

Short Communication

**Protocolo para obtención de alevines axénicos de trucha arcoíris
(*Oncorhynchus mykiss*)**

María Fernanda Jiménez-Reyes^{1,2}, Gabriel Yany² & Jaime Romero¹

¹Laboratorio de Biotecnología, INTA-Universidad de Chile, Santiago de Chile

²Escuela Ciencias del Mar, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso

Corresponding author: Jaime Romero (jaime.m.romero@gmail.com)

RESUMEN. El presente trabajo describe protocolo sobre la aplicación del desinfectante Buffodine® y un mix de antibacterianos para obtener alevines axénicos de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Este protocolo permitió obtener y mantener alevines axénicos de trucha por un periodo de 26 días. Este periodo permite aplicaciones como ensayos con organismos gnotobióticos, una herramienta fundamental en los estudios para el entendimiento de la interacción bacteria-hospedero o parásito-hospedero.

Palabras clave: *Oncorhynchus mykiss*, gnotobiótico, axénico, alevín, desinfectante, antibacteriano.

Protocol for obtaining rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) axenic fingerlings

ABSTRACT. In this paper a protocol based on the application of Buffodine® disinfectant and a mix of antibacterials for obtaining rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) axenic fingerlings is described. This allowed to obtain and maintain axenic trout fingerlings for a period of 26 days. This time allow to achieve a gnotobiotic organism, a fundamental tool in studies of the understanding bacteria-host interaction or host-parasite interaction.

Keywords: *Oncorhynchus mykiss*, gnotobiotic, axenic, fingerling, disinfectant, antibacterial.

Las investigaciones en organismos gnotobióticos (composición bacteriana conocida), buscan demostrar la influencia que pueden ejercer las bacterias de la microbiota sobre el hospedero en varios aspectos como inmunidad, nutrición, entre otros (Husebye, 1997; Rawls *et al.*, 2004; Bates *et al.*, 2006; Swaim *et al.*, 2006; Pham *et al.*, 2008; Nayak, 2010; Forberg *et al.*, 2012; Situmorang *et al.*, 2014). Previo al trabajo con organismos gnotobióticos, es necesario la obtención de un organismo axénico (libre de microorganismos); esta estrategia es útil para esclarecer el mecanismo de interacción que se genera entre la bacteria y el hospedero, a nivel celular y molecular, y así comprender una serie de procesos a nivel *in vivo* (Bates *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2007; Pham *et al.*, 2008; Forberg *et al.*, 2011; Situmorang *et al.*, 2014).

Uno de los primeros grupos de investigación en obtener peces axénicos fue el de Rawls *et al.* (2004), quienes observaron que la microbiota intestinal en mono-asociación con el pez cebra (*Danio rerio*) axénico, influía en la regulación de la expresión significativa en

aproximadamente 212 genes, relacionados con la estimulación de la proliferación epitelial, del metabolismo de nutrientes y la respuesta inmune innata a nivel intestinal, indicando que la interacción que se genere con el hospedero es dependiente del tipo de bacteria que lo colonice.

Bates *et al.* (2006), observaron la importancia que ejerce la microbiota intestinal en el desarrollo y función del tracto digestivo. Estos autores determinaron en peces cebra (*D. rerio*) axénicos, que la ausencia de bacterias de la microbiota intestinal en el hospedero, disminuía la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (enzima asociada con la detoxificación bacteriana por la endotoxina lipopolisacárido, para controlar la inflamación intestinal) y reducía la cantidad de células de la mucosa en el borde en cepillo, inhibiendo la absorción de proproteínas en el intestino distal. Sin embargo, al reintroducir la microbiota en estos peces estos cambios se revertían.

