

La microbiota

El microcosmo que permite una producción sostenible en la industria del salmon

PHARMAQ
Analytiq

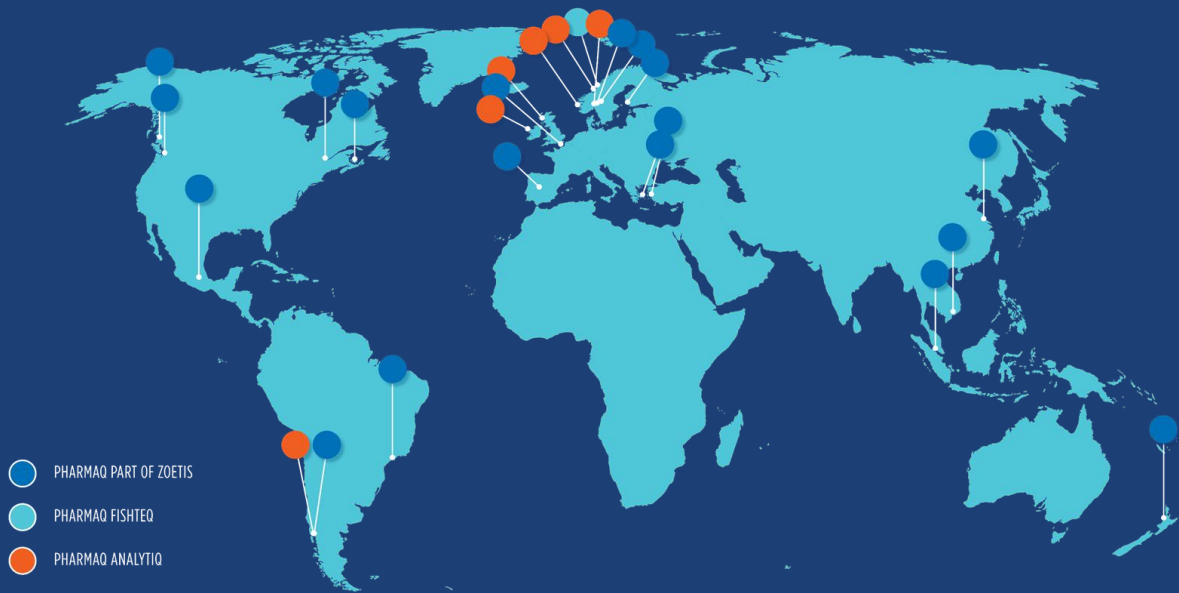


Carlos Lobos B. | 28 de noviembre, 2024.

zoetis

Nuestro alcance global

Proveemos globalmente vacunas, terapéuticos, biodevices, diagnósticos, y servicios de entrenamiento.



375

Colegas

36+

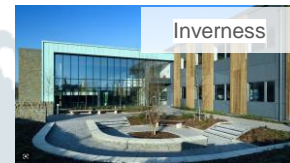
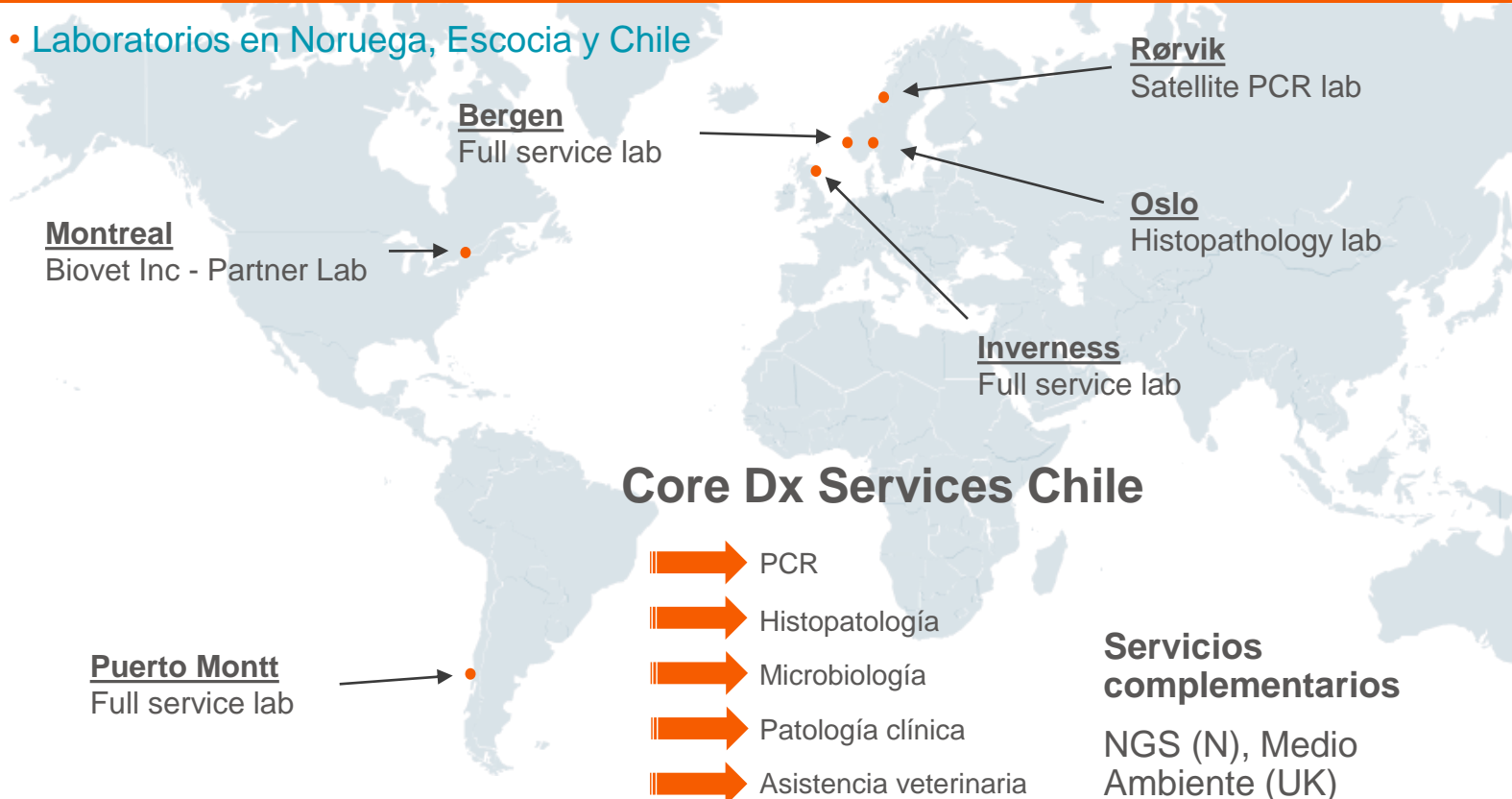
Años de I&D en salud de peces y vacunas

