

CONVENIO DE COLABORACIÓN ENTRE A CONSELLERÍA DO MAR E O CENTRO TECNOLÓXICO DO CLUSTER DA ACUICULTURA PARA O ESTUDO DAS ESTRATEXIAS DE BIORREMEDIACIÓN NA AMEIXA XAPONESA (*Ruditapes philippinarum*) E NO BERBERECHO (*Cerastoderma edule*), BIOREM.

MEMORIA XUSTIFICATIVA

Patricia García Sánchez, directora xeral de Pesca, Acuicultura e Innovación Tecnolóxica da Consellería do Mar, **DECLARA:**

Que esta Dirección Xeral de Pesca, Acuicultura e Innovación Tecnolóxica ten formalizado co Centro Tecnolóxico do Cluster da Acuicultura o instrumento convencional arriba referido por un período de vixencia que abrangue dende o 13/01/2025 ata o 15/12/2026.

Que o instrumento convencional ten por obxecto:

Establecer os termos e condicións polas que se rexerá a colaboración entre a Consellería do Mar e o Centro Tecnolóxico do Clúster da Acuicultura, para a realización do estudo das estratexias de biorremediación na ameixa xaponesa e no berberecho.

O proxecto BIOREM deséñase en torno as seguintes actividades:

Actividade 1. Caracterización do medio no que crecen os moluscos

T1.1. Recollida de mostras

Recolleanse mostras do sedimento sobre o que crecen a ameixa xaponesa (*Ruditapes philippinarum*) e o berberecho (*Cerastoderma edule*), en varios puntos das rías de Ferrol e Pontevedra.

As mostras de sedimento recolleranse a unha profundidade de 0-20 cm, utilizando columnas de Winogradsky, que permiten obter mostras con diferentes graos de osíxeno e fontes de carbón. Obteranse, ademais, mostras de auga, colleitadas en botellas de polietileno de 1L previamente lavadas con ácido nítrico 5% e dobre auga destilada (Jebelli et al., 2018). As mostras serán almacenadas a 4°C e trasladadas ao laboratorio para o seu procesamento.

Así mesmo, rexistraranse as condicións físico-químicas no momento de mostraxe.

T1.2. Análise de substrato sobre o que crecen o bivalvos.

As análises desta tarefa levaranse a cabo ao principio e ao final do proxecto, o que nos permitirá avaliar a eficacia da tecnoloxía aplicada en canto á mellora das



características biolóxicas e físico-químicas do chan.

ST1.2.1. Análise da composición bioquímica da materia orgánica

Para o estudo da composición bioquímica da materia orgánica, analizaranse o contido en proteínas, hidratos de carbono e lípidos nas mostras de sedimentos recollidas. Calcularase o Contido de Carbono Biopolimérico (BPC), como suma de carbono de lípidos, proteínas e carbohidratos. Utilizarase a contribución proteica (PRT) ao BPC (PRT/BPC%) e os valores da relación proteína/carbohidrato (CHO) (PRT:CHO), como descritores do envellecemento e a calidade nutricional da materia orgánica no sedimento (Ape et al., 2019). Determinarase, ademais, o contido no sedimento de carbono orgánico total, nitróxeno orgánico total e fósforo total (Lukwambe et al., 2018), entre outros.

ST1.2.2. Análise da actividade encimática dos sedimentos

Posto que a degradación e remineralización da materia orgánica están mediadas pola actividade encimática hidrolítica, estudarase a actividade de encimas implicadas nos procesos de reciclaxe de C, N e P, na capa de sedimento superficial (0-1 cm) (Ape et al., 2019), por exemplo:

- Encimas extracelulares que adquiren C, con actividades β -1,4-glucosidasa e celobiohidrolasa, implicadas na descomposición de celulosa e hemicelulosa.
- Encimas implicadas na adquisición de N como β -1,4-N-acetilglucosaminidasa e L-leucina aminopeptidasa, que interveñen na hidrólisis de compostos orgánicos nitrogenados como a quitina e as proteínas.
- Fosfatasa alcalina, implicada na adquisición de P, catalizando a hidrólisis de compostos orgánicos de fósforo,
- Encimas con actividade peroxidasa, implicada na degradación de materia orgánica recalcitrante (Li et al., 2022), ou con actividade deshidrogenasa (DHR) ou ureasa (Lukwambe et al., 2018; Misic et al., 2011).