Rekecki *et al.* (2009, 2012), cuestionaron la utilización del pez cebra como modelo de estudio para

peces de cultivo, ya que la mayoría de éstos, son marinos y se encuentran filogenéticamente distantes de los peces cebras. Forberg *et al.* (2012), se motivaron para estudiar un protocolo para obtener larvas axénicas de bacalao común (*Gadus morhua*), logrando desarrollar un sistema de alimentación de las larvas con rotíferos gnotobióticos, que permite ingresar los microorganismos al tracto digestivo y prolongar las fases del estudio en estado gnotobiótico. Con esto pudieron observar larvas de bacalao en mono-asociación con algunas bacterias intestinales (vivas y muertas), las que lograron inducir diferencialmente la expresión significativa de algunos genes como farnesil difosfato sintetasa (*fdps*) y glutatión peroxidasa (*gpx*), indicando que la respuesta del hospedero es dependiente de la viabilidad microbiana y no de las interacciones con bacterias como partículas (bacterias muertas).

En Chile la exportación de salmónidos es la más importante actividad acuícola. Esta actividad es amenazada por enfermedades de origen bacteriano que afectan a las principales especies cultivadas, *Salmo salar*, *Onchorynchus mykiss* y *Onchorynchus kisutch*. Por esta razón, este trabajo busca generar un protocolo para obtener alevines axénicos de trucha arcoíris (*O. mykiss*), como parte de una estrategia para estudiar las relaciones hospedero-bacteria y hospedero-patógeno. Esto permitiría aumentar nuestro conocimiento acerca de las relaciones y efectos que podrían ejercer algunas de las bacterias de la microbiota pertenecientes al tracto intestinal sobre el hospedero, en particular algunas señaladas como abundantes y comunes, por ejemplo, *Shewanella* y *Lactococcus* (Navarrete *et al.*, 2010). De esta forma, se podrá proponer posibles probióticos que promuevan la protección contra patógenos. Se debe considerar que la trucha arcoíris y otros salmónidos cultivados en Chile tienen un proceso de desarrollo a baja temperatura (8-10°C), lo cual impone una dificultad adicional dado que la absorción del saco vitelino conlleva mucho más tiempo que en otros modelos y contrasta con los modelos de pez cebra (26°C; Rawls *et al.*, 2004) y con las investigaciones realizadas en otros peces como la lubina (*Dicentrarchus labrax*) (16°C, Rekecki *et al.*, 2012). En salmónidos como la trucha arcoíris (*O. mykiss*), la absorción del saco vitelino toma entre 50 a 70 días post-eclosión, a una temperatura de 10°C, considerada óptima para su desarrollo (Kraus, 1999).

En este estudio se describe un protocolo para obtener alevines axénicos de trucha arcoíris hasta la reabsorción del saco vitelino. Esto permite promover a esta especie como modelo de estudio para las otras especies de salmónidos, contribuyendo con la investigación para el mejoramiento de la calidad y competitividad de la producción de salmónidos.

Para este trabajo se utilizaron 500 ovas de trucha arcoíris, con 280 Unidades Térmicas Acumuladas (UTAs), provenientes de la Piscicultura Huililco, Pucón, Chile. Las ovas se encontraban libres de virus (ISAv e IPNV) o de cualquier otra enfermedad de origen bacteriano. Las ovas se incubaron en oscuridad, a temperatura de $10 \pm 1^\circ\text{C}$ y aireación continua. Las ovas de trucha arcoíris presentaron una carga bacteriana inicial promedio de $2,9 \times 10^5$ UFC (Unidades Formadoras de Colonias) por ova. Esta cifra que se asemeja a los resultados obtenidos por Barker *et al.* (1989), Romero & Navarrete (2006) y Wagner *et al.* (2012), quienes observaron que las ovas de salmónidos alcanzaban una carga bacteriana promedio de 1×10^7 UFC ova⁻¹, debido a la presencia de componentes del corion que proveen nutrientes que favorecen el establecimiento o crecimiento bacteriano (Romero & Navarrete, 2006).

La estrategia para conseguir peces axénicos se basa en tratar las ovas y enfocarse en la reducción de la carga bacteriana presente en el corion. En consecuencia, para disminuir la carga bacteriana del corion de las ovas de trucha, se utilizó el desinfectante Buffodine®, en una relación 1:100, solución en la cual las ovas con 280 UTAs fueron sumergidas por 10 min. Este tratamiento se realizó diariamente y se extendió por cuatro días (320 UTAs), manteniendo siempre las ovas a una temperatura de 10°C. Según Trust (1974) y Salvesen & Vadstein (1995), este desinfectante logra reducir considerablemente las bacterias de la ova, coincidiendo con lo observado en el presente estudio, en que la carga bacteriana de las ovas disminuyó 10.000 veces, llegándose a niveles de solo 6,7 UFC por ova (Fig. 1). No obstante, este tratamiento no logró conseguir el estado axénico de las ovas.