7 de 10

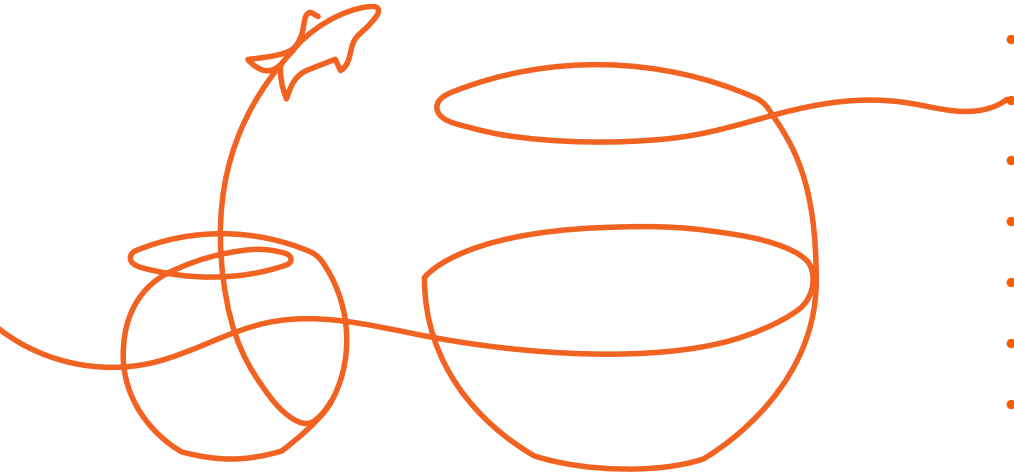
Salmones cultivados mundialmente son vacunados con productos PHARMAQ

La mayor cobertura de servicios diagnósticos

- Laboratorios en Noruega, Escocia y Chile



Contenidos



- ¿Que leémos del microcosmos bacteriano?
- ¿Qué es la secuenciación?
- NGS en acuicultura
- Análisis de la comunidad bacteriana
- Biofiltro y bacterias nitrificantes
- Agua y bioseguridad
- Microbiota en piel y heridas
- La huella de la microbiota en branquias

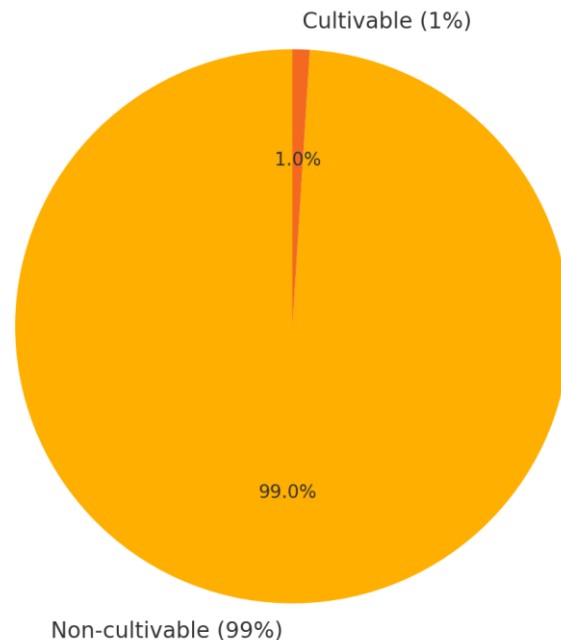
Microcosmos bacteriano:

Identificación de Bacterias de importancia en la producción y salud

En agua dulce existen 10^5 - 10^7 células bacterianas por mL de agua. En superficies con alta carga orgánica se estima que el número de bacterias por cm^2 fluctúa entre 10^6 - 10^9

De estas solo entre el 0,1% al 1% son cultivables utilizando técnicas tradicionales. El resto de las bacterias, entre el 99,9 y el 99.0%, son no cultivables.

Estas cifras subrayan la importancia de las técnicas moleculares, como la secuenciación de 16S rRNA y NGS, también conocido como metagenómica, para estudiar la biodiversidad microbiana en columnas de agua dulce, ya que permiten detectar estas bacterias no cultivables.



¿Qué es la secuenciación?

SECUENCIACIÓN

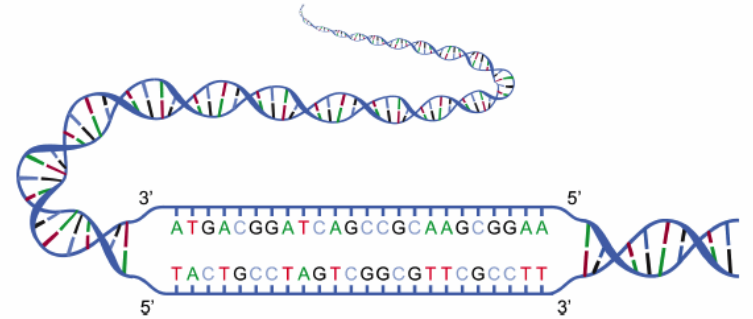
- Identificación del orden de los pares de bases en el ADN
- Utiliza una parte del ADN que tienen todas las bacterias
 - El ARNr 16S se utiliza para identificar bacterias
 - Distinguir las bacterias observando las diferencias en las regiones variables (V3 y V4)

Next Generation Sequencing

- Tecnología de secuenciación mejorada
- Permite la secuenciación de muchas secuencias de ADN al mismo tiempo
 - Comunidades enteras de bacterias
- Esto permite el análisis de estas comunidades

Virus

- Capacidad para secuenciar virus (genoma completo).
 - IPNV, SAV, ILAV, PMCV, PRV



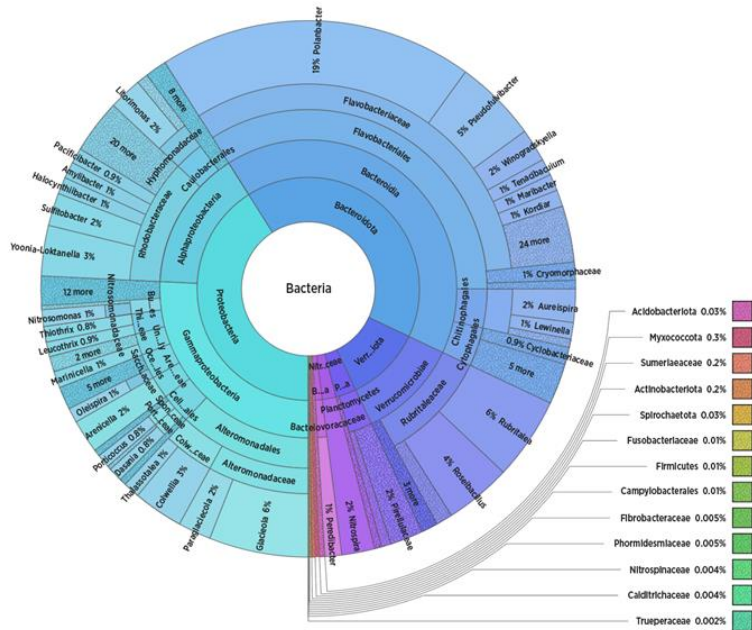
NGS

Next Generation Sequencing

El análisis se realiza utilizando el sistema de secuenciación **Illumina** en el Laboratorio de PHARMAQ Analytiq en Bergen, Noruega.

El análisis de la comunidad bacteriana permite examinar la composición e interacción de los micro organismos en un ambiente dado, usando avanzadas técnicas de secuenciación y análisis bioinformáticos.

Comprender la dinámica de las comunidades bacterianas es clave para garantizar una producción sostenible y económicamente viable.



Geraldine Wittwer
Development and new assays in PCR

Bioquímico PhD©, con especialización en Biología Molecular y bioinformática.



NGS

NEXT GENERATION SEQUENCING

Advancing
aquaculture
diagnostics

Materiales para toma de muestras

Biofilm de estanques / superficies

- Tórula de poliéster



Agua de estanques o de biofiltros

- Dispositivo de 120 ml
- Filtro de celulosa de 0,22 µm



NGS y Acuicultura

¿En qué áreas de la acuicultura moderna sería útil el uso de NGS?

