaCl	-	-	-	-	-					
3% NaCl	+	+	+	+	+					
6-12% NaCl	-	-	-	-	-					
Requerimiento agua de mar	-	-	-	-	-					
Luminiscencia	-	-	-	-	-					
O129 (10 μ g)	S	S	S	S	V					
O129 (150 μ g)	S	S	S	S	S					
Novobiocina	S	S	S	S	ND					
Ampicilina	S	S	S	S	V					

Buller (2004) y Noguerola & Blanch (2008), no obstante algunas discrepancias para la galería API ZYM (Tabla 62).

El sistema BIOLOG se utilizó con las cepas a200, a201, a255 y *V. tapetis* CECT 4600^T, y aunque no proporcionó una identificación aceptable a nivel de género ni de especie, los perfiles obtenidos fueron coincidentes con los publicados por Reid *et al.* (2003a) para las cepas de *V. tapetis* CECT 4600^T, HH6087, IS1, IS5 y UK6. No obstante se observaron diferencias en los test de utilización de D-galactosa (positivo solo para las cepas del fenón G255 y la HH6087), D-manosa, y de ácido glucurónico (positivo para las cepas del fenón G255 y la CECT 4600^T, pero negativa en todas las cepas caracterizadas por Reid *et al.* 2003a). Por otro lado las cepas de *V. tapetis* aisladas de acedía se diferencian de las aisladas de porredana (LP2) y halibut (HH6087) en que estas son positivas para la utilización de sacarosa y manitol, respectivamente.

La identificación de los aislados como *V. tapetis* se confirmó mediante PCR con los cebadores específicos Vtf y Vtr, descritos por Paillard *et al.* (2006) y Jvt-1 y Jvt-2, descritos por Romalde *et al.* (2007). Todas las cepas del fenón produjeron los productos de amplificación esperados, similares a los de la cepa tipo de *V. tapetis* (Figura 50).

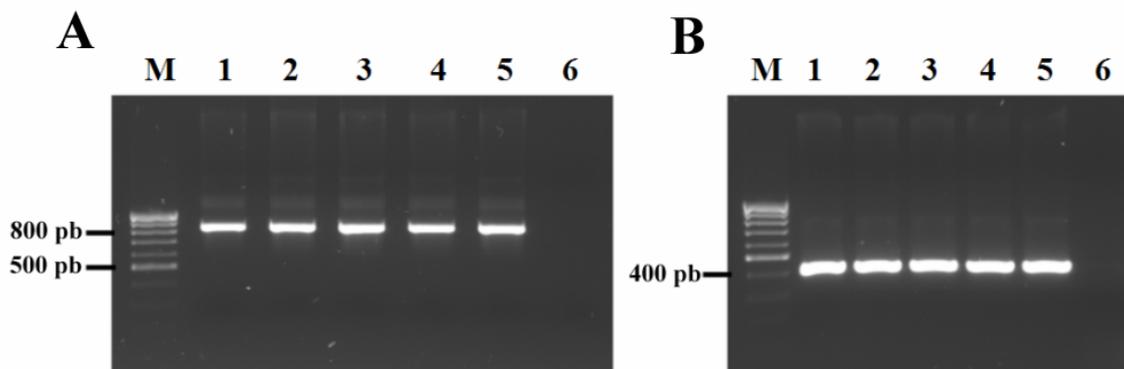


Figura 50. Amplificación por PCR utilizando los cebadores específicos para *V. tapetis* Jvt-1 y Jvt-2, descritos por Romalde *et al.* (2007) (A) y los Vtf y Vtr, descritos por Paillard *et al.* (2006) (B), con cepas del fenón G255. M, marcador de peso molecular 100 pb; línea 1, *V. tapetis* CECT 4600^T, utilizada como control positivo; líneas 2-5, cepas a200, a201, a204 y a255, respectivamente; línea 6, control negativo; los productos de amplificación esperados son de 816 pb en A y de 416 pb en B.

El análisis filogenético basado en el gen 16S ARNr corroboró los resultados anteriores. Las especies más cercanas de acuerdo al programa BLAST se muestran en el anexo VI-15. Las secuencias obtenidas mostraron una similitud igual o superior al 98,7% con la cepa tipo de *V. tapetis*, pero inferior a ese valor con otras especies relacionadas. Estas muestran por otra parte características fenotípicas que las diferencian claramente de las cepas del fenón G255 (Tabla 63). El árbol construido a partir de estas secuencias agrupó claramente las cepas del fenón con las de *Vibrio tapetis* (Figura 51).

Por último, los ensayos de aglutinación utilizando células enteras y antígenos O y los antisueros anti-CECT 4600, anti-0202RD y anti-6087, dirigidos contra cepas representativas de *V. tapetis*, mostraron resultados negativos en todos los casos, por lo que estos aislados podrían representar un nuevo serotipo dentro de esta especie.

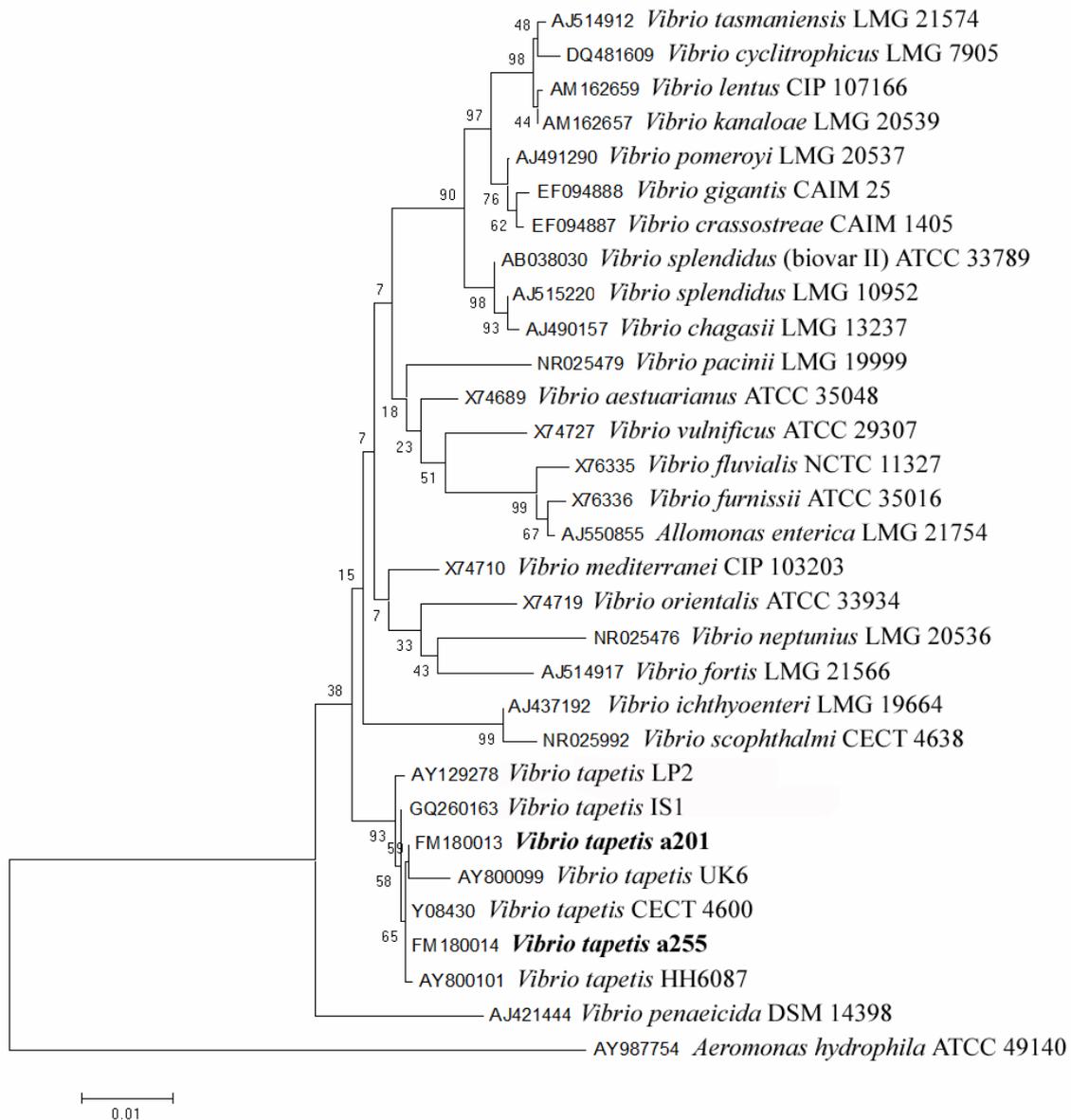


Figura 51. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de las cepas del fenón G255 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 63. Características fenotípicas diferenciales entre los aislados del fenón G255 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de Castro *et al.* (1992), Borrego *et al.* (1996), Buller (2004) y Noguerola & Blanch (2008).

Test	Especie				
	Fenón G255	<i>Vibrio tapetis</i>	<i>Vibrio mediterranei</i>	<i>Vibrio splendidus</i>	<i>Vibrio aestuarianus</i>
ADH	-	-	V	V	+
TCBS	v*	v	a	v	a
Citrato	-	-	-	V	+
Gelatinasa	+	+	-	+	+
Esculinasa	-	-	V+	V	V
Crecimiento en: 6% NaCl	-	-	+	V	+
Crecimiento a: 30°C	-	-	+	+	+
35°C	-	-	V+	V	+
Ácido de:					
Manitol	-	-	+	+	+
Sorbitol	-	-	+	-	V
Sacarosa	-	-	+	V	+
Lactosa	-	-	-	-	+

* En TCBS: v, colonias verdes; a, colonias amarillas.

- Fenón G256 (*Vibrio* sp.)

La caracterización fenotípica y genotípica situó a los aislados de este fenón dentro del género *Vibrio*, pero no permitió una identificación a nivel de especie.

Las colonias son similares a las del fenón G29. De color grisáceo, producen un pigmento difusible de color marrón-violáceo, pero no muestran *swarming* ni adherencia al agar. En la Tabla 64 se resumen las características fenotípicas de los aislados. Las cepas presentan perfiles idénticos, no observándose discrepancias en ninguno de los test realizados.

De acuerdo a las claves propuestas por Noguerola & Blanch (2008), las cepas fueron identificadas como *V. nereis*, sin embargo esta especie muestra discrepancias con el fenón G256 en los test catalasa, ONPG, hidrólisis de esculina y tween 80, y en el de utilización de citrato. El sistema BIOLOG no pudo dar una identificación aceptable para la única cepa testada (a256), aunque señaló a *L. pelagia* como especie probable. No obstante, esta especie puede diferenciarse fácilmente de las cepas del fenón G256 mediante distintas pruebas fenotípicas (Tabla 65).

Las especies más cercanas de acuerdo a la secuenciación del ADNr 16S y el programa BLAST se muestran en el anexo VI-16. Los valores de similitud más altos se dieron con *V. littoralis*, *V. fortis* y *V. agarivorans*, todos ellos con un 97,7%. Este valor está, sin embargo, muy por debajo de los propuestos por Stackebrand & Ebers (2008) para ser considerados miembros de una misma especie, por lo que las cepas del fenón G256 podrían constituir una nueva especie dentro del género *Vibrio*. El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias agrupó las secuencias del fenón G256 en un clado propio, claramente diferenciado del resto de las especies (Figura 52).

Tabla 64. Características fenotípicas de los aislados del fenón G256.

Test	Cepas					Test	Cepas				
	a212	a254	a256	a286	a297		a212	a254	a256	a286	a297
OF	F	F	F	F	F	Ácido de:					
ADH	+	+	+	+	+	Sacarosa	+	+	+	+	+
LDC	-	-	-	-	-	Melobiosa	-	-	-	-	-
ODC	-	-	-	-	-	Amigdalina	+	+	+	+	+
TCBS	a	a	a	a	a	Arabinosa	-	-	-	-	-
ONPG	+	+	+	+	+	Lactosa	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	-	-	Manosa	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	Salicina	-	-	-	-	-
Indol	+	+	+	+	+	Crecimiento a:					
VP	-	-	-	-	-	4°C	-	-	-	-	-
Rojo metilo	+	+	+	+	+	30°C	+	+	+	+	+
Gas glucosa	-	-	-	-	-	35°C	+	+	+	+	+
NO ₃	+	+	+	+	+	40°C	+	+	+	+	+
Amilasa	-	-	-	-	-	44°C	-	-	-	-	-
Lipasa	+	+	+	+	+	Crecimiento en:					
Gelatinasa	-	-	-	-	-	0% NaCl	-	-	-	-	-
Esculinasa	+	+	+	+	+	3% NaCl	+	+	+	+	+
Caseinasa	-	-	-	-	-	6% NaCl	+	+	+	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	8% NaCl	-	-	-	-	-
Hemólisis	α	α	α	α	α	10% NaCl	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	+	+	12% NaCl	-	-	-	-	-
Ácido de:						Requerimiento					
Glucosa	+	+	+	+	+	agua de mar	-	-	-	-	-
Manitol	-	-	-	-	-	Luminiscencia	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	O129 (10 µg)	S	S	S	S	S
Sorbitol	-	-	-	-	-	O129 (150 µg)	S	S	S	S	S
Rhamnosa	-	-	-	-	-	Novobiocina	S	S	S	S	S
						Ampicilina	S	S	S	S	S

* El sistema API 20E mostró el resultado opuesto.

La secuenciación parcial del gen ARNr 23S de la cepa a256 permitió por otra parte diferenciarla fácilmente de algunas de las especies más cercanas. Las cepas *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633, *V. campbellii* CECT 523, *V. harveyi* ATCC BAA-1116, *L. pelagia* CECT 4202 y *V. agarivorans* CECT 5085 mostraron valores de similitud muy bajos, de solo el 88-90,6%. Para otras especies próximas no hay secuencias publicadas.

La diferenciación entre el fenón G256 y especies relacionadas de acuerdo al ADNr 16S puede hacerse fácilmente mediante distintas pruebas fenotípicas, que se resumen en la Tabla 65.

Por otro lado, las cepas de este fenón parecen estar muy relacionadas con las del fenón G29. Con un 99,5-99,7% de similitud en las secuencias del gen ARNr 16S (y un 99,0% en el gen ARNr 23S de las cepas a29 y a256), cabe la posibilidad de que formen parte de una misma especie, no obstante una serie de características fenotípicas permiten diferenciarlos, por ejemplo, la producción de ácido a partir de melobiosa, la producción de hemolisinas y la hidrólisis de almidón y gelatina. Los perfiles de utilización de fuentes de carbono obtenidos con el sistema BIOLOG para las cepas a29 y a256 muestran también discrepancias en una serie de test (glucógeno, ácido D-galacturónico, D-alanina, L-alanina, ácido L-aspartico, L-serina y glucosa-6-fosfato).

Ensayos adicionales serán necesarios para determinar si estos dos fenones corresponden a una única especie o no y si constituyen o no una nueva especie dentro del género *Vibrio*.

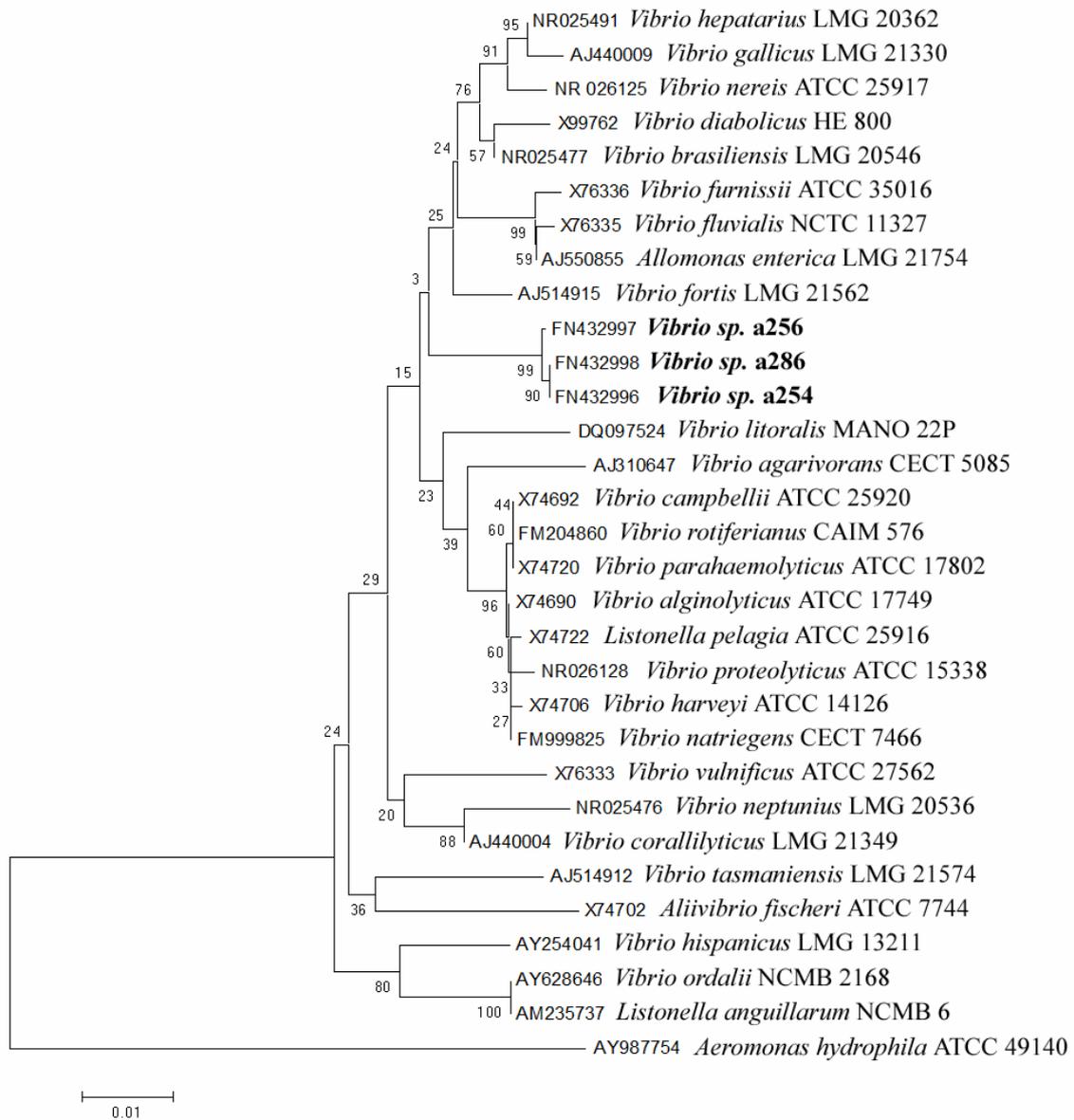


Figura 52. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de cepas del fenón G256 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Tabla 65. Características fenotípicas diferenciales entre el fenón G256 y las especies más próximas según la secuenciación del gen ARNr 16S. Datos extraídos de West *et al.* (1983), Raguenees *et al.* (1997), Gomez-Gil *et al.* (2003), Ben-Haim *et al.* (2003), Buller (2004) y Noguerola & Blanch (2008).

	ADH	LDC	ODC	ONPG	VP	Indol	Citrato	Esculinasa	Gelatinasa	Ácido de:			Crecimiento a/en:				O129 (10 µg)	
										Manitol	Sacarosa	Melobiosa	4°C	40°C	0% NaCl	8% NaCl		
Fenón G256	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	S
<i>Vibrio litoralis</i>	-	ND	ND	-	ND	-	+	-	-	+	-	ND	+	+	-	+	+	S
<i>Vibrio fortis</i>	-	-	-	+	ND	+	ND	ND	+	+	ND	+	-	-	-	+	+	R
<i>Vibrio agarivorans</i>	-	-	-	+	ND	-	-	d	+	+	-	+	-	-	-	-	-	S
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	-	+	+	-	-	V+	V+	-	+	+	-	-	-	+	d	d	d	R
<i>Vibrio hepatarius</i>	ND	-	-	-	ND	+	ND	ND	ND	+	-	-	+	-	+	+	+	ND
<i>Vibrio alginolyticus</i>	-	+	V+	-	V+	+	V+	V-	+	+	V+	-	d	+	-	+	+	R
<i>Vibrio natriegens</i>	-	-	-	V	-	-	+	+	V	+	+	V	d	V	-	d	d	R
<i>Vibrio rotiferianus</i>	-	+	+	d	-	+	-	ND	+	d	+	+	-	+	-	-	-	S
<i>Vibrio campbellii</i>	-	V	-	-	-	+	V	V	+	V	-	-	-	-	-	V	V	V
<i>Vibrio furnissii</i>	+	-	-	V	V-	-	+	-	+	+	+	-	-	V	V	+	+	R
<i>Vibrio fluvialis</i>	+	-	-	+	-	V+	+	V	+	+	+	-	-	V	V	V+	V+	R
<i>Vibrio diabolicus</i>	-	+	+	-	d	+	d	-	+	+	+	-	-	+	-	ND	ND	S
<i>Vibrio gallicus</i>	-	-	-	-	ND	ND	-	ND	-	+	-	-	-	-	-	ND	ND	ND
<i>Listonella pelagia</i>	-	-	-	+	-	V	V	V	V	+	V	-	V	-	-	V	V	V
<i>Allomonas enterica</i>	V+	-	V+	ND	-	+	+	ND	+	+	+	ND	-	-	-	-	-	ND
<i>Vibrio harveyi</i>	-	+	+	V	-	+	V	V	+	+	V	-	-	V	-	V+	V	V
<i>Vibrio nereis</i>	+	-	-	-	-	V+	+	-	V	-	+	-	V-	V	-	d	d	V
<i>Vibrio proteolyticus</i>	+	+	-	-	V+	+	+	-	V	+	V	-	-	+	-	+	+	R
<i>Vibrio ordalii</i>	-	-	-	-	-	-	V	V	V	V-	+	-	V	-	-	-	-	S
<i>Listonella anguillarum</i>	+	-	-	+	+	V+	+	V-	+	+	+	-	V	-	V	-	-	V
<i>Vibrio corallilyticus</i>	V	ND	+	+	-	+	V+	ND	+	V+	+	-	ND	ND	-	-	-	S
<i>Vibrio neptunius</i>	+	-	-	-	+	+	+	ND	+	-	+	-	-	-	-	-	-	S
<i>Vibrio hispanicus</i>	+	-	-	-	-	+	+	ND	-	+	+	-	+	+	+	+	+	S

- Otras cepas del género *Vibrio*

Las cepas a42, a152, a153 y a246, todas identificadas como *Vibrio* sp., mostraron perfiles fenotípicos que no permitían su inclusión en ninguno de los fenones establecidos. Sus características fenotípicas se resumen en la Tabla 66.

En el caso de la cepa a42, las especies más próximas de acuerdo a la secuencia del ADNr 16S (Figura 53) son *V. ichthyoenteri* (99,5% similitud) y *V. scopthalmi* (99,1%), un resultado que se vio confirmado por la caracterización fenotípica ya que ambas especies muestran perfiles prácticamente idénticos a los de esta cepa. *V. ichthyoenteri* muestra discrepancias en un solo test (ADH) y *V. scopthalmi* en dos (VP y 6% NaCl), por lo que podría tratarse de cualquiera de las dos especies.

La cepa a152 muestra como especie más próxima a *V. neptunius* (Figura 54), siendo esta la única que muestra en el ADNr 16S un valor de similitud por encima del propuesto por Stackebrandt & Ebers (2006). No obstante, parecen darse discrepancias con los resultados de algunos test fenotípicos como el citrato, VP, indol y producción de ácido a partir de manitol (Thompson *et al.* 2003, Buller 2004, Prado 2006, Noguerola & Blanch 2008).

Por último, las cepas a153 y a246 se sitúan dentro del grupo de especies próximas a *V. splendidus*, mostrando valores de similitud en el ADNr 16S por encima del 98,7% con varias especies de este grupo como *V. gigantis*, *V. crassostreae*, *V. pomeroyi*, *V. splendidus* o *V. chagasii*, no permitiendo tampoco la caracterización fenotípica una identificación a nivel de especie. Ambas cepas comparten valores de similitud en el ADNr 16S por encima del 98,7% entre sí y con las cepas del fenón G7, no obstante todas ellas son fácilmente diferenciables entre sí por su perfil fenotípico.

Tabla 66. Características fenotípicas de los aislados de *Vibrio* no incluidos en ningún fenón.

Test	Cepas				Test	Cepas			
	a42	a152	a153	a246		a42	a152	a153	a246
Color colonia	Gris	Gris	Gris	Blanca	Ácido de:				
<i>Swarming</i>	-	-	+	-	Glucosa	+	+	+	+
Adherencia al agar	-	-	-	-	Manitol	-	+	+	+
Pigmentos difusibles	-	-	-	+	Inositol	-	-	-	-
OF	F	F	F	F	Sorbitol	-	-	+	-
ADH	+	+	+	+	Rhamnosa	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	Sacarosa	+	+	-	+
ODC	-	-	-	-	Melodiosa	-	-	-	-
TCBS	a	a	v	a	Amigdalina	-	-	-	-
ONPG	-	-	-	-	Arabinosa	-	-	-	+
Citrato	-	-	-	-	Lactosa	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	Manosa	+	+	+	-
Indol	-	-	+	+	Crecimiento en:				
VP	+	-	+	-	0% NaCl	-	-	-	-
Rojo metilo	+	+	+	+	3% NaCl	+	+	+	+
NO ₃	+	+	+	+	6% NaCl	+	+	+	+
Amilasa	-	+	+	+	8% NaCl	-	-	-	+
Lipasa	-	+	+	+	O129 (10 µg)	S	S	S	R
Gelatinasa	-	+	+	+	O129 (150 µg)	S	S	S	R
Ureasa	-	-	-	-	Novobiocina	S	S	S	S
Catalasa	+	+	+	+	Ampicilina	S	R	R	R

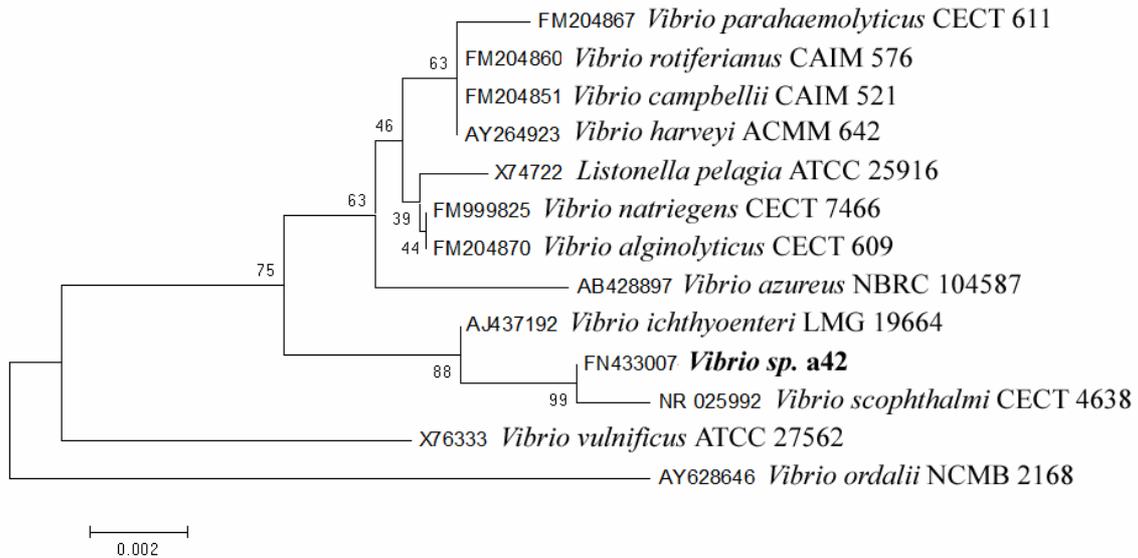


Figura 53. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa a42 y especies relacionadas. La secuencia de *Vibrio ordalii* fue incluida como *outgroup*. Los valores de *bootstrap* de 1000 replicas aparecen en el nudo correspondiente.

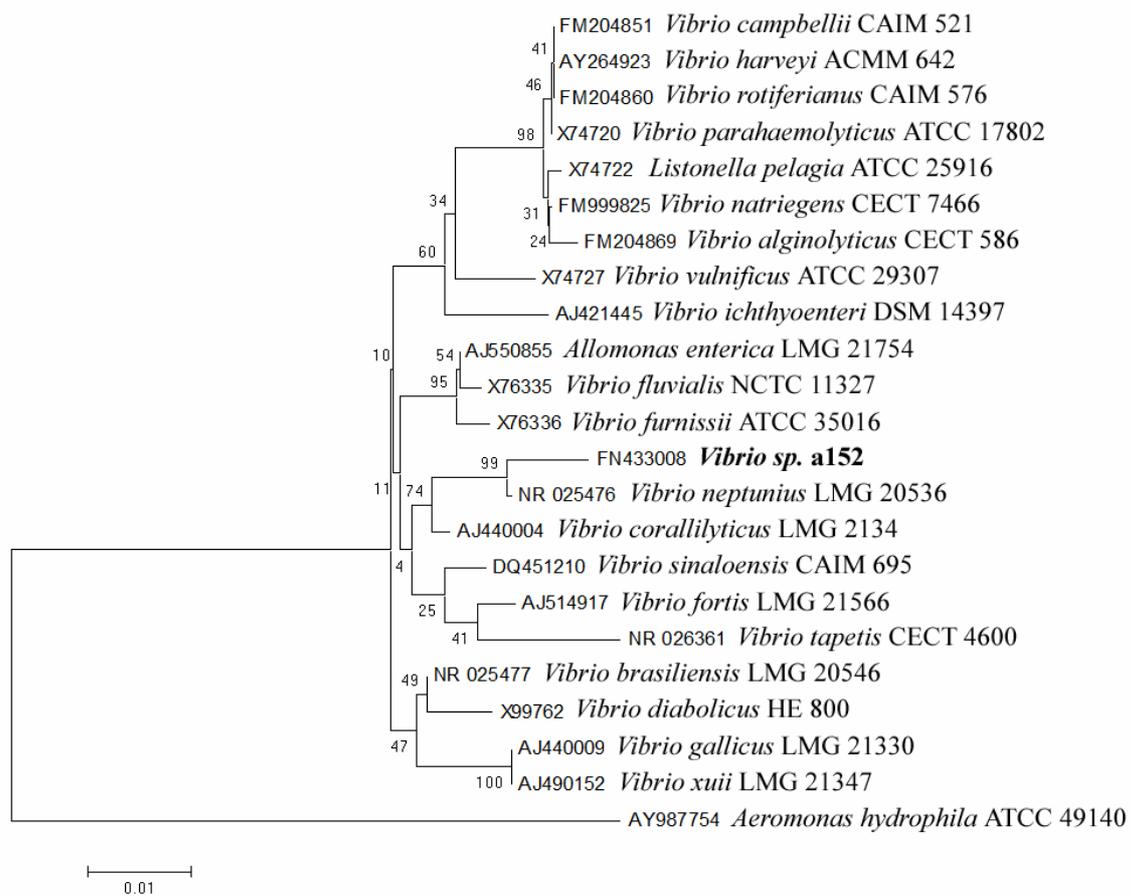


Figura 54. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias del gen ARNr 16S de la cepa a152 y especies relacionadas. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los valores de *bootstrap* de 1000 replicas aparecen en el nudo correspondiente.

4.4. COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA ASOCIADA A MORTALIDADES

La microbiota encontrada asociada a los episodios de mortalidad estudiados estuvo constituida por bacterias Gram negativas pertenecientes a las clases Gamma-Proteobacteria y Flavobacteria, pertenecientes a 5 familias y 8 géneros diferentes. La clase Gamma-Proteobacteria abarca el 90,6% de los aislados y el 84,2% de los fenones, perteneciendo los aislados y fenones restantes a Flavobacteria. La familia *Vibrionaceae* fue el grupo taxonómico dominante tanto en número de aislados (78,5% del total) como en diversidad (68% de los fenones), seguido de lejos por las familias *Flavobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Moraxellaceae*, que incluyen el 9,4%, 8%, 3,1% y 0,8% de los aislados, respectivamente. A nivel de género, el grupo dominante fue *Vibrio*, con el 63% de los aislados y el 47% de los fenones, seguido de *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas* y *Tenacibaculum* con el 13,9%, 8% y 7,6% de los aislados respectivamente, mostrando otros géneros representaciones mucho menores (Figura 55).

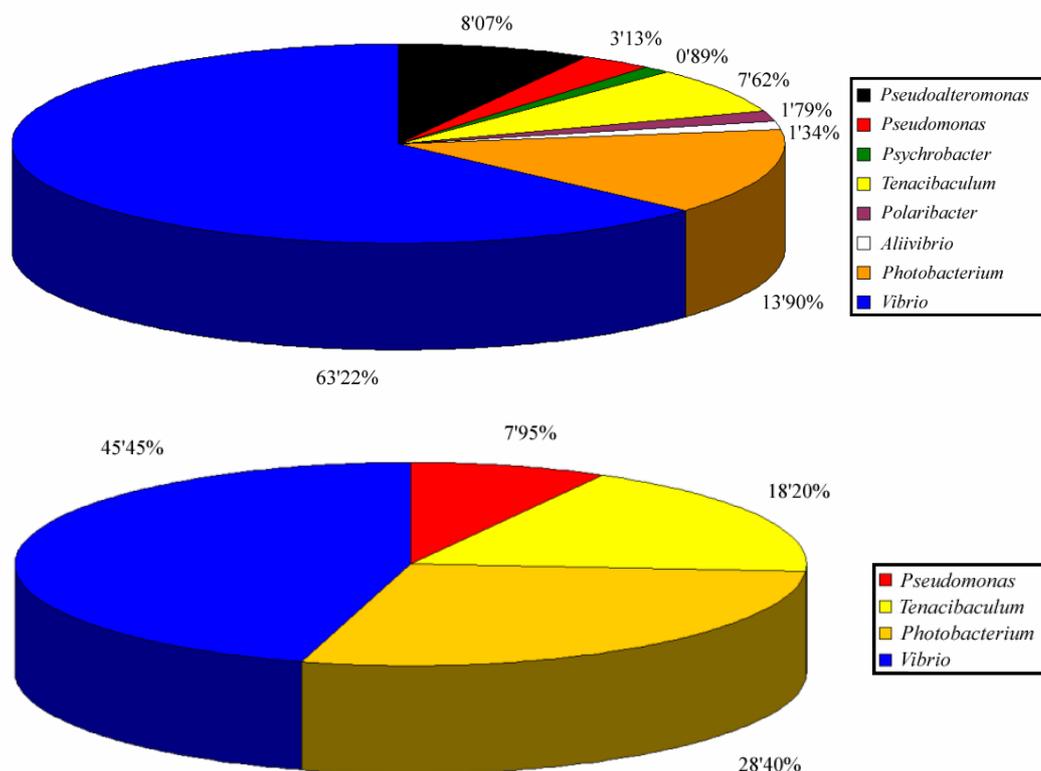


Figura 55. Distribución de los aislados obtenidos asociados a episodios de mortalidad en acedia, lenguado senegalés y rombo, en función del género al que pertenecen. En la parte superior se muestra la distribución del conjunto de aislados obtenidos. En la parte inferior se muestran únicamente los aislados de los fenones que mostraron ser patógenos en los ensayos de virulencia.

Del total de aislados recuperados de peces enfermos, solo el 39% pertenecen a fenones patógenos. Dentro del género *Vibrio*, únicamente un fenón, el correspondiente a *V. harveyi*, mostró ser virulento, perteneciendo las demás especies patógenas a otros géneros aislados con menor frecuencia (Figura 55).

No obstante, *V. harveyi* fue el patógeno más importante en número de aislados (más del 45% de los aislados incluidos en fenones patógenos pertenecen a esta especie) y en número de muestreos en los que apareció (ocho en total), aunque no se obtuvo ningún aislado a partir de rombo. Entre los patógenos detectados, la segunda especie más numerosa fue *P. damsela* subsp. *piscicida*, con aproximadamente el 28% de los aislados. Sin embargo, *T. soleae*, aunque presentó un número de aislados mucho menor (9%), apareció en un mayor número de muestreos (en seis, frente a los dos de *P. damsela*) y se recuperó a partir de las tres especies de peces planos muestreadas, mientras que *P. damsela* solo lo fue a partir de lenguado senegalés. Por último, *T. maritimum* y *P. baetica*, aunque con un porcentaje de aislados similar al de *T. soleae* (8-9%), se recuperaron a partir de un número menor de muestreos (tres y dos, respectivamente), y en todos los casos únicamente a partir de acedía.

Tras la identificación y evaluación de la virulencia de los fenones, la distribución de los distintos grupos de aislados en el conjunto de muestreos realizados (Tablas 67, 68 y 69) mostró que la mayor parte de estos presentaban bacterias patógenas que podrían haber estado implicadas o ser responsables de las mortalidades; en otros casos, sin embargo, no se pudo demostrar la existencia de patógenos bacterianos que permitiesen explicar las mismas:

- a) En larvas las únicas bacterias encontradas fueron vibrios relacionados con *V. splendidus* (grupos de aislados G7 y G107) y con *V. alginolyticus* (G148, G241). Sin embargo, la implicación de estas bacterias en la mortalidad larvaria no está clara, ya que al menos los tres primeros grupos fueron también recuperados a partir de larvas sanas, con lo que no hay diferencias entre la microbiota bacteriana encontrada en larvas sanas y larvas enfermas, y ninguno de ellos causó mortalidades significativas en los ensayos de virulencia.
- b) En alevines de acedía se encontraron bacterias de los géneros *Pseudoalteromonas*, *Tenacibaculum* (*T. soleae*), *Polaribacter* y *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. tapetis* y diversos grupos identificados como *Vibrio* sp., incluidas cepas relacionadas con *V. splendidus* y con *V. alginolyticus* -G7, G241, G256-). Las dos especies patógenas detectadas (*T. soleae* y *V. harveyi*) abarcan más de la mitad de los muestreos realizados, pero solo en un caso (muestreo A3-SE85) aparecen asociadas ambas especies. Por otro lado, en la mayor parte de los casos se detectó la presencia de bacterias filamentosas similares a las de *Tenacibaculum* en improntas de úlceras, sin

embargo, estas no crecieron en el medio de cultivo. En alevines de lenguado y rombo el número de muestreos fue menor; los grupos bacterianos encontrados fueron *Pseudoalteromonas* sp. y vibrios relacionados con *V. splendidus* (G107) y *V. alginolyticus* (G148 y G241), ninguno de ellos patógeno en los ensayos de virulencia realizados.

- c) En juveniles de acedía se encontraron bacterias pertenecientes a los géneros *Pseudoalteromonas*, *Tenacibaculum* (*T. soleae*, *T. maritimum*), *Psychrobacter*, *Photobacterium* (G197) y *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. tapetis* y diversos *Vibrio* sp. -G7, G29, G35, G107, G241, G256-). Se detectaron por tanto tres especies patógenas (*T. soleae*, *T. maritimum* y *V. harveyi*) que en conjunto abarcan la casi totalidad de los muestreos realizados, apareciendo en algún caso las tres especies juntas (muestreo A3-MA). En juveniles de lenguado las bacterias encontradas fueron *T. soleae*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *V. harveyi* y *Vibrio* sp. (G35), apareciendo las tres especies patógenas en distintos muestreos. En juveniles de rombo no se dio ningún episodio de mortalidad ni casos aislados de enfermedad.
- d) En adultos de acedía se encontraron bacterias de los géneros *Aliivibrio*, *Pseudomonas* (*P. baetica*), *Tenacibaculum* (*T. soleae*), *Photobacterium* (G185) y *Vibrio* (*V. harveyi* y diversos *Vibrio* sp. -G7, G35, G107, G256-). Las tres especies patógenas detectadas (*T. soleae*, *P. baetica* y *V. harveyi*) abarcan los dos muestreos realizados. Por otro lado, aunque los tres patógenos coincidieron en un mismo muestreo, cada uno fue recuperado a partir de tomas de muestras y peces distintos. En adultos de lenguado las bacterias detectadas fueron *T. soleae*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *V. harveyi* y diversos *Vibrio* sp. (G7, G35), recuperándose cada una de las especies patógenas a partir de muestreos distintos. En adultos de rombo la única bacteria aislada fue *T. soleae*, a partir de un único individuo enfermo. Sin embargo, ningún aislado fue recuperado del único episodio de mortalidad importante registrado en esta especie.

Las condiciones en las que fueron aisladas las cepas de los distintos grupos de aislados, así como la sintomatología que presentaban los peces afectados, se resume en la Tabla 70.

Tabla 67. Bacterias detectadas en los muestreos realizados en cultivos de acedía.

Edad	Referencia muestreo	Fecha	Síntomas observados	Mortalidad	T [§]	Bacterias detectadas
Larva	A1-LA10 [*]	Febrero 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	20	<i>Vibrio</i> sp. relacionados con <i>V. splendidus</i> (G7, G107) y <i>V. alginolyticus</i> (G148)
	A1S-1 [#]	Febrero 2005	Peces sanos	Ninguna	20	<i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. splendidus</i> (G107)
Alevín	A2-B110	Octubre 2004	Úlceras en piel y aleta caudal, hígado pálido (anemia) en algún caso	Baja	20	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (G1), <i>V. harveyi</i> (G91); se detectaron bacterias filamentosas en improntas de úlceras que no crecieron en placa
	A2-SE1	Marzo-mayo 2005	Úlceras en aleta caudal, piel con zonas de descamación; en algún caso sin síntomas externos, con apatía o pérdida de equilibrio (natación errática, en espiral)	Alta/baja según muestra	19-21	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (G1), <i>V. tapetis</i> (G255), <i>Vibrio</i> spp. incluyendo cepas relacionadas con <i>V. splendidus</i> y <i>V. alginolyticus</i> (G7, G241, G256); se detectaron bacterias filamentosas en improntas de úlceras que no crecieron en placa; <i>T. soleae</i> (G47) fue detectado mediante PCR [§]
	A2-SE1 (2)	Agosto 2006	Zona visceral inflamada, en algún caso aleta caudal erosionada	Alta	19	<i>Polaribacter</i> sp. (G500)
	A2-SE31	Abril-agosto 2004	Aleta caudal ulcerada	Baja	19-22	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (G1), <i>V. harveyi</i> (G91), <i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. splendidus</i> (G7); se detectaron bacterias filamentosas en improntas de úlceras que no crecieron en placa
Juvenil	A3-B110	Marzo-mayo 2005	Úlceras en piel, zona opercular, aleta caudal o en aleta anal; en algún caso hígado necrosado, distensión abdominal, apatía, o sin ningún síntoma externo	Alta	12-19	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (G1), <i>Photobacterium</i> sp. (G197), <i>V. tapetis</i> (G255), diversos <i>Vibrio</i> sp. incluyendo cepas relacionadas con <i>V. splendidus</i> (G35, G107, G256); se detectaron bacterias filamentosas en improntas de úlceras que no crecieron en placa; <i>T. soleae</i> (G47) fue detectado mediante PCR [§]
	A3-B19	Diciembre 2004	Úlceras en piel o aleta caudal, en algún caso hígado pálido (anemia) o necrosado	Alta	16	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (G1), <i>Vibrio harveyi</i> (G91), <i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. splendidus</i> (G107)
	A3-LA9	Octubre 2004	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	Puntual	20	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (G1), <i>V. harveyi</i> (G91), diversos <i>Vibrio</i> sp. incluyendo cepas relacionadas con <i>V. alginolyticus</i> (G5, G241)
	A3-MA	Abril-mayo 2006	Úlceras en zona opercular, aleta caudal o en aleta dorsal, hígado pálido (anemia) o hemorrágico; en algún caso sin síntomas externos	Alta	22	<i>T. soleae</i> (G47), <i>T. maritimum</i> (G443), <i>V. harveyi</i> (G91), diversos <i>Vibrio</i> sp. incluyendo cepas relacionadas con <i>V. splendidus</i> (G35, 107)
	A3-SE1	Marzo 2006	Aleta caudal ulcerada	Puntual	19	<i>T. maritimum</i> (G443), <i>Psychrobacter</i> sp. (G328), <i>Vibrio</i> sp. (G35)
	A3-SE1 (2) A3-SE85 [†]	Enero 2007 Septiembre-noviembre 2004	Aleta caudal inflamada, zona visceral inflamada Úlceras en aleta caudal, aleta dorsal o en zona opercular, zonas de descamación; en algún caso hígado pálido (anemia) o necrosado	Baja Alta	19 10-21	<i>T. maritimum</i> (G443) <i>Pseudoalteromonas</i> sp. (G1), <i>T. soleae</i> (G47), <i>V. harveyi</i> (G91), diversos <i>Vibrio</i> sp. incluyendo cepas relacionadas con <i>V. splendidus</i> (G7, G29, G35)
Adulto	A4-B16	Enero-marzo 2006	Sin síntomas externos, hígado frecuentemente alterado (necrosado, inflamado o hemorrágico); en algún caso pequeñas lesiones en aleta caudal	Baja	10-15	<i>Aliivibrio</i> sp. (G54), <i>Photobacterium</i> sp. (G185), <i>P. baetica</i> (G390), <i>T. soleae</i> (G47), <i>V. harveyi</i> (G91), diversos <i>Vibrio</i> sp. incluyendo cepas relacionadas con <i>V. splendidus</i> (G7, G35, G107, G256)
	A4-SE	Diciembre 2007	Úlceras en aleta caudal y rostro, pérdida de equilibrio, alteración del comportamiento	Puntual	20	<i>P. baetica</i> (G390)

[§] Temperatura del agua en el momento del muestreo, en grados centígrados; ^{*} larvas de 30 días en metamorfosis; [#] larvas sanas de 8-15 días; [†] algunos de los peces muestreados eran alevines; [§] ver la parte 4.5 de esta memoria

Tabla 68. Bacterias detectadas en los muestreos realizados en cultivos de lenguado senegales.

Edad	Referencia muestreo	Fecha	Sintomas observados	Mortalidad	T	Bacterias detectadas
Larva	L1-LA5	Mayo-junio 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	20	<i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. alginolyticus</i> (G241)
Alevin	L2-BI5	Febrero 2005	Úlceras en aleta caudal, dorsal o anal	Baja	16	<i>Vibrio</i> spp. relacionados con <i>V. alginolyticus</i> (G148) y <i>V. splendidus</i> (G107)
Juvenil	L3-AR	Mayo 2006	Úlceras y descamación en abultamientos en zonas ventral y dorsal	Puntual	19	<i>T. soleae</i> (G47)
	L3-SE	Junio 2004	Úlcera en aleta caudal y piel	Puntual	19	<i>Vibrio harveyi</i> (G91), <i>Vibrio</i> sp. (G35)
	L3-UM	Octubre 2005	Sin síntomas externos, hígado hemorrágico	Alta	22	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (G321)
Adulto	L4-BI5	Mayo-junio 2005	Coloración oscura, distensión abdominal; hígado hemorrágico, bazo inflamado o con granulomas blanquecinos, ascitis, congestión de la zona visceral; a veces sin ningún síntoma externo	Alta	19-21	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (G321), <i>Vibrio</i> sp. (G7, G35)
	L4-EXT*	Julio 2004	Aleta caudal ulcerada, úlceras cutáneas, hígado en algún caso ligeramente hemorrágico	Alta	21	<i>V. harveyi</i> (G91), <i>Vibrio</i> sp. (G35)
	L4-SE	Marzo 2006	Hemorragias en zona ventral, boca y aletas dorsal y anal, hígado hemorrágico en algún caso	Alta	19	<i>T. soleae</i> (G47)

* Dinoflagelado (*Amyloodinium*) en branquias de los peces afectados

Tabla 69. Bacterias detectadas en los muestreos realizados en cultivos de rombo.

Edad	Referencia muestreo	Fecha	Sintomas observados	Mortalidad	T	Bacterias detectadas
Larva	R1-LA2*	Febrero 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	20	<i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. alginolyticus</i> (G148)
	R1-LA6*	Febrero 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	20	<i>Vibrio</i> spp. relacionado con <i>V. alginolyticus</i> (G148) y <i>V. splendidus</i> (G7, G107)
	R1-LA7*	Febrero 2005	Sin síntomas aparentes	Alta	20	<i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. splendidus</i> (G107)
	R1S-1 [§]	Febrero 2005	Peces sanos	Ninguna	20	<i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. alginolyticus</i> (G148)
	R1S-2 [§]	Febrero 2005	Peces sanos	Ninguna	20	<i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. splendidus</i> (G7, G107)
Alevin	R2-LA	Mayo 2005	Aleta dorsal ulcerada	Baja	20	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. (G1), <i>Vibrio</i> sp. relacionado con <i>V. alginolyticus</i> (G241)
Adulto	R4-BI	Enero 2006	Úlceracutánea dorsal, falta de apetito	Puntual	10	<i>T. soleae</i> (G47)
	R4-BI (2)	Agosto 2007	Hemorragias en aletas y zona ventral; hígado hemorrágico, zona visceral congestionada	Alta	20	No se obtuvo ningún aislado

* Larvas de 17-20 días en metamorfosis; [§] larvas de 19-31 días en metamorfosis

Tabla 70. Condiciones en las que fueron aisladas las cepas de los 19 fenones establecidos.