Al alcanzar las 330 UTAs, las ovas comenzaron el proceso de eclosión de manera natural.

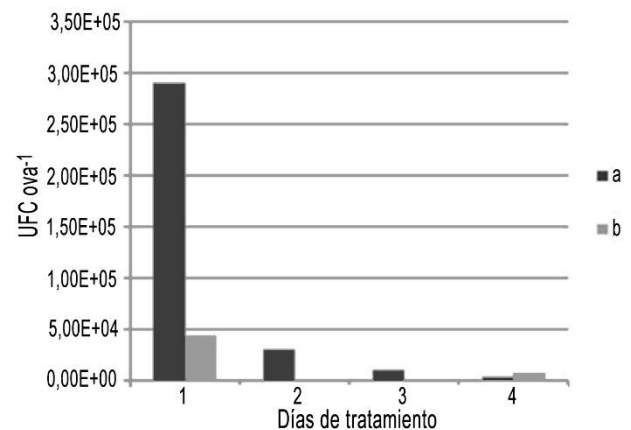


Figura 1. Recuento bacteriano en ovas con ojo de trucha arcoíris, a) Previo a desinfección, b) post-desinfección con Buffodine®.

Los restos de corion fueron removidos prontamente apenas se produjo la eclosión. Luego, los alevines fueron lavados con Buffodine® en una relación 1:1000, por 1 min y luego distribuidos en botellas de cultivo celular con capacidad para 200 mL. Estas botellas contenían un medio llamado APT (agua previamente tratada) que consiste en agua con una dureza de 60 mg L⁻¹ de CaCO₃, filtrada por microporo de Micropore® de 0,22 µm y autoclavada a 121°C por 20 min. A este medio se agregó, un mix de antibacterianos, que contenía 5 µg mL⁻¹ de kanamicina, 100 µg mL⁻¹ de ampicilina, 100 µg mL⁻¹ de ceftazidima y 10 µg mL⁻¹ de cloranfenicol.

Los antibacterianos kanamicina y ampicilina fueron utilizados siguiendo el protocolo utilizado por Rawls *et al.* (2004) y Bates *et al.* (2006). La ceftazidima y el cloranfenicol fueron preparados según Li *et al.* (1999). Algunos de estos antibacterianos como la ampicilina han sido utilizados en estudios para obtener larvas axénicas de lubina (*D. labrax*), bacalao común (*G. morhua*) y tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Dierckens *et al.*, 2009; Rekecki *et al.*, 2009, 2012; Forberg *et al.*, 2011; Situmorang *et al.*, 2014). Sin embargo, existen bacterias Gram negativas resistentes a los antibacterianos ampicilina y kanamicina y, además, se ha evidenciado que esta clase de bacterias (Gram negativas), es la que predomina en las ovas de salmónidos, de acuerdo a observaciones realizadas previamente por Romero & Navarrete (2006). Con base a esto, se escogieron ceftazidima y cloranfenicol, como antibacterianos complementarios que poseen acciones equivalentes al mix ampicilina y kanamicina en el mix de antibacterianos y la dosis a utilizar se basó en un estudio de susceptibilidad realizado por Li *et al.* (1999).

