

Necrosis bacilar en larvas de ostras *Crassostrea gigas*. Reporte de caso

Bacillary necrosis in oyster larvae *Crassostrea gigas*. Case report

Alexander Varela Mejías. alexander.varela@gmail.com. Ciudad Obregón, Sonora, México

RESUMEN

La presencia de bacterias del género *Vibrio* spp., en los sistemas de producción de moluscos bivalvos, es un factor de riesgo considerable en la producción de los mismos, este documento, presenta el procedimiento y los resultados obtenidos en un bioensayo realizado con larvas de ostra del Pacífico *Crassostrea gigas* desafiadas con una cepa patogénica de *Vibrio alginolyticus*, aislada a partir de una muestra de larvas D muertas. Se describe la evolución del cuadro clínico lesional durante las primeras 24 horas y los resultados de los análisis bacteriológicos. La mortalidad de los grupos desafiados superó el 90%. Los recuentos bacterianos finales superaron los $2,7 \times 10^4$ ufc/ml. Las cepas recuperadas de los organismos muertos fueron similares en morfología a las utilizadas en el inóculo infeccioso, permitiendo establecer la causalidad de esta cepa con las mortalidades observadas en un tanque de producción.

Palabras clave. Moluscos bivalvos, mortalidades, *Vibrio alginolyticus*, patogenicidad, causalidad.

ABSTRACT

The presence of bacteria of the genus *Vibrio* spp., in bivalve mollusk production systems, is a considerable risk factor in their production. This document presents the procedure and the results obtained in a bioassay carried out with oyster larvae. Pacific *Crassostrea gigas* challenged with a pathogenic strain of *Vibrio alginolyticus*, isolated from a sample of dead D larvae. The evolution of the clinical and injury condition during the first 24 hours and the results of the bacteriological analyzes are described. The mortality of the challenged groups exceeded 90%. The final bacterial counts exceeded 2.7×10^4 cfu/ml. The strains recovered from the dead organisms were similar in morphology to those used in the infectious inoculum. Allowing to establish the causality of this strain with the mortalities observed in a production tank.

Keywords. Bivalve molluscs, mortalities, *Vibrio alginolyticus*, pathogenicity, causality.

INTRODUCCIÓN

La actividad acuícola mundial ha experimentado un rápido incremento durante las últimas décadas, convirtiéndose en una importante fuente de alimentos de alta calidad, a la vez que ha dado lugar a la generación de una creciente cantidad de empleos, tanto directos como indirectos. Dentro de esta actividad, los aportes de la acuicultura han alcanzado y superando a las producciones obtenidas a partir de las capturas naturales, las cuales se encuentran prácticamente estancadas y en algunos casos, sobreexplotadas y decreciendo (FAO, 2020).

Actualmente, las producciones generadas por la acuicultura, se componen tanto de organismos dulceacuícolas como marinos, incluyendo a diferentes peces, crustáceos, moluscos, algas, mamíferos, reptiles y en menor proporción a otras especies. Durante el 2018, según los datos brindados por el Informe del Estado mundial de la pesca y la acuicultura, el cultivo de organismos acuáticos generó 51,3 millones de toneladas de productos. Siendo la producción de moluscos, la segunda en importancia (fig. 1), sumando un total de 17,7 millones de toneladas, con un valor de 34 600 millones de USD (FAO, 2020).

El cultivo y producción de moluscos, depende en gran medida de las semillas producidas en laboratorios especializados. La obtención de estas semillas abarca diversas estrategias, que incluyen manejo de los parámetros físico químicos en laboratorios; mientras que la cosecha y comercialización exigen protocolos que garanticen una buena calidad e inocuidad de los productos (Cáceres y Vásquez, 2014; Varela y Alfaro-Mora, 2020).

