

Efectos de la salinidad y la temperatura en la virulencia del patógeno emergente

Vibrio harveyi

Javier Barriga-Cuartero¹, Pablo Ibáñez-Payá¹, Carmen Amaro¹, Belén Fouz¹

¹Departamento de Microbiología y Ecología de la Universitat de València, Instituto Universitario en Biomedicina y Biotecnología. 46100, Burjassot (València)

Abstract

Vibrio harveyi, an emerging pathogen, is increasingly affecting the aquaculture industry by causing severe outbreaks of vibriosis in various species of fish and invertebrates. This study links the heightened virulence of *V. harveyi* to rising seawater temperatures, a direct result of global warming. Additionally, we hypothesize that the virulence of this pathogen is not solely temperature-dependent but also influenced by seawater salinity. To test this hypothesis, we conducted *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro* assays using the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model organism. Our results confirm that the virulence of *V. harveyi* is greater at a temperature of 28°C and salinities between 2-3 ‰. Thus, this pathogen is exceptionally well-suited to thrive and cause disease under conditions of warm temperatures and lower-than-average salinity, a concerning development in the context of its wide host range and the progressing climate change.

Resumen

Vibrio harveyi, un patógeno emergente, está afectando cada vez más a la industria acuícola al provocar graves brotes de vibriosis en diversas especies de peces e invertebrados. Este estudio vincula el aumento de la virulencia de *V. harveyi* con el incremento de las temperaturas del agua de mar, un resultado directo del calentamiento global. Además, hipotetizamos que la virulencia de este patógeno no depende únicamente de la temperatura, sino que también está influenciada por la salinidad del agua de mar. Para probar esta hipótesis, realizamos ensayos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro* utilizando la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) como organismo modelo. Nuestros resultados confirman que la virulencia de *V. harveyi* es mayor a una temperatura de 28°C y salinidades entre el 2-3 ‰. Por lo tanto, este patógeno está excepcionalmente bien adaptado para prosperar y causar enfermedades en condiciones de temperaturas cálidas y salinidades inferiores a la media, un aspecto preocupante en el contexto de su amplio rango de huéspedes y un cambio climático en progreso.

Introducción

Vibrio harveyi es un patógeno bacteriano marino que produce pérdidas importantes en acuicultura a escala global tanto en cultivos de peces como de invertebrados (Zhang *et al.*, 2018; Amaro *et al.*, 2020). Estas pérdidas, además, parecen estar ligadas al cambio climático puesto que la virulencia de los brotes es cada vez mayor (Amaro *et al.*, 2020). Nuestra hipótesis es que la virulencia de este patógeno no solo depende de la temperatura del agua de mar sino también de la salinidad, de manera que el incremento de temperatura junto con la disminución de la salinidad que está causando el cambio climático crearían unas condiciones favorables para este patógeno que serían sumamente preocupantes para la acuicultura marina. Para demostrar esta hipótesis, hemos seleccionado una cepa de *V. harveyi* representativa (C2) y realizado una batería de ensayos *in vitro* (crecimiento y producción de exoenzimas a distintas temperaturas y salinidades), *ex vivo* (resistencia al efecto bactericida del suero) e *in vivo* usando lubina europea (*Dicentrarchus labrax*) infectada por inmersión como modelo animal. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de partida y demuestran que este patógeno está especialmente adaptado para causar vibriosis a temperaturas por encima de 23°C y salinidades por debajo de la media oceánica.

Material y métodos

Crecimiento a diferentes condiciones de temperatura y salinidad: *V. harveyi* se creció en caldo marino a 3 temperaturas (18 °C, 23 °C y 28 °C) durante 24 h y las poblaciones se estimaron mediante recuento de células viables en placas de agar triptona soja suplementado con 1 ‰ de NaCl (TSA-1). La tolerancia a la salinidad se determinó mediante crecimiento en caldo Salinity Tolerant Broth (STB) complementado con distintas concentraciones de NaCl (de 0 a 5 ‰).

Producción de exoenzimas. Se extrajo la fracción cruda de exoenzimas según Liu (1957) tras crecer la bacteria a 18 °C, 23 °C y 28 °C y se cuantificó la actividad proteasa y lipasa en placa.

