Revista AquaTIC, nº 37, pp. 45-59. Año 2012
ISSN 1578-4541

Héroes y villanos: bacterias asociadas al cultivo de moluscos

Jesús L. Romalde

Departamento de Microbiología y Parasitología, CIBUS-Facultad de Biología, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Vida s/n, 15782 Santiago de Compostela, España.
E-mail: jesus.romalde@usc.es

Resumen

La acuicultura de moluscos se ve seriamente afectada por patógenos bacterianos que causan grandes pérdidas en los criaderos, así como en los bancos naturales. Los principales responsables de los brotes de mortalidad son diferentes especies de Vibrio, consideradas importantes patógenos en acuicultura. Con la introducción de nuevas especies al cultivo intensivo, como la oreja de mar (gasterópodos) y el pulpo (cefalópodos), también han aparecido nuevos patógenos potenciales, incluyendo entre otros algunos miembros de los géneros Pseudomonas o Serratia. El presente trabajo ofrece una visión actualizada de las principales enfermedades que afectan a los diferentes grupos de moluscos. Por otro lado, desde hace algunos años se ha prestado especial atención al uso en los criaderos de moluscos de bacterias con actividad antimicrobiana, con el fin de controlar la composición de la microbiota asociada a los cultivos larvarios, evitar la presencia de patógenos, y mejorar la supervivencia de las larvas. Diferentes taxones, como Phaeobacter o Pseudoalteromonas se han propuesto como probióticos (definición ampliada para la acuicultura) eficaces y ensayado en condiciones de laboratorio y de criadero.

Palabras Claves: Moluscos, bacterias, patología, probiosis.

Summary

Heroes and villains: bacteria associated with mollusk culture.

Molluscan aquaculture is seriously affected by bacterial pathogens that cause great losses in hatcheries and in natural beds. Different Vibrio species, considered important pathogens in aquaculture, are the major responsible for outbreaks and mortality. With the adaptation of new species to intensive culture, such as abalone (gastropods) and octopus (cephalopods), there are also new potential pathogens, including among other members of the genera Pseudomonas or Serratia. This paper provides an updated overview of the major diseases affecting different groups of mollusks. Moreover, in recent years particular attention has paid to the use of bacteria with antimicrobial activity in shellfish hatcheries, in order to control the composition of the microbiota associated with larval cultures, prevent pathogens, and improve the survival of larvae. Different taxa, as Pseudoalteromonas or Phaeobacter have been proposed as effective probiotics (extended definition for aquaculture) and tested in laboratory and hatchery conditions.

Key words: Mollusks, bacteria, pathology, probiosis.

Introducción

Uno de los problemas principales en la acuicultura de moluscos son los episodios repetitivos de la mortalidad, que reducen seriamente la producción. Estos brotes de enfermedad afectan a las etapas larvarias y post-larvarias en los criaderos, así como a juveniles y adultos cultivados en el medio ambiente natural. En el caso de los criaderos, las mortalidades masivas implican la pérdida total de la producción, con graves consecuencias económicas. En la mayoría de los casos, los estudios han demostrado que los problemas están causados por patologías bacterianas, siendo los principales agentes etiológicos miembros de género Vibrio (Beaz-Hidalgo y cols., 2010a; Paillard y cols., 2004). En relación con las etapas cultivadas en bancos naturales, a pesar de que los primeros estudios se centraron en las patologías causadas por protozoos parásitos, en los

últimos años se está prestando especial atención a las enfermedades con origen bacteriano que afectan a la supervivencia de los cultivos.

La falta de estudios sistemáticos y rigurosos sobre las poblaciones bacterianas asociadas al cultivo de moluscos y, por tanto, el escaso conocimiento sobre la materia, ha llevado a la búsqueda de soluciones enfocadas a la eliminación completa de la microbiota del agua de los cultivos durante las etapas de criadero. Los diferentes métodos empleados, desde tratamientos de agua a quimioterapia, han demostrado ser inadecuados para evitar los episodios de mortalidad. El uso de bacterias probióticas es la alternativa más prometedora en la acuicultura para el desarrollo de los cultivos, consiguiendo una población bacteriana equilibrada y con capacidad de auto-regulación. Además, su uso evita los peligros derivados de antibióticos y otras medidas de control.

Este trabajo constituye una revisión del conocimiento actual sobre este tema, detallándose los principales patógenos bacterianos que afectan a las etapas larvales y post-larvas cultivadas en criadero, así como a jóvenes y adultos cultivados en el medio ambiente natural. Se describen los signos característicos de las enfermedades causadas por las diferentes especies de bacterias, así como su rango de hospedadores y distribución geográfica. Además, se analizan las ventajas de la aplicación específica de probióticos en los criaderos, teniendo en cuenta las características especiales de este tipo de cultivos. La necesidad de su utilización se justifica por las desventajas de los diferentes sistemas generalmente utilizados para el control de enfermedades, como los tratamiento de agua y la quimioterapia. Se describen las diferentes especies bacterianas propuestas como posibles probióticos, así como la forma de seleccionarlas, los modos de acción y sus posibles aplicaciones en criaderos.

Los Villanos

2.1. Las bacterias patógenas de moluscos bivalvos.

2.1.1. Patógenos de estadios larvarios.

En general, hay una falta de conocimiento de los problemas patológicos que afectan a las larvas de moluscos, probablemente debido a la escasez de estudios sistemáticos rigurosos. Los episodios de alta mortalidad, que conducen a la pérdida total de la producción larvaria, son de frecuencia periódica y normalmente el agente responsable no llega a identificarse (Brown y cols., 1978, 1981; Elston, 1984; Elston y cols., 1980; Garland y cols., 1983; Prado y cols., 2005; Sugumar y cols., 1998; Tubiash, 1975; Tubiash y cols., 1965), a pesar de que implican una importante pérdida económica y la falta de suministro de semillas.

Por otro lado, las condiciones óptimas para el cultivo de moluscos también favorecen el crecimiento de bacterias y la acumulación de sus metabolitos (Murchelano y cols., 1975; Prieur y cols., 1979). El proceso de la enfermedad se ve favorecido en muchos ocasiones por un aumento de la susceptibilidad de larvas debido a factores de estrés externos, incluyendo mala calidad de los alimentos o el agua, la contaminación orgánica, etc Además, estos factores también facilitan el crecimiento de bacterias potencialmente patógenas (Di Salvo y cols., 1978; Tubiash y Otto, 1986). Por lo tanto, en muchas ocasiones la mortalidad está asociada a la proliferación de patógenos oportunistas.