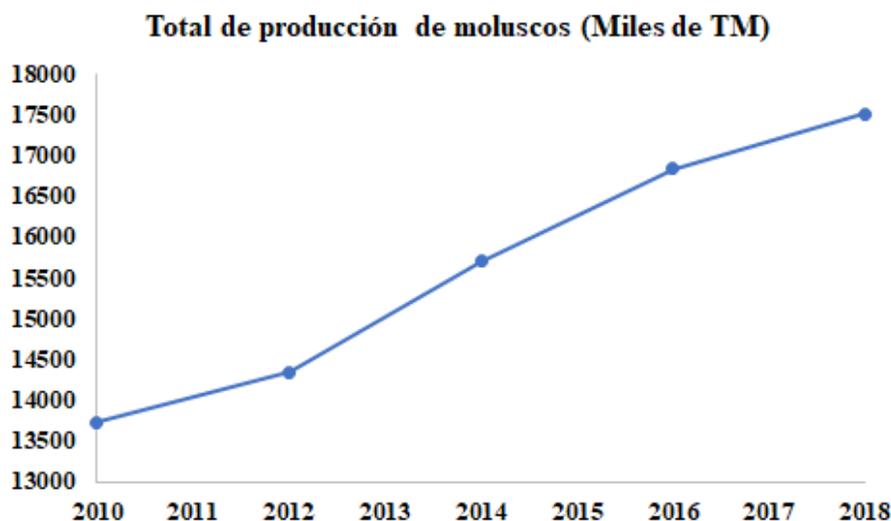


Fig. 1. Comportamiento creciente de los aportes de producción por los moluscos. Adaptado de FAO (2020)

En estos laboratorios de producción de semillas de moluscos, es indispensable realizar monitoreos sanitarios durante sus diferentes etapas de producción, estableciendo sistemas de detección temprana que permitan evitar los potenciales eventos infecciosos (Figueras y Novoa, 2011; Cáceres y Vásquez, 2014). La realización de un control efectivo de detección de patógenos requiere de la supervisión constante de las instalaciones y los organismos en cultivo, así como de la implementación de estrategias preventivas y, por último, llevar a cabo diagnósticos efectivos y confiables (Cáceres y Vásquez, 2014).

En estos establecimientos, las infecciones por diversas especies de bacterias han sido documentadas.

Presentando mayor impacto durante los estadíos larvales y juveniles tempranos (Lodeiros *et al.*, 1987; Romalde y Figueras, 2011; Dubert *et al.*, 2016), observándose una razonable tolerancia en organismos adultos (Tubiash *et al.* 1965), los cuáles, sin embargo pueden actuar como reservorios del patógeno, siendo un factor de riesgo para las larvas y juveniles (Figueras y Novoa, 2011).

Típicamente, entre las principales causas de mortalidades en moluscos, se han reportado a agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos, protozoos y metazoos; así como condiciones ambientales particularmente adversas. En el caso de México, los principales agentes reportados son de tipo viral y parasitaria, con escasos reportes de eventos infecciosos bacterianos (Cáceres y Vásquez, 2013).

A pesar de que múltiples especies bacterianas han sido descritas, incluyendo a géneros como *Mycobacterium* (Carella *et al.*, 2019), *Pseudomonas* (Lodeiros *et al.*, 1992), *Nocardia* (Friedman y Hedrick, 1991) y *Roseovarium* (Romalde y Figueras, 2011), las infecciones reportadas por *Vibrio* sp., son la principal causa de mortalidad, afectando, sobre todo, a los laboratorios de producción en estadios iniciales de desarrollo (Elston *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2014; Dubert *et al.*, 2016).

Para este género, se han identificado a diferentes especies asociadas a mortalidades importantes, incluyendo a *Vibrio tubiashii*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*; *V. neptunius*, *V. pectenica* y *V. splendidus*. (Tubiash *et al.*, 1965; Jeffries, 1982; Lodeiros *et al.*, 1987; Elston *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2014). Recibiendo el nombre de “*Necrosis bacilar*”, la cual puede comprometer severamente las sobrevivencias en las etapas larvares del cultivo (Tubiash *et al.*, 1965).

El presente trabajo, presenta los resultados de un bioensayo realizado con el fin de aislar, identificar y establecer un posible tratamiento de un brote de necrosis bacilar, para larvas de la ostra japonesa *Crassostrea gigas*, en un laboratorio de Sinaloa, México.