	M*	Especie y fase de cultivo	T**	Síntomas en peces <i>destetados</i> ***	Tipo de muestra
Familia Flavobacteriaceae					
<i>Polaribacter</i> sp. (Fenón G500)	1	Acedía (A [§])	19	Inflamación de la zona visceral	Órganos internos
<i>Tenacibaculum soleae</i> (Fenón G47)	6	Acedía (A, J, AD), lenguado (J, AD), rombo (AD)	10-22	Zonas de descamación; úlceras en piel, zona opercular o aletas; en un caso hemorragias en boca, zona ventral y aletas; en ocasiones sin síntomas externos; internamente sin síntomas, o bien hígado necrosado o ligeramente hemorrágico; en un caso, falta de apetito	Lesiones externas y órganos internos por igual
<i>Tenacibaculum maritimum</i> (Fenón G443)	3	Acedía (J)	19-22	Úlceras en aleta caudal o zona opercular; en un caso zona visceral inflamada; internamente sin síntomas o hígado pálido (anemia) o ligeramente hemorrágico	Lesiones externas
Familia Moraxellaceae					
<i>Psychrobacter</i> sp. (Fenón G328)	1	Acedía (J)	19	Úlceras en aleta caudal	Lesiones externas
Familia Pseudoalteromonadaceae					
<i>Pseudoalteromonas</i> spp. (Fenón G1)	8	Acedía (A, J), rombo (A)	12-21	Úlceras, generalmente en aleta caudal	Generalmente lesiones externas, también órganos internos
Familia Pseudomonadaceae					
<i>Pseudomonas baetica</i> (Fenón G390)	2	Acedía (AD)	14-20	En la mayor parte de los casos sin ningún síntoma ni externo ni interno; en un caso úlceras y alteración del comportamiento	Órganos internos
Familia Vibrionaceae					
<i>Aliivibrio</i> sp. (Fenón G54)	1	Acedía (AD)	11-12,5	Sin síntomas externos, hígado necrosado o ligeramente hemorrágico	Órganos internos
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (Fenón G321)	2	Lenguado (J, AD)	19-22	Melanosis, distensión abdominal, a veces sin síntomas externos; hígado hemorrágico, bazo con frecuencia inflamado o con granulomas	Órganos internos
<i>Photobacterium</i> sp. (Fenón G185)	1	Acedía (AD)	12,5	Sin síntomas externos, hígado inflamado	Órganos internos
<i>Photobacterium</i> sp. (Fenón G197)	1	Acedía (J)	12-19	Úlceras en piel y aletas	Lesiones externas
<i>Vibrio harveyi</i> (Fenón G91)	9	Acedía (A, J, AD), lenguado (J, AD)	10-22	Úlceras en piel, zona opercular y aletas; a veces sin síntomas externos; internamente sin síntomas o bien hígado pálido (anemia) o ligeramente hemorrágico	Generalmente lesiones externas, también órganos internos
<i>Vibrio</i> sp. (Fenón G7) [#]	7	Acedía (L, A, J, AD), lenguado (AD), rombo (L)	12,5-21	Generalmente úlceras; internamente sin síntomas, en algún caso hígado necrosado o hemorrágico	Lesiones externas y órganos internos
<i>Vibrio</i> sp. (Fenón G29)	1	Acedía (J)	21	Cuadro ulcerativo	Lesiones externas y órganos internos
<i>Vibrio</i> sp. (Fenón G35)	9	Acedía (J, AD), lenguado (AD)	10-22	Úlceras en piel o aletas; internamente generalmente sin síntomas, en algún caso hígado pálido (anemia) o ligeramente hemorrágico	Generalmente lesiones externas, en algún caso órganos internos
<i>Vibrio</i> sp. (Fenón G107) [#]	8	Acedía (L, J, AD), lenguado (A), rombo (L)	10-22	Úlceras en piel o aletas; internamente generalmente sin síntomas, en algún caso hígado pálido (anemia) o necrosado	Lesiones externas y órganos internos
<i>Vibrio</i> sp. (Fenón G148) [¶]	4	Acedía (L), lenguado (A), rombo (L)	16-20	Úlceras en aleta caudal	Lesiones externas y órganos internos
<i>Vibrio</i> sp. (Fenón G241) [¶]	4	Acedía (A, J), lenguado (L), rombo (A)	19-20	Zonas de descamación, úlceras en aleta caudal	Lesiones externas
<i>Vibrio</i> sp. (Fenón G256)	3	Acedía (A, J, AD)	10-20	Úlceras en aletas	Lesiones externas y órganos internos
<i>Vibrio tapetis</i> (Fenón G255)	2	Acedía (A, J)	11,5-20	Úlceras en piel, aletas o zona opercular	Lesiones externas

* Número de muestreos en los que fue detectado; ** Temperatura del agua en grados centígrados; *** En larvas el único síntoma observado fue la alta mortalidad; § Edad de los peces: L, larva; A, alevín; J, juvenil; AD, adulto; # Relacionados con *V. splendidus*; en el caso del fenón G7 las especies más próximas fueron *V. crassostreae* y *V. gigantis*. ¶ Relacionados con *V. alginolyticus*.

4.5. DESARROLLO DE MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN BASADOS EN LA PCR

▪ Análisis de la región ITS1

El análisis de la región ITS1 se realizó fundamentalmente para detectar secuencias específicas para cada uno de los fenones patógenos encontrados, susceptibles de ser utilizadas para el desarrollo de métodos moleculares de identificación basados en la técnica de la PCR. Las cepas utilizadas para el análisis de la región ITS1 y los resultados obtenidos para cada una de ellas se resumen en la Tabla 71.

Tabla 71. Cepas utilizadas para el análisis de la región ITS1 y principales características de las secuencias obtenidas.

Cepa	Número de bandas de amplificación	Número de acceso de la secuencia	Longitud de la región ITS1 (pb)	Genes tRNAs presentes
<i>Tenacibaculum soleae</i> a11	1	FN646547 ^c *	586	Ile, Ala*
		FN646548	586	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum soleae</i> a47	1	FN646550 ^c	588	Ile, Ala
		FN646549	588	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum soleae</i> a50	1	FN646554	595	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum soleae</i> a216	1	FN646551 ^c	586	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum soleae</i> a410	1	FN646553 ^c	586	Ile, Ala
		FN646552	586	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum soleae</i> a462	1	FN646555	596	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum soleae</i> a467	1	FN646556 ^c	594	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum soleae</i> a469	1	FN646557 ^c	593	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum maritimum</i> a274	1	FN646558	541	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum maritimum</i> a388	1	FN646559	541	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum maritimum</i> a443	1	FN646560	540	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum maritimum</i> a461	1	FN646561	540	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum maritimum</i> a523	1	FN646562	541	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum</i> sp. a3	1	FN646563	574	Ile, Ala
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i> LMG 13025	1	FN646564	548	Ile, Ala
<i>Polaribacter</i> sp. a502	1	FN646565	496	Ile, Ala
<i>Pseudomonas baetica</i> a390	1	FN646567	592	Ile, Ala
<i>Pseudomonas baetica</i> a391	1	FN646568	592	Ile, Ala
<i>Pseudomonas baetica</i> a393	1	FN646569	592	Ile, Ala
<i>Pseudomonas baetica</i> a398	1	FN646570	592	Ile, Ala
<i>Pseudomonas baetica</i> a399	1	FN646571	592	Ile, Ala
<i>Pseudomonas anguilliseptica</i> CECT 899 ^T	1	FN646566	534	Ile, Ala
<i>Psychrobacter</i> sp. a328	1	FN646572	584	Ile, Ala
<i>Psychrobacter</i> sp. a381	1	FN646573	584	Ile, Ala
<i>Photobacterium damsela</i> a316	2	FN646574 (bi)*	350	Ninguno
<i>Photobacterium damsela</i> a319	1	FN646575 (bi)	350	Ninguno
<i>Photobacterium damsela</i> a321	2	FN646576 (bi)	350	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a9	2	FN646577 (bi)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a10	2	FN646578 (bi)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a20	2	FN646579 (bi)	292	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a26	2	FN646580 (bi)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a30	2	FN646581 (bi)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a82	2	FN646582 (bi) ^c	277	Ninguno
		FN646583 (ab)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a91	2	FN646584 (ab)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a106	2	FN646585 (bi) ^c	277	Ninguno
		FN646586 (bs) ^c	277	Ninguno
		FN646587 (ab)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a417	2	FN646588 (ab)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a421	2	FN646589 (bi)	277	Ninguno
<i>Vibrio harveyi</i> a459	2	FN646590 (bi)	277	Ninguno

* c, secuencia clonada; bs, banda superior; bi, banda inferior; ab, ambas bandas; Ile, isoleucina; Ala, alanina.

- Amplificación de la región ITS1

Para la amplificación de la región ITS1 se utilizaron los cebadores descritos por Lee *et al.* (2002), obteniéndose distintos patrones de bandas en función del grupo de cepas utilizadas (Figura 56).

Las cepas de *T. soleae*, *T. maritimum* y *P. baetica* mostraron el mismo patrón en todos los casos, consistente en una sola banda de aproximadamente 1200 pb. Las cepas de *V. harveyi* mostraron también un único patrón, consistente en dos bandas principales, de aproximadamente 900-1000 y 1000-1100 pb, observándose en algún caso bandas muy tenues de mayor tamaño. En el caso de *P. damselae*, dos de las cepas mostraron dos bandas principales, de 1000 y 1100-1200 pb aproximadamente, mientras que la cepa restante solo mostró una banda clara, la de menor tamaño. No obstante, las tres cepas mostraron otras bandas más tenues de mayor tamaño.

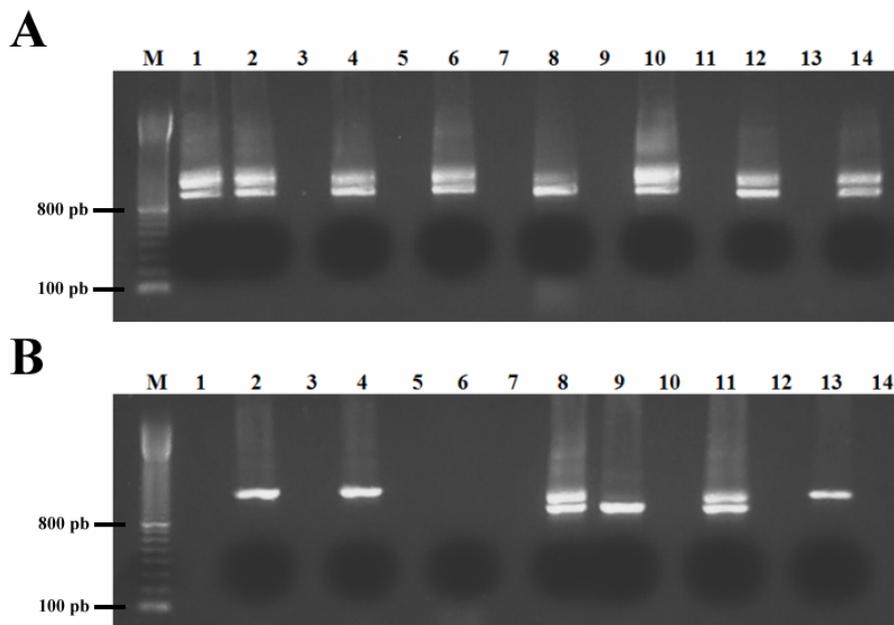


Figura 56. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación obtenidos con los cebadores universales 16/23S-F y 16/23S-R, descritos por Lee *et al.* (2002), con algunas de las cepas utilizadas en el análisis de la región ITS1. Los productos de amplificación incluyen la parte final del gen ARNr 16S, la región ITS1 completa y la parte inicial del gen ARNr 23S. A: M, marcador de peso molecular 100 pb ladder (Amersham Biosciences); líneas 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14: *Vibrio harveyi* a9, a10, a20, a26, a82, a91, a106 y a417, respectivamente; B: M, marcador de peso molecular 100 pb; líneas 1 y 2, *T. soleae* a467 y a469, respectivamente; líneas 8, 9 y 11, *P. damselae* subsp. *piscicida* a316, a319 y a321, respectivamente; línea 13, *T. maritimum* a443.

- Análisis de las secuencias ITS1

Los ITS1 obtenidos se clasificaron en función de los genes tRNA que contienen en dos clases distintas, los ITS1⁰, que no contienen ningún gen tRNA, y los ITS1^{IA}, que contienen los

genes tRNA^{Ile} (Isoleucina) y tRNA^{Ala} (Alanina). Dentro de cada clase se establecieron tipos en caso de observarse variaciones importantes debidas a la presencia de diferentes bloques de secuencias.

Las secuencias obtenidas a partir de la única banda de amplificación de las cepas de *T. soleae* mostraron la existencia de dos tipos de ITS1, ambos pertenecientes a la clase ITS1^{IA}. Las cepas a11, a47, a216 y a410 muestran una región ITS1 de 586-588 pb, compartiendo una similitud entre sí del 96,3-100%. Por otro lado, las cepas a50, a462, a467 y a469 muestran un ITS1 de 593-596 pb, con una similitud del 97,5-99,2%. Las secuencias de los dos tipos comparten una similitud del 90,6-92,9%. Estas diferencias se deben a la presencia de distintos bloques de secuencias dentro del ITS1 (Figura 57), no obstante dentro de cada grupo se dan diferencias en posiciones puntuales (transiciones y transversiones), no resultando ninguno de los tipos totalmente homogéneo. Es posible que cada cepa tenga una única clase y un único tipo de ITS1, dado que presentan una única banda de amplificación y no muestran ambigüedades en las secuencias obtenidas mediante secuenciación directa del producto de PCR (cepas a11, a47, a410, a50 y a462).

Las cepas de *T. maritimum* mostraron, al igual que las de *T. soleae*, una sola banda de amplificación, que fue secuenciada directamente. Los ITS1 obtenidos pertenecen en todos los casos a la clase ITS1^{IA}, situándose los genes tRNA^{Ile} y tRNA^{Ala} en la misma posición relativa que en el fenómeno anterior. Las secuencias de las distintas cepas presentan diferencias puntuales de nucleótidos, pero en ningún caso bloques de secuencias distintos como en las cepas de *T. soleae*, perteneciendo todas ellas a un único tipo. Los ITS1 tienen una longitud de 540-541 pb y muestran una similitud entre sí del 95,7-98,7%.

Las cepas de *V. harveyi* presentaron dos bandas de amplificación, de las cuales se purificó y secuenció la de menor tamaño. Las secuencias ITS1 obtenidas tienen un tamaño de 277 pb y presentan una similitud entre sí del 97,5-100%. La única excepción se da con la cepa a20, que tiene un ITS1 de 292 pb y muestra una similitud con las demás cepas del 91,1-93,5%. En todos los casos pertenecen a la clase ITS1⁰. Estas secuencias fueron comparadas con las publicadas para la cepa de referencia *V. harveyi* CGMCC 1.1593 (ATCC 33842). En esta cepa se han encontrado cuatro tipos de ITS1, uno de la clase ITS1^{IA}, otro que contiene tRNA^{Glu}, y dos tipos de la clase ITS1⁰. De estos últimos, el tipo 1 tiene 276 pb y muestra valores de similitud del 91,8% con la cepa a20 y de 94,9-97,5% con las demás cepas. El tipo 2 tiene 297 pb y muestra valores mucho menores, del 81,1% con la cepa a20 y de 79,1-80,5% con las demás. Como en el caso de *T. soleae*, las diferencias entre estas secuencias radican principalmente en la presencia de distintos bloques de secuencias, aunque también se dan diferencias en posiciones puntuales (Figura 58). La aparición de varias bandas de amplificación parece indicar que estas cepas poseen más de un tipo o clase de ITS1. No obstante, la secuenciación directa del producto de PCR de las cepas a82, a91 y a106 permitió obtener secuencias sin ambigüedades, mientras

		◀ 16S									
FN646551	a216	CACCTCCTTT	CTAGAGAAAG	ATGGTGAGTT	ACAAAAGGGA	AATTTTACTC	TTTGCTGTTA	ATTT-TAAA-	-ATACACTAA		
FN646553	a410
FN646547	a11
FN646550	a47
FN646556	a467
FN646557	a469
FN646555	a462
FN646554	a50
		◀ tRNA Ile ▶									
FN646551	a216	TAATAAGCTA	TTCTAGTCTC	GTAGCTCAGC	TGGTTAGAGC	GCTACACTGA	TAATGTAGAG	GTCGGCAGTT	CGAGTCTGCC		
FN646553	a410
FN646547	a11
FN646550	a47
FN646556	a467
FN646557	a469
FN646555	a462
FN646554	a50
		◀ tRNA Ala ▶									
FN646551	a216	CTAATCTCTA	CAATCTAATT	ACTATAAGCT	AGTATTAGGG	GGATTAGCTC	AGTTGGCTAG	AGCGCTTGCC	TTGCACGCAA		
FN646553	a410
FN646547	a11
FN646550	a47
FN646556	a467
FN646557	a469
FN646555	a462
FN646554	a50
		◀ tRNA Ala ▶									
FN646551	a216	GAGGTCATCG	GTTCGACTCC	GATATTCTCC	ACCAGGTAGC	ACCTGGAGGC	AATTTATTAA	AATTGTTTCA	GAGTGCTATA		
FN646553	a410
FN646547	a11
FN646550	a47
FN646556	a467
FN646557	a469
FN646555	a462
FN646554	a50
		◀ tRNA Ala ▶									
FN646551	a216	GGAATCAAGT	TGATA-----	--AAACACTT	ATCAATTCGG	ATTCACAAA-	-GTTTCATTGA	CATATTGGTA	AAATGATATC		
FN646553	a410
FN646547	a11
FN646550	a47	A.....T.
FN646556	a467	..C.GATT..	..C..CAAGT	TT..T...	G..G.GG..	..C..G.C.CA	C.....
FN646557	a469	..C.GATT..	..C..CAAGT	TT..T...	G..G.GG..	..C..G.C.CA	C.....
FN646555	a462	..C.GATT..	..C..CAAGT	TT..T...	G..G.GG..	..C..G.C.CA	C.....
FN646554	a50	..C.GATT..	..C..CAAGT	TT..T...	G..G.GG..	..C.GG.C.CA	C.....
		◀ tRNA Ala ▶									
FN646551	a216	GTAAGAAAT	CAAGATAGAG	AAGTTAAATT	AATATTTAAC	AACAATATTT	TTATAAAAAT	AA-TAATTAT	AAAGAGCTCG		
FN646553	a410
FN646547	a11
FN646550	a47
FN646556	a467
FN646557	a469
FN646555	a462
FN646554	a50
		23S ▶									
FN646551	a216	TTCTAAATAG	CAATATTTAG	AGCAAAAAGT	ACAATAAGCT	AAATAAGGGC	GTATGGCGG				
FN646553	a410
FN646547	a11
FN646550	a47	AG.....
FN646556	a467
FN646557	a469
FN646555	a462	T.....
FN646554	a50

Figura 57. Alineamiento de la región ITS1 de las distintas cepas de *T. soleae* aisladas en este trabajo. El extremo 3' del gen ARNr 16S, el 5' del gen ARNr 23S, y los genes tRNA presentes se muestran en gris. Los puntos indican identidad nucleotídica mientras que los guiones representan deleciones con respecto a la secuencia representativa.

		◀ 16S									
FN646588	a417	CACCTCCTTA	TACGATGATT	AYTCACGATG	AGTGTCCACA	CAGATTGATA	G TTCACAAGC	GCAAGCTTGT	AGCTAACATA		
FN646589	a421		
FN646584	a91C.....		
FN646590	a459C.....		
FN646579	a20C.....		
FN646582	a82T.....		
FN646587	a106T.....		
FN646581	a30T.....		
FN646580	a26T.....		
FN646578	a10T.....		
FN646577	a9T.....		
DQ095212	C.....A.....		
DQ095213	C.....A.....		
FN646588	a417	GCTCTTTAAC	AATTTGGAAA	GCTGACAAA	CAAM-----	----MWTTC	AWKG----TT	GTTTGTAAG	TTCTCAATGT		
FN646589	a421		
FN646584	a91C-----	----AA...	.TT-----		
FN646590	a459C-----	----AA...	.TT-----		
FN646579	a20TCCTTGT	CTTTAAA.AG	.TA.GAGA..		
FN646582	a82C-----	----AA...	.TT-----		
FN646587	a106C-----	----AA...	.TT-----		
FN646581	a30C-----	----AA...	.TT-----		
FN646580	a26C-----	----AA...	.TT-----		
FN646578	a10C-----	----AA...	.TT-----		
FN646577a9	C-----	----AA...	.TT-----		
DQ095212	C-----	----AAA...	.TT-----		
DQ095213	T-----	----C...	.AGA----A...		
FN646588	a417	TTGTCTTTAT	GACAAACACC	AATACAACAC	ATTCAAGTGT	TCTTGGA---	-----	-----ATTT	GAGTCCGGCA		
FN646589	a421		
FN646584	a91		
FN646590	a459		
FN646579	a20		
FN646582	a82C		
FN646587	a106C		
FN646581	a30C		
FN646580	a26C		
FN646578	a10		
FN646577	a9		
DQ095212	A.....		
DQ095213		A.-...A..	TGA.T..T..GTTT	TGCGAAAGCA	AAACAT....		
FN646588	a417	AAATCGAG--	---TCTGCAT	CATGTATAAA	AATGTCAGAC	AACTTTGGTG	ACTTGTTTCAT	CAACTCGAAA	CTCCTTCGGG		
FN646589	a421--	---		
FN646584	a91--	---		
FN646590	a459--	---		
FN646579	a20--	---		
FN646582	a82--	---		
FN646587	a106--	---		
FN646581	a30--	---		
FN646580	a26--	---		
FN646578	a10--	---		
FN646577	a9--	---		
DQ095212	--	---T...A-.T.		
DQ095213	AAG	CTA...CGC.	...TC.A.T.	.TGA.ATAG.T	GT..AA-.T.	...T.....		
		23S ▶									
FN646588	a417	TTGTATGGTT	AAGTGA								
FN646589	a421								
FN646584	a91								
FN646590	a459								
FN646579	a20								
FN646582	a82								
FN646587	a106								
FN646581	a30								
FN646580	a26								
FN646578	a10								
FN646577	a9								
DQ095212									
DQ095213									

Figura 58. Alineamiento de la región ITS1 de cepas de *V. harveyi* aisladas en este trabajo junto con los dos tipos de ITS1⁰ encontrados en la cepa de referencia *Vibrio harveyi* CGMCC 1.1593 (tipo 1, secuencia con número de acceso DQ095212; tipo 2, DQ095213). El extremo 3' del gen ARNr 16S y el extremo 5' del gen ARNr 23S se muestran en gris. Los puntos indican identidad nucleotídica mientras que los guiones representan deleciones con respecto a la secuencia representativa. Las posiciones indeterminadas corresponden a K=G/T, M=A/C, W=A/T, Y=C/T.

que la clonación y secuenciación de las dos bandas de amplificación principales de la cepa a106 dio como resultado secuencias similares, por lo que habría que determinar si la aparición de varias bandas pueda deberse a otras causas, como configuraciones secundarias del ADN.

Las cepas de *P. damsela*e presentaron asimismo dos bandas de amplificación, de las cuales se purificó y secuenció la de menor tamaño. En todos los casos se trata de ITS1 de clase ITS1⁰, de 350 pb, con una similitud entre sí del 99,7-100%. No presentan bloques de secuencias diferentes, perteneciendo a un único tipo. Estas secuencias fueron comparadas con los ITS1⁰ descritos por Osorio *et al.* (2005) para cuatro cepas de *P. damsela*e, dos pertenecientes a la subespecie *piscicida* (ATCC 29690 y DI21) y dos a la subespecie *damsela*e (ATCC 33539^T y RG-91). De estas, la ATCC 29690 es similar a las cepas del fenón G321 (99,7-100% similitud), diferenciándose las demás en la composición de bloques de secuencias (Figura 59), y presentando porcentajes de similitud más bajos (93,1-93,4% en el caso de la DI21 y del 83,3-83,7% las cepas de la subespecie *damsela*e). La presencia de otras bandas de amplificación probablemente se deba a la existencia de otras clases de ITS1, ya descritas en otras cepas de *P. damsela*e (Osorio *et al.* 2005).

Las cepas de *P. baetica* mostraron una única banda de amplificación que fue secuenciada directamente. Las secuencias ITS1 obtenidas corresponden a un único tipo, perteneciente a la clase ITS1^{IA}, tienen una longitud de 592 pb y son prácticamente idénticas, mostrando un porcentaje de similitud entre sí del 99,2-100%.

La estructura secundaria de los genes tRNA encontrados en las secuencias de *T. soleae*, *T. maritimum* y *P. baetica* se muestra en la Figura 60. En todos los casos presentan la típica estructura en forma de “hoja de trébol” y presentan un brazo extra corto, perteneciendo a la clase 1 de tRNAs. Los tRNA^{Ile} mostraron en todos los casos una longitud de 74 pb y el anticodon GAT. Los de *T. soleae* y *T. maritimum* son similares, pero muestran diferencias con los de *P. baetica* en 18 nucleótidos, la mayor parte de ellos situados en el brazo aceptor (10) y el brazo anticodon (6) del tRNA. Los tRNA^{Ala} tienen una longitud de 74 pb en las cepas de *T. soleae* y *T. maritimum*, y de 73 pb en las de *P. baetica*, siendo en todos los casos el anticodon TGC. También en este caso los de *T. soleae* y *T. maritimum* son similares (se diferencian únicamente en una base, en el brazo D), pero se diferencian de los de *P. baetica* en 13 nucleótidos (6 de ellos en el brazo aceptor).

- Análisis filogenético basado en las secuencias ITS1

Para el análisis filogenético de los fenones basado en la región ITS1, se utilizaron las especies más cercanas de acuerdo al programa BLAST, así como cepas de referencia que no presentaban secuencias publicadas en la base de datos GenBank, utilizándose en todos los casos

		◀ 16S							
FN646575	a319	CACCTCCTTA	CAAAAAAGAC	TGCGTTTTAC	GCAGTGTCCA	CACAGATTGC	TTGGTGAAAT	GGTTTTAGAA	ATAGCAAAAG
AJ274378		//							
FN646574	a316Y..M.
FN646576	a321
AJ274375		//							
AJ274377		//							
AJ274376		//							
FN646575	a319	TGCTAATGAA	TAACATAAGT	TATTGATTAA	CGCTTTTGGC	TTATGCTCTT	TAACAATCTG	GAAAGCTGAC	TAGTAAATTC
AJ274378		...G....	...G....
FN646574	a316
FN646576	a321
AJ274375	T...
AJ274377	
AJ274376	
FN646575	a319	AATCGAATGA	TTGATTTATT	TTAAGTTTTT	ATCGAAAGAT	AAAAACGAGT	TCTCAAACA	AACACATTCA	AGTGTCTTGT
AJ274378	
FN646574	a316
FN646576	a321
AJ274375	
AJ274377		...A....	G.....
AJ274376	
FN646575	a319	GTTTTTTGYC	TTCACTTTTT	AAAAGTGAAA	GCAAATAGTG	AGTCCGGCGA	AMCAACGTCT	ATCACAACCTC	AGATAGACAA
AJ274378	AA.A.....
FN646574	a316T.N.....
FN646576	a321T.N.....
AJ274375	T.A-----	-----	.C...A.-
AJ274377		-----AA.A-----	-----	.C...A.-
AJ274376	T.A.....
		23S ▶							
FN646575	a319	CCTTGTTTGT	TGAGCCATAC	GAAACCTCTT	GGGGTTGTAT	GGTTAAGTGA			
AJ274378	TGAA.....	//			
FN646574	a316	//			
FN646576	a321	//			
AJ274375	T....A....	//			
AJ274377		//			
AJ274376		//			

Figura 59. Alineamiento de la región ITS1 de las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* junto con las secuencias publicadas para las cepas *P. damsela* subsp. *piscicida* DI21 y ATCC 29690 (números de acceso AJ274375 y AJ274376, respectivamente) y *P. damsela* subsp. *damsela* ATCC 33539^T y RG91 (AJ274377 y AJ274378 respectivamente). El extremo 3' del gen ARNr 16S y el extremo 5' del gen ARNr 23S se muestran en gris. Los puntos indican identidad nucleotídica mientras que los guiones representan deleciones con respecto a la secuencia representativa. Las posiciones indeterminadas corresponden a M=A/C, Y=C/T.

secuencias ITS1 de la misma clase. En la Tabla 72 se muestran los porcentajes de similitud entre cepas representativas de los distintos fenones, pudiendo observarse que las secuencias ITS1 permiten una fácil discriminación interespecífica.

El análisis de la región ITS1 situó las cepas de *T. soleae* y *T. maritimum* dentro del género *Tenacibaculum*, diferenciándolas fácilmente de especies relacionadas pertenecientes a otros géneros de la familia *Flavobacteriaceae*. La cepa *T. soleae* a47 mostró como cepas más próximas a *T. ovolyticum* LMG 13025 (85,2% similitud), *Tenacibaculum* sp. a3 (79,1%), *Polaribacter* sp. a502 (72,3%), *T. maritimum* a523 (71,9%), *Flavobacterium columnare* IAM 1430 (65,7%), *Flavobacterium johnsoniae* ATCC 17061 (65,5%) y *Flavobacterium branchiophilum* ATCC 35035 (65,3%), mostrando otras cepas valores por debajo del 65%. La

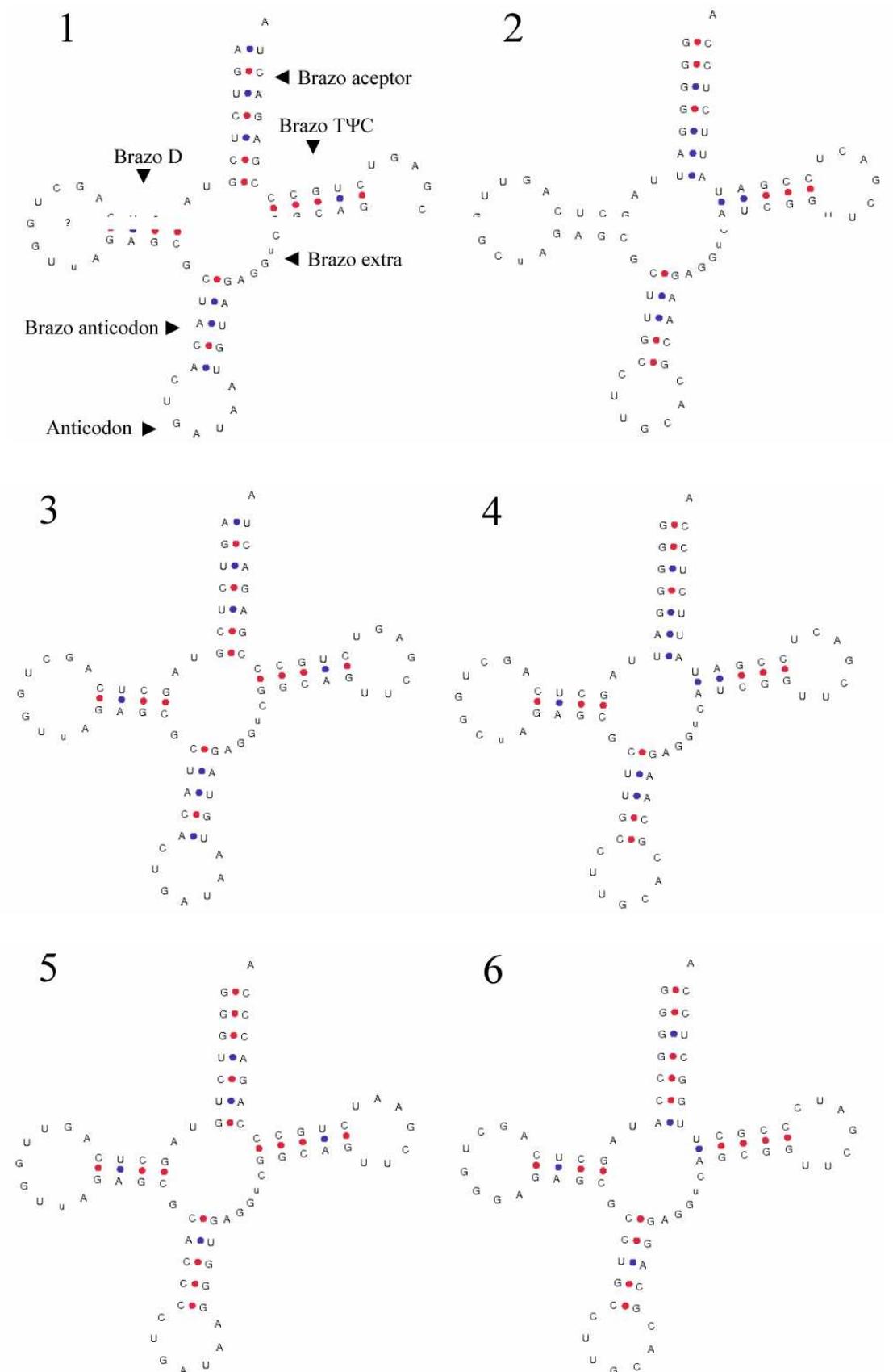


Figura 60. Representación de la estructura secundaria de los tRNAs presentes en la región ITS1 de *T. soleae* a47 (1, tRNA^{Ile}; 2, tRNA^{Ala}), *T. maritimum* a523 (3, tRNA^{Ile}; 4, tRNA^{Ala}) y *P. baetica* a390 (5, tRNA^{Ile}; 6, tRNA^{Ala}).

Tabla 72. Porcentajes de similitud entre las secuencias ITS1^{IA} y ITS1⁰ de cepas representativas de las especies patógenas encontradas en peces planos cultivados *T. soleae* (a47, a216, a462, a469), *T.maritimum* (a274, a523), *V. harveyi* (a20, a91), *P. damsela* subsp. *piscicida* (a321) y *P. baetica* (a390). A efectos comparativos se incluyeron también las cepas *Tenacibaculum* sp. a3, *Polaribacter* sp. a502 y *Psychrobacter* sp. a328. Excepto para las cepas a20, a91 y a321, todas las secuencias son de clase ITS1^{IA}.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. FN646550 a47													
2. FN646551 a216	97,3												
3. FN646555 a462	91,3	91,4											
4. FN646557 a469	92,1	92,6	97,5										
5. FN646558 a274	70,2	71,2	71,6	69,6									
6. FN646562 a523	71,9	73,4	73,3	72,3	97,8								
7. FN646563 a3	79,1	80,0	79,4	80,1	72,5	73,7							
8. FN646565 a502	72,3	73,5	71,3	71,0	75,2	76,2	73,0						
9. FN646572 a328	52,2	52,2	51,5	51,1	48,3	48,8	52,2	49,3					
10. FN646567 a390	54,4	53,7	54,5	55,0	49,2	49,7	54,6	51,0	54,4				
11. FN646579 a20	32,5	32,4	32,6	32,2	36,0	35,9	33,4	39,5	35,6	35,6			
12. FN646584 a91	32,0	32,4	32,6	32,2	34,0	33,6	32,8	37,3	33,6	34,1	93,5		
13. FN646576 a321	39,1	39,8	39,4	39,3	40,5	41,4	38,3	43,5	39,9	37,5	54,9	55,1	

cepa *T. maritimum* a523 mostró unos resultados parecidos. La cepa más cercana fue *T. ovolyticum* LMG 13025 (76,8%), seguida de *Polaribacter* sp. a502 (76,2%), *Tenacibaculum* sp. a3 (73,7%) y *T. soleae* a469 (72,3%), mostrando otras especies valores de similitud por debajo del 65%.

El árbol filogenético construido a partir de estas secuencias se muestra en la Figura 61. Las cepas pertenecientes a una misma especie aparecen claramente agrupadas entre sí y diferenciadas de las demás (valores de *bootstrap* de 79-100), pero muestran también variaciones intraespecíficas significativas. Las más importantes se dan entre las cepas de *T. soleae*, que forman dos clados principales, correspondientes a los dos tipos de ITS1 encontrados, dándose variaciones también dentro de estos. Estas variaciones no parecen, sin embargo, tener relación ni con el serotipo (las cepas a47 y a469 pertenecen al mismo serotipo pero presentan ITS1 de distinto tipo) ni con el brote o hospedador a partir del cual fueron aisladas las cepas (las cepas a47 y a50 fueron aisladas en el mismo muestreo pero presentan ITS1 de distinto tipo).

En *T. maritimum*, las dos cepas pertenecientes al serotipo O1 (a274 y a388) forman un clado aparte, aunque sería necesario analizar más cepas para determinar si esta relación es debida al azar o no.

Las secuencias ITS1 obtenidas a partir de las cepas de *V. harveyi* mostraron ser similares a las descritas para otras especies próximas como *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus*, no siendo por tanto de utilidad para la diferenciación de este grupo de especies. La cepa *V. harveyi* a91 mostró alta similitud con *V. alginolyticus* IID950 (ITS1 tipo 2, 99,0%), *V. parahaemolyticus* ATCC 178021 (98,6%), *V. harveyi* CGMCC 1.1593 (ITS1 tipo 1, 97,5%), *V. campbellii* ATCC 25920 (93,9% similitud), *V. splendidus* ATCC 33125 (ITS1 tipo 3, 92,1%) y *V. furnissii* CGMCC 1.1612 (81,0%). Las cepas más cercanas, pertenecientes a otros géneros de la familia *Vibrionaceae*, fueron *Listonella anguillarum* NCIMB 829, *Aliivibrio logei* IAM

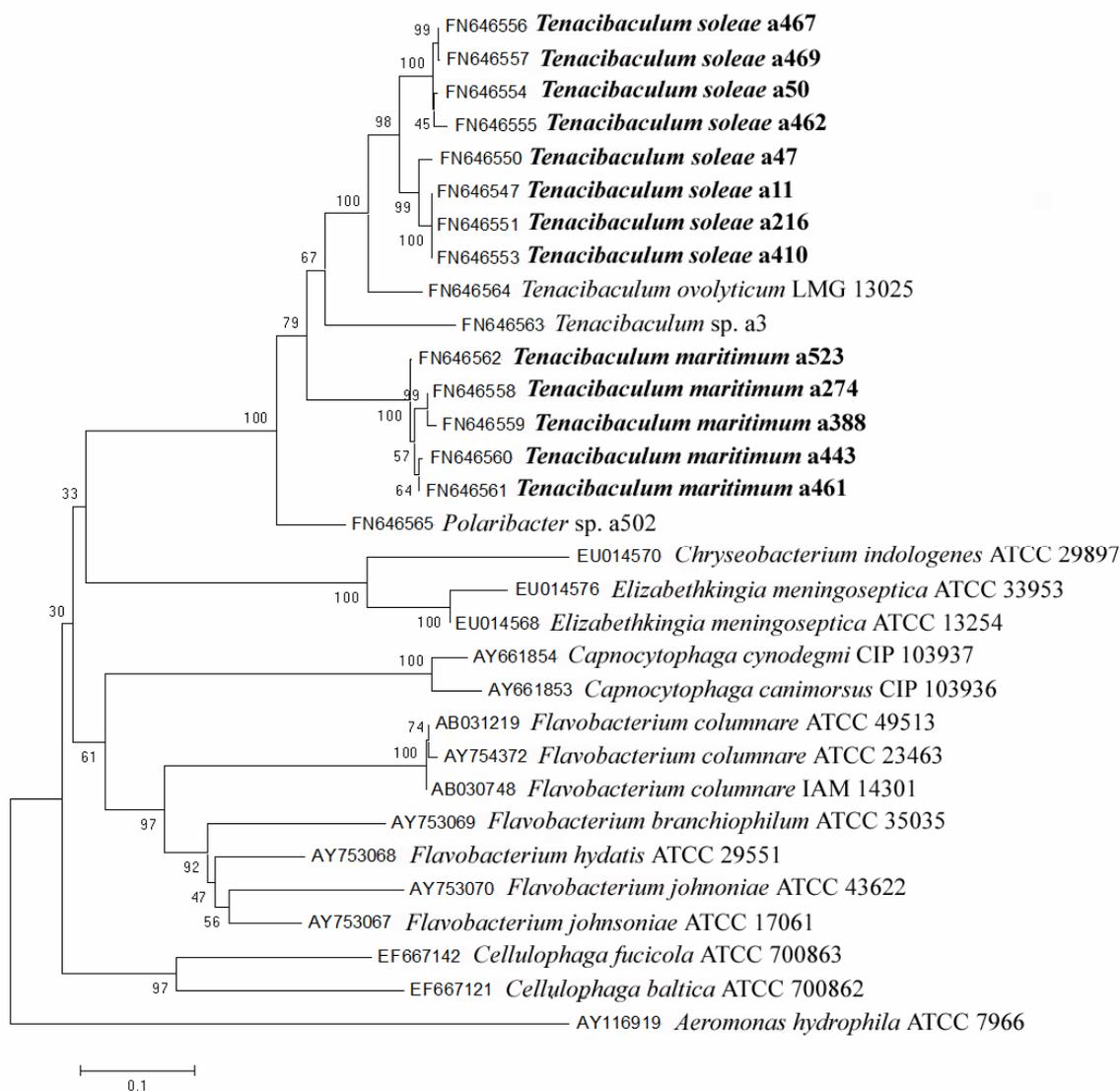


Figura 61. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS1 de las cepas de *T. soleae*, *T. maritimum* y especies relacionadas. Todas las secuencias utilizadas son de clase ITS1^{IA}. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

14405, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* ATCC 17911 y *Salinivibrio costicola* ATCC 33508, todas con valores mucho más bajos (66,3%, 69,6%, 64,7% y 58,5%, respectivamente).

No obstante se dieron grandes diferencias dependiendo del tipo de ITS1 analizado, tanto si proviene de distintas cepas de una especie como son de una misma cepa. Así, por ejemplo, la cepa *V. alginolyticus* IID950 muestra cuatro tipos de ITS1⁰, con valores de similitud con la cepa a91 de 86,7%, 99,0%, 98,6% y 77,3%, respectivamente; mientras que los de las cepas *V. alginolyticus* PD2 y CGMCC 1.1833 presentan valores de 79,8% y 49,5%, respectivamente.

Resultados similares se obtuvieron con los ITS1 de *V. splendidus* ATCC 33125. El tipo 3 muestra una similitud del 92,1%, mientras los tipos 1, 2 y 4 presentan valores de solo el 48,9-55,8%. En la Figura 62 se muestra el árbol filogenético construido a partir de estas secuencias.

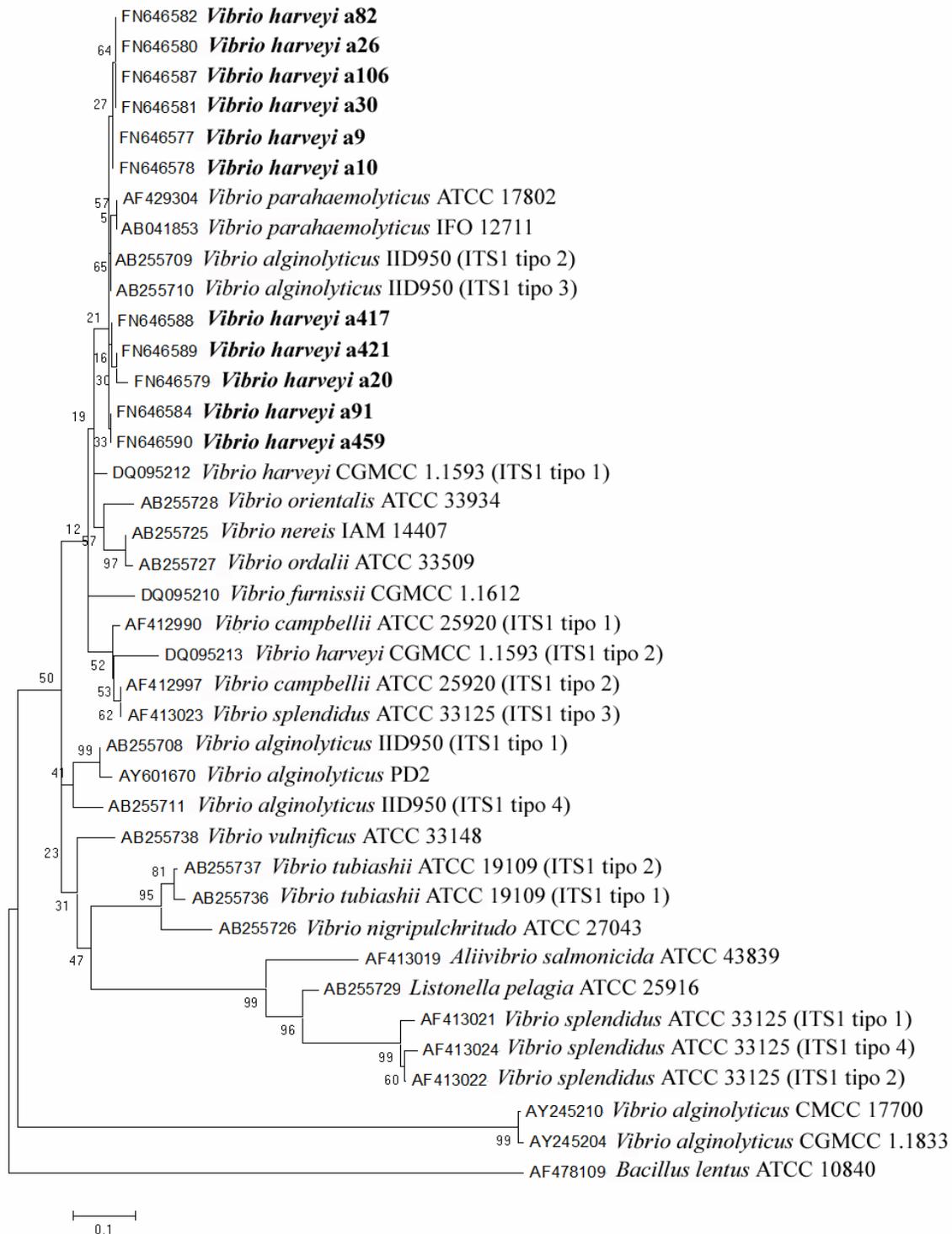


Figura 62. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS1 de las cepas de *V. harveyi* y especies relacionadas. Todas las secuencias utilizadas son de la clase ITS1⁰. La secuencia de *Bacillus lentus* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Las cepas obtenidas en este trabajo aparecen agrupadas con secuencias de *V. parahaemolyticus* y *V. alginolyticus* y muy próximas a las publicadas para *V. harveyi*, pero no es posible discriminar las cepas de estas tres especies. Entre las aisladas en este trabajo, las cepas a26, a30,

a82 y a106, diferenciables bioquímicamente de las demás por ser sacarosa negativas, forman un clado aparte, pero con valores de *bootstrap* no significativos (Figura 62).

Las secuencias ITS1 de las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* coincidieron con algunas de las publicadas previamente para esta especie. La cepa *P. damsela* a321 mostró como cepas más próximas a *P. damsela* subsp. *piscicida* ATCC 29690 (100% similitud), *P. damsela* subsp. *damsela* RG91 (88,3%), *P. profundum* SS9 (81,5%) y *P. phosphoreum* CIP 102511 (79,8%). Cepas pertenecientes a otros géneros de la familia *Vibrionaceae* como *V. splendidus* ATCC 33125, *A. salmonicida* ATCC 438391 y *S. costicola* ATCC 33508 mostraron valores de similitud mucho más bajos (54,9%, 63,1% y 59,7% respectivamente). También en este caso se dieron importantes diferencias entre cepas de una misma especie. Así, mientras que *P. phosphoreum* CIP 102511 muestra una similitud de casi el 80% con la cepa a321, en el caso de la *P. phosphoreum* IAM 1440 este valor es de solo el 55,7%. El árbol construido a partir de estas secuencias se muestra en la Figura 63. Las cepas obtenidas en este trabajo se agrupan claramente con las de *P. damsela*, observándose además diferencias intraespecíficas claras, ya que forman, junto con *P. damsela* subsp. *piscicida* ATCC 29690, un clado aparte de otras cepas de ambas subespecies.

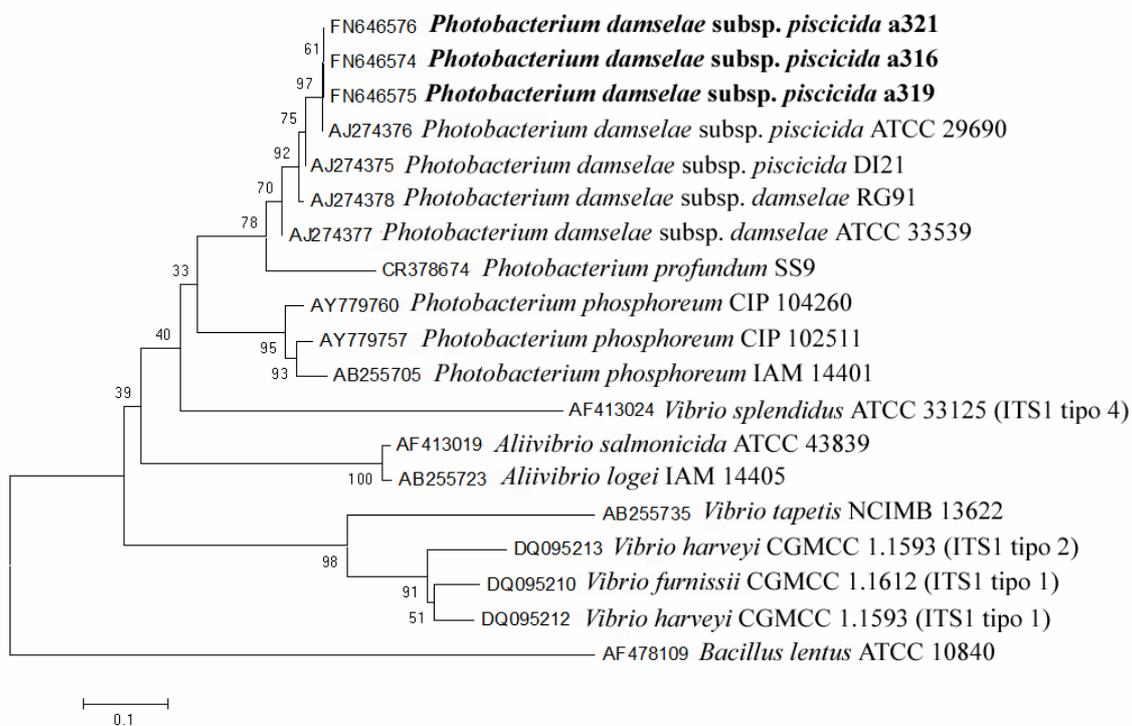


Figura 63. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS1 de las cepas de *P. damsela* y especies relacionadas. Todas las secuencias utilizadas son de la clase ITS1⁰. La secuencia de *Bacillus lentus* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

Por lo que respecta a las cepas de *P. baetica*, las secuencias ITS1 obtenidas se diferencian claramente de las publicadas hasta el momento para otras especies del género *Pseudomonas*. La secuencia obtenida para la cepa *P. baetica* a390 muestra como cepas más próximas a *P. tolaasii* LMG2342 (84,5% similitud), *P. fluorescens* LMG1794 (83,1%), *P. marginalis* CCUG 51507 (83,1%), *P. reactans* ATCC 14340 (82,4%) y *P. migulae* CCUG43165 (79,7%). Los patógenos de peces *P. anguilliseptica* CECT 899 y *P. putida* ATCC 8209 muestran valores de similitud del 71,3% y 71,1%, respectivamente. En la Figura 64 se muestra el árbol filogenético construido a partir de estas secuencias. Las cepas de *P. baetica* quedan claramente agrupadas, formando un clado aparte de las demás especies.

Por último, la utilidad de los genes tRNA encontrados fue nula en lo que a diferenciación a nivel de especies se refiere, ya que en la mayoría de los casos las especies de un mismo género, e incluso entre géneros de una misma familia, comparten genes tRNA similares, dándose por regla general diferencias importantes únicamente entre especies de distinta familia.