A partir del día de la eclosión (330 UTAs), los alevines de trucha arcoíris se mantuvieron con aireación continua, temperatura de 10 ± 1°C y fotoperíodo controlado (12:12 h luz:oscuridad) (Sørensen & Weber, 1995; Aegerter & Jalabert, 2004). Cada tres días, se trataron con Buffodine® (1:1000 por 1 min) y un mix antibacteriano que se cambiaba a diario, durante un período de 35 días post-eclosión (dpe). Sin embargo, se observó crecimiento bacteriano tanto en alevines como en el medio durante los 35 dpe. En alevines, la carga bacteriana promedio varió entre 1 y 14 UFC alevín⁻¹, no obstante, se observaron algunos días en que la carga bacteriana resultó 0, indicando la persistencia de bacterias a pesar de los tratamientos (Fig. 2). Por otra parte, en el medio APT, donde se encontraban los alevines de trucha arcoíris, la carga bacteriana promedio fue baja, oscilando entre 1 y 5 UFC mL⁻¹. Sin embargo, se registraron más días en los cuales no hubo presencia bacteriana, indicando que las bacterias detectadas estarían asociadas a los alevines más que al medio (Fig. 3).

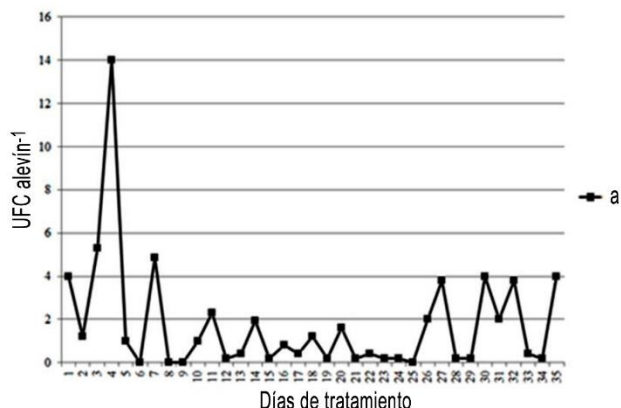


Figura 2. Tratamiento con antibacteriano post-eclosión. a) Recuento bacteriano en alevín de trucha arcoíris (UFC alevín⁻¹).

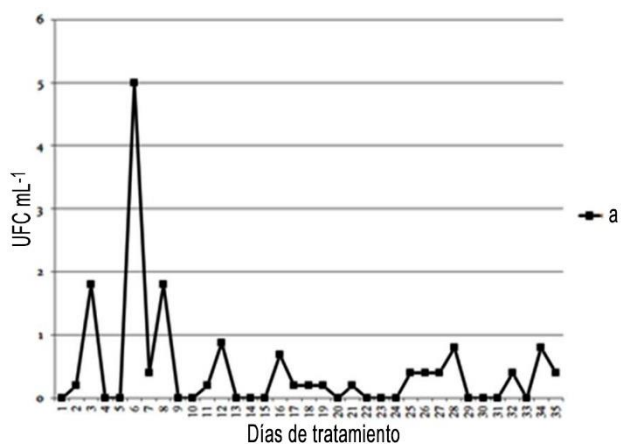


Figura 3. Tratamiento con antibacteriano. a) Recuento bacteriano en el medio donde estaban los alevines de trucha arcoíris (UFC mL⁻¹).

Al determinar que la presencia bacteriana fue persistente tanto en alevines como en el medio, se procedió a aislar y caracterizar las bacterias que se observaron en los recuentos. Se lograron aislar cinco colonias diferentes, entre cocos y bacilos Gram positivos, posiblemente estas bacterias correspondían a epibiotas de las ovas (Romero & Navarrete, 2006). Posteriormente, se determinó la susceptibilidad de estos microorganismos a los antibacterianos citados anteriormente mediante la prueba de concentración mínima inhibitoria-CMI (Andrews, 2001). La dosis utilizada en el CMI fue de 5, 10, 20 y 40 µg mL⁻¹ de kanamicina, 200, 400, 800 y 1600 µg mL⁻¹ de ampicilina, 200, 400, 800 y 1600 µg mL⁻¹ de ceftazidima y 20, 40, 80 y 160 µg mL⁻¹ de cloranfenicol. Se encontró que los cinco aislados bacterianos fueron susceptibles a 10 µg mL⁻¹ de kanamicina, 400 µg mL⁻¹ de ampicilina, 400 µg mL⁻¹ de ceftazidima y 20 µg mL⁻¹ de cloranfenicol (Tabla 1).