En un criadero, aunque todos los estadios larvarios son vulnerables, es durante la fijación temporal de las larvas en el fondo del tanque cuando más expuestas están a una alta concentración de bacterias patógenas potenciales asociadas con la superficie del tanque, las larvas moribundas o detritus orgánicos. Guillard (1959) fue el primero en evidenciar la participación de una especie de Vibrio en la destrucción del velo y los tejidos internos de

larvas de la almeja Mercenaria mercenaria, causando una mortalidad del 70% de la población. Posteriormente, Tubiash y cols. (1965) propusieron el término "necrosis bacilar" para describir la enfermedad, demostrando que afecta a numerosos bivalvos: Crassostrea virginica, Ostrea edulis, M. mercenaria, Argopecten irradians y Teredo navalis. Los signos típicos de la "necrosis bacilar" incluyen alteraciones del velo, reducción de la motilidad, o aparición de movimientos erráticos en círculos unas 4-5 horas después de la exposición a especies de Vibrio. Las especies V. alginolyticus, V. anguillarum y V. tubiashii se describieron como los principales agentes causales de la "necrosis bacilar" en estudios posteriores (Tubiash y Otto, 1986; Tubiash y cols., 1970). Otro signo característico de la vibriosis de larvas en los criaderos es la aparición del fenómeno llamado "spotting", definido como una acumulación de larvas moribundas aglutinadas en la parte inferior de los tanques (Di Salvo y cols., 1978). En la Tabla 1 se presenta un resumen de los estudios más recientes sobre la vibriosis en larvas de bivalvos.

En las últimas décadas, otras especies de vibrios se han asociado con la aparición de problemas en los cultivos larvarios de moluscos (Lambert y cols., 1998; Nicolsas y cols., 1996; Prado y cols., 2005). Es el caso de V. pectenicida (Lambert y cols., 1998), descrito originalmente como una especie capaz de producir una alta mortalidad de larvas de vieira (Pecten maximus), debido a la liberación de toxinas bacterianas que interrumpen el tránsito digestivo y degradan los tejidos de las larvas (Nicolsas y cols., 1996). Por otro lado, Prado y cols. (2005) investigaron 3 cepas de Vibrio aisladas de larvas de ostra europea (Ostrea edulis) en tres criaderos de Galicia y asociadas a una enfermedad compatible con una "necrosis bacilar". Una cepa se identificó como V. neptunius, siendo la primera descripción de esta especie bacteriana como patógeno de larvas de ostra. Los otros dos aislamientos se clasificaron como Vibrio sp., porque a pesar de mostrar similitudes a V. orientalis y V. vulnificus no podían ser asignados a estas especies de forma inequívoca. Estudios posteriores demostraron que una de estas cepas constituye una nueva especie, para la que se ha propuesto el nombre de V. ostreicida [resultados no publicados].

Algunos miembros del género Pseudomonas se han descrito como patógenos larvarios, siendo en la mayoría de los casos aislados junto con representantes del género Vibrio causando problemas en cultivos de larvas de bivalvos, incluyendo almeja (M. mercenaria), ostra (Ostrea edulis, C. virginica) y pectínidos (T. gigas, A. purpuratus) (Helm y Smith, 1971; Lodeiros y cols., 1987; Sutton y Garrik, 1993). Otras bacterias que han mostrado potencial patogénico para larvas son algunos representantes de los géneros Alteromonas y Moraxella, así como ciertas cepas de la especie Aeromonas hydrophila (Garland y cols., 1983; Riquelme y cols., 1995; Sutton y Garrik, 1993).

Se ha sugerido que los agentes responsables del desarrollo de la enfermedad en las larvas de bivalvos parecen actuar sinérgicamente y que la infección se produce como resultado del estrés de las larvas (Di Salvo y cols., 1978; Paillard y cols., 1994; Prado y cols., 2005). Esto pone de relieve la importancia de mantener la calidad óptima del agua y la densidad de cultivo en el criadero. El uso de antibióticos puede ser beneficioso a corto plazo, aunque su utilización frecuente puede dar lugar a la aparición de cepas bacterianas resistentes (Karunasagar y cols., 1994). Una posible medida contra los bivalvos patógenos bacterianos cultivadas podría ser la selección genética de poblaciones resistentes a las larvas en los criaderos (Tanguy y cols., 2008).

2.1.2. Las enfermedades de los moluscos bivalvos juveniles y adultos

Las infecciones más conocidas causadas por vibrios son la mortalidad de verano en las ostras juveniles y enfermedad del anillo marrón en almejas adultas. La Tabla 1 presenta los estudios recientes con especies de Vibrio que han causado patologías en bivalvos juveniles y adultos.

En Francia, la mortalidad de verano afecta a las poblaciones juveniles de la ostra del Pacífico (Crassostrea gigas) durante los meses de verano cuando la temperatura del agua es ≥ 18ºC (Berthelin y cols., 2000). Este fenómeno se ha asociado a situaciones de estrés, bajo oxígeno disuelto o la presencia de sustancias tóxicas en los sedimentos (Cheney y cols., 2000). Lipp y cols. (1976) fueron los primeros en observar que la hemolinfa de ostras tenían altos niveles de vibrios que causaban la muerte. Más tarde diversos estudios identificaron cepas de V. splendidus y/o V. aestuarianus como agentes causales de la enfermedad (Gay y cols., 2004a, b; Lacoste y cols., 2001), llegándose a describir la nueva subespecie V. aestuarianus subsp. francensis. Más recientemente, Allain y cols. (2009) sugieren el posible papel de V. harveyi como agente etiológico de la mortalidad de verano. La teoría más aceptada hoy en día es que la mortalidad de verano de la ostra no se puede atribuir a un solo patógeno, bacteriano o viral (Herpesvirus de ostra), sino a una compleja interacción entre el estado fisiológico y condicionantes genéticos del huésped, factores ambientales y la presencia de patógenos oportunistas (Labreuche y cols., 2006; Paillard y cols., 2004; Pruzzo y cols., 2005).