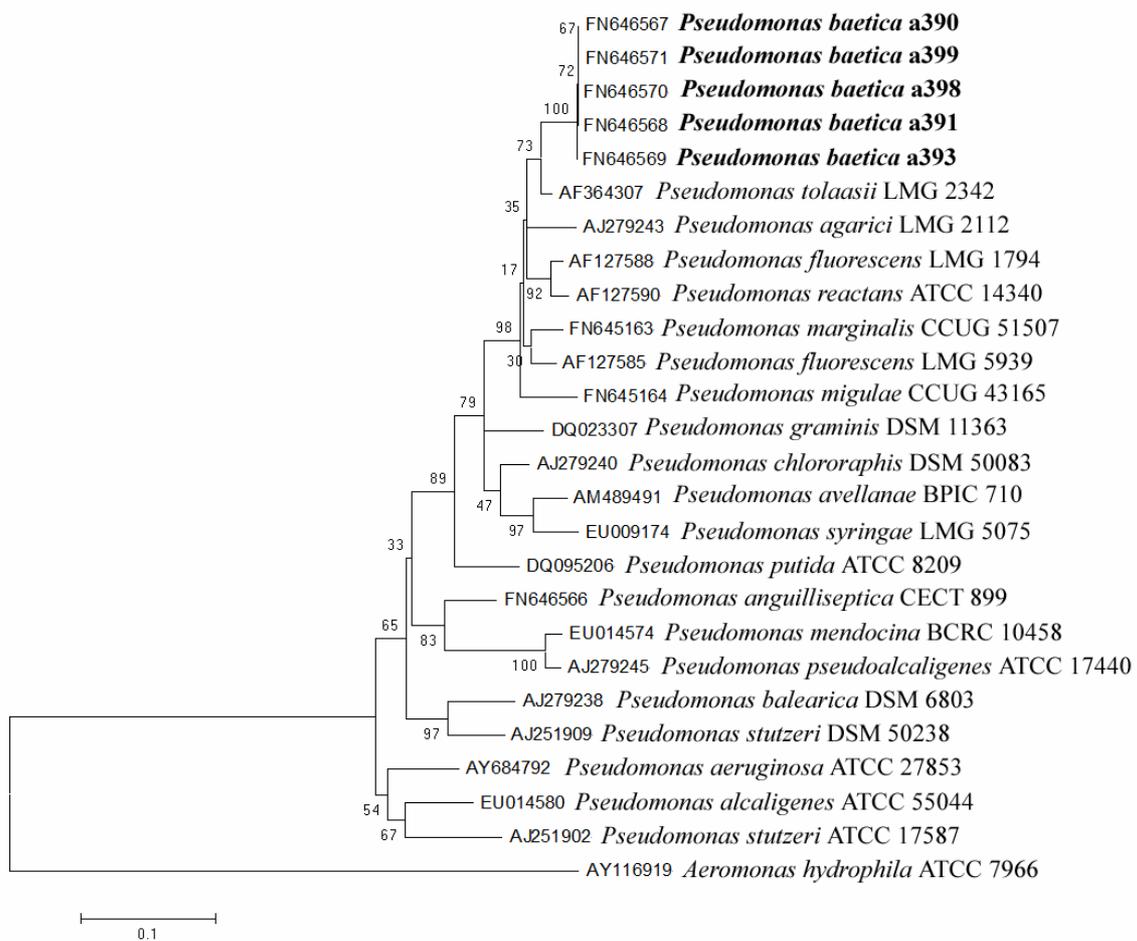


Figura 64. Árbol filogenético basado en las distancias genéticas de las secuencias de la región ITS1 de las cepas de *P. baetica* y especies relacionadas. Todas las secuencias utilizadas son de la clase ITS1^{IA}. La secuencia de *Aeromonas hydrophila* fue incluida como *outgroup*. Los números en los nudos indican los niveles de *bootstrap* con 1000 replicas.

▪ **Desarrollo de un protocolo de identificación y detección de *Tenacibaculum soleae* mediante PCR**

– Diseño de cebadores y optimización del protocolo de PCR

Para el diseño de cebadores específicos se utilizaron secuencias del gen ARNr 16S y de la región ITS1, tanto las obtenidas en este trabajo como aquellas publicadas previamente en la base de datos GenBank, principalmente para especies de la familia *Flavobacteriaceae*. Estas secuencias fueron alineadas con el programa Clustal W y examinadas en busca de regiones de variabilidad y similitud entre las diferentes especies y cepas. Basándose en estas comparaciones, se escogieron dos regiones variables para el diseño de una pareja de cebadores específicos de *T. soleae*, que se indican a continuación:

Primer directo (20 nucleótidos): G47F 5'-ATGCTAATATGTGGCATCAC-3'

Primer reverso (22 nucleótidos): G47R 5'-CGTAATTCGTAATTAACCTTTGT-3'

La situación relativa de estos dos cebadores se indica en la Figura 65. El primer directo se diseñó en el inicio del gen ARNr 16S, en una zona con alta variabilidad en el género *Tenacibaculum*, mientras que el reverso se diseñó al inicio de la región ITS1, entre los tRNA^{Ile} y tRNA^{Ala}. Ambos cebadores flanquean una región de 1555 pb.

Para los ensayos de optimización del protocolo de PCR se utilizó el ADN extraído de la cepa *T. soleae* a47 (1 y 100 ng por tubo de reacción) y un termociclador con gradiente de temperatura, ensayándose 11 temperaturas de hibridación (“annealing”) diferentes, de entre 40 y 60°C. Todas las temperaturas ensayadas permitieron la amplificación de la banda de 1555 pb, aunque las temperaturas óptimas fueron de 46,7-57,1°C. El número de ciclos ensayados fue de 35-45, y aunque se obtuvieron buenos resultados con 35 ciclos, finalmente se seleccionaron 45 para aumentar la sensibilidad en vistas a su utilización con muestras que no fueran cultivos puros bacterianos.

Las condiciones de amplificación finalmente utilizadas fueron las siguientes:

Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	1 min
45 ciclos	Hibridación	57 °C 45 s
	Elongación	72 °C 1 min
Elongación final	72 °C	5 min

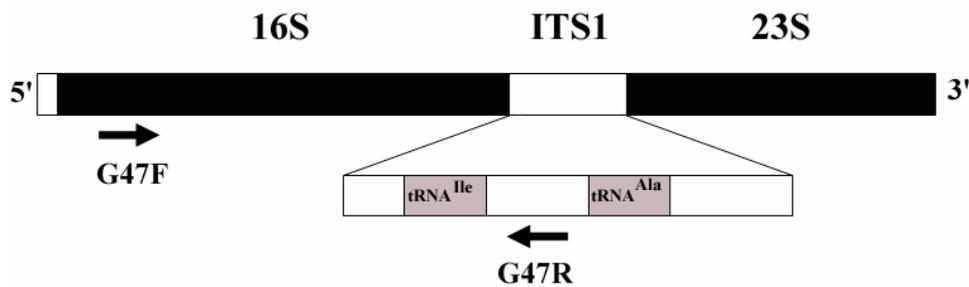


Figura 65. Representación esquemática de un operón ARNr de *T. soleae*, mostrando la localización relativa de los cebadores G47F y G47R, representados por flechas. El primer directo fue diseñado al principio del gen 16S, correspondiendo a los nucleótidos 137-156 de la secuencia con número de acceso AM989478. El primer reverso se diseñó en la región ITS1, entre los dos genes tRNA presentes, y se corresponde a los nucleótidos 193-214 de la secuencia FN646550.

- Especificidad y sensibilidad

La especificidad de los cebadores diseñados se determinó experimentalmente con cultivos puros de 9 cepas de *T. soleae*, aisladas de tres especies hospedadoras distintas e incluyendo la cepa tipo, y con 81 cepas de especies filogenéticamente relacionadas y no relacionadas, muchas de ellas patógenas de peces y en su mayor parte recuperadas del medio marino. Las cepas ensayadas se indican en la Tabla 7. Todas las cepas de *T. soleae* produjeron la banda de amplificación esperada de 1555 pb. En algún caso apareció también una banda tenue de aproximadamente 750 pb, que no siempre fue visible. Las demás especies ensayadas no mostraron ningún producto de amplificación (Figura 66).

El límite de detección del ensayo de PCR, cuando se utilizó ADN puro de *T. soleae* como diana, fue de 1 pg (equivalente a aproximadamente 1-30 células de acuerdo a Romalde *et al.* 2004) en un volumen de reacción de 50 μ l. En algunos casos se llegaron a detectar cantidades de hasta 100 fg de ADN, sin embargo en estos casos la banda de amplificación fue muy débil, y no siempre reproducible. En el extremo opuesto, las muestras con mayor concentración de ADN dieron resultados positivos, mostrando una cantidad óptima de ADN molde de 2 μ g-100 ng (Figura 67).

La sensibilidad del protocolo en presencia de ADN no diana se evaluó utilizando las mismas diluciones decimales de ADN diana que en el ensayo anterior, pero mezcladas con 1 μ g de ADN de acedía sana o de una mezcla de varias bacterias marinas. El límite de detección en este caso fue diez veces menor, como se observa en la Figura 68. No obstante el ensayo de PCR fue capaz de detectar 10 pg de ADN de *T. soleae* en 1 μ g de ADN no diana, o lo que es lo mismo, 1 copia genómica de *T. soleae* entre 10^5 copias de pez o de otras bacterias.

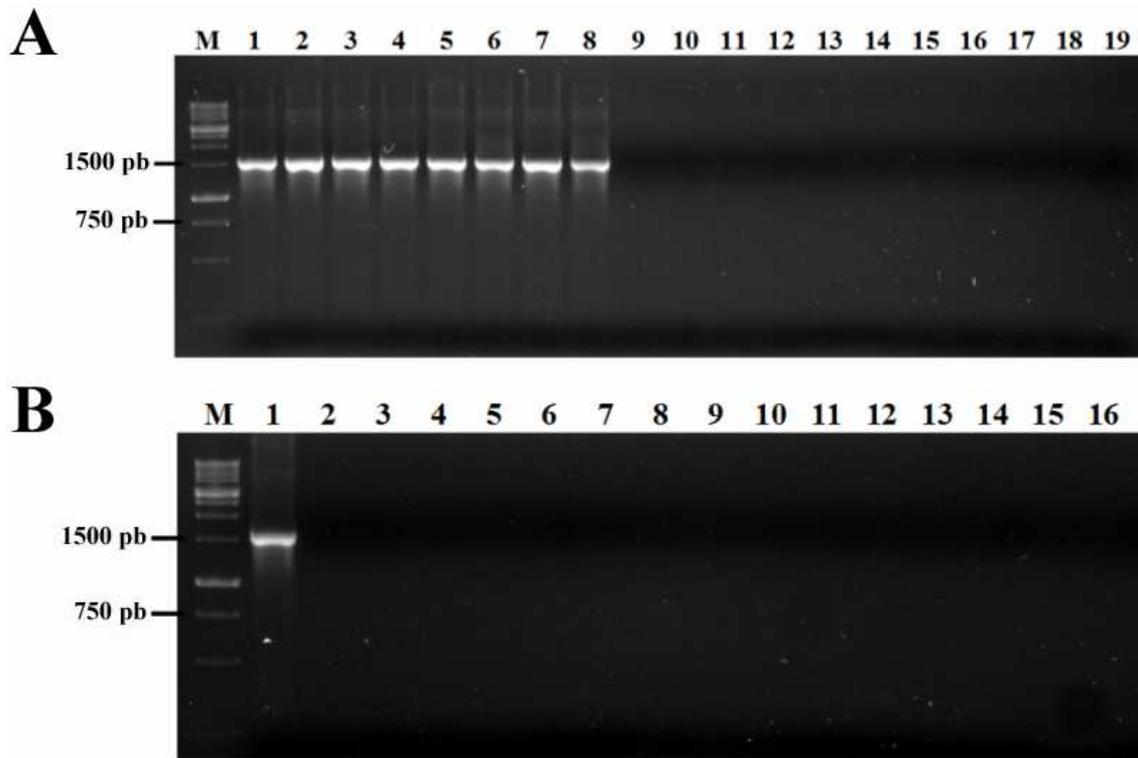


Figura 66. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos utilizando los cebadores específicos G47F y G47R, con ADN molde de *T. soleae* y algunas de las especies utilizadas en los ensayos de especificidad. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder. A: líneas 1-8, cepas de *T. soleae* NCIMB 14368^T, a11, a47, a50, a216, a410, a462 y a467, respectivamente; líneas 9-19, *Tenacibaculum* sp. a3, *T. ovolyticum* LMG 13025, *T. maritimum* CECT 4276, Lg326 y a443, *Polaribacter* sp. a502, *F. psychrophylum* NCIMB 1947 y OSU THCO2-90, *F. johnsoniae* CECT 5015 y UW101, y *F. marinotypicum* CECT 578, respectivamente. B: líneas 1-16, *T. soleae* a469, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894, *V. harveyi* CECT 525, *V. alginolyticus* CECT 436, *V. parahaemolyticus* CECT 511, *V. campbellii* CECT 523, *V. tapetis* CECT 4600, *V. splendidus* CECT 528, *Aliivibrio fischeri* CECT 524, *P. damselae* subsp. *piscicida* CECT 5895, *P. damselae* subsp. *damselae* CECT 626, *P. phosphoreum* CECT 4192, *P. leiognathi* CECT 4191, *P. fluorescens* CECT 378, *P. putida* CECT 385 y *P. anguilliseptica* CECT 899, respectivamente. Los números a la izquierda indican tamaño en pares de bases en el marcador de peso molecular. Solo las cepas de *T. soleae* muestran la banda esperada de 1555 pb.

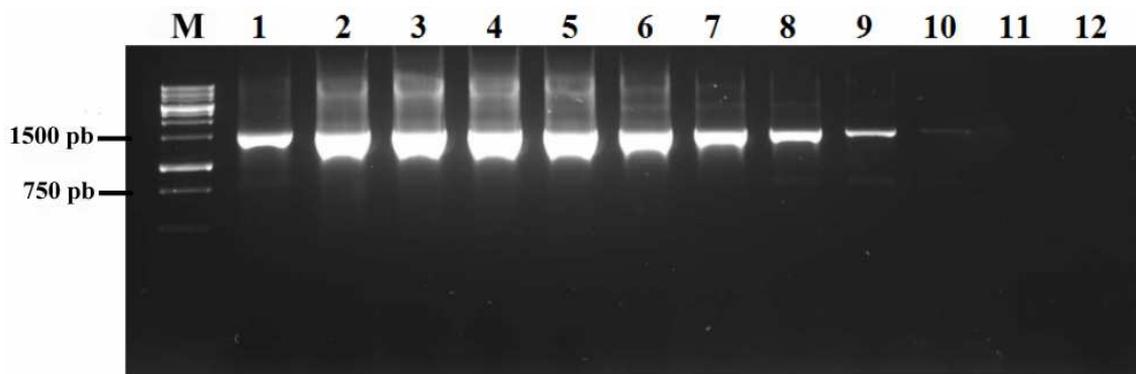


Figura 67. Límite de detección del protocolo de PCR con los cebadores G47F y G47R, determinado utilizando distintas diluciones de ADN puro de *T. soleae* a47. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder. Líneas 1 a 11: 3 μ g, 2 μ g, 1 μ g, 500 ng, 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg y 100 fg de ADN, respectivamente; línea 12, control negativo.

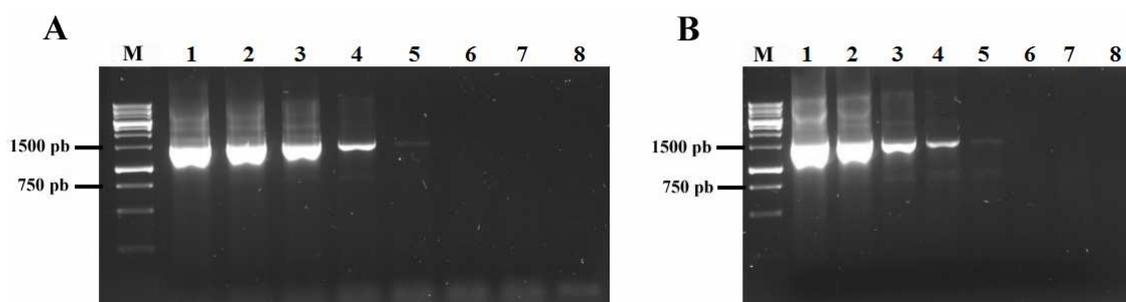


Figura 68. Límite de detección del protocolo de PCR con los cebadores G47F y G47R, determinado mezclando 1 μ g de ADN extraído de hígado de acedía (A) o de cultivos de varias especies bacterianas (B) con diluciones en base diez de ADN de *T. soleae* a47, en un rango de 100 ng-100 fg. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder. Líneas 1 a 7: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg y 100 fg de ADN de *T. soleae*, respectivamente; línea 8, control negativo.

- Detección de *T. soleae* en tejidos de peces infectados naturalmente

Para determinar la utilidad del protocolo de PCR a la hora de detectar *T. soleae* a partir de tejidos de peces infectados de forma natural se utilizaron muestras congeladas de peces procedentes de los distintos muestreos realizados. Se utilizaron un total de 10 muestras, que se detallan en la Tabla 73. En cuatro de estas muestras (muestras 8-11) la presencia de *T. soleae* había sido confirmada previamente mediante cultivo en placa, mientras que las seis muestras restantes (muestras 2-7) provienen de peces sospechosos de presentar la bacteria, por presentar bacterias filamentosas en las lesiones o por la aparición en placa de colonias inviábiles morfológicamente similares a las de *T. soleae*. Los resultados obtenidos con estas muestras se recogen en la Figura 69. Las muestras con presencia confirmada del patógeno (8-11) mostraron la banda de 1555 pb en todos los casos, pero con una intensidad baja, resultando apenas visible en la muestra 8. Por el contrario las muestras de peces sospechosos de sufrir tenacibaculosis por *T. soleae* (2-7) solo dieron positivo en la mitad de los casos, pero con bandas de mayor intensidad.

Tabla 73. Muestras congeladas utilizadas en el ensayo de detección de *T. soleae* con los cebadores G47F y G47R a partir de muestras de peces infectados de forma natural y resultados obtenidos.

Referencia muestra	Especie	Edad	Muestra	Referencia muestreo	Presencia de <i>T. soleae</i>	Resultado PCR
Muestra 2	Acedía	Alevín	Úlcera	A2-SE1	Presencia de bacterias filamentosas en aleta caudal. Colonias en placa similares a las de <i>T. soleae</i> que no fueron viables	+
Muestra 3	Acedía	Juvenil	Úlcera	A3-B110	Presencia de bacterias filamentosas en úlceras.	-
Muestra 4	Acedía	Juvenil	Úlcera	A3-B110	Presencia de bacterias filamentosas en úlceras.	+
Muestra 5	Acedía	Juvenil	Úlcera	A3-B110	Presencia de bacterias filamentosas en úlceras.	+
Muestra 6	Acedía	Juvenil	Úlcera	A3-B110	Presencia de bacterias filamentosas en úlceras.	-
Muestra 7	Acedía	Juvenil	Úlcera	A3-B110	Presencia de bacterias filamentosas en úlceras.	-
Muestra 8	Lenguado	Adulto	Hígado	L4-SE	Crecimiento en placa de la cepa <i>T. soleae</i> a410	(+)
Muestra 9	Rombo	Adulto	Úlcera	R4-BI	Crecimiento en placa de la cepa <i>T. soleae</i> a11	+
Muestra 10	Acedía	Juvenil	Úlcera	A3-MA	Crecimiento en placa de la cepa <i>T. soleae</i> a462	+
Muestra 11	Acedía	Juvenil	Riñón	A3-MA	Crecimiento en placa de la cepa <i>T. soleae</i> a467	+

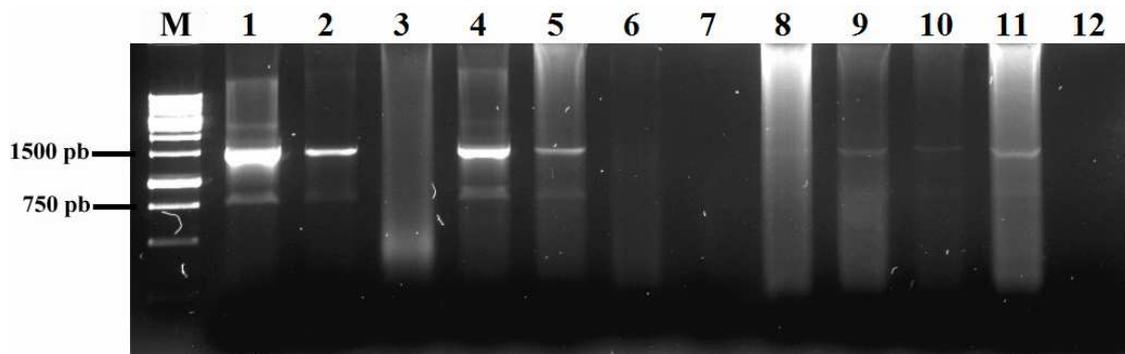


Figura 69. Resultados obtenidos en la PCR con los cebadores G47F y G47R y muestras de peces infectados de forma natural. M: marcador de peso molecular 1Kb ladder. Línea 1, ADN puro de *T. soleae* a47 (control positivo); líneas 2 a 11: muestras 2-11, indicadas en la Tabla 73, respectivamente; línea 12, control negativo.

▪ **Desarrollo de un protocolo de identificación de *Tenacibaculum soleae*, *Tenacibaculum maritimum*, *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* y *Pseudomonas baetica* mediante hibridación RLB**

– Diseño de sondas

El alineamiento de las secuencias de la región ITS1 y del gen ARNr 23S obtenidas en este trabajo, junto con las recuperadas de la base de datos GenBank para otras especies y cepas, mostró diferencias interespecíficas que permitieron el diseño de sondas de ADN específicas para los patógenos *T. soleae*, *T. maritimum*, *V. harveyi*, *Photobacterium damsela* y *P. baetica*, cuyas características se resumen en la Tabla 74.

Las sondas finalmente utilizadas tienen 20-26 nucleótidos, y muestran diferencias entre sí tanto en la temperatura de melting (de los 53,9°C de la sonda de *T. soleae* a los 65,7°C de la de *V. harveyi*) como en el porcentaje de guaninas y citosinas (del 15% de la sonda de *P. damsela* al 55% de la de *P. baetica*). A excepción de la sonda de *V. harveyi*, todas fueron diseñadas en la región ITS1. Las dirigidas contra *T. soleae* y *T. maritimum* se sitúan entre los tRNA^{Ile} y tRNA^{Ala}, mientras que la dirigida contra *P. baetica* se sitúa entre el gen ARNr 16S y el tRNA^{Ile}. En el caso de *V. harveyi*, como ya se ha visto, la región ITS1 no es útil a la hora de diferenciar esta especie de otras próximas como *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, que muestran secuencias similares. La sonda de *V. harveyi* fue, por tanto, diseñada en el gen ARNr 23S, en una zona variable que permite su diferenciación de las dos especies mencionadas. Por otro lado, no se encontraron diferencias en la región ITS1 que permitiesen la discriminación de las dos subespecies de *P. damsela*, por lo que la sonda diseñada detecta a ambas.

Para la optimización del protocolo se ensayaron varias temperaturas de lavado tras la hibridación, y distintas concentraciones de sonda, en un rango de 10 a 6400 pmol. La temperatura de lavado finalmente utilizada fue 65°C. La cantidad de sonda utilizada en cada

caso, de forma que todas las sondas produjesen una señal de aproximadamente la misma intensidad, se indica en la Tabla 74.

Tabla 74. Secuencias y características de las sondas utilizadas en los ensayos RLB.

Sonda	Especificidad	Secuencia (5'-3')	Región diana	Posición (número de acceso)	T _m (°C) ^a	% G+C	pmol ^b
PG47	<i>T. soleae</i>	CTAGAAACAAAGTTAATTACGAA	ITS1	187-209 (FN646550)	53.9	26	3.200
PG443	<i>T. maritimum</i>	AGGATTTTATAATCTGAATTCAT	ITS1	263-286 (FN646562)	55.7	21	3.200
PG91	<i>V. harveyi</i>	AACCGGCAACGCATWTAAG	ADNr 23S	332-351 (FM956007)	65.7	45	50
PG321	<i>P. damsela</i>	TGATTTATTTAAGTTTTATCGAAA	ITS1	162-187 (FN646576)	58	15	3.200
PG390	<i>P. baetica</i>	TGGTTAAGAGCAGGGTGAGG	ITS1	122-141 (FN646567)	64.1	55	50

^aTemperatura de melting proporcionada por el fabricante de acuerdo al método del vecino más próximo.

^bCantidad en pmol de sonda aplicada en las ranuras, en 150 ul de NaHCO₃ 500 mM (pH 8.4).

- Especificidad y sensibilidad

La especificidad de las sondas diseñadas se determinó experimentalmente utilizando cultivos puros de 90 cepas de referencia o aislados, pertenecientes a las especies diana *T. soleae* (9 cepas), *T. maritimum* (9 cepas), *V. harveyi* (15 cepas), *P. damsela* (10 cepas) y *P. baetica* (6 cepas), y a especies no diana (41 cepas), en su mayor parte relacionadas ecológica o taxonómicamente con las anteriores. Las cepas utilizadas se resumen en la Tabla 7.

Tanto las cepas de referencia como los aislados de cada una de las especies diana fueron correctamente identificadas con el protocolo propuesto (Figura 70), mientras que las cepas de las especies no diana dieron resultados inequívocamente negativos, a excepción de la reacción cruzada entre la sonda de *V. harveyi* y el producto de PCR de *V. campbellii* CECT 523 (Figura 71). La secuenciación del ADNr 23S de esta cepa mostró que las secuencias de ambas especies son similares. Por otro lado, la sonda de *V. harveyi* dio resultados positivos con *Photobacterium* sp. a185 con temperaturas de lavado tras la hibridación de 42, 55 y 60°C, pero no con 65°C. La secuencia diana encontrada en el gen ARNr 23S de esta cepa difiere de la de *V. harveyi* en solo 4 nucleótidos.

El límite de detección del protocolo, utilizando ADN puro de cepas diana (*T. soleae* a47, *T. maritimum* a443, *V. harveyi* a91, *P. damsela* subsp. *piscicida* a321 y *P. baetica* a390) fue de 100 pg en el caso de las sondas de *T. soleae* y *T. maritimum* (equivalente a 100-3000 células), 1 pg para la de *V. harveyi* (1-30 células) y de 10 pg para las de *P. damsela* y *P. baetica* (10-300 células) (Figura 72). Las sondas de estas dos últimas especies detectaron en ocasiones cantidades de 1 pg, pero este resultado no siempre fue reproducible. Por otro lado, la

sensibilidad de las sondas de *T. soleae* y *T. maritimum* permaneció inalterable cuando se utilizaron temperaturas de lavado inferiores, de hasta 42°C.

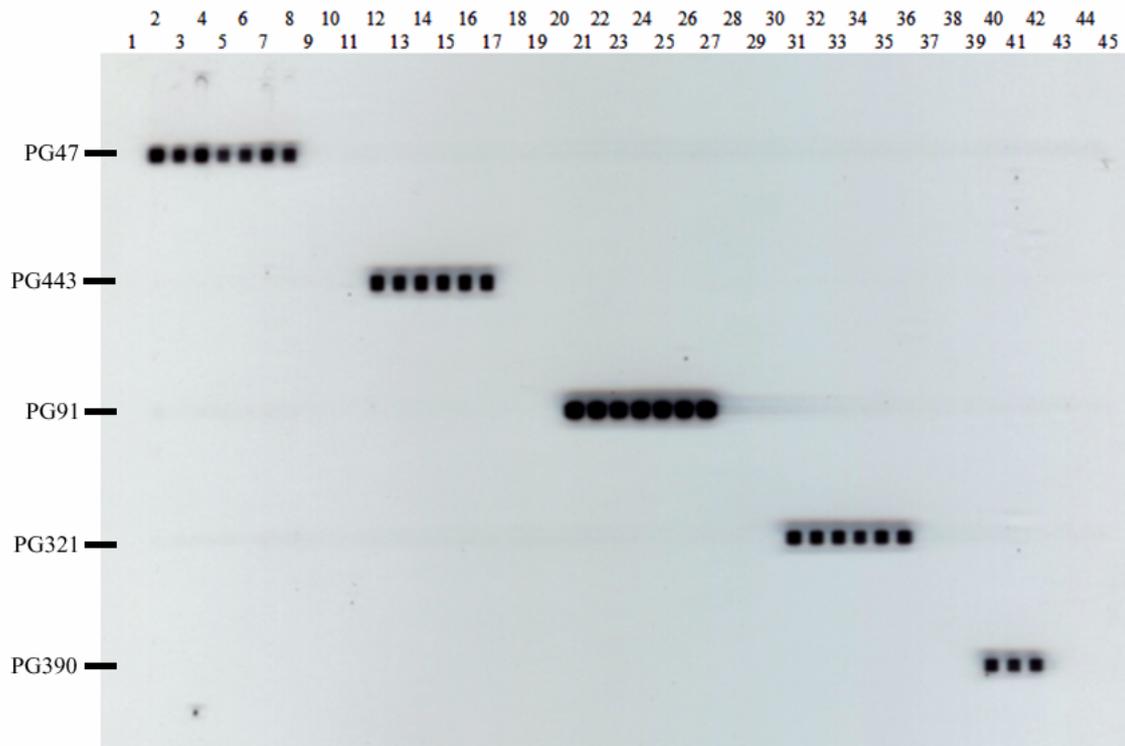


Figura 70. Resultados del ensayo de hibridación RLB con las sondas PG47 (*T. soleae*), PG443 (*T. maritimum*), PG91 (*V. harveyi*), PG321 (*P. damsela*) y PG390 (*P. baetica*), con cepas de las especies diana. Las sondas están aplicadas en líneas horizontales y se indican a la izquierda. Las muestras se aplican perpendiculares a las sondas, mostrándose como columnas verticales. Columnas 2-8: cepas de *T. soleae* NCIMB 14368^T, a47, a50, a467, a469, a410 y a11, respectivamente; columnas 12-17: cepas de *T. maritimum* CECT 4276, Lg326, a274, a388, a443, a523; columnas 21-27: cepas de *V. harveyi* CECT 525^T, CECT 5156, Lg123, a10, a82, a91, a417; columnas 31-36: cepas de *P. damsela* CECT 5895, CECT 626^T, Lg122, a316, a321, a356; columnas 40-42: cepas de *P. baetica* a390, a398, a600; columna 44: control negativo.

– Aplicabilidad en tejidos de peces infectados de forma natural

Para determinar la capacidad del protocolo propuesto de detectar los patógenos estudiados a partir de tejidos, se utilizaron muestras congeladas de 27 peces procedentes de distintos muestreos, que se detallan en la Tabla 75. El número de muestras en que la presencia del patógeno fue confirmada mediante cultivo o cebadores específicos fue de 7 para *T. soleae* (muestras 16-22), 4 para *T. maritimum* (muestras 22-25), 10 para *V. harveyi* (muestras 22 y 26-34), 5 para *P. damsela* subsp. *piscicida* (muestras 35-39) y 2 para *P. baetica* (muestras 40-41). Se incluyeron también las 3 muestras sospechosas de presentar *T. soleae* que dieron negativo con los cebadores específicos G47F y G47R. La mayor parte de las muestras de *T. soleae*,

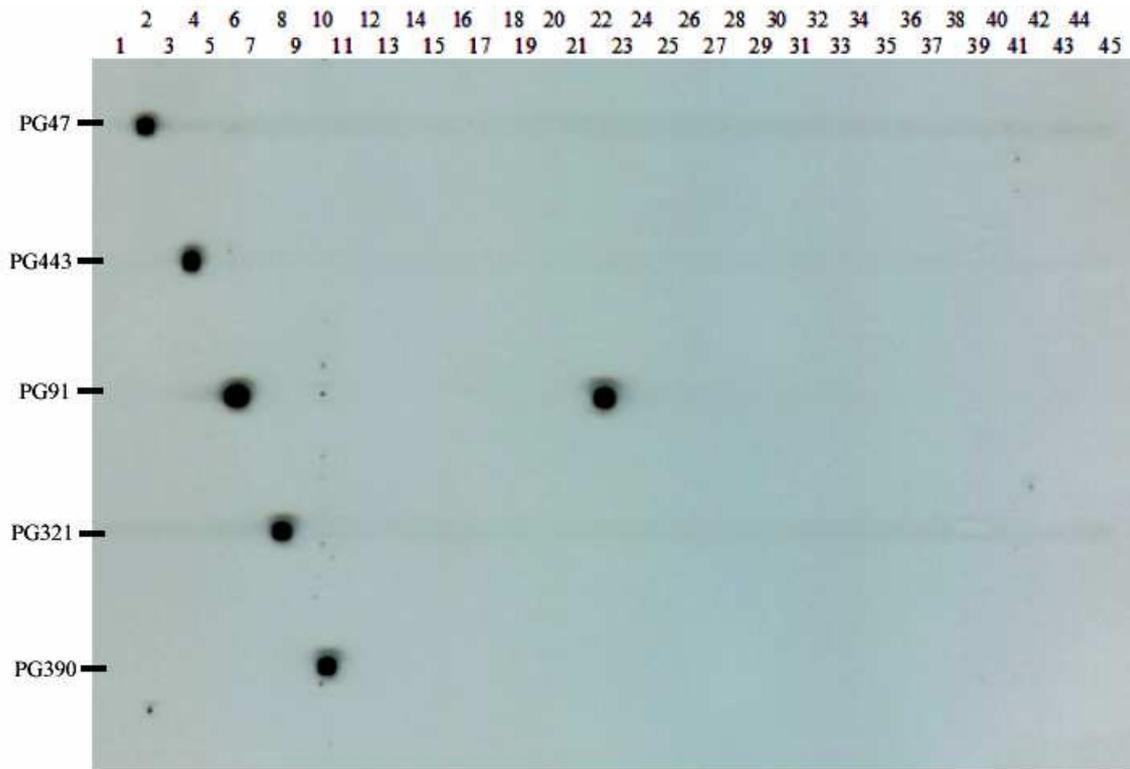


Figura 71. Hibridación RLB con las sondas PG47, PG443, PG91, PG321 y PG390, y algunas de las cepas no diana utilizadas en los ensayos de especificidad. Columnas 2, 4, 6, 8 y 10: *T. soleae* a47, *T. maritimum* a443, *V. harveyi* a91, *P. damsela* subsp. *piscicida* a321 y *P. baetica* a390 respectivamente, usadas como controles positivos; columnas 12-42: *T. ovolyticum* LMG 13025, *Tenacibaculum* sp. a3, *Polaribacter* sp. a502, *F. johnsoniae* CECT 5015 y UW101^T, *F. psychrophilum* NCIMB 1947^T y OSU THCO2-90, *F. marinotypicum* CECT 578^T, *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* CECT 894^T, *V. parahaemolyticus* CECT 511^T, *V. campbellii* CECT 523^T, *V. alginolyticus* CECT 521^T y CECT436, *V. natriegens* CECT 526^T, *V. tubiashii* CECT 4196^T, *V. tapetis* CECT 4600^T, *V. splendidus* CECT 528^T, *Aliivibrio fischeri* CECT 524^T, *Photobacterium* sp. a185 y a197, *P. leiognathi* CECT 4191^T, *P. angustum* CECT 5690^T, *P. phosphoreum* CECT 4192^T, *P. fluorescens* CECT 378^T, *P. putida* CECT 385, *P. anguilliseptica* CECT 899^T, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Psychrobacter* sp. a328, *Pseudoalteromonas* sp. a220 y a250, y *E. coli* ATCC 25922, respectivamente; columna 44: control negativo. La única reacción cruzada no esperada se da entre la sonda de *V. harveyi* y la cepa *V. campbellii* CECT 523^T (columna 22).

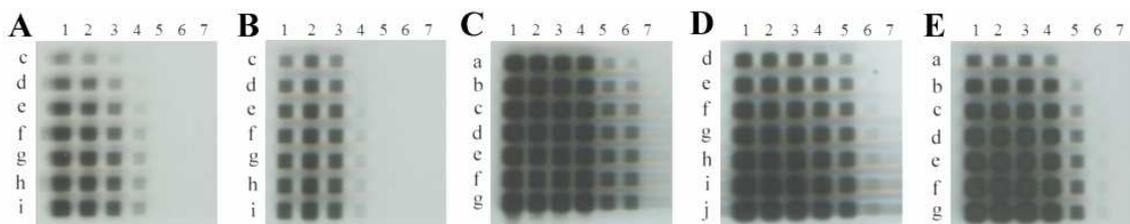


Figura 72. Límite de detección de las sondas utilizadas en la hibridación RLB, determinado utilizando diferentes diluciones de ADN puro de las especies diana (columnas) y diferentes concentraciones de sonda (líneas). A, sonda PG47; B, sonda PG443; C, sonda PG91; D, sonda PG321; E, sonda PG390. Columnas 1-7: 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg y 100 fg de ADN, respectivamente. Líneas a-j: 10, 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 y 6400 pmol de sonda en 150 μ l de NaHCO₃ 500 mM, respectivamente.

Tabla 75. Muestras congeladas utilizadas en el ensayo de detección de *T. soleae*, *T. maritimum*, *V. harveyi*, *P. damsela* y *P. baetica* mediante RLB a partir de muestras de peces infectados de forma natural y resultados obtenidos.

Referencia muestra	Especie	Edad	Muestra	Referencia muestreo	Bacterias presentes	Resultado RLB
Muestra 13	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-B110	Posible <i>T. soleae</i> †	+ para <i>V. harveyi</i>
Muestra 14	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-B110	Posible <i>T. soleae</i> †	-
Muestra 15	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-B110	Posible <i>T. soleae</i> †	-
Muestra 16	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-B110	<i>T. soleae</i> (PCR especifica positiva)	+
Muestra 17	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-B110	<i>T. soleae</i> (PCR especifica positiva)	-
Muestra 18	Acedia	Alevín	Úlcera	A2-SE1	<i>T. soleae</i> (PCR especifica positiva)	-
Muestra 19	Lenguado	Adulto	Hígado	L4-SE	<i>T. soleae</i> (a410)*	-
Muestra 20	Rombo	Adulto	Úlcera	R4-B1	<i>T. soleae</i> (a11)	-
Muestra 21	Acedia	Juvenil	Riñón	A3-MA	<i>T. soleae</i> (a467)	-
Muestra 22	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-MA	<i>T. soleae</i> (a462), <i>T. maritimum</i> (a443), <i>V. harveyi</i> (a450)	+ para <i>V. harveyi</i> y <i>T. maritimum</i>
Muestra 23	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-MA	<i>T. maritimum</i> (a461)	+ para <i>V. harveyi</i> y <i>T. maritimum</i>
Muestra 24	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-SE1	<i>T. maritimum</i> (a274, a388)	-
Muestra 25	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-SE1 (2)	<i>T. maritimum</i> (a523)	-
Muestra 26	Acedia	Adulto	Úlcera	A4-B16	<i>V. harveyi</i> (a26)	+
Muestra 27	Acedia	Adulto	Úlcera	A4-B16	<i>V. harveyi</i> (a30)	-
Muestra 28	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-MA	<i>V. harveyi</i> (a417)	-
Muestra 29	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-MA	<i>V. harveyi</i> (a426)	+
Muestra 30	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-MA	<i>V. harveyi</i> (a455)	+
Muestra 31	Acedia	Juvenil	Hígado	A3-MA	<i>V. harveyi</i> (a428)	+
Muestra 32	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-MA	<i>V. harveyi</i> (a457)	+
Muestra 33	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-MA	<i>V. harveyi</i> (a459)	-
Muestra 34	Acedia	Juvenil	Úlcera	A3-MA	<i>V. harveyi</i> (a433)	+
Muestra 35	Lenguado	Adulto	Hígado	L4-B15	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (a316)	+
Muestra 36	Lenguado	Adulto	Hígado	L4-B15	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (a335)	+
Muestra 37	Lenguado	Adulto	Hígado	L4-B15	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (a321)	+
Muestra 38	Lenguado	Adulto	Riñón	L4-B15	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (a319)	+
Muestra 39	Lenguado	Juvenil	Hígado	L3-UM	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> (a356)	+
Muestra 40	Acedia	Adulto	Hígado	A4-B16	<i>P. baetica</i> (a390, a391, a393)	+
Muestra 41	Acedia	Adulto	Hígado	A4-B16	<i>P. baetica</i> (a398, a399)	+

† Presencia de bacterias filamentosas en las improntas de las úlceras; * En paréntesis se indican las cepas obtenidas a partir de estas muestras por cultivo en placa.

T. maritimum y *V. harveyi* provienen de lesiones externas, mientras que las de *P. damsela* y *P. baetica* vienen en su totalidad de órganos internos.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 73. La sonda diseñada contra *T. soleae* reacciono únicamente con 1 de las siete muestras confirmadas para esta especie (14%) y con ninguna de las sospechosas. Por otro lado, ninguna de las muestras en las que el patógeno había sido confirmado por cultivo dio positivo, siendo la muestra positiva una de las confirmadas mediante la PCR con cebadores específicos. La sondas dirigidas contra *T. maritimum* y contra *V. harveyi* reaccionaron con el 50% y 70% de sus correspondientes muestras, respectivamente, no obstante la sonda de *V. harveyi* dio positivo también con dos muestras en las que esta bacteria no había sido detectada al realizar cultivos en placa. Las sondas de *P. damsela* y *P. baetica* dieron resultados positivos con el 100% de sus respectivas muestras. Por otro lado, cuando se realizó el ensayo utilizando como muestra ADN de acedia, ninguna de las sondas mostró reacciones cruzadas.

Los resultados obtenidos muestran claramente que si bien el protocolo es útil para la identificación de cultivos bacterianos puros, no lo es para la detección de los patógenos a partir de tejidos, al menos no para todos ellos, en las condiciones propuestas. La sonda de *V. harveyi*,

a pesar de su alta sensibilidad con cultivos puros, reaccionó positivamente solo con el 70% de sus muestras, quizás debido a que la mayor parte de estas consistían en lesiones externas no estériles en las que el resto de bacterias presentes competirían por los cebadores universales utilizados durante la PCR. En el caso de las sondas de *T. soleae* y *T. maritimum*, los malos resultados obtenidos probablemente se deban a esta misma circunstancia, unida al hecho, quizás más determinante, de tener una sensibilidad bastante menor. Las sondas de *P. damsela* y *P. baetica* parecen por el contrario útiles para la detección a partir de tejidos, quizás debido a la conjunción de una alta sensibilidad y a la naturaleza de los órganos muestreados, por regla general estériles.

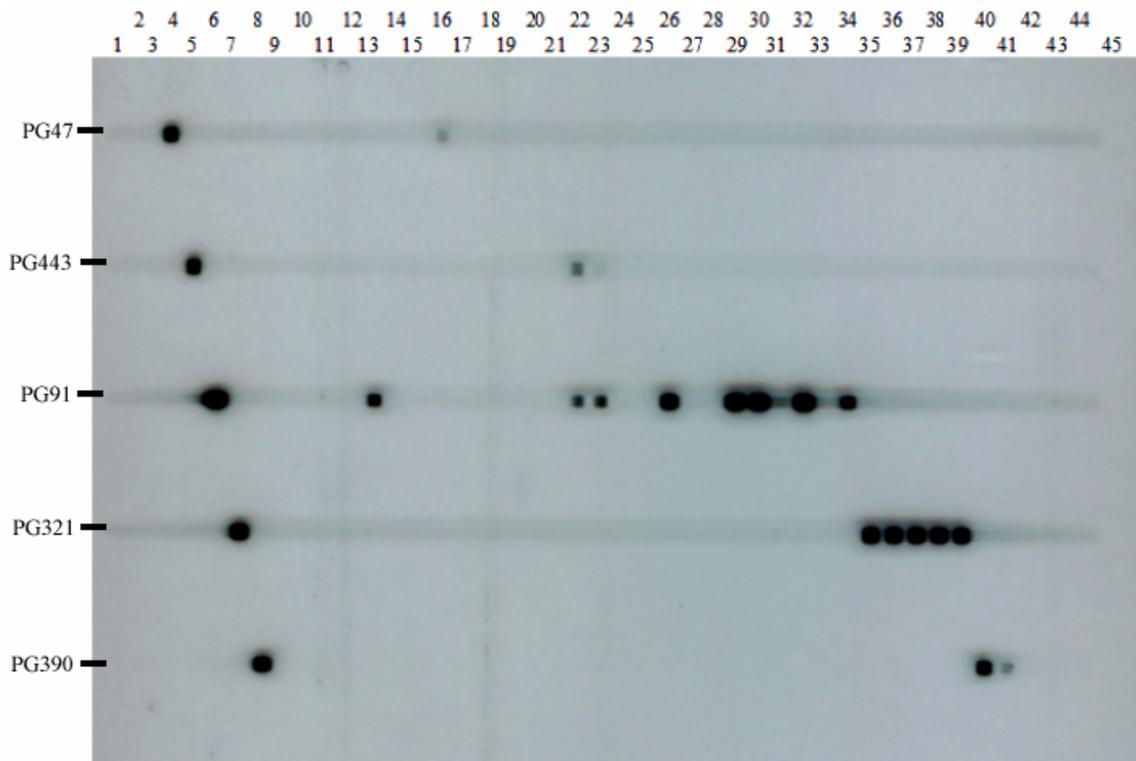


Figura 73. Hibridación RLB con los productos de PCR obtenidos a partir del ADN extraído de tejidos de peces infectados de forma natural. Columnas 4-8: *T. soleae* a47, *T. maritimum* a443, *V. harveyi* a91, *P. damsela* a321 y *P. baetica* a390, respectivamente, utilizados como controles positivos; columnas 13-41: muestras 13-41, indicadas en la Tabla 75, respectivamente; columna 44, control negativo. Las muestras 13-15 provienen de peces sospechosos de sufrir tenacibaculosis por *T. soleae*; muestras 16-22, peces afectados por *T. soleae*; muestras 22-25, peces afectados por *T. maritimum*; muestras 22 y 26-34, peces afectados por *V. harveyi*; muestras 35-39, peces afectados por *P. damsela* subsp. *piscicida*; muestras 40-41, peces afectados por *P. baetica*.

5. DISCUSIÓN

▪ Contexto y objetivos

Durante los últimos años, la acuicultura ha alcanzado un desarrollo espectacular, constituyendo el sector alimentario que crece con mayor rapidez y convirtiéndose en una alternativa real a la pesca extractiva. Entre los retos que se deben afrontar para su desarrollo futuro están la investigación del potencial de nuevas especies para el cultivo (diversificación) y la lucha contra una de las causas más importantes de pérdidas económicas, las enfermedades de origen bacteriano (Austin & Austin 1999, Diggles *et al.* 2000b, Toranzo *et al.* 2005).

En este contexto, el IFAPA Centro *Agua del Pino* instaló en 2002 una planta piloto para la evaluación del potencial de cultivo de dos nuevas especies en acuicultura, la acedía (*Dicologlossa cuneata*) y el rombo (*Scophthalmus rhombus*), y para la mejora del cultivo del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*). Los resultados obtenidos mostraron que el principal problema para el cultivo de la acedía era, al igual que en el caso del lenguado senegalés, la alta incidencia de patologías, que causaban altas mortalidades (Herrera 2008, Herrera *et al.* 2008), en tanto que el principal obstáculo en el caso del rombo era la alta mortalidad larvaria al agotarse el vitelo (Hachero *et al.* 2005, Hachero 2008).

Para poder prevenir las enfermedades de origen bacteriano, tanto a nivel de hospedador (vacunación, inmunoestimulación, selección de peces resistentes), como a nivel de patógeno (antibióticos, desinfectantes, etc.) e incluso a nivel de las condiciones ambientales (temperatura, pH, salinidad, etc.), es esencial conocer qué especies son las que pueden estar afectando a los cultivos. Los objetivos de este trabajo fueron por tanto 1) la identificación de las bacterias asociadas a episodios de mortalidad en estas tres especies de peces planos, especialmente de la acedía, 2) la evaluación de su virulencia y 3) el desarrollo de métodos rápidos de identificación de los patógenos encontrados.

▪ Taxones bacterianos encontrados asociados a episodios de mortalidad

Para la realización de los objetivos de este trabajo, entre 2004 y 2007 se realizaron 28 muestreos en los que se examinaron más de 250 peces de todas las edades, obteniéndose 223 aislados que fueron agrupados inicialmente en 19 grupos fenotípicos (fenones). La posterior caracterización fenotípica y genotípica, más extensa, permitió mantener esta clasificación inicial de los aislados, asumiendo, no obstante, que no todos ellos eran grupos homogéneos a nivel de especie.

En todos los casos excepto uno las cepas obtenidas fueron bacterias Gram negativas pertenecientes a las clases Gamma-Proteobacteria o Flavobacteria, que se repartieron en 5 familias (*Flavobacteriaceae*, *Moraxellaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Pseudomonadaceae* y

Vibrionaceae) y 8 géneros (*Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Polaribacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Tenacibaculum* y *Vibrio*). Solo en el caso de un brote ocurrido a finales de 2007 y no incluido en este trabajo, se aisló una cepa Gram positiva que fue identificada como *Vagococcus* sp. y que posiblemente constituya una nueva especie. Esta desproporción entre bacterias Gram positivas y Gram negativas ha sido observada en estudios similares realizados en rodaballo y dorada, constituyendo las bacterias Gram positivas menos del 10% de los aislados obtenidos (Toranzo *et al.* 1993, Balebona *et al.* 1998a, Thomson *et al.* 2005).

La familia *Vibrionaceae* y el género *Vibrio* fueron los grupos dominantes, tanto en número como en diversidad. En número de aislados, estos taxones abarcan el 78,5% y el 63% de los aislados respectivamente, un resultado similar al obtenido por otros autores como Nova *et al.* (1992), Toranzo *et al.* (1993), Balebona *et al.* (1998a) y Thomson *et al.* (2005). Por ejemplo, en un estudio realizado durante 6 años en cultivos de dorada situados en el sur de España, Balebona *et al.* (1998a) encontraron que el 56% de los aislados pertenecían al género *Vibrio*, el 13,5% a *Pseudomonas*, el 11,5% a *Aliivibrio*, el 6,7% a *Photobacterium* y solo el 4,8% a miembros de la familia *Flavobacteriaceae*, resultados no muy diferentes de los obtenidos en este trabajo. Por otro lado, la importante representación del género *Vibrio* probablemente viene dada por el hecho de que este sea el grupo dominante en la microbiota intestinal de los peces cultivados, algo que se ha observado en especies como el lenguado senegalés, el lenguado común, la platija japonesa y en varias especies de besugo (Campbell & Buswell 1983, Muroga *et al.* 1987, Sugita & Ito 2006, Martín-Antonio *et al.* 2007, Tapiá-Paniagua *et al.* 2010).

En lo que respecta a la diversidad de los aislados, de los 19 grupos fenotípicos establecidos, nueve pertenecen a *Vibrio*, tres a *Photobacterium* y dos a *Tenacibaculum*, estando los demás géneros representados por un único fenón. De estos grupos de aislados, cinco fueron identificados a nivel de especie o subespecie (*P. damselae* subsp. *piscicida*, *T. soleae*, *T. maritimum*, *V. harveyi* y *V. tapetis*), en tanto que otro constituye una nueva especie de *Pseudomonas*, para la que hemos propuesto el nombre de *Pseudomonas baetica* sp. nov.