Estos son algunos ejemplos:

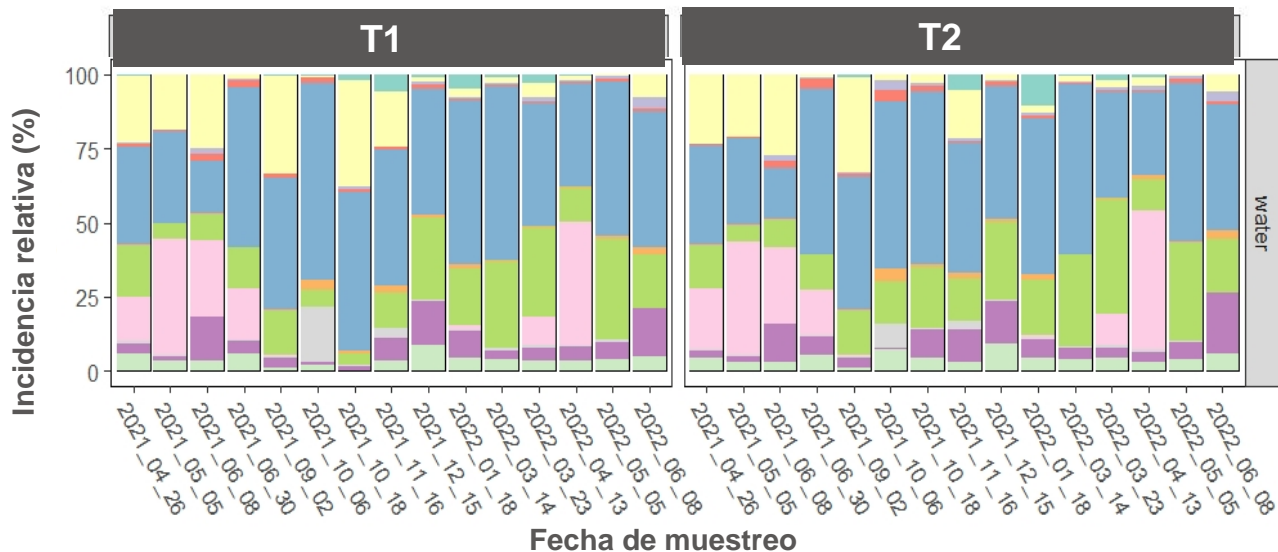
- Maduración de biofiltros y sus bacterias nitrificantes.
- Determinación de la actividad y estado de salud del biofiltro.
- Bioseguridad del agua de ingreso (¿es biosegura el agua de ingreso agua? ¿funciona satisfactoriamente la desinfección por UV? ¿ es eficiente la desinfección en general?).
- Mapeo de la microbiota presente en la producción, a fin de identificar la presencia de bacterias oportunistas y/o patogénicas en el sistema.
- Características de la microbiota cutánea / mucosa saludable y de la microbiota asociada con presencia de heridas.

Análisis de la comunidad bacteriana

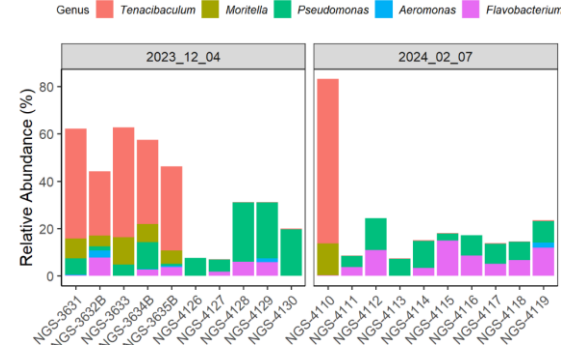
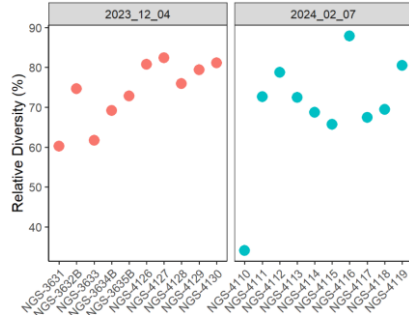
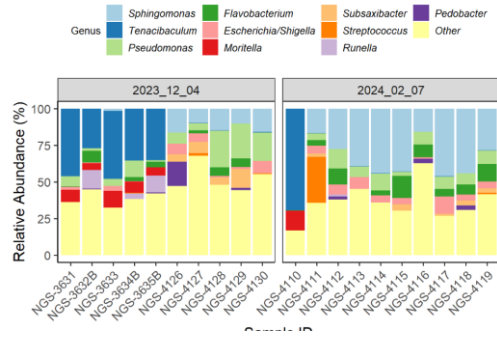


Estudio comparativo:

- Caracterización de la microbiota “normal” por unidad en el tiempo
- Identificar cambios
- Examinar la diversidad
- Seguimiento de grupos bacterianos relevantes
 - Nitrificantes
 - Asociados a enfermedades



Conceptos



Comunidad bacteriana

Abundancia relativa (%) de bacterias a nivel de género para todas las muestras. Menos del 5% de la abundancia de un género dado se denomina "otro".

Diversidad relativa

El porcentaje de diversidad encontrado en todas las muestras tomadas de peces o en agua. Se muestran los 10 géneros que tienen la mayor proporción en la muestra.

Asociadas a enfermedad

Abundancia (%) de bacterias asociadas a enfermedades en muestras tomadas de peces o agua. Bacterias que se conocen como patógenas.

Análisis de la comunidad bacteriana

Biofiltros y bacterias nitrificantes en RAS:

- ¿Los niveles de bacterias nitrificantes en el biofiltro son los esperados?
- Caracterización de biofiltros débiles o de bajo rendimiento.
- Identificación de la acumulación de bacterias patógenas conocidas.
- ¿Cómo afecta el lavado del biofiltro a las bacterias del biofiltro?

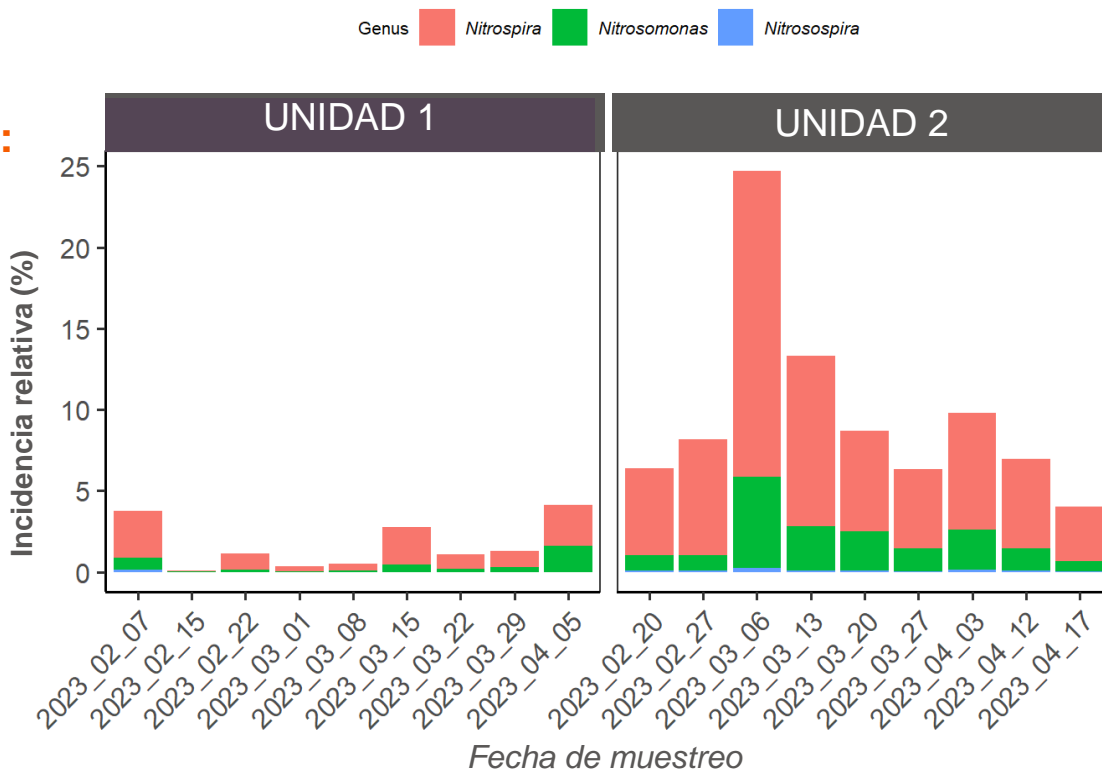


Análisis de la comunidad bacteriana

Maduración de los biofiltros en RAS:

¿Cómo sabemos si los biofiltros están maduros y listos para usar?