ST1.2.3. Análise da biomasa microbiana: abundancia e biodiversidade

Cuantificarase a abundancia total de procariotas en todas as mostras, mediante o cálculo da biomasa bacteriana e a biomasa bacteriana específica.

Para analizar a diversidade, de 1 g de mostra, realizarase a extracción de ADN da comunidade microbiana en 1 g de mostra do sedimento, mediante un kit de illamento de ADN en chans (Power Soil®) seguindo un protocolo optimizado (Ape et al., 2019), determinando a pureza do ADN e a concentración por espectrofotometría. As rexións hipervariables V3-V4 do xene 16rRNA se amplificarán utilizando os cebadores 5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3' e 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3', secuenciando a



continuación os produtos de PCR (Lukwambe et al., 2018).

Para a análise bioinformática dos datos, como paso inicial a secuenciación de lecturas unirase con FLASH. A continuación, os arquivos Raw FASTQ procesaranse utilizando Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME versión 1.8.0) (Caporaso et al., 2010). Os filotipos microbianos identificáronse mediante UCLUST e asignaranse a unidades taxonómicas operativas (OTU, 97% de similitude). O número de OTU de cada mostra utilizarase para representar a riqueza de especies (Lukwambe et al., 2018). A asignación taxonómica realizarase utilizando Greengenes 13.8 como base de datos de referencia, e as abundancias en cada mostra normalizaranse ao número de secuencias da mostra co menor número de lecturas retidas (Ape et al., 2019).

ST1.2.4. Análise comparativa entre distintas zonas de mostraxe

Mediante ferramentas de análises bioinformática e análise estatística, levará a cabo unha análise comparativa entre o substrato das zonas de Pontevedra e Barallobre, o que nos permitirá identificar posibles especies bacterianas asociadas á supervivencia dos moluscos, tanto boa como mala, que poderían pasar a formar parte do consorcio bacteriano a utilizar na estratexia de biorremediación.

Actividade 2. Illamento das bacterias prexudiciais e beneficiosas asociadas ao cultivo da ameixa e do berberecho.

T2.1. Illamento bacteriano a partir de bivalvos.

Os moluscos serán recolleitos en varios puntos das rías galegas, e trasladados vivos ás instalacións do CETGA, onde se estabularán en caixas de cultivo para levar a cabo os ensaios posteriores. Á súa chegada ao CETGA, levará a cabo o illamento e identificación das bacterias presentes nas mostras de ameixa e berberecho baixo as condicións do momento de mostraxe, que serán adoptadas como condicións ambientais normais, ou basales. Mostrearanse un total de 10 exemplares de cada lote.

A microbiota do tracto gastrointestinal dos mariscos pódese dividir en dous grupos principais: a microbiota do lumen GI (microbiota alóctona) e a microbiota adherente á superficie da mucosa (microbiota autóctona). Co fin de illar ambos os grupos, a cada exemplar, extraeránselle asépticamente o manto, hepatopáncreas e branquia, que serán homoxeneizados en solución salina estéril para a súa sementa posterior. A continuación, mediante sementa en placas de agar con medios xerais e específicos, illaranse as bacterias dos distintos grupos. Unha vez sementadas, as placas se incubarán entre 2 e 7 días a 25°C en aerobiosis, sendo observadas diariamente para comprobar indicios de crecemento. En base ás súas características morfolóxicas, cada colonia de aspecto diferente será resembrada para obter un cultivo puro, que será mantido en refrixeración para levar a cabo as probas de caracterización.