Los fenones y aislados restantes solo pudieron ser identificados a nivel de género. Abarcan como mínimo 17 especies más, pertenecientes a los géneros *Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Polaribacter*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter*, *Tenacibaculum* y *Vibrio*. Dentro de este último se observa una gran diversidad, contando con cepas relacionadas con varios de los distintos grupos de especies presentes en el género, particularmente con *V. alginolyticus* y *V. splendidus*. Por otra parte varios grupos parecen constituir nuevas especies, principalmente dentro de los géneros *Photobacterium*, *Polaribacter* y *Vibrio*.

▪ Evaluación de la virulencia de los aislados

Para evaluar la patogenicidad de los aislados, se realizaron ensayos mediante inyección intraperitoneal en alevines y juveniles de acedía, con cepas representativas de cada uno de los 19 grupos bacterianos encontrados. Solo las cepas de *T. soleae*, *T. maritimum*, *V. harveyi*, *P. damsela* subsp. *piscicida* y *P. baetica* mostraron ser claramente virulentas, registrando tasas de mortalidad de generalmente el 80-100% en ambos grupos de peces.

De los demás grupos de aislados ensayados, la cepa *Photobacterium* sp. a185 causó mortalidad en alevines (30%), pero no en juveniles, sin embargo, los representantes de los demás grupos no causaron mortalidades significativas en ningún caso. En función de estos resultados, los fenones correspondientes a estas cepas fueron considerados como no patógenos, sin embargo, no debe descartarse la posibilidad de que también estos incluyan cepas patógenas, por varias razones.

En primer lugar, en la mayor parte de los casos la evaluación de la virulencia se realizó únicamente con 1 ó 2 cepas por fenón, lo que podría ser insuficiente, especialmente en aquellos grupos que presentaban un alto número de cepas y heterogeneidad fenotípica y/o genotípica y que por tanto podían abarcar varias especies diferentes, caso por ejemplo de los relacionados con *V. splendidus* o las cepas del género *Pseudoalteromonas*.

La conveniencia de utilizar un mayor número de cepas viene dada también por el hecho de que no todas las cepas de una misma especie muestran el mismo grado de virulencia, como por ejemplo se ha visto en *V. splendidus* y en *P. damsela* subsp. *piscicida*, en los que cepas aisladas de distintos hospedadores, e incluso de un mismo brote, pueden presentar grados de patogenicidad totalmente diferentes (Thomson *et al.* 2005, Toranzo *et al.* 2005). En esta memoria, este tipo de diferencias entre cepas solo se observaron en el caso de *V. harveyi*, en el que los aislados testados, procedentes de distintos brotes, mostraron diferentes tasas de mortalidad en alevines (40, 80 y 100%). Estas variaciones en el grado de virulencia de *V. harveyi* han sido observadas también por otros autores y podrían deberse a la expresión de distintos factores de virulencia, como proteasas, hemolisinas, proteínas relacionadas con la adherencia, etc. (Toranzo & Barja 1993, Fernández *et al.* 2003, Austin & Zhang 2006).

Por otro lado, el grado de virulencia de una cepa bacteriana puede estar influenciado por un gran número de factores, tales como la ruta de inoculación, la temperatura, el medio de cultivo utilizado, la fase de crecimiento del inóculo, así como la especie animal utilizada en el ensayo, su edad y su estado fisiológico (Davis *et al.* 1981, Romalde 2005).

La ruta de inoculación se ha demostrado importante, por ejemplo, en el caso de *Vibrio ichthyenteri*, un patógeno de larvas de platija japonesa que no es capaz de causar mortalidad mediante inyección intraperitoneal, pero sí si se administra por vía oral (Gauger *et al.* 2006).

Alsina & Blanch (1993) y Avendaño-Herrera *et al.* (2006a) obtuvieron resultados similares con *T. maritimum*. La inoculación del patógeno mediante inyección intraperitoneal o intramuscular no inducía la aparición de la enfermedad, pero esta sí se daba cuando los ensayos se realizaban por inmersión. No obstante, en este trabajo pudimos observar que *T. maritimum* sí provocaba alta mortalidad y las lesiones típicas de la enfermedad al ser inyectado intraperitonealmente en ejemplares de acedía. En cualquier caso, no se puede descartar que algunas de las cepas de *Vibrio* o de otros géneros utilizadas en los ensayos presenten diferentes comportamientos en función de la ruta de administración utilizada.

La temperatura tiene asimismo gran importancia, habiéndose demostrado su influencia en un gran número de casos (Magariños *et al.* 2001, Zheng *et al.* 2004). Zheng *et al.* (2004) mostraron que la susceptibilidad de la platija japonesa a *E. tarda* dependía en gran medida tanto de la temperatura a la que la bacteria era cultivada, como a la que eran mantenidos los peces, siendo la interacción de estos dos factores también significativa. Debido a que la mayor parte de los brotes tuvieron lugar con temperaturas de aproximadamente 20°C y a que era la temperatura a la que se mantenían generalmente los peces, esta se utilizó tanto para el aislamiento y crecimiento de las cepas, como para el mantenimiento de los peces en los ensayos de patogenicidad. No obstante, en el caso de dos cepas, *Aliivibrio* sp. a54 y *Photobacterium* sp. a185, esta temperatura probablemente no fue adecuada dado que ambos fueron aislados con temperaturas de aproximadamente 12°C, por lo que sería conveniente revisar la virulencia de ambos en el futuro.

Otro factor de importancia es la edad del pez, razón por la cual se utilizaron peces de distintas edades (alevines y juveniles, y en el caso de ciertos fenones, larvas) en los ensayos. En rodaballo se ha observado que la susceptibilidad a *L. pelagia* depende de la edad del pez, siendo alta en larvas, nula en juveniles e intermedia en alevines (Villamil *et al.* 2006). Estas diferencias pueden deberse tanto al desarrollo del sistema inmune como a otros cambios fisiológicos. Por ejemplo, *V. ichthyenteri* causa enfermedad en larvas de platija japonesa pero no en juveniles debido a que es inhibido por el pH bajo de los estómagos de los juveniles, más diferenciados que los de las larvas (Gauger *et al.* 2006). En este trabajo, sin embargo, no se detectaron diferencias en las tasas de mortalidad en alevines y juveniles a pesar de que las dosis de bacterias utilizadas en ambos casos fueron similares. La única excepción, ya mencionada, fue la cepa *Photobacterium* sp. a185, que causó mortalidad en alevines, pero no en juveniles. Por otra parte, los fenones utilizados en el ensayo por inmersión con larvas mostraron en este caso el mismo comportamiento que con peces *destetados*, no detectándose ninguna cepa que fuese virulenta únicamente para larvas.

Los ensayos por inmersión, que presentan unas condiciones de infección más parecidas a las naturales, se realizaron únicamente con las cinco especies patógenas encontradas y

mostraron que el grado de virulencia no era igual en todos los casos. *T. soleae*, *T. maritimum* y *P. damselae* subsp. *piscicida* fueron capaces de causar altas mortalidades también mediante esta vía de infección, por lo que podrían ser considerados patógenos primarios y por tanto los más importantes de los encontrados. El grado de patogenicidad de las cepas de estas tres especies, determinado mediante el cálculo de la dosis letal 50, fue muy similar ($2,2-7,8 \times 10^5$ UFC/ml), aunque *T. maritimum* y *P. damselae* subsp. *piscicida*, con valores prácticamente idénticos, fueron ligeramente más virulentas que *T. soleae*. No obstante, de acuerdo a la clasificación propuesta por Santos *et al.* (1991), las tres especies deberían ser consideradas como altamente virulentas.

Por el contrario, *V. harveyi* y *P. baetica* no causaron mortalidades significativas por inmersión, por lo que podrían tratarse de patógenos secundarios u oportunistas que forman parte de la microbiota normal, causando enfermedad únicamente cuando por la actuación de otros patógenos o por circunstancias adversas, el hospedador presenta una mayor susceptibilidad. Un ejemplo que ilustra esta posibilidad son las cepas de *V. alginolyticus* aisladas por Balebona *et al.* (1998b) en dorada, capaces de causar mortalidad mediante inyección intraperitoneal pero no por inmersión, a no ser que previamente se retire la capa de mucus y la piel sea dañada. Por otro lado, mientras que en el caso de *P. baetica* no se sabe prácticamente nada en cuanto a su relación con el hospedador, *V. harveyi* sí es considerado miembro normal de la microbiota de muchos animales marinos, incluidos peces planos, y ha sido previamente descrito como patógeno oportunista, por ejemplo, en lenguado senegalés y platija de verano (Moriñigo *et al.* 2001, Padrós *et al.* 2003, Gauger *et al.* 2006).

▪ Patógenos bacterianos asociados al cultivo de acedía

Los cultivos de acedía presentaron un elevado número de episodios de mortalidad, siendo los más graves los que afectaron a larvas, alevines y juveniles, pudiendo perderse lotes enteros en pocos días o meses. Las cepas encontradas asociadas a estos episodios incluyeron representantes de cada uno de los fenones descritos en este trabajo excepto *P. damselae* subsp. *piscicida*, y en conjunto presentan un cuadro similar a los descritos en otras especies de peces planos. De hecho, de las cuatro especies patógenas recuperadas de acedías enfermas, tres de ellas: *T. soleae*, *T. maritimum* y *V. harveyi*, han sido descritas también causando enfermedad en lenguado senegalés cultivado en España (Padrós *et al.* 2003, Toranzo *et al.* 2003, Piñeiro-Vidal *et al.* 2008). En este sentido, la única especie patógena novedosa en acedía es la descrita aquí, *P. baetica*. Por otro lado, aunque *P. damselae* subsp. *piscicida* no fue aislado en ningún caso a partir de esta especie, mostró ser capaz de causar mortalidad tanto por inmersión como por

inyección, por lo que su aparición en cultivos de acedía probablemente sea solo cuestión de tiempo.

– Mortalidad en larvas

Los episodios de mortalidad larvaria que afectaron a la acedía fueron básicamente similares en sus características a los observados en las otras dos especies de peces planos estudiadas en esta memoria, por lo que se verán aquí en conjunto. En todos los casos el único síntoma observable fue la alta mortalidad que se producía en los tanques, lo que concuerda con lo observado en cultivos larvarios de otras muchas especies de peces planos que presentan mortalidades similares. La etiología de la enfermedad no está clara, no obstante, parece que es multicausal, siendo las bacterias presentes en los cultivos uno de los agentes etiológicos implicados (Wolke *et al.* 2000). Así por ejemplo, Benavente & Gatesoupe (1988) mostraron que las bacterias asociadas a los cultivos de rotíferos y artemias eran perjudiciales para las larvas de rodaballo, ya que la supervivencia de estas mejoraba cuando dichos cultivos eran tratados con antibióticos; no obstante, la mortalidad larvaria seguía siendo alta, por lo que concluyeron que otras causas, quizás deficiencias nutricionales, debían estar también implicadas.

En este trabajo, los tipos de bacterias aisladas a partir de larvas enfermas fueron básicamente similares para las tres especies de peces estudiadas, especialmente en el caso del rombo y la acedía, y no difirieron demasiado de las encontradas en otras especies. En todos los casos se trató de bacterias del género *Vibrio*, pertenecientes a cuatro grupos de aislados, dos de ellos relacionados con *V. alginolyticus* (G148 y G241) y otros dos relacionados con *V. splendidus* (G7 y G107). Sin embargo, no está claro que estas bacterias sean las causantes de las altas mortalidades. Por un lado, los fenones encontrados en larvas enfermas fueron similares a los encontrados en larvas sanas, y por otro lado ninguna de las cepas de estos grupos mostró ser virulenta en los ensayos de patogenicidad.

En el ensayo por inmersión realizado con larvas de acedía de 20 días, las cepas relacionadas con *V. splendidus* mostraron porcentajes de mortalidad similares al del grupo control (en torno al 60%), sin embargo las relacionadas con *V. alginolyticus* parecieron tener un efecto beneficioso en la supervivencia de las larvas, que fue mayor que en el grupo control (la mortalidad fue del 35-43%). Por otro lado, las cepas utilizadas como controles positivos en estos ensayos, *V. harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida*, mostraron resultados diferentes. En el caso de *V. harveyi*, estos fueron similares a los del control negativo, confirmando su incapacidad para provocar enfermedad por inmersión incluso con larvas, sin embargo *P. damsela* fue claramente patógena, con una tasa de mortalidad muy por encima del grupo control (100%).

En conjunto, estos resultados son similares a los observados por Thomson *et al.* (2005) al estudiar la mortalidad de larvas de rodaballo cultivadas en el norte de España. En ambos casos *V. alginolyticus* fue la única bacteria aislada de los cultivos de artemias, y también en ambos casos la práctica totalidad de las cepas aisladas de larvas enfermas correspondieron a *V. splendidus* y a *V. alginolyticus*. La virulencia de los aislados obtenidos fue asimismo parecida, ya que solo el 36% de las cepas de *V. splendidus* testadas por estos autores fue capaz de causar mortalidad, mientras que la única cepa de *V. alginolyticus* ensayada mejoró la supervivencia larvaria respecto al grupo control (62% frente al 44%).

No obstante, en el caso de *V. splendidus*, otros autores han encontrado que las cepas aisladas son en su mayor parte virulentas, siendo considerado un patógeno para larvas tanto de rodaballo como de halibut (Gatesoupe *et al.* 1999, Bergh *et al.* 2001). Por el contrario, aunque *V. alginolyticus* ha sido descrito causando enfermedad tanto en peces como en invertebrados marinos (Balebona *et al.* 1998b, Liu *et al.* 2004, Gómez-León *et al.* 2005, Austin 2010), las cepas aisladas de larvas de rodaballo han mostrado ser no virulentas (Munro *et al.* 1995) o incluso beneficiosas (Gatesoupe 1990) para estas, disminuyendo la tasa de mortalidad. Este efecto beneficioso ha sido observado también con algunas cepas de *Aeromonas* y *L. pelagia* aisladas de larvas de rodaballo, aunque otras son patógenas (Munro *et al.* 1995, Ringø & Vadstein 1998, Villamil *et al.* 2003a). Este fenómeno se ha atribuido a factores diversos, como por ejemplo que estas bacterias reduzcan la cantidad de amonio de los cultivos (Munro *et al.* 1995), que compitan con bacterias patógenas (Gatesoupe 1990), o que pueden tener efectos positivos en la nutrición de las larvas. A este último respecto, la endocitosis de bacterias por parte de larvas se ha demostrado en el caso del bacalao (Hansen & Olafsen 1990), por lo que Ringø & Vadstein (1998) realizaron ensayos en rodaballo con cepas de *L. pelagia* que demostraron que la presencia de estas bacterias en los cultivos mejoraba la supervivencia larvaria, un resultado que sugirieron podría deberse a que esta especie contiene un ácido graso poliinsaturado potencialmente útil para la nutrición de las larvas.

Otro factor a tener en cuenta en lo que a la mortalidad larvaria se refiere es que la mayor parte de los brotes se produjeron coincidiendo con la metamorfosis. Este proceso, que como se ha visto provoca importantes cambios fisiológicos y morfológicos en el pez, requiere un gran consumo de energía. Sin embargo, al mismo tiempo limita la adquisición de la misma debido a que durante el tiempo que dura, la eficacia en la captura del alimento disminuye, al verse afectada la visión y a que el paso de una vida pelagica a una bentónica implica cambios de comportamiento que la larva debe aprender. La metamorfosis suele ir acompañada de altas mortalidades, sin embargo no está claro si estas se deben al proceso en sí o, más posiblemente, a que este resta flexibilidad al pez para adaptarse a las circunstancias que lo rodean (Geffen *et al.* 2007, Herrera 2008).

En conjunto, las causas de la mortalidad observada en larvas siguen sin estar claras. Una posibilidad es que estos episodios sean causados por algún tipo de bacteria patógena que no haya sido detectada. Dado que las cepas obtenidas de estos brotes, especialmente las relacionadas con *V. alginolyticus*, crecen a gran velocidad y acaban por ocupar toda la placa de cultivo, no se puede descartar que estas enmascaren la presencia de patógenos que podrían causar altas mortalidades, como *P. damsela* subsp. *piscicida*, *T. soleae* o *T. maritimum*, todos ellos de crecimiento lento. Otra posibilidad es que las mortalidades estén causadas por bacterias pertenecientes a alguno de los fenones encontrados (*V. alginolyticus*, *V. splendidus*). En este caso, podría ser que las cepas ensayadas no sean virulentas pero otras sí, como se ha visto en otros estudios (Gatesoupe *et al.* 1999, Thomson *et al.* 2005), o bien que se trate de patógenos oportunistas que causen mortalidad a concentraciones más altas de las ensayadas aquí, o cuando las larvas presentan una mayor susceptibilidad. En este sentido, hay que tener en cuenta que la alta carga de materia orgánica presente en los cultivos -debida a la presencia de altas concentraciones de larvas y sus presas, vivas o muertas- favorece el crecimiento y propagación de estas bacterias oportunistas, y que el proceso de metamorfosis constituye un elemento que debilita las larvas, volviéndolas más susceptibles a un posible patógeno, en un momento en el que además el sistema inmune está aún inmaduro (Hansen & Olafsen 1999).

– Mortalidad en alevines y juveniles

En alevines y juveniles de acedía, la mayor parte de los episodios de mortalidad fueron causados por vibriosis, tenacibaculosis o una asociación de ambas enfermedades, siendo posiblemente el canibalismo que se da en estas edades un factor que contribuye a la aparición y propagación de las mismas. Los tanques afectados generalmente presentaban una mortalidad baja pero constante que era interrumpida cada cierto tiempo por episodios de alta mortalidad. Patrones similares han sido observados, por ejemplo, en cultivos de rodaballo afectados por *T. maritimum*, debido a que aunque los tratamientos con quimioterápicos funcionan bien en un principio, las mortalidades reaparecen a las pocas semanas (Toranzo *et al.* 1997). Los síntomas observados fueron también los típicos de estas dos enfermedades. La mayor parte de los peces afectados mostraban cuadros ulcerativos, pudiendo en ocasiones darse también alteraciones en órganos internos, apatía y pérdida del equilibrio. No obstante en algún caso los peces no mostraban síntoma alguno de enfermedad.

Los patógenos implicados en estos episodios fueron *V. harveyi*, *T. soleae* y *T. maritimum*. En conjunto, estas tres especies abarcan la práctica totalidad de los brotes estudiados, ya que fueron aislados, separadamente o en asociación, en ocho de los once

muestreos realizados, mientras que la PCR específica desarrollada en este trabajo contra *T. soleae* permitió detectar la presencia de este patógeno en peces de otros dos muestreos más.

De estas tres especies, *V. harveyi* fue la que se aisló con más frecuencia, apareciendo en un número de brotes similar al de las dos especies de *Tenacibaculum* juntas, siendo en una gran parte de los muestreos el único patógeno encontrado. No obstante, no parece claro que la vibriosis por esta especie sea la principal enfermedad que afecta a alevines y juveniles, ya que los resultados de los ensayos de virulencia por inmersión parecen indicar que se trata más bien de un patógeno secundario. En este sentido, Padrós *et al.* (2003) observaron que en lenguado senegalés las vibriosis causadas por *V. harveyi* (y *V. alginolyticus*) y las tenacibaculosis por *T. maritimum* aparecían frecuentemente asociadas, detectándose generalmente las primeras como infecciones secundarias asociadas a la tenacibaculosis inicial. No obstante, esto no siempre era así, por lo que no puede descartarse la posibilidad de que en ciertos casos *V. harveyi* pueda actuar como patógeno primario, o que se de algún tipo de sinergia entre las dos especies.

En este trabajo, este tipo de asociación se observó solamente en dos brotes, ambos de juveniles con alta mortalidad, apareciendo asociados *T. soleae* y *V. harveyi* en el primero de ellos, y las tres especies patógenas en el segundo. Sin embargo, es posible que esta asociación se haya dado en un número mucho mayor de casos y que constituya de hecho la tónica general en estos episodios de mortalidad. El hecho que sugiere esta hipótesis es que en la mayor parte de los muestreos en los que no se obtuvo ningún aislado de *Tenacibaculum* se pudieron sin embargo observar, en las improntas de las lesiones de los peces, cantidades significativas de bacterias filamentosas que luego no crecían en placa o que eran imposibles de recuperar. Aunque estas no tendrían por qué pertenecer a *T. soleae* o a *T. maritimum*, el hecho de que mediante PCR haya podido confirmarse la presencia de *T. soleae* entre las bacterias filamentosas presentes en varias de estas improntas, da fuerza a esa posibilidad. En el caso de *T. maritimum* además varios autores han observado que las bacterias presentes en las muestras pueden ocultar o inhibir su crecimiento, por lo que su recuperación a partir de muestras naturales, a pesar de haberse descrito un medio de cultivo específico para su aislamiento, sigue siendo complicada (Pazos *et al.* 1996, Avendaño-Herrera *et al.* 2004b, Avendaño-Herrera *et al.* 2006b). Por otra parte, la dificultad de recuperar *T. soleae* y *T. maritimum* se puso de manifiesto en este trabajo durante la realización de los ensayos de virulencia, en los que solo fue posible recuperar unos pocos aislados o ninguno en absoluto a partir de los peces enfermos.

Ninguna de las especies patógenas implicadas en estos episodios fue aislada nunca en cultivo puro, sino asociadas a cepas de otros fenones no patógenos de los géneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Psychrobacter* y *Tenacibaculum*. Dado que muchas de estas cepas fueron aisladas no solo a partir de lesiones externas sino también a partir de órganos internos, es posible que algunos de estos grupos bacterianos -concretamente *Pseudoalteromonas*

spp. y varios fenones de *Vibrio*, entre ellos los relacionados con *V. alginolyticus* y *V. splendidus*- hayan actuado, como probablemente *V. harveyi*, como patógenos secundarios.

Dentro del género *Pseudoalteromonas*, algunas especies han sido descritas, muy raramente, como patógenos oportunistas de peces marinos (Nelson & Ghiorse 1999, Buller 2004, Bowman 2007, Pujalte *et al.* 2007). Por ejemplo, Pujalte *et al.* (2007) encontraron, asociadas a episodios de mortalidad en cultivos de dorada y lubina cultivadas en España, cepas de cuatro especies de *Pseudoalteromonas*; sin embargo, aunque todas ellas fueron aisladas de órganos internos, en los ensayos de virulencia no fueron capaces de causar mortalidad, o lo hicieron a altas concentraciones. Por el contrario, *V. alginolyticus* y *V. splendidus* sí han sido descritos como patógenos de juveniles de peces, entre ellos la dorada o el rodaballo, siendo considerados en ciertos casos patógenos oportunistas (Austin *et al.* 1993, Angulo *et al.* 1994, Balebona *et al.* 1998a, 1998b, Diggles *et al.* 2000b, Padrós *et al.* 2003, Buller 2004, Liu *et al.* 2004, Austin 2010).

Otra bacteria aislada en este trabajo a partir de alevines y juveniles de acedía (si bien nunca a partir de órganos internos), y que podría haber actuado como patógeno oportunista es *V. tapetis*. Esta especie ha sido aislada asociada a episodios de mortalidad en porredana y halibut, pero mientras que es patógeno para la primera, su relación con las mortalidades en halibut, al igual que en las de acedía, no está clara (Jensen *et al.* 2003, Reid *et al.* 2003a). La falta de susceptibilidad de estas especies podría deberse a las condiciones utilizadas en los ensayos de virulencia; en almeja japonesa por ejemplo, las bajas concentraciones salinas favorecen el desarrollo de la BRD (Reid *et al.* 2003b), mientras que temperaturas por encima de los 21°C previenen el desarrollo de la enfermedad (Paillard 2004).

Por último, en uno de los muestreos realizados, el A2-SE1-2, no se pudo detectar ninguna especie patógena asociada. En este caso, solo se obtuvieron aislados a partir de uno de los diez peces muestreados, y aún en ese caso estos pertenecieron a un fenón no patógeno, el G500 (*Polaribacter* sp.), por lo que la etiología de este brote permanece desconocida.

– Mortalidad en adultos

Los adultos de acedía mostraron ser menos susceptibles a la enfermedad que alevines y juveniles, dándose solamente dos episodios de importancia. Uno de ellos, ocurrido a finales de 2007, no ha sido incluido en este trabajo debido a que no pudo ser convenientemente caracterizado. Este brote tuvo lugar tras ser trasladados de tanque los peces, siendo los principales síntomas melanosis y hemorragias o necrosis en órganos internos, principalmente en el hígado. La mortalidad fue importante, sin embargo solamente se recuperó un aislado a partir de uno de los peces muestreados, por lo que la etiología podría ser no bacteriana. La única cepa

obtenida fue aislada de órganos internos (riñón) e identificada como *Vagococcus* sp., siendo su patogenicidad desconocida. No obstante otras especies de este género han sido descritas como patógenos de peces, como por ejemplo *Vagococcus salmoninarum*, que causa una enfermedad de tipo septicémico en salmónidos (Schmidtke & Carson 1994).

El otro episodio ocurrido en adultos tuvo lugar a principios de 2006, presentó baja mortalidad y una sintomatología diferente a la observada en alevines y juveniles. Aunque en algún caso se observaron pequeñas lesiones externas, en general los peces no mostraban ningún síntoma externo de enfermedad, y solo en algunos casos se observaron alteraciones en órganos internos (hemorragias, inflamación, necrosis). Los patógenos aislados en este caso fueron *T. soleae*, *V. harveyi* y *P. baetica*, no obstante también se aislaron cepas de *Aliivibrio* sp. G54 y *Photobacterium* sp. G185 que como se ha comentado podrían también ser patógenas. Sin embargo, todas estas cepas fueron aisladas a partir de peces y fechas diferentes, por lo que no está claro cual podría ser el agente o agentes etiológicos determinantes.

▪ Patógenos bacterianos asociados al cultivo de lenguado senegalés

Los cultivos de lenguado presentaron, al igual que los de acedía, un elevado número de episodios de alta mortalidad, que afectaron principalmente a larvas, juveniles y adultos. En larvas, al igual que en acedía, el único síntoma observable fue la alta mortalidad de los tanques, sin embargo, en el único brote estudiado los peces no se encontraban realizando la metamorfosis, y los únicos aislados obtenidos estaban relacionados con *V. alginolyticus*, no encontrándose cepas próximas a *V. splendidus*.

En juveniles y adultos, las enfermedades que afectaron a los cultivos fueron tenacibaculosis por *T. soleae*, vibriosis por *V. harveyi* y, la más importante ya que siempre apareció asociada a altas mortalidades, photobacteriosis causada por *P. damsela* subsp. *piscicida*. Todas estas patologías han sido ya descritas en esta especie por otros autores (Padrós *et al.* 2003, Toranzo *et al.* 2003, Piñeiro-Vidal *et al.* 2008). Cada una de estas especies apareció en brotes distintos, no dándose ningún tipo de asociación entre ellas.

▪ Patógenos bacterianos asociados al cultivo de rombo

A diferencia de lo observado en lenguado y acedía, los cultivos de rombo se caracterizaron por apenas presentar episodios de mortalidad en peces *destetados*. El principal problema que se dio en esta especie fue el de la mortalidad larvaria, que como se ha dicho, fue similar en sus características al observado en acedía: alta mortalidad sin síntomas aparentes en

peces que realizan la metamorfosis, con una microbiota asociada constituida por bacterias relacionadas con *V. alginolyticus* y *V. splendidus*, y que es similar a la observada en larvas sanas. No obstante, a diferencia de la acedía, la escasez de peces impidió la realización de ensayos de virulencia con larvas de esta especie.

En peces *destetados* no se registraron mortalidades importantes ni en alevines ni en juveniles. Únicamente en adultos se dio un brote con alta mortalidad en el que los peces mostraron un cuadro septicémico, sin embargo, no se aisló ningún aislado bacteriano, por lo que el episodio podría tener una etiología vírica. Por último, el único patógeno detectado en esta especie fue *T. soleae*, recuperado a partir de un único pez adulto que presentaba un cuadro ulcerativo.

▪ Epizootiología de los patógenos encontrados

Los resultados obtenidos en este trabajo han permitido extender el rango de especies hospedadoras de varios patógenos de peces, como *V. harveyi*, *T. maritimum* y *T. soleae*, descritos por primera vez en acedía los dos primeros y en acedía y rombo el último. Estos resultados son de especial interés en el caso de *T. soleae*, ya que esta especie, recientemente descrita, solo había sido detectada en lenguado senegalés cultivado en Galicia (Piñeiro-Vidal *et al.* 2008). Los resultados obtenidos aquí amplían su número de hospedadores y confirman su presencia en lenguado senegalés cultivado en el sur de España, lo que junto con los resultados obtenidos en los ensayos de virulencia, indica que debe ser una especie a tener en cuenta en el futuro, por ejemplo para la elaboración de vacunas. Por otro lado, la realización de este trabajo ha permitido la descripción de una nueva especie patógena de peces, *P. baetica*, por el momento solo descrita en acedía.

La sintomatología de los peces afectados y las condiciones en las que se recuperaron los distintos patógenos varió según la especie. En el caso de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, los dos episodios estudiados se dieron con temperaturas de 19-22°C, lo que concuerda con lo publicado por otros autores, que han observado que las mortalidades más importantes se dan cuando la temperatura del agua se sitúa por encima de los 18-20°C, pudiendo permanecer el patógeno en el hospedador sin causar enfermedad por largos periodos de tiempo a temperaturas inferiores (Magariños *et al.* 1992, Padrós *et al.* 2003, Toranzo *et al.* 2005).

Los síntomas observados en los peces afectados (juveniles y adultos de lenguado) fueron los típicos de esta enfermedad: exteriormente melanosis o ningún síntoma en absoluto, internamente ascitis, hemorragias muy notorias en el hígado e inflamación y presencia de granulomas blanquecinos en riñón y/o bazo (Toranzo *et al.* 2005). Todos los aislados fueron

recuperados a partir de órganos internos, y todas las cepas utilizadas en los ensayos serológicos mostraron pertenecer al único serotipo descrito en esta subespecie (Magariños *et al.* 1992, Romalde 2002).

Las cepas de *T. maritimum* fueron recuperadas también con temperaturas elevadas, de entre 19 y 22°C, pero solo a partir de juveniles de acedía. Estos resultados concuerdan con lo descrito en otras especies, en las que se ha observado que la enfermedad es más severa y presenta una mayor prevalencia a temperaturas por encima de los 15°C y en peces jóvenes más que en adultos (Bernardet *et al.* 1994, Toranzo *et al.* 2005, Avendaño-Herrera *et al.* 2006b).

Los principales síntomas observados fueron úlceras en la aleta caudal; en algún caso los peces mostraban también inflamación de la zona visceral o alteraciones en el hígado (hemorragias, anemia), sin embargo estas nunca fueron tan aparentes como en el caso de las observadas con *P. damsela* subsp. *piscicida*. Esta sintomatología se corresponde con la descrita por otros autores, dado que aunque el patógeno se caracteriza por provocar cuadros ulcerativos, también puede provocar septicemia y afectar a los órganos internos (Alsina & Blanch 1993, Bernardet 1998, Toranzo *et al.* 2005, Avendaño-Herrera *et al.* 2006b). A diferencia de la especie anterior, todos los aislados fueron recuperados de lesiones externas.

La caracterización serológica reveló que las cepas obtenidas de acedía eran serológicamente heterogéneas, perteneciendo a dos de los tres serotipos descritos. Estos parecen estar relacionados con la especie hospedadora. Así, el serotipo O1 abarca todos los aislados obtenidos de dorada y la mayor parte de los de lenguado senegalés cultivado en el noroeste de España, el serotipo O2 abarca los aislados de rodaballo y el O3 las cepas recuperadas de lenguado senegalés cultivado en Portugal y sur de España (Avendaño-Herrera *et al.* 2004a, 2005, 2006b). Las cepas aisladas en este trabajo a partir de acedía mostraron resultados similares a los observados en lenguado senegalés, al pertenecer en todos los casos a los serotipos O1 y O3, no encontrándose ningún aislado del serotipo O2. Por otra parte, los dos serotipos detectados no coexistieron en ninguno de los brotes estudiados.

En el caso de *T. soleae*, los resultados obtenidos aquí son de mayor interés debido a que en la descripción original del patógeno solo se indicaba que este había sido aislado a partir de lenguado senegalés enfermo (Piñeiro-Vidal *et al.* 2008), por lo que poco se sabe de la enfermedad causada por esta especie. En esta memoria, *T. soleae* ha sido detectado en cultivos de acedía, lenguado senegalés y rombo, afectando a peces de todas las edades excepto larvas (alevines de acedía, juveniles de acedía y lenguado y adultos de las tres especies). La bacteria fue recuperada con temperaturas de 10-22°C, tanto a partir de lesiones externas como de órganos internos (hígado, riñón).

La sintomatología que presentaban los peces afectados fue muy variable, no obstante puede clasificarse en cuatro tipos de cuadros que podían darse conjuntamente en un mismo brote: 1) cuadro ulcerativo, los peces muestran úlceras externas, principalmente en la aleta caudal, pero no alteraciones en órganos internos; 2) septicémico, no hay síntomas externos o son de poca importancia, pero sí se observan alteraciones en órganos internos (hígado necrosado o hemorrágico); 3) septicémico-ulcerativo, los peces muestran tanto úlceras externas como alteraciones en órganos internos; y 4) septicémico-hemorrágico, los únicos síntomas observados son hemorragias (petequias) en boca, zona ventral y aletas. Entre los peces a partir de los cuales se obtuvieron cepas de *T. soleae*, los dos primeros cuadros fueron los más frecuentes, abarcando cada uno el 37,5% de los peces, dándose cada uno los otros dos cuadros en un 12,5% de peces.

Esta variedad de síntomas ha sido observada en otras especies patógenas de peces, como por ejemplo *L. anguillarum* y *A. salmonicida*, y puede deberse a factores diversos como la especie hospedadora, la edad del pez, y factores como la temperatura del agua, el grado de virulencia de las cepas implicadas o el nivel de estrés de los peces, que pueden influir en que la enfermedad siga un curso agudo, crónico, o que permanezca asintomática (Levin *et al.* 1972, Roberts 1981, Toranzo *et al.* 2005). En este trabajo no se ha observado ningún patrón de síntomas específico de una determinada especie, edad o temperatura (por ejemplo, el cuadro ulcerativo se dio en las tres especies de peces planos, en alevines, juveniles y adultos, y en todo el rango de temperaturas mencionado), por lo que las diferencias observadas posiblemente se deben a un conjunto de factores que hacen que la enfermedad siga un curso agudo o crónico, tal como se observa por ejemplo en *A. salmonicida*. Esta especie causa una enfermedad de tipo septicémico que puede ir o no aparejada a la presencia de furúnculos; sin embargo, si la enfermedad sigue un curso agudo, la muerte puede ser tan rápida que los peces afectados apenas muestran síntomas, mientras que en las infecciones crónicas la aparición de furúnculos es frecuente (Roberts 1981).

La caracterización serológica reveló, al igual que en el caso de *T. maritimum*, la existencia de variabilidad antigénica. Tres cepas, aisladas de acedía y lenguado senegalés, mostraron pertenecer al mismo serotipo que la cepa tipo de *T. soleae*, sin embargo, los demás aislados (recuperados de acedía, lenguado y rombo) mostraron resultados negativos al utilizarse antígenos O, por lo que podrían constituir nuevos serotipos dentro de esta especie. Futuros estudios determinarán el número de serotipos presentes, si presentan especificidad de hospedador y si son útiles como herramientas epidemiológicas.

V. harveyi fue recuperado con temperaturas de 10-22°C a partir de peces (acedías y lenguados *destetados* de cualquier edad) que presentaban generalmente cuadros ulcerativos o septicémico-ulcerativos, siendo en este caso la decoloración por anemia la principal alteración interna observada. Esta sintomatología concuerda con la descrita por otros autores en tiburones

y en lenguado senegalés (Bertone *et al.* 1996, Padrós *et al.* 2003, Zorrilla *et al.* 2003), no obstante los síntomas observados en las distintas especies de peces afectadas por este patógeno son muy variables, incluyendo gastroenteritis y especialmente lesiones oculares, que en ningún caso se observaron en este estudio (Ishimaru & Muroga 1997, Lee *et al.* 2002, Austin & Zhang 2006). Aunque fue aislado con cierta frecuencia a partir de órganos internos, generalmente se recuperó a partir de lesiones externas. A partir de rombo no se obtuvo ninguna cepa.

P. baetica fue detectada solamente en dos brotes ocurridos con temperaturas de 14-20°C (meses de marzo y diciembre), afectando en ambas ocasiones a adultos de acedía que presentaban mortalidades bajas o muy bajas. Dado que la tasa de mortalidad que presentaban los peces solo fue significativa en el episodio ocurrido a 14°C, y que se trata de una bacteria psicrófila (capaz de crecer a 4°C), es probable que esta especie se de más frecuentemente con las temperaturas bajas del invierno, como ocurre con la principal especie de *Pseudomonas* patógena de peces, *P. anguilliseptica*, que causa enfermedad con temperaturas por debajo de los 16°C (Austin & Austin 1999, Romalde 2005, Toranzo *et al.* 2005).

Los síntomas observados fueron variables. En el brote ocurrido a 14°C, los peces no mostraban absolutamente ningún síntoma de enfermedad, ni externo ni interno. Por el contrario, el único pez muestreado a 20°C mostraba lesiones externas (úlceras) y alteración del equilibrio. La bacteria fue, sin embargo, recuperada siempre a partir de órganos internos (hígado y riñón), prácticamente en cultivo puro. Por otra parte, sería conveniente testar la virulencia de estos aislados a 14°C con el fin de comprobar si el grado de virulencia se ve afectado por la temperatura y si se trata o no de un patógeno oportunista.

La prevalencia de todas estas especies, tal como se ha podido probar en el caso de *T. soleae*, probablemente sea mayor que la que indica el número de aislamientos obtenidos. De hecho, aunque en la mayor parte de los brotes estudiados se pudieron encontrar asociados uno o más patógenos, por regla general estos no fueron consistentemente aislados de los peces enfermos. Únicamente en tres casos el patógeno detectado (*P. damsela* subsp. *piscicida* en los dos brotes en los que fue detectado y *V. harveyi* en el muestreo A3-MA) fue recuperado de todos o casi todos los peces muestreados.

Esta inconsistencia en el aislamiento de los patógenos ha sido también observada por otros autores en estudios similares (Gauger *et al.* 2006), y podría deberse a la utilización de muestras, condiciones o medios de cultivo inadecuados, a la presencia de bacterias contaminantes, o a la conjunción de estos u otros factores. La utilización de una mayor variedad de muestras, de medios de cultivo y condiciones más específicas, o de métodos moleculares de detección más sensibles que el aislamiento en placa serían de utilidad para conocer la prevalencia real de estos patógenos. Futuros trabajos deberán estudiar también las rutas de

transmisión, reservorios, estrategias de supervivencia y mecanismos de virulencia de estos patógenos, así como su resistencia a la utilización de probióticos, quimioterápicos y vacunas.

▪ Métodos de identificación utilizados

La caracterización e identificación de los aislados se realizó de acuerdo a los criterios de la taxonomía polifásica, utilizándose tanto métodos fenotípicos (caracterización fenotípica clásica, galerías API, BIOLOG, caracterización serológica) como genotípicos (secuenciación de genes ribosómicos y “housekeeping”, MLSA, hibridación ADN-ADN, PCR con cebadores específicos).

La caracterización fenotípica clásica por sí sola no permitió, en la mayor parte de los casos, una identificación clara a nivel de especie, siendo la excepción *P. damsela* subsp. *piscicida* y *V. tapetis*, ambas con perfiles muy característicos. Sin embargo, a menudo sí posibilitó la identificación a nivel de familia, género o de grupo de especies; caso, por ejemplo, de los diversos fenones relacionados con *V. harveyi* o con *V. splendidus*. La utilización de las galerías API, por otro lado, tampoco permitió una identificación fiable de los aislados a nivel de especie, dado que las bases de datos de las mismas no suelen incluir especies patógenas de peces o de medios marinos. No obstante, estos sistemas son utilizados comúnmente en laboratorios de ictiopatología de todo el mundo como herramienta de caracterización (Austin & Austin 1999, Romalde 2005) ya que permiten la realización de un número considerable de test de forma rápida y cómoda.

Los resultados obtenidos en este trabajo para test realizados mediante métodos clásicos y mediante galerías API fueron generalmente similares, no obstante, en algún caso se observaron discrepancias. Por ejemplo, las cepas de *V. harveyi* mostraron con frecuencia resultados falsos negativos en las pruebas ornitina decarboxilasa, ureasa e indol cuando se utilizaba el sistema API 20E. La existencia de estas reacciones falso negativas y/o falso positivas con algunas pruebas de estos sistemas ya ha sido descrita con bacterias aisladas de peces (Kent 1982, Grisez *et al.* 1991, Santos *et al.* 1993). En algún caso también se observaron diferencias con las descripciones publicadas por otros autores, por ejemplo para los perfiles del API 20NE y API ZYM de *P. damsela* subsp. *piscicida*. Estas inconsistencias no son infrecuentes y pueden deberse a la utilización, por parte de los autores, de una metodología diferente (en nuestro caso, por ejemplo, se utilizaron inóculos con agua de mar y temperaturas de incubación de 20°C), a una diferente interpretación de datos relativamente subjetivos o también a variaciones entre cepas de una misma especie.

El sistema BIOLOG se reveló también como un método de identificación de utilidad limitada. Únicamente los fenones relacionados con *V. alginolyticus* fueron identificados de forma aceptable a nivel de especie; en otros casos, el sistema permitió una identificación a nivel de género o grupo de especies, por ejemplo, en el caso de *V. harveyi*. Sin embargo, en otros casos el sistema o bien realizó identificaciones erróneas (caso de la cepa *Photobacterium* a197, identificada como *V. splendidus*) o no proporcionó ninguna identificación en absoluto (caso de las cepas de *Pseudoalteromonas* spp. o de *V. tapetis*). Uno de los principales inconvenientes del sistema, y que explica en parte los malos resultados obtenidos, reside en la base de datos, que incorpora un número relativamente bajo de especies. Por ejemplo, entre las especies relacionadas con *V. splendidus*, muchas de ellas (*V. lentus*, *V. kanaloae*, *V. pomeroyi*, etc..) no se incluyen en la base de datos de BIOLOG. No obstante estos inconvenientes, el sistema BIOLOG resultó útil para la caracterización de los aislados obtenidos. En el caso de *V. tapetis*, aunque el sistema no pudo identificar las cepas ensayadas a ningún nivel taxonómico, los perfiles obtenidos pudieron compararse con los publicados para esta especie por otros autores, mostrando ser prácticamente idénticos. También permitió una mejor diferenciación fenotípica de *P. baetica* respecto a otras especies del género. Por otra parte, el sistema permite la creación de bases de datos propias, por lo que en ciertos casos podría utilizarse también como instrumento de identificación una vez puesto a punto.

En conjunto, la caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de los aislados identificados a nivel de especie (*P. damsela* subsp. *piscicida*, *T. maritimum*, *T. soleae*, *V. harveyi*, *V. tapetis*) mostraron resultados similares a los descritos para estas especies por otros autores, aunque como se ha comentado, en todos los casos se dieron, en mayor o menor medida, discrepancias en algunas pruebas.

La utilización de métodos serológicos con células enteras fue de utilidad para confirmar la identificación de los aislados de *P. damsela* subsp. *piscicida*, *T. maritimum* y *T. soleae*. En el caso de *V. tapetis*, sin embargo, el resultado obtenido con células enteras fue negativo. La inclusión de estas cepas en dicha especie se basó por tanto, en principio, en las características fenotípicas, en la secuenciación del gen ARNr 16S y en la utilización de cebadores específicos.

Hasta ahora, se habían descrito dentro de *V. tapetis* tres grupos serológicos y genéticos coincidentes y que guardaban relación con la especie hospedadora (Balboa *et al.* 2006, Rodríguez *et al.* 2006). Por esta razón, en colaboración con el Dr. J.L. Romalde de la Universidad de Santiago de Compostela, se realizaron ensayos de REP-PCR y ERIC-PCR, así como un análisis MLSA con varios genes “housekeeping”, concretamente el *rpoA*, *pyrH* y *atpA*. Los resultados de estas pruebas, no incluidas en este trabajo, confirmaron que las cepas caracterizadas pertenecían a *V. tapetis* y mostraron que estas constituyen un nuevo grupo genético y serológico, claramente diferenciado de las demás cepas de esta especie (López *et al.* 2010b). Por último, mencionar en lo que se refiere a métodos fenotípicos, que el equipo de la Dr.

Y. Santos de la Universidad de Santiago de Compostela caracterizó los ácidos grasos (FAME) de varias cepas de *T. soleae* obtenidas en este trabajo, obteniendo perfiles similares a los de la cepa tipo de esta especie (López *et al.* 2010a).

Entre los métodos genotípicos empleados, la secuenciación del ADNr 16S fue el más utilizado y aún con sus limitaciones, constituyó una herramienta muy útil para asignar los aislados a distintos niveles taxonómicos, especialmente a nivel de género, ya que las descripciones fenotípicas de estos, como las proporcionadas por el Manual de Bergey (Holt *et al.* 1994), no siempre son lo suficientemente discriminantes y pueden resultar poco útiles en la práctica. La secuenciación de este gen ribosómico fue también de gran utilidad para mostrar las especies más relacionadas dentro de un género, pero la identificación a nivel de especie fue más complicada. En el caso de *P. damselae*, *T. maritimum*, *T. soleae*, *V. harveyi* y *V. tapetis*, la utilización de secuencias casi completas permitió una identificación aceptable a nivel de especie, acorde con la caracterización fenotípica.

Sin embargo, en el caso de *P. baetica*, los resultados con secuencias prácticamente completas no fueron determinantes ya que un número considerable de especies del género *Pseudomonas* presentaban secuencias muy parecidas, con valores superiores a los indicados por Stackebrand & Ebers (2006) como límite interespecífico. Por otro lado, cuando se utilizaron secuencias parciales, generalmente solo se pudo llegar a una identificación a nivel de grupo de especies dentro de un género (caso por ejemplo de las cepas *Aliivibrio* sp. a54, *Vibrio* sp. a7, *Vibrio* sp. a35, etc.). Sin embargo, en ciertos casos incluso estas secuencias parciales mostraron unos valores de similitud con especies descritas manifiestamente por debajo del límite del 98,7% propuesto por Stackebrand & Ebers (2006). Las cepas de cinco fenones, a saber: *Polaribacter* sp. G500, *Photobacterium* sp. G185, *Photobacterium* sp. G197 y *Vibrio* sp. G29/G256, mostraron este tipo de resultados, lo que sugiere que probablemente se trata de nuevas especies, una suposición apoyada también por los resultados de la caracterización fenotípica de estos aislados.

Otros genes secuenciados fueron el ARNr 23S, el *gyrB* y el *rpoD*. Aunque en el caso del 23S solo se utilizaron secuencias parciales muy cortas, estas parecen tener un mayor poder de discriminación que el ADNr 16S, no obstante presentan el inconveniente de que el número de secuencias depositadas en las bases de datos es limitado.

Los genes *gyrB* y *rpoD* se utilizaron únicamente para la caracterización de *P. baetica*. Mostraron una resolución a nivel de especie mucho mayor que el ADNr 16S y no presentaron problemas de disponibilidad de secuencias en la base de datos, pudiéndose abarcar todas las especies que eran de interés para la descripción de esta nueva especie. Ambos genes mostraron bajos porcentajes de similitud con otras especies de *Pseudomonas*, generalmente del 93% o

menos, y agruparon las cepas de *P. baetica* en clados claramente diferenciados filogenéticamente de las demás especies del género.

La utilización de secuencias concatenadas en el análisis MLSA fue asimismo de gran utilidad, obteniéndose resultados básicamente similares. La similitud intraespecífica en *P. baetica* con estas secuencias fue muy alta (por encima del 99%), sin embargo los valores de similitud con otras especies fueron mucho menores (generalmente del 96% o menos) situándose por debajo del límite interespecífico del 97% propuesto por Roselló-Mora (2009) y observado por Mulet *et al.* (2010) dentro del género *Pseudomonas*.

Los ensayos de hibridación ADN-ADN confirmaron los resultados obtenidos mediante MLSA. De acuerdo a los límites establecidos por Wayne *et al.* (1987), las cepas de *P. baetica* compartieron porcentajes de hibridación por encima del 70%, e inferiores a ese valor con cepas de otras especies. Por otra parte, como ya se ha comentado, diversos autores consideran que el análisis MLSA constituye una alternativa a la hibridación ADN-ADN a la hora de asignar aislados bacterianos a una determinada especie, ya que muestra resultados congruentes con los de esta, al tiempo que es una técnica más rápida, fácil y reproducible que además presenta la ventaja de permitir el almacenamiento y comparación de los resultados en bases de datos (Yamamoto *et al.* 1999, Zeigler 2003, Mulet *et al.* 2010).

Por último, la utilización de protocolos de PCR con cebadores específicos fue de utilidad en la identificación de *P. damsela* subsp. *piscicida*, *T. maritimum*, *V. harveyi* y *V. tapetis*, además de permitir descartar, en el caso de otros fenones, especies que figuraban como probables de acuerdo a a caracterización fenotípica y genotípica, como *A. fischeri*, *P. fluorescens*, *V. harveyi* o *V. splendidus*.

▪ **Análisis de la región ITS1**

El análisis de la región espaciadora situada entre los genes ARNr 16S y 23S (ITS1) se realizó fundamentalmente con el fin de evaluar su idoneidad para el diseño de sondas y cebadores específicos que permitiesen la identificación de las especies patógenas encontradas en este trabajo.

En los casos de *P. baetica*, *T. maritimum* y *T. soleae* se observaron varias características comunes. Las tres especies presentaban una única banda de amplificación y los ITS encontrados pertenecían en los tres casos a una misma clase, la ITS1^{IA}, conteniendo dos genes tRNA, el de la isoleucina y el de la alanina. Los resultados obtenidos parecen indicar además que estas especies tienen o bien un único operón ribosómico, o bien varios con ITS1 similares; no obstante la primera opción parece menos probable dado que en un estudio en el que se analizaron los ITS1 de 155 bacterias de taxones muy diversos, Stewart & Cavanaugh (2007)

encontraron que el número de operones ribosómicos por cepa era de entre 2 y 15, no detectando ninguna cepa que tuviese un único operón.