- Evaluando el % de bacterias nitrificantes, ¿están en su rango normal esperado (>5% de abundancia relativa)?
- Determinando la diversidad relativa a lo largo del tiempo, su estabilidad, que tan resistente es a los cambios.
 - Aumento de la salinidad
 - Uso de desinfectantes
 - Cambio en la concentración de nutrientes



Análisis de la comunidad bacteriana

Agua de ingreso y bioseguridad

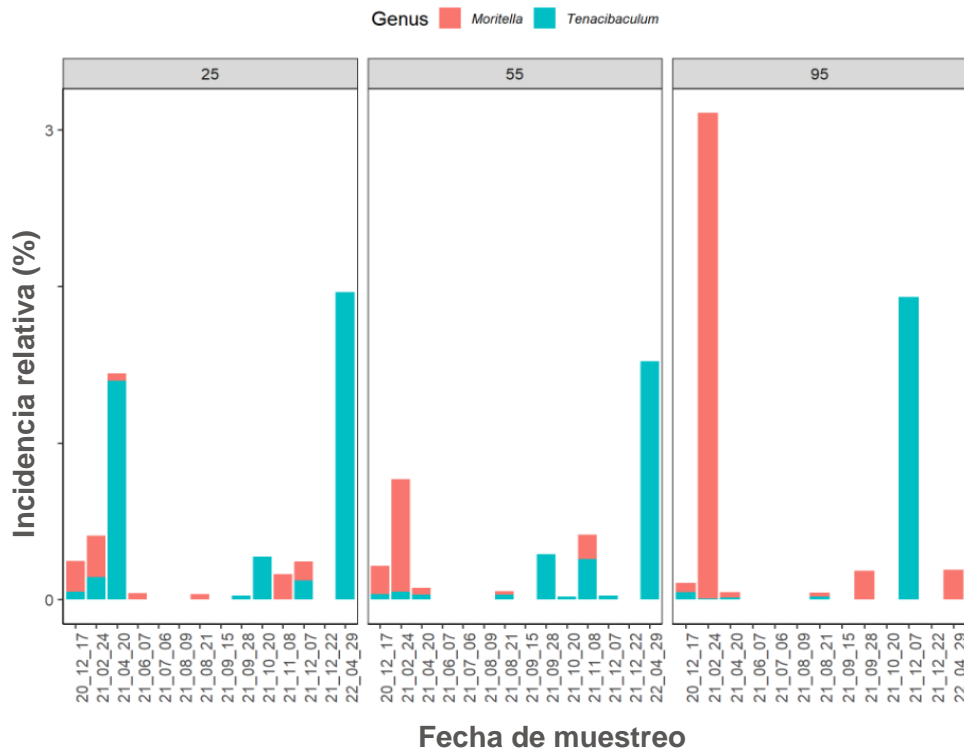
- ¿Es satisfactoria la desinfección UV?
- ¿Se debe cambiar la dosis de UV?
- ¿Necesidad de equipos extras como el O₃?
- ¿Existe bacterias patógenas en el agua de ingreso?
- ¿Hay cambios en la composición bacteriana de la fuente de agua a lo largo de las estaciones?



Análisis de la comunidad bacteriana

Agua de ingreso y bioseguridad

- Piscicultura con bombeo de agua de mar desde diferentes profundidades
- ¿Qué está presente y cuándo cambia?
- ¡Presencia de *Tenacibaculum* y *Moritella* en todas las profundidades!
- Variación estacional de las bacterias asociadas a enfermedades
- Resultados: La microbiota se modifica en mayor medida por la variación estacional más que por la profundidad del bombeo.



Análisis de la comunidad bacteriana

La microbiota en piel y sus cambios cuando hay heridas

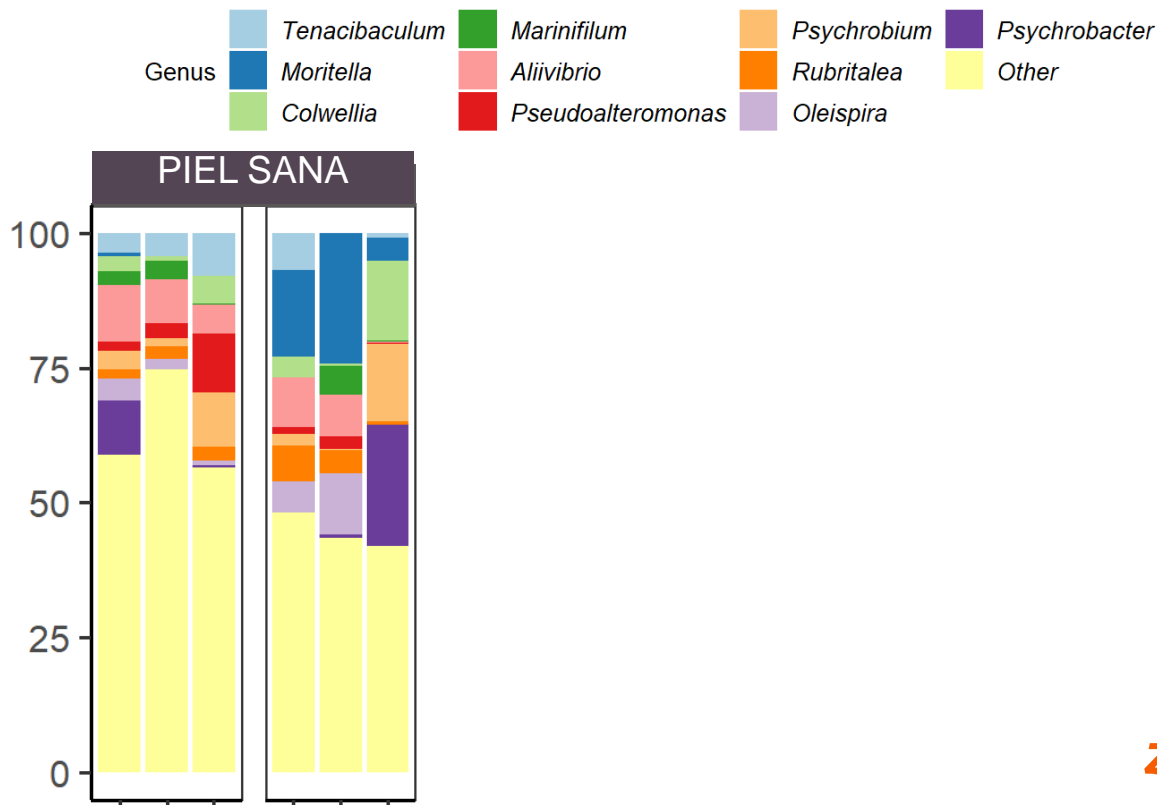
- NGS como herramienta para evaluar el estado sanitario de la piel de los peces
- Identificación de grupos de individuos propensos a cursar con ulceraciones en piel
- ¿Cómo afectan los tratamientos, los manejos u otro tipo evento estresante a la piel del pez?