Tabla 1. Susceptibilidad a los antibacterianos de los aislados bacterianos constantes tanto en medio como en alevín. CMI para los aislados bacterianos (colonias diferentes), presentes en el medio y alevines de trucha arcoíris.

Antibacterianos ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Aislados bacterianos				
	1	2	3	4	5
Kanamicina	20	10	20	10	10
Ampicilina	400	400	400	400	400
Ceftazidima	400	400	400	400	400
Cloranfenicol	20	20	40	20	40

Según los resultados obtenidos en la prueba de CMI se puede determinar que para obtener alevines axénicos de trucha arcoíris, se necesita el doble o hasta cuatro veces más de antibacteriano (kanamicina y ampicilina) en comparación con la dosis utilizada por otros trabajos para obtener larvas axénicas de algunas especies de cultivo (Dierckens *et al.*, 2009; Rekecki *et al.*, 2009,

2012; Forberg *et al.*, 2011; Situmorang *et al.*, 2014). Con el propósito de lograr la obtención de organismos axénicos, es indispensable realizar un seguimiento en los días posteriores a la eclosión, de la carga bacteriana tanto de alevines como del medio, y mediante la prueba de CMI, estimar la concentración de antibacteriano a administrar para erradicar aquellos microorganismos resistentes (Situmorang *et al.*, 2014).

Por consiguiente, se reajustó la dosis de antibacteriano a utilizar en alevines a partir de los 36 dpe. El tratamiento con el mix de antibacterianos con la modificación de dosis consistió en $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina, $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ampicilina, $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ceftazidima y $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cloranfenicol. Este tratamiento se alternó con la aplicación del desinfectante Buffodine® (1:1000 por 1 min). Esto permitió reducir la carga bacteriana promedio del medio de 2 a 0 UFC mL^{-1} y en alevines la carga bacteriana se mantuvo en 0 UFC alevín⁻¹ por un período de 26 días (Fig. 4).



Figura 4. Tratamiento con antibacteriano después del CMI, comenzado a partir a los 36 dpe. Recuento bacteriano en el medio (UFC mL^{-1}) y alevín de trucha arcoíris (UFC alevín⁻¹).



Figura 5. Secuencia protocolo para obtención de alevines axénicos de trucha arcoíris. pre y post-concentración mínima inhibitoria (CMI).