ANTECEDENTES

Durante el año 2021 se presentaron mortalidades puntuales y atípicas en un tanque larvario de *C. gigas*. Las larvas se encontraban contenidas en tanques de 20 000 L, llenados con agua marina, sometida secuencialmente a procesos de filtrado con arena, sedimentación, filtrado multimedia, cartuchos de 5µm y 1 µm, para pasar finalmente por tratamientos ultravioleta. Estos tanques recibieron recambios de agua del 100% de su volumen cada 48 h.

Los lotes de larvas fueron alimentados diariamente, utilizando microalgas de la especie *Pavlova lutheri* y los tanques recibieron aireación constante. Durante el inicio del evento infeccioso, se observaron acumulaciones de larvas en el fondo del tanque, formando manchas marrones o rojizas, fenómeno denominado “*spotting*”. Se realizaron observaciones microscópicas en larvas moribundas o muertas, las cuales presentaban una alta concentración de bacterias móviles.

En los análisis bacteriológicos realizados en agar TCBS, selectivo diferencial para *Vibrio* spp. Se aislaron cepas Gram negativas, sucrosa positivas, con recuentos de $4,2 \times 10^5$ ufc/gr de larva, pero sin presentar conteos elevados en las muestras de la columna de agua de los mismos tanques, con recuentos de $1,1 \times 10^3$ ufc/ml para el mismo medio de cultivo.

Estas observaciones y resultados, por sí mismos, son insuficientes para establecer si la presencia bacteriana se dio como consecuencia de colonizaciones de animales muertos, o si, por el contrario, se trató de mortalidades ocasionadas por una infección activa.

Por lo anterior, se realizó un bioensayo, cuyo objetivo fue establecer la posible patogenicidad de la cepa bacteriana aislada.

MATERIALES Y MÉTODOS

LARVAS

Se utilizaron larvas de *C. gigas* provenientes de un tanque en el cual no se detectaron mortalidades o comportamientos anómalos, obtenidas de un desove realizado 24 horas antes, con una densidad inicial de 14 larvas/ml. De las cuales, aproximadamente el 90% se encontraban en estadio “D” de desarrollo y el restante 10% permanecían aun como trocóforas.

Estos organismos se sometieron a evaluaciones microscópicas, determinando su actividad, morfología, estadio y condición general, siendo todos estos parámetros normales. Se realizaron, además, análisis bacteriológicos en agar TCBS, selectivo-diferencial para *Vibrio* sp., con el fin de determinar una posible carga bacteriana inicial y la identificación de la cepa aislada.

INÓCULO BACTERIANO

Se utilizó la cepa C-2021-56, formadora de colonias sucrosa positivas, convexas, de forma regular, pequeñas (diámetro \approx 1mm), no bioluminiscentes, recuperadas de muestras de los animales moribundos en el tanque con mortalidades, aisladas a partir de muestras procesadas en agar TCBS.

Se preservó una muestra para su identificación bioquímica posterior, la cual se procesó mediante el método API según las indicaciones del fabricante. Se realizaron, además, pruebas de Tinción de Gram y Pruebas de sensibilidad a antibióticos por difusión en agar, según lo descrito en Murray *et al.*, (2013).

DISEÑO EXPERIMENTAL

Las larvas se distribuyeron equitativamente en tres contenedores de 200ml, para un total aproximado de 2800 larvas por grupo. Estas larvas fueron mantenidas con aireación y alimentadas con microalgas *Pavlova lutheri* en la densidad y frecuencia estándar del laboratorio, en un rango de temperaturas entre 25 y 27°C.

Los grupos “A” y “B”, fueron inoculados en el tiempo “0”, con la cepa C-2021-56, a una densidad final aproximada de 1×10^4 ufc/ml. Un tercer grupo, denominado “C” fue utilizado como grupo control, sometiéndolo a las mismas condiciones, pero “inoculadas” con solución salina estéril.

Se realizaron revisiones con un microscopio Labomed CxL, cada tres horas durante las primeras doce horas, con el fin de detectar cambios en el comportamiento, mortalidad o presencia bacteriana en los animales, registrando todos los hallazgos. Las larvas se observaron en cámaras de Sedgewick Rafter para evitar daños o mortalidad por aplastamiento con el cubreobjetos.