La enfermedad del anillo marrón (BRD, del inglés Brown Ring Disease), causada por V. tapetis (Borrego y cols., 1996), ha sido ampliamente estudiada, ya que es la principal enfermedad de etiología bacteriana en almejas adultas (Paillard y cols., 1994, 2004). La susceptibilidad a las infecciones por V. tapetis es específica de especie, causando mayores alteraciones fisiológicas y mortalidad en Venerupis philippinarum que en otras especies de almeja (V. decussata y M. mercenaria) o en ostra (C. virginica) (Allam y cols., 2001, 2006). La enfermedad se caracteriza por la alteración del proceso de calcificación en la superficie interior de las válvulas y la aparición de un depósito marrón característico entre el borde de la concha y la línea palial (Borrego y cols., 1996; Paillard y cols., 1994). Los factores ambientales (temperatura y salinidad) desempeñan un papel importante en el desarrollo de la BRD, que tiende a ser más frecuente en invierno y primavera (Paillard y cols., 1994, 2004). Se ha descrito variabilidad intraespecífica fenotípica, serológica y genética en V. tapetis, estableciéndose tres subgrupos principales que se correlacionan con el hospedador (Rodríguez y cols., 2006). Esta heterogeneidad se ha confirmado además en estudios de MLSA (análisis de secuencias multilocus) y análisis proteómicos (Balboa y cols., 2011).

Recientemente, se ha sugerido que otras especies de vibrios pueden tener también potencial patogénico para juveniles y adultos de moluscos. Tal es el caso de V. celticus, componente de la microbiota de las poblaciones de almejas cultivadas en Galicia (noroeste de España), para la que se ha confirmado su virulencia en los desafíos experimentales con almejas juveniles (Beaz-Hidalgo y cols., 2010b).

La presencia de procariotas intracelulares se ha descrito en varios invertebrados marinos (Buchanan, 1978; Elston y Peacock, 1984; Gulka y cols., 1983; Le Gall y cols., 1988; Mialhe y cols., 1987; Otto y cols., 1979), sugiriéndose en algunas ocasiones una asociación con mortalidad (Gulka y cols., 1983). Sin embargo, si estas infecciones producen alteraciones significativas en el hospedador ha sido motivo de controversia durante décadas. Algunos autores indican un papel clave en la aparición de la enfermedad y la mortalidad (Gulka y cols., 1983; Le Gall y cols., 1988; Villalba y cols., 1999; Wu y Pan, 1999, 2000), mientras que otros autores señalan que estos microorganismos no provocan daños celulares o solo una patología limitada (Fries y Grant, 1991).

En 1987, se registró una mortalidad masiva (aprox. 40%) de vieira en Bretaña (Francia). El estudio anátomo-patológico reveló la presencia de una infección bacteriana de las branquias (Le Gall y cols., 1988). Se observaron colonias bacterianas intracelulares de carácter basofílico con diferentes tamaños, que en estudios adicionales, pudieron relacionarse con el grupo Rickettsia (Le Gall y Mialhe, 1992). Posteriormente, se

detectaron otros casos, también asociados con mortalidades de almeja (Venerupis rhomboides) en Galicia (España) (Villalba y cols., 1999) y diferentes especies de ostra (Pinctada máxima y Crassostrea ariakensis) en China (Sun y Wu, 2004; Wu y Pan, 1999) La hipótesis más aceptada actualmente es que estas bacterias tipo-Rickettsia presentarían baja virulencia y que el grado de las alteraciones patológicas estaría relacionado con el grado de infección. Así, solo las infecciones masivas, que por acción mecánica bloqueasen importantes funciones fisiológicas, causarían una patología significativa.

La enfermedad de ostra juvenil (JOD, del inglés Juvenile Oyster Disease) se detectó por primera vez en poblaciones cultivadas de Crassostrea virginica en los EE.UU. durante la década de 1980 (Bricelj y cols., 1992). La enfermedad afecta a ostras con un tamaño menor de 25 mm, y la mortalidad puede alcanzar el 90% de la producción anual (Bricelj y cols., 1992; Davis y Barber, 1994). En las zonas afectadas, la enfermedad tiene una frecuencia anual, cuando la temperatura del agua es ≥ 20 º C (Bricelj y cols., 1992; Davis y Barber, 1994; Ford y Borrero, 2001). Los signos principales son el cese de crecimiento, bordes irregulares de las valvas y un gran abultamiento de la válva inferior seguido de un depósito de conquiolina en la parte interior de la concha (Bricelj y cols.,1992; Ford y Borrero, 2001). Estudios posteriores revelaron que el agente causal era una nueva especie de α-proteobacterias del grupo Roseobacter, Roseovarius crassostreae, que mostraba una fuerte colonización en todas las ostras infectadas (Boettcher y cols., 1999, 2000, 2005; Maloy y cols., 2007). De hecho, se propuso un cambio de nombre de la enfermedad para pasar a denominarse "enfermedad de la ostra por Roseovarius" (ROD), a fin de evitar confusión con otras enfermedades de ostras juveniles (Maloy y cols., 2007).

Hace aproximadamente 60 años, se registraron altas mortalidades de ostra del Pacífico (C. gigas) en Japón y los EE.UU. durante los meses de verano (Imai y cols., 1965; Perdue y cols., 1981). La presencia de alteraciones patológicas en el tejido conectivo alrededor del tracto digestivo sugirió su naturaleza infecciosa, probablemente debida a una bacteria Gram positiva. Fue en 1991, cuando Friedman y Hedrick aislaron una bacteria perteneciente al género Nocardia a partir de ostras cultivadas enfermas en Washington (EE.UU.) y British Colsumbia (Canadá), nombrando la enfermedad como Nocardiosis de la ostra del Pacífico (PON). La caracterización fenotípica y genética de los aislados demostró que constituían una nueva especie para la cual se propuso el nombre de Nocardia crassostreae (Friedman y cols., 1998). La enfermedad, tanto en infecciones naturales y experimentales, se muestra prácticamente sin signos externos. En infecciones graves, se observó la presencia de nódulos de color verde / amarillo en la mayoría de los tejidos, incluyendo el músculo aductor, branquias, el corazón y el manto (Friedmna y cols., 1991).

Se han descrito infecciones por miembros de los géneros Chlamydia y Mycoplasma en una gran variedad de moluscos bivalvos adultos, como ostra, vieira, almeja, mejillón y berberecho (Cerastoderma edule) (Azevedo, 1993; Bower y Meyer, 1991; Cajaraville y Angulo, 1991; Harshbarger y Chang, 1977; Hine y Diggles, 2002). La mayoría de las descripciones se basan en estudios histológicos con observación de prevalencias variables y, solo en algunos casos, alteraciones patológicas en los tejidos del hospedador relacionadas con la intensidad de la infección (Svärdh, 1999; Ward y cols., 2004). El género Cytophaga también se ha relacionado con lesiones en juveniles de C. gigas.