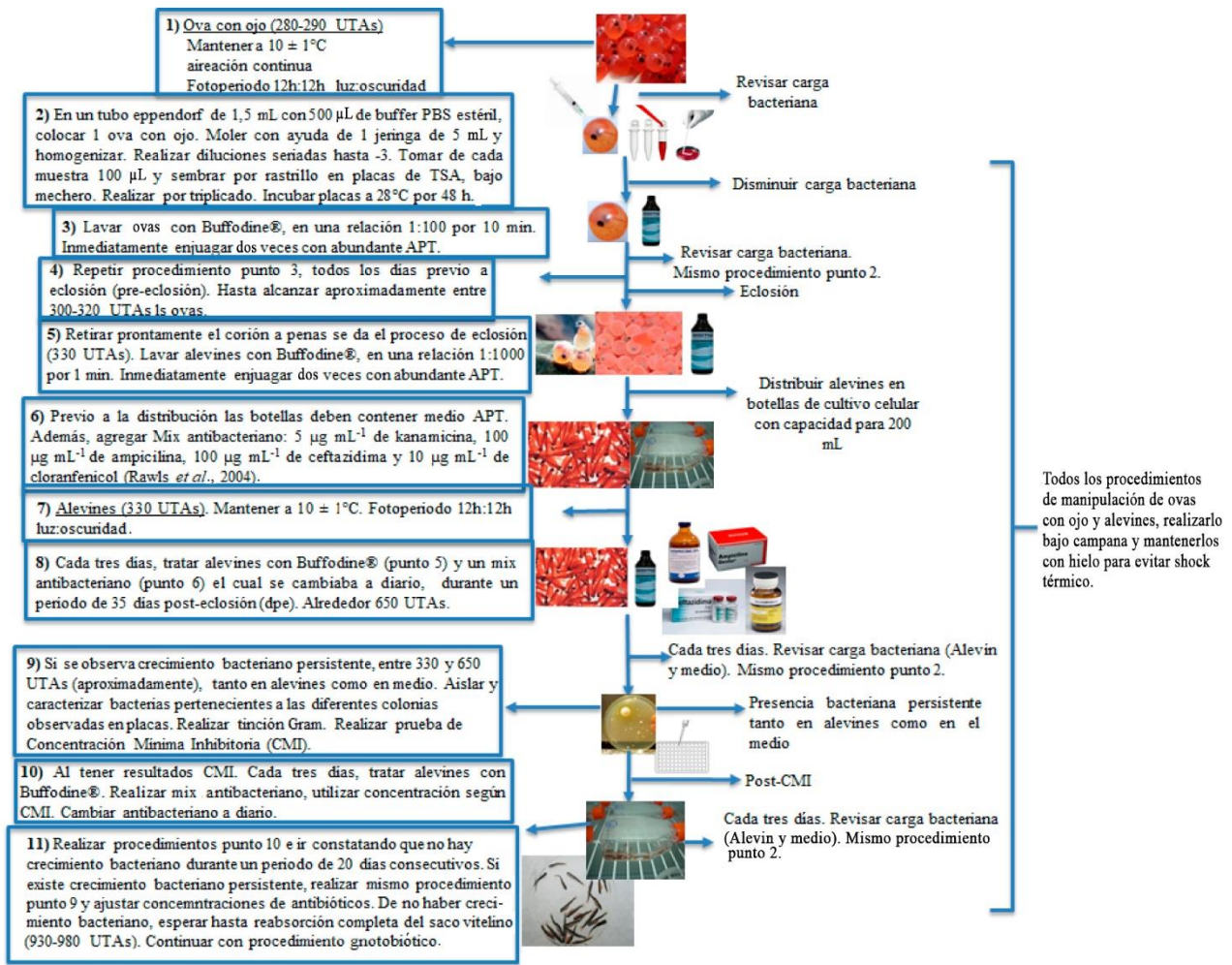


Figura 6. Esquema protocolo para obtención de alevines axénicos de trucha arcoíris.

En conclusión, se logró obtener un protocolo de desinfección con Buffodine® y tratamiento con antibacterianos que permitieron mantener a los alevines axénicos de trucha arcoíris (*O. mykiss*) por un período de 26 días (Figs. 5, 6). Esto permitiría utilizar a esta especie, como modelo biológico para las especies de salmónidos de importancia para la acuicultura chilena. Asimismo, la obtención de organismos axénicos permitirían aplicaciones como ensayos con organismos gnotobióticos, una herramienta fundamental en los estudios para el entendimiento de la interacción bacteria (probiótico)-hospedero o parásito (patógeno)-hospedero.

REFERENCIAS

- Aegerter, S. & B. Jalabert. 2004. Effects of post-ovulatory oocyte ageing and temperature on egg quality and on the occurrence of triploid fry in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 231: 59-71.
- Andrews, J.M. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.*, 48: 5-16.
- Barker, G.A., S.N. Smith & N.R. Bromage. 1989. The bacterial flora of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, and brown trout, *Salmo trutta* L., eggs and its relationship to developmental success. *J. Fish Dis.*, 12: 281-293.
- Bates, J.M., E. Mittge, J. Kuhlman, K.N. Baden, S.E. Cheesman & K. Guilleim. 2006. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. *Dev. Biol.*, 297: 374-386.
- Dierckens, K., A. Rekecki, S. Laureau, P. Sorgeloos, N. Boon, W. Van den Broeck & P. Bossier. 2009. Development of a bacterial challenge test for gnotobiotic sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Environ. Microbiol.*, 11(2): 526-533.
- Forberg, T., A. Arukwe & O. Vadstein. 2011. A protocol and cultivation system for gnotobiotic Atlantic cod larvae (*Gadus morhua* L.) as a tool to study host microbe interactions. *Aquaculture*, 315: 222-227.

