

Development of a

GNOTOBIOTIC GROWTH MODEL SYSTEM FOR *Dicentrarchus labrax* LARVAE

MASTER'S THESIS

Chemotherapeutic and antimicrobial disinfectant compounds, have long been used to control the aquatic microbial environment. However, this practice promoted the emergence and dissemination of antibiotic-resistant bacteria, in livestock and aquaculture facilities, reduced prophylactic efficacy control, transferred resistance to human pathogens and caused adverse ecological impacts.

Beneficial probiotic bacteria, is a preventive and prophylactic alternative to control microbiota. Although the importance of proper control is generally acknowledged, the role and mode of action of probiotic strains requires studying. Better understanding of the mechanisms involved in host-microbe relationships is essential to develop effective solutions of disease control for the aquaculture industry.

One strategy is to define the cultured organisms performance under germ-free conditions, before evaluating the effects of supplementary strains. The development of a standardized gnotobiotic culture system to provide essential framework conditions and enable further strains testing is fundamental. The European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, one of the most economically important cultured marine species in Europe, is an excellent model for evaluating such interactions.

Efforts were made to combine available information with feasible and effective procedures, to establish a standardized culture system model for *D.labrax* gnotobiotic larvae, under circumstances, which in the future, may be relevant to the aquaculture industry.

In an attempt to obtain axenic larvae, eggs were surface disinfected upon arrival and part of the experimental sets designed to study the effects of such chemical procedures on hatchability and survival of the eggs.

Bacteria density based on number of colonies growing on classical medium, after egg/larvae homogenised solutions incubation, was used to evaluate the bactericidal effect of the different chemical treatments and verify the axenic state, throughout hatching and development of sea bass larvae.

New rotating devices and two introductory strain regimes were evaluated by analyses of larvae mortality/survival rates. Although the devices imposed stress on larvae, they are probably the best means to maintain bacteria and yeast cells in suspension.

The system design facilitated adjustment of important variables, axenic egg hatching and successful maintenance of larvae under gnotobiotic conditions, for the first 13 days.

Surface disinfection with 100 mg.L⁻¹ glutaraldehyde for 5 min, and further antibiotics supplements (ampicillin and rifampicin, 10 mg.L⁻¹ each), was highly efficient in reducing microbial load and enhancing early larval survival, for all evaluated set-up groups. In general, no major differences were observed in the morphological development pattern, between the individuals reared in both the control and the glutaraldehyde disinfection treatments.

Aeromonas hydrophila, Wild Type *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast and its mnn9 isogenic mutant, acted as neutral microorganisms, not influencing the larvae performance during 13 days.

Keywords: Dicentrarchus labrax, gnotobiotic, axenic, probiotics, hatching and larval survival.

Desenvolvimento de um

SISTEMA MODELO DE CRESCIMENTO GNOTOBIÓTICO PARA LARVAS *Dicentrarchus labrax*

TESE DE Mestrado

Compostos quimioterapeutas e desinfectantes antimicrobianos, têm sido usados para controlo do ambiente microbiano aquático. Porém, esta prática, promoveu o surgimento e proliferação de estirpes bacterianas resistentes a antibióticos, nos organismos aquáticos e instalações de cultivo, reduziu a eficácia do controlo profilático, transmitiu aos humanos patógenos resistentes e causou impactos ambientais adversos.

O emprego de estirpes bacterianas probióticas, é uma alternativa profilática para controlo microbacteriano. Embora a importância do controlo seja reconhecida, o papel e modo de actuação das estirpes probióticas requerem mais estudos. Um melhor reconhecimento dos mecanismos nas relações hospedeiro-microorganismo é essencial ao desenvolvimento de soluções alternativas para controlo de patologias na indústria da aquacultura.

Uma estratégia coerente, apreciará o desempenho dos organismos cultivados em condições axénicas, avaliando posteriormente o efeito induzido pelas estirpes suplementares. Um sistema de cultivo gnotobiótico, que promova as condições-chave para avaliação de estirpes diversas, é fundamental. O robalo, *Dicentrarchus labrax*, economicamente das espécies marinhas mais importantes na Europa, é o modelo perfeito para avaliar tais interações.

Procurou-se conciliar a informação disponível com procedimentos mais recentes e eficazes, estabelecendo um modelo padronizado para o cultivo de larvas gnotobióticas de *D. labrax*, em circunstâncias as quais, no futuro, poderão ser relevantes à aquacultura industrial.

Com vista à obtenção de larvas axénicas, à chegada desinfectou-se a superfície dos ovos, sendo parte das experiências planeadas para estudar o efeito dos protocolos de desinfecção na taxa de eclosão e sobrevivência dos ovos.

A densidade bacteriana, baseada no número de colónias de crescimento em meios nutritivos clássicos, após incubação do homogeneizado de ovos/larvas, foi utilizada na avaliação do efeito bactericida dos diferentes tratamentos químicos e verificação do estado axénico, durante a eclosão e desenvolvimento das larvas.

Novos dispositivos rotativos e dois regimes com suplementos de duas estirpes diferentes, foram avaliados por análise das taxas de mortalidade/sobrevivência larvar. Embora os dispositivos rotativos causem tensão nas larvas, são provavelmente o melhor meio para manter bactérias e células de fermento em suspensão.

O sistema em desenvolvimento permitiu ajustar variáveis importantes, suportando uma eclosão em ambiente axénico e manutenção eficaz das larvas em condições gnotobióticas durante 13 dias.

A desinfecção superficial com 100 mg.L⁻¹ glutaraldeído durante 5 min, suplementada com antibióticos (ampicilina e rifampicina, 10 mg.L⁻¹ cada), foi eficaz na redução da carga microbiana, melhorando significativamente as taxas de sobrevivência larvar, dos grupos em avaliação. Num contexto geral, nenhuma diferença de maior, fora observada entre o padrão de desenvolvimento morfológico dos indivíduos cultivados nos grupos de controle e desinfecção com glutaraldeído, respectivamente.

Aeromonas hydrophila, leveduras de padeiro *Saccharomyces cerevisiae* (estirpe selvagem) e seu mutante isogénico mnn9, agiram como estirpes microbianas neutras, sem influenciar o desenvolvimento larvar durante os primeiros treze dias.

Palavras-chave: *Dicentrarchus labrax*, gnotobiótico, axénico, probióticos, eclosão e sobrevivência larvar.