Se realizaron análisis bacteriológicos en el agua pre inoculación (tiempo 0) y a las 24 horas post infección (hpi), utilizando para ello, al agar selectivo diferencial TCBS. Además, se realizaron análisis de sensibilidad a antibióticos, mediante antibiogramas en agar Mueller-Hinton, incubando en ambos casos por 24 horas a 35°C.

RESULTADOS

Cepa bacteriana

La cepa obtenida brindó resultados de tinción Gram negativa. Además, los resultados de identificación mediante el sistema de galerías API indican que se trata de una cepa de *Vibrio alginolyticus*.

Los resultados bacteriológicos, obtenidos a partir de las muestras de los tres tratamientos, se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Resultados bacteriológicos en muestras de agua (ufc/ml).

Tiempo hpi	Grupo A		Grupo B		Grupo C	
	Sucrosa +	Sucrosa -	Sucrosa +	Sucrosa -	Sucrosa +	Sucrosa -
0	1,0 x 10 ²	<10	1,2 x 10 ²	<10	1,1 x 10 ²	<10
24	2,8 x 10 ⁴	<10	2,7 x 10 ⁴	<10	1,1 x 10 ³	6 x 10 ¹

El 100% de las colonias recuperadas en los grupos A y B fueron sucrosa positivas, de pequeñas dimensiones y forma regular. Por su parte, en el grupo control se detectaron colonias sucrosa positivas y negativas. La morfología de las colonias también difirió en este grupo, incluyendo colonias pequeñas y con forma regular y colonias medianas, con bordes irregulares. Ninguna colonia presentó bioluminiscencia. Los análisis realizados sobre la cepa C-2021-56, confirmaron su identidad como *Vibrio alginolyticus*.

Los resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos, sobre esta cepa, se presentan en la tabla 2:

Tabla 2. Resultados de la Prueba de sensibilidad a antibióticos

	R	I	S
Oxitetraciclina			X
Florfenicol		X	
Enrofloxacina			X

R= resistente; I= intermedio; S= sensible

Observaciones al microscopio:

0 hpi: Las larvas de los tres grupos presentan actividad normal, natación constante, su desplazamiento describe trayectorias circulares amplias y el movimiento ciliar es uniforme. Los velos lucen íntegros, con actividad contráctil regular. Se observa claramente el movimiento de las estructuras internas, incluyendo el músculo retractor del velo y el tracto digestivo.

3hpi: Grupos A y B: se observan algunos organismos aletargados, sin reducción apreciable de la actividad de alimentación, el movimiento ciliar continúa sin alteraciones evidentes. El grupo C presenta la misma actividad que mostró al inicio del ensayo. En todos los grupos permanece una proporción baja de trocóforas.

6hpi: Grupos A y B: presentan una creciente quiescencia, algunos organismos presentan una anormal distensión y ataxia del velo (fig. 1A) y una reducción en la actividad natatoria. El movimiento ciliar continúa

uniforme, excepto en los organismos quiescentes. El grupo C no presenta alteraciones evidentes.

9 hpi: Grupos A y B: ataxia evidente, se observa mortalidad (<10%), con presencia de bacterias móviles en el exterior de algunos animales moribundos o muertos, en un movimiento semejante a “enjambres” (fig. 1B). El movimiento de la mayoría de los animales, en caso de estar presente, es rotatorio sobre su propio eje, sin desplazamientos efectivos. Persisten algunos animales sin cambios conductuales. Estas anomalías están ausentes en el grupo C. La presencia de trocóforas es prácticamente nula en todos los grupos.

12 hpi: Grupos A y B: mayor mortalidad (20-25%), reducción de actividad natatoria y alimenticia notoria, algunos de los animales muertos o moribundos presentan necrosis granular, formando acúmulos esféricos no identificados y presencia interna de bacterias móviles (fig. 1C). Las bacterias en movimientos de enjambre se observan, pero en menor proporción que en la revisión previa, se observan cantidades variables de bacterias móviles dentro de las valvas. El grupo C continúa sin alteraciones evidentes.