- Forberg, T., R.I. Vestrum, A. Arukwe & O. Vadstein. 2012. Bacterial composition and activity determines host gene-expression responses in gnotobiotic Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *Vet. Microbiol.*, 157: 420-427.
- Husebye, E. 1997. The stimulatory influence of the intestinal microflora on gastrointestinal motility and myoelectric activity of small intestine. In: P.J. Heidt, V. Rusch & D. van der Waaij (eds.). *Gastro-intestinal motility*. Old Herborn University, Herborn & Herborn Litterae, Seminar Monographs 9: pp. 41-52.
- Kraus, F. 1999. A guide to classroom salmon egg incubation in Alaska. Alaska Department of Fish and Game, Special publication N°99-2: 37 pp.
- Li, J., J. Yie, R.W.T. Foo, J.M.L. Ling, H. Xu & N.Y.S. Woo. 1999. Antibiotic resistance and plasmid profiles of *Vibrio* isolates from cultured silver sea bream. *Sparus sarva*. *Mar Pollut Bull.*, 39(1-2): 245-249.
- Navarrete, P., F. Magne, P. Mardones, M. Riveros, R. Opazo, A. Suau, P. Pochart & J. Romero. 2010. Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fems Microbiol. Ecol.*, 71(1): 148-156.
- Nayak, S.K. 2010. Review: Probiotics and immunity: a fish perspective. *Fish Shellfish Immunol.*, 29: 2-14.
- Pham, L.N., M. Kanther., I. Semova & J.F. Rawls. 2008. Methods for generating and colonizing gnotobiotic zebrafish. NIH-PA Author Manuscript; available in PMC, 3 (12): 1862-1875.
- Rawls, J.F., B.S. Samuel & J.I. Gordon. 2004. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *PNAS Microbiology*, 101(13): 4596-4601.
- Rekecki, A., K. Dierckens, S. Laureau, N. Boon, P. Bossier & W. Van den Broeck. 2009. Effect of germ-free rearing environment on gut development of larval sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture*, 293: 8-15.
- Rekecki, A., R.A.Y.S.A. Gunasekara, K. Dierckens, S. Laureau, N. Boon, H. Favoreel, M. Cornelissen, P. Sorgeloos, R. Ducatelle, P. Bossier & W. Van den Broeck. 2012. Bacterial host interaction of GFP-labelled *Vibrio anguillarum* HI-610 with gnotobiotic sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), larvae. *J. Fish Dis.*, 35: 265-273.
- Romero, J. & P. Navarrete. 2006. 16S rDNA-based analysis of dominant bacterial populations associated with early life stages of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Microbiol. Ecol.*, 51: 422-430.
- Salvesen, I. & O. Vadstein. 1995. Surface disinfection of eggs from marine fish: evaluation of four chemicals. *Aquacult. Int.*, 3: 155-171.
- Situmorang, M.L., K. Dierckens, F.T. Mlingi, B. Van Delsen & P. Bossier. 2014. Development of a bacterial challenge test for gnotobiotic Nile tilapia *Oreochromis niloticus* larvae. *Dis. Aquat. Org.*, 109: 23-34.
- Smith, K., K.D. McCoy & A.J. Macpherson. 2007. Review: use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin. Immunol.*, 19: 59-69.
- Sørensen, B. & R.E. Weber. 1995. Effects of oxygenation and the stress hormones adrenaline and cortisol on the viscosity of blood from the trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.*, 198: 953-959.
- Swaim, L.E., L.E. Connolly, H.E. Volkman, O. Humbert, D.E. Born & L. Ramakrishnan. 2006. Mycobacterium marinum infection of adult zebrafish causes caseating granulomatous tuberculosis and is moderated by adaptative immunity. *Infect. Immunol.*, 74(11): 6108-6117.
- Trust, T.J. 1974. Sterility of salmonid roe and practicality of hatching gnotobiotic salmonid fish. *Appl. Microbiol.*, 28(3): 340-341.
- Wagner, E.J., R.W. Oplinger & M. Bartley. 2012. Laboratory and production scale disinfection of salmonid eggs with hydrogen peroxide. *N. Am. J. Aquacult.*, 74: 92-99.

Received: 19 May 2016; Accepted: 8 July 2017