Análisis de la comunidad bacteriana

Salud de la piel y desarrollo de heridas

- Cambios en la microbiota antes de la ocurrencia de un brote de úlceras
- Evaluar el efecto de los manejos y de tratamientos
- Descripción general de la piel del pez
- Detectar factores que afectan a la calidad de la piel

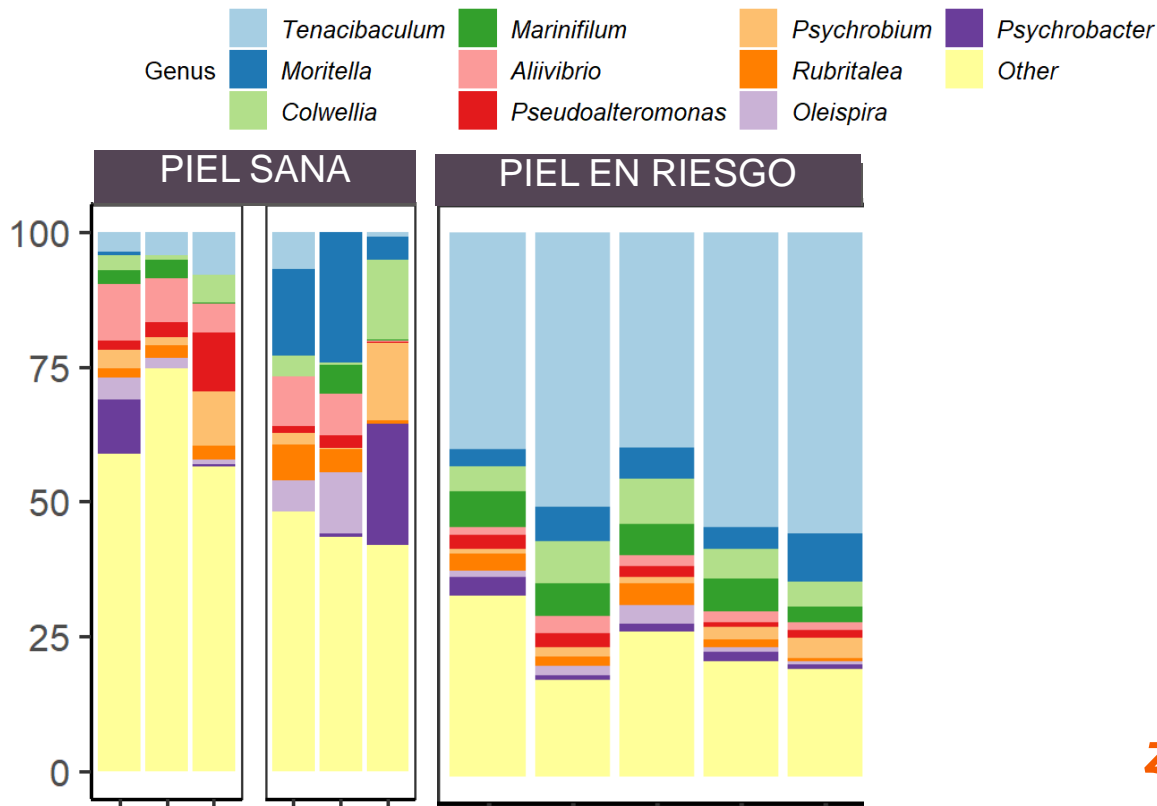


Análisis de la comunidad bacteriana

Salud de la piel y desarrollo de heridas

Piel en riesgo, ¿qué vemos aquí?

- Diversidad reducida
- Aumento de la presencia relativa de *Tenacibaculum*.

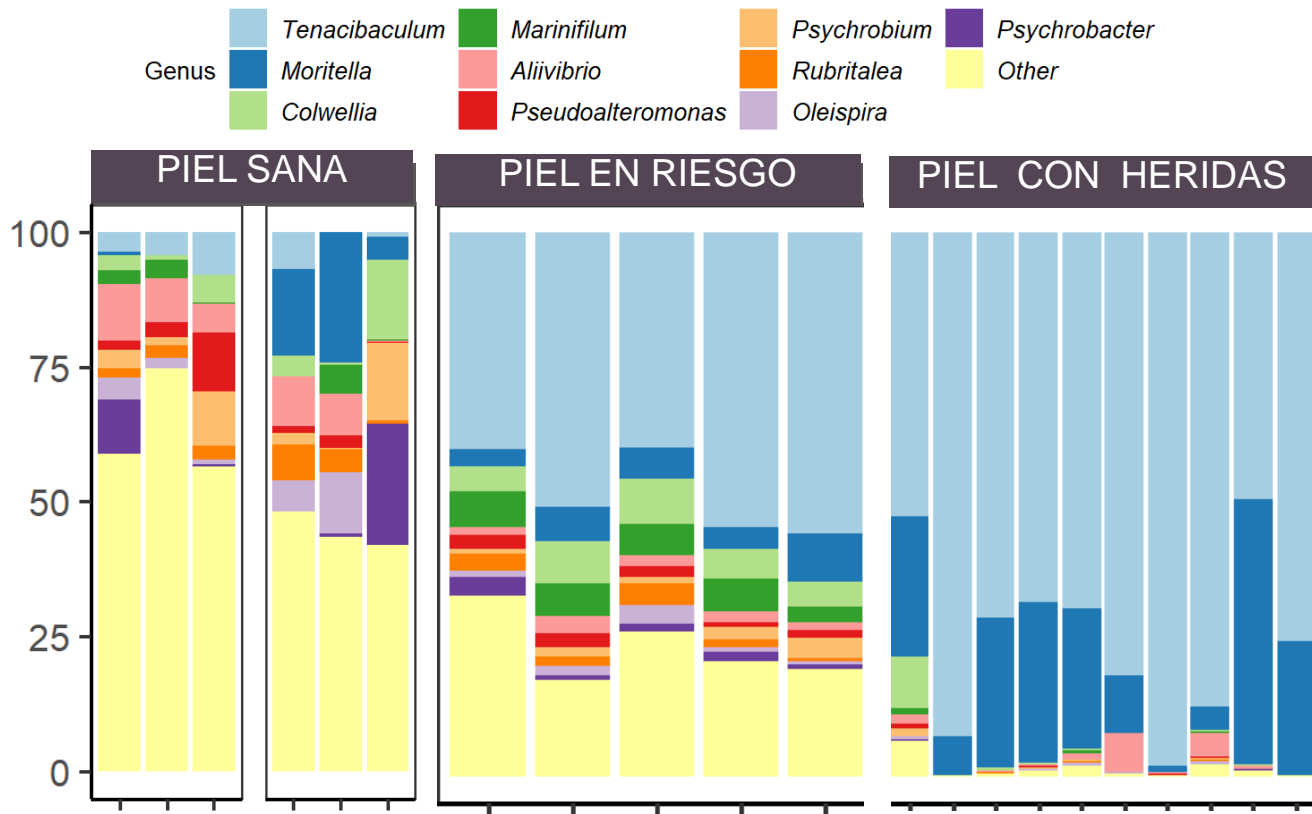


Análisis de la comunidad bacteriana

Salud de la piel y desarrollo de heridas

Piel con heridas, ¿qué vemos aquí?