24 hpi: Grupos A y B: mortalidades mayores al 90%. En la mayoría de los organismos muertos no es posible identificar órganos o estructuras internas, luciendo como masas uniformes con posible licuefacción tisular y decoloración. En este punto, no se detecta el comportamiento de enjambre de las bacterias, los restos de organismos muertos presentan una colonización bacteriana interior extremadamente alta (fig. 1D). Aún permanecen algunos organismos vivos (<10%), con comportamiento aparentemente normal y alimentándose activamente. El grupo C no presentó anomalías o mortalidades detectadas. Presencia de microalgas *P. lutheri* en todos los grupos.

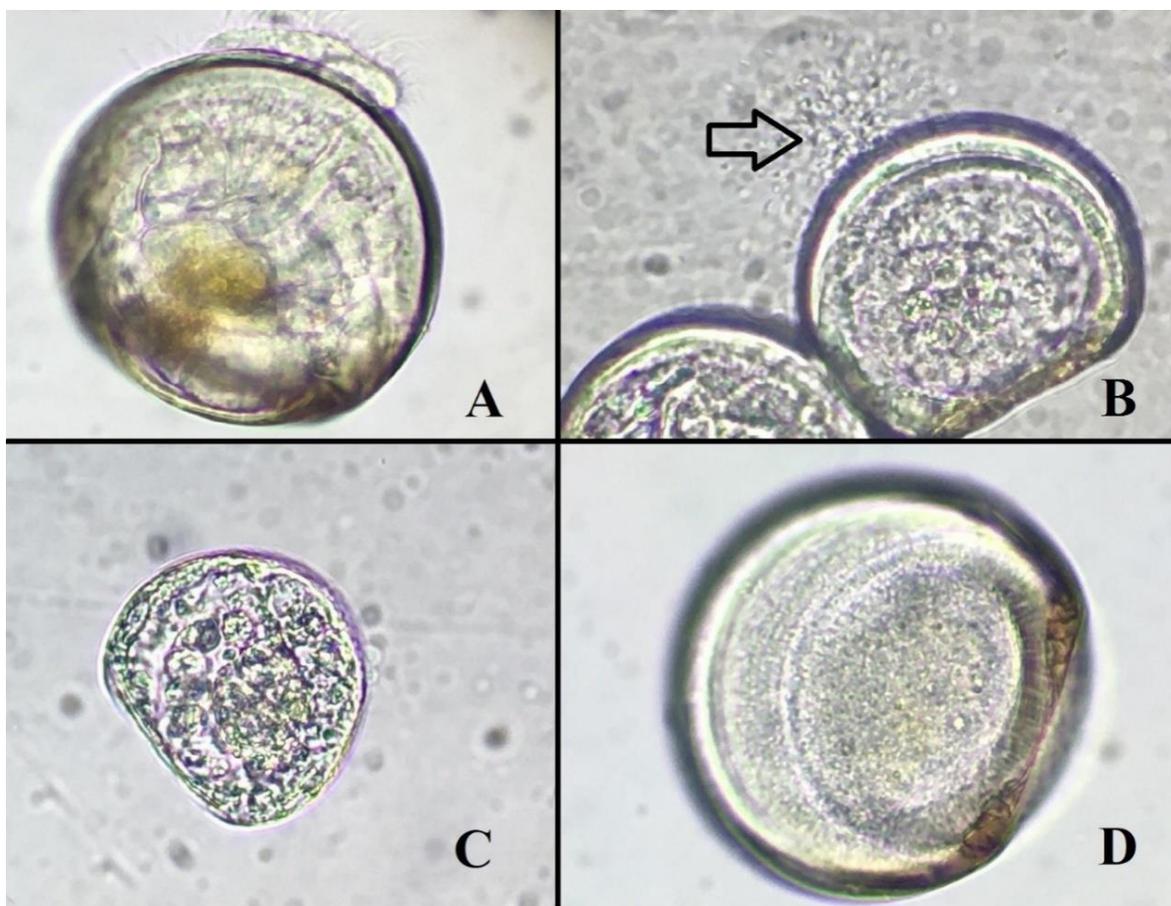


Figura 1. Principales signos observados durante el bioensayo. A. larva quiescente con distensión velar. B. *swarming* bacteriano en el exterior de larva (flecha). C. Necrosis de tipo granular en el interior de la larva. D. licuefacción de tejidos en larva muerta y acumulación de bacterias móviles. Sin tinción A, B y

D, 400x. C 300x

DISCUSIÓN:

Luego de un estado inicial normal, se observa una rápida evolución clínico-lesional hacia un cuadro patológico agudo, caracterizado por cambios conductuales y lesiones progresivas en los organismos inoculados.