2.2. Bacterias patógenas para otros moluscos

Las orejas de mar o abulones son moluscos gasterópodos de la familia Haliotidae que habitan los arrecifes costeros en las zonas tropicales, subtropicales y templadas. En los últimos años, su cultivo ha cobrado gran importancia en diferentes países debido a su alto valor económico en el mercado. Se han descrito varias enfermedades infecciosas en Haliotis spp., siendo en su mayoría bacterianas y parasitarias (Bower, 2000). Se han aislado patógenos como Vibrio alginolyticus, V. parahaemolyticus y V. harveyi de abulones

enfermos en Japón, Taiwán, China y Francia (Cai y cols., 2007; Lee y cols., 2001; Liu y cols., 2000, 2001; Nicolsas y cols., 2002), provocando en algunos casos mortalidades masivas. Los principales signos clínicos observados en los individuos juveniles y adultos afectados, fueron abscesos o ulceración en el manto, manchas blancas en el pie, blanqueamiento general, así como la pérdida de capacidad de adherirse a superficies (Cai y cols., 2007). Más recientemente, se han identificado cepas de Shewanella algae y Klebsiella oxytoca como agentes causantes de mortalidades masivas en post-larvas de abulón en China, siendo su patogenicidad confirmada en infecciones experimentales (Cai y cols., 2006, 2008).

El pulpo es un molusco cefalópodo que también ha recibido una gran atención en los últimos años debido a su interés para la acuicultura. Hay algunos informes que describen agentes infecciosos en diferentes especies de pulpo (Octopus vulgaris, O. joubini y O. briareus), principalmente a partir de animales cultivados, aunque también en algún caso de individuos silvestres (Farto y cols., 2003; Hanlon y cols., 1984, 1990). Los principales signos observados en los pulpos enfermos son úlceras en la piel, lo que puede derivar en heridas profundas en el manto de la cabeza o los brazos. Diferentes especies de Vibrio, incluyendo V. alginolyticus, V. anguillarum, V. harveyi , V. lentus o V. parahaemolyticus, así como algunas especies de otros grupos como Aeromonas hydrophila y A. cavieae, o Pseudomonas stutzeri se han asociado con la aparición de estas lesiones en pulpo cultivado (Farto y cols., 2003; Hanlon y cols., 1984, 1990).

Los Héroes

Verschuere y cols. (2000) propusieron una definición de probiótico apropiada para ser utilizada dentro del campo de la acuicultura, teniendo en cuenta la estrecha interacción del animal con el medio ambiente. Según estos autores un probiótico sería un aditivo microbiano vivo con un efecto beneficioso en el hospedador, modificando la microbiota asociada con el hospedador o el medio ambiente, asegurando el uso óptimo de la alimentación o una mejora de su valor nutricional, mejorando la respuesta del huésped contra la enfermedad, o consiguiendo una mejor calidad de su medio ambiente.

Las características deseables de una bacteria probiótica para uso en acuicultura incluyen: i) ser aislada del medio ambiente en el que se empleará, lo que significa una bacteria marina capaz de crecer en el sistema del criadero evitando, además, los riesgos de introducción de organismos alóctonos en el sistema; ii) tener efectos beneficiosos en el molusco, y iii) ser no patógena o tóxica, no sólo para el moluscos en cultivo, sino también para otros organismos vivos presentes en el sistema, tales como fitoplancton u otros alimentos vivos (Prado y cols., 2010).

La mayoría de los trabajos publicados sobre el uso de probióticos en acuicultura corresponden a estudios en peces y crustáceos, siendo escasos los que se centran en moluscos. Lodeiros y cols. (1989) publicaron por primera vez un estudio sobre el efecto de antibióticos producidos por bacterias marinas en la supervivencia de las larvas de la vieira Pecten ziczac. Riquelme y colaboradores desarrollaron estudios más exhaustivos sobre la aplicación de una bacteria probiótica, Pseudoalteromonas haloplanktis (anteriormente Alteromonas haloplanktis), a larvas de Argopecten purpuratus (Riquelme y cols., 1996), así como sobre la determinación de su espectro de actividad contra diferentes especies bacterianas, incluyendo miembros del género Vibrio. La caracterización preliminar del compuesto activo indicó que se trataba de un componente intracelular, producido como metabolito secundario, que se secretaba durante la fase estacionaria de crecimiento.

En otros trabajos del mismo grupo (Riquelme y cols., 1997) se identificaron cepas de Pseudomonas sp. y Vibrio sp. cepas con una fuerte actividad antibacteriana, y se estudió el uso de cultivos axénicos de microalgas (Isochrysis galbana) como una vía de incorporar las bacterias activas a los cultivos (Avendaño y Riquelme, 1999). Finalmente, también demostraron que, mediante la incorporación de las bacterias probióticas en cultivos de larvas (Riquelme y cols., 2001) inoculando periódicamente una mezcla de cepas productoras de antibiótico en el sistema, la fase larval se podía completar sin la adición de agentes quimioterapéuticos comerciales.

Gibson y cols. (1998) y Longeon y cols. (2004) describieron otras bacterias con potencial probiótico, incluyendo cepas de Aeromonas media y Pseudoalteromonas sp., para su aplicación en cultivos de larvas de C. gigas y P. maximus. En los últimos años, diferentes aislados de Phaeobacter (Roseobacter) gallaeciensis han recibido una atención especial por parte de diferentes grupos de investigación, debido a su gran espectro de inhibición contra bacterias patógenas en los sistemas de acuicultura (Prado y cols., 2009, 2010; Ruiz-Ponte y cols., 1999).

En prácticamente todos estos estudios se observó el mismo patrón de actividad, siendo necesario el establecimiento de las cepas probióticas en el sistema previamente o simultáneamente a los patógenos. Estos resultados indican el uso potencial de las cepas probióticas como método de control en los criaderos de moluscos, si se permite su acción antes de que los patógenos alcancen altas concentraciones en el sistema (Prado y cols., 2010).

La fijación, proceso irreversible de adherencia al sustrato al final de la fase larvaria, es un momento crítico durante el desarrollo de las larvas cuando se observan generalmente mortalidades importantes. Está seguida por la metamorfosis, momento en el que se adquieren las estructuras de la vida adulta y bentónicas. La implicación de bacterias, específicamente Shewanella colwelliana (Coyne y cols., 1999) o Phaeobacter gallaeciensis (Prado y cols., 2009, 2010), en los procesos de fijación y metamorfosis de ciertas especies de moluscos es bien conocida. En la mayoría de los casos, se observó una inducción mediada por biopelículas bacterianas o por la producción de exopolisacáridos hidrosolubles (Abu y cols., 1986; Walch y cols. 1999).