Por otra parte, la presencia de una única clase de ITS1 es frecuente en bacterias, de hecho, los autores mencionados encontraron que solo el 41% de los genomas analizados contenían dos o más clases. Este parece ser, sin embargo, el caso de *P. damsela*e y *V. harveyi*, ya que todas sus cepas, excepto una, mostraron al menos dos bandas de amplificación. Los ITS1 encontrados a partir de las bandas de menor tamaño, las únicas secuenciadas, fueron en todos los casos de la clase ITS1⁰, no conteniendo ningún gen tRNA. No obstante, la existencia de otras bandas de amplificación sugiere que otras clases de ITS1, posiblemente con genes tRNA, se hayan presentes en las cepas de estas dos especies, algo que ya ha sido de hecho observado por otros autores. Por ejemplo, Osorio *et al.* (2005) estudiaron la región espaciadora de las dos subespecies de *P. damsela*e, demostrando que esta especie presenta un elevado número de clases de ITS1, con combinaciones de dos, tres, cuatro o ningún gen tRNA. En el caso de *V. harveyi*, también hay publicadas secuencias para la cepa ATCC 33842, que presenta tres clases de ITS1, con uno, dos o ninguno de estos genes de transferencia. En los aislados de *V. harveyi* incluidos en este trabajo, la presencia de otras clases de ITS1 debería no obstante estudiarse en más profundidad, ya que en algunos casos parece que la dos bandas de amplificación principales sean similares a nivel de secuencia.

La composición de genes tRNA de los ITS1 encontrados en las especies estudiadas corresponden con los más frecuentemente hallados en bacterias; así, en su estudio, Stewart & Cavanaugh (2007) encontraron que la combinación conteniendo los genes tRNA^{Ala} y tRNA^{Ile} se daba en el 48% de las secuencias ITS1, mientras que en el 27% de los casos no aparecía ningún gen tRNA. No obstante, la presencia de estos genes variaba ampliamente de unos grupos bacterianos a otros, por ejemplo, en Actinobacteria no se dieron en ningún caso, mientras que en Gamma-Proteobacteria solo el 8% de los ITS1 no presentaban ningún gen tRNA. La longitud de los ITS1 encontrados aquí (540-592 pb en el caso de los ITS1^{IA} y 277-350 pb en el de los ITS1⁰) entra también dentro del rango observado por estos autores, que sitúan la media en 476 pb, siendo los extremos *Lactobacillus salivarius* con 13 pb y *Saccharophagus degradans* con 2880 pb.

Por lo que respecta a la variación intraespecífica dentro de cada especie, esta se estudio únicamente entre secuencias ITS1 de la misma clase. Comparados con los resultados obtenidos por Stewart & Cavanaugh (2007), que registraron porcentajes de disimilitud del 0-12,11% entre secuencias de la misma clase, los obtenidos aquí presentaron un rango mayor, cuando se compararon con secuencias ya publicadas. Los máximos porcentajes de disimilitud entre las secuencias ITS1 de *P. baetica*, *P. damsela*e, *T. maritimum*, *T. soleae* y *V. harveyi* obtenidas en este trabajo fueron del 0,8%, 0,3%, 4,3%, 9,4% y 8,9%, respectivamente. Sin embargo, aunque todos estos valores se encuentran dentro del rango observado por Stewart & Cavanaugh (2007),

cuando las secuencias ITS⁰ de *P. damsela*e y *V. harveyi* se compararon con las de la misma clase publicadas para *P. damsela*e por Osorio *et al.* (2005) y la de *V. harveyi* ATCC 33842, los porcentajes de disimilitud fueron en algunos casos mucho mayores, de hasta el 16,7% y 20,9%, respectivamente.

Las variaciones intraespecíficas más importantes (las observadas en *P. damsela*e, *T. soleae* y *V. harveyi*) se deben a casos de inserción y/o delección de distintos bloques de secuencias dentro del ITS1, algo que ha sido observado en un gran número de especies bacterianas (Gürtler & Barrie 1995, Privitera *et al.* 1998, Pérez-Luz *et al.* 1998, Chun *et al.* 1999, Osorio *et al.* 2005, Stewart & Cavanaugh 2007).

Las diferencias interespecíficas se estudiaron también entre secuencias ITS1 de la misma clase, obteniéndose resultados satisfactorios con *P. baetica*, *P. damsela*e, *T. maritimum* y *T. soleae*, que mostraron porcentajes de similitud con especies próximas inferiores a los observados con secuencias del ADNr 16S. Así, por ejemplo, la cepa *T. soleae* a47, que mostraba una similitud en el ADNr 16S del 95% y 94% con cepas de *T. ovolyticum* y *T. maritimum* respectivamente, mostró valores del 85% y 72% cuando se usaron los ITS1.

En el caso de *V. harveyi*, sin embargo, las secuencias ITS1 obtenidas no fueron de utilidad para diferenciarlo de especies próximas como *V. alginolyticus* o *V. parahaemolyticus*, que muestran secuencias similares (hasta del 99% de similitud). En este sentido, hay que señalar que aunque por regla general la región ITS1 muestra una divergencia nucleotídica considerablemente mayor que la del ADNr 16S, esto no siempre es así. Por ejemplo, Stewart & Cavanaugh (2007) observaron que en el 24% de los casos estudiados, el ADNr 16S mostraba una divergencia mayor que la región ITS1.

Por último, los genes tRNA no fueron de utilidad para la diferenciación a nivel de especie ya que por regla general fueron similares entre especies de un mismo género e incluso entre géneros de una misma familia, dándose diferencias significativas únicamente a nivel de familia.

▪ Desarrollo de métodos moleculares de identificación basados en la PCR

En este trabajo se han desarrollado dos protocolos de identificación basados en la utilización de los ácidos nucleicos, uno para la detección específica de *T. soleae* mediante PCR y otro mediante hibridación RLB que permite la identificación simultánea de las cinco especies patógenas encontradas (*T. soleae*, *T. maritimum*, *P. baetica*, *P. damsela*e y *V. harveyi*).

El desarrollo de un protocolo de PCR específico para *T. soleae* se justifica por el importante papel que este patógeno parece jugar en la aparición de mortalidades en acedía y

lenguado senegalés, por lo problemático que resulta su aislamiento a partir de peces enfermos y por la dificultad para obtener una identificación confiable en un periodo de tiempo razonable mediante métodos fenotípicos, dado su lento crecimiento en los medios de cultivo. Por otra parte, de todos los patógenos ya descritos encontrados en este trabajo, solo *T. soleae* carecía de un método de identificación mediante PCR.

El protocolo de PCR descrito aquí es específico, sensible y permite una identificación más fácil y rápida del patógeno. Los cebadores se diseñaron en zonas variables del ADN_r 16S y del ITS1, dos regiones que han sido utilizadas con buenos resultados para el diseño de cebadores específicos para otras especies (Tilsala- Timisjärvi & Alatossava 1997, Osorio *et al.* 1999, Kong *et al.* 1999, Wiklund *et al.* 2000, Del Cerro *et al.* 2002a, b, Lee *et al.* 2002, Oakey *et al.* 2003, Scarpellini *et al.* 2004, Kwon *et al.* 2004, Sul *et al.* 2007, Hassan *et al.* 2008).

La especificidad, testada con más de 90 cepas de una treintena de especies, en su mayor parte marinas, fue del 100%, no observándose reacciones cruzadas con ninguno de los microorganismos no diana. Los resultados de sensibilidad con cultivos puros mostraron una detección mínima de ADN de 1 pg por tubo de PCR, aproximadamente 1-30 células, situándose en un rango similar al obtenido por otros protocolos diseñados contra patógenos bacterianos de peces (Del Cerro *et al.* 2002a, b, Mata *et al.* 2004, Romalde *et al.* 2004, Hong *et al.* 2007). Por otra parte, los resultados obtenidos utilizando ADN extraído de peces sanos o de una mezcla de cultivos bacterianos “sembrados” con ADN de *T. soleae* confirmó la sensibilidad del método, permitiendo detectar 10 pg de ADN diana con una ratio diana/no diana de 1:10⁵. No obstante, como era de esperar, la sensibilidad en estos casos fue menor a la observada con cultivos puros, probablemente debido a la presencia de algún inhibidor de la PCR. En este sentido, se ha descrito que niveles altos de ADN no diana, constituyentes de las células bacterianas y compuestos encontrados en tejidos animales pueden tener un efecto adverso en la PCR (Wilson 1997, Becker *et al.* 2000).

Los resultados obtenidos en el análisis de muestras naturales muestran que el protocolo propuesto es válido para su uso en campo, ya que no solo detectó el patógeno en todos los casos confirmados, sino que hizo lo propio en la mitad de los casos sospechosos, en los que no se había podido confirmar la presencia de este mediante cultivo. En algún caso, sin embargo, las bandas obtenidas fueron muy tenues, por lo que sería necesario realizar ensayos adicionales para optimizar la extracción de ADN o las condiciones de PCR, a fin de aumentar la sensibilidad. En cualquier caso, el método ha probado ser una herramienta más sensible y rápida para la detección de *T. soleae* a partir de tejidos que el cultivo en placa, lo que permitirá un mejor diagnóstico de la enfermedad y será de utilidad para el estudio de la epidemiología de esta especie.

Por otra parte, el desarrollo de un protocolo de identificación mediante hibridación RLB fue determinado por las ventajas que presenta esta metodología, que permite la identificación simultánea de un gran número de especies en un número considerable de muestras. Este aspecto es de gran utilidad para el estudio de las enfermedades que afectan al cultivo de peces planos, ya que como se ha visto en este trabajo, en casi todos los casos se trata de infecciones mixtas, lo que implica tener que identificar un alto número de microorganismos que con frecuencia no están filogenéticamente relacionados, requiriéndose por tanto la realización de una diversidad de pruebas fenotípicas que a menudo requieren bastante tiempo y no son concluyentes. Si se compara con otros métodos de identificación utilizados en acuicultura, la hibridación RLB es mucho más rápida que los métodos fenotípicos, permite la identificación simultánea de un número mucho mayor de dianas que la PCR múltiple y es más barata que los microarrays de ADN y la secuenciación. Por otro lado, una vez unidas las sondas a la membrana, esta puede ser almacenada durante meses y reutilizarse hasta 20 veces sin pérdida de señal (Kong & Gilbert 2006).

El protocolo descrito en este trabajo permite la identificación simultánea de *P. baetica*, *P. damselae*, *T. maritimum*, *T. soleae* y *V. harveyi* mediante la utilización de sondas que tienen como diana el gen ARNr 23S en el caso de *V. harveyi* y la región ITS1 en los demás casos. La utilización del gen ARNr 23S en el caso de *V. harveyi* se debió a que esta especie mostraba una región ITS1 similar a la de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, algo que también ha sido constatado por Matsuyama *et al.* (2006).

La especificidad del protocolo se validó utilizando más de 90 cepas diana y no diana, estas últimas relacionadas ecológica o taxonómicamente con las primeras en la mayor parte de los casos. La especificidad fue del 100% en todos los casos excepto en el de *V. harveyi*, cuya sonda hibridó con *V. campbellii* y *Photobacterium* sp. a185. No obstante, la sonda de *V. harveyi* permitió su diferenciación de otras dos especies próximas, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*, con las que otros protocolos de identificación basados en la PCR han dado falsos positivos (Oakey *et al.* 2003, Matsuyama *et al.* 2006). La secuenciación del ITS1 y del ADNr 23S de *V. campbellii* mostró que la composición nucleotídica de estas regiones es similar a la de *V. harveyi*, por lo que otras dianas alternativas deberían ser utilizadas para la diferenciación de estas dos especies. Por otro lado, aunque la secuencia diana en *Photobacterium* sp. a185 mostró solamente 4 discrepancias con la sonda de *V. harveyi*, la elevación de la temperatura de lavado a 65°C permitió eliminar los falsos positivos con esta cepa. Este resultado concuerda con lo descrito por Zwart *et al.* (2003), que observó que no se daban reacciones cruzadas cuando se producían dos o tres discrepancias, mientras que la presencia de una sola evitaba la aparición de falsos positivos en unos casos, pero no en otros, dependiendo de la secuencia de la sonda. Por otra parte, la discriminación entre las subespecies

de *P. damselae* y de *V. harveyi* y *V. campbellii* puede realizarse mediante los protocolos propuestos por Osorio *et al.* (2000) y Pang *et al.* (2006), respectivamente.

La sensibilidad del método con cultivos puros fue de 1-10 pg para *P. baetica* y *P. damselae*, 100 pg para *T. maritimum* y *T. soleae*, y 1pg para *V. harveyi*. La relativamente baja sensibilidad de las sondas de *T. maritimum* y *T. soleae* podría deberse a la baja Tm de las mismas, sin embargo la sensibilidad no mejoró cuando se probaron temperaturas de lavado inferiores. A este respecto, Zwart *et al.* (2003) sugirió que una alta o baja reactividad de las sondas podría no explicarse en función de sus temperaturas de melting teóricas, pudiendo el comportamiento de las sondas unidas a una fase sólida desviarse del esperado en sondas en solución.

No obstante, el principal problema del protocolo propuesto radica en su utilización con muestras naturales, con las que se obtuvieron resultados variables. Las sondas de *T. maritimum* y *T. soleae* mostraron ser totalmente inadecuadas, en las condiciones ensayadas, para su utilización con tejidos de peces, con solo un 50% y 14% de positivos respectivamente; la sonda de *V. harveyi* mostró resultados positivos con el 70% de sus respectivas muestras, y las sondas de *P. baetica* y *P. damselae* con el 100%. Los malos resultados obtenidos en la detección de las dos especies de *Tenacibaculum* probablemente se deben a la baja sensibilidad de las sondas y al tipo de muestras utilizadas, úlceras externas en las cuales el alto número de bacterias contaminantes presentes competirían por la unión a los cebadores universales utilizados en los ensayos. El tipo de muestra también podría haber sido un condicionante importante en las otras tres especies, ya que la sonda de *V. harveyi*, a pesar de presentar una alta sensibilidad con cultivos puros, no reaccionó más que con el 70% de sus muestras, procedentes en su mayor parte de lesiones externas. Por el contrario, las sondas de *P. baetica* y *P. damselae*, a pesar de tener sensibilidades algo inferiores, reaccionaron positivamente con el 100% de las suyas, todas procedentes de órganos internos estériles.

En conjunto, el protocolo propuesto ha mostrado ser válido para la identificación de cultivos puros bacterianos, pero no para la detección a partir de tejidos, salvo en el caso de *P. baetica* y *P. damselae*. Basándose en los resultados obtenidos aquí, el objetivo de futuros estudios debería ser aumentar el número de especies diana, y mejorar la especificidad y sensibilidad del método mediante la utilización de cebadores no universales o PCR múltiple y la utilización de otras regiones o genes más discriminantes como diana.

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir que:

- 1) La microbiota asociada a los episodios de mortalidad en acedía, lenguado y rombo estuvo claramente dominada por el género *Vibrio*. Otros géneros presentes fueron *Aliivibrio*, *Photobacterium*, *Polaribacter*, *Pseudoalteromonas*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter* y *Tenacibaculum*.
- 2) La caracterización fenotípica y genotípica realizada permitió en la mayor parte de los casos únicamente una identificación a nivel de género. A nivel de especie o subespecie fueron identificados *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Tenacibaculum maritimum*, *Tenacibaculum soleae*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio tapetis*. Otras cepas parecen estar relacionadas con *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio splendidus*, y especies próximas a estas.
- 3) Los ensayos realizados permitieron la descripción de una nueva especie del género *Pseudomonas*, *Pseudomonas baetica* sp. nov. Los resultados obtenidos sugieren que otras cepas pertenecientes a los géneros *Photobacterium*, *Polaribacter* y *Vibrio* podrían también constituir nuevas especies.
- 4) Los ensayos de virulencia realizados mediante inyección intraperitoneal mostraron como principales patógenos a *P. damsela* subsp. *piscicida*, *T. maritimum*, *T. soleae*, *P. baetica* y *V. harveyi*. De acuerdo con los resultados de los ensayos realizados por inmersión, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *T. maritimum* y *T. soleae* parecen ser patógenos primarios mientras que *P. baetica* y *V. harveyi* probablemente son patógenos oportunistas.
- 5) La mortalidad larvaria fue importante en las tres especies de peces planos estudiadas, no obstante la causa de las mortalidades se desconoce. Las bacterias asociadas a estos episodios, relacionadas con *V. alginolyticus* y *V. splendidus*, fueron incapaces de causar mortalidades significativas e incluso, en el caso de las primeras, parecieron mejorar la supervivencia larvaria.
- 6) Los cultivos de acedías *destetadas* presentaron episodios de mortalidad en todas las edades, siendo no obstante los más graves los que afectaron a alevines y juveniles. Los patógenos asociados a estos episodios fueron *P. baetica*, *T. maritimum*, *T. soleae* y *V. harveyi*, pudiendo aparecer los tres últimos asociados en un mismo muestreo. Por otra

- parte, aunque no se aisló en ningún caso a partir de acedía, *P. damsela* subsp. *piscicida* ha mostrado ser también patógena para esta especie en infecciones experimentales.
- 7) Los cultivos de lenguado senegalés *destetados* también presentaron mortalidades significativas en todas las edades, pero principalmente en juveniles y adultos. La especie asociadas a estos episodios fueron *P. damsela* subsp. *piscicida*, *T. soleae* y *V. harveyi*, todas ellas ya descritas como patógenas para esta especie.
 - 8) Los cultivos de rombo *destetados* no presentaron mortalidades importantes a excepción de un brote en adultos, de etiología desconocida. El único patógeno bacteriano detectado en esta especie, aunque no asociado a mortalidades significativas, fue *T. soleae*.
 - 9) La caracterización serológica mostró que las cepas de *V. tapetis* aisladas de acedía constituyen muy probablemente un nuevo serotipo dentro de esta especie. Las cepas de *P. damsela* subsp. *piscicida* pertenecen al único serotipo descrito en esta subespecie, y las de *T. maritimum* pertenecen a los serotipos O1 y O3, no encontrándose ninguna cepa del serotipo O2. En el caso de *T. soleae*, varias cepas pertenecen al mismo serotipo que la cepa tipo de esta especie, mientras que otras parecen pertenecer a otro u otros serotipos diferentes.
 - 10) La caracterización de la región ITS1 permitió la diferenciación con especies relacionadas en el caso de *P. damsela*, *P. baetica*, *T. maritimum* y *T. soleae*, pero no en el caso de *V. harveyi*, que mostró una composición nucleotídica similar a la de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*.
 - 11) Se ha desarrollado un protocolo basado en la PCR para la detección e identificación específica de *T. soleae*, aplicable tanto con cultivos bacterianos puros como en tejidos de peces afectados. La utilización de este protocolo con muestras naturales ha mostrado ser un método rápido y eficaz de diagnóstico molecular, y ha puesto de manifiesto que la prevalencia de este patógeno es mayor de lo que refleja el número de aislamientos.
 - 12) Se ha desarrollado un protocolo de hibridación RLB que permite la identificación simultánea de *P. damsela*, *P. baetica*, *T. maritimum*, *T. soleae* y *V. harveyi* a partir de cultivos puros. No obstante la sonda diseñada contra *V. harveyi* dio reacción cruzada con *V. campbellii*, por lo que métodos adicionales deberán ser empleados para la diferenciación de estas dos especies. El protocolo también resulto útil para el

diagnóstico de *P. damsela* y *P. baetica* a partir de muestras de hígado y riñón de peces enfermos.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Akagawa-Matsushita M, Matsuo M, Koga Y & Yamasato K. 1992. *Alteromonas atlantica* sp. nov. and *Alteromonas carrageenovora* sp. nov., bacteria that decompose algal polysaccharides. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 621-627
- Anders K & Yoshimizu M. 1994. Role of viruses in the induction of skin tumours and tumour-like proliferations of fish. *Diseases of Aquatic Organisms* 19, 215-232
- Alonso MC, Cano I, Garcia-Rosado E, Castro D, Lamas J, Barja JL, Borrego JJ & Bergmann SM. 2005. Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot sea bream, *Pagellus bogaraveo* (Brunnich). *Journal of Fish Diseases* 28, 221-228
- Alsina M & Blanch AR. 1993. First isolation of *Flexibacter maritimus* from cultivated turbot (*Scophthalmus maximus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 13, 157-160
- Alsina M & Blanch AR. 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. *Journal of Applied Bacteriology*. 76, 79-85
- Altinok I & Kurt I. 2003. Molecular diagnosis of fish diseases: a review. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 3, 131-138
- Altschul SF, Warren G, Miller W, Myers EW & Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215, 403-410
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W & Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein data base search programs. *Nucleic Acids Research* 25, 3389-3402
- Alves D, Specker JL & Bengtson DA. 1999. Investigations into the causes of early larval mortality in cultured summer flounder (*Paralichthys dentatus* L.). *Aquaculture* 176, 155-172
- Angulo L, Lopez JE, Vicente JA & Saborido AM. 1994. Haemorrhagic areas in the mouth of farmed turbot *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Diseases* 17, 163-169
- APROMAR. 2009. La acuicultura marina de peces en España 2009. Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos, 68 pp
- Arijo S, Chabrillón M, Díaz-Rosales P, Rico R, Martínez- Manzanares E, Balebona MC, Toranzo AE & Moriñigo MA. 2005a. Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists* 25, 148-154

- Arijo S, Rico R, Chabrillon M, Diaz-Rosales P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Magariños B, Toranzo AE & Moriñigo MA. 2005b. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases* 28, 33-8
- Ast JC, Cleenwerck I, Engelbeen K, Urbanczyk H, Thompson FL, De Vos P & Dunlap PV. 2007. *Photobacterium kishitanii* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 2073–2078
- Austin B. 2010. Vibrios as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology* 140, 310–317
- Austin B & Austin DA. 1999. Bacterial fish pathogens: diseases in farmed and wild fish. Tercera edición. Ellis Horwood, Chichester
- Austin B & Zhang X-H. 2006. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters in Applied Microbiology* 43, 119–124
- Austin B, Stobie M, Robertson PAW, Glass HG, Stark JR & Mudarris M. 1993. *Vibrio alginolyticus*: the cause of gill disease leading to progressive low-level mortalities among juvenile turbot, *Scophthalmus maximus* L., in a scottish aquarium. *Journal of Fish Diseases* 16, 277-280
- Avendaño-Herrera R, Magariños B, López-Romalde S, Romalde JL & Toranzo AE. 2004a. Phenotypic characterization and description of two major O-serotypes in *Tenacibaculum maritimum* strains from marine fishes. *Diseases of Aquatic Organisms* 58, 1-8
- Avendaño-Herrera R, Núñez S, Magariños B & Toranzo AE. 2004b. A non-destructive method for rapid detection of *Tenacibaculum maritimum* in farmed fish using nested PCR amplification. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 24, 280-286
- Avendaño-Herrera R., Magariños B., Moriñigo M.A., Romalde J.L. & Toranzo A.E. 2005. A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 25, 68–72
- Avendaño-Herrera R, Toranzo AE & Magariños B. 2006a. A challenge model for *Tenacibaculum maritimum* infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 29, 371-374
- Avendaño-Herrera R, Toranzo AE & Magariños B. 2006b. Tenacibaculosis infection in marine fish caused by *Tenacibaculum maritimum*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 71, 255–266

- Bader JA & Shotts EB. 1998. Identification of *Flavobacterium* and *Flexibacter* species by species polymerase chain reaction cebadores to the 16S ribosomal RNA gene. *Journal of Aquatic Animal Health* 10, 311-319
- Bachrach G, Zlotkin A, Hurvitz A, Evans DL & Eldar A. 2001. Recovery of *Streptococcus iniae* from diseased fish previously vaccinated with a *Streptococcus vaccine*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3756–3758
- Bakermans C, Ayala-del-Río HL, Ponder MA, Vishnivetskaya T, Gilichinsky D, Thomashow MF & Tiedje JM. 2006. *Psychrobacter cryohalolentis* sp. nov. and *Psychrobacter arcticus* sp. nov., isolated from Siberian permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1285–1291
- Balboa S, Prado S, Beaz R, Barja JL & Romalde JL. 2006. Biochemical, serológico and genetical intraspecific diversity in the clam pathogen *Vibrio tapetis*. Fifth International Symposium on Aquatic Animal Health. San Francisco, USA
- Balebona MC, Zorrilla I, Moriñigo MA, Borrego JJ. 1998a. Survey of bacterial pathologies affecting farmed gilt-head sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain from 1990 to 1996. *Aquaculture* 166, 19–35
- Balebona MC, Andreu MJ, Bordas MA, Zorrilla I, Morinigo MA & Borrego JJ. 1998b. Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for Cultured Gilt-Head Sea Bream (*Sparus aurata* L.). *Applied and Environmental Microbiology* 64, 4269-4275
- Barahona-Fernandes MH & Dinis MT. 1992. Leech control (*Platybdella soleae*, Hirudinae) on flatfishes in an aquaculture unit. Publicações do Instituto de Zoologia “Dr. Augusto Nobre”. Faculdade de Ciências do Porto No. 226, 4 pp
- Barton BA. 1997. Stress in finfish: past, present and future -a historical perspective. En: Fish stress and health in aquaculture. Iwama GK, Pickering AD, Sumpter JP & Schreck CB (eds). Society for Experimental Biology Seminar Series 62, Cambridge University Press, Cambridge (UK), pp 1-33
- Bauer AL, Kirby WMM, Sherris JC & Turck M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology* 45, 493-496
- Baumann P, Baumann L, Bang S & Woolkalis M J. 1980. Re-evaluation of the taxonomy of *Vibrio*, *Beneckeia*, and *Photobacterium*: abolition of the genus *Beneckeia*. *Current Microbiology* 4, 127-132

- Baumann P, Baumann L, Bowditch RD & Beaman B. 1984. Taxonomy of *Alteromonas*: *A. nigrifkciens* sp. nov., norn. rev.; *A. macleodii*; and *A. haloplanktis*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 34, 145-149
- Baxa DV, Kawai K & Kusuda R. 1986. Characteristics of gliding bacteria isolated from diseased cultured flounder, *Paralichthys olivaceous*. *Fish Pathology* 21, 251–258
- Beaz-Hidalgo R. 2008. Identificación de bacterias del género *Vibrio* asociadas al cultivo de la almeja. Caracterización y patogénesis. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela
- Beaz-Hidalgo R, Magi GE, Balboa S, Barja JL & Romalde JL. 2008. Development of a PCR protocol for the detection of *Aeromonas salmonicida* in fish by amplification of the *fstA* (ferric siderophore receptor) gene. *Veterinary Microbiology* 128, 386-94
- Becker S, Boger P, Oehlmann R & Ernst A. 2000. PCR bias in ecological analysis: a case study for quantitative *Taq* nuclease assays in analyses of microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology* 66, 4945-4953
- Bein SJ. 1954. A study of certain chromogenic bacteria isolated from “red tide” water with a description of a new species. *Bulletin of Marine Science* 4, 110-119
- Belghyti D, Berrada-Rkhami O, Boy V, Aguesse P & Gabrion C. 2005. Population biology of two helminth parasites of flatfishes from the Atlantic coast of Morocco. *Journal of Fish Biology* 44, 1005 - 1021
- Benavente G & Gatesoupe FJ. 1988. Bacteria associated with cultured rotifers and artemia are detrimental to larval turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Aquacultural Engineering* 7, 289-293
- Ben-Haim Y, Thompson FL, Thompson CC, Cnockaert MC, Hoste B, Swings J & Rosenberg E. 2003. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 309–315
- Bergh O, Hjeltnes B & Skiftesvik AB. 1997. Experimental infection of turbot *Scophthalmus maximus* and halibut *Hippoglossus hippoglossus* yolk sac larvae with *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 13-20
- Bergh O, Nilsen F, Samuelson OB. 2001. Diseases, prophylaxis and treatment of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*: a review. *Diseases of Aquatic Organisms* 48, 57-74

- Bernardet JF, Campbell AC & Buswell JA. 1990. *Flexibacter maritimus* is the agent of black patch necrosis in Dover sole in Scotland. *Diseases of Aquatic Organisms* 8, 233–237
- Bernardet JF, Kerouault B & Michel C. 1994. Comparative study on *Flexibacter maritimus* strains isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) in France. *Fish Pathology* 29, 105-111
- Bernardet JF, Nakagawa Y & Holmes B. 2002. Proposed minimal standards for describing new taxa of the family *Flavobacteriaceae* and emended description of the family. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1049-1070
- Bernardet JF. 1998. *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Flexibacter* and *Chryseobacterium* infections in cultured marine fish. *Fish Pathology* 33, 229-238
- Bertone S, Gili C, Moizo A & Calegari L. 1996. *Vibrio carchariae* associated with a chronic skin ulcer on a shark, *Carcharhinus plumbeus* (Nardo). *Journal of Fish Diseases* 19, 429–434
- Blanco MM, Gibello A, Vela AI, Moreno MA, Domínguez L & Fernández-Garayzábal JF. 2002. PCR detection and PFGE DNA macrorestriction analysis of clinical isolates of *Pseudomonas anguilliseptica* from winter disease outbreaks in sea bream *Sparus aurata*. *Diseases of Aquatic Organisms* 50, 19– 27
- Blaxter JHS, Danielssen D, Moksness E & Oiestad V. 1983. Description of the early development of halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and attempts to rear the larvae past first feeding. *Marine Biology* 73, 99–107
- Bloch B & Larsen JL. 1993. An iridovirus-like agent associated with systemic infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus* fry in Denmark. *Diseases of Aquatic Organisms* 15, 235-240
- Bloch B, Gravningen K & Larsen JL. 1991. Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Diseases of Aquatic Organisms* 10, 65-70
- Bondad-Reantaso MG, Subasinghe RP, Arthur JR, Ogawa K, Chinabut S, Adlard R, Tan Z & Shariff M. 2005. Disease and health management in Asian aquaculture. *Veterinary Parasitology* 132, 249-272
- Borghesan F, Palazzi R, Zanella L, Vascellari M, Mutinelli F, Montesi F, Manfrin A, Selli L & Bovo G. 2003. Viral encephalopathy and retinopathy infection in reared common sole (*Solea solea*). 11th International Conference “Diseases of fish and shellfish” of the European Association of Fish Pathologists (EAFP), St Julians (Malta)

- Borrego, JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, Garcia MT & Ventosa A. 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured Clams. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 46, 480-484
- Bowman JP. 2007. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. *Marine Drugs* 5, 220-241
- Bowman JP, Cavanagh J, Austin JJ & Sanderson K. 1996. Novel *Psychrobacter* species from antarctic ornithogenic soils. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 841-848
- Bozal N, Tudela E, Rosselló-Mora R, Lalucat J & Guinea J. 1997. *Pseudoalteromonas antarctica* sp. nov., isolated from an Antarctic coastal environment. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 47, 345-351
- Bozal N, Montes MJ, Tudela E & Guinea J. 2003. Characterization of several *Psychrobacter* strains isolated from Antarctic environments and description of *Psychrobacter luti* sp. nov. and *Psychrobacter fozii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1093–1100
- Brenner DJ, Fanning GR, Rake AV & Johnson KE. 1969. Batch procedure for thermal elution of DNA from hydroxyapatite. *Analytical Biochemistry* 28, 447-459
- Buchanan JS & Madeley CR. 1978. Studies on *Herpesvirus scophthalmi* infection of turbot *Scophthalmus maximus* (L.); ultrastructural observations. *Journal of Fish Diseases* 1, 283-295
- Buck JD. 1982. Nonstaining (KOH) Method for determination of gram reactions of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 44, 992-993
- Buller NB. 2004. Bacteria from fish and other aquatic animals: a practical identification manual. CABI Publishing, Oxfordshire (UK), 361 pp
- Cámara B, Strömpl C, Verburg S, Spröer C, Pieper DH & Tindall BJ. 2007. *Pseudomonas reinekei* sp. nov., *Pseudomonas moorei* sp. nov. and *Pseudomonas mohnii* sp. nov., novel species capable of degrading chlorosalicylates or isopimaric acid. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 923–931
- Campanella JJ, Bitincka L & Smalley J. 2003. MatGAT: An application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinformatics* 4, 29

- Campbell AC & Buswell JA. 1983. The intestinal microflora of farmed dover sole (*Solea solea*) at different stages of fish development. *Journal of Applied Bacteriology* 55, 215–223
- Cañavate JP & Fernández-Díaz C. 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255-263
- Cañavate JP. 2005. Opciones del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858 para diversificar la acuicultura marina. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 21, 147-154
- Castric J, Baudin-Laurencin F, Coustans MF & Auffret M. 1987. Isolation of infectious pancreatic necrosis virus AB serotype, from an epizootic in farmed turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 67, 117-126
- Castro D, Martínez-Manzanares E, Luque A, Fouz B, Moriñigo MA, Borrego JJ & Toranzo AE. 1992. Characterization of strains related to brown ring disease outbreaks in southwestern Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 14, 229-236
- Castro N, Toranzo AE, Barja JL, Núñez S & Magariños B. 2006. Characterization of *Edwardsiella tarda* strains isolated from turbot, *Psetta maxima* (L.). *Journal of Fish Diseases* 29, 541-547
- Cepeda C & Santos Y. 2002. First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalése sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 22, 388–392
- Cepeda C, García-Márquez S & Santos Y. 2003. Detection of *Flexibacter maritimus* in fish tissue using nested PCR amplification. *Journal of Fish Diseases* 26, 65-70
- Chan KY, Baumann L, Garza MM & Baumann P. 1978. Two New Species of *Alteromonas*: *Alteromonas espejiana* and *Alteromonas undina*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28, 217-222
- Cheng S, Zhang WW, Zhang M & Sun L. 2010. Evaluation of the vaccine potential of a cytotoxic protease and a protective immunogen from a pathogenic *Vibrio harveyi* strain. *Vaccine* 28, 1041-1047
- Choi DH, Kim YG, Hwang CY, Yi H, Chun J & Cho BC. 2006. *Tenacibaculum litoreum* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 635–640

- Chun J, Huq A & Colwell RR. 1999. Analysis of 16S-23S ARNr intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2202–2208
- Cipriano RC, Pyle JB, Starliper CE & Pyle SW. 1985. Detection of *Vibrio anguillarum* antigen by the dot blot assay. *Journal of Wildlife Diseases* 21, 211-218
- Clark WM & Lubs HA. 1915. The differentiation of bacteria of the colon-aerogenes family by the use of indicators. *Journal of Infectious Diseases* 17, 160-173
- Coiras MT, López-Huertas MR, López-Campos G, Aguilar JC & Pérez-Breña P. 2005. Oligonucleotide array for simultaneous detection of respiratory viruses using a reverse-line blot hybridization assay. *Journal of Medical Virology* 76, 256-264
- Colwell RR. 1970. Polyphasic taxonomy of bacteria. En: Culture collection of microorganisms. Iizuka H & Hasegawa T (eds). University of Tokyo Press, Tokyo, pp 421-436
- Conejero MJU & Hedreyda CT. 2003. Isolation of partial *toxR* gene of *Vibrio harveyi* and design of *toxR*-targeted PCR cebadores for species detection. *Journal of Applied Microbiology* 95, 602-611
- Costas M. 1992. Classification, identification and typing of bacteria by the analysis of their one-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns. *Advances in Electrophoresis* 5, 351-408
- Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN & Ginsberg HS (eds). 1981. Microbiology, including immunology and molecular genetics (3^a edición), pp 552-572
- Denner EB, Mark B, Busse HJ, Turkiewicz M & Lubitz W. 2001. *Psychrobacter proteolyticus* sp. nov., a psychrotrophic, halotolerant bacterium isolated from the Antarctic krill *Euphausia superba* Dana, excreting a cold-adapted metalloprotease. *Systematic and Applied Microbiology*. 24, 44-53
- Del Cerro A, Mendoza MC & Guijarro JA. 2002a. Usefulness of a TaqMan-based Polymerase chain reaction assay for the detection of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Journal of Applied Microbiology* 93, 149-156
- Del Cerro A, Marquez I & Guijarro JA. 2002b. Simultaneous detection of *Aeromonas salmonicida*, *Flavobacterium psychrophilum* and *Yersinia ruckeri*, three major fish pathogens, by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 5177-5180
- Devesa S, Barja JL & Toranzo AE. 1989. Ulcerative and skin and fin lesions in reared turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 12, 323–333

- Diggles BK, Moss GA, Carson J & Anderson CD. 2000a. Luminous vibriosis in rock lobster *Jasus verreauxi* (Decapoda: *Palinuridae*) phyllosoma larvae associated with infection by *Vibrio harveyi*. *Diseases of Aquatic Organisms* 43, 127–137
- Diggles BK, Carson J, Hine PM, Hickman RW & Tait MJ. 2000b. *Vibrio* species associated with mortalities in hatchery-reared turbot (*Colistium nudipinnis*) and brill (*C. guntheri*) in New Zealand. *Aquaculture* 183, 1–12
- Dinis MT, Ribeiro L, Soares F & Sarasquete C. 1999. A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and Portugal. *Aquaculture* 176, 27-38
- Doménech A, Fernández-Garayzábal JF, Pascual C, García JA, Cutú li MT, Moreno MA, Collins MD & Domínguez, L. 1996. Streptococcosis in cultured turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), associated with *Streptococcus parauberis*. *Journal of Fish Diseases* 19, 33-38
- Dos Santos NM, Do Vale A, Sousa MJ & Silva MT. 2002. Mycobacterial infection in farmed turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 52, 87-91
- Dyková I, Figueras A, Novoa B & Casal JF. 1998. *Paramoeba* sp., an agent of amoebic gill disease of turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 33,137-41
- Ewing WH, McWhorter AC, Escobar MR & Lubin AH. 1965. *Edwardsiella* a new genus of *Enterobacteriaceae* based on a new species, *E. tarda*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* 15, 33-38
- Fabre-Domerque P & Biérix E. 1905. Développement de la sole (*Solea vulgaris*). *Travail du Laboratoire de Zoologie Maritime de Concarneau*. Voibert et Nony, Paris
- FAO. 2007. Estadísticas de pesca y acuicultura. FAO, Roma, 101 pp
- FAO. 2008. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2008. FAO, Roma, 218 pp
- Faury N, Saulnier D, Thompson FL, Gay M, Swings J & Le Roux F. 2004. *Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2137–2140
- Feist SW. 1998. Diseases of flatfish. En: Proceedings of the second internacional conference on recirculating aquaculture. Libey GS & Timmons MB (eds). Virginia Polytechnic Institute & Virginia State University, Roanoke, Virginia, pp 149-156

- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the *bootstrap*. *Evolution* 39, 783-791
- Fernandez L, Lopez JR, Secades P, Menendez A, Marquez I & Guijarro JA. 2003. In vitro and in vivo studies of the Yrp1 protease from *Yersinia ruckeri* and its role in protective immunity against enteric red mouth disease of salmonids. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 7328-7335
- Fouz B, Conchas RF, Magarinos B, Amaro C & Toranzo AE. 1992a. *Vibrio damsela* strain virulence for fish and mammals. *FHS/AFS Newsletter* 20, 56-59
- Fouz B, Larsen JL, Nielsen B, Barja JL & Toranzo AE. 1992b. Characterization of *Vibrio damsela* strain isolated from turbot *Scophthalmus maximus* in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 12, 155-166
- Fouz B, Toranzo AE, Milan M & Amaro C. 2000. Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *damsela*. *Journal of Applied Microbiology* 88, 531-535
- Franco-Sierra A, Sita-Bobadilla A & Alvarez-Pellitero P. 2005. *Ichthyophonus* infections in cultured marine fish from Spain. *Journal of Fish Biology* 51, 830 - 839
- Frazier WC. 1926. A method for detection of changes in gelatin due to bacteria. *Journal of Infectious Diseases* 39, 302-309
- Frette L, Jørgensen NO, Irming H & Kroer N. 2004. *Tenacibaculum skagerrakense* sp. nov., a marine bacterium isolated from the pelagic zone in Skagerrak, Denmark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 519-524
- Gatesoupe FJ. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture*, 89, 139-148
- Gatesoupe FJ, Lambert C & Nicolas JL. 1999. Pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Journal of Applied Microbiology* 87, 757-63
- Gatica MGG. 2000. Micosis Sistémica asociada a *Exophiala salmonis* en turbot (*Scophthalmus maximus*) cultivados en Chile. Tesis de grado. Universidad Austral de Chile
- Gauger E, Smolowitz R, Uhlinger K, Casey J & Gómez-Chiarri M. 2006. *Vibrio harveyi* and other bacterial pathogens in cultured summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquaculture* 260, 10-20

- Gauthier MJ. 1976. *Alteromonas rubra* sp. nov., a new marine antibiotic-producing bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 26, 459-466
- Gauthier MJ. 1977. *Alteromonas citrea*, a new gram-negative, yellow-pigmented species from seawater. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 27, 349-354
- Gauthier MJ. 1982. Validation of the name *Alteromonas luteoviolacea*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 32, 82-86
- Gauthier G, Gauthier M & Christen R. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit ARNr sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45, 755-761
- Geffen AJ, Van der Veer HW & Nash RDM. 2007. The cost of metamorphosis in flatfishes. *Journal of Sea Research* 58, 35–45
- Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL & Swings J. 2005. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology* 3, 733-739
- Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, García-Gasca A, Roque A, Vazquez-Juarez R, Thompson FL & Swings J. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150, 1769–1777
- Gomez-Gil B, Thompson FL, Thompson CC & Swings J. 2003. *Vibrio rotiferianus* sp. nov., isolated from cultures of the rotifer *Brachionus plicatilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 239–243
- Gomez-Gil B, Soto-Rodríguez S, Garcia-Gasca A, Roque A, Vazquez-Juarez R, Thompson FL & Swings J. 2004. Molecular identification of *Vibrio harveyi*-related isolates associated with diseased aquatic organisms. *Microbiology* 150, 1769-1777
- Gómez-León J, Villamil L, Lemos ML, Novoa B & Figueras A. 2005. Isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 98-104

- González SF, Drug MJ, Nielsen ME, Santos Y & Call DR. 2004. Simultaneous detection of marine fish pathogens by using multiplex PCR and a DNA microarray. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1414-1419
- Gosink JJ, Woese CR & Staley JT. 1998. *Polaribacter* gen. nov., with three new species, *P. irgensii* sp. nov., *P. franzmannii* sp. nov. and *P. filamentus* sp. nov., gas vacuolate polar marine bacteria of the Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides group and reclassification of *Flectobacillus glomeratus*, as *Polaribacter glomeratus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 48, 223-235
- Grisez L, Ceuster R & Ollivier F. 1991. The use of the API 20E for the identification of *Vibrio anguillarum* and *V. ordalii*. *Journal of Fish Diseases* 14, 359-365
- Gürtler V & Barrie HD. 1995. Typing of *Staphylococcus aureus* strains by PCR-amplification of variable-length 16S-23S ADNr spacer regions: characterization of spacer sequences. *Microbiology* 141, 1255–1265
- Grotmol S, Totland GK, Thorud K & Hjeltnes BK. 1997. Vacuolating encephalopathy and retinopathy associated with a nodavirus-like agent: a probable cause of mass mortality of cultured larval and juvenile Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 29, 85–97
- Hachero I. 2008. Reproducción y cultivo larvario del parracho *Scophthalmus rhombus* (Linneo, 1758). Tesis doctoral. Universidad de Cadiz
- Hachero I, Herrera M, Ferrer JF, Márquez JM, Rosano M, Rodiles A & Navas JI. 2005. Resultados preliminares sobre la reproducción y el cultivo larvario de parracho (*Scophthalmus rhombus* Linneo, 1758). En: Resúmenes X Congreso Nacional de Acuicultura. Gandía, octubre 2005. Universidad Politécnica de Valencia, pp 492-493
- Handler J, Soltani H & Percival V. 1997. The pathology of *Flexibacter maritimus* in aquaculture species of Tasmania, Australia. *Journal of Fish Diseases* 20, 159–168
- Hansen GH & Olafsen JA. 1990. Endocytosis in yolksac larvae of cod (*Gadus morhua* L.). En: Microbiology in Poecilothersms. Lesel R (ed). Elsevier, Amsterdam, pp 187–191
- Hansen GH, Bergh O, Michaelsen J & Knappskog D. 1992. *Flexibacter ovolyticus* sp. nov., a pathogen of eggs and larvae of Atlantic Halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 451-458

- Hansen GH & Olafsen JA. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microbial Ecology* 38, 1–26
- Hassan AA, Vossen A, Lämmler C, Siebert U & Fernandez-Garayzabal JF. 2008. PCR amplification of species specific sequences of ADNr 16S and 16S–23S ADNr intergenic spacer region for identification of *Streptococcus phocae*. *Microbiological Research* 163, 132-135
- Heindl H, Wiese J & Imhoff JF. 2008. *Tenacibaculum adriaticum* sp. nov., from a bryozoan in the Adriatic Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 58, 542-547
- Hemmingsen W. 2006. Emerging diseases in mariculture. En: Proceedings of the International Workshop on Marine Parasitology: Applied aspects of marine parasitology. Afonso-Días I, Menezes G, MacKenzie K & Eiras JC (eds). Arquipélago. Life and Marine Sciences. Supplement 6, pp 1-6
- Herrera M. 2008. Biología y cultivo de la acedía (*Dicologlossa cuneata* Moreau, 1881). Tesis doctoral. Universidad de Cadiz
- Herrera M, Hachero I, Prado MA, Márquez JM & Navas JI. 2003. Resultados preliminares sobre aclimatación y mantenimiento en cautividad de reproductores de lenguado (*Solea senegalensis*), parracho (*Scophthalmus rhombus*) y acedía (*Dicologlossa cuneata*) en el CICEM Agua del Pino, Huelva. En: Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cadiz, mayo 2003. Junta de Andalucía, pp 291-295
- Herrera M, Hachero I, Rosano M, Ferrer JF, Márquez JM & Navas JI. 2008. First results on spawning, larval rearing and growth of the wedge sole (*Dicologlossa cuneata*) in captivity, a candidate species for aquaculture. *Aquaculture International* 16, 69–84
- Heuchert A, Glöckner FO, Amann R & Fischer U. 2004. *Psychrobacter nivimaris* sp. nov., a heterotrophic bacterium attached to organic particles isolated from the South Atlantic (Antarctica). *Systematic and Applied Microbiology* 27, 399-406
- Higgins DG & Sharp PM. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73, 237-244
- Holmes B. 1992. Synonymy of *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986 and *Cytophaga marina* Reichenbach 1989. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 185
- Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT & Williams ST. 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Novena edición. Lippincott Williams & Wilkins

- Hong G-E, Kim D-G, Bae J-Y, Ahn S-H, Bai SC & Kong I-S. 2007. Species-specific PCR detection of the fish pathogen, *Vibrio anguillarum*, using the *amiB* gene, which encodes N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase. *FEMS Microbiology Letters* 269, 201-206
- Horne MT & Barnes AC. 1999. Enteric redmouth disease (*Yersinia ruckeri*). En: Fish diseases and disorders Vol. 3. Woo PTK & Bruno DW (eds). CAB International Publications, UK, pp 455-477
- Howell BR. 1998. Development of turbot farming in Europe. *Bulletin of Aquaculture Association of Canada* 94, 4-10
- Hugh R & Leifson E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* 66, 24-26
- Imsland AK, Foss A, Conceição LEC, Dinis MT, Delbare D, Schram E, Kamstra A, Rema P & White P. 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 379-407
- Ishimaru K, Akagawa-Matsushita M & Muroga K. 1996. *Vibrio ichthyenteri* sp. nov., a pathogen of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) larvae. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46, 155-159
- Ishimaru K & Muroga K. 1997. Taxonomical re-evaluation of two pathogenic *Vibrio* species isolated from milkfish and swimming crab. *Fish Pathology* 32, 59-64
- Isshiki T, Nishizawa T, Kobayashi T, Nagano T & Miyazaki T. 2001. An outbreak of VHSV (viral hemorrhagic septicemia virus) infection in farmed Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in Japan. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 87-99
- Ivanova EP, Sawabe T, Alexeeva YV, Lysenko AM, Gorshkova NM, Hayashi K, Zukova NV, Christen R, & Mikhailov VV. 2002a. *Pseudoalteromonas issachenkonii* sp. nov., a bacterium that degrades the thallus of the brown alga *Fucus evanescens*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 229-234
- Ivanova EP, Shevchenko LS, Sawabe T, Lysenko AM, Svetashev VI, Gorshkova NM, Satomi M, Christen R & Mikhailov VV. 2002b. *Pseudoalteromonas maricaloris* sp. nov., isolated from an Australian sponge, and reclassification of [*Pseudoalteromonas aurantia*] NCIMB 2033 as *Pseudoalteromonas flavipulchra* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 263-271

- Ivanova EP, Sawabe T, Lysenko AM, Gorshkova NM, Hayashi K, Zhukova NV, Nicolau DV, Christen R & Mikhailov VV. 2002c. *Pseudoalteromonas translucida* sp. nov. and *Pseudoalteromonas paragorgicola* sp. nov., and emended description of the genus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1759–1766
- Ivanova EP, Sawabe T, Lysenko AM, Gorshkova NM, Svetashev VI, Nicolau DV, Yumoto N, Taguchi T, Yoshikawa S, Christen R & Mikhailov VV. 2002d. *Pseudoalteromonas ruthenica* sp. nov., isolated from marine invertebrates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 235–240
- Ivanova EP, Gorshkova NM, Zhukova NV, Lysenko AM, Zelepuga EA, Prokof,eva NG, Mikhailov VV, Nicolau DV & Christen R. 2004. Characterization of *Pseudoalteromonas distincta*-like sea-water isolates and description of *Pseudoalteromonas aliena* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 54, 1431-1437
- Jensen S, Samuelsen OB, Andersen K, Torkildsen L, Lambert C, Choquet G, Paillard C & Bergh O. 2003. Characterization of strains of *Vibrio splendidus* and *Vibrio tapetis* isolated from corkwing wrasse (*Symphodus melops*) suffering vibriosis. *Diseases of Aquatic Organisms* 53, 25-31
- Johnson FH & Shunk V. 1936. An interesting new species of luminous bacteria. *Journal of Bacteriology* 31, 585-592
- Johnson JL & Chilton WS. 1966. Galactosamine glycan of *Chondrococcus columnaris*. *Science* 152, 1247-1248
- Johnson RM & Weisrock WP. 1969. *Hyphomicrobium indicum* sp. nov (Hyphomicrobiaceae Douglass). *International Journal of Systematic Bacteriology* 19, 295-307
- Jones A. 1972. Studies on egg development and larval rearing of turbot, *Scophthalmus maximus* L., and brill, *Scophthalmus rhombus* L., in the laboratory. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 52, 965-986
- Jong-Hun K & Eunheui K. 2003. Diversity of the streptococcal strains isolated from diseased olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Journal of the Korean Fisheries Society* 36, 654-660
- Jung SY, Lee MH, Oh TK, Park YH & Yoon JH. 2005. *Psychrobacter cibarius* sp. nov., isolated from jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 577–582