Estos organismos redujeron rápidamente su actividad, nadando con menor velocidad y describiendo círculos cada vez más reducidos. Reacción que coincide con el reportado por Tubiash y colaboradores (1965), en infecciones experimentales en *Mercenaria mercenaria*, este comportamiento representaría una señal de alerta temprana, como primer cambio conductual en estas infecciones.

Progresivamente, los organismos desafiados pierden movilidad por largos periodos de tiempo, para reiniciar el nado por periodos cortos. En este punto no se observaron bacterias, posiblemente por estar en una cantidad relativamente baja o por las limitaciones del tipo de análisis realizado, principalmente por las dimensiones de las bacterias y por procesar muestras sin tinciones o contrastes.

Muchas larvas presentaron una característica distensión del velo, asociada a debilidad, el movimiento ciliar, fue menos vigoroso que al inicio del ensayo. Esta distensión velar ha sido reportada en otros moluscos ante infecciones bacterianas (Guillard, 1959; Tubiash *et al.*, 1965). En estos reportes, se mencionan, además, desprendimiento del velo y la aparición de estrías en el cuerpo (Guillard, 1959; Tubiash *et al.*, 1965; Romalde y Prado, 2011), lesiones que no fueron observadas en el presente trabajo.

A las 9 hpi, se observó presencia y actividad bacteriana, en un comportamiento similar a enjambres, reportado previamente como “*swarming*” por Tubiash *et al.*, (1965), describiéndolo como un signo patognomónico de la Necrosis bacilar. Durante el presente trabajo, este signo solo se observó en larvas inmóviles o en larvas que giraban sobre su propio eje. No en larvas que continuaban nadando. Lo que sugiere que la quiescencia es necesaria para que se presente esta condición. La mortalidad se incrementó progresivamente, en animales que desarrollaron necrosis granular. En este punto es muy probable que los animales más débiles mueran y sirvan como “sustratos” o alimento que aceleren la reproducción bacteriana.

Durante la etapa final del ensayo, la mortalidad de los organismos desafiados superó el 90%, en tanto que la mortalidad del grupo control fue de solo 3%. Los daños tisulares de los grupos A y B eran muy evidentes, unidos a una posible degradación *post mortem*. El movimiento de enjambre no se observó en esta etapa, aunque si ha sido descrita en otros trabajos (Guillard, 1959; Tubiash *et al.*, 1965; Brown y Losee, 1978). Es posible que este comportamiento dependa de la cepa utilizada o se presente únicamente en el pico de mayor actividad bacteriana, disminuyendo paulatinamente, paralelo a la reducción de hospedadores potenciales que infectar.

La presencia de organismos sin cambios clínico-lesionales a las 24 hpi en los grupos desafiados, podría estar relacionado con la existencia de larvas en estadio de trocófora al inicio del desafío. Se debe considerar que en este estadio los organismos aún no se alimentan, siendo factible suponer que la infección estaría relacionada con esta actividad, siendo, por tanto, la ruta entérica la utilizada por las bacterias para infectar al organismo. Esta misma ruta fue sugerida por Tubiash para larvas de *M. mercenaria*, *Ostrea edulis*, *Aequipecten irradians* y *Teredo navalis*, pero en su caso, se basó en que las últimas larvas en morir eran las que presentaban malformaciones, indicando que posiblemente debido a ello, no se alimentaban (Tubiash *et al.*, 1965). Este mecanismo de infección concuerda con el descrito en otros estudios (Dubert *et al.*, 2016). Sin ser el único propuesto, Elston y Leibovitz (1980), por ejemplo, sugieren el manto, la cavidad viceral, el velo y glándula digestiva como posibles rutas de ingreso en estudios realizados en *Crassostrea virginica*.