- Fuerte reducción de la diversidad de géneros bacterianos presentes
- La microbiota es dominada por *Tenacibaculum* y *Moritella*.



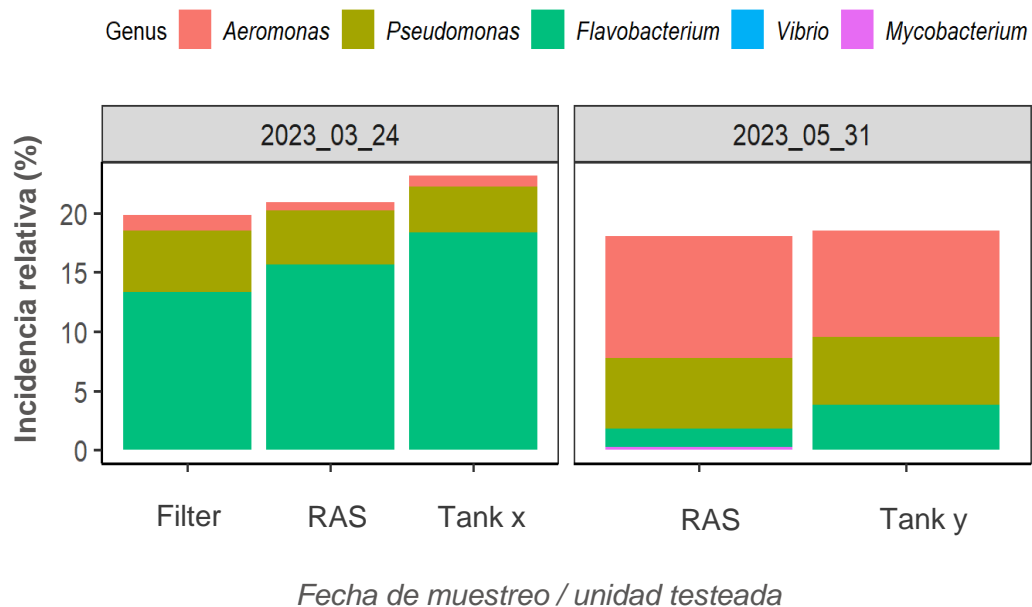
Análisis de la comunidad bacteriana

Medidas de bioseguridad

- *Aeromona salmonicida* atípica: un problema en alza
- Descontaminación y reinicio de todos los sistemas biológicos
- Muestreo de NGS antes y después del lavado

Resultados

- Aumento relativo de *Aeromonas* sp.
- Caída en los otros géneros bacterianos y nuevo brote
- Sin efecto positivo el lavado y desinfección de las unidades, piezas y partes



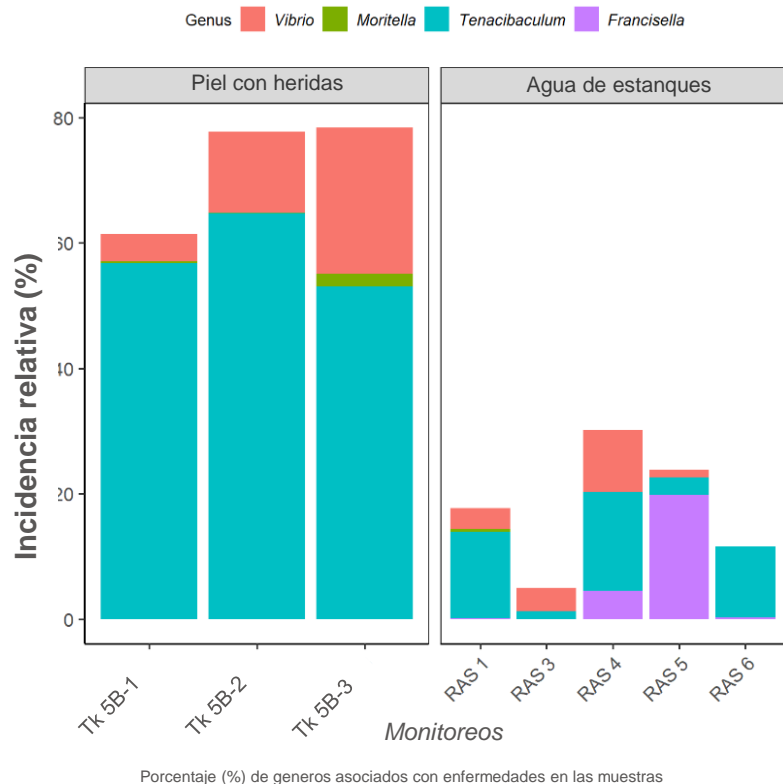
Análisis de la comunidad bacteriana

Medidas de bioseguridad

- Unidad RAS con frecuencia de heridas.
- Los torulados de heridas describen (abundancia):
 - Tenacibaculum (alta) / Vibrio (media) /Moritella (baja)
- Alta presencia de bacterias típicas de heridas en agua de RAS
- Agua y biomedica de la unidad RAS 4 se usaron para inocular la unidad RAS 1

Resultados

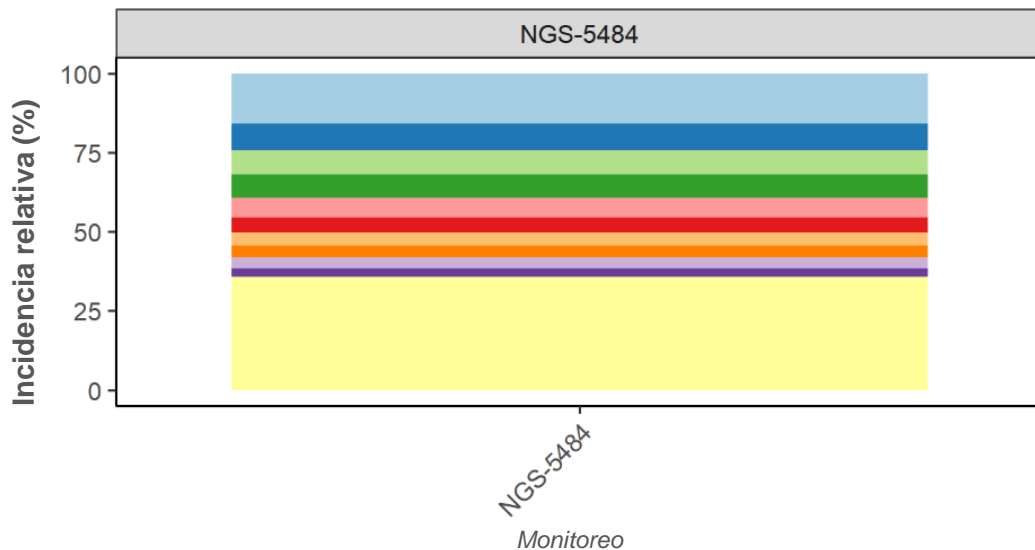
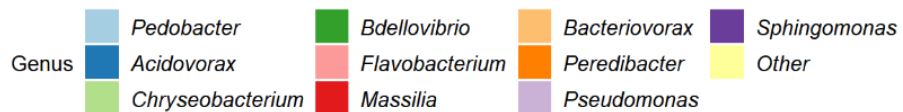
- Alta presencia de bacterias patogénicas propias de heridas en la unidad RAS 1 también
- Tener en cuenta las medidas de bioseguridad para el agua de ingreso o para el reinicio del nuevo ciclo.