-Illamento xeral de cepas bacterianas con protocolo estándar. Sementaranse por extensión alícuotas de 100 µl en placas de agar tripticosa soia (TSAm), agar sangue (Columbia Agar, CA), medio de Flexibacter maritimum (FMM) e agar con Infusión



Cerebro Corazón (BHIA) (Pronadisa), preparados segundo as instrucións do fabricante, engadindo un 1% extra de NaCl aos medios para facilitar o crecemento das bacterias mariñas con requirimentos extras deste compoñente.

-Illamento de bacterias acedo-lácticas. As bacterias acedo lácticas requiren medios ricos en nutrientes para o seu crecemento e desenvolvemento, como son os ambientes que imos estudar (Canak et al., 2024), polo que se illarán a partir de seméntaa en placas de agar sangue, no que crecen ben as bacterias Gram positivas. Seleccionaranse as bacterias catalasa negativas e Gram positivas, e confirmarase a produción de ácido láctico.

-Illamento de bacterias oxidantes do xofre. Os compostos reducidos do xofre, por exemplo o sulfuro de hidróxeno, son altamente reactivos e tóxicos. Como posible solución para retirar estes contaminantes do medio, propónse illar bacterias con capacidade de oxidación de xofre, que ademais poidan tamén tolerar cambios na salinidade e a temperatura. A confirmación de pertenza a este grupo levará a cabo mediante probas de oxidación de compostos de xofre.

De cada cultivo puro almacenarase unha alícuota en conxelación a -80°C en BHI cun 15% de glicerol como crioprotector, creando así un cepario que poderá ser utilizado posteriormente para a realización de distintos ensaios.

Actividade 3. Caracterización e selección de cepas probióticas.

T3.1. Caracterización de posibles cepas probióticas.

A selección de bacterias probióticas levará a cabo mediante distintas probas encamiñadas a detectar varias características nas bacterias illadas, responsables da capacidade probiótica das bacterias e/o de biorremediación do sedimento.

En base aos coñecementos cos que contamos na actualidade, propónse illar microorganismos que crezan en ambientes anoxixénicos ou sexan tolerantes a eles, así como á salinidade, e que á súa vez teñan o potencial de oxidar compostos do xofre, que se pensa podería estar en importantes cantidades nos sedimentos de cultivo de ameixa e berberecho. Demostrouse que o sulfuro de hidróxeno é tóxico para os animais acuáticos, xa que interfere na súa respiración e metabolismo, así como no seu desenvolvemento xeral, provocando un aumento directo da mortalidade. As posibles bacterias candidatas examinaranse en función da redución do pH e seleccionaranse bacterias oxidantes do xofre, que se someterán a probas de tolerancia á salinidade seguindo metodoloxías descritas na bibliografía dispoñible (Shinde et al., 2022). Paralelamente, investigarase a capacidade proteolítica e lipolítica dos illados, de forma similar á realizada en estudos de biorremediación en lagostino (*Litopenaeus vannamei*) (Ayuningrum et al., 2022; Zhu et al., 2019), que se tomará como modelo para o deseño experimental do procedemento de biorremediación.

Para enriquecer o consorcio bacteriano de interese, empregaranse tamén outros métodos descritos na bibliografía (Tuyet et al., 2022).



ST3.1.1. Actividade antimicrobiana e produción de substancias antibacterianas

Mediante ensaios de cohabitación, analizarase a inhibición do crecemento xerada polas distintas cepas probióticas illadas sobre as principais especies patóxenas que afectan o cultivo da ameixa e berberecho. Utilizaranse metodoloxías baseadas na difusión en agar dos sobrenadantes do cultivo das cepas bacterianas e a medición de halos de inhibición (Bhakta et al., 2023; Shinde et al., 2022).

Unha vez seleccionadas as cepas con efecto inhibitorio sobre o crecemento das diferentes cepas patóxenas, levará a cabo a análise da produción de substancias antibacterianas, seguindo a metodoloxía descrita por Nikoskelainen et al. (2001) con pequenas modificacións descritas por Kim e Austin (2008). Estas probas permitirannos avaliar se o efecto inhibitorio observado é debido a substancias extracelulares que produce a bacteria durante o seu crecemento.