Conclusiones

En este trabajo, se ha realizado una revisión de los conocimientos actuales sobre la patología bacteriana de moluscos. Es de prever que en un futuro próximo, con la diversificación de las especies cultivadas y la introducción de los cultivos intensivos de estos organismos en nuevas áreas geográficas, puedan emerger nuevas especies de bacterias con potencial patógeno. La identificación rápida de los nuevos patógenos será muy útil para su control que ha de basarse, debido a las características especiales del cultivo de moluscos en fases juvenil y de adulto, en el establecimiento de medidas preventivas adecuadas y la limitación del movimiento de los individuos o poblaciones afectados. El desarrollo de métodos moleculares para el diagnóstico será fundamental para lograr tales objetivos, así como para el estudio de las vías de infección y el modo de acción de los agentes patógenos.

En los criaderos, hay una entrada constante de bacterias a través de los diferentes compartimentos del sistema (reproductores, el agua, el fitoplancton, las larvas, tanques, etc), lo que implica múltiples rutas de incorporación de los agentes patógenos potenciales. La mejor manera de evitar este hecho es el control de la microbiota del medio ambiente (agua) para mantener una composición beneficiosa para el desarrollo y la supervivencia de las larvas o, al menos, para dificultar la proliferación de patógenos oportunistas. Son

necesarios por tanto más estudios sobre la utilización práctica de la probiosis en cultivos de larvas de moluscos, con el fin de conocer la interacción de los probióticos con otros organismos vivos presentes en el sistema, para establecer su capacidad de crecimiento y las dosis efectivas, así como para obtener un método para su conservación y manejo en los criaderos. Su aplicación generalizada permitirá no solo una disminución en el uso de antibióticos, con los consiguientes efectos beneficiosos sobre el medio ambiente y la salud humana, sino también una acuicultura más sostenible.

Agradecimientos

Los trabajos del grupo de investigación de la Universidad de Santiago de Compostela incluidos en la presente revisión han sido financiados gracias a proyectos del Ministerio de Ciencia e Innovación y la Xunta de Galicia (España).

Bibliografía

1. Abu GO, Weiner RM, Bonar DB, Colwell RR. Extracellular polysaccharide production by a marine bacterium. In: Barry S, Houghton DR, eds. Proc. Sixth Int. Biodet. Sympos., Cambrian News LTD. Eng. 1986, pp. 543-549.
2. Allain G, Arzul I, Chollet B, Cobret L, de Decker S, Faury N, Ferrand S, et al. Summer mortality outbreaks of French Pacific oysters, Crassostrea gigas in 2008: research and detection of pathogens. 14th EAFP International Conference. Diseases of Fish and Shellfish. Prague (Czech Republic). 2009;pp. 127.
3. Allam B, Ford SE. Effects of the pathogenic Vibrio tapetis on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalve species: I. Haemocyte changes following in vitro challenge. Fish Shellfish Immunol 2006;20: 374-383.
4. Allam B, Ashton-Alcox A, Ford SE. Hemocyte activities associated with resistance to brown ring disease in Ruditapes spp. clams. Dev Comp Immunol 2001;25: 365-375.
5. Allam B, Paillard C, Auffre M, Ford SE. Effects of the pathogenic Vibrio tapetis on defence factors of susceptible and non-susceptible bivalves species: II. Cellular and biochemical changes following in vivo challenges. Fish Shellfish Immunol 2006;20: 384-397.
6. Anguiano-Beltrán C, Lizárraga-Partida ML, Searcy-Bernal R. Effect of Vibrio alginolyticus on larval survival of the blue mussel Mytilus galloprovincialis. Dis Aquat Org 2004;59: 119-123.
7. Avendaño RE, Riquelme CE. Establishment of mixed-culture probiotics and microalgae as food for bivalve larvae. Aquaculture Res 1999;30: 893-900.
8. Azevedo C. Occurrence of an unusual branchial mycoplasma-like infection in cockle Cerastoderma edule (Mollusca, Bivalvia). Dis Aquat Org 1993;16: 55-59.
9. Balboa S, Bermudez-Crespo J, Gianzo C, López JL, Romalde JL. Proteomics and multilocus sequence analysis confirm intraspecific variability of Vibrio tapetis. FEMS Microbiol Lett. 2011; 324:80-87.

10. Beaz-Hidalgo R, Balboa S, Romalde JL, Figueras MJ.. Diversity and pathogenicity of Vibrio species in cultured bivalve molluscs. Environ Microbiol Reports 2010a;2: 34-43.

11. Beaz-Hidalgo R, Diéguez AL, Cleenwerck I, Balboa S, Doce A, de Vos P, Romalde JL. Vibrio celticus sp. nov., a new Vibrio species belonging to the Splendidus clade with pathogenic potential for clams. Syst Appl Microbiol. 2010b; 33: 311-315.

12. Berthelin C, Kellner K, Mathieu M. Storage metabolism in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) in relation to summer mortalities and reproductive cycle (west coast of France). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Bio 2000;125: 359-169.

13. Boettcher KJ, Barber BJ, Singer JT. Use of antibacterial agents to elucidate the etiology of juvenile oyster disease (JOD) in Crassostrea virginica and numerical dominance of an ▪-Proteobacterium in JOD-affected animals. Appl Environ Microbiol 1999;65: 2534–2539.

14. Boettcher KJ, Barber BJ, Singer JT. Additional evidence that juvenile oyster disease is caused by a member of the Roseobacter group and colonization of nonaffected animals by Stappia stellulata-like strains. Appl Environ Microbiol 2000;66: 3924–3930.

15. Boettcher KJ, Geaghan KK, Maloy AP, Barber JB. Roseovarius crassostreae sp. nov., a member of the Roseobacter clade and the apparent cause of juvenile oyster disease (JOD) in cultured Eastern oysters. Int J Syst Evol Microbiol 2005;55: 1531-1537.

16. Borrego JJ, Castro D, Luque A, Paillard C, Maes P, García M, Ventosa A. Vibrio tapetis sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. Int J Syst Bacteriol 1996;46: 480-484.

17. Bower S. Infectious diseases of abalone (Haliotis spp.) and risks associated with transplantation. In: Campbell A, ed. Workshop on rebuilding abalone stocks in British Columbia. Can Spec Publ Fish Aquatic Sci 2000;130, Canada. pp: 111-122.