Análisis de la comunidad bacteriana

Salud de la piel

- Productor de smolts para venta/entrega
- Caracterizar la condición de la piel de los smolts antes de la venta / entrega
- La salud de la piel se ve bien
- Alta diversidad y muchas bacterias ambientales diferentes.
- Documentar al comprador de que la piel del smolt no presenta desviaciones
- ¿Smolt más robusto?

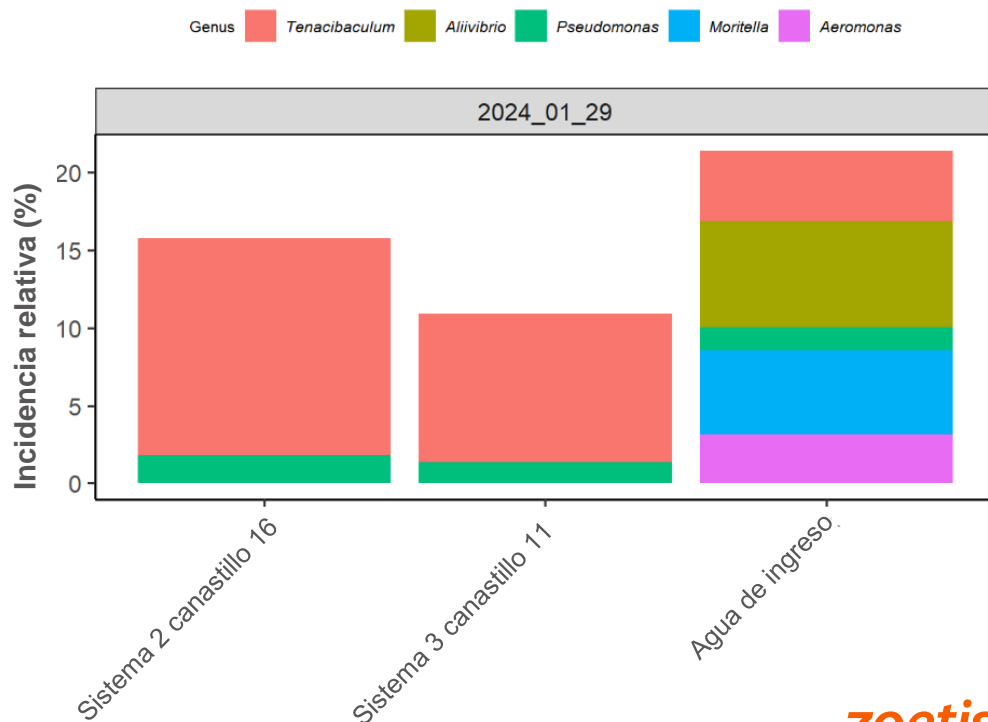


Frecuencia relativa (%) de géneros bacterianos detectados en el monitoreo de piel

Análisis de la comunidad bacteriana

Medidas de bioseguridad

- Alta mortalidad durante incubación y en la fase de primera alimentación
- Se tomaron muestras de NGS del agua de cultivo en incubación y del agua de ingreso
- Hay altos niveles de *Tenacibaculum* en el agua de cultivo y también en la de ingreso
- El análisis del caso gatilló acciones preventivas significativas para el futuro.
- Lavado de implementos y equipos
- Filtración de partículas
- Asegurar una dosis de UV suficientemente efectiva.



NGS

NEXT GENERATION SEQUENCING

Advancing
aquaculture
diagnostics

Microbiota en branquias es característica por tipo de producción

Hatchery type influences the gill microbiome of Atlantic farmed salmon (*Salmo salar*) after transfer to sea



Kelly J. Stewart¹, Annette S. Boerlage², William Barr¹, Umer Z. Ijaz¹ and Cindy J. Smith^{1*}

Abstract

Background Salmon aquaculture involves freshwater and seawater phases. Recently there has been an increase in multifactorial gill health challenges during the seawater phase which has led to an urgent need to understand the gill microbiome. There is a lack of understanding on what drives the composition of the gill microbiome, and the influence the freshwater stage has on its long-term composition. We characterise the gill microbiome from seven cohorts of Atlantic salmon raised in six different freshwater operational systems—recirculating aquaculture system (RAS), flowthrough (FT) and loch-based system, prior to and after transfer to seven seawater farms, over two different input seasons, S0 (2018) and S1 (2019).

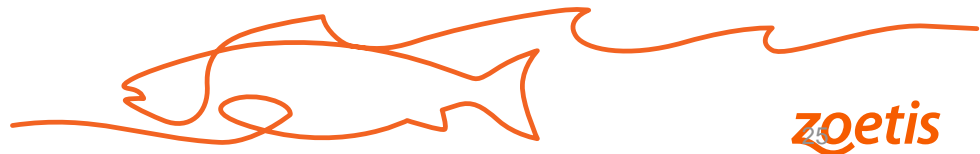
Results Using the V1-V2 region of the 16S rRNA gene, we produced amplicon libraries absent of host contamination. We showed that hatchery system influenced the gill microbiome (PERMANOVA $R^2 = 0.226, p < 0.001$). Loch and FT systems were more similar to each other than the three RAS systems, which clustered together. On transfer to sea, the gill microbiomes of all fish changed and became more similar irrespective of the initial hatchery system, seawater farm location or season of input. Even though the gill microbiome among seawater farm locations were different between locations (PERMANOVA $R^2 = 0.528, p < 0.001$), a clustering of the gill microbiomes by hatchery system of origin was still observed 7–25 days after transfer (PERMANOVA $R = 0.164, p < 0.001$). Core microbiomes at genera level were observed among all fish in addition to freshwater only, and seawater only. At ASV level core microbiomes were observed among FT and loch freshwater systems only and among all seawater salmon. The gill microbiome and surrounding water at each hatchery had more shared ASVs than seawater farms.

Conclusion We showed hatchery system, loch, FT or RAS, significantly impacted the gill microbiome. On transfer to sea, the microbiomes changed and became more similar. After transfer, the individual sites to which the fish were transferred has a significant influence on microbiome composition, but interesting some clustering by hatchery system remained. Future gill disease mitigation methods that target enhancing the gill microbiome may be most effective in the freshwater stage, as there were more shared ASVs between water and gill at hatchery, compared to at sea.

Keywords Atlantic farmed salmon, Hatchery, Seawater, 16S rRNA, Gill microbiome

NGS Y ACUICULTURA

- **Resumen**
- NGS (Next-Generation Sequencing) nos da una visión de un ecosistema complejo
- Acuicultura inteligente y responsable que permite una producción sostenible
- La microbiota describe, predice y produce peces más saludables



Contacto:



Claudio Arcos

MV, Project Manager &
Customer Support

Claudio.arcos@zoetis.com

+56 9 5189 1856



Geraldine Wittwer

Bioq, Development and new
assays in PCR

Geraldine.wittwer@zoetis.com

+56 9 3226 0106

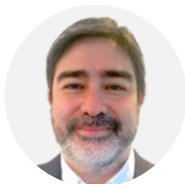


Bárbara Etcharren

MV, Technical Manager & Head
of Laboratory

Barbara.etcharren@zoetis.com

+56 9 7609 8743



Jorge Infante

MV, Diagnostics Services
Manager

Jorge.infante@zoetis.com

+56 9 4211 4079



Helene Bevan

MoIBio, NGS Manager,
Noruega

Helene.bevan@zoetis.com

+47 480 61 499



2004 - 2024



PHARMAQ

part of *zoetis*

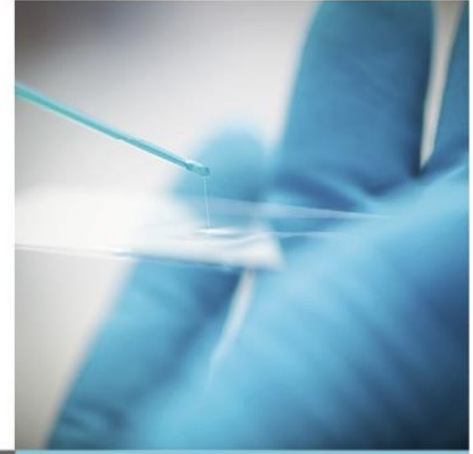
zoetis

CONTINUUM OF CARE



Asistencia Técnica

Equipo de médicos veterinarios y especialistas de amplia experiencia en producción y terreno. Área acreditada ante el INN