Resistencia a la inmunidad innata en suero. Se obtuvo suero de lubina que se inoculó con 10⁴ células bacterianas (UFC; unidades formadoras de colonia/mL) y se determinó la resistencia mediante el cálculo del porcentaje de supervivencia tras 4 h de incubación a 18 °C, 23 °C y 28 °C.

Ensayos de virulencia. Los ejemplares de lubina europea (35 ± 5 g) se infectaron por inmersión prolongada (1 h) con diferentes dosis del patógeno. Tras la infección, los animales se mantuvieron en diferentes condiciones de salinidad y/o temperatura durante 10 días. Finalmente, se calculó la dosis letal media (LD₅₀) de la cepa inoculada.

Resultados y discusión

Crecimiento a distintas temperaturas. Los resultados revelaron que las temperaturas más altas promueven una entrada más rápida de *V. harveyi* en la fase logarítmica de crecimiento.

Crecimiento a distintas concentraciones de sal. Se observó crecimiento a partir de una concentración de NaCl igual o superior al 0,5 %, lo que demuestra la tolerancia del patógeno a los cambios de salinidad.

Producción de exoenzimas. No se visualizaron diferencias en función de la temperatura en la capacidad proteolítica, pero sí en la actividad lipolítica con títulos 4 veces superiores a la temperatura más baja (18°C).

Resistencia a la inmunidad innata. La cepa C2 consiguió proliferar en suero de lubina a las diferentes temperaturas ensayadas, destacando los valores de porcentaje de supervivencia a las temperaturas más altas (1900,01 % a 23 °C y 13391,30 % a 28 °C), frente al 166,97 % a 18 °C.

Ensayos de virulencia. *V. harveyi* no fue virulento para lubina mantenida a 18 °C mientras que presentó el grado de virulencia más alto (LD₅₀ más baja) a 28 °C (Tabla 1). En cuanto a la influencia de la salinidad, la bacteria no pudo considerarse virulenta en condiciones de salinidad baja (1 %) mientras que sí en condiciones de salinidad del 2 y 3 % (Tabla 2).

Tabla 1. Resultados de los ensayos de virulencia en lubina a diferentes temperaturas.

Temperatura del agua	DL ₅₀ ¹
18 °C	> 2,0 x 10 ⁷
23 °C	1,0 x 10 ⁶
28 °C	2,7 x 10 ⁵

¹Dosis letal 50 % mortalidad.

Tabla 2. Resultados de los ensayos de virulencia en lubina a diferentes salinidades.

Salinidad del agua ¹	DL ₅₀ ²
1 %	> 2,0 x 10 ⁷
2 %	1,1 x 10 ⁶
3 %	1,2 x 10 ⁶

¹Temperatura del agua: 23 °C. ²Dosis letal 50 % mortalidad

En conclusión, estos resultados confirman las hipótesis de partida y sugieren que *V. harveyi* está adaptado para prosperar y causar enfermedades en condiciones de temperaturas cálidas y salinidades inferiores a la media, un aspecto preocupante en el contexto de su amplio rango de huéspedes y el cambio climático en progreso.

Palabras clave: *Vibrio harveyi*, calentamiento global, virulencia, salinidad

Bibliografía

- Amaro, C., Fouz, B., Sanjuán, E. y L. Romalde, J. 2020. Vibriosis. *CABI*, 2020. 182-210
- Liu, P.V. 1957. Survey of hemolysin production among species of pseudomonas. *Journal of bacteriology*. 74(6): 718-727.
- Zhang, X., Lin, H., Wang, X. y Austin, B. 2018. Significance of *Vibrio* species in the marine organic carbon cycle—A review. *Sci. China Earth Sci.* **61**, 1357–1368.

Agradecimientos

Proyectos THINKINAZUL/2021/027 con fondos de la Unión Europea NextGeneration EU (PRTR-C17.I1) y GV, PID2020-120619RB-I00 (MCIN/AEI/10.13039/501100011033) y CIAICO/2021/293. Barriga-Cuartero recibió fondos de PRE2021-099708 e Ibáñez-Payá, de MRR-GVA Programa Investigo 2022. Culmarex, S.A.U.

Correo del autor: luis.barriga@uv.es