18. Bower SM, Meyer GR. Disease of Japanese scallops (Patinopecten yessoensis) caused by an intracellular bacterium. J Shellfish Res 1991;10: 513.

19. Bricelj VM, Ford SE, Borrero FJ, Perkins FO, Rivara G, et al. Unexplained mortalities of hatchery-reared juvenile oysters, Crassostrea virginica (Gmelin). J Shellfish Res 1992;11: 331-347.

20. Brown C. A study of two shellfish-pathogenic Vibrio strains isolated from a Long Island hatchery during a recent outbreak of disease. J Shellfish Res 1981;1: 83-87.

21. Brown C, Losee E. Observations on natural and induced epizootics of vibriosis in Crassostrea virginica larvae. J Invertebr Pathol;1978;31: 41-47.

22. Buchanan JS. Cytological studies on a new species of rickettsia found in association with a phage in the digestive gland of the marine bivalve mollusc, Tellina tenuis (da Costa). J Fish Dis 1978;1: 27-43.

23. Cai J, Chan H, Thompson KD, Li C. Isolation and identification of Shewanella alga and its pathogenic effects on postlarvae of abalone Haliotis diversicolor suprasexta. J Fish Dis 2006;29: 505-508.

24. Cai J, Li J, Thompson KD, Li C, Han H. Isolation and characterization of pathogenic of Vibrio parahaemolyticus from diseased post-larvae of abalone Haliotis diversicolor suprasexta. J Basic Microbiol 2007;47: 84-86.

25. Cai J, Wang Z, Cai C, Zhou Y.. Characterization and identification of virulent Klebsiella oxytoca isolated from abalone (Haliotis diversicolor suprasexta) postlarvae with mass mortality in Fujian, China. J Invertebr Pathol 2008;97: 70-75.

26. Cajaraville MP, Angulo E. Chlamydia-like organisms in digestive and duct cells of mussels from the Basque coast. J Invertebr Pathol 1991;58: 381-386.

27. Cheney DP, McDonald BF, Elston RA. Summer mortality of Pacific oysters, Crassostrea gigas (Thunberg): initial findings on multiple environmental stressors in Puget Sound, Washington, 1998. J Shellfish Res 2000;19: 353-380.

28. Coyne VE, Pillidge CJ, Sledjeski DD, Hori H, Ortiz-Conde BA, et al. Reclassification of Alteromonas colwelliana to the genus Shewanella by DNA-DNA hybridization, serology and 5S ribosomal RNA sequence data. Syst Appl Microbiol 1989;12: 275-279.

29. Davis CV, Barber BJ. Size-dependent mortality in hatchery-reared populations of oysters, Crassostrea virginica, Gmelin 1791, affected by juvenile oyster disease. J Shellfish Res 1994;13: 137–142.

30. Di Salvo LH, Blecka J, Zebal R. Vibrio anguillarum and larval mortality in a California coastal shellfish hatchery. Appl Environ Microbiol 1978;35: 219-221.

31. Elston R. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusc husbandry. J World Maricul Soc 1984;15: 284-300.

32. Elston R, Leibovitz L. Pathogenesis of experimental vibriosis in larval American oysters, Crassostrea virginica. Can J Fish Aquat Sci 1980;37: 964-978.

33. Elston R A, Peacock MG. A rickettsiales-like infection in the Pacific razor clam, Siliqua patula. J Invertebr Pathol 1984;47: 93-104.

34. Estes RM, Friedman CS, Elston RA, Herwig RP. Pathogenicity testing of shellfish hatchery bacterial isolates on Pacific oyster Crassostrea gigas larvae. Dis Aquat Org 2004;58: 223-230.

35. Farto, R, Armada SP, Montes M, Guisande JA, Pérez MJ, Nieto TP. Vibrio lentus associated with diseased wild octopus (Octopus vulgaris). J Invertebr Pathol 2003;83: 149-156.

36. Ford SE, Borrero FJ. Epizootiology and pathology of juvenile oyster disease in the easter oyster, Crassostrea virginica. J Invertebr Pathol 2001;78: 141-154.

37. Friedman CS, Hedrick RP. Pacific oyster nocardiosis: Isolation of the bacterium and induction of laboratory infections. J Invertebr Pathol 1991;57: 109-120.

38. Friedman CS, Beaman BL, Chun J, Goodfellow M, Gee A, et al. Nocardia crassostreae sp. nov., the casual agent of nocardiosis in Pacific oysters. Int J Syst Bacteriol 1998;48: 237-246.

39. Fries CR, Grant DM. Rickettsiae in gill epithelial cells of the hard clam Mercenaria mercenaria. J Invertebr Pathol 1991;57: 166-171.

40. Garland CD, Nash GV, Sumner CE, Mcmeekin TA. Bacterial pathogens of oyster larvae (Crassostrea gigas) in a Tasmanian hatchery. Aust. J. Mar. Fresw. Res. 1983;34: 483-487.

41. Garnier M, Laubreche Y, Nicolas JL. Molecular and phenotypic characterization of Vibrio aestuarianus subsp. francensis subsp. nov., a pathogen of the oyster Crassostrea gigas. Syst Appl Microbiol 2008;31: 358-365.

42. Gay M, Berthe FCJ, Le Roux F. Screening of Vibrio isolates to develop an experimental infection model in the Pacific oyster Crassostrea gigas. Dis Aquat Org 2004a;59: 49-56.

43. Gay M, Renault T, Pons AM, Le Roux F. Two Vibrio splendidus related strains collaborate to kill Crassostrea gigas: taxonomy and host alterations. Dis Aquat Org 2004b;62: 65-74.

44. Gibson LF, Woodworth J, George AM. Probiotic activity of Aeromonas media on the Pacific oyster, Crassostrea gigas, when challenged with Vibrio tubiashii. Aquaculture 1998;169: 111-120.

45. Gómez-León J, Villamil L, Lemos ML, Novoa B. Isolation of Vibrio alginolyticus and Vibrio splendidus from aquacultured carpet shell clam (Ruditapes decussatus) larvae associated with mass mortalities. Appl Environ Microbiol 2005;71: 98-104.

46. Gómez- León J, Villamil L, Salger SA, Sallum RH, Remacha-Triviño A, Leavitt DF, Gómez-Chiarri M. Survival of eastern oysters Crassostrea virginica from three lines following experimental challenge with bacterial pathogens. Dis Aquat Org 2008;79: 95-105.