Biología Molecular

Sofisticada y robusta plataforma de servicios diagnósticos de la red nacional, desarrollos e innovaciones, integrada globalmente

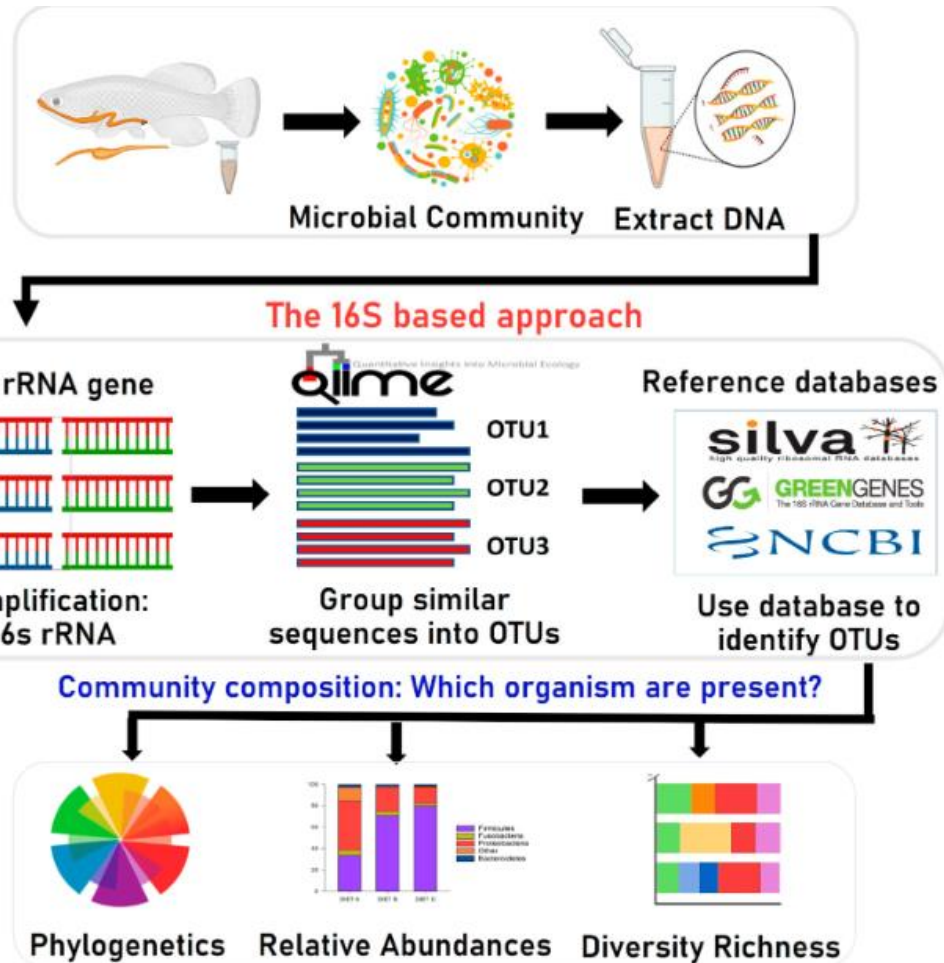


Patología Veterinaria

La más completa oferta de servicios integrados para el diagnóstico de enfermedades y estudios de parámetros de normalidad.

Análisis de la comunidad bacteriana

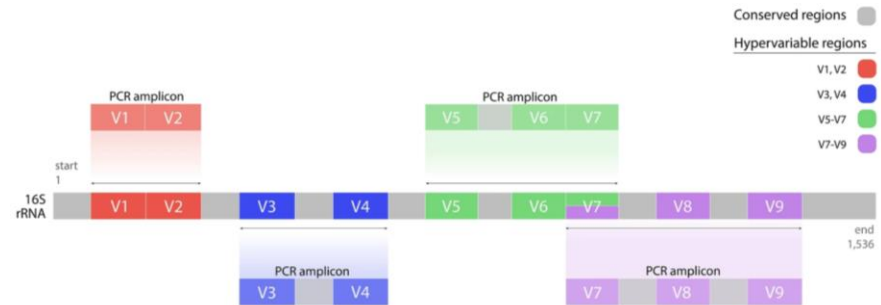
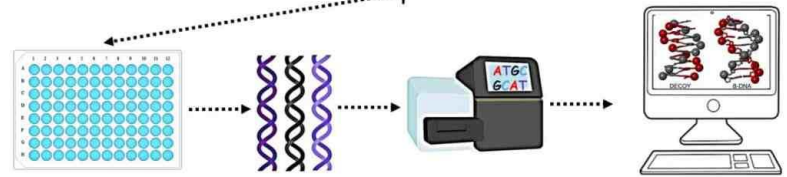
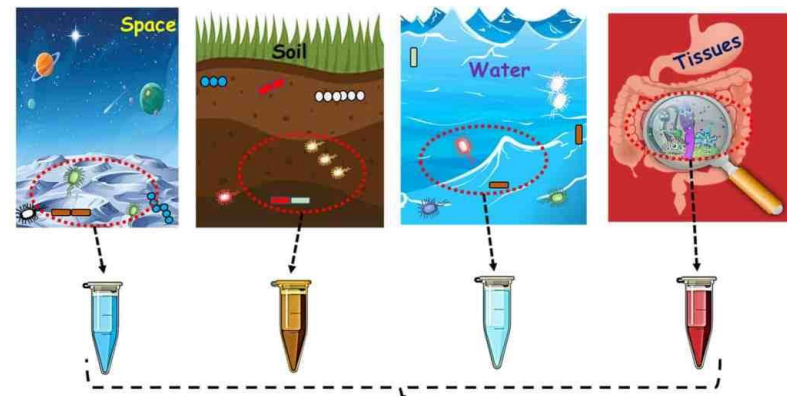
CALIDAD DE AGUA
MONITOREO BENTÓNICO
CARACTERIZACIÓN
GENÉTICA DE
PATÓGENOS Y RASTREO
MOLECULAR
SECUENCIACIÓN DEL
GENOMA COMPLETO
(WGS)



Fundamentos de NGS

NGS es el estudio del ADN genómico total obtenido directamente de las muestras ambientales, el microcosmo que interactúa en distintos planos con los sistemas vivos. El NGS puede utilizarse para comprender la evolución, la ecología y el metabolismo de los microbios presentes en un nicho ecológico, así como para investigar la relación entre la diversidad microbiana y el funcionamiento de los ecosistemas.

Identificación bacteriana a partir de secuenciación 16S rDNA



Hypervariable region strategy on 16S rRNA. A summary of the four hypervariable region strategies for amplification of variable regions V1–V2, V3–V4, V5–V7, and V7–V9 in the 16S rRNA gene (positioning is based on the *E. coli* 16S rRNA gene).