



Puyana Peña, J.C.(1,*), Muñoz Ruiz, M.J.(1) y Brokate Llanos, A.M.(1)

(1) Departamento de Biología Molecular e Ingeniería Bioquímica/CABD-UPO, Ctra. Utrera Km 1. 41013 - Sevilla

INTRODUCCIÓN

La acuicultura es un sector de gran importancia cuyo desarrollo se encuentra limitado por varios factores, entre los que se encuentra la necesidad de *Artemia* para alimentar a las larvas de peces. Este producto se extrae de lagos naturales y su disponibilidad supone un cuello de botella en el desarrollo de la acuicultura. Una alternativa puede ser el nematodo *C. elegans* debido a su fácil cultivo alimentado con bacterias, a su rápida multiplicación mediante autofecundación y a su capacidad de vivir tanto en medios sólidos como en medios líquidos [1]. Para ello, se ha realizado una adaptación a diferentes concentraciones de sal en medio líquido. Se está desarrollando un protocolo para producir nematodos utilizando subproductos de la industria alimentaria para generar un alimento libre de patógenos para larvas de peces y, al mismo tiempo, reutilizar un producto que de otra manera sería desechable. Además, se está investigando el uso de nematodos como vector de bacterias probióticas y otros compuestos [2].

RESULTADOS

Prueba de crecimiento de *C. elegans* con *E. coli* a diferentes condiciones salinas

El crecimiento de los nematodos se produce en medio estándar, placas NGM (*Nematode Growth Medium*) a una concentración de 51 mM de NaCl. Posteriormente, se han traspasado nematodos en fase L4 a una placa NGM de 100 mM NaCl para comenzar a acondicionar a los nematodos a las condiciones salinas del agua de mar.

Una vez adaptados a 100 mM NaCl en medio sólido, se ha llevado a cabo la adaptación en medio líquido. Para ello, se realizó una preparación de huevos según protocolo sobre la placa de 100 mM NaCl, y se pasaron 5000 nematodos a 10 mL de medio líquido (S-Medium) 100 mM NaCl con *E. coli* 3%. Posteriormente, se realizan pases a las concentraciones superiores del mismo modo (Figura 1).



Figura 1. Adaptación sucesiva de *C. elegans* en matraces Erlenmeyer de 100 mL con S-Medium + *E. coli* a diferentes concentraciones de NaCl. Cada flecha indica el traspaso de 5000 nematodos, en cualquier estadio del desarrollo, a excepción de la primera en la que se traspararon L1, desde un medio no saturado.

Estimándose que una cifra >50000 nematodos/mL supone un valor significativo de crecimiento, se ha obtenido un crecimiento óptimo en medio líquido con *E. coli* al 3% de 77000 y 69800 nematodos/mL para 100 y 200 mM NaCl en 5 días, respectivamente, y de 50039 nematodos/ml en 300 mM NaCl en 7 días, siendo bajo en 400 mM NaCl, con 23660 nematodos/mL tras 7 días. Por ello, se ha decidido trabajar con los adaptados a 100 y 300 mM de NaCl, principalmente.

Adaptación de *C. elegans* a subproducto de la industria alimentaria en medio líquido

Se ha probado la adaptación de nematodos procedentes de matraces Erlenmeyer de 100 y 300 mM NaCl a nuevos matraces que contenían S-Medium no compuesto por *E. coli*, sino por subproductos de la industria alimentaria. El proceso de adaptación ha conllevado sucesivas renovaciones en los medios líquidos, con la transferencia de 5000 nematodos a 10 mL nuevos de medio de cultivo. Tras cuatro renovaciones de medio, se han obtenido los valores más elevados de crecimiento en 100 mM NaCl con 5 y 10% de subproducto, con 99133 y 109133 nematodos/mL, respectivamente (Figura 2).

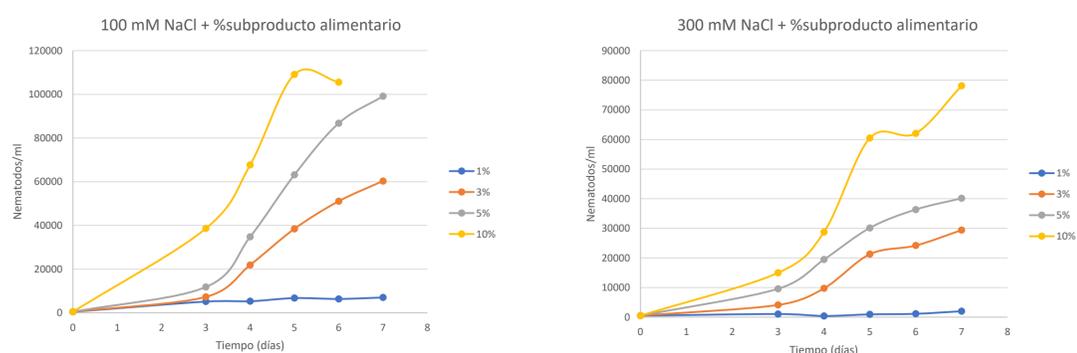


Figura 2. Adaptación de *C. elegans* en S-Medium + subproducto alimentario a 100 y 300 mM NaCl. Se muestra el número de nematodos/mL obtenido en el cuarto pase de medio en presencia del 1, 3, 5 y 10% del subproducto tanto para los nematodos previamente adaptados a 100 mM como a 300 mM de NaCl.

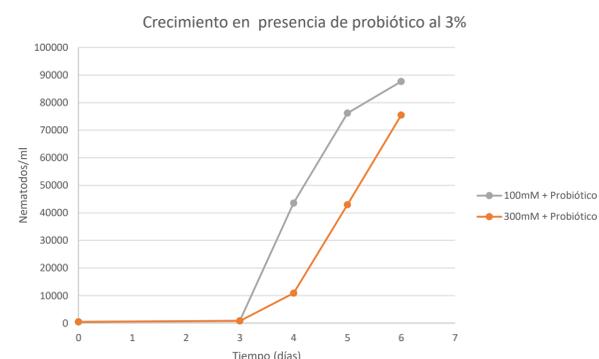


Figura 3. Adaptación de *C. elegans* a 100 y 300 mM NaCl en presencia de probiótico al 3%. Se muestra la cantidad de nematodos obtenidos en 6 días en las condiciones de 100 y 300 mM NaCl.

Prueba de crecimiento de *C. elegans* con un probiótico bajo condiciones salinas

De la misma manera a como ha sucedido con *E. coli*, también se está tratando a *C. elegans* con probióticos al 3%, para luego realizar otra adaptación posterior a subproducto de la industria alimentaria. Se han alcanzado valores de 87700 y 75500 nematodos/mL (Figura 3).

CONCLUSIONES

- Es posible adaptar a *C. elegans* a condiciones de estrés salino empleando *E. coli* como alimento, siendo 100 y 300 mM NaCl las condiciones de mejor crecimiento.
- Es posible adaptar los nematodos a condiciones salinas de 100 y 300mM en presencia de un subproducto alimentario.
- Los nematodos han conseguido adaptarse a 100 y 300 mM NaCl siendo alimentados con bacterias probióticas de peces.

REFERENCIAS

1. Nigon, V.M., Félix, M.A.. History of research on *C. elegans* and other free-living nematodes as model organisms. *WormBook*. 2017;2017:1-84. doi:10.1895/wormbook.1.181.1
2. Schulenburg H, Félix MA. The natural biotic environment of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 2017;206(1):55-86. doi:10.1534/genetics.116.195511