47. Guillard RRL. Further evidence of the destruction of bivalve larvae by bacteria. Biol Bull 1959;117: 258-266.

48. Gulka G, Chang PW, Marti KA. Prokaryotic infection associated with a mass mortality of the sea scallop, Placopecten magellanicus. J Fish Dis 1983;6: 355-364.

49. Hanlon RT, Forsythe JW. Diseases of Mollusca: Cephalopoda. Diseases caused by microorganisms. In: Kinne O, ed. Diseases of marine animals, vol III. Biologische Anstalt Helgoland, Hamburg, Germany, 1990, pp. 21-39.

50. Hanlon, RT, Forsythe JW, Cooper KM, Dinuzzo AR, Folse DS, Kelly MT. Fatal penetrating ulcers in laboratory-reared octopuses. J Invert Pathol 1984;44: 67-83.

51. Harshbarger JC, Chang SC. Chlamydiae (with phages), mycoplasmas, and rickettsiae in Chesapeake Bay bivalves. Science 1977;196: 666-668.

52. Helm MM, Smith FM. Observations on a bacterial disease in laboratory-cultured larvae of the European flat oyster, Ostrea edulis L. Int. Counc. Explor. Sea, CM 1971 / k:10 1971;9 pp.

53. Hine PM, Diggles BK. Prokaryote infections in the New Zealand scallops Pecten novaezelandiae and Chlamys delicatula. Dis Aquat Org 2002;50: 137-144.

54. Imai T, Numachi K-I, Oizimu J, Sato S. Studies on the mass mortality of the oyster in Matsushima Bay. II. Search for the cause of mass mortality and the possibility to prevent it by transplantation experiment. Bull Tohoku Reg Fish Res Lab 1965;25: 25-38.

55. Karunasagar I, Pai R, Malathi GR, Karunasagar I. Mass mortality of Penaeus monodon larvae due to antibiotic resustat Vibrio harveyi infection. Aquaculture 1994;128: 203-209.

56. Labreuche Y, Lambert C, Soudant P, Boulo V, Huvet A, Nicolas JL. Cellular and molecular hemocyte responses of the Pacific oyster, Crassostrea gigas, following bacterial infection with Vibrio aestuarianus strain 01/32. Microbes Infect 2006a ;8: 2715-2724.

57. Labreuche Y, Soudant P, Goncalves M, Lambert C, Nicolas JL. Effects of extracellular products from the pathogenic Vibrio aestuarianus strain 01/32 on lethality and cellular immune responses of the oyster Crassostrea gigas. Dev Comp Immunol 2006b;30: 367–379.

58. Lacoste A, Jalabert F, Malham S, Cueff A, Gelebart F, Cordevant C, et al. A Vibrio splendidus strain is associated with summer mortality of juvenile oysters Crassostrea gigas in the Bay of Morlaix (North Brittany, France). Dis Aquat Org 2001;46: 139-145.

59. Lambert C, Nicolas JL, Cilia V, Corre S. Vibrio pectenicida sp. nov., a pathogen of scallop (Pecten maximus) larvae. Int J Syst Bacteriol 1998;48: 481-487.

60. Le Gall G, Chagot D, Mialhe E, Grizel H. Branchial rickettsiales-like infection associated with a mass mortality of sea scallop Pecten maximus. Dis Aquat Org 1988;10: 139-145.

61. Le Gall G, Mialhe E. Purification of Rickettsiales-like organisms associated with Pecten maximus (Mollusca: Bivalvia): serological and biochemical characterization. Dis Aquat Org 1992;12: 215-220.

62. Lee KK, Liu PC, Chen YC and Huang CY. The implication of ambient temperature with outbreak of vibriosis in cultured small abalone Haliotis diversicolor suprasexta Lischke. J Therm Biol 2001;26: 585-587.

63. Lipp PR, Brown B, Liston J, Chew K. Recent findings on the summer diseases of Pacific oysters. Proc Nat Shellfish Assoc 1976;65: 9-10.

64. Liu PC, Chen YC, Huang CY and Lee KK. Virulence of Vibrio parahaemolyticus isolated from cultured small abalone Haliotis diversicolor suprasexta, with whitering syndrome. Lett Appl Microbiol 2000;31: 433-437.

65. Liu PC, Chen YC, and Lee KK. Pathogenicity of Vibrio alginolyticus isolated from diseased small abalone, Haliotis diversicolor suprasexta. Microbios 2001;104: 71-77.

66. Lodeiros C, Bolinches J, Dopazo CP, Toranzo AE. Bacillary necrosis in hatcheries of Ostrea edulis in Spain. Aquaculture 1987;65: 15-29

67. Lodeiros C, Freites L, Fernández E, Vélez A, Bastardo J. Efecto antibiótico de tres bacterias marinas en la supervivencia de larvas de la vieira Pecten ziczac infectadas con el germen Vibrio anguillarum. Bol Inst Oceanogr Venezuela Univ Oriente 1989;28: 165-169.

68. Longeon A, Peduzzi J, Barthélemy M, Corre S, Nicolas JL, et al. Purification and partial identification of novel antimicrobial protein from marine bacterium Pseudoalteromonas species strain X153. Mar Biotech 2004;6: 633-641.

69. Maloy AP, Ford SE, Karney RC, Boettcher KJ. Roseovarius crassostreae, the etiological agent of Juvenile Oyster Disease (now to be known as Roseovarius Oyster Disease) in Crassostrea virginica. Aquaculture 2007;269: 71-83.

70. Mialhe E, Chagot D, Boulo V, Comps M, Ruano F, et al. An infection of Ruditapes decussatus (Bivalvia) by Rickettsia. Aquaculture 1987;67: 258-259.

71. Murchelano RA, Brown C, Bishop C. Quantitative and qualitative studies of bacteria isolated from sea water used in the laboratory culture of the American oyster, Crassostrea virginica. J Fish Res Board Can 1975;32: 739-745.

72. Nicolas JL, Basuyaux O, Mazurie J, Thebault A. Vibrio carchariae (syn. Vibrio harveyi), a pathogen of the abalone Haliotis tuberculata. Dis Aquat Org 2002;50: 35-43.

73. Nicolas JL, Corre S, Gauthier G, Robert R, Ansquer D. Bacterial problems associated with scallop Pecten maximus larval culture. Dis Aquat Org 1996;27: 67-76.