- Jung SY, Oh TK & Yoon JH. 2006. *Tenacibaculum aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1577–1581
- Juni E & Heym GA. 1986. *Psychrobacter immobilis* gen. nov. sp. nov.: genospecies composed of gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 388-391
- Kabata Z. 1979. Parasitic copepoda of British fishes. En: Ray Society Series n° 152. The Ray Society, Londres, pp 421-438
- Kaufhold A, Podbielski A, Baumgarten G, Blokpoel M, Top J & Schouls L. 1994. Rapid typing of group A streptococci by the use of DNA amplification and non-radioactive allele-specific oligonucleotide probes. *FEMS Microbiology Letters* 119, 19-25
- Kent ML. 1982. Characteristic and identification of *Pasteurella* and *Vibrio* species pathogenic to fishes using API-20E (Analytab Products) multitube test strips. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 1725-1729
- Kim WS, Oh MJ, Jung SJ, Kim YJ & Kitamura S. 2005. Characterization of an iridovirus detected from cultured turbot *Scophthalmus maximus* in Korea. *Diseases of Aquatic Organisms* 64, 175-80
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16, 111-120
- Kimura H & Kusuda R. 1983. Microbial succession in gliding bacterium infection in red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society for Scientific Fisheries* 49, 1553–1559
- Kimura T, Yoshimizu M & Gorie S. 1986. A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder) *Paralichthys olivaceus* and ayu *Plecoglossus altivelis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 1, 209–217
- Kin JA, Snow M, Skall HF & Raynard RS. 2001. Experimental susceptibility of Atlantic salmon *Salmo salar* and turbot *Scophthalmus maximus* to european freshwater and marine isolates of viral haemorrhagic septicaemia virus. *Diseases of Aquatic Organisms* 47, 25-31
- King EO, Ward WK & Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301-307

- Kong RYC, Pelling A, So CL & Wu RSS. 1999. Identification of oligonucleotide cebadores targeted at the 16S-23S ADNr intergenic spacers for genus- and species-specific detection of Aeromonads. *Marine Pollution Bulletin* 38, 802-808
- Kong F & Gilbert GL. 2006. Multiplex PCR-based reverse line blot hybridization assay (mPCR/RLB)-a practical epidemiological and diagnostic tool. *Nature protocols* 1, 2668-2680
- Kovacs N. 1928. Eine vereinfachte methode zum Nachweis der indolbildung durch bacterien. *Zeitschrift für Immunitätsforschung* 55, 311-315
- Kovacs N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178, 703
- Kudo T, Hatai K & Seino A. 1988. A *Nocardia seriolae* sp. nov. causing nocardiosis of cultured fish. *International Journal of Systematic Bacteriology* 38, 173-178
- Kumar S, Tamura K & Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163
- Kvitt H, Ueko M, Colorni A, Batargias C, Zlotkin A & Knibb W. 2002. *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*: detection by direct amplification of 16S ARNr gene sequences and genotypic variation as determined by amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Diseases of Aquatic Organisms* 48, 187-195
- Kwon SW, Kim JS, Park IC, Yoon SH, Park DH, Lim CK & Go SJ. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 21-27
- Kwon H-S, Yang E-H, Yeon S-W, Kang B-H & Kim T-Y. 2004. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific cebadores based on the region extending from 16S ARNr through 23S ARNr. *FEMS Microbiology Letters* 239, 267-275
- Labella A, Vida M, Alonso MC, Infante C, Cardenas S, Lopez-Romalde S, Manchado M & Borrego JJ. 2006. First isolation of *Photobacterium damsela* ssp. *damsela* from cultured redbanded seabream, *Pagrus auriga* Valenciennes, in Spain. *Journal of Fish Diseases* 29, 175-179
- Lamas J, Cepeda C, Dopazo CP, Toranzo AE, Anadón R & Barja JL. 1996. Occurrence of an erythrocytic virus infection in cultured turbot *Scophthalmus maximus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 24, 159-167

- Lamas J, Noya M, Figueras A & Toranzo AE. 2006. Pathology associated with a viral erythrocytic infection in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 18, 425-433
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ & Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948
- Le Roux F, Goubet A, Thompson FL, Faury N, Gay M, Swings J & Saulnier D. 2005. *Vibrio gigantis* sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (*Crassostrea gigas*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2251-2255
- Ledo A, Lupiani B, Dopazo CP, Toranzo AE & Barja JL. 1990. Fish viral infections in Northwest of Spain. *Microbiologia* 6, 21-29
- Lee HK, Kim HJ & Kim I. 1991. Isolation of *Vibrio* species from cultured flounders *Paralichthys olivaceus* with ulcers and ascites in the southern coast of Korea during the winter season. *Korean Journal of Microbiology* 29, 319-328
- Lee K & Ruby EG. 1995. Symbiotic role of the viable but nonculturable state of *Vibrio fischeri* in hawaiian coastal seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 278-283
- Lee DC, Lee JI, Park CI & Park SI. 2001. The study on the causal agent of streptococcosis (*Lactococcus garvieae*), isolated from cultured marine fish. *Journal of Fish Pathology* 14, 71-80
- Lee SKY, Wang HZ, Law SHW, Wu RSS & Kong RYC. 2002. Analysis of the 16S-23S ADNr intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences. *Marine Pollution Bulletin* 44, 412-420
- Lee KK, Liu PC & Chuang WH. 2002. Pathogenesis of gastroenteritis caused by *Vibrio carchariae* in cultured marine fish. *Marine Biotechnology* 4, 267-277
- Lee YS, Baik KS, Park SY, Kim EM, Lee DH, Kahng HY, Jeon CO & Jung JS. 2009. *Tenacibaculum crassostreae* sp. nov., isolated from the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1609-1614
- Leiro P, Ortega P & Fernández S. 2008. An amoeba associated with gill disease in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 21, 281-288
- Lemos ML, Toranzo AE & Barja JL. 1985. Modified medium for the oxidation-fermentation test in the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1541-1543

- Levin MA, Wolke RE & Cabelli VJ. 1972. *Vibrio anguillarum* as a cause of disease in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Microbiology* 18, 1585–1592
- Lind E & Ursing J. 1986. Clinical strains of *Enterobacter agglomerans* (synonyms, *Erwinia herbicola*, *Erwinia milletiae*) identified by DNA-DNA-hybridization. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 94, 205-213
- Liu PC, Lee KK & Chen SN. 1996. Pathogenicity of different isolates of *Vibrio harveyi* in tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Letters in Applied Microbiology* 22, 413–416
- Liu PC, Lin JY, Hsiao PT & Lee KK. 2004. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased cobia *Rachycentron canadum*. *Journal of Basic Microbiology* 44, 23-28
- López JR, Piñeiro-Vidal M, García-Lamas N, de la Herran R, Navas JI, Hachero-Cruzado I & Santos Y. 2010a. First isolation of *Tenacibaculum soleae* from diseased cultured wedge sole, *Dicologlossa cuneata* (Moreau), and brill, *Scophthalmus rhombus* (L.). *Journal of Fish Diseases* 33, 273-278
- López JR, Balboa S, Núñez S, de la Roca E, de la Herran R, Navas JI, Toranzo AE & Romalde JL. 2010b. Characterization of *Vibrio tapetis* strains isolated from diseased cultured Wedge sole (*Dicologlossa cuneata* Moreau). *Research in Veterinary Science*, in press.
- Lowe TM & Eddy SR. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research* 25, 955-964
- Ludwig W. 2007. Nucleic acid techniques in bacterial systematics and identification. *International Journal of Food Microbiology* 120, 225-236
- Lunder T, Sørum H, Holstad G, Steigerwalt AG, Mowinckel P & Brenner DJ. 2000. Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with winter ulcer. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 427-450
- Lupiani B, Dopazo CP, Ledo A, Fouz B, Barja JL, Hetrick FM & Toranzo AE. 1989. New syndrome of mixed bacterial and viral ethiology in cultured turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Journal of Aquatic Animal Health* 1, 197-204
- Mac Faddin JF. 1980. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 301 pp

- Madigan MT, Martinko JM & Parker J. 2004. Brock Biología de los Microorganismos. Decima edición. Pearson Educación, Madrid, 1096 pp
- Magariños B, Romalde JL, Bandin I, Fouz B & Toranzo AE. 1992. Phenotypic, antigenic, and molecular characterization of *Pasteurella piscicida* strains isolated from fish. *Applied and Environmental Microbiology* 58, 3316-3322
- Magariños B, Couso N, Noya M, Merino P, Toranzo AE & Lamas J. 2001. Effect of temperature on the development of pasteurellosis in carrier gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 195, 17-21
- Mangor-Jensen A, Harboe T, Shields RJ, Gara B & Naas KE. 1998. Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L., larvae cultivation literature, including a bibliography. *Aquaculture Research* 29, 857-886
- Marques JF, Cabral HN, Busi M & D,Amelio S. 2006. Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes off the Portuguese coast. *Journal of Helminthology* 80, 47-51
- Martens M, Dawyndt P, Coopman R, Gillis M, De Vos P & Willems A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 “housekeeping” genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 200-214
- Martin-Antonio B, Manchado M, Infante C, Zerolo R, Labella A, Alonso C & Borrego JJ. 2007. Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquaculture Research* 38, 1213-1222
- Masumura K & Wakabayashi H. 1977. Outbreak of gliding bacterial disease in hatchery-born red seabream (*Pagrus major*) and gilthead (*Acanthopagrus schlegeli*) fry in Hiroshima. *Fish Pathology* 12, 171-177
- Mata AI, Blanco MM, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF & Gibello A. 2004. Development of a PCR assay for *Streptococcus iniae* based on the lactate oxidase (*lctO*) gene with potential diagnostic value. *Veterinary Microbiology* 101, 109-116
- Matsuyama T, Kamaishi T & Oseko N. 2006. Rapid discrimination of fish pathogenic *Vibrio* and *Photobacterium* species by oligonucleotide DNA array. *Fish Pathology* 41, 105-112
- Meyer FP. 1991. Aquaculture disease and health management. *Journal of Animal Science* 69, 4201-4208

- McEwen BS. 1998. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences* 840, 33-44
- McVicar AH & White PG. 1979. Fin and skin necrosis of Dover sole *Solea solea* (L.). *Journal of Fish Diseases* 2, 557-562
- McVicar AH. 1986. Fungal infection in marine fish and its importance in mariculture. *Special Publication European Aquaculture Society* 9, 189-196
- Migula W. 1894. Über ein neues System der Bakterien. *Arbeiten aus dem Bakteriologischen Institut der Technischen Hochschule zu Karlsruhe* 1, 235-238
- Miller PJ & Loates MJ. 1999. Peces de España y de Europa. Ediciones Omega, Barcelona 312 pp
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 2001. Libro Blanco de la Acuicultura en España. Madrid, 521 pp
- Miyazaki T. 2005. Ultrastructural features of herpesvirus-infected cells in epidermal lesions in larvae of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* *Diseases of Aquatic Organisms* 66, 159-162
- Moeller V. 1955. Simplified tests for some amino acid decarboxylase and for the arginine dihydrolase system. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica* 36, 158-172
- Mohanty BR & Sahoo PK. 2007. Edwardsiellosis in fish: a brief review. *Journal of Biosciences* 32, 1331-1344
- Mohn WW, Wilson AE, Bicho P & Moore ERB. 1999. Physiological and phylogenetic diversity of bacteria growing on resin acids. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 68-78
- Montes A, Figueras A & Novoa B. 2010. Nodavirus encephalopathy in turbot (*Scophthalmus maximus*): inflammation, nitric oxide production and effect of anti-inflammatory compounds. *Fish & Shellfish Immunology* 28, 281-288
- Moriñigo MA, Zorrilla I, Chabrillon M, Arijo S, Díaz P & Balebona MC. 2001. Isolation and characterization of *Vibrio harveyi* strains causing infection in sole (*Solea senegalensis*). 10th International Conference of the European Association of Fish Pathologists. Dublin, Irlanda
- Mortensen SH, Hjeltnes B, Rodseth O, Krogsrud J & Christie KE. 1990. Infectious pancreatic necrosis virus, serotype N1, isolated from Norwegian halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), turbot

- (*Scophthalmus maximus*) and scallops (*Pecten maximus*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 10, 42-43
- Mudarris M, Austin B, Segers P, Vancanneyt M, Hoste B & Bernardet JF. 1994. *Flavobacterium scophthalmum* sp. nov., a pathogen of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *International Journal of Systematic Bacteriology* 44, 447-453
- Mulet M, Lalucat J & García-Valdés E. 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* 12, 1513-1530
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G & Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273
- Munday BL, Kwang J & Moody N. 2002. Betanodavirus infections of teleost fish: a review. *Journal of Fish Diseases* 25, 127-142
- Munro PD, Barbour A & Birkbeck TH. 1995. Comparison of the growth and survival of larval turbot in the absence of culturable bacteria with those in the presence of *Vibrio anguillarum*, *Vibrio alginolyticus*, or a marine *Aeromonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 4425-4428
- Murchelano RA. 1976. Lymphocystis disease in the winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of Wildlife Diseases* 12, 101-103
- Muroga K. 2001. Viral and bacterial diseases of marine fish and shellfish in Japanese hatcheries. *Aquaculture* 202, 23-44
- Muroga K, Higashi M & Keitoku H. 1987. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. *Aquaculture* 65, 79-88
- Nakatsugawa T. 1983a. A streptococcal disease of cultured flounder. *Fish Pathology* 17, 281-285
- Nakatsugawa T. 1983b. *Edwardsiella tarda* isolated from cultured young flounder. *Fish Pathology* 18, 99-101
- Nelson EJ & Ghiorse WC. 1999. Isolation and identification of *Pseudoalteromonas piscicida* strain Curad associated with diseased damselfish (*Pomacentridae*) eggs. *Journal of Fish Diseases* 22, 253-260

- Nieto JM, Devesa S, Quiroga I & Toranzo AE. 1995. Pathology of *Enterococcus* sp. in farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Diseases* 18, 21–30
- Nishimori E, Kita-Tsukamoto K & Wakabayashi H. 2000. *Pseudomonas plecoglossicida* sp. nov., the causative agent of bacterial haemorrhagic ascites of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 83-89
- Noga EJ, Wright JF, Levine JF, Dykstra M.J & Hawkins JH. 1991. Dermatological lesions affecting fishes of the Tar-Pamlico estuary, north Carolina. *Diseases of Aquatic Organisms* 10, 87-92
- Noguerola I & Blanch AR. 2008. Identification of *Vibrio* spp. with a set of dichotomous keys. *Journal of Applied Microbiology* 105, 175-185
- Novoa B, Nuñez S, Fernández-Puentes C, Figueras AJ & Toranzo AE. 1992. Epizootic study in a turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology. *Aquaculture* 107, 253–258
- Novoa B, Figueras A, Puentes CF, Ledo A & Toranzo AE. 1993a. Characterization of a bimavims isolated from diseased turbot cultured in Spain. *Diseases of Aquatic Organisms* 15, 163-169
- Novoa B, Toranzo AE, Dopazo CP, Barja JL & Figueras A. 1993b. Isolation in Europe of the VR-299 serotype of IPNV from turbot. *Diseases of Aquatic Organisms* 17, 61-65
- Oakey HJ, Levy N, Bourne DG, Cullen B & Thomas A. 2003. The use of PCR to aid in the rapid identification of *Vibrio harveyi* isolates. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1293-1303
- Oh M-J, Jung S-J, Kitamura S-I, Kim H-Y & Kang SY. 2005. Viral diseases of olive flounder in Korean hatcheries. *Journal of Ocean University of China* 5, 45-48
- Orvay FC. 1993. Acuicultura: historia, evolucion y situación actual. En: Acuicultura marina: fundamentos biológicos y tecnología de la producción. Orsay FC (ed). Publicacions Universitat de Barcelona, Barcelona, pp 11-25
- Ortega C & Múzquiz JL. 2002. Vigilancia epidemiológica y medicina preventiva en acuicultura: Principios generales. I Congreso Internacional Virtual de Acuicultura CIVA, pp 148-162
- Osorio CR, Collins MD, Toranzo AE, Barja JL & Romalde JL. 1999. 16S ARNr gene sequence analysis of *Photobacterium damsela* and nested PCR method for rapid detection of the causative agent of fish pasteurellosis. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2942-2946

- Osorio CR, Toranzo AE, Romalde JL & Barja JL. 2000. Multiplex PCR assay for ureC and 16s ARNr genes clearly discriminates between both subspecies of *Photobacterium damsela*. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 177-183
- Osorio CR, Collins MD, Romalde JL & Toranzo AE. 2005. Variation in 16S-23S ARNr intergenic spacer regions in *Photobacterium damsela*: a mosaic-like structure. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 636-45
- Ostland VE, la Trace C, Morrison D & Ferguson HW. 1999. *Flexibacter maritimus* associated with a bacterial stomatitis in Atlantic salmon smolts reared in net-pens in British Columbia. *Journal of Aquatic Animal Health* 11, 35-44
- Padrós F, Zarza C, Estévez A, Crespo S & Furones MD. 2003. La patología como factor limitante para el desarrollo del cultivo del lenguado. En: Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cadiz, mayo 2003. Junta de Andalucía, pp 343-345
- Paetkau V & Langman L. 1975. A quantitative, batch hydroxyapatite method for analyzing native and denatured DNA at room temperature. *Analytical Biochemistry* 65, 525-532
- Paillard C & Maes P. 1990. Étiologie de la maladie de l'anneau brun chez *Tapes philippinarum*: Pathogenicité d'un *Vibrio* sp. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences* 310, 15-20
- Paillard C. 2004. A short-review of brown ring disease, a vibriosis affecting clams, *Ruditapes philippinarum* and *Ruditapes decussatus*. *Aquatic Living Resources* 17, 467-475
- Paillard C, Gausson S, Nicolas JL, le Pennec JP & Haras D. 2006. Molecular identification of *Vibrio tapetis*, the causative agent of the brown ring disease of *Ruditapes philippinarum*. *Aquaculture* 253, 25- 38
- Pang L, Zhang X.H, Zhong Y, Chen J, Li Y & Austin B. 2006. Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Letters in Applied Microbiology* 43, 249-255
- Park YD, Baik KS, Yi H, Bae KS & Chun J. 2005. *Pseudoalteromonas byunsanensis* sp. nov., isolated from tidal flat sediment in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 2519-2523
- Pasnik DJ & Smith SA. 2005. Immunogenic and protective effects of a DNA vaccine for *Mycobacterium marinum* in fish. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 103, 195-206

- Pazos F, Santos Y, Macias AR, Nuñez S & Toranzo AE. 1996. Evaluation of media for the successful culture of *Flexibacter maritimus*. *Journal of Fish Diseases* 19, 193-197
- Pearson WR & Lipman DJ. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 2444-2448
- Pedersen K & Larsen JL. 1996. First report of an outbreak of furunculosis in turbot, *Scophthalmus maximus* caused by *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida* in Denmark. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 16, 129-133
- Pedersen K, Verdonck L, Austin B, Austin DA, Blanch AR, Grimont PAD, Jofre J, Koblavi S, Larsen JL, Tiainen T, Vigneulle M & Swings J. 1998. Taxonomic evidence that *Vibrio carchariae* Grimes *et al.* 1985 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *et al.* 1981. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 749-758
- Pedersen K, Austin B, Austin DA & Larsen JL. 1999. Vibrios associated with mortality in cultured plaice *Pleuronectes platessa* fry. *Acta Veterinaria Scandinavica* 40, 263-270
- Pérez-Luz S, Rodríguez-Valera F, Lan R & Reeves PR. 1998. Variation of the ribosomal operon 16S-23S gene spacer region in representatives of *Salmonella enterica* subspecies. *Journal of Bacteriology* 180, 2144-2151
- Perez-Prieto S, Garcia-Rosado E, Rodriguez S, Castro D & Borrego JJ. 2001. Antigenic properties and experimental transmission to several fish species of a marine birnavirus isolated from sole (*Solea senegalensis*). *Veterinary Microbiology* 82, 11-25
- Piñeiro-Vidal M, Carballas CG, Gómez-Barreiro O, Riaza A & Santos Y. 2008. *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 881-885
- Planas M & Cunha I. 1999. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. *Aquaculture* 177, 171-190
- Planas M, Pérez-Lorenzo M, Hjelm M, Gram L, Fiksdal IU, Bergh O & Pintado J. 2006. Probiotic effect in vivo of *Roseobacter* strain 27-4 against *Vibrio* (*Listonella*) *anguillarum* infections in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Aquaculture* 255, 323-333
- Plumb JA. 1993. *Edwardsiella septicaemia*. En: Bacterial diseases of fish. Inglis V, Roberts RJ & Bromage NR (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp 61-79

- Plumb JA. 1999. Health maintenance and principal microbial diseases of cultured fishes. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 328 pp
- Plumb JA. 2002. A guide to the integrated management of warm-water and cool-water fish diseases in the Great Lakes basin. Great Lakes Fishery Commission Fish Health Committee Annual Meeting, Minnesota, pp 1-28
- Portal AV. 2003. Taxonomía polifásica de poblaciones de microorganismos que establecen simbiosis con *Phaseolus vulgaris*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca
- Prado S. 2006. Microbiota asociada a criaderos de moluscos. Patogénesis y probiosis. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.
- Privitera A, Rappazzo G, Sangari P, Giannino V, Licciardello L & Stefani S. 1998. Cloning and sequencing of a 16S/23S ribosomal spacer from *Haemophilus parainfluenzae* reveals an invariant, mosaic-like organization of sequence blocks. *FEMS Microbiology Letters* 164, 289–294
- Pujalte MJ, Sitja-Bobadilla A, Macian MC, Alvarez-Pellitero P & Garay E. 2007. Occurrence and virulence of *Pseudoalteromonas* spp. in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Molecular and phenotypic characterisation of *P. undina* strain U58. *Aquaculture* 271, 47–53
- Rabben H, Nilsen TO, Huse I & Jelmert A. 1986. Production experiment of halibut fry in large enclosed water columns. International Council for the Exploration of the Sea, Council Meeting F19, 27 pp
- Raguenes G, Christen R, Guezennec J, Pignet P & Barbier G. 1997. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 47, 989-995
- Rajan PR, Lin JH, Ho MS & Yang HL. 2003. Simple and rapid detection of *Photobacterium damsela* ssp *piscicida* by a PCR technique and plating method. *Journal of Applied Microbiology* 95, 1375-1380
- Rand TG. 1994. An unusual form of *Ichthyophonus hoferi* (*Ichthyophonales: Ichthyophonaceae*) from yellowtail flounder *Limanda ferruginea* from the Nova Scotia shelf. *Diseases of Aquatic Organisms* 18, 21-28
- Read MM (ed). 2006. Focus on DNA fingerprinting research. Nova Science Publishers, New York, 151pp

- Redondo MJ, Quiroga MI, Palenzuela O, Nieto JM & Alvarez-Pellitero P. 2003. Ultrastructural studies on the development of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), an enteric parasite of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Parasitology Research* 90, 192-202
- Reed LJ & Muech H. 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Animal Journal of Hygiene* 27, 493-497
- Reid HI, Duncan HL, Laidler LA, Hunter D & Birkbeck TH. 2003a. Isolation of *Vibrio tapetis* from cultivated Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 221, 65-74
- Reid HI, Soudant P, Lambert C, Paillard C & Birkbeck TH. 2003b. Salinity effects on immune parameters of *Ruditapes philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*. *Diseases of Aquatic Organisms* 56, 249-258
- Rico RM, Tapia-Paniagua S, Martínez-Manzanares E, Balebona MC & Moriñigo MA. 2008. Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Microbiology* 105, 752-760
- Rigby PJW, Dieckmann MJ, Rhodes C & Berg P. 1977. Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* 113, 237-251
- Ringø E & Vadstein O. 1998. Colonization of *Vibrio pelagius* and *Aeromonas caviae* in early developing turbot (*Scophthalmus maximus* L.) larvae. *Journal of Applied Microbiology* 84, 227-33
- Robert F, Renaud F, Mathieu E & Gabrion C. 1988. Importance of the paratenic host in the biology of *Bothriocephalus gragarius* (Cestoda, Pseudophyllidea), a parasite of the turbot. *International Journal for Parasitology*, 18, 611-621
- Roberts RJ (ed). 1981. Patología de los peces. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, 366 pp
- Robertson PAW, Calderón J, Carrera L, Stark JR, Zherdmant M & Austin B. 1998. Experimental *Vibrio harveyi* infections in *Penaeus vannamei* larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 32, 151-155
- Rodríguez RB. 1984. Biología y cultivo de *Solea senegalensis* Kaup 1858 en el Golfo de Cádiz. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla
- Rodríguez S, Vilas MP, Gutiérrez MC, Pérez-Prieto SI, Sarasquete MC & Rodríguez RB. 1997. Isolation and characterization of a birnavirus from the sole *Solea senegalensis* in southwest Spain. *Journal of Aquatic Animal Health* 9, 295-300

- Rodríguez JM, López-Romalde S, Beaz R, Alonso MC, Castro D & Romalde JL. 2006. Molecular fingerprinting of *Vibrio tapetis* strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. *Diseases of Aquatic Organisms* 69, 175-183
- Rollefsen G. 1939. Artificial rearing of fry of sea water fish. Preliminary communication. Rapports et Procès-Verbaux des Réunions. Conseil international pour l'Exploration de la Mer 109, 133
- Romalde JL, Magarinos B, Fouz B, Bandin I, Nunez S & Toranzo AE. 1995. Evaluation of BIONOR Mono-kits for rapid detection of bacterial fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 21, 25-34
- Romalde JL. 2002. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology* 5, 3-9
- Romalde JL, Romalde SL, Ravelo C, Magariños B & Toranzo AE. 2004. Development and validation of a PCR-based protocol for the detection of *Pseudomonas anguilliseptica*. *Fish Pathology* 39, 33-41
- Romalde SL. 2005. Caracterización del patógeno emergente en acuicultura marina *Pseudomonas anguilliseptica*. Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela
- Romalde JL, Ravelo C, López-Romalde S, Avendaño-Herrera R, Magariños B & Toranzo AE. 2005. Vaccination strategies to prevent important emerging diseases for Spanish aquaculture. En: Fish vaccinology. Developmental Biology, Vol 121. Midtlyng PJ (ed). Karger, Suiza, pp 85-95
- Romalde JL, Rodríguez JM & Borrego JJ. 2007. Protocolo de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para detección e identificación de *Vibrio tapetis* a partir de cultivos puros del microorganismo y de tejidos de moluscos. Patente ES 2 265 707. Oficina Española de Patentes y Marcas
- Romanenko LA, Schumann P, Rohde M, Lysenko AM, Mikhailov VV & Stackebrandt E. 2002. *Psychrobacter submarinus* sp. nov. and *Psychrobacter maricola* sp. nov., psychrophilic halophiles from marine environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1291-1297
- Romanenko LA, Zhukova NV, Rohde M, Lysenko AM, Mikhailov VV & Stackebrandt E. 2003a. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 125-131
- Romanenko LA, Zhukova NV, Lysenko AM, Mikhailov VV & Stackebrandt E. 2003b. Assignment of *Alteromonas marinoglutinosa* NCIMB 1770 to *Pseudoalteromonas mariniglutinosa* sp. nov.,

- nom. rev., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1105–1109
- Romanenko LA, Lysenko AM, Rohde M, Mikhailov VV & Stackebrandt E. 2004. *Psychrobacter maritimus* sp. nov. and *Psychrobacter arenosus* sp. nov., isolated from coastal sea ice and sediments of the Sea of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 1741-1745
- Roselló-Mora R. 1999. Sobre el concepto de especie en Microbiología. *Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología* 27, 18-22
- Roselló-Mora R. 2006. DNA-DNA reassociation applied to microbial taxonomy and their critical evaluation. En: *Molecular identification, systematics, and population structure of Prokaryotes*. E. Stackebrandt (ed.). Springer, Berlin, pp 23-50
- Roselló-Mora R. 2009. La taxonomía del siglo XXI. *Actualidad SEM Boletín Informativo de la Sociedad Española de Microbiología* 48, 18-24
- Rozen S & Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En: *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Krawetz S & Misener S (eds). Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 365-386
- Saitou N & Nei M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425
- Sambrook J & Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3ª edición). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 999 pp
- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467
- Salas-Leiton E, Martín-Antonio B, Manchado M & Cañavate JP. 2007. Efecto de la alimentación en la resistencia a patógeno y factor de condicion en individuos de *Solea senegalensis* sometidos a ayuno prolongado. Estudio preliminar. En: *Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura*. Cadiz, mayo 2003. Junta de Andalucía, pp 1451-1454
- Santos Y, Laixier R, Bandin I, Lamas J & Toranzo AE. 1991. Susceptibility of turbot (*Scophthalmus maximus*), coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), and rainbow trout (*O. mykiss*) to strains of *Vibrio anguillarum* and their exotoxins. *Journal of Applied Ichthyology* 7, 160-167

- Santos Y, Romalde JL, Bandín I, Magariños B, Núñez S, Barja JL & Toranzo AE. 1993. Usefulness of the API-20E system for the identification of bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 116, 111-120
- Sawabe T, Tanaka R, Iqbal MM, Tajima K, Ezura Y, Ivanova EP & Christen R. 2000. Assignment of *Alteromonas elyakovii* KMM 162T and five strains isolated from spot-wounded fronds of *Laminaria japonica* to *Pseudoalteromonas elyakovii* comb. nov. and extended description of the species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 50, 265–271
- Scarpellini M, Franzetti L & Galli A. 2004. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype. *FEMS Microbiology Letters* 236, 257-260
- Seo HJ, Bae SS, Lee J-H & Kim S-J. 2005. *Photobacterium frigidiphilum* sp. nov., a psychrophilic, lipolytic bacterium isolated from deep-sea sediments of Edison Seamount. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1661–1666
- Schlottfeldt H-J, Ahne W, Vestergard-Jergensen PE & Glende W. 1991. Occurrence of viral haemorrhagic septicaemia in turbot (*Scophthalmus maximus*) - a natural outbreak. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 11, 105-107
- Schmidtke LM & Carson J. 1994. Characteristics of *Vagococcus salmoninarum* isolated from diseased salmonid fish. *Journal of Applied Bacteriology* 77, 229-236
- Schreiber AM. 2001. Metamorphosis and early larval development of the flatfishes (Pleuronectiformes): an osmoregulatory perspective. *Comparative Biochemistry and Physiology* 129, 587-95
- Shcherbakova VA, Chuvil'skaia NA, Rivkina EM, Pecheritsyna SA, Suetin SV, Laurinavichius KS, Lysenko AM & Gilichinsky DA. 2009. Novel halotolerant bacterium from cryopeg in permafrost: description of *Psychrobacter muriicola* sp. nov. *Microbiology* 78, 84–91
- Shelburne JE. 1964. The artificial propagation of marine fish. *Advances in Marine Biology* 2, 1-83
- Sheu SY, Lin KY, Chou JH, Chang PS, Arun AB, Young CC & Chen WM. 2007. *Tenacibaculum litopenaei* sp. nov., isolated from a shrimp mariculture pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1148–1153
- Shin JD, Shin MG, Suh SP, Ryang DW, Rew JS & Nolte FS. 1996. Primary *Vibrio damsela* septicemia. *Clinical Infectious Diseases* 22, 856–857

- Shivaji S, Reddy GS, Suresh K, Gupta P, Chintalapati S, Schumann P, Stackebrandt E & Matsumoto GI. 2005. *Psychrobacter vallis* sp. nov. and *Psychrobacter aquaticus* sp. nov., from Antarctica. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 757–762
- Simidu U, Kita-Tsukamoto K, Yasumoto T & Yotsu M. 1990. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, 331-336
- Simmons JS. 1926. A culture medium for differentiating organisms of typhoid-colon aerogenes groups and for isolating of certain fungi. *Journal of Infectious Diseases* 39, 209-241
- Skjermo J & Olav Vadstein O. 1999. Techniques for microbial control in the intensive rearing of marine larvae. *Aquaculture* 177, 333–343
- Smibert RM & Krieg NR. 1981. Systematics: general characterization. En: Manual of methods for general bacteriology. Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RN, Nester EW, Wood NA, Krieg NR & Phillips GB (eds). American Society for Microbiology, Washington DC, pp 409-443
- Snieszko SF. 1974. The effects of environmental stress on outbreaks of infectious diseases in fishes. *Journal of Fish Biology* 6, 197-208
- Soffientino B, Gwaltney T, Nelson DR, Specker JL, Mauel M & Gómez-Chiarri M. 1999. Infectious necrotizing enteritis and mortality caused by *Vibrio carchariae* in summer flounder *Paralichthys dentatus* during intensive culture. *Diseases of Aquatic Organisms* 38, 201-210
- Soltani M, Munday BL & Burke CM. 1996. The relative susceptibility of fish to infections by *Flexibacter columnaris* and *Flexibacter maritimus*. *Aquaculture* 140, 259–264
- Sorensen UBS & Larsen JL. 1986. Serotyping of *Vibrio anguillarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 593–597
- Stackebrandt E & Ebers J. 2006. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today* 33, 152-155
- Stackebrandt E & Goebel BM. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S ARNr sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systemic Bacteriology* 44, 846-849
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, Nesme X, Rosselló-Mora R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC & Whitman WB. 2002. Report of the ad

- hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 1043-1047
- Stewart FJ & Cavanaugh CM. 2007. Intragenomic variation and evolution of the internal transcribed spacer of the ARNr operon in Bacteria. *Journal of Molecular Evolution* 65, 44-67
- Sugita H & Ito Y. 2006. Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. *Letters in Applied Microbiology* 43, 336-342
- Sul S-Y, Kim H-J, Kim T-W & Kim H-Y. 2007. Rapid Identification of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in probiotic products using multiplex PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 490-495
- Sun K, Zhang WW, Hou JH & Sun L. 2009. Immunoprotective analysis of VhhP2, a *Vibrio harveyi* vaccine candidate. *Vaccine*. 27, 2733-2740
- Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S & Yamamoto S. 2001. Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amyolyticum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51, 1639-1652
- Takano R, Nishizawa T, Arimoto M & Muroga K. 2000. Isolation of viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) from wild Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 20, 186-192
- Tang Y-W, Procop GW & Persing DH. 1997. Molecular diagnosis of infectious diseases. *Clinical Chemistry* 43, 2021-2038
- Tapia-Paniagua ST, Chabrilón M, Díaz-Rosales P, de la Banda IG, Lobo C, Balebona MC & Moriñigo MA. 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbial Ecology* 60, 310-319
- Thiéry R, Cozien J, de Boissésou C, Kerbart-Boscher S & Névarez L. 2004. Genomic classification of new betanodavirus isolates by phylogenetic analysis of the coat protein gene suggests a low host-fish species specificity. *Journal of General Virology* 85, 3079-3087
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680

- Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Engelbeen K, Denys R & Swings J. 2002. *Vibrio trachuri* Iwamoto *et al.* 1995 is a junior synonym of *Vibrio harveyi* (Johnson and Shunk 1936) Baumann *et al.* 1981. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52, 973–976
- Thompson FL, Li Y, Gomez-Gil B, Thompson CC, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Rupp GS, Pereira A, De Bem MM, Sorgeloos P & Swings J. 2003. *Vibrio neptunius* sp. nov., *Vibrio brasiliensis* sp. nov. and *Vibrio xuii* sp. nov., isolated from the marine aquaculture environment (bivalves, fish, rotifers and shrimps). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 245–252
- Thompson FL, Iida T & Swings J. 2004. Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 68, 403-431
- Thompson FL, Gevers D, Thompson CC, Dawyndt P, Naser S, Hoste B, Munn CB & Swings J. 2005. Phylogeny and molecular identification of vibrios on the basis of multilocus sequence analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 5107-5015
- Thompson FL, Gomez-Gil B, Vasconcelos ATR & Sawabe T. 2007. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 4279-4285
- Thomson R, Macpherson HL, Riaza A & Birkbeck TH. 2005. *Vibrio splendidus* biotype 1 as a cause of mortalities in hatchery-reared larval turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Applied Microbiology* 99, 243-250
- Thyssen A, Grisez L, van Houdt R & Ollevier F. 1998. Phenotypic characterization of the marine pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 1145-1151
- Tilsala-Timisjärvi A & Alatossava T. 1997. Development of oligonucleotide cebadores from the 16S-23S ARNr intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *International Journal of Food Microbiology* 35, 49-56
- Toranzo AE, Baya A, Roberson BS, Barja JL, Grimes DJ & Hetrick FM. 1987. Specificity of slide agglutination test for detecting bacterial fish pathogens. *Aquaculture* 61, 81–97
- Toranzo AE & Barja JL. 1992. First report of furunculosis in turbot reared in floating cages in northwest of Spain. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 12, 147–149

- Toranzo AE & Barja JL. 1993. Virulence factors of bacteria pathogenic for coldwater fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 5-36
- Toranzo AE, Novoa B, Romalde JL, Núñez S, Devesa S, Mariño E, Silva R, Martínez E, Figueras A & Barja JL. 1993. Microflora associated with healthy and diseased turbot (*Scophthalmus maximus*) from three farms in northwest Spain. *Aquaculture* 114, 189-202
- Toranzo AE, Dopazo CP, Romalde JL, Santos Y & Barja JL. 1997. Estado actual de la patología bacteriana y vírica en la piscicultura española. *Revista AquaTIC* n°1
- Toranzo AE, Avendaño R, Lopez-Vazquez C, Magariños B, Dopazo CP, Romalde JL & Barja JL. 2003. Principales patologías bacterianas y víricas en lenguado cultivado: caracterización y agentes etiológicos. En: Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura. Cadiz, mayo 2003. Junta de Andalucía, pp 354-356
- Toranzo AE, Magariños B & Romalde JL. 2005. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture* 246, 37-61
- Toyama T, Kita-Tsukamoto K & Wakabayashi H. 1996. Identification of *Flexibacter maritimus*, *Flavobacterium branchiophilum* and *Cytophaga columnaris* by PCR targeted 16S ribosomal DNA. *Fish Pathology* 31, 25-31
- Tvrzová L, Schumann P, Spröer C, Sedláček I, Pácová Z, Sedo O, Zdráhal Z, Steffen M & Lang E. 2006. *Pseudomonas moraviensis* sp. nov. and *Pseudomonas vranovensis* sp. nov., soil bacteria isolated on nitroaromatic compounds, and emended description of *Pseudomonas asplenii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 2657-2663
- Urakawa H, Kita-Tsukamoto K, Steven SE, Ohwada K & Colwell RR. 1998. A proposal to transfer *Vibrio marinus* (Russell 1891) to a new genus *Moritella* gen. nov. as *Moritella marina* comb. nov. *FEMS Microbiology Letters* 165, 373-378
- Urbanczyk H, Ast JC, Higgins MJ, Carson J & Dunlap PV. 2007. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2823-2829
- Vallejo SV & Gonzalez-Posada JO. 2007. Acuicultura: la revolucion azul. *Publicaciones científicas y tecnológicas del observatorio español de acuicultura*

- Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K & Swings J. 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* 60, 407-38
- Vandenbergh J, Thompson F, Gomez-Gil B & Swings J. 2003. Phenotypic diversity amongst isolates from marine aquaculture systems. *Aquaculture* 219, 9-20
- Vela AI, Collins MD, Latre MV, Mateos A, Moreno MA, Hutson R, Domínguez L & Fernández-Garayzábal JF. 2003. *Psychrobacter pulmonis* sp. nov., isolated from the lungs of lambs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 415-419
- Vendrell D, Balcázar JL, Ruiz-Zarzuela I, de Blas I, Gironés O & Múzquiz JL. 2006. *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 29, 177-198
- Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Izard D & Leclerc H. 1999a. Taxonomic study of bacteria isolated from natural mineral waters: proposal of *Pseudomonas jessenii* sp. nov. and *Pseudomonas mandelii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 22, 45-58
- Verhille S, Baida N, Dabboussi F, Hamze M, Izard D & Leclerc H. 1999b. *Pseudomonas gessardii* sp. nov. and *Pseudomonas migulae* sp. nov., two new species isolated from natural mineral waters. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 1559-1 572
- Verner-Jeffreys DW, Shields RJ, Bricknell IR & Birkbeck TH. 2004. Effects of different water treatment methods and antibiotic addition on larval survival rate and gut microflora development in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) yolk sac larvae. *Aquaculture* 232, 129–143
- Versalovic J, Koeuth T & Lupski JR. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19, 6823-6831
- Vigneulle M & Laurencin FB. 1995. *Serratia liquefaciens*: a case report in turbot (*Scophthalmus maximus*) cultured in floating cages in France. *Aquaculture* 132, 121-124
- Villamil L, Figueras A, Toranzo AE, Planas M & Novoa B. 2003a. Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. *Journal of Fish Diseases* 26, 293-303
- Villamil L, Figueras A, Planas M & Novoa B. 2003b. Control of *Vibrio alginolyticus* in Artemia culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219, 43–56

- Wakabayashi H & Egusa S. 1972. Characteristics of a *Pseudomonas* sp. from an epizootic of pond-cultured eels (*Anguilla japonica*). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries* 38, 577–587
- Wakabayashi H, Hikida H & Masumura K. 1986. *Flexibacter maritimus* sp. nov., a pathogen of marine fishes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 36, 396–398
- Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T & Itakura K. 1979. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to Φ_X 174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research* 6, 3543-3558
- Wang JT, Chou YJ, Chou JH, Chen CA & Chen WM. 2008. *Tenacibaculum aiptasiae* sp. nov., isolated from a sea anemone *Aiptasia pulchella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58, 761-766
- Warsen AE, Krug MJ, LaFrentz S, Stanek DR, Loge FJ & Call DR. 2004. Simultaneous discrimination between 15 fish pathogens by using 16S ribosomal DNA PCR and DNA microarrays. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 4216-4221
- Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky L, Moore LH, Moore WC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP & Trüper HG. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37, 463-464
- Wei Q. 2002. Social and economic impacts of aquatic animal health problems in aquaculture in China. En: Primary aquatic animal health care in rural, small-scale, aquaculture development. FAO Fish Technical Paper no. 406. Arthur JR, Phillips MJ, Subasinghe RP, Reantaso MB & MacRae IH. (eds). FAO, Roma, pp 55-61
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* 173, 697-703
- West PA, Lee JV & Bryan TN. 1983. A numerical taxonomic study of species of *Vibrio* isolated from the aquatic environment and birds in Kent, England. *Journal of Applied Bacteriology* 55, 263-282
- Wheeler RW, Davies RL, Dalsgaard I, Garcia J, Welch TJ, Wagley S, Bateman KS & Verner-Jeffreys DW. 2009. *Yersinia ruckeri* biotype 2 isolates from mainland Europe and the UK likely represent different clonal groups. *Diseases of Aquatic Organisms* 84, 25-33

- Wiklund T, Madsen L, Bruun MS & Dalsgaard I. 2000. Detection of *Flavobacterium psychrophilum* from fish tissue and water samples by PCR amplification. *Journal of Applied Microbiology* 88, 299-307
- Wilson IG. 1997. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63, 3741-3751
- Wilson T & Carson J. 2003. Development of sensitive, high-throughput one-tube RT-PCR-enzyme hybridization assay to detect selected bacterial fish pathogens. *Diseases of Aquatic Organisms* 54, 127-134
- Wilson T, Carson J & Bowman J. 2002. Optimization of one-tube PCR-ELISA to detect femtogram amounts of genomic DNA. *Journal of Microbiological Methods* 51, 163-170
- Wolke RE, Bengtson DA, Rice MA & Whittaker M. 2000. Diseases of cultured flatfish: diagnosis and prevention. NRAC Publication No. 00-001. Northeastern Regional Aquaculture Center, University of Massachusetts, Dartmouth, Massachusetts, 12 pp
- Wolters J & Erdmann A. 1988. Compilation of 5S ARNr and 5S ARNr gene sequences. *Nucleic Acids Research* 16, 1-85
- Xie C-H & Yokota A. 2004. Transfer of *Hyphomicrobium indicum* to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium indicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54, 2113-2116
- Yamamoto S & Harayama S. 1995. PCR Amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal cebadores and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 1104-1109
- Yamamoto S. & Harayama S. 1998. Phylogenetic relationship of *Pseudomonas putida* strains deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA genes. *International Journal of Systematic Bacteriology* 48, 813-819
- Yamamoto S, Bouvet PJ & Harayama S. 1999. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 87-95
- Yoon JH, Yeo SH, Oh TK & Park YH. 2005a. *Psychrobacter alimentarius* sp. nov., isolated from squid jeotgal, a traditional Korean fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 171-176

- Yoon JH, Lee CH, Yeo SH & Oh TK. 2005b. *Psychrobacter aquimaris* sp. nov. and *Psychrobacter namhaensis* sp. nov., isolated from sea water of the South Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 1007–1013
- Yoon JH, Kang SJ & Oh TK. 2005c. *Tenacibaculum lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat in the Yellow Sea, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55, 793–798
- Yoon JH, Kang SJ & Oh TK. 2006. *Polaribacter dokdonensis* sp. nov., isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 56, 1251–1255
- Yoshizawa S, Wada M, Kita-Tsukamoto K, Yokota A & Kogure K. 2009. *Photobacterium aquimaris* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1438–1442
- Yúfera M & Darias MJ. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268, 53–63
- Yumoto I, Hirota K, Sogabe Y, Nodasaka Y, Yokota Y & Hoshino T. 2003. *Psychrobacter okhotskensis* sp. nov., a lipase-producing facultative psychrophile isolated from the coast of the Okhotsk Sea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1985–1989
- Zeigler D. 2003. Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53, 1893–1900
- Zeng X, Kong F, Halliday C, Chen S, Lau A, Playford G & Sorrell TC. 2007. Reverse line blot hybridization assay for identification of medically important fungi from culture and clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 45, 2872–2880
- Zheng D, Mai K, Liu S, Limin C, Liufu Z, Xu W, Tan B & Zhang W. 2004. Effect of temperature and salinity on virulence of *Edwardsiella tarda* to Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture Research* 35, 494–500
- Ziemke F, Höfle MG, Lalucat J & Rosselló-Mora R. 1998. Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen,s genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology* 48, 179–186
- Zorrilla I, Balebona MC, Moriñigo MA, Sarasquete C & Borrego JJ. 1999. Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases* 22, 167–172

- Zorrilla I, Arijo S, Chabrellón M, Díaz P, Martínez- Manzanares E, Balebona MC & Moriñigo MA. 2003. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *Journal of Fish Diseases* 26, 103–110
- Zwart G, van Hannen EJ, Kamst-van Agteveld MP, Van der Gucht K, Lindström ES, Van Wichelen J, Lauridsen T, Crump BC, Han S-K & Declerck S. 2003. Rapid screening for freshwater bacterial groups by using reverse line blot hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 69, 5875-5883

8. ANEXOS

ANEXO I. Medios de cultivo, reactivos y tampones utilizados.

	Composición
MEDIOS DE CULTIVO	
Agar luminiscente	Caldo nutritivo 2,5% (p/v); NaCl 1,75%; MgCl ₂ 0,4%; KCl 0,1%; agar 1,5%
Agar Columbia (BBL)	Digerido pancreático de caseína 1,2%; digerido de tejido animal 0,5%; extracto de levadura 0,3%; extracto de carne 0,3%; almidón 0,1%; NaCl 0,5%; agar 1,35%
Agar nutritivo	Extracto de carne 0,5%; peptona 1%; NaCl 1%; agar 1,5%; pH 7,2
Caldo base rojo fenol	Peptona proteosa 1%; rojo fenol 0,0018%; NaCl 1%; pH 7,4
Caldo nitrato	Extracto de carne 0,3%; peptona 0,5%; KNO ₃ 0,1%; NaCl 1,5%; pH 7
Caldo triptona	Triptona 1%; NaCl 1%; pH 7,5
Citrato de Simmons	(NH ₄) ₂ H ₂ PO ₄ 0,1%; K ₂ HPO ₄ 0,1%; NaCl 1%; citrato sódico 0,2%; MgSO ₄ 0,02%; azul de bromotimol 0,008%; agar 1,5%; pH 6,9
Clark & Lubs	Peptona 0,7%; glucosa 0,5%; K ₂ HPO ₄ 0,5%; NaCl 2%; pH 6,9
FMM	Peptona 0,5%; extracto de levadura 0,05%; acetato sódico 0,001%; agar 1,5%; como diluyente se usa agua de mar; pH 7,2
King A (Difco)	Digerido pancreático de gelatina 2%; cloruro de magnesio 0,14%; sulfato de potasio 1%; agar 1,5%
King B (Difco)	Digerido pancreático de caseína 1%; peptona proteosa 1%; fosfato dipotásico 0,15%; sulfato de magnesio 0,15%; agar 1,5%
LB	Peptona 1%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 0,5%; agar 1,5%
Medio basal	Peptona 0,4%; extracto de levadura 0,1%; agar 1,5%
Medio base OF (Difco)	Digerido pancreático de caseína 0,2%; NaCl 0,5%; K ₂ HPO ₄ 0,03%; azul de bromotimol 0,008%; agar 0,2%; pH 6,8
Medio base decarboxilasa Moeller (Difco)	Peptona 0,5%; extracto de carne 0,5%; dextrosa 0,05%; púrpura de bromocresol 0,001%; rojo cresol 0,0005%; piridoxal 0,0005%; pH 6
Mueller-Hinton (Difco)	Extracto de carne 0,2%; digerido ácido de caseína 1,75%; almidón 0,15%; agar 1,7%; pH 7,3
OF modificado (producción de ácido a partir de azúcares)	Peptona 0,2%; NaCl 1%; K ₂ HPO ₄ 0,03%; azul de bromotimol 0,003%; agar 1,5%; azúcar utilizado, 1%; pH 7,1
SOC	Bacto triptona 2%; extracto de levadura 0,5%; NaCl 0,058%; KCl 0,018%; MgCl ₂ 0,095%; MgSO ₄ 0,12%; glucosa 0,36%
TCBS (Difco)	Extracto de levadura 0,5%; peptona proteosa 1%; citrato sódico 1%; tiosulfato de sodio 1%; oxgall 0,8%; sacarosa 2%; NaCl 1%; citrato ferrico amonio 0,1%; azul de bromotimol 0,004%; azul de timol 0,004%; agar 1,5%
TSA (Difco)	Digerido pancreático de caseína 1,5%; digerido enzimático de soja 0,5%; NaCl 0,5%; agar 1,5%
Urea de Christensen	Peptona 0,1%; NaCl 1%; KH ₂ PO ₄ 0,2%; glucosa 0,1%; rojo fenol 0,0012%; urea 2%; pH 6,8
ZOF	Agar marino 3,7%; Tris 0,05%; glucosa 1%; rojo fenol 0,0001%; agar 0,3%; pH 7,6
REACTIVOS	
Reactivo de Frazier	HgCl ₂ al 15% en 20 ml de ácido clorhídrico concentrado y 80 ml de agua destilada
Reactivo de Griess-Ilosvay (A)	α-naftilamina 0,5% en ácido acético 5 N. Guardar protegido de la luz
Reactivo de Griess-Ilosvay (B)	Ácido sulfanílico 0,8% en ácido acético 5 N. Guardar protegido de la luz
Reactivo indol de Kovacs (Panreac)	4-(dimetilamino)benzaldehído al 5% en 250 ml de ácido clorhídrico concentrado (37%) y 750 ml de 1-Butanol
Reactivo oxidasa de Kovacs (BioMérieux)	Solución acuosa de N,N,N,N,-tetrametil-1,4-fenilenediamina al 1% y ácido ascórbico al 0,2%
Reactivo VP1	α-naftol al 5% en etanol absoluto
Reactivo VP2	Solución acuosa de KOH al 40%
Rojo de metilo	Rojo de metilo 0,02% en 200 ml de agua destilada y 300 ml en alcohol 96%
TAMPONES	
Coating buffer	Na ₂ CO ₃ 7,5 mM; NaHCO ₃ 15,5 mM; MgCl ₂ 1 mM; pH 9,8
PB 1 M	Na ₂ HPO ₄ 0,5 M; NaH ₂ PO ₄ 0,5 M; pH 6,8
PBS	NaCl 136 mM; KCl 26,8 mM; Na ₂ HPO ₄ 8 mM; KH ₂ PO ₄ 1,46 mM; pH 7,2
PBS (hibridación ADN-ADN)	NaCl 0,3M; Na ₂ HPO ₄ 5mM; KH ₂ PO ₄ 1,5 mM; pH 7,16
SSPE (1x)	NaCl 150 mM; Na ₂ HPO ₄ 10 mM; EDTA 1 mM; pH 7,4
Tampón carbonato	NaHCO ₃ 0,1M; MgCl ₂ 1 M; pH 9,8
Tampón de carga	Sacarosa 40%; azul de bromofenol 0,25%
TE	Tris-HCl 1M, pH 8; EDTA 0,1M
TBE	Tris-HCl 50 mM, pH 8,2; EDTA 2,5 mM; ácido bórico 50 mM
TBS	Tris-HCl 5 mM, pH 7,5; NaCl 0,2 M
TTBS	TBS con tween 20 al 0,05%

ANEXO II. Datos de aislamiento.