La presencia de microalgas durante todo el ensayo, en los tres grupos, indican que el alimento para las larvas no presentó limitaciones. Por lo que se considera que la inanición no sería la causa de la reducción de actividad y posterior quiescencia. La velocidad en el desarrollo de mortalidades, podría obedecer a la carga bacteriana utilizada en el desafío, superando al umbral mínimo infeccioso (Jeffries, 1982; Romalde y Prado, 2011). Se plantea esto considerando que las larvas del grupo control no desarrollaron signos patológicos a pesar de que también presentaron presencia bacteriana. Lo que sugiere que además de la presencia bacteriana, se requiere que estas superen el umbral mínimo infectivo, o que otro factor actúe como detonante, sin los cuales no hay desarrollo del cuadro infeccioso (Elston *et al.*, 2008).

Sobre la diversidad de las bacterias recuperadas, se observó un predominio fenotípico en las colonias presentes en los grupos desafiados, siendo exclusivamente colonias sucrosa positivas, pequeñas y regulares, pertenecientes a la especie *V. alginolyticus*. En tanto que el grupo control presentó diversos tipos de colonias. Esto implica que además de los altos conteos observados en los grupos inoculados, lo que era de esperarse por el inóculo aplicado, también se presentó un predominio de una especie bacteriana. Lo que sugiere que además de la presencia de bacterias en concentración suficiente, se requiere que estas predominen para provocar eventos infecciosos. La presencia bacteriana en larvarios es usual y aparentemente inocua, a menos que factores externos, como las condiciones del agua y los animales lo detonen (Jeffries, 1982; Lodeiros *et al.*, 1987; Elston *et al.*, 2008; Dubert *et al.*, 2016).

La cantidad y tamaño de los animales usados en el ensayo, no permitió disponer de muestras suficientes para su análisis bacteriológico, optando por usar muestras de agua de superficie y fondo. Los recuentos obtenidos fueron apenas superiores en las muestras de fondo, lo que podría deberse a la carga inicial inoculada y al pequeño volumen de agua utilizado. Situación que contrasta con los tanques larvarios, cuyos volúmenes superan los 20,000L.

Las colonias bacterianas recuperadas en los grupos infectados son similares a las utilizadas en las inoculaciones. El desarrollo de los signos clínicos y las mortalidades observadas son también congruentes con el caso original y consistentemente diferente al grupo control, cumpliendo con los postulados de Koch. Estas colonias presentaron sensibilidad a la Oxitetraciclina y a la Enrofloxacin, en tanto que el florfenicol presentó resultado intermedio. Esto sugiere que los antibióticos Oxitetraciclina y Enrofloxacin podrían ser utilizados en tratamientos metafilácticos para eventos futuros. Previa confirmación de la sensibilidad al fármaco (Figueras y Novoa, 2011; Murray *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

Basado en los resultados, se concluye que la causa de las mortalidades observadas en el tanque larvario, se debieron a una infección por la cepa C-2021-56 de *Vibrio alginolyticus*. Desarrollando experimentalmente un cuadro patológico de necrosis bacilar dentro de las primeras 24 hpi, con mortalidades superiores al 90%. El grupo control presentó baja y diversa presencia bacteriana, sin desarrollar signos clínicos lesionales detectables o mortalidades. Las bacterias presentes fueron aparentemente inocuas, bajo las condiciones descritas.

Considerando la cronología del desarrollo del cuadro clínico, es posible que la ruta de infección más probable sería la entérica, esto basado en las observaciones, según las cuales, la proporción afectada inicialmente, coincide con la presente como larva D, sin afectar aparentemente, a las larvas que se encontraban en estadio de trocófora al iniciar el ensayo, las cuales dependen aún de sus reservas vitelinas.

El establecimiento de la ruta de ingreso de las bacterias al sistema de producción, deberá ser investigado en

trabajos futuros, pero tentativamente, se considera que los alimentos y el bioma de los reproductores se encuentran entre los posibles factores de riesgo a evaluar.