74. Otto SV, Harshbarger JC, Chang SC. Status of selected unicellular eucaryote pathogens, and prevalence and histopathology of inclusions containing obligate prokaryote parasite, in commercial bivalve mollusks from Maryland estuaries. Haliotis 1979;8: 285-295.

75. Paillard C, Le Roux F, Borrego JJ. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: Trends and evolution. Aquat Living Resour 2004;17: 477-498.

76. Paillard C, Maes P, Oubella R. Brown ring disease in clams. Ann Rev Fish Dis 1994;4: 1–22.

77. Perdue JA, Beattie JH, Chew KK. Some relationships between gametogenic cycle and summer mortality phenomenon in the Pacific oyster (Crassostrea gigas) in Washington State. J Shellfish Res 1981;1: 9-16.

78. Prado S, Montes J, Romalde JL, Barja JL. Inhibitory activity of Phaeobacter strains against aquaculture pathogenic bacteria. Int Microbiol 2009 ;12: 107-114.

79. Prado S, Romalde JL, Barja JL. Review of probiotics for use in bivalve hatcheries. Vet Microbiol. 2010;145:187-197.

80. Prado S, Romalde JL, Montes J, Barja JL. Pathogenic bacteria isolated from disease outbreaks in shellfish hatcheries. First description of Vibrio neptunius as an oyster pathogen. Dis Aquat Org 2005;67: 209-215.

81. Prieur D, Carval YJP. Bacteriological and physico-chemical analysis in a bivalve hatchery: Techniques and preliminary results. Aquaculture 1979;17: 359-374.

82. Pruzzo C, Gallo G, Canesi L. Persistence of vibrios in marine bivalves: the role of interactions with haemolymph components. Environ Microbiol 2005;6: 761-772.

83. Riquelme C, Araya R, Vergara N, Rojas A, Guaita M, et al. Potential probiotic strain in the culture of the Chilean scallop Argopecten purpuratus (Lamarck, 1819). Aquaculture 1997;154: 17-26.

84. Riquelme C, Hayashida G, Toranzo AE, Vilches J, Chávez P. Pathogenicity studies on a Vibrio anguillarum-related (VAR) strain causing an epizootic in Argopecten purpuratus larvae cultured in Chile. Dis Aquat Org 1995;22: 135-141.

85. Riquelme C, Hayashida G, Araya R, Uchida A, Satomi M, et al. Isolation of a native bacterial strain from the scallop Argopecten purpuratus with inhibitory effects against pathogenic vibrios. J Shellfish Res 1996;15: 369-374

86. Riquelme CE, Jorquera MA, Rosas AI, Avendaño RE, Reyes N. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of Argopecten purpuratus larvae (Lamarck, 1819). Aquaculture 2001;192: 111-119.

87. Rodríguez JM, López-Romalde S, Beaz R, Alonso C, Castro D, Romalde JL. Molecular fingerprinting of Vibrio tapetis strains using three PCR-based methods: ERIC-PCR, REP-PCR and RAPD. Dis Aquat Org 2006;69: 175-183.

88. Ruíz-Ponte C, Samain JF, Sánchez JL, Nicolas JL. The benefit of a Roseobacter species on the survival of the scallop larvae. Mar Biotech 1999;1: 52-59.

89. Sandlund N, Torkildsen L, Maqnesen T, Mortesen S, Bergh O. Immunohistochemistry of great scallop Pecten maximus larvae experimentally challenged with pathogenic bacteria. Dis Aquat Org 2006;69: 163-173.

90. Sugumar G, Nakai T, Hirata Y, Matsubara D, Muroga K. Vibrio splendidus biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Japanese oyster Crassostrea gigas larvae. Dis Aquat Org 1998;33: 111-118.

91. Sun J, Wu X. Histology, ultrastructure, and morphogenesis of a Rickettsia-like organism causing disease in the oyster, Crassostrea ariakensis Gould. J Invertebr Pathol 2004;86: 77-86.

92. Sutton DC, Garrik R. Bacterial disease of cultured giant clam Tridacna gigas larvae. Dis Aquat Org 1993;16: 47-53.

93. Svärdh L. Bacteria, granulocytomas, and trematode metacercariae in the digestive gland of Mytilus edulis: seasonal and interpopulation variation. J Invertebr Pathol 1999;74: 275-280.

94. Tanguy A, Bierne N, Saavedra C, Pina B, Bachérre E, Kube M, et al. Increasing genomic information in bivalves through new EST collections in four species: Development of new genetic markers for environmental studies and genome evolution. Gene 2008;408: 27-36.

95. Tubiash HS. Bacterial pathogens associated with cultured bivalve mollusk larvae. In: Smith WL, Chanley CMH, eds. Culture of Marine Invertebrate Animals. New York, NY: Plenum Press; 1975:61-71.

96. Tubiash HS, Otto SV. Bacterial problems in oysters. A review. In: Vivarès CP, Bonami JR, Jasper E, eds. Pathology in Marine Aquaculture. Bredene, Belgium, European Aquaculture Society, Spec. Publ. 1986;9: 233-242.

97. Tubiash HS, Chanley PE, Leifson E. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. I. Etiology and epizootiology. J Bacteriol 1965; 90:1036-1044.

98. Tubiash HS, Colwell RR, Sakazaki R. Marine vibrios associated with bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve molluscs. J Bacteriol 1970;103: 272-273.

99. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev 2000;64: 655-671.

100. Villalba A, Carballal MJ, López C, Cabada A, Corral L, et al. Branchial rickettsia-like infection associated with clam Venerupis rhomboides mortality. Dis Aquat Org 1999;36: 53-60.

101. Walch M, Weiner RM, Colwell RR, Coon SL. Use of L-DOPA and soluble bacterial products to improve set of Crassostrea virginica (Gmelin, 1791) and C.gigas (Thunberg, 1793). J Shellfish Res 1999;18: 133-138.

102. Ward ME, Shields JD, van Dover CL. Parasitism in species of Bathymodiolus (Bivalvia: Mytilidae) mussels from deep-sea and hydrothermal vents. Dis Aquat Org 2004;62: 1-16.

103. Wu XZ, Pan JP. Studies on Rickettsia-like organism disease of the Tropical marine pearl oyster. I: The fine structure and morphogenesis of Pinctada maxima pathogen Rickettsia-like organism. J. Invertebr. Pathol. 1999;73: 162-172.

104. Wu XZ, Pan JP. An intracellular prokaryotic microorganism associated with lesions in the oyster Crassostrea ariakensis Gould. J Fish Dis 2000;23: 409-414.