A*	F	R	F	RP	SP	E	MA	S	P	TQ	T
a1	G1	A2-SE31	14/04/2004	1A-4	Acedia	Alevin	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	19
a3	otro	A2-SE31	14/04/2004	1A-3	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	19
a4	G1	A2-SE31	14/04/2004	1A-3	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	19
a5	G1	A2-SE31	14/04/2004	1A-3	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	19
a6	G35	L4-EXT	02/07/2004	2B-2	Lenguado	Adulto	Aleta caudal (úlceras)	Úlceras en aleta caudal y piel	A	EXT	21
a7	G7	A2-SE31	24/06/2004	1B-2	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	20
a8	G91	L4-EXT	02/07/2004	2B-2	Lenguado	Adulto	Higado	Úlceras en aleta caudal y piel	A	EXT	21
a9	G91	A2-SE31	04/08/2004	3-1	Acedia	Alevin	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	22
a10	G91	L3-SE	25/06/2004	2A-1	Lenguado	Juvenil	Úlceras cutánea dorsal	Úlceras en aleta caudal y piel	A	SE	19
a11	G47	R4-B1 (1)	15/01/2006	41-1	Rombo	Adulto	Úlceras cutánea dorsal	Úlceras cutánea dorsal, falta de apetito	A	BI	10
a12	G256	A4-B16	18/01/2006	42-1	Acedia	Adulto	Aleta caudal (erosionada)	Sin síntomas externos salvo ligera erosión en aleta caudal, hígado necrosado	A	BI-6	10
a13	G29	A3-SE85	06/09/2004	4-7	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a14	G29	A3-SE85	06/09/2004	4-7	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a15	G256	A4-B16	18/01/2006	42-2	Acedia	Adulto	Aleta caudal (erosionada)	Sin síntomas externos salvo ligera erosión en aleta caudal	A	BI-6	10
a16	G107	A4-B16	18/01/2006	42-3	Acedia	Adulto	Aleta caudal (úlceras)	Sin síntomas externos salvo ligera erosión en aleta caudal	A	BI-6	10
a17	G91	A3-SE85	06/09/2004	4-9	Acedia	Juvenil	Opérculo (úlceras)	Úlceras en zona opercular	A	SE-85	21
a18	G91	A2-SE31	04/08/2004	3-8	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	22
a19	G91	A2-SE31	04/08/2004	3-8	Acedia	Alevin	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	22
a20	G91	A3-SE85	06/09/2004	4-9	Acedia	Juvenil	Higado	Úlceras en zona opercular	A	SE-85	21
a26	G91	A4-B16	18/01/2006	42-1	Acedia	Adulto	Aleta caudal (úlceras)	Sin síntomas externos salvo ligera erosión en aleta caudal, hígado necrosado	A	BI-6	10
a27	G35	A3-SE85	06/09/2004	4-2	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a28	G29	A3-SE85	06/09/2004	4-1	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a29	G29	A3-SE85	06/09/2004	4-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a30	G91	A4-B16	18/01/2006	42-2	Acedia	Adulto	Aleta caudal (úlceras)	Sin síntomas externos salvo ligera erosión en aleta caudal	A	BI-6	10
a31	G35	A4-B16	18/01/2006	42-3	Acedia	Adulto	Aleta caudal (úlceras)	Sin síntomas externos salvo ligera erosión en aleta caudal	A	BI-6	10
a32	G35	A3-SE85	06/09/2004	4-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a33	G35	A3-SE85	06/09/2004	4-1	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a35	G35	A3-SE85	06/09/2004	4-2	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a36	G35	A3-SE85	06/09/2004	4-2	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a42	otro	A3-SE85	06/09/2004	4-4	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a47	G47	A3-SE85	06/09/2004	4-10	Acedia	Juvenil	Higado	Piel con zonas de descamación	A	SE-85	21
a48	G1	A3-SE85	06/09/2004	4-7	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a49	G1	A3-SE85	06/09/2004	4-7	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a50	G47	A3-SE85	06/09/2004	4-7	Acedia	Alevin	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a51	G29	A3-SE85	06/09/2004	4-2	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	21
a52	G35	L3-SE	25/06/2004	2A-1	Lenguado	Juvenil	Úlceras cutánea dorsal	Úlceras en aleta caudal y piel	A	SE	19
a54	G54	A4-B16	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Higado	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a57	G1	A2-SE31	24/06/2004	1B-2	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-31	20
a58	G107	A4-B16	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Riñón	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a72	G1	A2-B110	27/10/2004	5A-1	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, úlcera cutánea dorsal	A	BI-10	20
a75	G1	A2-B110	27/10/2004	5A-2	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	BI-10	20
a76	G91	A2-B110	27/10/2004	5A-2	Acedia	Alevin	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	BI-10	20
a80	G1	A3-LA9	27/10/2004	5B-6	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	A	LA-9	20
a81	G241	A3-LA9	27/10/2004	5B-6	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	A	LA-9	20
a82	G91	A3-LA9	27/10/2004	5B-6	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	A	LA-9	20
a85	G35	A3-LA9	27/10/2004	5B-7	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	A	LA-9	20
a86	G35	A3-LA9	27/10/2004	5B-7	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	A	LA-9	20
a87	G91	A3-LA9	27/10/2004	5B-7	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	A	LA-9	20
a90	G7	A3-SE85	29/11/2004	6-03	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	19
a91	G91	A3-SE85	29/11/2004	6-03	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	19
a92	G35	A3-SE85	29/11/2004	6-03	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	19
a97	G35	A3-SE85	29/11/2004	6-09	Acedia	Juvenil	Aleta dorsal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, úlcera en aleta dorsal	A	SE-85	19
a98	G35	A3-SE85	29/11/2004	6-09	Acedia	Juvenil	Aleta dorsal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, úlcera en aleta dorsal	A	SE-85	19
a100	G35	A3-SE85	29/11/2004	6-12	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	19
a101	G35	A3-SE85	29/11/2004	6-01	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-85	19
a102	G91	A3-B19	21/12/2004	7-1	Acedia	Juvenil	Úlceras cutánea dorsal	Aleta caudal ulcerada, úlcera cutánea dorsal, hígado necrosado	A	BI-9	16

A	F	R	F	RP	SP	E	MA	S	P	TQ	T
a105	G107	A3-BI9	21/12/2004	7-2	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	BI-9	16
a106	G91	A3-BI9	21/12/2004	7-3	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	A	BI-9	16
a107	G107	A3-BI9	21/12/2004	7-3	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	A	BI-9	16
a108	G1	A3-BI9	21/12/2004	7-4	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	BI-9	16
a117	G107	A1S-1	01/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Peces sanos	A	LA-10	20
a118	G107	A1S-1	01/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Peces sanos	A	LA-10	20
a119	G107	A1S-1	01/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Peces sanos	A	LA-10	20
a126	G107	R1-LA7	04/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-7	20
a133	G107	A1S-1	07/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Peces sanos	A	LA-10	20
a134	G148	R1-LA2	07/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-2	20
a142	G148	R1-LA2	07/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-2	20
a143	G148	R1-LA2	07/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-2	20
a148	G148	W4	07/02/2005		Artemia		Cultivo de artemia		A		
a149	G148	W4	07/02/2005		Artemia		Cultivo de artemia		A		
a150	G107	A1-LA10	22/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-10	20
a152	otro	A1-LA10	22/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-10	20
a153	otro	A1-LA10	22/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-10	20
a154	G148	R1S-1	22/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Peces sanos	A	LA-3	20
a155	G148	R1S-1	22/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Peces sanos	A	LA-3	20
a156	G148	A1-LA10	23/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-10	20
a157	G7	A1-LA10	23/02/2005		Acedia	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-10	20
a163	G7	R1-LA6	23/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-6	20
a164	G148	R1-LA6	23/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-6	20
a165	G7	R1-LA6	23/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-6	20
a166	G107	R1-LA6	23/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-6	20
a167	G7	R1S-2	23/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Peces sanos	A	LA-3	20
a168	G107	R1S-2	23/02/2005		Rombo	Larva	Larva entera	Peces sanos	A	LA-3	20
a170	G7	A4-BI6	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Riñón	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a172	G148	L2-BI5	24/02/2005	17-3	Lenguado	Alevín	Higado	Aleta caudal ulcerada	A	BI-5	16
a173	G54	A4-BI6	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Higado	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a174	G107	L2-BI5	24/02/2005	17-4	Lenguado	Alevín	Higado	Aleta anal ulcerada	A	BI-5	16
a175	G148	L2-BI5	24/02/2005	17-6	Lenguado	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	BI-5	16
a176	G107	A4-BI6	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Riñón	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a177	G107	A4-BI6	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Riñón	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a180	G185	A4-BI6	21/02/2006	43-2	Acedia	Adulto	Riñón	Sin síntomas externos, hígado inflamado	A	BI-6	12'5
a184	G185	A4-BI6	21/02/2006	43-2	Acedia	Adulto	Higado	Sin síntomas externos, hígado inflamado	A	BI-6	12'5
a185	G185	A4-BI6	21/02/2006	43-2	Acedia	Adulto	Higado	Sin síntomas externos, hígado inflamado	A	BI-6	12'5
a190	G255	A3-BI10	04/03/2005	18-3	Acedia	Juvenil	Úlcera cutánea dorsal	Úlcera cutánea dorsal	A	BI-10	11'5
a194	G7	A4-BI6	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Piel (descamación)	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a196	G255	A3-BI10	07/03/2005	19-1	Acedia	Juvenil	Aleta anal (úlceras)	Aleta anal ulcerada	A	BI-10	12
a197	G197	A3-BI10	07/03/2005	19-2	Acedia	Juvenil	Aleta anal (úlceras)	Aleta anal ulcerada, úlcera cutánea dorsal	A	BI-10	12
a199	G197	A3-BI10	07/03/2005	19-3	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, úlcera cutánea dorsal	A	BI-10	12
a200	G255	A3-BI10	07/03/2005	19-3	Acedia	Juvenil	Opérculo (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, úlcera en zona opercular	A	BI-10	12
a201	G255	A3-BI10	07/03/2005	19-4	Acedia	Juvenil	Aleta anal (úlceras)	Aleta anal ulcerada	A	BI-10	12
a202	G1	A3-BI10	07/03/2005	19-4	Acedia	Juvenil	Aleta anal (úlceras)	Aleta anal ulcerada	A	BI-10	12
a203	G255	A3-BI10	07/03/2005	19-6	Acedia	Juvenil	Aleta anal (úlceras)	Aleta anal ulcerada	A	BI-10	12
a204	G255	A3-BI10	07/03/2005	19-8	Acedia	Juvenil	Aleta anal (úlceras)	Aleta anal ulcerada	A	BI-10	12
a206	G1	A3-BI10	07/03/2005	19-9	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada, úlcera cutánea dorsal	A	BI-10	12
a207	G107	A3-BI10	07/03/2005	19-9	Acedia	Juvenil	Higado	Aleta caudal ulcerada, úlcera cutánea dorsal	A	BI-10	12
a208	G255	A3-BI10	07/03/2005	19-9	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, úlcera cutánea dorsal	A	BI-10	12
a212	G256	A3-BI10	07/03/2005	19-1	Acedia	Juvenil	Aleta anal (úlceras)	Aleta anal ulcerada	A	BI-10	12
a213	G255	A3-BI10	07/03/2005	19-3	Acedia	Juvenil	Opérculo (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, úlcera en zona opercular	A	BI-10	12
a214	G7	A4-BI6	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Piel (descamación)	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a216	G47	A4-BI6	21/02/2006	43-1	Acedia	Adulto	Piel (descamación)	Sin síntomas externos, hígado necrosado	A	BI-6	12'5
a218	G241	A2-SE1	29/03/2005	20-3	Acedia	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	19
a220	G1	A2-SE1	31/03/2005	21-1	Acedia	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	19'5
a221	G241	A2-SE1	31/03/2005	21-2	Acedia	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	19'5
a227	G54	A4-BI6	01/03/2006	44-1	Acedia	Adulto	Higado	Sin síntomas externos, hígado ligeramente hemorrágico	A	BI-6	11
a230	G1	A3-BI10	05/04/2005	22-4	Acedia	Juvenil	Higado	Úlcera cutánea en zona visceral	A	BI-10	19
a233	G241	A2-SE1	05/04/2005	23-2	Acedia	Alevín	Piel (descamación)	Piel con zonas de descamación	A	SE-1	19

*Leyenda: R, referencia del brote o muestreo; F, fecha de aislamiento; RP, referencia del pez muestreado; SP, especie a la que pertenece el pez muestreado; E, edad del pez muestreado; MA, muestra a partir de la cual se realizó el aislamiento; S, síntomas; P, piscifactoria; TQ, tanque; T, temperatura del agua en el momento del muestreo, en °C.

Anexo II (continuación)

A	F	R	F	RP	SP	E	MA	S	P	TQ	T
a234	G7	A2-SE1	05/04/2005	23-2	Acedia	Alevín	Hígado	Piel con zonas de descamación	A	SE-1	19
a237	G241	A2-SE1	05/04/2005	23-4	Acedia	Alevín	Piel (descamación)	Piel con zonas de descamación	A	SE-1	19
a238	G35	A3-SE1	08/03/2006	45-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE1	19
a239	G241	A2-SE1	05/04/2005	23-5	Acedia	Alevín	Piel (descamación)	Piel con zonas de descamación	A	SE-1	19
a241	G241	A2-SE1	05/04/2005	23-6	Acedia	Alevín	Piel (descamación)	Piel con zonas de descamación	A	SE-1	19
a242	G241	A2-SE1	05/04/2005	23-6	Acedia	Alevín	Hígado	Piel con zonas de descamación	A	SE-1	19
a243	G241	A2-SE1	05/04/2005	23-7	Acedia	Alevín	Piel (descamación)	Piel con zonas de descamación	A	SE-1	19
a245	G241	A2-SE1	05/04/2005	23-8	Acedia	Alevín	Piel (descamación)	Piel con zonas de descamación	A	SE-1	19
a246	otro	A2-SE1	05/04/2005	23-8	Acedia	Alevín	Hígado	Sin síntomas aparentes	A	SE-1	19
a248	G1	A2-SE1	05/04/2005	23-9	Acedia	Alevín	Hígado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	19
a250	G1	A2-SE1	05/04/2005	23-9	Acedia	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	19
a252	G241	A2-SE1	15/04/2005	24-1	Acedia	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	19
a254	G256	A2-SE1	22/04/2005	25-1	Acedia	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	20
a255	G255	A2-SE1	22/04/2005	25-1	Acedia	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	20
a256	G256	A2-SE1	22/04/2005	25-1	Acedia	Alevín	Hígado	Aleta caudal ulcerada	A	SE-1	20
a257	G241	L1-LA5	03/05/2005		Lenguado	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-5	20
a258	G241	L1-LA5	03/05/2005		Lenguado	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-5	20
a259	G241	L1-LA5	03/05/2005		Lenguado	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-5	20
a260	G241	L1-LA5	03/05/2005		Lenguado	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-5	20
a262	G241	L1-LA5	03/05/2005		Lenguado	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-5	20
a266	G1	R2-LA	11/05/2005	27-2	Rombo	Alevín	Aleta dorsal (úlceras)	Aleta dorsal ulcerada	A	LA	20
a269	G1	R2-LA	11/05/2005	27-2	Rombo	Alevín	Aleta dorsal (úlceras)	Aleta dorsal ulcerada	A	LA	20
a271	G241	R2-LA	11/05/2005	27-1	Rombo	Alevín	Aleta dorsal (úlceras)	Aleta dorsal ulcerada	A	LA	20
a273	G7	L4-BI5	20/05/2005	28-1	Lenguado	Adulto	Piel (descamación)	Coloracion oscura, distension abdominal, hígado hemorrágico, bazo inflamado, ascitis	A	BI-5	19
a274	G443	A3-SE1	08/03/2006	45-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE1	19
a281	G107	A3-BI10	26/05/2005	29-9	Acedia	Juvenil	Úlceras cutánea dorsal	Úlceras cutánea dorsal	A	BI-10	19
a286	G256	A3-BI10	26/05/2005	29-8	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	BI-10	19
a287	G35	A3-BI10	26/05/2005	29-8	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	BI-10	19
a292	G256	A3-BI10	26/05/2005	29-7	Acedia	Juvenil	Hígado	Úlceras cutánea dorsal	A	BI-10	19
a295	G107	A3-BI10	26/05/2005	29-7	Acedia	Juvenil	Úlceras cutánea dorsal	Úlceras cutánea dorsal	A	BI-10	19
a297	G256	A3-BI10	26/05/2005	29-6	Acedia	Juvenil	Aleta anal (úlceras)	Aleta anal ulcerada	A	BI-10	19
a303	G7	A2-SE1	31/05/2005	31-1	Acedia	Alevín	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada, alteración del equilibrio (natación errática y en espiral)	A	SE-1	21
a308	G197	A3-BI10	26/05/2005	29-2	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	BI-10	19
a309	G35	A3-BI10	26/05/2005	29-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	BI-10	19
a311	G35	L4-BI5	20/05/2005	28-2	Lenguado	Adulto	Riñón	Sin síntomas externos, hígado hemorrágico	A	BI-5	19
a312	G241	L1-LA5	01/06/2005		Lenguado	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-5	20
a313	G241	L1-LA5	01/06/2005		Lenguado	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-5	20
a314	G241	L1-LA5	01/06/2005		Lenguado	Larva	Larva entera	Sin síntomas aparentes	A	LA-5	20
a316	G321	L4-BI5	30/05/2005	30-1	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloracion oscura, congestión de zona visceral, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	20
a318	G321	L4-BI5	30/05/2005	30-1	Lenguado	Adulto	Bazo	Coloracion oscura, congestión de zona visceral, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	20
a319	G321	L4-BI5	30/05/2005	30-1	Lenguado	Adulto	Riñón	Coloracion oscura, congestión de zona visceral, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	20
a320	G321	L4-BI5	20/05/2005	28-1	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloracion oscura, distension abdominal, hígado hemorrágico, bazo inflamado, ascitis	A	BI-5	19
a321	G321	L4-BI5	20/05/2005	28-2	Lenguado	Adulto	Hígado	Sin síntomas externos, hígado hemorrágico	A	BI-5	19
a328	G328	A3-SE1	08/03/2006	45-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlceras)	Aleta caudal ulcerada	A	SE1	19
a329	G321	L4-BI5	06/06/2005	34-1	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloración oscura, hígado hemorrágico	A	BI-5	21
a330	G321	L4-BI5	06/06/2005	34-1	Lenguado	Adulto	Riñón	Coloración oscura, hígado hemorrágico	A	BI-5	21
a331	G321	L4-BI5	06/06/2005	34-2	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloración oscura, hígado hemorrágico	A	BI-5	21
a332	G321	L4-BI5	06/06/2005	34-2	Lenguado	Adulto	Riñón	Coloración oscura, hígado hemorrágico	A	BI-5	21
a333	G321	L4-BI5	06/06/2005	34-3	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloración oscura, distension abdominal, hígado hemorrágico, ascitis	A	BI-5	21
a334	G321	L4-BI5	06/06/2005	34-3	Lenguado	Adulto	Riñón	Coloración oscura, distension abdominal, hígado hemorrágico, ascitis	A	BI-5	21
a335	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-1	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloración oscura, hígado hemorrágico	A	BI-5	21
a336	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-1	Lenguado	Adulto	Riñón	Coloración oscura, hígado hemorrágico	A	BI-5	21
a337	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-2	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloración oscura, hígado hemorrágico, bazo inflamado	A	BI-5	21
a338	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-2	Lenguado	Adulto	Riñón	Coloración oscura, hígado hemorrágico, bazo inflamado	A	BI-5	21
a339	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-3	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloración oscura, hígado hemorrágico, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	21
a340	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-3	Lenguado	Adulto	Bazo	Coloración oscura, hígado hemorrágico, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	21
a341	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-3	Lenguado	Adulto	Riñón	Coloración oscura, hígado hemorrágico, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	21
a342	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-4	Lenguado	Adulto	Hígado	Coloración oscura, hígado hemorrágico, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	21
a343	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-4	Lenguado	Adulto	Bazo	Coloración oscura, hígado hemorrágico, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	21

A	F	R	F	RP	SP	E	MA	S	P	TQ	T
a344	G321	L4-BI5	07/06/2005	35-4	Lenguado	Adulto	Riñón	Coloración oscura, hígado hemorrágico, bazo con granulomas blanquecinos	A	BI-5	21
a354	G321	L3-UM	07/10/2005	37-2	Lenguado	Juvenil	Hígado	Sin síntomas externos, hígado hemorrágico	C	UM	22
a356	G321	L3-UM	07/10/2005	37-3	Lenguado	Juvenil	Hígado	Sin síntomas externos, hígado hemorrágico	C	UM	22
a357	G321	L3-UM	07/10/2005	37-4	Lenguado	Juvenil	Hígado	Sin síntomas externos, hígado hemorrágico	C	UM	22
a364	G321	L3-UM	07/10/2005	37-7	Lenguado	Juvenil	Hígado	Sin síntomas externos, hígado hemorrágico	C	UM	22
a381	G328	A3-SE1	08/03/2006	45-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada	A	SE1	19
a388	G443	A3-SE1	08/03/2006	45-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada	A	SE1	19
a390	G390	A4-BI6	14/03/2006	46-1	Acedia	Adulto	Hígado	Sin síntomas aparentes	A	BI-6	14
a391	G390	A4-BI6	14/03/2006	46-1	Acedia	Adulto	Hígado	Sin síntomas aparentes	A	BI-6	14
a392	G390	A4-BI6	14/03/2006	46-1	Acedia	Adulto	Hígado	Sin síntomas aparentes	A	BI-6	14
a393	G390	A4-BI6	14/03/2006	46-1	Acedia	Adulto	Hígado	Sin síntomas aparentes	A	BI-6	14
a394	G107	A4-BI6	14/03/2006	46-1	Acedia	Adulto	Hígado	Sin síntomas aparentes	A	BI-6	14
a398	G390	A4-BI6	14/03/2006	46-2	Acedia	Adulto	Hígado	Sin síntomas aparentes	A	BI-6	14
a399	G390	A4-BI6	14/03/2006	46-2	Acedia	Adulto	Hígado	Sin síntomas aparentes	A	BI-6	14
a410	G47	L4-SE	16/03/2006	48-1	Lenguado	Adulto	Hígado	Hemorragias en zona ventral, boca y aletas dorsal y anal	A	SE	19
a415	G107	A4-BI6	20/03/2006	50-1	Acedia	Adulto	Riñón	Aleta caudal ulcerada, zona visceral inflamada, hígado con granulomas	A	BI-6	15
a417	G91	A3-MA	26/04/2006	52-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a418	G91	A3-MA	26/04/2006	52-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a419	G91	A3-MA	26/04/2006	52-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a420	G91	A3-MA	26/04/2006	52-1	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a421	G91	A3-MA	26/04/2006	52-2	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a422	G91	A3-MA	26/04/2006	52-2	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a423	G91	A3-MA	26/04/2006	52-2	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a426	G91	A3-MA	26/04/2006	52-3	Acedia	Juvenil	Aleta dorsal (úlcera)	Aleta caudal y dorsal ulceradas, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a427	G91	A3-MA	26/04/2006	52-4	Acedia	Juvenil	Hígado	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a428	G91	A3-MA	26/04/2006	52-4	Acedia	Juvenil	Hígado	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a429	G91	A3-MA	26/04/2006	52-5	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a430	G91	A3-MA	26/04/2006	52-5	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a431	G91	A3-MA	26/04/2006	52-5	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a432	G91	A3-MA	26/04/2006	52-8	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a433	G91	A3-MA	26/04/2006	52-8	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a434	G91	A3-MA	26/04/2006	52-8	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a439	G35	A3-MA	26/04/2006	52-9	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a440	G107	A3-MA	26/04/2006	52-9	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a441	G107	A3-MA	26/04/2006	52-9	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a442	G443	A3-MA	26/04/2006	52-10	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal y zona opercular ulcerada, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a443	G443	A3-MA	26/04/2006	52-10	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal y zona opercular ulcerada, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a444	G443	A3-MA	26/04/2006	52-10	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal y zona opercular ulcerada, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a445	G443	A3-MA	26/04/2006	52-10	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal y zona opercular ulcerada, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a450	G91	A3-MA	26/04/2006	52-10	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal y zona opercular ulcerada, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a451	G91	A3-MA	26/04/2006	52-10	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal y zona opercular ulcerada, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a452	G91	A3-MA	26/04/2006	52-10	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal y zona opercular ulcerada, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a455	G91	A3-MA	26/04/2006	52-4	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a456	G91	A3-MA	26/04/2006	52-4	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a457	G91	A3-MA	26/04/2006	52-6	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado hemorrágico	B	MA	22
a458	G91	A3-MA	26/04/2006	52-6	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado hemorrágico	B	MA	22
a459	G91	A3-MA	26/04/2006	52-7	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a460	G91	A3-MA	26/04/2006	52-7	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a461	G443	A3-MA	26/04/2006	52-9	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, hígado pálido (anemia)	B	MA	22
a462	G47	A3-MA	26/04/2006	52-10	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal y zona opercular ulcerada, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a467	G47	A3-MA	11/05/2006	54-1	Acedia	Juvenil	Riñón	Sin síntomas externos, hígado ligeramente hemorrágico	B	MA	22
a469	G47	L3-AR	10/05/2006	53B-2	Lenguado	Juvenil	Úlcera cutánea dorsal	Úlceras y descamación en abultamientos transversales en zona ventral y dorsal	A	AR	19
a500	G500	A2-SE1 (2)	07/08/2006	56-3	Acedia	Alevín	Hígado	Zona visceral inflamada	A	SE-1	19
a501	G500	A2-SE1 (2)	07/08/2006	56-3	Acedia	Alevín	Hígado	Zona visceral inflamada	A	SE-1	19
a502	G500	A2-SE1 (2)	07/08/2006	56-3	Acedia	Alevín	Hígado	Zona visceral inflamada	A	SE-1	19
a503	G500	A2-SE1 (2)	07/08/2006	56-3	Acedia	Alevín	Hígado	Zona visceral inflamada	A	SE-1	19
a523	G443	A3-SE1 (2)	24/01/2007	57-3	Acedia	Juvenil	Aleta caudal (úlcera)	Aleta caudal ulcerada, zona visceral inflamada	A	SE1	19
a600	G390	A4-SE	01/12/2007	62-1	Acedia	Adulto	Riñón	Úlceras en aleta caudal y rostro, alteración del equilibrio y del comportamiento	A	SE	20

A	F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	
a105	G107	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S		
a106	G91	MC	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	V	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	R	R	S	R	
a107	G107	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a108	G1	B	-	-	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	R	R	R	R	
a117	G107	B	-	+	+	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	R	S	S	S	
a118	G107	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a119	G107	B	-	+	+	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	R	S	S	S	
a126	G107	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a133	G107	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a134	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a142	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a143	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	S	S	R	
a148	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a149	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a150	G107	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S		
a152	otro	G	-	-	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	S	S	S	R		
a153	otro	G	+	-	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	+	V	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	S	S	S	R	
a154	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a155	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a156	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a157	G7	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	S	S	S	S		
a163	G7	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a164	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a165	G7	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	R	R	S	S		
a166	G107	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a167	G7	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	-	V	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	R	R	S	S	
a168	G107	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a170	G7	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	R	S	S	S	
a172	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a173	G54	AP	-	-	-	V	-	+	+	+	F	-	+	+	+	V	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	S	S	S	S	
a174	G107	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a175	G148	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	R	R	S	R	
a176	G107	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a177	G107	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a180	G185	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a184	G185	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a185	G185	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a190	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a194	G7	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a196	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a197	G197	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a199	G197	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	-	V	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a200	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a201	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a202	G1	B	-	-	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	R	R	S	R		
a203	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a204	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a206	G1	B	-	-	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	R	R	S	R		
a207	G107	B	-	+	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	S	S	S	S	
a208	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a212	G256	G	-	+	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a213	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S
a214	G7	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	S	S	S	S	
a216	G47	AB	-	-	-	F	-	+	(+)	-	O	-																															

Anexo III (continuación)

A	F	I	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41										
a227	G54	AP	-	-	-	V	-	+	+	+	F	-	+	-	-	V	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	S	S	S	S											
a230	G1	B	-	-	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S										
a233	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R										
a234	G7	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	V	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	S	S									
a237	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R									
a238	G35	G	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	R	S	S	R									
a239	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R								
a241	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R								
a242	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	R								
a243	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R							
a245	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	-	+	A	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R							
a246	otro	B	-	+	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R							
a248	G1	B	-	-	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R							
a250	G1	B	-	+	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R						
a252	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R						
a254	G256	G	-	+	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S						
a255	G255	B	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	-	-	+	V	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S						
a256	G256	G	-	+	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S					
a257	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R					
a258	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	-	+	A	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R					
a259	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R				
a260	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	-	+	A	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R				
a262	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	-	+	A	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R				
a266	G1	B	-	-	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R					
a269	G1	B	-	-	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R				
a271	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R			
a273	G7	G	-	+	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R	R	S	S				
a274	G443	AP	-	-	+	F	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	S	S	S	S					
a281	G107	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S				
a286	G256	G	-	+	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S			
a287	G35	G	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S	S	R				
a292	G256	G	-	+	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S			
a295	G107	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S			
a297	G256	G	-	+	-	B	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S		
a303	G7	G	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	A	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	R	R	S	S		
a308	G197	B	-	-	-	V	-	+	+	+	F	+	-	-	+	V	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S			
a309	G35	G	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S	S	R		
a311	G35	G	-	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S	S	R		
a312	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R		
a313	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	R	R		
a314	G241	B	+	-	-	B	-	+	+	+	F	-	+	+	+	A	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	R		
a316	G321	G	-	-	+	B	-	+	+	+	F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S		
a318	G321	G	-	-	+	B	-	+	+	+	F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	
a319	G321	G	-	-	+	B	-	+	+	+	F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S	
a320	G321	G	-	-	+	B	-	+	+	+	F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S
a321	G321	G	-	-	+	B	-	+	+	+	F	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S	S	S	S
a328	G328	B	-	-	-	B	-	+	+	+	O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	S	S	
a329	G321	G	-	-	+	B	-	+	+	+	F	+	-	-	-	-	-	+	-	-																																

ANEXO IV. Perfiles de utilización de fuentes de carbono con el sistema BIOLOG.

Fuente de carbono	Fenon G1		Fenon G7	Fenon G29	Fenon G35		Fenon G91					
	a220	a250	a7	a29	a6	a35	a8	a9	a10	a20	a26	a30
A2	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
A3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
A4	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
A5	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
A6	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
A7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A8	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
A9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A11	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A12	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
B1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B5	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
B6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B10	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
B11	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
B12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-
C8	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
C9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D7	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
D8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D9	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
D10	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
E7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E12	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
F1	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+
F2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
F4	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
F5	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F6	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
F7	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
F8	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
F9	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
F10	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
F11	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
F12	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
G1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G6	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
G7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G8	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
G9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G10	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
G11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
H3	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
H4	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H9	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-
H10	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
H11	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
H12	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+

Fuente de carbono	Fenon G91										Fenon G107	Fenon G148
	a82	a87	a91	a102	a106	a417	a421	a426	a428	a459	a107	a148
A2	α-ciclodextrina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A3	Dextrina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A4	Glicógeno	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
A5	Tween 40	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+
A6	Tween 80	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
A7	N-acetil-D-galactosamina	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
A8	N-acetil-D-glucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
A9	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A10	L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
A11	D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A12	D-celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B1	i-eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B3	L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	D-galactosa	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+
B5	Gentiobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	α-D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B7	m-inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B8	α-D-lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B9	Lactulosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B10	Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B11	D-manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
B12	D-manosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C1	D-melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	β-metil-D-glucosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	D-psicosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
C4	D-rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	L-ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	D-sorbitol	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
C7	Sacarosa	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	D-trehalosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	Turanosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	Metil piruvato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C12	Mono-metil-succinato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
D1	Ácido acético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D2	Ácido cis-aconítico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D3	Ácido cítrico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D4	Ácido fórmico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D5	Lactona de ácido D-galactónico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D6	Ácido D-galacturónico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D7	Ácido D-glucónico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D8	Ácido D-glucosaminico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D9	Ácido D-glucurónico	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
D10	Ácido α-hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D11	Ácido β-hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D12	Ácido γ-hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	Ácido p-hidroxi-fenilacético	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	Ácido itacónico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E3	Ácido α-ceto butírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E4	Ácido α-ceto glutárico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E5	Ácido α-ceto valérico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E6	Ácido D,L-láctico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
E7	Ácido malónico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E8	Ácido propiónico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
E9	Ácido quínico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E10	Ácido D-sacárico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E11	Ácido sebácico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E12	Ácido succínico	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+
F1	Ácido bromo-succínico	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
F2	Ácido succinámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F3	Glucuronamida	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
F4	L-alaninamida	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
F5	D-alanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
F6	L-alanina	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
F7	L-alanil-glicina	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+
F8	L-asparagina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F9	Ácido L-aspartico	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+
F10	Ácido L-glutámico	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
F11	Ácido glicil-L-aspartico	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
F12	Ácido glicil-L-glutámico	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
G1	L-histidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
G2	Hidroxi-L-prolina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
G3	L-leucina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G4	L-ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G5	L-fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G6	L-prolina	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
G7	Ácido L-piroglutámico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G8	D-serina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G9	L-serina	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+
G10	L-treonina	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G11	D,L-carnitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G12	Ácido γ-aminobutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H1	Ácido urocánico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	Inosina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H3	Uridina	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+
H4	Timidina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H5	Fenietilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	Putrescina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H7	2-aminoetanol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H8	2,3-butanodiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H9	Glicerol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
H10	D,L-α-glicerol fosfato	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
H11	Glucosa-1-fosfato	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
H12	Glucosa-6-fosfato	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Fuente de carbono	Fenon G197	Fenon G241	Fenon G255			Fenon G256	Fenon G321	Fenon G328
	a197	a241	a200	a201	a255	a256	a321	a328
A2	α-ciclodextrina	-	+	+	+	-	-	-
A3	Dextrina	+	+	+	+	+	+	+
A4	Glicógeno	+	+	+	+	-	-	+
A5	Tween 40	-	+	-	-	-	+	+
A6	Tween 80	-	+	-	+	-	-	+
A7	N-acetil-D-galactosamina	+	-	-	-	-	-	-
A8	N-acetil-D-glucosamina	+	+	+	+	+	-	-
A9	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-
A10	L-arabinosa	-	-	-	-	-	-	-
A11	D-arabitol	-	-	-	-	-	-	-
A12	D-celobiosa	-	-	-	-	+	+	-
B1	i-eritritol	-	-	-	-	-	-	-
B2	D-fructosa	+	+	+	+	+	+	-
B3	L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-
B4	D-galactosa	+	-	+	+	+	-	-
B5	Gentiobiosa	-	-	-	-	-	-	-
B6	α-D-glucosa	+	+	+	+	+	+	-
B7	m-inositol	-	-	-	-	-	-	-
B8	α-D-lactosa	-	-	-	-	-	-	-
B9	Lactulosa	-	-	-	-	-	-	-
B10	Maltosa	+	+	+	+	+	-	-
B11	D-manitol	+	+	-	-	-	-	-
B12	D-manosa	+	-	-	-	+	+	-
C1	D-melibiosia	-	-	-	-	-	-	-
C2	β-metil-D-glucosido	-	-	+	+	+	-	-
C3	D-psicosa	-	+	-	-	-	-	-
C4	D-rafinosa	-	-	-	-	-	-	-
C5	L-ramosa	-	-	-	-	-	-	-
C6	D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-
C7	Sacarosa	-	+	-	-	+	-	-
C8	D-trehalosa	+	+	+	+	+	-	-
C9	Turanosa	-	-	-	-	-	-	-
C10	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-
C11	Metil piruvato	-	+	-	-	-	-	+
C12	Mono-metil-succinato	-	+	-	-	-	-	-
D1	Ácido acético	-	+	-	-	-	-	-
D2	Ácido cis-aconítico	-	-	-	-	-	-	-
D3	Ácido cítrico	-	-	-	-	-	-	-
D4	Ácido fórmico	-	-	-	-	-	-	-
D5	Lactona de ácido D-galactónico	+	-	-	-	-	-	-
D6	Ácido D-galacturónico	-	-	-	-	-	-	-
D7	Ácido D-glucónico	-	+	-	-	-	-	-
D8	Ácido D-glucosaminico	-	-	-	-	-	-	-
D9	Ácido D-glucurónico	-	-	+	+	+	-	-
D10	Ácido α-hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-
D11	Ácido β-hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-
D12	Ácido γ-hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-
E1	Ácido p-hidroxi-fenilacético	-	-	-	-	-	-	-
E2	Ácido itacónico	-	-	-	-	-	-	-
E3	Ácido α-ceto butírico	-	-	-	-	-	-	-
E4	Ácido α-ceto glutárico	-	-	-	-	-	-	-
E5	Ácido α-ceto valérico	-	-	-	-	-	-	+
E6	Ácido D,L-láctico	+	+	-	-	+	-	-
E7	Ácido malónico	-	-	-	-	-	-	-
E8	Ácido propiónico	-	+	-	-	-	-	-
E9	Ácido quínico	-	-	-	-	-	-	-
E10	Ácido D-sacárico	-	-	-	-	-	-	-
E11	Ácido sebácico	-	-	-	-	-	-	-
E12	Ácido succínico	+	+	-	-	-	-	-
F1	Ácido bromo-succínico	-	+	-	+	-	-	-
F2	Ácido succinámico	-	-	-	-	-	-	-
F3	Glucuronamida	-	-	-	-	-	-	-
F4	L-alaninamida	-	-	-	-	-	-	-
F5	D-alanina	-	+	-	-	-	-	-
F6	L-alanina	+	+	-	+	-	-	-
F7	L-alanil-glicina	+	+	-	-	+	-	-
F8	L-asparagina	-	+	-	-	+	-	-
F9	Ácido L-aspártico	+	+	-	-	+	-	-
F10	Ácido L-glutámico	+	+	-	-	+	-	-
F11	Ácido glicil-L-aspártico	+	-	-	-	+	-	-
F12	Ácido glicil-L-glutámico	-	+	-	-	+	-	-
G1	L-histidina	-	+	-	-	-	-	-
G2	Hidroxi-L-prolina	-	+	-	+	-	-	-
G3	L-leucina	-	-	-	-	-	-	-
G4	L-ornitina	-	-	-	-	-	-	-
G5	L-fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-
G6	L-prolina	+	+	-	+	+	-	-
G7	Ácido L-piroglutámico	-	-	-	-	-	-	-
G8	D-serina	-	-	-	-	-	-	-
G9	L-serina	+	+	-	-	-	-	-
G10	L-treonina	+	+	-	-	+	-	-
G11	D,L-carnitina	-	-	-	-	-	-	-
G12	Ácido γ-aminobutírico	-	-	-	-	-	-	-
H1	Ácido urocánico	-	-	+	-	-	-	-
H2	Inosina	+	+	+	+	+	-	-
H3	Uridina	+	+	-	-	-	+	-
H4	Timidina	+	+	-	-	-	+	-
H5	Fenietilamina	-	-	-	-	-	-	-
H6	Putrescina	-	-	-	-	-	-	-
H7	2-aminoetanol	-	+	-	-	-	-	-
H8	2,3-butanodiol	-	-	-	-	-	-	-
H9	Glicerol	-	+	-	+	+	-	-
H10	D,L-α-glicerol fosfato	-	-	-	-	-	+	-
H11	Glucosa-1-fosfato	-	-	-	-	-	-	-
H12	Glucosa-6-fosfato	+	+	-	-	-	-	-

Fuente de carbono	Fenon G390						<i>P. damselae</i> subsp. <i>damselae</i> CECT 626	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. fluorescens</i> CECT 378	<i>P. putida</i> CECT 385
	a390	a391	a393	a398	a399	a600				
A2	α-ciclodextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A3	Dextrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A4	Glicógeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A5	Tween 40	+	+	+	+	+	-	+	+	+
A6	Tween 80	+	+	+	+	+	-	+	+	+
A7	N-acetil-D-galactosamina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A8	N-acetil-D-glucosamina	+	+	+	+	+	+	+	+	-
A9	Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-
A10	L-arabinosa	+	+	+	+	+	-	-	+	+
A11	D-arabitol	+	+	+	+	+	-	-	+	-
A12	D-celobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B1	i-eritritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	D-fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B3	L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B4	D-galactosa	+	+	+	+	+	+	-	+	+
B5	Gentiobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B6	α-D-glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B7	m-inositol	-	-	-	-	-	-	-	+	-
B8	α-D-lactosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B9	Lactulosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B10	Maltosa	-	-	-	-	-	+	-	-	-
B11	D-manitol	+	+	+	+	+	-	+	+	-
B12	D-manosa	+	+	+	+	+	+	-	+	-
C1	D-melibiosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C2	β-metil-D-glucosido	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C3	D-psicosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C4	D-rafinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C5	L-ramnosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C6	D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C7	Sacarosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C8	D-trehalosa	-	-	-	-	-	-	-	+	-
C9	Turanosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C10	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C11	Metil piruvato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C12	Mono-metil-succinato	-	+	+	-	+	-	+	-	-
D1	Ácido acético	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D2	Ácido cis-aconítico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D3	Ácido cítrico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D4	Ácido fórmico	-	-	-	-	-	-	+	-	+
D5	Lactona de ácido D-galactónico	+	+	+	+	+	-	-	+	+
D6	Ácido D-galacturónico	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D7	Ácido D-glucónico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D8	Ácido D-glucosaminico	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D9	Ácido D-glucurónico	-	-	-	-	-	-	-	+	+
D10	Ácido α-hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	+	+	+
D11	Ácido β-hidroxibutírico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D12	Ácido γ-hidroxibutírico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E1	Ácido p-hidroxifenilacético	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E2	Ácido itacónico	-	-	-	-	+	-	+	+	+
E3	Ácido α-ceto butírico	-	-	-	-	-	-	+	+	-
E4	Ácido α-ceto glutárico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
E5	Ácido α-ceto valérico	-	-	-	-	-	-	+	-	+
E6	Ácido D,L-láctico	+	+	+	+	+	+	+	+	+
E7	Ácido malónico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
E8	Ácido propiónico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
E9	Ácido quínico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
E10	Ácido D-sacárico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
E11	Ácido sebácico	-	-	-	-	-	-	+	-	-
E12	Ácido succínico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
F1	Ácido bromo-succínico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
F2	Ácido succinámico	-	-	-	-	-	+	+	-	-
F3	Glucuronamida	-	-	-	-	-	-	-	+	+
F4	L-alaninamida	-	-	-	-	+	-	-	-	-
F5	D-alanina	+	+	+	+	+	-	+	+	+
F6	L-alanina	+	+	+	+	+	-	+	+	+
F7	L-alanil-glicina	+	+	+	+	+	-	+	+	+
F8	L-asparagina	+	+	+	+	+	-	+	+	+
F9	Ácido L-aspartico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
F10	Ácido L-glutámico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
F11	Ácido glicil-L-aspartico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F12	Ácido glicil-L-glutamico	-	-	-	-	-	-	+	+	-
G1	L-histidina	-	+	+	+	+	-	+	+	+
G2	Hidroxil-L-prolina	-	-	-	-	-	-	+	-	+
G3	L-leucina	+	+	+	+	+	-	+	+	+
G4	L-ornitina	-	-	-	-	-	-	+	+	+
G5	L-fenilalanina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G6	L-prolina	+	+	+	+	+	-	+	+	+
G7	Ácido L-piroglutámico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
G8	D-serina	-	-	-	-	-	-	-	-	+
G9	L-serina	+	+	+	+	+	-	+	+	+
G10	L-treonina	-	+	+	+	+	-	+	+	+
G11	D,L-carnitina	-	-	-	-	-	-	+	+	+
G12	Ácido γ-aminobutírico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
H1	Ácido urocánico	+	+	+	+	+	-	+	+	+
H2	Inosina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H3	Uridina	+	+	+	+	+	+	+	+	-
H4	Timidina	-	-	-	-	-	+	-	-	-
H5	Fenietilamina	-	-	-	-	-	-	-	-	+
H6	Putrescina	-	+	+	+	+	-	+	+	+
H7	2-aminoetanol	-	+	+	+	+	-	+	+	+
H8	2,3-butanodiol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H9	Glicerol	+	+	+	+	+	-	+	+	+
H10	D,L-α-glicerol fosfato	-	-	-	-	-	-	-	+	-
H11	Glucosa-1-fosfato	-	-	-	-	-	+	-	-	-
H12	Glucosa-6-fosfato	-	-	-	-	-	+	-	+	-

Fuente de carbono	<i>V. alginolyticus</i> CECT 436	<i>V. alginolyticus</i> CECT 521	<i>V. harveyi</i> CECT 5156	<i>V. harveyi</i> CECT 525	<i>V. parahaemolyticus</i> CECT 511	<i>V. tapetis</i> CECT 4600
A2	α-ciclodextrina	+	+	+	-	+
A3	Dextrina	+	+	+	+	+
A4	Glicógeno	+	+	+	+	+
A5	Tween 40	+	+	-	-	-
A6	Tween 80	-	+	-	+	-
A7	N-acetil-D-galactosamina	-	-	+	+	-
A8	N-acetil-D-glucosamina	+	+	+	+	+
A9	Adonitol	-	-	-	-	-
A10	L-arabinosa	-	-	-	+	-
A11	D-arabitol	-	-	-	-	-
A12	D-celobiosa	+	+	+	+	-
B1	i-eritritol	-	-	-	-	-
B2	D-fructosa	+	+	+	+	+
B3	L-fucosa	-	-	-	-	-
B4	D-galactosa	-	-	-	+	+
B5	Gentiobiosa	-	-	-	-	-
B6	α-D-glucosa	-	-	+	+	+
B7	m-inositol	-	-	-	-	-
B8	α-D-lactosa	-	-	-	-	-
B9	Lactulosa	-	-	-	-	-
B10	Maltosa	+	+	+	+	-
B11	D-manitol	+	+	+	+	-
B12	D-manosa	-	+	+	+	+
C1	D-melibiosa	-	-	-	-	-
C2	β-metil-D-glucosido	-	-	-	+	+
C3	D-psicosa	-	-	-	-	-
C4	D-rafinosa	-	-	-	-	-
C5	L-ramnosa	-	-	-	-	-
C6	D-sorbitol	-	-	+	-	-
C7	Sacarosa	+	+	+	-	-
C8	D-trehalosa	+	+	+	+	+
C9	Turanosa	-	-	-	-	-
C10	Xylitol	-	-	-	-	-
C11	Metil piruvato	-	+	-	-	-
C12	Mono-metil-succinato	+	+	-	-	-
D1	Ácido acético	-	-	-	-	-
D2	Ácido cis-aconítico	-	-	-	-	-
D3	Ácido cítrico	-	-	-	-	-
D4	Ácido fórmico	-	-	-	-	-
D5	Lactona de ácido D-galactónico	-	-	-	-	-
D6	Ácido D-galacturónico	-	-	-	-	-
D7	Ácido D-glucónico	+	-	+	+	+
D8	Ácido D-glucosamínico	-	-	-	-	-
D9	Ácido D-glucurónico	-	-	+	+	+
D10	Ácido α-hidroxi-butírico	-	-	-	-	-
D11	Ácido β-hidroxi-butírico	-	-	-	-	-
D12	Ácido γ-hidroxi-butírico	-	-	-	-	-
E1	Ácido p-hidroxi-fenilacético	-	-	-	-	-
E2	Ácido itacónico	-	-	-	-	-
E3	Ácido α-ceto butírico	-	-	-	-	-
E4	Ácido α-ceto glutárico	-	-	-	-	-
E5	Ácido α-ceto valérico	-	-	-	-	-
E6	Ácido D,L-láctico	+	+	+	+	-
E7	Ácido malónico	-	-	-	-	-
E8	Ácido propiónico	+	+	-	-	-
E9	Ácido quínico	-	-	-	-	-
E10	Ácido D-sacárico	-	-	-	-	-
E11	Ácido sebácico	-	-	-	-	-
E12	Ácido succínico	+	+	+	-	-
F1	Ácido bromo-succínico	-	+	+	+	-
F2	Ácido succinámico	-	-	-	-	-
F3	Glucuronamida	-	-	-	+	-
F4	L-alaninamida	+	+	+	-	-
F5	D-alanina	+	+	-	-	-
F6	L-alanina	+	+	+	+	-
F7	L-alanil-glicina	+	+	+	+	-
F8	L-asparagina	+	+	-	+	-
F9	Ácido L-aspártico	+	+	-	+	+
F10	Ácido L-glutámico	+	+	+	+	-
F11	Ácido glicil-L-aspártico	+	+	-	+	-
F12	Ácido glicil-L-glutámico	+	+	-	+	-
G1	L-histidina	+	+	-	-	-
G2	Hidroxi-L-prolina	+	+	-	+	-
G3	L-leucina	-	-	-	-	-
G4	L-ornitina	-	-	-	-	-
G5	L-fenilalanina	-	-	-	-	-
G6	L-prolina	+	+	-	+	-
G7	Ácido L-piroglutámico	-	-	-	-	-
G8	D-serina	-	-	-	-	-
G9	L-serina	+	+	+	-	-
G10	L-treonina	+	-	+	+	-
G11	D,L-carnitina	-	-	-	-	-
G12	Ácido γ-aminobutírico	-	-	-	-	-
H1	Ácido urocánico	-	-	-	-	-
H2	Inosina	+	+	+	+	+
H3	Uridina	+	+	-	+	-
H4	Timidina	+	+	-	-	-
H5	Fenietilamina	-	-	-	-	-
H6	Putrescina	-	-	-	-	-
H7	2-aminoetanol	-	-	-	-	-
H8	2,3-butanodiol	-	-	-	-	-
H9	Glicerol	+	+	-	-	-
H10	D,L-α-glicerol fosfato	+	+	-	-	-
H11	Glucosa-1-fosfato	+	+	+	+	-
H12	Glucosa-6-fosfato	+	+	+	+	-

ANEXO VI. Secuencias obtenidas en este trabajo.