ST3.1.2. Ensaio de tolerancia ao pH

Analizarase a capacidade de crecemento das cepas en medios de cultivo con pH acedo (simulando a secreción aceda do tracto intestinal) ou básico. Estes ensaios permitirán determinar de modo indirecto a capacidade de colonización do tracto gastrointestinal (Bhakta et al., 2023).

Analizarase tamén a capacidade de crecemento das cepas en medios suplementados con sales biliare, co fin de avaliar a capacidade de resistencia á acción das secrecións biliare.

ST3.1.3. Determinación da hidrofobicidade celular

A determinación da hidrofobicidade celular, que nos permitirá coñecer a capacidade de adhesión aos tecidos das cepas illadas, levará a cabo mediante o método descrito por Ocaña et al. (1999) de adhesión microbiana a hidrocarburos.

ST3.1.4. Ensaio de tolerancia á salinidade

Analizarase a capacidade de crecemento das cepas baixo distintas salinidades.

ST3.1.5. Capacidade de produción de ácido láctico

A produción de ácido láctico confirmarase indirectamente mediante seméntaa en placas de agar MRS (especialmente indicado para o crecemento e recuento de Lactobacillus) con 0,1% de púrpura de bromocresol, que é violeta a pH neutro e amarelo a pH acedo, o que permite detectar a produción de ácido polas distintas cepas bacterianas.

ST3.1.6. Capacidade de oxidación de compostos de xofreA capacidade de oxidación de compostos de xofre confirmarase mediante ensaios de detoxificación de sulfuro de hidróxeno (Shinde et al., 2022) e de oxidación do tiosulfato a sulfato, mediante



espectrofotometría tras a precipitación con cloruro de bario (Cha et al 1999; Behera et al. 2014).

T3.2. Identificación das cepas probióticas.

Unha vez realizada a caracterización in vitro das cepas potencialmente probióticas, as cepas seleccionadas serán identificadas mediante espectrometría de masas, MALDITOF, e secuenciación do xene ARN 16S, utilizando metodoloxías descritas na Actividade 1.

T3.3. Formulación e preparación do consorcio de microorganismos (inóculo) ou material (inorgánico) a empregar para lavar a cabo a biorremediación.

En función dos resultados das análises realizadas, que permitirán determinar os factores limitantes que afectan o crecemento dos bivalvos, e en base aos coñecementos cos que contamos na actualidade, definiranse as características dos microorganismos probióticos a empregar. Utilizando o software Minitab v.14 (paquete estatístico que permite determinar, en función das súas capacidades, a combinación de bacterias a utilizar e as súas proporcións) (Shinde et al., 2022), formularase o consorcio de microorganismos a utilizar na estratexia de biorremediación, seleccionando os illados bacterianos que exercen reducións significativas no nivel de pH, maior produción de ións de sulfato, tolerancia ao sal, non hemolíticos e non tóxicos en organismos mariños.

ST3.3.1. Confirmación da inocuidade das cepas seleccionadas

Comprobarase a inocuidade das cepas seleccionadas como posibles cepas probióticas, en ensaios de infección por inmersión con ameixas, levados a cabo no Laboratorio de Experimentación animal do CETGA.

Ademais, analizarase de modo indirecto a posible patoxenicidade mediante probas in vitro (capacidade de hemólises, posesión de xenes de virulencia,...).

ST3.3.2. Confirmación da inexistencia de efectos antagónicos no consorcio bacteriano

Tras a formulación do consorcio bacteriano, levarán a cabo ensaios de antagonismo ou inhibición para confirmar que as mesturas sexan compatibles e asegurar así o crecemento de todos os microorganismos que formen parte do consorcio.

Actividade 4. Análise do efecto da baixa salinidade sobre a abundancia de bacterias probióticas asociadas ao cultivo da ameixa e do berberecho.

T4.1. Cultivo dos bivalvos baixo distintas salinidades.