REFERENCIAS

- Brown, C. Losee, E. 1978. Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in *Crassostrea virginica* larvae. J. Invertebr. Pathol. 31: 41-47. DOI: 10.1016/0022-2011(78)9 Ciencia Pesquera
- Cáceres, J. Vásquez, R. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. Ciencia pesquera. Vol. 21, abril de 2013-0107-6
- Cáceres, J. Vásquez, R. 2014. Manual de buenas prácticas para el cultivo de moluscos bivalvos. OIRSA OSPESCA. 117pp.
- Cáceres, J. Vásquez, R. 2001. Manual de enfermedades en moluscos. Boletín del programa nacional de sanidad acuícola y la red de diagnóstico. México. Año 4, Vol. 4, N° 16
- Carella, F. Aceto, S. Pollaro, F. Miccio, A. Iaria, C. Carrasco, N. Prado, P. de Vico, G. 2019. A mycobacterial disease is associated with the silent mass mortality of the pen shell *Pinna nobilis* along the Tyrrhenian coastline of Italy. Scientific Reports. 9:2725. DOI: 10.1038/s41598-018-37217-y
- Dubert, J. Nelson, D. R. Spinard, E. J. Kessner, L. Gomez-Chiarri, M. da Costa, F. Prado, S. Barja, J. L. 2016. Following the infection process of vibriosis in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*) larvae through GFP-tagged pathogenic *Vibrio* species. J Invertebr. Pathol. DOI: 10.1016/j.jip.2015.11.008
- Elston, R. Hasegawa, H. Humphrey, K. L. Polyak, I. K. Häse, C. C. 2008. Re-emergence of *Vibrio tubiashii* in bivalve shellfish aquaculture: severity, Environmental drivers, geographic extent and management. Dis Aquat Org. Vol. 82: 119–134. DOI: 10.3354/dao01982
- Elston, R. Leibovitz, L. 1980. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, *Crassostrea virginica*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 37: 964-978. DOI: 10.1139/f80-126
- FAO. 2020. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2020. La sostenibilidad en acción. Roma. Italia. DOI: 10.4060/ca9229es
- Figueras, A. Novoa, B. 2011. Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en Acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura - Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. 541pp
- Friedman, C. S., Hedrick, R. P. 1991. Pacific oyster nocardiosis: isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. J. Invertebr. Pathol. 57: 109-120. DOI: 10.1016/0022-2011(91)90047-T
- Guillard, R. R. L. 1959. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. Biol. Bull. 117: 258-266. DOI: 10.2307/1538905
- Jeffries, V. E. 1982. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Aquaculture, 29 (3-4), 201–226. DOI:10.1016/0044-8486(82)90136-3
- Lodeiros, C. L. Bolinches, J. Dopazo, C. P. Toranzo, A. E. 1987. Bacillary necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. Aquaculture, 65: 15-29.
- Lodeiros, C. L. Freitas, Y. Vélez, A. 1992. Necrosis bacilar en larvas del bivalvo *Euvola ziczac* (Linneo, 1758) causada por una *Pseudomonas* sp. Microbiología, Acta Científica Venezolana 43: 154-158
- Murray, P. R. Rosenthal, K. S. Pfaller, M. A. 2013. Microbiología médica. 7° edición. Elsevier. España.
- Prado, S. Dubert, J. da Costa, F. Martínez-Patino, D. Barja, J. L. 2014. Vibrios in hatchery cultures of the razor clam, *Solen marginatus* (Pulteney). Journal of Fish Diseases, 37, 209–217. DOI:10.1111/jfd.12098
- Romalde, J. L. 2012. Héroe y villanos: bacterias asociadas al cultivo de moluscos. Revista AquaTIC, N.º 37: 45-59.
- Romalde, J. L. Prado, S. 2011. Enfermedades bacterianas de moluscos bivalvos. In: Figueras A, Novoa B. Enfermedades de moluscos bivalvos de interés en Acuicultura. Fundación Observatorio Español de Acuicultura - Consejo Superior de Investigaciones Científicas- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. pp: 93-145.
- Tubiash, H. S. Chanley, P. E. Leifson, E. 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve

- mollusks I. Etiology and epizootiology. *J. Bacteriol.* 90: 1036-1044. DOI: 10.1128/JB.90.4.1036-1044.1965
- Varela, A. Alfaro-Mora, R. 2020. Principales estrategias en la obtención de poliploides en moluscos bivalvos. *Rev. Colombiana Cienc. Anim. Recia.* 2020; 12(2): e844. DOI: 10.24188/recia.v12.n2.2020.844