A	F	ADNr 16S	23S ADNr	ITS1	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
a1	G1	FN432922				
a3	otro	FN433001		FN646563		
a5	G1	FN432923				
a6	G35	FN432940				
a7	G7	FN432929				
a8	G91	FN432955				
a9	G91	FM162399		FN646577		
a10	G91	FN432956	FN551187	FN646578		
a11	G47	EU669862	FR734189	FN646547, FN646548		
a14	G29	FN432937				
a20	G91	FM162400	FM956003	FN646579		
a26	G91		FM956004	FN646580		
a27	G35	FN432941				
a29	G29	FN432938	FR734205			
a30	G91		FM956005	FN646581		
a32	G35	FN432942				
a33	G35	FN432943				
a35	G35	FN432944				
a36	G35	FN432945				
a42	otro	FN433007				
a47	G47	AM989478	FR734190	FN646550, FN646549		
a50	G47	AM989479	FR734191	FN646554		
a51	G29	FN432939				
a52	G35	FN432946				
a54	G54	FN432953				
a81	G241	FN432977				
a82	G91	FM162401	FM956006	FN646582, FN646583		
a85	G35	FN432947				
a87	G91	FM162402				
a90	G7	FN432930				
a91	G91	FM162398	FM956007	FN646584		
a92	G35	FN432948				
a97	G35	FN432952				
a100	G35	FN432949				
a101	G35	FN432950				
a102	G91	FM162403				
a106	G91	FM162404	FM956008	FN646585, FN646586, FN646587		
a107	G107	FN432960				
a108	G1	FN432924				
a118	G107	FN432961				
a119	G107	FN432962				
a134	G148	FN432966				
a142	G148	FN432969				
a143	G148	FN432970				
a148	G148	FN432971				
a149	G148	FN432972				
a150	G107	FN432959				
a152	otro	FN433008				
a153	otro	FN433009				
a154	G148	FN432973				
a155	G148	FN432967				
a156	G148	FN432968				
a157	G7	FN432931				
a163	G7	FN432932				
a165	G7	FN432933				
a166	G107	FN432963				
a167	G7	FN432934				
a168	G107	FN432964				
a174	G107	FN432965				
a185	G185	FN432974	FR734213			
a190	G255	FN432995				
a197	G197	FN432976	FR734214			
a199	G197	FN432975				
a201	G255	FM180013	FR734209			
a216	G47	AM989480	FR734192	FN646551		
a220	G1	FN432925				
a221	G241	FN432979				
a227	G54	FN432954				
a233	G241	FN432980				
a234	G7	FN432935				
a237	G241	FN432981				
a239	G241	FN432982				
a241	G241	FN432983	FR734207			
a242	G241	FN432978				
a243	G241	FN432984				
a245	G241	FN432985				
a246	otro	FN433002				
a250	G1	FN432926				
a254	G256	FN432996				
a255	G255	FM180014	FR734211			
a256	G256	FN432997	FR734206			
a257	G241	FN432986				
a258	G241	FN432987				
a259	G241	FN432988				
a260	G241	FN432989				
a262	G241	FN432990				
a266	G1	FN432927				

A	F	ADNr 16S	23S ADNr	ITS1	<i>gyrB</i>	<i>rpoD</i>
a269	G1	FN432928				
a271	G241	FN432991				
a273	G7	FN432936				
a274	G443		FR734197	FN646558		
a286	G256	FN432998				
a311	G35	FN432951				
a312	G241	FN432992				
a313	G241	FN432993				
a314	G241	FN432994				
a316	G321		FN551188	FN646574		
a319	G321	FN432999	FN551189	FN646575		
a321	G321	FN433000	FN551190	FN646576		
a328	G328	FN433003	FR734203	FN646572		
a381	G328	FN433004	FR734204	FN646573		
a388	G443	EU623455	FR734198	FN646559		
a390	G390	FM201274	FN551198	FN646567	FM201278	FN678357
a391	G390	FM201275	FN551197	FN646568	FM201279	FN678358
a393	G390	FN678353	FN551196	FN646569		
a398	G390	FM201276	FN551195	FN646570		
a399	G390	FM201277	FN551194	FN646571		
a410	G47	AM989482	FR734193	FN646553, FN646552		
a417	G91		FM956009	FN646588		
a421	G91		FM956010	FN646589		
a443	G443	EU623456	FR734199	FN646560		
a459	G91			FN646590		
a461	G443		FR734200	FN646561		
a462	G47	FR734188	FR734194	FN646555		
a467	G47	AM989481	FR734195	FN646556		
a469	G47	AM989483	FR734196	FN646557		
a500	G500	FN433005				
a502	G500	FN433006	FR734202	FN646565		
a523	G443		FR734201	FN646562		
<i>Pseudomonas</i> <i>anguilliseptica</i> CECT 899			FN551193	FN646566		
<i>Pseudomonas</i> <i>fluorescens</i> CECT 378			FN551192			
<i>Pseudomonas putida</i> CECT 385			FN551191			
<i>Tenacibaculum</i> <i>ovolyticum</i> LMG 13025			FN551199	FN646564		
<i>Vibrio campbellii</i> CECT 523			FN551184			
<i>Vibrio harveyi</i> CECT 525			FN551185			
<i>Vibrio harveyi</i> CECT 5156			FN551186			

ANEXO VII. Porcentajes de identidad obtenidos utilizando el programa BLAST.

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad				
VI-1	G1	a220 (759 pb)	16S ARNr	<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	IAM-GA 0812	100				
				<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>	KMM 3549	100				
				<i>Pseudoalteromonas haloplanktis subsp. tetraodonis</i>	IAM 14160	100				
				<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	KMM 255	99				
				<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i>	KMM 3548	99				
				<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	IAM 12927	99				
				<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	ATCC 12662	99				
				<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	NCIMB 8614	99				
				<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	CIP 105339	98				
				<i>Pseudoalteromonas aliena</i>	KMM 3562	98				
				<i>Pseudoalteromonas undina</i>	NCIMB 2128T	98				
				<i>Pseudoalteromonas antarctica</i>	CECT 4664	98				
				<i>Pseudoalteromonas translucida</i>	KMM520	98				
				<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	NCIMB 2033	98				
				<i>Moritella marina</i>	ATCC 15831T	99				
				<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	KMM 3635	98				
				<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	NCIMB 645	97				
				<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	ATCC 29570	98				
				<i>Pseudoalteromonas maricaloris</i>	KMM 636	97				
				<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	NCIMB 1893	97				
				<i>Pseudoalteromonas aurantia (P. flavipulchra)</i>	ATCC 33046	97				
				<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	KMM 300	97				
				<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	ATCC 43337T	93				
				<i>Shewanella waksmanii</i>	KMM 3823	93				
				VI-2	G1	a250 (763pb)	16S ARNr	<i>Pseudoalteromonas mariniglutinosa</i>	KMM 3635	99
								<i>Pseudoalteromonas byunsanensis</i>	FR 1199	98
								<i>Pseudoalteromonas aliena</i>	KMM 3562	97
								<i>Pseudoalteromonas elyakovii</i>	IAM-GA 0812	97
								<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i>	KMM 3549	97
								<i>Pseudoalteromonas haloplanktis subsp. tetraodonis</i>	IAM 14160	97
								<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	KMM 216	97
								<i>Pseudoalteromonas citrea</i>	CIP 105339	97
								<i>Pseudoalteromonas agarivorans</i>	KMM 255	97
<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i>	KMM 3548	97								
<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	IAM 12927	97								
<i>Pseudoalteromonas espejana</i>	NCIMB 2127T	97								
<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i>	NCIMB 2033	97								
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	NCIMB 645	97								
<i>Pseudoalteromonas luteoviolacea</i>	NCIMB 1893	97								
<i>Pseudoalteromonas aurantia (P. flavipulchra)</i>	ATCC 33046	97								
<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i>	NCIMB 8614	97								
<i>Pseudoalteromonas carrageenovora</i>	ATCC 8614	97								
<i>Pseudoalteromonas maricaloris</i>	KMM 636	97								
<i>Pseudoalteromonas antarctica</i>	CECT 4664	97								
<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	ATCC 29570	97								
<i>Pseudoalteromonas translucida</i>	KMM 520	97								
<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	ATCC 15057	97								
<i>Moritella marina</i>	ATCC 15831T	96								
<i>Pseudoalteromonas undina</i>	NCIMB 2128T	96								
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	KMM 300	96								
<i>Pseudoalteromonas denitrificans</i>	ATCC 43337T	94								
<i>Shewanella waksmanii</i>	KMM 3823	93								
VI-3	G7	a7 (1077pb)	16S ARNr					<i>Vibrio crassostreae</i>	CAIM 1405	99
								<i>Vibrio gigantis</i>	CAIM 25	99
								<i>Vibrio pomeroyi</i>	CAIM 578	98
								<i>Vibrio splendidus</i> biovar II	ATCC 33789	98
								<i>Vibrio chagasii</i>	DSM 17138 T	98
				<i>Vibrio gallaecicus</i>	CECT 7244	98				
				<i>Vibrio splendidus</i>	ATCC 33125T	98				
				<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	LMG 21359	98				
				<i>Vibrio kanaloae</i>	LMG 20539T	98				
				<i>Vibrio lentus</i>	CIP 107166T	98				
				<i>Vibrio tasmaniensis</i>	LMG 21574T	97				
				<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC 35048T	97				
				<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203T	97				
				<i>Listonella anguillarum</i>	NCMB 6	97				
				<i>Vibrio ordalii</i>	NCMB 2168	97				
				<i>Vibrio ichthyenteri</i>	DSM 14397T	97				
				<i>Vibrio pacinii</i>	LMG 19999	97				
				<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21566	96				
				<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562T	96				
				<i>Vibrio scopthalmi</i>	CECT 4638	96				
				<i>Vibrio orientalis</i>	ATCC 33934T	96				
				<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085T	96				
				<i>Vibrio metschnikovii</i>	CIP 6914T	96				

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad				
VI-4	G29	a29 (1049)	16S ARNr	<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21562	97				
				<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085T	97				
				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802T	97				
				<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362	97				
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749T	97				
				<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 7466	97				
				<i>Vibrio rotiferianus</i>	CAIM 576	97				
				<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920T	97				
				<i>Vibrio furnissii</i>	ATCC 35016T	97				
				<i>Vibrio fluvialis</i>	NCTC 11327T	97				
				<i>Vibrio diabolicus</i>	HE 800 T	97				
				<i>Vibrio gallicus</i>	LMG 21330	97				
				<i>Vibrio litoralis</i>	MANO 22D	97				
				<i>Listonella pelagia</i>	ATCC 25916T	97				
				<i>Allomonas enterica</i>	LMG 21754	97				
				<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126T	97				
				<i>Vibrio nereis</i>	ATCC 25917T	97				
				<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC 15338	96				
				<i>Vibrio ordalii</i>	NCMB 2168	96				
				<i>Listonella anguillarum</i>	NCMB 6	96				
				<i>Vibrio corallilyticus</i>	LMG 21349	96				
				<i>Vibrio neptunius</i>	LMG 20536	96				
				<i>Vibrio pectenicida</i>	IFREMER A365	96				
				<i>Vibrio hispanicus</i>	LMG 13211	96				
				<i>Vibrio tasmaniensis</i>	LMG 21574T	96				
				<i>Vibrio breoganii</i>	LMG 23858	96				
				<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	LMG 7905	96				
				<i>Vibrio kanaloae</i>	LMG 20539T	96				
				<i>Aliivibrio fischeri</i>	ATCC 7744T	96				
				VI-5	G35	a35 (753pb)	16S ARNr	<i>Vibrio rotiferianus</i>	CAIM 576	99
								<i>Vibrio campbellii</i>	CAIM 521	99
								<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 7466	99
								<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920T	99
								<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802T	99
								<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749T	99
								<i>Listonella pelagia</i>	ATCC 25916T	99
								<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC 15338	99
<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC14126T	99								
<i>Vibrio diabolicus</i>	HE 800	98								
<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085T	98								
<i>Vibrio haliotocoli</i>	IAM 1459	97								
<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21562	97								
<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362	97								
<i>Vibrio breoganii</i>	LMG 23858	97								
<i>Vibrio litoralis</i>	MANO22P	97								
<i>Vibrio gallicus</i>	CIP 107864	97								
<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546	97								
<i>Allomonas enterica</i>	LMG 21754	97								
<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	DSM 14397T	97								
<i>Vibrio furnissii</i>	ATCC 35016T	97								
<i>Vibrio fluvialis</i>	NCTC 11327T	97								
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 29307	97								
<i>Vibrio scophthalmi</i>	A089	97								
<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562T	96								
<i>Vibrio xuii</i>	LMG 21347	97								
<i>Photobacterium angustum</i>	ATCC 33975	96								
<i>Vibrio penaeicida</i>	DSM 14398T	96								
<i>Vibrio corallilyticus</i>	LMG 21349	96								
<i>Vibrio navarrensis</i>	CIP 103381T	96								
<i>Vibrio hispanicus</i>	LMG 13211	96								
<i>Vibrio diazotrophicus</i>	ATCC 33466	96								
<i>Vibrio sinaloensis</i>	CAIM 695	96								
<i>Vibrio neptunius</i>	LMG 20536	96								
VI-6	G47	a47 (1407pb)	16S ARNr					<i>Tenacibaculum soleae</i>	NCIMB 14368 T	98
								<i>Tenacibaculum adriaticum</i>	DSM 18961 T	96
								<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	DSM 18841 T	95
				<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	LMG 24004 T	96				
				<i>Flexibacter aurantiacus</i> subsp. <i>copepodarum</i>	IFO 15978	95				
				<i>Tenacibaculum discolor</i>	DSM 18842 T	96				
				<i>Tenacibaculum litoreum</i>	KCCM 42115 T	96				
				<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	IFO 15947 T	95				
				<i>Tenacibaculum crassostreae</i>	JCM 15428 T	95				
				<i>Tenacibaculum aestuarii</i>	KCTC 12569 T	95				
				<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	MBIC 1140 T	95				
				<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	KCTC 12302	95				
				<i>Tenacibaculum skagerrakense</i>	ATCC BAA-458 T	94				
				<i>Tenacibaculum amyolyticum</i>	MBIC 4355 T	94				
				<i>Tenacibaculum litopenaei</i>	LMG 23706 T	94				
				<i>Tenacibaculum maritimum</i>	IFO 15946 T	94				
				<i>Polaribacter dokdonensis</i>	DSM 17204 T	92				

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad
VI-7	G54	a54 (1149pb)	16S ARNr	<i>Aliivibrio finisterrensis</i>	CECT 7228T	98
				<i>Aliivibrio fischeri</i>	ATCC 7744T	97
				<i>Aliivibrio fischeri</i>	ATCC 25918	97
				<i>Aliivibrio fischeri</i>	ATCC 33715	97
				<i>Aliivibrio wodanis</i>	ATCC 15382	97
				<i>Aliivibrio logei</i>	NCIMB 2252	97
				<i>Vibrio gallicus</i>	CIP 107867	96
				<i>Vibrio superstes</i>	LMG 21323	96
				<i>Vibrio comitans</i>	GHG2-1	96
				<i>Vibrio chagasii</i>	LMG 13237	96
				<i>Vibrio splendidus</i> biovar II	ATCC 33789	96
				<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21562	95
				<i>Vibrio halioticoli</i>	IAM 1459	95
				<i>Vibrio crassostreae</i>	CAIM 1405	95
			<i>Aliivibrio salmonicida</i>	NCMB 2262	95	
VI-8	G91	a91 (1409pb)	16S ARNr	<i>Vibrio carchariae</i> (<i>V. harveyi</i>)	ATCC 35084T	98
				<i>Vibrio harveyi</i>	LMG4404T	99
				<i>Vibrio trachuri</i> (<i>V. harveyi</i>)	LMG 19643T	98
				<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126T	98
				<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920T	98
				<i>Vibrio rotiferianus</i>	LMG 21460T	98
				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210633	98
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	CECT 609	98
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749T	97
				<i>Vibrio natriegens</i>	ATCC 14048T	97
				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802T	97
				<i>Listonella pelagia</i>	ATCC 25916T	97
				<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546T	96
				<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21562	96
				<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362T	96
				<i>Vibrio gallicus</i>	LMG 21330T	96
				<i>Vibrio nigripulchritudo</i>	ATCC 27043T	96
				<i>Vibrio sinaloensis</i>	CAIM 797T	96
				<i>Vibrio halioticoli</i>	IAM 14599	96
				<i>Vibrio diabolicus</i>	HE800T	97
				<i>Vibrio hispanicus</i>	LMG 13211	96
				<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC 15338T	96
				<i>Vibrio corallilyticus</i>	LMG 21349	95
				<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085T	95
<i>Vibrio neptunius</i>	LMG 20536T	95				
VI-9	G91	a91 (425pb)	23S ARNr	<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC BAA-1116	99
				<i>Vibrio campbellii</i>	CECT 523	99
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	PD2	93
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 19108	92
				<i>Aliivibrio fischeri</i>	ES 114	92
				<i>Vibrio mediterranei</i>	CECT 621 T	91
				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	RIMD 2210633	90
				<i>Listonella pelagia</i>	CECT 4202 T	90
				<i>Vibrio lentus</i>	CECT 5110 T	90
				<i>Vibrio splendidus</i>	CECT 4204	89
				<i>Vibrio navarrensis</i>	CIP 103381 T	88
				<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085 T	88
				<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562	87
				<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	ATCC 33539	86
			<i>Aeromonas hydrophila</i>	ATCC 7966	86	
VI-10	G107	a107 (1098pb)	16S ARNr	<i>Vibrio lentus</i>	CIP 10766T	99
				<i>Vibrio kanaloae</i>	LMG 20539T	99
				<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	LMG 23439	99
				<i>Vibrio tasmaniensis</i>	LMG 21574T	99
				<i>Vibrio gigantis</i>	CAIM 25	98
				<i>Vibrio gallaecicus</i>	CECT 7244	98
				<i>Vibrio crassostreae</i>	CAIM 14 1405	98
				<i>Vibrio splendidus</i>	ATCC 33125T	98
				<i>Vibrio pomeroyi</i>	CAIM 578	98
				<i>Vibrio chagasii</i>	LMG 13237	98
				<i>Vibrio splendidus</i> biovar II	ATCC 33789	98
				<i>Vibrio tapetis</i>	CECT 4600T	98
				<i>Aliivibrio fischeri</i>	ATCC 33715	97
				<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC 35048T	97
				<i>Aliivibrio wodanis</i>	ATCC 15382	97
				<i>Aliivibrio logei</i>	NCIM 2252	97
				<i>Listonella anguillarum</i>	NCMB 6	97
				<i>Vibrio ordalii</i>	NCMB 2168	97
				<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 29307	97
				<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085T	96
<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203T	97				
<i>Vibrio pectenicida</i>	IFREMER A365	97				
<i>Vibrio pacinii</i>	LMG 19999	96				
			<i>Aliivibrio logei</i>	ATCC 15832	96	

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad
VI-11	G148	a148 (1099pb)	16S ARNr	<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 7466	99
				<i>Vibrio diabolicus</i>	HE800T	99
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749T	98
				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802T	98
				<i>Vibrio rotiferianus</i>	CAIM 576	98
				<i>Listonella pelagia</i>	ATCC 25916T	98
				<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920T	98
				<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126 T	98
				<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21559	98
				<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC 15338	98
				<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362	98
				<i>Vibrio fluvialis</i>	NCTC 11327T	98
				<i>Vibrio gallicus</i>	LMG 21330	98
				<i>Vibrio furnissii</i>	ATCC 35016T	98
				<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546	97
				<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 27562T	97
				<i>Vibrio litoralis</i>	MANO22P	97
				<i>Vibrio neptunius</i>	LMG 20536	97
				<i>Vibrio corallilyticus</i>	LMG 21349	96
				<i>Vibrio haliotocoli</i>	IAM 14599	97
				<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085T	97
				<i>Vibrio ichthyenteri</i>	LMG 19664T	97
				<i>Vibrio breoganii</i>	LMG 23858	97
				<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC 35048T	97
				<i>Vibrio sinaloensis</i>	CAIM 797	97
				<i>Vibrio scopthalmi</i>	CECT 4638	97
				<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203T	97
				<i>Vibrio ponticus</i>	CECT 5869T	96
				<i>Vibrio chagasii</i>	LMG 13237	96
				<i>Vibrio penaeicida</i>	DSM 14398T	96
				<i>Vibrio metschnikovii</i>	CIP 69.14T	96
<i>Vibrio hispanicus</i>	LMG 13211	96				
<i>Vibrio splendidus</i>	LMG 10952	96				
VI-12	G185	a185 (1149pb)	16S ARNr	<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	NCIMB 13478	97
				<i>Photobacterium kishitanii</i>	LMG 23892	97
				<i>Photobacterium kishitanii</i>	NCIMB 12839	97
				<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	ATCC 51761	97
				<i>Photobacterium phosphoreum</i>	ATCC 11040T	97
				<i>Photobacterium indicum</i>	MBIC 3157	96
				<i>Photobacterium frigidophilum</i>	SL13	96
				<i>Photobacterium angustum</i>	ATCC 33975	96
				<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25587	96
				<i>Photobacterium euros Rosenbergii</i>	LMG 22223T	96
				<i>Photobacterium aplysiae</i>	GMD 509	96
				<i>Photobacterium aquimaris</i>	LC2-038	97
				<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25521T	95
				<i>Vibrio gallicus</i>	CIP 107864	95
				VI-13	G197	a197 (777pb)
<i>Photobacterium kishitanii</i>	NCIMB 12839	97				
<i>Photobacterium iliopiscarium</i>	NCIMB 13478	97				
<i>Photobacterium aquimaris</i>	LC2-068	96				
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	ATCC 11040T	96				
<i>Photobacterium frigidophilum</i>	SL13	96				
<i>Photobacterium indicum</i>	NBRC 14233	96				
<i>Photobacterium indicum</i>	MBIC 3157	96				
<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25587	96				
<i>Photobacterium aplysiae</i>	GMD 509	96				
<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25521T	96				
<i>Photobacterium angustum</i>	ATCC 25915T	95				
VI-14	G241	a241 (1053pb)	16S ARNr	<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 7466	99
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749T	99
				<i>Listonella pelagia</i>	ATCC 25916T	99
				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802T	99
				<i>Vibrio rotiferianus</i>	CAIM 576	99
				<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC 25920T	99
				<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126T	99
				<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC 15338	99
				<i>Vibrio diabolicus</i>	HE 800T	98
				<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362	98
				<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085T	98
				<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21559	98
				<i>Vibrio litoralis</i>	MANO22P	97
				<i>Allomonas enterica</i>	LMG 21754	97
				<i>Vibrio furnissii</i>	ATCC 35016T	97
				<i>Vibrio fluvialis</i>	NCTC 11327T	97
				<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 29307	97
				<i>Vibrio gallicus</i>	LMG 21330	98
<i>Vibrio haliotocoli</i>	IAM 14599	97				
<i>Vibrio corallilyticus</i>	LMG 21349	96				

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad
				<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	DSM 14397T	97
				<i>Vibrio breoganii</i>	LMG 23858	97
				<i>Vibrio hispanicus</i>	LMG 13211	97
				<i>Vibrio neptunius</i>	LMG 20536	97
				<i>Vibrio scophthalmi</i>	CECT 4638	97
				<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC 35048T	97
				<i>Vibrio penaeicida</i>	DSM 14398T	97
				<i>Vibrio navarrensis</i>	CIP 103381T	97
				<i>Vibrio ponticus</i>	CECT 5869T	96
				<i>Vibrio metschnikovii</i>	CIP 69.14T	96
				<i>Photobacterium angustum</i>	ATCC 33975	96
				<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203T	96
				<i>Vibrio sinaloensis</i>	CAIM 695	96
				<i>Listonella anguillarum</i>	NCMB 6	96
VI-15	G255	a255 (1293pb)	16S ARNr	<i>Vibrio tapetis</i>	CECT 4600T	98
				<i>Vibrio tapetis</i>	IS1	98
				<i>Vibrio tapetis</i>	HH6087	98
				<i>Vibrio mediterranei</i>	CIP 103203T	97
				<i>Vibrio tasmaniensis</i>	LMG 21574T	96
				<i>Vibrio splendidus</i> biovar II	ATCC 33789	97
				<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	LMG 7905	96
				<i>Vibrio gigantis</i>	CAIM 25T	96
				<i>Vibrio pomeroyi</i>	CAIM 578T	96
				<i>Vibrio chagasii</i>	LMG 13237	96
				<i>Vibrio crassostreae</i>	CAIM 1405T	96
				<i>Vibrio orientalis</i>	ATCC 33934T	96
				<i>Vibrio lentus</i>	CIP 107166T	96
				<i>Vibrio kanaloae</i>	LMG 20539T	96
				<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21566	96
				<i>Vibrio aestuarianus</i>	ATCC 35048T	97
				<i>Vibrio splendidus</i>	LMG 10952	97
				<i>Vibrio pacinii</i>	LMG 19999T	96
				<i>Vibrio splendidus</i>	ATCC 33125T	96
				<i>Vibrio penaeicida</i>	DSM 14398T	96
				<i>Vibrio ichthyoenteri</i>	LMG 19664T	96
				<i>Vibrio scophthalmi</i>	CECT 4638T	96
				<i>Vibrio furnissii</i>	ATCC 35016T	96
				<i>Vibrio fluvialis</i>	NCTC 11327T	96
VI-16	G256	a256 (1100pb)	16S ARNr	<i>Vibrio litoralis</i>	MANO 22P	97
				<i>Vibrio agarivorans</i>	CECT 5085T	97
				<i>Vibrio fortis</i>	LMG 21562	97
				<i>Vibrio hepatarius</i>	LMG 20362	97
				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802	97
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	ATCC 17749T	97
				<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 7466	97
				<i>Vibrio rotiferianus</i>	CAIM 576	97
				<i>Vibrio furnissii</i>	ATCC 35016T	97
				<i>Vibrio campbellii</i>	ATCC25920T	97
				<i>Vibrio gallicus</i>	LMG 21330	97
				<i>Vibrio fluvialis</i>	NCTC 11327T	97
				<i>Vibrio diabolicus</i>	HE 800	97
				<i>Listonella pelagia</i>	ATCC 25916	97
				<i>Vibrio harveyi</i>	ATCC 14126T	97
				<i>Listonella anguillarum</i>	NCMB 6	97
				<i>Allomonas enterica</i>	LMG 21754T	97
				<i>Vibrio ordalii</i>	NCMB 2168	97
				<i>Vibrio neptunius</i>	LMG 20536	96
				<i>Vibrio corallilyticus</i>	LMG 21349	96
				<i>Vibrio proteolyticus</i>	ATCC 15338	96
				<i>Vibrio hispanicus</i>	LMG 13211	97
				<i>Vibrio tasmaniensis</i>	LMG 21574T	96
				<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	LMG 7905	96
				<i>Vibrio nereis</i>	ATCC 25917T	96
				<i>Vibrio lentus</i>	CIP 107166T	96
				<i>Vibrio penaeicida</i>	DSM 14398T	96
				<i>Aliivibrio fischeri</i>	ATCC 7744T	96
				<i>Vibrio tapetis</i>	CECT 4600T	96
				<i>Vibrio gigantis</i>	CAIM 25	96
				<i>Vibrio pomeroyi</i>	CAIM578	96
				<i>Vibrio splendidus</i> biovar II	ATCC 33789	96
				<i>Vibrio halioticoli</i>	IAM 1459	96
				<i>Vibrio ordalii</i>	ATCC 33509T	96
				<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 29307	96
				<i>Vibrio ponticus</i>	CECT 5869T	96
				<i>Vibrio brasiliensis</i>	LMG 20546	96
				<i>Vibrio breoganii</i>	LMG 23858	96
				<i>Vibrio chagasii</i>	LMG 13237	96
				<i>Vibrio penaeicida</i>	LMG 19663T	96
				<i>Vibrio gallaecicus</i>	CECT 7244	96

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad				
VI-17	G321	a321 (684pb)	16S ARNr	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	JCM 8968	99				
				<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>damsela</i>	ATCC 33539 T	99				
				<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	ATCC 29690	99				
				<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	NCIMB 2058 T	99				
				<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25587	97				
				<i>Photobacterium mandapamensis</i> (<i>P. leiognathi</i>)	ATCC 33981	97				
				<i>Photobacterium leiognathi</i>	ATCC 25521 T	96				
				<i>Vibrio rotiferianus</i>	CAIM 576	96				
				<i>Vibrio campbellii</i>	CAIM 521	96				
				<i>Vibrio natriegens</i>	CECT 7466	96				
				<i>Vibrio alginolyticus</i>	CECT 609	96				
				<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CECT 611	96				
				<i>Vibrio harveyi</i>	LMG 4404 T	96				
				<i>Photobacterium aplysiae</i>	GMD 509T	96				
				<i>Listonella pelagia</i>	ATCC 25916 T	96				
				<i>Photobacterium frigidiphilum</i>	SC13 T	96				
				<i>Photobacterium indicum</i>	MBIC 3157	96				
				<i>Vibrio vulnificus</i>	ATCC 29307	95				
				<i>Photobacterium aquimaris</i>	LC2-038	95				
				<i>Vibrio gallicus</i>	CIP 107867	95				
				VI-18	G328	a381 (1427pb)	16S ARNr	<i>Psychrobacter nivimaris</i>	DSM 16093T	99
								<i>Psychrobacter proteolyticus</i>	CIP 106830T	98
								<i>Psychrobacter muriicola</i>	VKH B-2270T	99
								<i>Psychrobacter aquimaris</i>	DSM 15329T	98
								<i>Psychrobacter aquaticus</i>	DSM 15339T	98
								<i>Psychrobacter namaensis</i>	DSM 16330T	98
								<i>Psychrobacter vallis</i>	DSM 15337T	98
<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>	DSM 17306T	98								
<i>Psychrobacter arcticus</i>	215-51T	97								
<i>Psychrobacter fozii</i>	LMG 21280T	97								
<i>Psychrobacter okhotskensis</i>	NCIMB 13931T	97								
<i>Psychrobacter luti</i>	CECT 5885T	97								
<i>Psychrobacter alimenarius</i>	DSM 16066	97								
<i>Psychrobacter maritimus</i>	DSM 15387T	97								
<i>Psychrobacter fulvigenes</i>	KMM 3967	97								
<i>Psychrobacter urativorans</i>	DSM 14009T	97								
<i>Psychrobacter glacincola</i>	DSM 12194T	97								
<i>Psychrobacter cibarius</i>	DSM 16327T	97								
<i>Psychrobacter immobilis</i>	DSM 7229 T	97								
<i>Psychrobacter celer</i>	JCM 12601T	96								
<i>Psychrobacter frigidicola</i>	DSM 12411 T	96								
<i>Psychrobacter submarinus</i>	KMM 225T	97								
<i>Psychrobacter faecalis</i>	ISO-46 T	96								
<i>Psychrobacter marincola</i>	KMM 277T	96								
<i>Psychrobacter salsus</i>	DD48T	96								
<i>Psychrobacter jeotgali</i>	YKJ-105	96								
<i>Psychrobacter pacificensis</i>	IFO 16270T	96								
VI-19	G390	a390 (1496pb)	16S ARNr	<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361T	99				
				<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647T	98				
				<i>Pseudomonas jessenii</i>	CIP 105274 T	99				
				<i>Pseudomonas umsongensis</i>	KACC 10847T	99				
				<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LMG 14577	99				
				<i>Pseudomonas mohnii</i>	DSM 18327T	98				
				<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 17573	99				
				<i>Pseudomonas moraviensis</i>	DSM 16007T	99				
				<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 17522	99				
				<i>Pseudomonas koreensis</i>	KACC 10848T	99				
				<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	ATCC 700688T	99				
				<i>Pseudomonas migulae</i>	CIP 105470T	98				
				<i>Pseudomonas graminis</i>	DSM 11363T	98				
				<i>Pseudomonas monteilii</i>	CIP 104883T	98				
				<i>Pseudomonas brenneri</i>	CIP 106646T	98				
				<i>Pseudomonas mosselii</i>	CIP 105259T	98				
				<i>Pseudomonas proteolytica</i>	DSM 15321T	98				
				<i>Pseudomonas asplenii</i>	ATCC 23835T	98				
				<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>	MAFF 301177T	98				
				<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	IAM 1568T	97				
				<i>Pseudomonas mandelii</i>	CIP 105273T	98				
				<i>Pseudomonas agarici</i>	LMG 2112T	98				
				<i>Pseudomonas gessardii</i>	CIP 105469T	97				
				<i>Pseudomonas libanensis</i>	CIP 105460T	97				
				<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aurantiaca</i>	NCIB 10068	97				
				<i>Pseudomonas lurida</i>	DSM 15835T	97				
				<i>Pseudomonas poae</i>	DSM 14936T	97				
				<i>Pseudomonas veronii</i>	CIP 104663T	97				
				<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	CIP 104664T	97				
				<i>Pseudomonas congelans</i>	DSM 14939T	97				
				<i>Pseudomonas tremae</i>	CFBP 6111T	97				
				<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	KMM 3447T	97				

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad
				<i>Pseudomonas trivialis</i>	DSM 14937T	97
				<i>Pseudomonas cannabina</i>	CFBP 2341T	97
				<i>Pseudomonas meridiana</i>	DSM 15319T	97
				<i>Pseudomonas synxantha</i>	IAM 12356	97
				<i>Pseudomonas orientalis</i>	CIP 105540T	97
				<i>Pseudomonas tolaasii</i>	LMG 2342T	97
				<i>Pseudomonas marginales</i>	ATCC 10844T	97
				<i>Pseudomonas meliae</i>	MAFF 301463T	97
				<i>Pseudomonas vranovensis</i>	DSM 16006T	97
				<i>Pseudomonas kilonensis</i>	DSM 13547T	98
				<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	ATCC 700383T	98
				<i>Pseudomonas parafulva</i>	AJ 2129T	98
				<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	JCM 2400T	97
				<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 12633T	98
				<i>Pseudomonas savastanoi</i>	ATCC 13522T	97
				<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525T	97
				<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603	97
				<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	DSM 13022T	97
				<i>Pseudomonas mediterranea</i>	G-229-21T	97
				<i>Pseudomonas aurantiaca</i>	ATCC 33663T	96
				<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	LMG 1225T	97
				<i>Pseudomonas japonica</i>	IAM 15071T	97
				<i>Pseudomonas fragi</i>	IFO 3458T	96
				<i>Pseudomonas stutzeri</i>	ATCC 17594	96
				<i>Pseudomonas corrugata</i>	ATCC 29736	97
				<i>Pseudomonas mendocina</i>	NCIB 10541	96
				<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	ATCC 700689T	97
				<i>Pseudomonas viridiflava</i>	LMG 2352T	96
				<i>Pseudomonas amygdali</i>	LMG 2123T	96
				<i>Pseudomonas cichorii</i>	ATCC 10857T	96
				<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	LMG 1224T	96
				<i>Pseudomonas luteola</i>	IAM 13000	96
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25330	95
VI-20	G390	a390 (724pb)	gyrB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo B)	ATCC 17467	94
				<i>Pseudomonas koreensis</i>	DSM 16610T	93
				<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603	92
				<i>Pseudomonas kilonensis</i>	520-20 T	92
				<i>Pseudomonas marginalis</i>	NCPPB 667 T	92
				<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	CFBP 11261 T	92
				<i>Pseudomonas umsongensis</i>	DSM 16611 T	92
				<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo C)	ATCC 17561	92
				<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361T	92
				<i>Pseudomonas synxantha</i>	IFO 3913	92
				<i>Pseudomonas putida</i> (biotipo B)	ATCC 17522	92
				<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo G)	ATCC 17573	92
				<i>Pseudomonas mediterranea</i>	CFBP 5447 T	92
				<i>Pseudomonas jessenii</i>	DSM 17150 T	92
				<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	CFBP 11706 T	92
				<i>Pseudomonas moraviensis</i>	DSM 16007T	92
				<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	DSM 17555 T	91
				<i>Pseudomonas fluorescens</i> (biotipo A)	ATCC 49036	91
				<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647 T	91
				<i>Pseudomonas corrugata</i>	NCPPB 3056	91
				<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525 T	91
				<i>Pseudomonas migulae</i>	CCUG 43165T	91
				<i>Pseudomonas mohnii</i>	DSM 18327 T	91
				<i>Pseudomonas mucidolens</i>	IAM 12406	91
				<i>Pseudomonas frederikbergensis</i>	DSM 13022 T	91
				<i>Pseudomonas tolaasii</i>	NCPPB 2412	90
				<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	IFO 3904 T	90
				<i>Pseudomonas fragi</i>	ATCC 27362	90
				<i>Pseudomonas agarici</i>	NCPPB 2472	89
				<i>Pseudomonas taetrolens</i>	IAM 1653	88
				<i>Pseudomonas syringae</i>	PDDCC 4303	88
				<i>Pseudomonas asplenii</i>	NCPPB 959	87
				<i>Pseudomonas savastanoi</i>	NCPPB 639	87
				<i>Pseudomonas meliae</i>	DSM 6759 T	87
				<i>Pseudomonas tremiae</i>	611 T	86
				<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	NCPPB 1873	86
				<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	ICM 2400	86
				<i>Pseudomonas cichorii</i>	NCPPB 943	86
				<i>Pseudomonas amygdali</i>	NCPPB 2609	86
				<i>Pseudomonas mosselii</i>	BCRC 17518	85
				<i>Pseudomonas fulva</i>	IAM 1587	85
				<i>Pseudomonas straminea</i>	IAM 1598	85
				<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	BCRC 17517T	85
				<i>Pseudomonas putida</i> (biotipo A)	ATCC 12633 T	85
				<i>Pseudomonas anguilliseptica</i>	FPC 48	85
				<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25011	84

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad				
VI-21	G390	a390 (815pb)	<i>rpoD</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 17573	95				
				<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 17522	90				
				<i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	DSM 13022T	90				
				<i>Pseudomonas jessenii</i>	CIP 10574T	90				
				<i>Pseudomonas reinekei</i>	DSM 18361	90				
				<i>Pseudomonas moraviensis</i>	DSM 16007T	92				
				<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 17467	90				
				<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	NCIMB 9030	88				
				<i>Pseudomonas thivervalensis</i>	CFBP 11261T	88				
				<i>Pseudomonas moorei</i>	DSM 12647T	90				
				<i>Pseudomonas kilonensis</i>	520-20T	89				
				<i>Pseudomonas agarici</i>	NCPBP 2289	87				
				<i>Pseudomonas koreensis</i>	LMG 21318T	91				
				<i>Pseudomonas mediterranea</i>	CFBP 5447T	88				
				<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC 13525T	87				
				<i>Pseudomonas marginalis</i>	NCPBP 3183	87				
				<i>Pseudomonas tolaasii</i>	NCPBP 2194	87				
				<i>Pseudomonas corrugata</i>	NCPBP 3316	87				
				<i>Pseudomonas synxantha</i>	IFO 3913	87				
				<i>Pseudomonas azotoformans</i>	IAM 1603	87				
				<i>Pseudomonas mucidolens</i>	IAM 12406	87				
				<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	CFBP 11706T	88				
				<i>Pseudomonas migulae</i>	CCUG 43165T	90				
				<i>Pseudomonas marginata</i>	HRI 17	86				
				<i>Pseudomonas vancouverensis</i>	ATCC 700688T	89				
				<i>Pseudomonas lini</i>	CIP 107460T	89				
				<i>Pseudomonas asplenii</i>	NCPBP 959	86				
				<i>Pseudomonas mohnii</i>	CCUG 53115T	89				
				<i>Pseudomonas taetrolens</i>	IAM 1653	85				
				<i>Pseudomonas umsongensis</i>	LMG 21317T	89				
				<i>Pseudomonas mandelii</i>	LMG 2210T	88				
				<i>Pseudomonas salomonii</i>	LMG 22120T	88				
				<i>Pseudomonas syringae</i>	PDDCC 2848	84				
				<i>Pseudomonas palleroniana</i>	LMG 23076T	87				
				<i>Pseudomonas amygdali</i>	NCPBP 2610	84				
				<i>Pseudomonas poae</i>	LMG 21465T	87				
				<i>Pseudomonas savastanoi</i>	NCPBP 639	84				
				<i>Pseudomonas ficuserectae</i>	JCM 2400	84				
				<i>Pseudomonas caricapapayae</i>	NCPBP 3439	83				
				<i>Pseudomonas cichorii</i>	NCPBP 3238	83				
				<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	LMG 19695T	87				
				<i>Pseudomonas veronii</i>	LMG 17761T	86				
				<i>Pseudomonas trivialis</i>	LMG 21464T	86				
				<i>Pseudomonas panacis</i>	CIP 108524T	86				
				<i>Pseudomonas libanensis</i>	CIP 105460T	86				
				<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	LMG 17764T	86				
				<i>Pseudomonas grimontii</i>	CIP 106645T	85				
				<i>Pseudomonas brenneri</i>	DSM 15294T	85				
				<i>Pseudomonas fragi</i>	ATCC 4973 T	85				
				<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	ATCC 700689 T	84				
				<i>Pseudomonas lundensis</i>	LMG 13517 T	83				
				<i>Pseudomonas cannabina</i>	LMG 5096 T	83				
				<i>Pseudomonas tremae</i>	LMG 22121 T	82				
				<i>Pseudomonas meliae</i>	CCUG 51503 T	82				
				<i>Pseudomonas congelans</i>	LMG 21466 T	82				
				<i>Pseudomonas lutea</i>	LMG 21974 T	82				
				<i>Pseudomonas rhizophraerae</i>	LMG 21640 T	79				
				<i>Pseudomonas mendocina</i>	ATCC 25411	75				
				<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	IFO 14167	74				
				<i>Pseudomonas putida</i>	ATCC 12633 T	75				
				<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	CIP 106493 T	73				
				VI-22	G443	a388 (1345pb)	16S ARNr	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	IFO 15946 T	99
								<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	MBIC 1140 T	95
								<i>Tenacibaculum aestuarii</i>	KCTC 12569 T	95
								<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	LMG 24004 T	94
								<i>Tenacibaculum crassostreae</i>	JCM 15428 T	94
								<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	KCTC 12302 T	94
								<i>Polaribacter dokdonensis</i>	DSM 17204 T	94
								<i>Flexibacter aurantiacus</i> subsp. <i>copepodarum</i>	IFO 15978	95
								<i>Tenacibaculum litoreum</i>	KCCM 42115 T	94
								<i>Tenacibaculum adriaticum</i>	DSM 18961 T	94
								<i>Tenacibaculum discolor</i>	DSM 18842 T	94
								<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	DSM 18841 T	94
<i>Tenacibaculum soleae</i>	NCIMB 14368 T	94								
<i>Tenacibaculum litopenaei</i>	LMG 23706 T	94								
<i>Tenacibaculum skagerrakense</i>	ATCC BAA-458 T	94								
<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	IFO 15947 T	93								
<i>Tenacibaculum amyolyticum</i>	MBIC 4355 T	93								
<i>Polaribacter franzmannii</i>	ATCC 700399 T	93								

Anexo	Fenón	Cepa (pb)*	Gen	Especies más próximas	Cepa	% identidad
VI-23	G500	a500 (1307 pb)	16S ARNr	<i>Polaribacter dokdonensis</i>	DSM 17204 T	97
				<i>Polaribacter irgensii</i>	ATCC 700-398 T	95
				<i>Polaribacter franzmannii</i>	ATCC 700399 T	95
				<i>Polaribacter filamentus</i>	ATCC 700397 T	95
				<i>Tenacibaculum maritimum</i>	IFO 15946 T	94
				<i>Polaribacter glomeratus</i>	ATCC 43844 T	93
				<i>Tenacibaculum aestuarii</i>	KCTC 12569 T	93
				<i>Tenacibaculum lutimaris</i>	KCTC 12302 T	92
				<i>Tenacibaculum mesophilum</i>	MBIC 1140 T	93
				<i>Tenacibaculum crassostreae</i>	JCM 15428 T	93
				<i>Tenacibaculum discolor</i>	DSM 18842 T	93
				<i>Tenacibaculum aiptasiae</i>	LMG 2400T T	92
				<i>Tenacibaculum litoreum</i>	KCCM 42115	93
				<i>Tenacibaculum skagerrakense</i>	ATCC BAA-458 T	92
				<i>Tenacibaculum adriaticum</i>	DSM 18961 T	92
				<i>Tenacibaculum gallaicum</i>	DSM 18841 T	92
				<i>Tenacibaculum amylolyticum</i>	MBIC 4355 T	92
				<i>Tenacibaculum ovolyticum</i>	IFO 15947 T	92
				<i>Tenacibaculum soleae</i>	NCIMB 14368 T	92

ANEXO VIII. Descripción de *Pseudomonas baetica* sp. nov.

Pseudomonas baetica [ba.e.,ti.ca, L. fem. n. *Baetica*, nombre de la provincia del Imperio Romano que abarcaba la region suroccidental de España. Procedente de esta provincia]

Bacilos de morfología irregular, de 3-20 μm de longitud, gram negativos y móviles. Colonias circulares y de color blanquecino en TSA. Metabolismo oxidativo. Oxidasa y catalasa positivos. Producen fluoresceína pero no piocianina. Presentan arginina dihidrolasa, pero no lisina ni ornitina decarboxilasas. Incapaces de crecer en TCBS. Crecen a 4 y 30°C, pero no a 35°C. Capaces de crecer en medios con concentraciones de 0-6% NaCl, pero no con 8%. Negativos para la reducción de nitratos pero positivos para desnitrificación. Negativos para los test producción de H₂S, indol y Voges-Proskauer. Hidrolizan la gelatina y la caseína pero no el almidón, tween 80, esculina y urea. Hemolíticos en agar sangre. Producen ácido a partir de glucosa y manosa, pero no a partir de manitol, inositol, sorbitol, rhamnosa, sacarosa, amigdalina, arabinosa, lactosa y salicina. La producción de ácido a partir de melobiosa es variable (la cepa tipo es negativa). De acuerdo a las placas Biolog GN2 todas las cepas utilizan los siguientes sustratos como fuentes de carbono: tween 40, tween 80, N-acetil-D-glucosamina, L-arabinosa, D-arabitol, D-fructosa, D-galactosa, α -D-glucosa, D-manitol, D-manosa, metil piruvato, ácido acético, ácido cis-acónico, ácido cítrico, lactona de ácido D-galactónico, ácido D-gluconico, ácido β -hidroxibutírico, ácido α -ceto glutárico, ácido D,L-láctico, ácido malónico, ácido propiónico, ácido quínico, ácido D-sacárico, ácido succínico, ácido bromo-succínico, D-alanina, L-alanina, L-alanil-glicina, L-asparagina, ácido L-aspartico, ácido L-glutámico, L-leucina, L-prolina ácido L-piroglutámico, L-serina, ácido γ -aminobutírico, ácido urocánico, inosina, uridina y glicerol. Los siguientes sustratos no fueron utilizados por ninguna cepa: α -ciclodextrina, dextrina, glicógeno, N-acetil-D-galactosamina, adonitol, D-celobiosa, i-eritritol, L-fucosa, gentiobiosa, m-inositol, α -D-lactosa, lactulosa, maltosa, D-melibiosa, β -metil-D-glucosido, D- psicosa, D-rafinosa, L-ramnosa, D-sorbitol, sacarosa, D-trehalosa, turanosa, xylitol, ácido fórmico, ácido D-galacturónico, ácido D-glucosaminico, ácido D-glucurónico, ácido α -hidroxibutírico, ácido γ -hidroxibutírico, ácido p-hidroxi-fenilacético, ácido α -ceto butírico, ácido α -ceto valerico, ácido sebáico, ácido succinámico, glucuronamida, ácido glicil-L-aspartico, ácido glicil-L-glutámico, hidroxil-L-prolina, L-ornitina, L-fenilalanina, D-serina, timidina, fenietilmanina, 2,3-butanodiol, D,L- α -glicerol fosfato, glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato. La mayor parte de las cepas fueron positivas para L-histidina, L-treonina, putrescina y 2-aminoetanol, y negativas para ácido itacónico, L-alaninamida y D,L-carnitina. Los resultados para el sustrato mono-metil-succinato fueron variables (la cepa tipo es negativa). De acuerdo al sistema API ZYM, todas las cepas producen las enzimas esterasa lipasa C8 y fosfatasa ácida y ninguna produce lipasa C14, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina, α -quimotripsina, naftol-AS-BI-fosfolhidrolasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa y α -mannosidasa. La mayor parte de las cepas fueron positivas para fosfatasa alcalina, esterasa C4 y leucina arilamidasa, y negativas para α -fucosidasa (la cepa tipo es positiva para todos estos test excepto el último). Todas las cepas son sensibles a novobiocina (30 $\mu\text{g}/\text{disco}$) y resistentes al agente vibriostático O129 (10 y 150 $\mu\text{g}/\text{disco}$) y a la ampicilina (10 $\mu\text{g}/\text{disco}$). La cepa tipo es a390^T (=CECT 7720^T =LMG 25716^T). Fue aislada en marzo de 2006 en Huelva (España) a partir de una acedía (*Dicologolossa cuneata*) adulta enferma y es patógena para esta especie. Otra cepa de referencia es la a391 (=CECT 7721 =LMG 25717).