A continuación, levarán a cabo ensaios de cultivo das ameixas baixo diferentes salinidades, analizando o efecto destes cambios sobre a viabilidade dos exemplares, e sobre a abundancia das bacterias identificadas previamente. Deste xeito, a información obtida poderá ser utilizada para enriquecer o consorcio bacteriano,



seleccionando bacterias que contribúan a proporcionar un mellor estado sanitario das ameixas ante os cambios de salinidade.

Actividade 5. Ensaios de biorremediación ambiental con cepas probióticas.

T5.1. Validación da eficacia dos probióticos ou cóctel de probióticos baixo condicións de cultivo semiindustrial.

As cepas que obtivesen os mellores resultados *in vitro* respecto á súa caracterización como potenciais probióticos, e que á súa vez mostrasen a súa inocuidade na tarefa anterior, serán cultivadas para desenvolver un cóctel de probióticos, cuxa eficacia será validada en ensaios de cultivo *in vivo* de ameixas nas instalacións do CETGA, nos que o cóctel microbiano será engadido ao substrato das ameixas, monitorizando a continuación o desenvolvemento do cultivo e realizando un seguimento da evolución dos parámetros físico-químicos (contido de materia orgánica, nitritos, amoníaco, pH...) e biolóxicos (especies bacterianas presentes). Nestes ensaios incluírase un grupo control en cuxo substrato non se engadirán os probióticos, que será analizado do mesmo xeito que os lotes tratados.

ST5.1.1. Determinación do mellor método de entrega dos probióticos

Analízanse distintos métodos de entrega dos probióticos:

- Pellets celulares en auga de mar filtrada (Zhang et al., 2021).
- Liofilizados, utilizada con frecuencia en ensaios no medio natural (Garcias-Bonet et al., 2023).
- Vehiculizados en microalgas, para incrementar a estabilidade.

ST5.1.2. Optimización da composición cualitativa e cuantitativa do consorcio de probióticos

Analízarase o efecto de varios consorcios de probióticos, realizando os cambios necesarios, tanto na composición como na concentración, para incrementar a súa eficacia.

T5.2. Validación da eficacia do probiótico ou cóctel de probióticos en condicións de cultivo intensivo.

Os cócteles de probióticos que ofrecen os mellores resultados nas probas *in vitro* e na validación preliminar *in vivo* levada a cabo na tarefa previa serán validadas no medio natural, nos parques de cultivo das rías galegas, analizando a continuación a evolución dos lotes tratados en comparación con lotes non tratados. Analízarase o efecto sobre o crecemento dos moluscos e o seu estado sanitario.

ST5.2.1. Determinación do estado sanitario dos bivalvos unha vez implantada a biorremediación

Unha vez implantada a estratexia de biorremediación, analízanse a actividade bactericida da hemolinfa, actividade fagocítica, actividade da superóxido dismutasa



(SOD), capacidade antioxidante total, recuento total de hemocitos, e as actividades da catalasa, fenoloxidasa e profenoloxidasa, parámetros que segundo a bibliografía ven influenciados positivamente polos probióticos en varias especies de moluscos (Čanák et al., 2024).

ST5.2.2. Determinación do efecto da estratexia de biorremediación sobre as características físico-químicas e biolóxicas do substrato

Tras a implantación da estratexia de biorremediación, repetiranse as análises levadas a cabo na Actividade 1, ao comezo do proxecto, comparando os resultados de ambas as mostraxes para analizar a eficacia do proceso de biorremediación.

A α -diversidade analizarase mediante o número de OTUs e os índices de uniformidade de Chao1, Shannon-Wiener e Simpson. Utilizarase a proba t de Student para avaliar a significación estatística das diferenzas entre as mostrax dos distintos grupos. Para avaliar o efecto do consorcio bacteriano sobre a composición taxonómica e a estrutura da comunidade bacteriana dos bivalvos, os datos analizaranse mediante tres métodos estatísticos multivariantes non paramétricos (Procedemento de Permutación de Respostas Múltiples [MRPP], Adonis e Análises de similitudes [ANOSIM]) utilizando o índice de disimilitud de Bray-Curtis (Zhang et al., 2021; Lukwambe et al., 2018).

Actividade 6. Plan de divulgación dos resultados, detallando e especificando individualmente os medios e alcance da publicación autonómica, nacional ou internacional.

O Plan de divulgación deseñado para o proxecto BIOREM desenvolverase segundo un plan de acción cuxos obxectivos son:

- Dar a coñecer prácticas e tecnoloxías innovadoras, para mellorar a sustentabilidade e resiliencia fronte ao cambio climático na actividade acuícola marisqueira.
- Transferir ás empresas do sector os coñecementos, produtos e tecnoloxías obtidos a partir do proxecto, para incrementar a súa competitividade e produtividade.
- Aproveitar sinerxias con outros axentes da cadea de valor acuícola e potenciar a comunicación con grupos clave do sector.
- Ampliar o enfoque sobre a importancia da acuicultura e o impacto social.

Accións de divulgación e difusión:

- Creación de material de difusión: crearase un logo do proxecto que sirva como imaxe corporativa propia.
- Publicidade a través das páxinas web dos socios do consorcio: manterase un sitio web actualizado con información sobre o proxecto, resultados, informes e recursos



para acceder a investigación. Así mesmo, tamén se dará difusión da concesión do proxecto nas webs corporativas de todos os socios da agrupación, incluíndo unha ligazón permanente ás páxinas web do proxecto. Se se realizan eventos, seminarios ou conferencias anunciaranse nestas.

-Divulgación de noticias do proxecto a través de redes sociais: crearase unha conta de Linkedin exclusiva para o proxecto, co propósito de compartir actualizacións e noticias pertinentes, para fomentar a interacción coa comunidade.

-Publicación de artigos en prensa divulgativa, tanto en revistas do sector como dirixidas ao público en xeral: contactarase con medios xerais de noticias, así como con revistas especializadas do sector para a difusión das noticias e dos fitos máis relevantes do proxecto, por exemplo: MisPeces, IPacuicultura, Fishealth Forum, WeAreAquaculture etc. Ademais, contéplase a publicación de polo menos 1 artigo en revistas científicas de alto impacto e acceso aberto, así como a difusión a través do repositorio institucional da universidade, tamén de acceso aberto.

-Realización de eventos de difusión e divulgación de coñecementos. Realizarase unha xornada para dar a coñecer o proxecto. Ademais, levará a cabo un evento de difusión final para dar a coñecer os resultados definitivos obtidos durante o proxecto, dirixido tanto ao público en xeral, como ao persoal especializado do sector acuícola

-Asistencia a congresos especializados do sector acuícola: O consorcio participará en eventos, seminarios e conferencias nacionais e internacionais relacionadas co sector acuícola (Foro de Recursos Mariños e Rías Galegas, Foro Iberoamericano de Recursos Mariños e Acuicultura, Congreso Nacional de Acuicultura, SeaFood Expo Global, Aquafuture Spain, Aquaculture Europe...) para dar a coñecer o proxecto e os seus logros. Os resultados divulgaranse nun mínimo de 2 congresos ou foros científicos.

Que a Consellería do Mar e o Centro Tecnolóxico do Cluster da Acuicultura consideran esencial o establecemento de accións conxuntas de carácter colaborativo, compartindo os riscos e obxectivos que permitan realizar os traballos no marco do proxecto para realizar o estudo das estratexias de biorremediación na ameixa xaponesa e no berberecho.

Que os intereses converxentes das partes asinantes exclúen o ánimo de lucro, e non poden satisfacerse axeitadamente mediante a celebración dun contrato dos contemplados na Lei 9/2017, de 8 de novembro, de Contratos do Sector Público, ou doutro instrumento alleo á natureza estritamente convencional.

En atención ao exposto, e a fin de dar cumprimento ao preceptuado no artigo 15.2 da Lei 1/2016, de 18 de xaneiro, de transparencia e bo goberno, estímase xustificado o recurso á sinatura do instrumento convencional que se pretende, con exclusión doutras figuras.

E para que conste, asínase esta memoria, en Santiago de Compostela

